



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química

MATHEUS BARROS GARCEZ

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO COM PEPTÍDEO
SINTÉTICO MIMÉTICO DE HSP60: UMA NOVA
ABORDAGEM PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE**

SÃO LUÍS – MA

2025

MATHEUS BARROS GARCEZ

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO COM PEPTÍDEO
SINTÉTICO MIMÉTICO DE HSP60: UMA NOVA
ABORDAGEM PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão (PPGQuim - UFMA), como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Luiza Maria Ferreira Dantas.

SÃO LUÍS – MA

2025

Garcez, Matheus Barros.

Imunossensor eletroquímico com peptídeo sintético mimético de HSP60 : uma nova abordagem para o diagnóstico da hanseníase / Matheus Barros Garcez. - 2025.

61 p.

Orientador(a): Luiza Maria Ferreira Dantas.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - Ma, 2025.

1. Mycobacterium Leprae. 2. Mpml14. 3. Antígeno. 4. Hsp60. 5. Biossensor. I. Dantas, Luiza Maria Ferreira. II. Título.

MATHEUS BARROS GARCEZ

**IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO COM PEPTÍDEO
SINTÉTICO MIMÉTICO DE HSP60: UMA NOVA
ABORDAGEM PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão (PPGQuim - UFMA), para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 27/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luiza Maria Ferreira Dantas (Orientadora UFMA)
Universidade Federal do Maranhão -UFMA

Prof. Dr. Luiz Ricardo Guterres e Silva (UFMA)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Paulo Cesar Mendes Villis (UNICEUMA)
Universidade Ceuma - UNICEUMA

*Dedico à minha família, que me ajudou até aqui
e sempre me incentivou a fazer boas escolhas
na vida.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder fôlego de vida e força em meu corpo e mente para seguir todos os dias da jornada acadêmica do mestrado.

Aos meus pais, Alúcio e Eliane, por toda dedicação, apoio e esforço para me verem feliz, realizado e contente. Pelos abraços carinhosos de minha mãe e pela satisfação no sorriso de meu pai ao me apoiar. Meus profundos agradecimentos também à minha irmã, Andressa.

À minha querida e amada namorada, Thaiz, por seu amor, carinho e compreensão, que me confortaram durante toda a árdua caminhada.

Aos meus familiares, que me envolveram com seus sorrisos e nunca mediram esforços para me ajudar. Sou eternamente grato e imensamente feliz por terem feito parte dessa conquista.

À minha orientadora, professora Luiza Dantas, pela disponibilidade, paciência e boa vontade em orientar-me desde a graduação; à professora Laís Brazaca, que me auxiliou durante minha estadia na USP de São Carlos com orientações pertinentes aos meus estudos; e à professora Ilanna Campelo, por sua assistência fundamental ao trabalho. Aos demais professores, que sempre estiveram presentes e dispostos a auxiliar em meu trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao Laboratório de Eletroquímica da UFMA (LELQ), incluindo todos os professores que contribuíram para meu trabalho, toda a equipe e colegas. Agradeço também ao Laboratório de Pesquisa de Automação Analítica (LPAA); ao LabGeM, por fornecer os materiais necessários para a realização deste projeto, e a todos que participaram dessa parceria. Ao grupo de pesquisa Bioanalítica, Microfabricação e Separação (BioMicS), situado no IQSC-USP, e seus membros, que me ajudaram nos momentos em que mais precisei.

À CAPES, pela bolsa de estudo, e à FAPEMA e ao CNPq, que financiaram os recursos necessários para a realização deste projeto.

À UFMA e ao PPGQuim – UFMA, pela oportunidade de cursar o mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram e colaboraram para a conclusão deste projeto, meus mais sinceros agradecimentos.

“Nossas lentes podem se sujar com ódio, raiva e insatisfação; entretanto, tudo o que necessitamos para que a paz reine em nossos corações é Deus.”

Thaiz Carvalho

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela *Mycobacterium leprae*, cujos principais sintomas incluem lesões cutâneas e perda de sensibilidade. Embora a doença tenha cura, pode deixar sequelas se o tratamento for iniciado tardiamente. Neste sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS) busca novas estratégias para o diagnóstico precoce e para minimizar a incidência da doença. Neste trabalho é descrito o uso do MPML14, um peptídeo sintético que mimetiza a proteína de choque térmico HSP60, para fabricação de um imunossensor eletroquímico *label-free* para a detecção de anticorpos IgG *anti-M. leprae*. O peptídeo foi imobilizado na superfície do eletrodo serigrafado de ouro por meio de monocamadas automontadas e, posteriormente, funcionalizado com N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). O MPML14 foi então adsorvido quimicamente na superfície do transdutor. As etapas de modificação foram caracterizadas quimicamente por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), e fisicamente por microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS). Foi possível avaliar a performance do biossensor por voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) com soros positivos e negativos para hanseníase e a melhor resposta foi obtida por VPD. O volume de solução peptídica foi avaliado e escolhido como sendo 7 μ L. Foi realizado um estudo utilizando diferentes concentrações de amostras, no qual toda a faixa de concentrações testada demonstrou uma resposta qualitativa capaz de distinguir soros positivos de soros negativos. A concentração que apresentou o melhor desempenho foi 1:200 (v:v). Por fim, a especificidade do biossensor foi avaliada com amostras de crianças saudáveis e adultos com HIV ou leishmaniose. E todas estas amostras apresentaram respostas semelhantes às amostras de soro negativo, provando a excelente especificidade do biossensor. Este estudo sugere que o biossensor eletroquímico baseado no MPML14 é promissor para uso em diagnóstico de hanseníase.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*; MPML14; Antígeno; HSP60; Biossensor.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*, whose main symptoms include skin lesions and loss of sensitivity. Although the disease has a cure, it can leave sequelae if treatment is started late. In this sense, the World Health Organization (WHO) seeks new strategies for early diagnosis and to minimize its incidence. This work reports the use of MPML14, a peptide that mimics the heat shock protein HSP60 present in the bacillary wall of the *M. leprae*, for the manufacture of a label-free electrochemical immunosensor for the detection of anti-leprosy IgG antibodies. The peptide was immobilized on the surface of the gold screen-printed electrode by means of self-assembled monolayers and subsequently functionalized with EDC and NHS. MPML14 was then chemically adsorbed on the surface of the transducer. The modification steps were chemically characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and physically by scanning electron microscopy coupled to dispersive energy spectroscopy (SEM-EDS). The performance of the biosensor was evaluated using differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) with positive and negative sera for leprosy, with the best response obtained by DPV. The volume of peptide solution was evaluated and chosen as 7 μL . A study was carried out using different sample concentrations, in which the entire range of concentrations tested demonstrated a qualitative response capable of distinguishing positive sera from negative sera. The concentration that showed the best performance was 1:200 (v:v). Finally, the specificity of the biosensor was evaluated with samples from healthy children and adults with HIV or leishmaniasis. All these samples showed similar responses to the negative serum samples, proving the excellent specificity of the biosensor. This study suggests that the MPML14-based electrochemical biosensor is promising for use in leprosy diagnosis.

Keywords: *Mycobacterium leprae*; MPML14; Antigen; HSP60; Biosensor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. Hanseníase	18
2.1.1. Diagnóstico	19
2.2. Biossensores	20
2.2.1. Biossensores Enzimáticos	21
2.2.2. Genossensores	22
2.2.3. Biossensor Celular	22
2.2.4. Imunossensor	23
2.2.5. Biossensor peptídico	24
2.3. Monocamadas automontadas	24
2.4. Peptídeo	25
2.4.1. MPML14	26
2.5. Proteínas de Choque Térmico	27
2.6. Biossensores Eletroquímicos para Hanseníase	27
2.7. Técnicas Eletroquímicas	28
2.7.1. Voltametria cíclica (VC)	29
2.7.2. Voltametria de Pulso Diferencial	30
2.7.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
4.1. Instrumentação	35
4.2. Reagentes e Soluções	35
4.3. Ativação do Eletrodo serigrafado de Ouro	36
4.4. Construção do Biossensor	36
4.5. Incubação das Amostras	37

4.6.	Medidas Eletroquímicas	37
4.7.	Amostras de Pacientes	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	Tratamento do Eletrodo	39
5.1.1.	Voltametria Cíclica	39
5.1.2.	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	40
5.2.	Etapas da construção do Biossensor por EIS	41
5.3.	Caracterização do Biossensor	43
5.3.1.	Voltametria de Pulso Diferencial	43
5.3.2.	Espectroscopia de impedância eletroquímica	44
5.3.3.	MEV	45
5.4.	Otimização do volume de solução de peptídeo	47
5.5.	Avaliação das diluições dos <i>pools</i>	48
6.	Estudo de seletividade	50
7.	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Biossensor <i>labelled</i> . (B) Biossensor <i>label-free</i>	21
Figura 2: Diagrama esquemático de uma monocamada automontada.	25
Figura 3: (A) Variação do potencial em função do tempo na VC; (B) Representação da variação da corrente em função do potencial (voltamograma).....	30
Figura 4: (A) Sinais de excitações para voltametria de pulso diferencial. (B) Variação da corrente capacitiva e faradaica em função do tempo de pulso. (C) Voltamograma resultante.....	31
Figura 5: (A) Circuito equivalente. (B) Gráfico de Nysquist para o modelo simplificado de célula de Randles.	33
Figura 6: Processo de fabricação do biossensor.	36
Figura 7: Sistema eletroquímico.....	37
Figura 8: (A) VC em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ com SPGE sem tratamento e com tratamento, insert: SPGE sem tratamento. (B) VC em K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4 com SPGE sem tratamento e com tratamento. Passo de potencial de 5 mV, velocidade de 100 mVs ⁻¹	40
Figura 9: Gráfico de Nyquist com SPGE sem e com tratamento, insert: SPGE sem tratamento. Condições experimentais: K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4 na faixa de frequência de 1.10 ⁵ - 0,1 Hz.	41
Figura 10: Etapas da construção do biossensor	41
Figura 11: (A) Gráfico de Nyquist em diferentes etapas de fabricação do biossensor. (B) Efeito da etapa de modificação sobre o valor da resistência à transferência de carga. Condições experimentais: K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4 na faixa de frequência de 1.10 ⁵ – 0,1 Hz.....	42
Figura 12: (A) corrente relativa usando K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4 com BIO, BIO/SP e BIO/SN. (B) variação relativa de I _p após incubação com SN (1:100) e SP (1:100). Condições experimentais: faixa de potencial de -0,3 a +0,6 V, amplitude de pulso de 0,05 V, período de pulso (t _{pulso}) de 50 ms e velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹	44
Figura 13: (A) Gráfico de Nyquist com BIO, BIO/SN e BIO/SP. (B) variação relativa de R _{tc} do BIO após incubação com SN (1:100) e SP (1:100). Condições experimentais: K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol L ⁻¹ em T. Fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4 na faixa de frequência de 1.10 ⁵ – 0,1 Hz.	45

Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura para diferentes etapas de modificação do biossensor para (A) SPGE; (B) SPGE/3AMP; (C) SPGE/3AMP/EDC+NHS; (E) mapeamento de elementos do SPGE-BIO.....	46
Figura 15: Espectroscopia de energia dispersiva das diferentes etapas de modificações para (A) SPGE; (B) SPGE/3AMP; (C) SPGE/3AMP/EDC-NHS; e (D) BIO.	47
Figura 16: Variação relativa de I_p em $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4 com BIO/SN (—) e BIO/SP (—) em diferentes volumes de solução peptídica (5, 7 e 10 µL).	48
Figura 17: (A) Respostas de correntes relativas para BIO/SP e (B) histograma com corrente de pico relativa para BIO/SP sob condições otimizadas do BIO após incubação em amostras de soro positivo diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) a diferentes diluições (v/v; 1:50, 1:80, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:600).	48
Figura 18: (A) Variação relativa de I_p sob condições otimizadas do BIO após incubação em amostras de soro positivo e negativo diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) a diferentes diluições (v/v; 1:80, 1:50, 1:200, 1:400 e 1:600). (B) Histograma do BIO/SN e BIO/SP para diferentes diluições.	49
Figura 19: Histogramas das respostas eletroquímicas do biossensor incubado com amostras de criança (BIO/CRI), leishmaniose (BIO/LEI) e HIV (BIO/HIV) em diluições de 1:200.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3AMP	Ácido 3-mercaptopropiônico
AC	Corrente Alternada
AM	Azul de Metileno
ASB	Albumina de soro bovino
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
Epa	Potencial de Pico Anódico
Epc	Potencial de Pico Catódico
GTA	Glutaraldeído
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IgG	Imunoglobulina G
Ipa	Corrente de Pico Anódica
Ipc	Corrente de Pico Catódica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NHS	N-hidroxisuccinimida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	<i>Phage Display</i>
PGL-1	Phenolic Glycolipid-1
R_{sol}	Resistência da Solução
R_{tc}	Resistência à Transferência de Carga
R^2	coeficiente de determinação
S_{comb}	desvio padrão combinado
ssDNA	DNA de Fita Simples
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
ΔE_p	diferença de Potencial de Pico
BIO	Biossensor
BIO/SN	Biossensor incubado com amostra de soro negativo para hanseníase
BIO/SP	Biossensor incubado com amostra de soro positivo para hanseníase

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença que afeta milhares de pessoas por todo o mundo. Entre os países com maiores índices de novos casos, destaca-se a Índia e o Brasil, países que apresentam baixos índices de desenvolvimento social e econômico (CARVALHO et al., 2018; GAMA et al., 2018; ROSA et al., 2024). O Brasil está entre os poucos países que não atingiram a meta de menos de um caso a cada 10.000 habitantes (MONTANHA et al., 2023).

Mundialmente, o número de novos casos relatados está diminuindo desde 2010, com uma diminuição de 1 % ao ano. Cada país deve atingir a meta de menos de 1 caso a cada 10.000 habitantes para que não seja considerado um problema de saúde pública (OMS, 2021). Porém, a hanseníase é classificada como uma doença tropical negligenciada segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (RIBEIRO et al., 2023). Mas também pode ser classificada como doença duplamente negligenciada por afetar principalmente populações pobres com pouca capacidade de vocalização e poder político de países com baixo poder econômico que apresenta dificuldade para combater esta doença.

Embora, nos últimos 30 anos, mais de 30 milhões de pacientes tenham sido curados da hanseníase, a incidência da doença ainda é alta, chegando a 200.000 novos casos a cada ano (LETURIONDO et al., 2019). Já em 2020, a taxa de detecção de novos casos teve uma redução de 37 % em comparação com 2019, causada pela superlotação dos hospitais devido a pandemia do COVID-19 (BARBOSA et al., 2022).

Mycobacterium leprae (*M. leprae*) é a bactéria causadora da hanseníase, doença que causa lesões em nervos periféricos e na pele (QUEIROZ et al., 2019). Trata-se de um patógeno intracelular obrigatório com tropismo para células de Schwann e macrófagos. (CABRAL et al., 2022). Tem um crescimento extremamente lento com tempo de geração entre 12 a 14 dias, além de não se desenvolver em meios artificiais (JIN; AHN; AN, 2018).

A rota de transmissão ainda necessita de provas, mas acredita-se que a principal rota seja por meio de exposição ao bacilo presentes em aerossóis expelidos por indivíduos com altas cargas bacterianas (CABRAL et al., 2022). Os contatos de pacientes multibacilares são de 5 a 8 vezes mais propícios a desenvolver a doença (SCHREUDER; NOTO; RICHARDUS, 2016).

A hanseníase tem cura e pode ser tratada submetendo o paciente a uma terapia desenvolvida pela OMS em 1982, a poliquimioterapia (PQT), que consiste na administração de diversos medicamentos combatentes contra a *M. leprae*. Os principais medicamentos utilizados na PQT são a dapsona, rifampicina, clofazimina, minociclina, claritromicina e ofloxacina (ACEBRÓN-GARCÍA-DE-EULATE; BLUNDELL; VEDITHI, 2021). Embora esta estratégia seja altamente eficaz no tratamento de casos individuais, não impede a propagação da doença (SAUNDERSON; FASTENAU, 2022).

Para reduzir a disseminação da doença e diminuir o risco de incapacidade física, o diagnóstico precoce é a estratégia principal (GAMA et al., 2020). Exames neurológicos, dermatológicos e testes de esfregaço de pele para visualização do bacilo em microscópio são algumas das avaliações clínicas aplicadas para o diagnóstico da hanseníase, tais métodos podem ser suficientes para o diagnóstico da maioria dos casos (AFONSO; MADURRO; BRITO-MADURRO, 2021). Porém, alguns pacientes podem apresentar baciloscopia negativa para esfregaços de pele (TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015). Sendo assim, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, que tenham alta sensibilidade e especificidade, e que não necessitam de profissionais altamente treinados, além de poderem ser realizados sem necessidade de transporte da amostra, ou seja, o teste é realizado no local de coleta da amostra (*point-of-care*), são extremamente necessários (AFONSO; MADURRO; BRITO-MADURRO, 2021).

A incapacidade de cultivar a *M. leprae* em meios artificiais tem dificultado o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. No entanto, atualmente, a bioinformática e a sequência do genoma de *M. leprae* abrem novas possibilidades para a pesquisa sobre hanseníase.

Peptídeos sintéticos e materiais recombinantes estão sendo cada vez mais explorados para desenvolvimento de métodos de diagnósticos precoce da hanseníase (YOTSUMOTO NETO et al., 2019). Os peptídeos possuem boa estabilidade, afinidade com o analito alvo, resistência a ambientes hostis e devido ao seu tamanho reduzido apresenta maior densidade de imobilização e maior facilidade de se ligar a um anticorpo, devido à sua estrutura conformacional que deixa o epítipo mais exposto (QI et al., 2014; VANOVA et al., 2021).

A bioconjugação pode ser utilizada como estratégia para fabricação de biossensores, possibilitando utilizar um peptídeo como bioreceptor visando a sua interação com um anticorpo específico (LIU; WANG; BOYD, 2015). As técnicas eletroquímicas podem ser empregadas para a visualização da mudança de sinal provocada

por esta interação, por meio da variação de corrente, potencial, condutância ou resistência (BALABAN HANOGLU et al., 2024). Estas técnicas são promissoras por apresentarem alta sensibilidade e possibilitarem a miniaturização do sistema para aplicação em análises *in situ*, característica que a OMS define como requisito para fabricação de biossensores (WU et al., 2023a).

Neste trabalho, o peptídeo MPML14, mimético do antígeno HSP60 da *Mycobacterium leprae*, foi utilizado para a fabricação de um imunossensor eletroquímico *label-free* capaz de detectar anticorpos IgG em soro sanguíneo de pacientes com hanseníase, utilizando um eletrodo serigrafado de ouro. Foi possível imobilizar o MPML14 por meio de uma estratégia com monocamada auto-organizada, na qual seu grupo terminal (-COOH) foi ativado com EDC e NHS para proporcionar uma ligação covalente com o peptídeo. O imunossensor apresentou respostas distintas quando incubado com soro positivo e soro negativo para hanseníase, demonstrando alta seletividade. Por fim, o imunossensor mostrou-se uma alternativa de baixo custo, inovadora, econômica, miniaturizada e com grande potencial para uso no diagnóstico da hanseníase, principalmente em países com baixo poder econômico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Hanseníase

A hanseníase é uma doença crônica causada pelo bacilo *M. leprae*, que provoca lesões à pele e aos nervos periféricos (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022). Os sintomas clínicos podem aparecer entre 2 e 7 anos após o paciente se tornar hospedeiro (CARVALHO et al., 2018; GUEVARA et al., 2022). Entre os sintomas, destacam-se lesões cutâneas, inflamação dos nervos, dor, perda de sensibilidade, atrofia e perda óssea (BOUTH et al., 2023). Além dos inúmeros malefícios à saúde física, a doença também carrega um forte estigma social.

A *M. leprae* infecta as células de *Schwann* presentes no sistema nervoso periférico. Essas células desempenham funções importantes, como a regeneração de nervos periféricos após sofrerem lesões, a produção das bainhas isolantes de mielina e o suporte trófico para os neurônios (MA; SVAREN, 2018; MONK; FELTRI; TAVEGGIA, 2015; MUNGROO; KHAN; SIDDIQUI, 2020). Devido ao longo tempo de replicação, é essencial que a *M. leprae* infecte a célula de *Schwann* para sua eventual sobrevivência (CHAVARRO-PORTILLO; SOTO; GUERRERO, 2019).

A bactéria tem forma de um bacilo ligeiramente curvo, com comprimento que varia de 1 a 8 μm e espessura de 0,2 a 0,5 μm . É álcool-ácido resistente, ou seja, não descolore quando lavada com álcool e ácido, devido ao seu alto teor lipídico (CHAVARRO-PORTILLO; SOTO; GUERRERO, 2019; SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022).

Pouco se sabe sobre a via de transmissão da bactéria, mas estudos mostram que pessoas que convivem com portadores de hanseníase possuem um risco maior de adquirir a doença (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022). Acredita-se que a principal rota de transmissão seja por meio de gotículas aerossol, que entram pela via respiratória (DE ABREU et al., 2014; PIERNEEF et al., 2021).

A doença pode ser classificada levando em consideração aspectos histopatológicos e critérios clínicos, bacteriológicos e imunológicos pelo método de Ridley e Jopling. As formas da doença são tuberculóide (TT), dimorfa tuberculóide (BT), dimorfa média (BB), dimorfa virchowiana (BL) e virchowiana (LL) sendo as formas TT e LL consideradas polares (CHAVARRO-PORTILLO; SOTO; GUERRERO, 2019; ROSA et al., 2024; SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022).

Para facilitar o diagnóstico e o tratamento da hanseníase, especialmente em países com baixa renda, a OMS criou uma classificação baseada, essencialmente, no número de lesões e na presença ou ausência de bacilos em baciloscopia cutânea. Os casos são classificados em multibacilares (MB), com mais de 5 lesões ou paucibacilares (PB) com 5 ou menos lesões cutâneas (DUTHIE et al., 2016).

2.1.1. Diagnóstico

Um paciente com suspeita de hanseníase, deve realizar exames laboratoriais, sendo a baciloscopia um dos mais utilizados e considerado padrão ouro (SIWAKOTI et al., 2016). Este exame consiste na coleta esfregaços de pele em locais padrão (com lesões cutâneas, lóbulos da orelha e cotovelos) para verificação se há presença dos bacilos com o auxílio de um microscópio (SIWAKOTI et al., 2016). Devido à resistência do bacilo ao álcool e ácido, utiliza-se a técnica de coloração de Ziehl Neelsen que consiste em deixar os bacilos avermelhados para posterior observação em microscópio (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022).

O ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) é um teste utilizado para verificar a presença de anticorpos combatentes ao bacilo (FABRI et al., 2016). O teste ELISA se baseia na interação chave-fechadura entre o anticorpo e o antígeno e é composto por um substrato sólido, um elemento de reconhecimento, uma parte de reconhecimento de sinal e um método de leitura (PENG et al., 2022). O PGL-1 (*Phenolic Glycolipid-I*) é um glicolípido que possui um trissacarídeo antigênico específico do *M. leprae*, bastante utilizado em testes ELISA para detectar anticorpos anti-PGL-1. Este marcador reflete a carga bacteriana e pode ser útil para a forma clínica da doença multibacilar (MB) (CHEN et al., 2022).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é baseada na replicação de DNA ou RNA, consistindo em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Essas etapas são repetidas diversas vezes aumentando exponencialmente a concentração do componente genômico (SAJEER PARAMABTH; VARMA, 2023). O gene 16S rRNA, específico de *M. leprae*, permitiu em um estudo com PCR a detecção positiva de 94% para pacientes com Hanseníase multibacilar e uma taxa menor para pacientes paucibacilar. A implementação da PCR para o diagnóstico da hanseníase apresenta limitações devido ao alto custo e à necessidade de equipamentos laboratoriais especializados. Além disso, como a PCR é apenas uma técnica de amplificação do DNA,

é necessário um método de detecção, o que dificulta ainda mais sua aplicação em países com altos índices de pobreza. (SILVA et al., 2024). Mesmo assim, o DNA de *M. leprae* pode ser detectado por PCR, facilitando o diagnóstico precoce da hanseníase, mesmo em pacientes com baixa carga bacteriana, como é o caso dos pacientes PB (MARTINEZ et al., 2014).

2.2. Biossensores

Os sensores podem ser classificados em físicos, quando detectam informações como luz, som, temperatura e pressão e em químicos, quando a informação a ser detectada for a composição, concentração e identidade da substância (YU et al., 2024). De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), sensores químicos são transdutores miniaturizados que respondem de forma seletiva e reversível a compostos químicos ou a íons, gerando um sinal elétrico mensurável que depende da concentração do analito (CHANDRA KISHORE et al., 2022).

Entre as diversas subclassificações de sensores, destacam-se os biossensores, que são dispositivos analíticos, contendo um elemento de reconhecimento biológico integrado a um transdutor. A IUPAC definiu biossensores como sensores que utilizam um mecanismo bioquímico como sistema de reconhecimento (DURMAZ et al., 2023).

Vários desses biossensores utilizam marcadores, que são moléculas adicionais capazes de gerar um sinal mensurável e que encarecem o sistema e apresentam tempo de ensaios mais longos. Na Figura 1A é apresentado um exemplo de biossensor *labelled* com um marcador fluorescente, neste caso o sinal é oriundo do marcador ligado ao anticorpo. Enquanto os biossensores *label-free* (sem rótulos) não necessitam desses marcadores para captar a interação bioquímica do analito com o bioreceptor (BARRIAS et al., 2019). Na Figura 1B é representado o esquema para o biossensor *label-free*, em que a interação bioquímica é monitorada pela variação de sinal da sonda redox devido ao bloqueio da superfície do transdutor. Neste caso, tem-se como referência o sinal gerado utilizando o biossensor (sem a presença dos anticorpos) como 100%, enquanto o sinal gerado pelo biossensor com os anticorpos gera um sinal menor (< 100%).

Biossensores possuem quatro partes principais, o bioreceptor, que interage com o analito; o transdutor, que traduz as informações químicas ou físicas oriundas da interação entre o receptor e o analito em sinais elétricos; e um sistema de equipamentos eletrônicos para processamento das informações (DURMAZ et al., 2023; NGUYEN et al., 2019;

SONG et al., 2021). Dependendo do receptor, as principais classes de biossensores podem ser enzimáticos, imunossensores, genossensores, celulares, peptídicos, entre outros. Essas classificações têm se expandido continuamente (ÖZSOYLU; WAGNER; SCHÖNING, 2022; SONG et al., 2021).

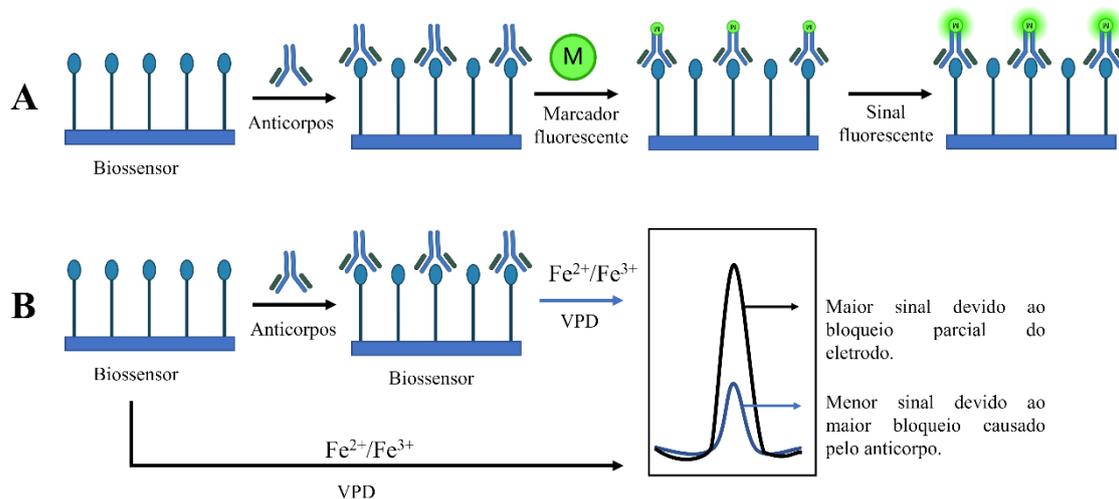


Figura 1: (A) Biossensor *labelled*. (B) Biossensor *label-free*.

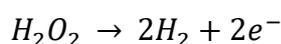
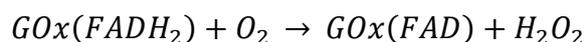
2.2.1. Biossensores Enzimáticos

Em um biossensor enzimático o elemento de reconhecimento utilizado é uma enzima que faz parte da matriz de suporte mantida na superfície do transdutor (NGUYEN et al., 2019). Com a característica de ter alta seletividade e ser sensível à molécula alvo, as enzimas realizam uma reação química que consome o substrato e gera um produto detectável por meio da geração de um sinal mensurável (SANTHA; DOBAY; HARSANYI, 2002).

Após a coleta do sinal amostral, o produto da reação enzimática é dissipado liberando o sítio ativo para reagir com outra molécula alvo (SANTHA; DOBAY; HARSANYI, 2002). O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lyons e utilizado para medir a glicose em pessoas diabéticas, o qual emprega a enzima glicose oxidase (GOx) na superfície de um transdutor para oxidar a glicose presente na matriz sanguínea do paciente, gerando o ácido glucônico e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como produtos (CHERAGHI et al., 2022; POHANKA, 2021). O H_2O_2 é oxidado devido à diferença de potencial aplicada e a corrente elétrica é mensurada, desta forma, o número de elétrons coletados é diretamente proporcional à quantidade de moléculas de glicose presentes (MOHAMAD NOR; RIDHUAN; ABDUL RAZAK, 2022). As reações que

ocorrem são representadas na Reação 1. No entanto, devido ao alto custo com fios maciços de platina e prata, aos procedimentos de ensaios e a facilidade de alteração com fatores físicos e químicos, este biossensor tornou-se obsoleto e foi sofrendo melhorias até que se chegasse à quarta geração, em que não se usa mais uma enzima (NAIKOO et al., 2023; POHANKA, 2021).

Reação 1: Princípio geral de um biossensor eletroquímico de glicose baseado em flavina adenina dinucleotídeo (FAD) dependente de glicose oxidase (GOx).



2.2.2. Genossensores

Genossensores, ou sensores de DNA, são uma classe de biossensores que utilizam uma sequência de DNA de fita simples (ssDNA - *single-stranded* DNA) ou uma sonda de DNA como agente de reconhecimento biológico (FUKU; BILIBANA; IWUOHA, 2022). O princípio de funcionamento do genossensor baseia-se na interação, altamente eficiente e específica entre a sonda biológica e a sequência alvo complementar, formando um híbrido de fita dupla. Essa reação bioquímica é reconhecida pelo transdutor e transformada em um sinal mensurável (MELINTE et al., 2022; YANG; MCGOVERN; THOMPSON, 1997).

Com a pandemia de COVID-19, foram desenvolvidos diversos métodos de diagnóstico, incluindo os que envolvem genossensores (ALAFEEF et al., 2020; CAJIGAS et al., 2022; HUSSEIN et al., 2023). Desse modo, é possível diagnosticar a doença pela detecção do RNA do vírus (ALAFEEF et al., 2020) por meio da tecnologia de genossensores.

2.2.3. Biossensor Celular

Assim como outras classes de biossensores que utilizam um componente de reconhecimento biológico, os biossensores celulares empregam células vivas como biorreceptores (ÖZSOYLU; WAGNER; SCHÖNING, 2022). Bactérias, leveduras e células de animais podem ser utilizadas na fabricação desses sensores (YE; GUO; SUN, 2019). Uma vantagem dos biossensores celulares é que as moléculas necessárias para o

sensoriamento, estão em seu ambiente natural, podendo apresentar maior especificidade e atividade em relação ao analito (ÖZSOYLU; WAGNER; SCHÖNING, 2022).

Sua aplicabilidade inclui o monitoramento de interações fármaco-ligante, efeitos de agentes bioativos e estudos de toxicidade ambiental (metais pesados, poluentes inorgânicos, etc.) (GUPTA et al., 2019; YE; GUO; SUN, 2019). Um exemplo é o biossensor baseado em célula (BBC) para determinação de íons cobre em amostras reais de águas, o qual utiliza a célula *Saccharomyces cerevisiae* como elemento de reconhecimento biológico. A alteração de coloração, que resulta em um tom avermelhado na presença de íons de cobre, possibilita estimar a concentração desses íons ao comparar a coloração observada com a curva de calibração (VOPÁLENSKÁ; VÁCHOVÁ; PALKOVÁ, 2015).

2.2.4. Imunossensor

Imunossensores são responsáveis por monitorar a interação específica entre um antígeno e seu anticorpo (JANIK-KARPINSKA et al., 2022). Essa classe de biossensores tem despertado grande interesse, devido à sua aplicação em diagnósticos clínicos, análise ambiental, monitoramento industrial e controle alimentar (AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2021). Quando o sensor monitora diretamente o imunocomplexo formado pela ligação entre o anticorpo e o antígeno, a variação do sinal mensurável caracteriza o imunossensor como *label-free* (livre de rótulos). Já quando o sinal é oriundo de um marcador detectável, o imunossensor é chamado *labelled* (com marcador) (CANCELIERE et al., 2024). Na Figura 1B pode-se notar um exemplo de imunossensor que utiliza um antígeno como elemento de reconhecimento biológico e seu anticorpo como biomolécula alvo, o qual é baseado no bloqueio da superfície do transdutor. Quando maior o número de imunocomplexo, mais a superfície é bloqueada e menor será o sinal obtido.

Braz et al. 2022 desenvolveram um imunossensor utilizando um peptídeo mimético como antígeno e bioreceptor para reconhecimento de anticorpos SARS-CoV-2 (BRAZ et al., 2022). O imunossensor foi caracterizado fisicamente e eletroquimicamente com espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria cíclica e de pulso diferencial. Este biossensor baseia-se na diminuição do sinal faradaico de uma sonda redox quando um imunocomplexo é formado bloqueando a superfície do transdutor.

2.2.5. Biossensor peptídico

O Peptídeo é uma escolha promissora para a utilização em biossensores devido à semelhante estrutura com outras proteínas, que permite ao peptídeo uma ligação forte e específica com moléculas alvo (YUAN; LIU, 2021). Eles possuem uma estabilidade contra desnaturação maior do que proteínas e possuem protocolo de síntese padrão (WANG et al., 2022). Estes peptídeos podem ser acoplados a um transdutor por meio de diversas estratégias servindo como elemento de biorreconhecimento para produção de um biossensor.

Alves et al. utilizaram um peptídeo (Ac-NHWLSPL [Lys (FITC)]) como biorreceptor em um eletrodo de pasta de carbono para detecção de glutamato, um biomarcador para a doença de Alzheimer. Após as etapas de limpeza mecânica e eletroquímica do eletrodo, foi gotejada uma alíquota de solução da sonda peptídica na superfície do eletrodo e esta alíquota foi seca em temperatura de 35 °C por 35 min. Os eletrodos foram imersos em solução de albumina de soro bovino durante a noite. O biossensor apresentou um pico em voltametria de pulso diferencial devido a oxidação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) na ausência de glutamato. Na presença do biomarcador, houve um aumento da corrente devido à interação do glutamato com o peptídeo que deixou o FITC mais próximo da superfície do eletrodo facilitando a transferência de elétrons. Deste modo o peptídeo foi usado com sucesso para fabricação de um biossensor (ALVES et al., 2016).

2.3. Monocamadas automontadas

As monocamadas automontadas ou monocamadas auto-organizadas são agregados de moléculas orgânicas que possuem um grupo com afinidade específica com o substrato, sendo imobilizadas espontaneamente em sua superfície (ROBINSON; JUSKA; O'RIORDAN, 2023). Normalmente elas são formadas a partir de soluções, permitindo o revestimento de diversos tipos de superfícies, não se limitando apenas a superfícies planas.

Esta estratégia de modificação de superfície apresenta como vantagens experimentais, a facilidade de manuseio, a preparação, o baixo custo e a estabilidade (KIM; YOO, 2021). O diagrama esquemático de uma monocamada automontada é apresentado na Figura 2. Podemos observar a molécula da monocamada automontada

com: grupo principal, o qual tem afinidade com o substrato; cadeia; e o grupo terminal, que pode ser escolhido de acordo com o interesse.

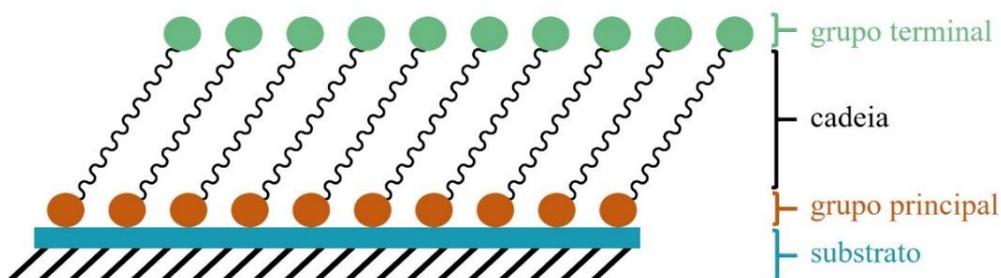


Figura 2: Diagrama esquemático de uma monocamada automontada.

Moléculas de alcanotóis são uma alternativa versátil e de custo baixo para imobilização de elementos de biorreconhecimento na superfície de um transdutor de ouro. O seu grupo tiol na extremidade da molécula tem alta afinidade com o ouro, fazendo com que a ligação Au-tiol seja espontânea (TAN; LI; ZHOU, 2020; VANOVA et al., 2021). A tecnologia de monocamada automontada é bastante vantajosa para biossensores eletroquímicos, pois: os alcanotóis formam monocamadas estáveis e proporcionam uma superfície de imobilização uniforme; protegem as biomoléculas da superfície do transdutor, evitando desnaturação; e as monocamadas podem ser adaptadas com grupos funcionais terminais para imobilização de um elemento de biorreconhecimento (WINK et al., 1997).

O grupo carboxílico como grupo terminal pode ser ativado com N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) para eventual imobilização de proteína em monocamada automontada (LV; WANG; CHEN, 2009). Portanto, esta tecnologia é promissora para uso em biossensores eletroquímicos.

2.4. Peptídeo

Peptídeos são biomoléculas naturais ou artificiais formadas por ligações peptídicas, que unem dois ou mais aminoácidos, formando uma cadeia curta (MOIOLA; MEMEO; QUADRELLI, 2019). Os aminoácidos, compostos por um grupo amina, uma carboxila e cadeias laterais, apresentam cerca de 20 variações que conferem características e funcionalidades únicas. Por compartilharem a mesma estrutura básica das proteínas, peptídeos específicos podem desempenhar funções semelhantes às das proteínas em análises biológicas (KARIMZADEH et al., 2018).

Dependendo da sequência de um peptídeo sintético, ele pode desempenhar a função de ligar-se com alta afinidade a um analito específico, além de oferecer estabilidade, rotas de síntese padronizadas e grande plasticidade (LIU; WANG; BOYD, 2015). Os peptídeos, devido ao seu menor comprimento, oferecem maior estabilidade química e conformacional para aplicação em biossensores, em relação às proteínas (BALABAN HANOGLU et al., 2024). A técnica de *Phage Display* pode ser utilizada para estudar a interação entre peptídeos e outras biomoléculas, permitindo rastrear peptídeos com alta afinidade por um analito alvo para aplicação em biossensoriamento (WANG et al., 2024).

Dado o desafio em se cultivar *M. leprae* e, conseqüentemente em obter seus antígenos, peptídeos podem ser usados para mimetizar os antígenos naturais desse patógeno, conservando sua especificidade e reatividade (LIMA et al., 2023; ZHOU et al., 2024). Os peptídeos sintéticos têm diversas aplicações, como em biossensoriamento, diagnóstico, tratamento, caracterização de epítomos e desenvolvimento de vacinas (TRIER; HANSEN; HOUEN, 2019).

2.4.1. MPML14

O MPML14 é um peptídeo desenvolvido por Lima et al. (2023) para mimetizar a proteína HSP60, presente na membrana do bacilo de *M. leprae*, funcionando como um antígeno desse patógeno (LIMA et al., 2023). Essas proteínas estimulam as células apresentadoras de antígenos, que são responsáveis por apresentar os antígenos aos linfócitos T, desencadeando uma resposta imune adaptativa (DUBANIEWICZ, 2010). Devido à dificuldade de obtenção de antígenos naturais de *M. leprae*, o peptídeo MPML14 é utilizado para contornar este problema.

O MPML14 é composto por duas sequências iguais de 7 aminoácidos, dispostas para ampliar a área de interação entre antígeno e anticorpo. Essas sequências são separadas por um espaçador (GGGS), cuja função é manter uma conformação globular tal que o MPML14 se alinhe entre os aminoácidos 125 e 131 da proteína mimetizada. Os aminoácidos presentes no peptídeo são tirosina (Y), glicina (G), cisteína (C), leucina (L), treonina (T) e serina (S), os quais formam a sequência **YGCLGTTGGGSYGCLGTT**. A subsequência GGGS representa o separador.

2.5. Proteínas de Choque Térmico

As proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Protein*) têm a função de manter a estabilidade da estrutura e a função de outras proteínas, desempenhando um papel crucial no sistema de controle de qualidade proteico (WU et al., 2023b). As HSP são encontradas na parede celular de *M. Leprae*, desempenhando um papel crucial no crescimento e na sobrevivência da micobactéria ao infectar o hospedeiro (CHAKRABORTY; GHOSH; BISWAS, 2022; MARENGO et al., 2009; WIKER; TOMAZELLA; DE SOUZA, 2011).

A função de diferentes células do sistema imunológico pode ser ativada pelas HSP. Um exemplo é a HSP65, presente em *M. leprae*, que se mostra um importante antígeno da bactéria, capaz de induzir uma resposta imune no hospedeiro (BALDON et al., 2014). Uma vez que proteínas de choque térmico podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro, diversos estudos relatam a interação de imunoglobulina G (IgG) específica para cada HSP patogênica estudada (ROJAS et al., 1997; ZHANG et al., 2001).

Considerando a dificuldade de cultivo de *M. leprae*, os perigos associados ao trabalho com essa bactéria, a atividade antigênica das HSP presentes no bacilo e o uso de peptídeos miméticos, é possível combinar essas informações para a criação de métodos diagnósticos.

2.6. Biossensores Eletroquímicos para Hanseníase

Algumas estratégias para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a hanseníase são relatadas na literatura.

Afonso et al. 2021 construíram um genossensor eletroquímico capaz de detectar produtos de PCR de *M. leprae* utilizando azul de metileno (AM) como indicador de hibridização. Uma sequência específica do material genético da micobactéria foi replicada por PCR e utilizada como sonda de captura e alvo complementar, respectivamente (AFONSO; MADURRO; BRITO-MADURRO, 2021).

O eletrodo de grafite foi modificado por eletropolimerização do monômero 4-aminofenol, que serviu como substrato para adsorção da sonda de captura. Após a incubação da fita complementar ou não complementar, o AM foi adicionado à superfície do eletrodo. O AM interage com as fitas de DNA por meio da base guanina, que está mais disponível em fitas simples de DNA. Assim, ao realizar uma voltametria linear, a maior

quantidade de AM em fitas de DNA não hibridizadas gerava uma corrente de pico maior, enquanto que uma fita dupla, por conter uma menor quantidade de AM, apresentava uma corrente de pico menor. Sendo assim, este genossensor foi capaz de identificar o DNA de *M. leprae* (AFONSO; MADURRO; BRITO-MADURRO, 2021).

Em uma abordagem de imunossensor fotoeletroquímico, Neto et al. (ano) desenvolveram um biossensor utilizando o PGL1M3R, peptídeo mimético do antígeno glicolípido fenólico (PGL1) de *M. leprae*, como elemento de reconhecimento e uma plataforma fotoeletroquímica que consistia em sulfeto de cádmio (CdS) e hidróxido de níquel (Ni(OH)_2) eletrodepositados em lâmina de vidro com óxido de estanho dopado com flúor (FTO) (YOTSUMOTO NETO et al., 2019).

Após o processo de construção da plataforma fotossensível, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi utilizada para monitorar a imobilização do PGL1M3R. O aumento da resistência de transferência de carga (R_{tc}) indicava que mais peptídeo estava sendo imobilizado na superfície. Após a construção do biossensor fotoeletroquímico proposto, PGL1M3R/CdS/ Ni(OH)_2 /FTO, o dispositivo foi incubado em pools de soro sanguíneo de pacientes com e sem hanseníase. Os anticorpos presentes nas amostras positivas se ligavam ao PGL1M3R/CdS/ Ni(OH)_2 /FTO, bloqueando a passagem da luz e gerando uma fotocorrente induzida menor. Em contrapartida, as amostras negativas, por apresentarem ausência de anticorpos contra *M. Leprae*, tinham a superfície menos bloqueada. Deste modo, este imunossensor fotoeletroquímico foi capaz de detectar amostras contaminadas de hanseníase (YOTSUMOTO NETO et al., 2019).

2.7. Técnicas Eletroquímicas

Técnicas eletroanalíticas consistem em um conjunto de técnicas que relacionam parâmetros elétricos, tais como corrente, potencial e carga, com parâmetros químicos (ESFANDIARI; ALIOFKHAZRAEI, 2024). A configuração mais comum nas análises eletroanalíticas inclui um potenciostato ou galvanostato, uma célula eletroquímica e três eletrodos, sendo estes o eletrodo de trabalho, o contra eletrodo e o eletrodo de referência (MOLLA; YOUK, 2023).

As técnicas eletroquímicas possuem características interessantes, como alta sensibilidade, baixo custo operacional, rapidez na obtenção dos resultados, miniaturização e a possibilidade de análises *in situ*, sendo ideais para métodos de diagnósticos de doenças (BARRETO; DA SILVA; CESARINO, 2023).

As reações de interesse ocorrem na interface do eletrodo de trabalho. Esses eletrodos podem ser sólidos ou líquidos (eletrodo de mercúrio). Eletrodos sólidos possuem as vantagens de serem mecanicamente mais estáveis, facilitando seu manuseio, além de possuírem uma faixa anódica maior do que o eletrodo de mercúrio (USLU; OZKAN, 2011). O eletrodo de referência serve como referência para o potencial aplicado no eletrodo de trabalho, enquanto o contra eletrodo tem a função de fechar o circuito elétrico para passagem da corrente (BANSOD et al., 2017).

Os eletrodos quimicamente modificados (EQM) possuem espécies quimicamente ativas imobilizadas em sua superfície, o que melhora a seletividade e reatividade, possibilitando o desenvolvimento de sensores em diversas áreas, incluindo biossensores.

Assim, técnicas como voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) fornecem um amplo leque de aplicações de sensoriamento, abrangendo desde a detecção de metais pesados até testes imunológicos (ANCHIDIN-NOROCEL et al., 2024; HAJI-HASHEMI et al., 2017; ILKHANI; FARHAD, 2018).

2.7.1. Voltametria cíclica (VC)

Embora seja pouco usada para análise quantitativa, a voltametria cíclica (VC) é bastante utilizada para estudar o comportamento eletroquímico de analitos e eletrodos, modificados ou não. A popularidade da VC pode ser atribuída à possibilidade de obter informações como potencial redox, constantes de formação e reversibilidade dos processos de transferência de carga, mesmo sem cálculos matemáticos complexos.

A VC é realizada aplicando-se um potencial inicial (E_0) ao eletrodo de trabalho, seguido por uma variação linear de potencial (rampa de potencial) até atingir o ponto de inversão (E_i), processo comumente chamado de varredura direta. A partir do E_i , a variação de potencial é invertida até atingir um ponto final, que pode ou não coincidir com o potencial inicial (E_0), como representado na Figura 3. Dessa forma, os potenciais são variados até que se chegue a valores nos quais uma ou mais reações ocorram na superfície do eletrodo.

Ao realizar uma VC, obtém-se um voltamograma cíclico, que é um gráfico que representa a variação de corrente em função da variação do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho.

A transferência de elétron ocorre na superfície do eletrodo quando o sistema fornece energia suficiente para remover elétrons do analito, permitindo que sejam coletados na superfície do eletrodo (ocorrendo a oxidação do analito, que resulta em uma corrente de pico anódica, I_{pa}). O processo inverso também pode ocorrer, ou seja, elétrons são transferidos do eletrodo para o analito (ocorrendo a redução do analito, gerando uma corrente de pico catódica, I_{pc}). Cada pico de corrente possui seu respectivo potencial de pico redox (E_{pa} e E_{pc}).

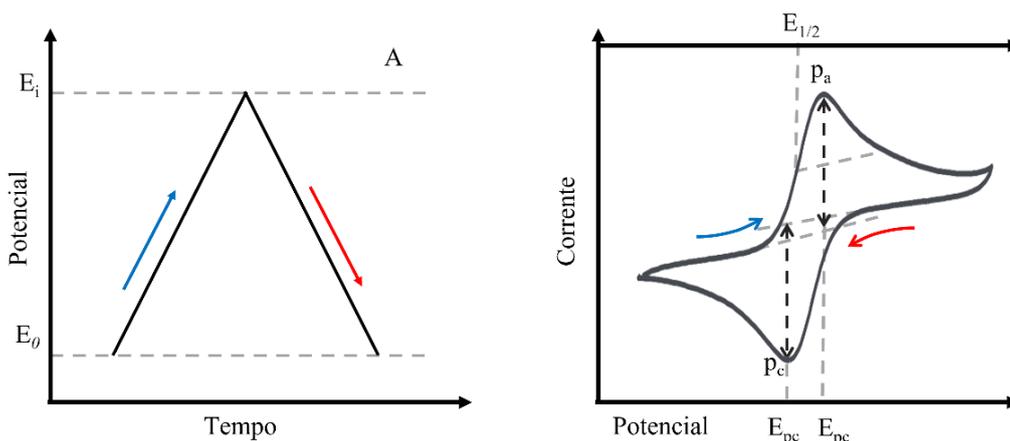


Figura 3: (A) Variação do potencial em função do tempo na VC; (B) Representação da variação da corrente em função do potencial (voltamograma).

Quando os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) de um par redox se tornam cada vez mais separados com o aumento da velocidade de varredura, o sistema é considerado quase reversível ou irreversível. No entanto, quando os picos estão muito separados entre si, o sistema é classificado como totalmente irreversível. Portanto, quanto mais próximos os valores de E_{pa} e E_{pc} , mais reversível será sistema.

Utilizando a Equação 1 de Randles-Sevcik, a VC possibilita a obtenção de informações como, número de elétrons (n), área eletroativa do eletrodo (A) em cm^2 , coeficiente de difusão (D) em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, concentração da espécie eletroativa (C) em mol cm^{-3} e velocidade de varredura do em V s^{-1} . Desse modo, é possível observar a dependência da corrente em função da variação da velocidade de varredura (TICHTER; MARSHALL, 2022).

$$i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} ACv^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

2.7.2. Voltametria de Pulso Diferencial

As técnicas de pulso ganharam atenção dos pesquisadores na década de 1950 por sua capacidade de diminuir a corrente de fundo e aumentar a sensibilidade do sinal. Essas

técnicas são utilizadas para estudar a natureza das reações eletroquímicas e determinar a concentração de analitos em solução (OSTERYOUNG, 1983; USLU; OZKAN, 2011).

A corrente de fundo interfere diretamente na relação linear entre a corrente e a concentração do analito, de modo que a equação $i = kC$ torna-se $i = kC + b$, sendo i a corrente, k o coeficiente linear (ou sensibilidade), C a concentração do analito e b a contribuição da corrente não faradaica (OSTERYOUNG, 1983). O limite de detecção depende principalmente da razão alta entre corrente faradaica e corrente de carga (MACFARLANE; ZHOU; NEWMAN, 2004).

Criada por Barker e Gardner em 1960, esta técnica tem como principais parâmetros: E_a - Amplitude de pulso; t_a - Largura de pulso; $I_1 - I_2$ - Período de amostragem; t_p - Período de pulso (ÖZKAN; USLU; ABOUL-ENEIN, 2003). Na voltametria de pulso diferencial (VPD), são aplicados ao eletrodo pulsos de magnitude fixa que são sobrepostos a uma rampa de potencial. A corrente é amostrada antes (I_2) e ao final (I_1) do pulso, de forma que o voltamograma represente a diferença entre essas duas correntes. A perturbação do sistema pode ser visualizada na Figura 4, juntamente com o voltamograma.

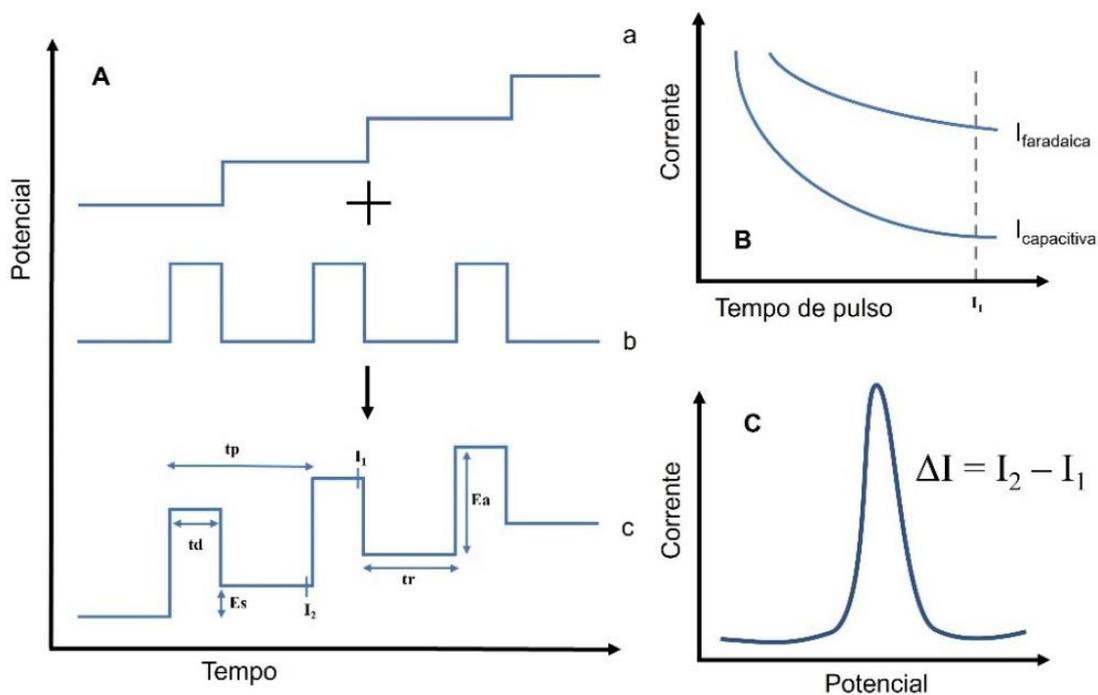


Figura 4: (A) Sinais de excitações para voltametria de pulso diferencial. (B) Variação da corrente capacitiva e faradaica em função do tempo de pulso. (C) Voltamograma resultante.

Com a aplicação do pulso, duas correntes podem ser geradas, a corrente capacitiva e a corrente faradaica. Com o passar do tempo de pulso, a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto a corrente faradaica decai mais linearmente, como pode ser visto na Figura 4B. No entanto, o decaimento da corrente capacitiva é mais pronunciado, enquanto a corrente faradaica diminui mais lentamente, resultando em um voltamograma com a corrente faradaica discriminada, como mostrado na Figura 4C (COMPTON; BANKS, 2018).

2.7.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) surgiu entre os anos de 1880 e 1900, com o inglês Oliver Heaviside, e foi aprimorada ao longo dos anos por diversos cientistas. Em 1899, Warburg relatou pela primeira vez a impedância para sistemas eletroquímicos difusionais, e estes princípios são utilizados até os dias atuais (MACDONALD, 2006; RANDVIIR; BANKS, 2013). Atualmente, a EIE é uma técnica eletroquímica que pode ser aplicada no desenvolvimento de imunossensores, detecção de vírus e hibridização de DNA (LAZAR et al., 2016).

Em comparação com outros sistemas eletroquímicos, a EIE pode apresentar a vantagem de ser aplicada em condições estacionárias, ao contrário da VC, que aplica uma ampla faixa de potencial. Deste modo, percebe-se a ampla gama de aplicação da EIE na área da bioanalítica.

Basicamente, a impedância é a força de oposição que a corrente elétrica encontra ao passar por um circuito elétrico composto por resistores, capacitores e indutores, e sua unidade é a mesma da resistência, Ω (NECHACHE; CASSIR; RINGUEDÉ, 2014; RANDVIIR; BANKS, 2013). Há uma relação de resistência (R), tensão (V) e corrente (I) quando uma tensão de corrente contínua é aplicada a um circuito, correspondendo à Lei de Ohm. Da mesma forma, quando é aplicada uma tensão de corrente alternada (CA), é possível obter uma relação entre V e I, também regida pela Lei de Ohm aplicada a um circuito de corrente alternada (SACCO, 2017).

A EIE difere das outras técnicas eletroquímicas convencionais, pois uma diferença de potencial CA é aplicada em uma ampla faixa de frequência a um eletrodo, e a resposta eletroquímica é mensurada (ARIYOSHI et al., 2022).

A técnica utiliza um potencial (ou corrente) de pequena amplitude em diferentes frequências, gerando uma perturbação no sistema. Após mensurar a resposta do sistema a essa perturbação, é calculada a impedância (Z), que é definida como um número complexo dependente da frequência, de acordo com a Equação 2, em que ω é a frequência angular, $j(\sqrt{-1})$ é um número imaginário, e a parte real, Z' , é uma resistência real e a parte imaginária, Z'' , é uma reatância, e ambas dependem da frequência (LAZANAS; PRODROMIDIS, 2023; WANG et al., 2021).

$$Z(\omega) = Z' + jZ'' \quad \text{Equação 2}$$

Os resultados podem ser interpretados de diversas maneiras, sendo um dos gráficos mais utilizados o gráfico de Nyquist acompanhado de um circuito equivalente. O circuito equivalente é responsável por representar todos os componentes que podem estar presentes na célula eletroquímica, utilizando resistores, capacitores e/ou indutores (NECHACHE; CASSIR; RINGUEDÉ, 2014).

Em um modelo de célula eletroquímica de Randles simplificado, tem-se um capacitor (C_1) que representa a interface eletrodo/solução, um resistor (R_1) referente à resistência da solução e outros componentes do circuito e por fim um resistor (R_2) que representa a resistência à transferência de carga (R_{tc}) na interface eletrodo/solução. Esse modelo está representado na Figura 5 com o gráfico de Nyquist e o circuito equivalente (CHOI et al., 2020). Por meio do gráfico de Nyquist, projetando o semicírculo no eixo Z' , é possível calcular o valor de R_2 .

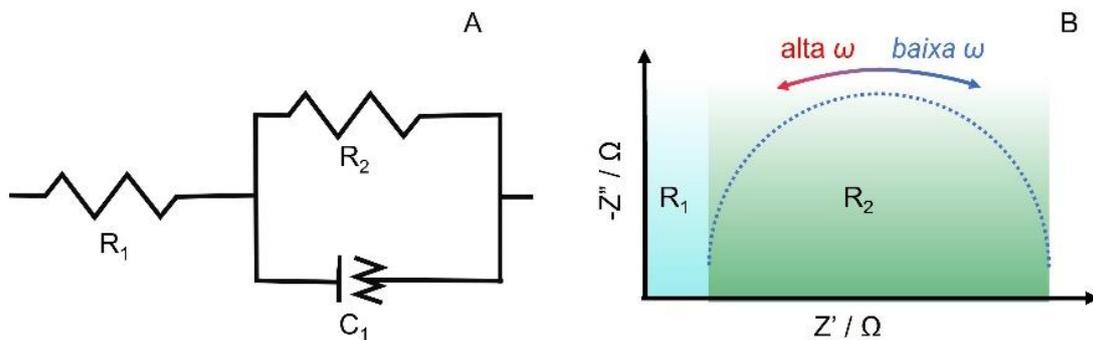


Figura 5: (A) Circuito equivalente. (B) Gráfico de Nysquist para o modelo simplificado de célula de Randles.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um biossensor eletroquímico com peptídeo mimético (MPML14), combinado com materiais simples de ancoragem para sua imobilização, para a detecção de hanseníase em amostras sorológicas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as propriedades redox do eletrodo serigrafado de ouro utilizando técnicas voltamétricas;
- Construir biossensores utilizando eletrodos de ouro e o peptídeo mimético (MPML14), específico do antígeno de *M. leprae*;
- Testar os biossensores miméticos construídos por meio de técnicas eletroquímicas;
- Caracterizar os materiais presentes na superfície dos biossensores utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).
- Aplicar os biossensores miméticos em amostras sorológicas de doentes para detecção da hanseníase por meio de técnicas eletroquímicas.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Instrumentação

Para as medidas eletroquímicas, foi utilizado um potenciostato (Autolab PGSTAT302N, Metrohm), conectado a um computador com o software NOVA versão 2.1. Para dissolução e homogeneização dos reagentes e amostras foram utilizados um banho ultrassônico (USC 1400, Unique) e um Vortex (Fisatom, modelo 772, 2800rpm).

A análise morfológica do eletrodo serigrafado de ouro (SPGE) e das diferentes etapas da fabricação do biossensor foi feita por microscopia eletrônica de varredura - MEV (JSM 7200F, JOEL) e análises de espectroscopia de energia dispersiva - EDS (XFLASH 6-60, BRUKER).

4.2. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade $\geq 18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) do sistema Milli-Q (Millipore). Todos os reagentes eram de grau analítico, sem necessidade de purificação prévia.

A solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) e H_2SO_4 (Isolar, 85 %) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas como eletrólito suporte nas medidas eletroquímicas e armazenadas sob refrigeração.

As soluções de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Synth, 99 % e 98,5 %) e glutaraldeído (GTA) (Sigma-Aldrich, 25%) foram preparadas diariamente para evitar degradação. A solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ foi preparada dissolvendo o soluto em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) e armazenada em frasco âmbar para evitar possíveis degradações. As soluções de peptídeo mimético (MPML14), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich, 98 %), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, 97%), albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin* - ASB) (Sigma-Aldrich, 98%) e as amostras de *pools* de soro sanguíneo positivo (SP) e negativo (SN) foram diluídas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) e condicionadas em baixas temperaturas. Enquanto a solução de ácido 3-mercaptopropiônico (3AMP, Sigma-Aldrich, 99%) foi preparada em água ultrapura.

4.3. Ativação do Eletrodo serigrafado de Ouro

O SPGE foi submetido a uma ativação eletroquímica em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando potenciais de $1,4 \text{ V}$ e $-0,35 \text{ V}$ por 10 s cada, seguidos por 10 ciclos de voltametria cíclica (VC) a $0,1 \text{ V s}^{-1}$. A eficácia da ativação foi verificada com 15 ciclos de VC a 100 mV s^{-1} . Se o perfil voltamétrico apresentasse picos bem definidos de ouro, o SPGE seria considerado pronto para as próximas etapas, caso contrário, seria reativado (ZHANG et al., 2007). Antes da construção do biossensor, foi realizado um ciclo de VC em solução equimolar de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

4.4. Construção do Biossensor

O SPGE ativado foi imerso em solução de 3AMP $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ por 15 min , seguido de lavagem com água desionizada em abundância. Em seguida, $7,0 \mu\text{L}$ de uma solução contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de NHS foram gotejados na superfície do eletrodo, e este foi mantido em ambiente úmido (placa de Petri contendo um papel umedecido) por 30 min . Após esse tempo, o eletrodo foi lavado com água desionizada.

A mistura do peptídeo MPML14, ASB e GTA ($680,0 \text{ mg L}^{-1}$, $3,2 \%$ e $0,2\%$, respectivamente) foi preparada previamente antes de cada uso. Foram depositados $10,0 \mu\text{L}$ desta mistura na superfície do eletrodo e, após a secagem, o biossensor estava pronto para uso (YOTSUMOTO NETO et al., 2019). O processo pode ser melhor visualizado na Figura 6.

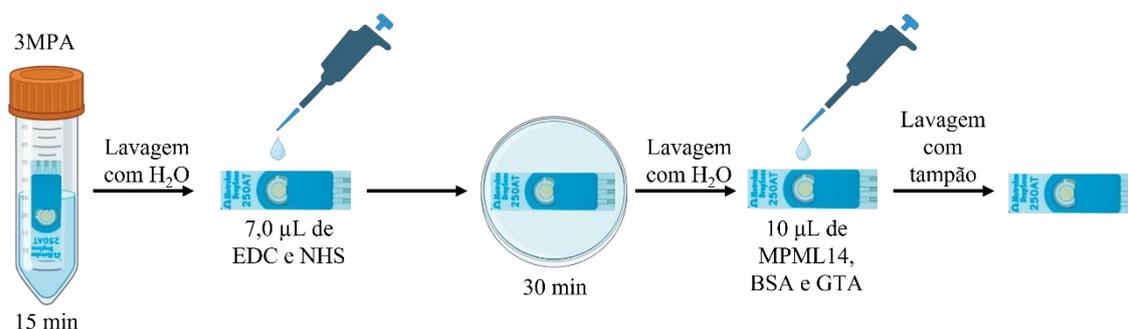


Figura 6: Processo de fabricação do biossensor.

4.5. Incubação das Amostras

As amostras de soro positivo (SP) e negativo (SN) foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) e um volume de $15,0 \mu\text{L}$ foi imobilizado na superfície do biossensor (BIO/SN e BIO/SP) por 30 min em ambiente úmido para evitar a evaporação (LIMA et al., 2025). Após a lavagem com tampão fosfato, o biossensor foi analisado.

4.6. Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas, independente da técnica empregada, foram feitas em uma célula eletroquímica de vidro com capacidade de $10,0 \text{ mL}$ à temperatura ambiente e na presença de oxigênio. Voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram as técnicas exploradas neste trabalho.

As análises foram realizadas utilizando um eletrodo serigrafado de ouro da Metrohm Dropsens, modelo 250AT, produzido com tecnologia de cura com alta temperatura, o qual é composto por um eletrodo de trabalho de ouro ($\phi = 4,0 \text{ mm}$), um pseudo-referência de prata e um contra eletrodo de platina. O sistema eletroquímico completo é ilustrado na Figura 7.

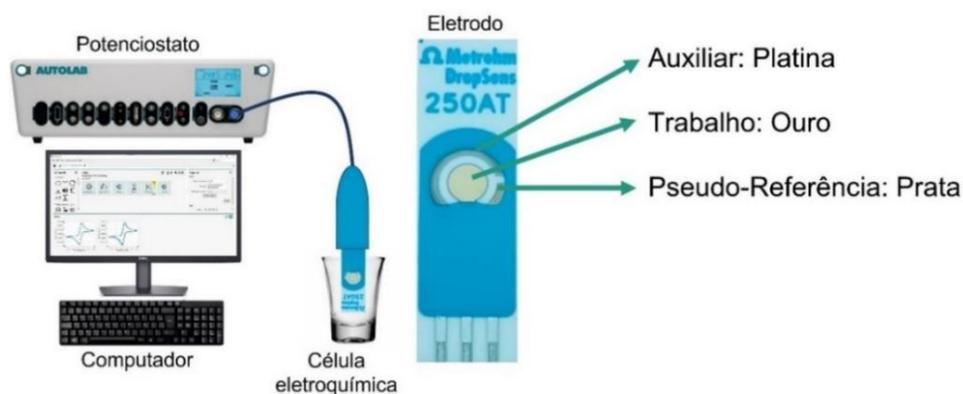


Figura 7: Sistema eletroquímico.

A sonda $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ equimolar $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) foi utilizada para as medidas de EIE. Primeiramente, era realizada uma VC para obtenção do potencial de meia onda. Este potencial era aplicado na medida de EIE para obtenção do espectro de impedância eletroquímica. Esta técnica foi utilizada

com os seguintes parâmetros: frequência variando entre 100 kHz a 0,1 Hz; amplitude de 0,01 V; e número de frequência por década de 10 pontos.

4.7. Amostras de Pacientes

As amostras sorológicas foram coletadas de pessoas que residem em São Luís, Maranhão – Brasil, sendo que essa cidade está caracterizada por ser uma região hiperendêmica de hanseníase. Todas as amostras foram coletadas de acordo com o Comitê Ético de Pesquisa, com número de parecer 3.921.094. Cada *pool* de amostra sorológica foi preparado misturando 5 amostras individuais, diluídas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para cada tipo de amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à inatividade eletroquímica dos peptídeos, é necessário o uso de uma sonda eletroquímica para visualizar as alterações na corrente de pico. Neste estudo, foi utilizada a sonda $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, que possui um comportamento reversível. Para tornar possível a imobilização do peptídeo na superfície do transdutor, foi utilizado um eletrodo de ouro, que serve como substrato para a formação de monocamadas auto-organizadas por meio da interação ouro-tiol (VANOVA et al., 2021). Em seguida foram realizadas etapas capazes de funcionalizar os grupos carboxílicos da monocamada automontada, permitindo a imobilização do peptídeo MPML14.

5.1. Tratamento do Eletrodo

Para uma melhor resposta do eletrodo, este passou por um processo de ativação e limpeza eletroquímica e os resultados comparativos são mostrados a seguir.

5.1.1. Voltametria Cíclica

Inicialmente, foi avaliado o perfil voltamétrico do SPGE em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , antes e após o tratamento eletroquímico. Com o SPGE sem o tratamento, pode-se observar picos com pouca definição e valores de corrente muito baixos. Em comparação, após o tratamento eletroquímico, um perfil mais característico de eletrodo de ouro é observado no voltamograma da Figura 8A. A partir do potencial de 0,85 V a monocamada de óxidos de ouro é formada, evidenciadas por três picos de oxidação, com o início do processo ocorrendo em torno de 0,87 V. Os óxidos formados são reduzidos durante a varredura anódica em potencial de 0,67 V.

Quando avaliada a resposta eletroquímica da sonda $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, observa-se uma grande diferença de sinal, com picos mais definidos no SPGE após o pré-tratamento, como mostrado na Figura 8B. Para as correntes de pico de oxidação e redução, houveram aumentos de 50 % e 58 %, respectivamente, indicando uma melhor resposta para o SPGE tratado.

Quando comparadas as diferenças do potencial de pico (ΔE_p), nota-se que o menor valor foi obtido para o eletrodo tratado, com $\Delta E_p = 0,10$ V, enquanto para o SPGE sem pré-tratamento obteve-se $\Delta E_p = 0,51$ V, representando uma melhora de 80 %. Esta melhora pode ser explicada pela remoção de material orgânico presente na tinta de ouro

que inibem área eletroativa do eletrodo (DA SILVA et al., 2020) . Deste modo, o SPGE tratado apresentou um sistema com melhor reversibilidade, com um menor ΔE_p , indicando uma relação de taxa de transferência de elétrons/taxa de transferência de massa maior (YAMADA et al., 2022).

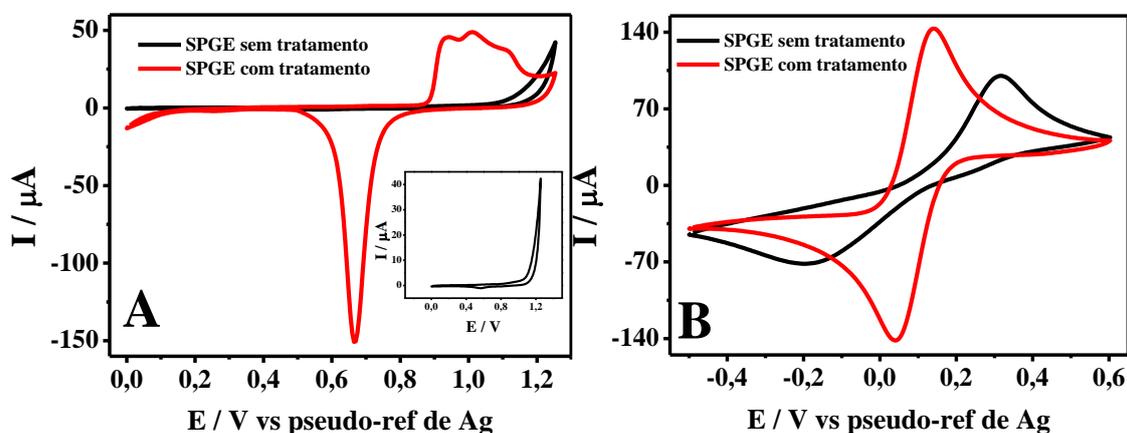


Figura 8: (A) VC em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com SPGE sem tratamento e com tratamento, insert: SPGE sem tratamento. (B) VC em $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 com SPGE sem tratamento e com tratamento. Passo de potencial de 5 mV, velocidade de 100 mVs^{-1} .

5.1.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A EIS também foi usada para avaliar a eficácia do tratamento eletroquímico e os resultados podem ser observados na Figura 9. Como era esperado, o SPGE não tratado obteve maior resistência à transferência de carga (R_{tc}) em comparação com o SPGE tratado. Essa redução na R_{tc} pode ser atribuída à limpeza eletroquímica do SPGE, capaz de remover parte da impureza presente na superfície do eletrodo (ZHANG et al., 2007).

Deste modo, pode-se notar que os resultados obtidos na EIS corroboram com os resultados obtidos por VC tanto em ácido sulfúrico, quanto na sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, mostrando que esta etapa prepara a superfície do eletrodo para uma melhor performance nas medições e reações específicas, possibilitando uma melhor transferência de carga. Sendo assim, este tratamento precede todas as etapas para a fabricação do biossensor.

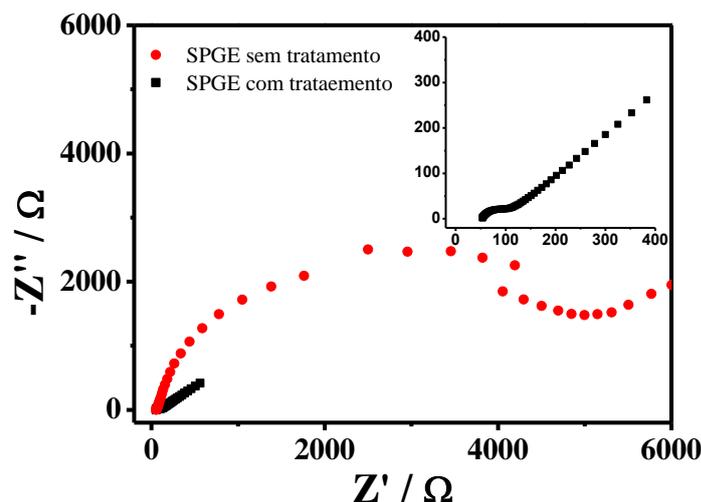


Figura 9: Gráfico de Nyquist com SPGE sem e com tratamento, insert: SPGE sem tratamento. Condições experimentais: $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 na faixa de frequência de 1.10^5 - 0,1 Hz.

5.2. Etapas da construção do Biossensor por EIS

A cada etapa da fabricação do biossensor foi avaliada a resistência a transferência de carga (R_{tc}), que limita o processo de transferência de elétrons, e está associada ao tamanho dos semicírculos apresentados nos espectros de impedância eletroquímica. A variação do tamanho dos semicírculos caracterizou a modificação da superfície do eletrodo. Na Figura 10 está ilustrado cada etapa da construção do biossensor.

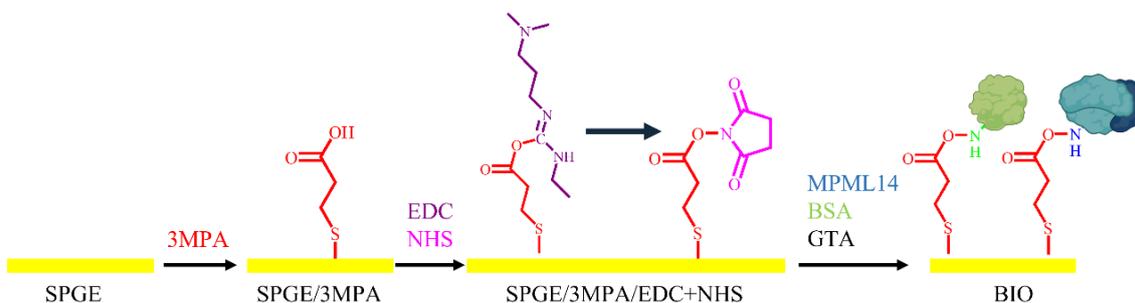


Figura 10: Etapas da construção do biossensor

Após cada etapa de modificação, não foi possível observar grandes mudanças no valor da resistência ôhmica da solução eletrolítica (R_{sol}), indicando que não houve alteração da R_{sol} pelas etapas de modificação da superfície do eletrodo. Deste modo, as grandes alterações dos valores de R_{tc} para cada etapa de modificação se mostrou ser mais adequado para efeito de comparação.

Na Figura 11A está representado os gráficos de Nyquist correspondente às diferentes etapas da fabricação do biossensor, acompanhadas pelo gráfico de barras com

os valores de resistência à transferência de carga (Figura 11B). O ouro é um metal altamente condutor, por conta desta característica, o gráfico de Nyquist para o SPGE apresentou um semicírculo relativamente pequeno com R_{tc} de 16,7 Ω . Com a adição do 3AMP, espera-se a formação de uma monocamada isolante na superfície do eletrodo. O semicírculo nesta etapa apresentou uma grande variação, resultando em um valor de R_{tc} de 181,4 Ω , indicando que a monocamada de 3AMP cobriu substancialmente a superfície do eletrodo. Esse aumento pode ser explicado pela formação da camada que age como um isolante na superfície do eletrodo. Os grupos carboxílicos presentes na extremidade do 3AMP repelem as cargas negativas da sonda redox dificultando a transferência eletrônica (NETO et al., 2018).

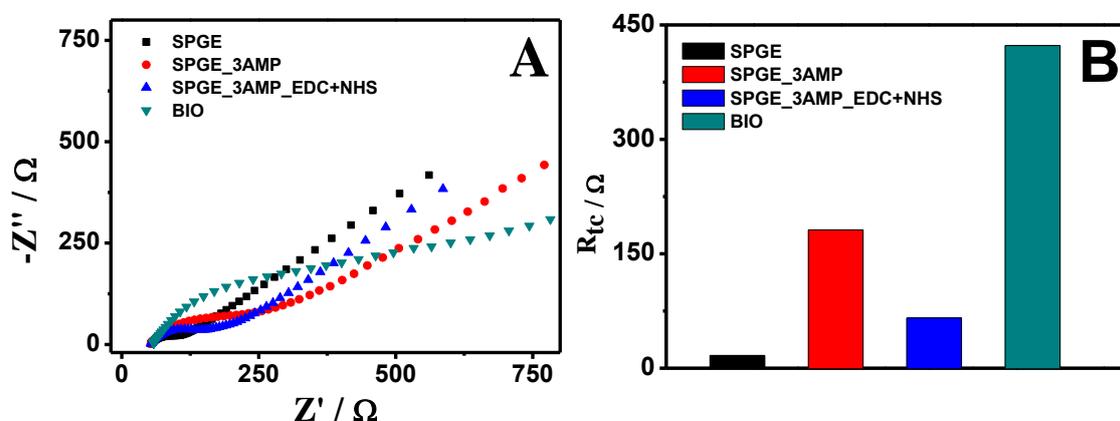


Figura 11: (A) Gráfico de Nyquist em diferentes etapas de fabricação do biossensor. (B) Efeito da etapa de modificação sobre o valor da resistência à transferência de carga. Condições experimentais: $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 na faixa de frequência de $1.10^5 - 0,1$ Hz.

Na etapa seguinte, foi adicionado uma alíquota de solução contendo EDC e NHS. O EDC funciona como um ativador do grupo reativo (carboxila) do 3AMP formando um intermediário instável, em seguida ocorre a formação de um éster NHS (ERTEKIN; ÖZTÜRK; ÖZTÜRK, 2016). Nesta etapa, a R_{tc} diminuiu significativamente para 65,8 Ω . Esta diminuição pode ser explicada por dois processos: (I) as cargas negativas do grupo carboxílico terminal do 3AMP foram neutralizadas, permitindo a passagem do $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ até a superfície do ouro, pois não terá o efeito de repulsão; (II) O EDC/NHS pode apresentar um efeito eletrocatalítico devido às ligações duplas existentes no conjunto de moléculas (LI et al., 2011).

Na última etapa da construção do biossensor, é formado um filme na superfície do eletrodo. O peptídeo MPML14 é adsorvido na superfície por meio dos seus grupos aminos laterais, que reagem com o éster NHS reativo de amina, de forma que o NHS é

substituído pelo peptídeo (VASHIST, 2012). A albumina de soro bovino (ASB) foi utilizada para bloquear grupos reativos, reduzindo as ligações não específicas, diminuindo a probabilidade de resultados falsos negativos (BLASQUES et al., 2023). O GTA foi utilizado para aumentar a estabilidade do biossensor. Ele é um agente de reticulação, capaz de formar ligações cruzadas entre grupos aminas livres, formando bases de schiff (AKYILMAZ; YORGANCI, 2008; ZHANG et al., 2018). Nesta etapa, a R_{tc} tem seu valor consideravelmente aumentado em relação às etapas anteriores, devido ao aumento de material na superfície do eletrodo, chegando a um valor de 423,1 Ω .

5.3. Caracterização do Biossensor

5.3.1. Voltametria de Pulso Diferencial

A caracterização eletroquímica do imunossensor foi realizada por VPD e EIE em uma mistura equimolar de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. A corrente relativa (I/I_{p0}) do BIO, BIO/SN e BIO/SP é mostrada na Figura 12A, ela é uma corrente comparativa entre a corrente de pico do BIO/SN ou BIO/SP (I_p) com a do BIO (I_{p0}). A corrente relativa serve para normalizar os dados coletados, sempre fazendo uma comparação com o valor de corrente do BIO (valor de referência), minimizando interferências. A variação relativa de corrente de pico (Figura 12B) refere-se à variação de corrente entre a corrente de pico do BIO (I_{p0}) com a corrente do BIO/SP (ou BIO/SN) (I_p) em relação à I_{p0} . De forma que a soma da corrente de pico relativa com a variação de corrente de pico relativa é sempre igual a 1. A corrente relativa do BIO tem um máximo de valor igual a 1, porém ao adicionar amostra de soro sanguíneo negativo (BIO/SN), o sinal decai para 0,35 do valor de referência. Quando adicionado amostra de soro sanguíneo positivo (BIO/SP), a resposta diminui ainda mais, em consequência do bloqueio maior da superfície do eletrodo referente às ligações específica dos anticorpos com o MPML14, este decaimento pode ser notado através do gráfico de barra mostrado na Figura 12B. Sendo assim, há uma diferença de resposta quando incubadas amostras de pacientes com (soro positivo - SP) e sem hanseníase (soro negativo - SN) na superfície do biossensor, mostrando a capacidade de diferenciação na resposta de acordo com a amostra.

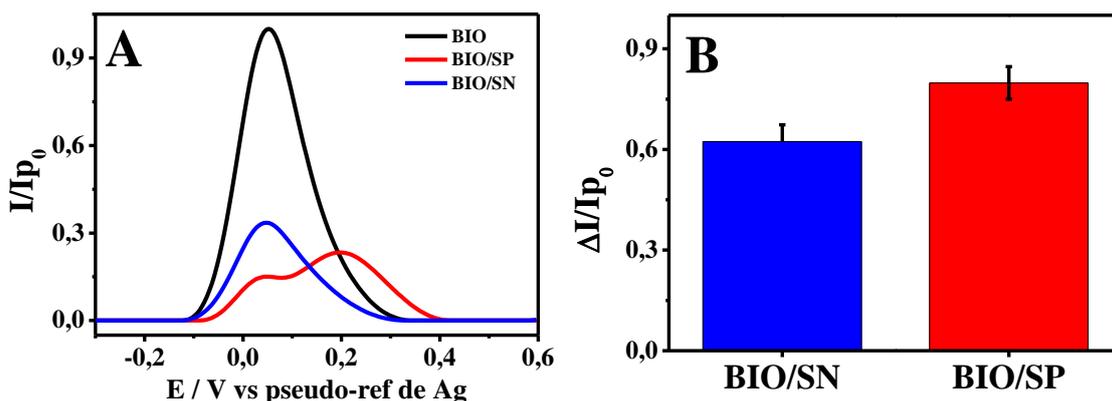


Figura 12: (A) corrente relativa usando $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 com BIO, BIO/SP e BIO/SN. (B) variação relativa de I_p após incubação com SN (1:100) e SP (1:100). Condições experimentais: faixa de potencial de $-0,3$ a $+0,6 \text{ V}$, amplitude de pulso de $0,05 \text{ V}$, período de pulso (t_{pulso}) de 50 ms e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

O teste t para diferença entre médias foi aplicado para verificar se as duas médias diferem a um nível de confiança de 95 % com grau de liberdade igual a 4 e foi verificado que os dois valores diferem estatisticamente.

5.3.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica

Na Figura 13A, está represento as respostas da EIE para o BIO, BIO/SP e BIO/SN. Como observado também para a VPD, a EIE do BIO teve uma resistência à transferência de carga (R_{tc}) menor com valor de $271,0 \Omega$, devido à superfície estar menos bloqueada. Porém, ao adicionar as amostras, observa-se que houve aumento no valor de R_{tc} . Para o BIO/SN e BIO/SP, os valores obtidos foram de $475,0$ e $697,0 \Omega$, respectivamente (Figura 13B).

Essa diferença pode ser atribuída à presença de anticorpos IgG no *pool* de amostras SP, que se ligam especificamente ao peptídeo MPML14, bloqueando de maneira mais acentuada a superfície do biossensor. Assim como na VPD, pode-se notar a capacidade de alteração da resposta do sensor a depender da amostra condicionada em sua superfície.

O teste T para diferença entre duas médias foi aplicado seguindo o mesmo procedimento utilizado para VPD, com a diferença que agora as médias são as R_{tc} . O valor de t estatístico foi calculado e verificou-se que seu valor só é maior do que o valor de t_{tab} para um nível de confiança de 90%, ou seja, as médias só diferem a um nível de no máximo 90%. Sendo assim, a técnica de VPD foi utilizada para continuar com os estudos.

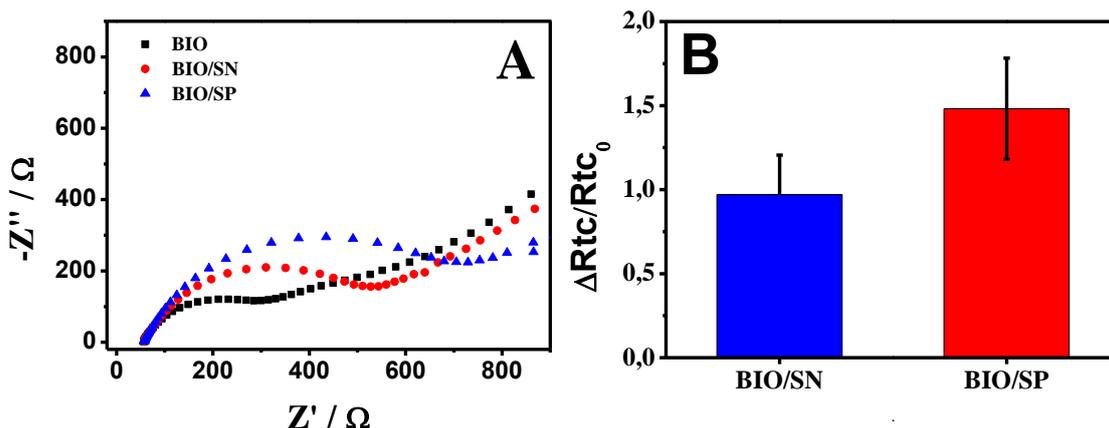


Figura 13: (A) Gráfico de Nyquist com BIO, BIO/SN e BIO/SP. (B) variação relativa de R_{tc} do BIO após incubação com SN (1:100) e SP (1:100). Condições experimentais: $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L⁻¹ em T. Fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 na faixa de frequência de $1.10^5 - 0,1$ Hz.

5.3.3. MEV

Análise de MEV e EDS foram realizadas para avaliar a morfologia e a composição elementar do SPGE e das diferentes etapas de modificação. A superfície do SPGE apresentou espaços que não foram preenchidos pela tinta de ouro, como pode ser observado na Figura 14A-C. O SPGE apresenta camadas de cristais de ouro com diferentes geometrias. Para o SPGE, era de se esperar apenas a presença do ouro, porém, foram detectados também o oxigênio, carbono e alumínio por EDS (Figura 15A-C), pois estes elementos estão presentes em materiais cerâmicos (substrato do eletrodo). Os elementos do substrato podem ser detectados por dois motivos: (I) O feixe de radiação pode atravessar a camada de ouro chegando ao substrato cerâmico; (II) as lacunas deixadas pela tinta de ouro expõem o substrato. Além de que as composições verdadeiras dos eletrodos comerciais muitas das vezes são confidenciais para as empresas fabricantes. Dessa forma, é possível que se utilizem aglutinantes e solventes que possuam esses elementos em suas composições (STAN et al., 2022). Nas outras etapas de modificação, não foi possível observar mudança na morfologia (Figura 14B-C).

Como mostrado na Figura 14D, há uma grande mudança superficial, devido a formação do filme do biossensor. O filme apresentou uma superfície homogênea e ondulada devido à rugosidade do substrato. Na Figura 14E é mostrado o mapeamento de elementos presente em uma área sem filme (área azulada) e com filme (área escura). Pode-se observar a presença de oxigênio e alumínio nas lacunas deixadas pela tinta de ouro e uma presença maior de carbono, oxigênio e nitrogênio presentes no filme, além de uma grande área azulada referente ao ouro do eletrodo.

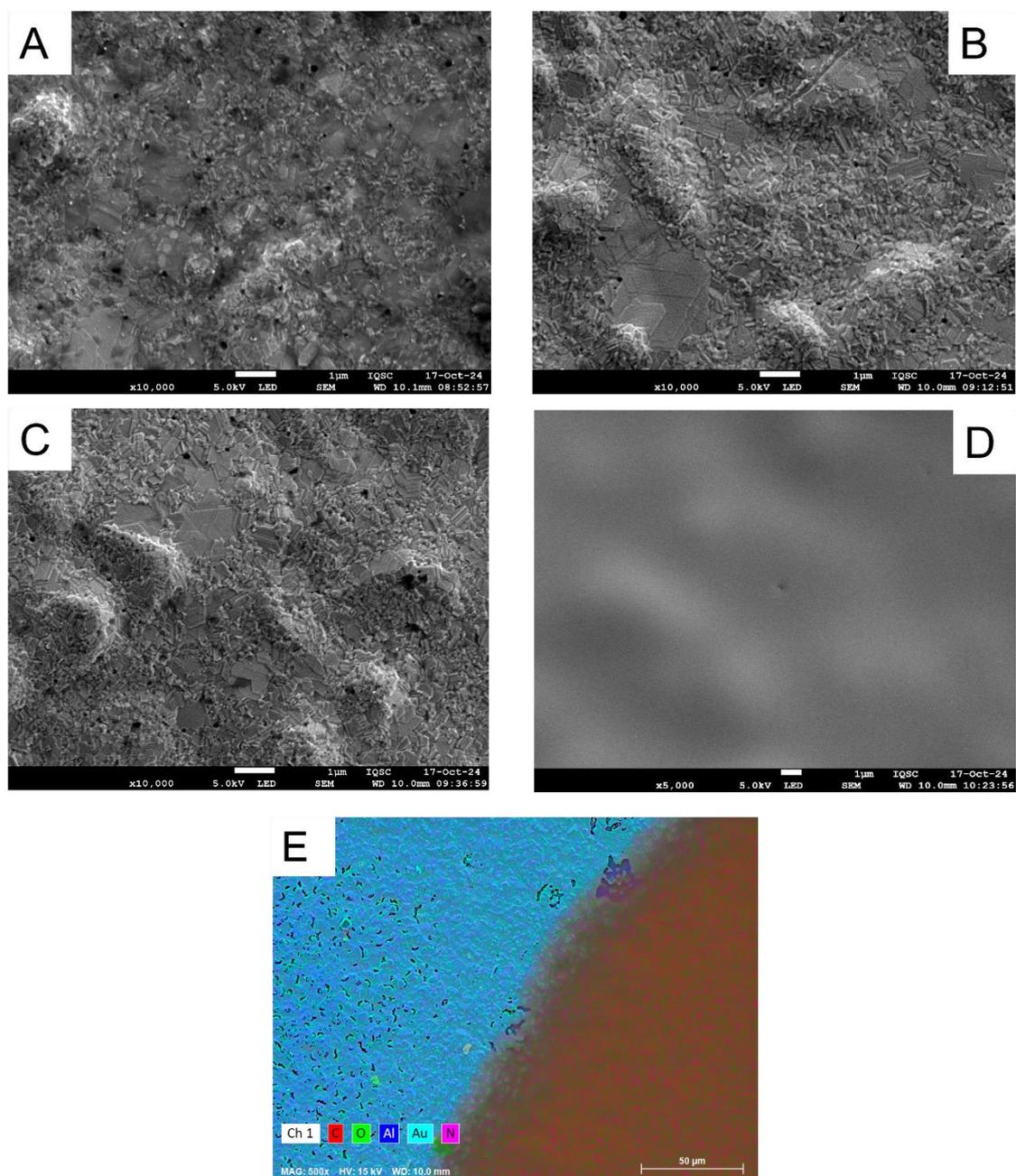


Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura para diferentes etapas de modificação do biossensor para (A) SPGE; (B) SPGE/3AMP; (C) SPGE/3AMP/EDC+NHS; (E) mapeamento de elementos do SPGE-BIO.

As diferentes etapas de modificação que consistem na adição de 3AMP ($C_3H_6O_2S$), EDC ($C_8H_{17}N_3$) e NHS ($C_4H_5NO_3$) foram avaliadas por EDS (Figura 15), no entanto, devido à quantidade de N e S serem baixas, não foi possível detectá-los, e suas concentrações ficaram abaixo do nível de detecção do equipamento. Porém, pode-se notar principalmente a presença de carbono e oxigênio, decorrente das moléculas orgânicas imobilizadas no substrato do eletrodo, além de que esses elementos também estão presentes nos eletrodos sem modificação. O espectro de EDS do filme (Figura 15D)

apresentou picos referentes ao carbono, nitrogênio e oxigênio, que são referentes às composições químicas das biomoléculas que possuem vários aminoácidos em suas composições.

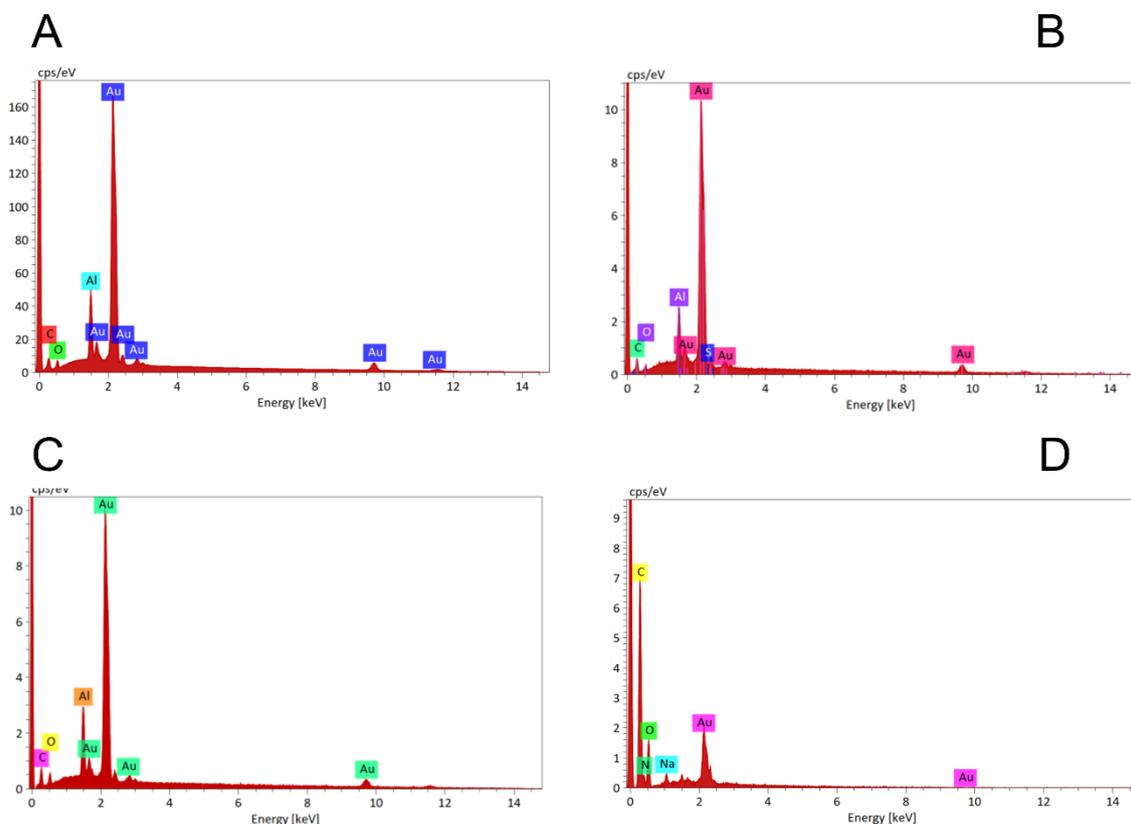


Figura 15: Espectroscopia de energia dispersiva das diferentes etapas de modificações para (A) SPGE; (B) SPGE/3AMP; (C) SPGE/3AMP/EDC-NHS; e (D) BIO.

5.4. Otimização do volume de solução de peptídeo

O volume de solução de peptídeo MPML14 depositado na superfície do eletrodo, de mesma concentração, para formação do filme foi avaliado com o intuito de verificar um volume capaz de fornecer uma alta relação de resposta eletroquímica/volume de material. Na Figura 16 está representado os valores de corrente relativa para os volumes de 5, 7 e 10 μL , utilizando *pools* de soro positivo e negativo. A menor variação de corrente entre os sinais de BIO/SP e BIO/SN foi obtida para o volume de 5 μL , seguida pela variação do volume de 10 μL . Uma maior distinção entre estes dois sinais, foi obtida para o volume de 7 μL .

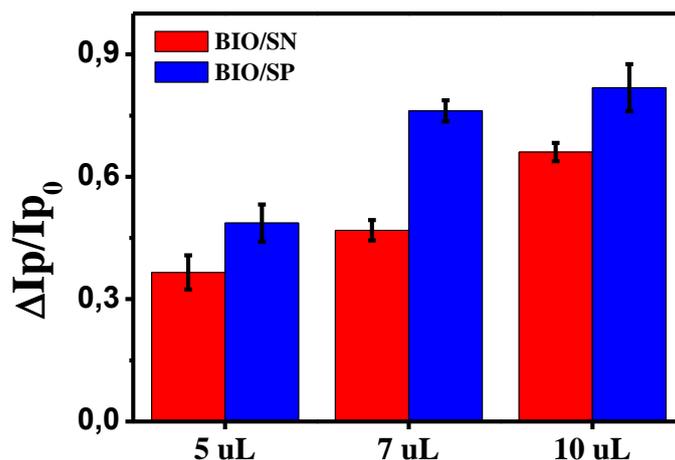


Figura 16: Variação relativa de I_p em $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 com BIO/SN (—) e BIO/SP (—) em diferentes volumes de solução peptídica (5, 7 e 10 μL).

Dessa forma, o volume de 7 μL foi selecionado para os testes subsequentes, pois proporcionou uma combinação ideal entre distinção de sinal e economia de material.

5.5. Avaliação das diluições dos *pools*

Para avaliar o desempenho do imunossensor em relação às amostras, este foi incubado em amostras de pacientes SN e SP por 30 min, e suas respectivas correntes relativas obtidas por VPD foram calculadas para diferentes diluições em solução tampão fosfato pH 7,4: 1:50, 1:80, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:600. A Figura 17 mostra as correntes relativas para o BIO/SP.

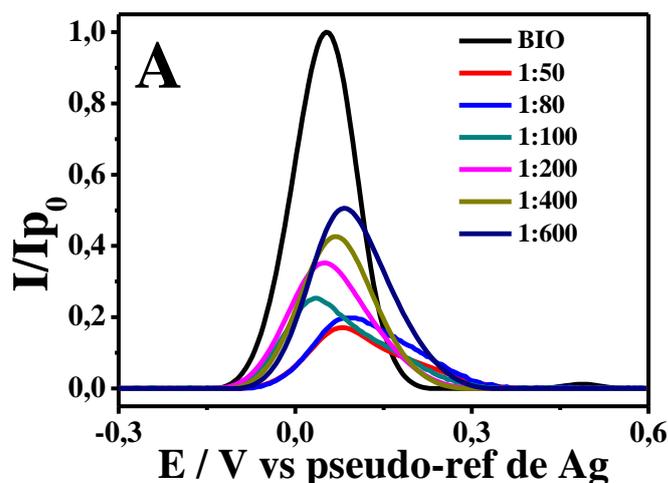


Figura 17: (A) Respostas de correntes relativas para BIO/SP e (B) histograma com corrente de pico relativa para BIO/SP sob condições otimizadas do BIO após incubação

em amostras de soro positivo diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) a diferentes diluições (v/v; 1:50, 1:80, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:600).

Na Figura 18A, observa-se uma correlação linear entre a variação relativa de corrente de pico e logaritmo da diluição da amostra SP. Para a amostra SP, foi possível observar que à medida que a amostra se torna mais diluída, a diferença entre a corrente de pico do BIO e BIO/SP se torna menos evidente. Quando a amostra de paciente com hanseníase (SP) está mais concentrada, a diferença é maior, pois a quantidade de anticorpos na amostra SP é maior causando um boqueio mais pronunciado.

O comportamento linear foi observado em toda a faixa de diluição estudada para a amostra SP. A curva apresentou um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,979$. Houve uma diferença de sinal para BIO/SN e BIO/SP em toda a faixa de diluição estudada, porém uma relação de maior diferença entre os sinais e maior diluição foi obtida para 1:200. Deste modo esta diluição foi escolhida para ser utilizada no teste de seletividade.

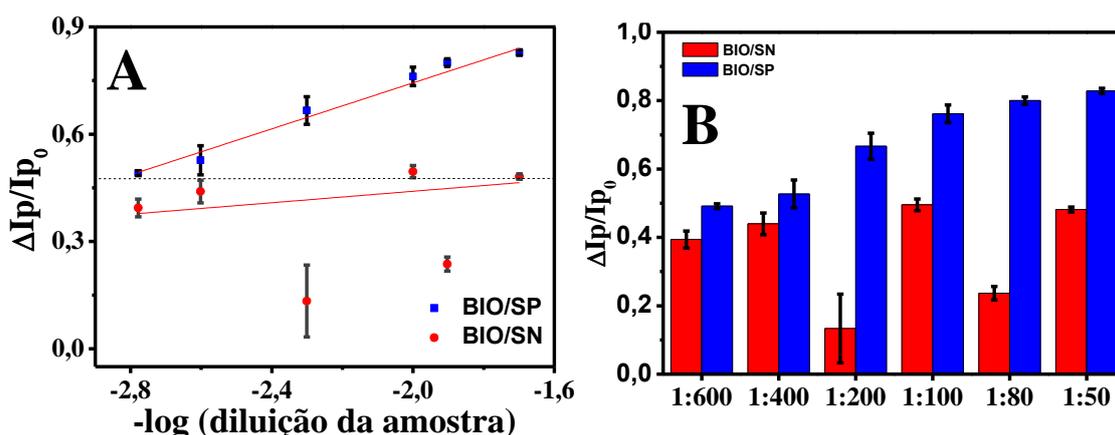


Figura 18: (A) Variação relativa de I_p sob condições otimizadas do BIO após incubação em amostras de soro positivo e negativo diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) a diferentes diluições (v/v; 1:80, 1:50, 1:200, 1:400 e 1:600). (B) Histograma do BIO/SN e BIO/SP para diferentes diluições.

Para as diluições de SN não foi observado um comportamento linear. A resposta não seguiu nenhuma tendência clara com as diferentes diluições. Ademais, é possível observar uma linha imaginária em aproximadamente $y = 0,48$ entre os pontos referentes à BIO/SP e BIO/SN. De modo que é possível diferenciar uma amostra positiva de outra negativa para utilização de um biossensor qualitativo. Este imunossensor apresenta alta seletividade, já que é capaz de detectar anticorpos *anti-M. leprae* em amostras complexas.

6. Estudo de seletividade

Para o teste de especificidade, foram utilizados *pools* sorológicos de crianças saudáveis e pessoas adultas com leishmaniose ou HIV com diluição de 1:200 e testados nas mesmas condições previamente otimizadas. As amostras de crianças foram utilizadas como controle, uma vez que elas possuem um sistema imunológico ainda em desenvolvimento (SIMON; HOLLANDER; MCMICHAEL, 2015). Como é apresentado na Figura 19, pode-se notar que todas as três amostras geraram sinal abaixo de $y = 0,48$. Esse comportamento pode ser atribuído à ausência de anticorpos IgG *anti-M. leprae*, o que impede um bloqueio significativo no biossensor, evidenciando o potencial de especificidade do dispositivo.

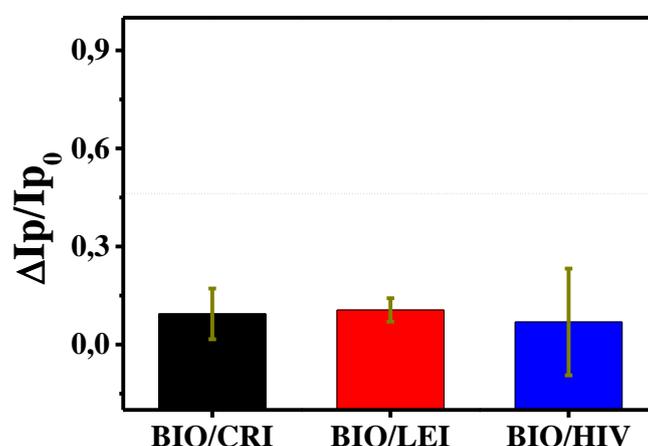


Figura 19: Histogramas das respostas eletroquímicas do biossensor incubado com amostras de criança (BIO/CRI), leishmaniose (BIO/LEI) e HIV (BIO/HIV) em diluições de 1:200.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstra o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico sem rótulo inovador e econômico para a detecção de hanseníase utilizando o peptídeo mimético MPML14. Este biossensor oferece uma alternativa promissora aos métodos de diagnóstico tradicionais, como baciloscopia e ELISA. A capacidade do biossensor para diferenciar amostras de soro positivo e negativo para hanseníase em uma ampla faixa de diluições destaca seu potencial para aplicações clínicas. A seletividade do biossensor foi ainda validada por sua falta de reatividade cruzada com amostras de crianças saudáveis e adultos com HIV ou leishmaniose, indicando alta seletividade para anticorpos anti-M.

leprae. Além disso, a natureza sem rótulo da plataforma do biossensor simplifica o procedimento de ensaio, reduzindo o tempo e o custo associados ao diagnóstico. A capacidade de fabricação do biossensor utilizando materiais prontamente disponíveis e técnicas de imobilização simples aumenta ainda mais seu apelo prático, particularmente em ambientes com recursos limitados. O biossensor eletroquímico baseado em MPML14 apresenta resultados promissores para a detecção de hanseníase, com potencial para diagnóstico precoce e intervenções terapêuticas oportunas. No entanto, estudos clínicos adicionais com tamanhos de amostra maiores são necessários para validar completamente sua eficácia e desempenho em um cenário do mundo real.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEBRÓN-GARCÍA-DE-EULATE, M.; BLUNDELL, T. L.; VEDITHI, S. C. Strategies for drug target identification in *Mycobacterium leprae*. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 7, p. 1569–1573, jul. 2021.

AFONSO, A. S.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Electrochemical DNA Biosensor for *Mycobacterium leprae* Identification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 2021.

AKYILMAZ, E.; YORGANCI, E. A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1874–1877, jul. 2008.

ALAFEEF, M. et al. Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip. **ACS Nano**, v. 14, n. 12, p. 17028–17045, 22 dez. 2020.

ALVES, L. M. et al. Development of a mimetic system for electrochemical detection of glutamate. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2479–2489, 28 set. 2016.

ANCHIDIN-NOROCEL, L. et al. Electrochemical sensors and biosensors: effective tools for detecting heavy metals in water and food with possible implications for children's health. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 19, n. 8, p. 100643, ago. 2024.

ARIYOSHI, K. et al. Electrochemical Impedance Spectroscopy Part 1: Fundamentals. **Electrochemistry**, v. 90, n. 10, p. 22–66071, 31 out. 2022.

AYDIN, M.; AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Advances in immunosensor technology. Em: **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 102p. 1–62.

BALABAN HANOGLU, S. et al. Detection strategies of infectious diseases via peptide-based electrochemical biosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 160, p. 108784, dez. 2024.

BALDON, E. J. et al. *Mycobacterium leprae* Hsp65 administration reduces the lifespan of aged high antibody producer mice. **Immunity & Ageing**, v. 11, n. 1, p. 6, 26 dez. 2014.

BANSOD, B. et al. A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, p. 443–455, ago. 2017.

BARBOSA, A. M. et al. Seroepidemiologic survey of the household contacts of leprosy patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 68, n. 10, p. 1389–1393, out. 2022.

BARRETO, F. C.; DA SILVA, M. K. L.; CESARINO, I. Copper Nanoparticles and Reduced Graphene Oxide as an Electrode Modifier for the Development of an Electrochemical Sensing Platform for Chloroquine Phosphate Determination. **Nanomaterials**, v. 13, n. 9, p. 1436, 22 abr. 2023.

BARRIAS, S. et al. Label free DNA-based optical biosensor as a potential system for wine authenticity. **Food Chemistry**, v. 270, p. 299–304, jan. 2019.

BLASQUES, R. V. et al. Flexible Label-Free Platinum and Bio-PET-Based Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2. **Biosensors**, v. 13, n. 2, p. 190, 26 jan. 2023.

BOUTH, R. C. et al. Specialized active leprosy search strategies in an endemic area of the Brazilian Amazon identifies a hypermutated *Mycobacterium leprae* strain causing primary drug resistance. **Frontiers in Medicine**, v. 10, 13 set. 2023.

BRAZ, B. A. et al. Graphene-Binding Peptide in Fusion with SARS-CoV-2 Antigen for Electrochemical Immunosensor Construction. **Biosensors**, v. 12, n. 10, p. 885, 17 out. 2022.

CABRAL, N. et al. Modulation of the Response to *Mycobacterium leprae* and Pathogenesis of Leprosy. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2 jun. 2022.

CAJIGAS, S. et al. Electrochemical genosensor for the specific detection of SARS-CoV-2. **Talanta**, v. 245, p. 123482, ago. 2022.

CANCELLIERE, R. et al. Label-free electrochemical immunosensors: A practical guide. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 180, p. 117949, nov. 2024.

CARVALHO, R. S. et al. Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 10, p. 1863–1867, 14 out. 2018.

CHAKRABORTY, A.; GHOSH, R.; BISWAS, A. Interaction of constituents of MDT regimen for leprosy with *Mycobacterium leprae* HSP18: impact on its structure and function. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 3, p. 832–853, 10 fev. 2022.

CHANDRA KISHORE, S. et al. Smartphone-Operated Wireless Chemical Sensors: A Review. **Chemosensors**, v. 10, n. 2, p. 55, 30 jan. 2022.

CHAVARRO-PORTILLO, B.; SOTO, C. Y.; GUERRERO, M. I. *Mycobacterium leprae*'s evolution and environmental adaptation. **Acta Tropica**, v. 197, p. 105041, set. 2019.

CHEN, K.-H. et al. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2022, p. 1–13, 4 jul. 2022.

CHERAGHI, S. et al. Novel enzymatic graphene oxide based biosensor for the detection of glutathione in biological body fluids. **Chemosphere**, v. 287, p. 132187, jan. 2022.

CHOI, W. et al. Modeling and Applications of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) for Lithium-ion Batteries. **Journal of Electrochemical Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 29 fev. 2020.

COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding Voltammetry**. 3^a ed. New Jersey: World Scientific, 2018.

DA SILVA, S. M. et al. Improved anodic stripping voltammetric detection of zinc on a disposable screen-printed gold electrode. **Ionics**, v. 26, n. 5, p. 2611–2621, 2 maio 2020.

DE ABREU, M. A. M. M. et al. Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, p. 59–64, jan. 2014.

DUBANIEWICZ, A. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 6, p. 419–424, abr. 2010.

DURMAZ, E. et al. Lignocellulosic Bionanomaterials for Biosensor Applications. **Micromachines**, v. 14, n. 7, p. 1450, 19 jul. 2023.

DUTHIE, M. S. et al. Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3267–3275, 28 abr. 2016.

ERTEKIN, Ö.; ÖZTÜRK, S.; ÖZTÜRK, Z. Label Free QCM Immunobiosensor for AFB1 Detection Using Monoclonal IgA Antibody as Recognition Element. **Sensors**, v. 16, n. 8, p. 1274, 11 ago. 2016.

ESFANDIARI, N.; ALIOFKHAZRAEI, M. Advances in the determination of trace amounts of iron cations through electrochemical methods: A comprehensive review of principles and their limits of detection. **Talanta**, v. 277, p. 126365, set. 2024.

FABRI, A. DA C. O. C. et al. Integrative literature review of the reported uses of serological tests in leprosy management. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 158–164, abr. 2016.

FUKU, X.; BILIBANA, M. P.; IWUOHA, E. Genosensor design and strategies towards electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) signal transduction: Mechanism of interaction. **Journal of Molecular Structure**, v. 1269, p. 133810, dez. 2022.

GAMA, R. S. et al. High frequency of M. leprae DNA detection in asymptomatic household contacts. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 153, 2 dez. 2018.

GAMA, R. S. et al. Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

GUEVARA, A. et al. Chromoblastomycosis-Leprosy Co-Infection in Central West Brazil. Presentation of Three Cases and Literature Review. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 363–374, 28 ago. 2022.

GUPTA, N. et al. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111435, set. 2019.

HAJI-HASHEMI, H. et al. Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of Citrus tristeza virus using modified gold electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 244, p. 211–216, jun. 2017.

HUSSEIN, H. A. et al. Designing and fabrication of electrochemical nano-biosensor for the fast detection of SARS-CoV-2-RNA. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 5139, 29 mar. 2023.

ILKHANI, H.; FARHAD, S. A novel electrochemical DNA biosensor for Ebola virus detection. **Analytical Biochemistry**, v. 557, p. 151–155, set. 2018.

JANIK-KARPINSKA, E. et al. Immunosensors—The Future of Pathogen Real-Time Detection. **Sensors**, v. 22, n. 24, p. 9757, 13 dez. 2022.

JIN, S.-H.; AHN, K. J.; AN, S. Importance of the immune response to *Mycobacterium leprae* in the skin. **Biomedical Dermatology**, v. 2, n. 1, p. 1, 20 dez. 2018.

KARIMZADEH, A. et al. Peptide based biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 107, p. 1–20, out. 2018.

KIM, S.; YOO, H. Self-Assembled Monolayers: Versatile Uses in Electronic Devices from Gate Dielectrics, Dopants, and Biosensing Linkers. **Micromachines**, v. 12, n. 5, p. 565, 17 maio 2021.

LAZANAS, A. CH.; PRODRONIDIS, M. I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. **ACS Measurement Science Au**, v. 3, n. 3, p. 162–193, 21 jun. 2023.

LAZAR, J. et al. Hampering of the Stability of Gold Electrodes by Ferri-/Ferrocyanide Redox Couple Electrolytes during Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 682–687, 5 jan. 2016.

LETURIONDO, A. L. et al. Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 22, 7 dez. 2019.

- LI, D. et al. Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of Escherichia coli O157:H7. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n. 1, p. 89–96, fev. 2011.
- LIMA, M. I. S. et al. HSP60 mimetic peptides from Mycobacterium leprae as new antigens for immunodiagnosis of Leprosy. **AMB Express**, v. 13, n. 1, p. 120, 27 out. 2023.
- LIMA, T. M. et al. Development and Optimization of a Cost-Effective Electrochemical Immunosensor for Rapid COVID-19 Diagnosis. **Biosensors**, v. 15, n. 2, p. 67, 22 jan. 2025.
- LIU, Q.; WANG, J.; BOYD, B. J. Peptide-based biosensors. **Talanta**, v. 136, p. 114–127, maio 2015.
- LV, Z.; WANG, J.; CHEN, G. **The Wettability and Topography of Self-Assembled Protein Monolayer Linked by Alkanethiols**. 2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. **Anais...IEEE**, jun. 2009.
- MA, K. H.; SVAREN, J. Epigenetic Control of Schwann Cells. **The Neuroscientist**, v. 24, n. 6, p. 627–638, 7 dez. 2018.
- MACDONALD, D. D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 8–9, p. 1376–1388, jan. 2006.
- MACFARLANE, D. R.; ZHOU, Z.; NEWMAN, P. J. Differential pulse voltammetry studies of heavy metal fluoride melts. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 34, n. 2, p. 197–204, fev. 2004.
- MARENCO, E. B. et al. Administration of Mycobacterium leprae rHsp65 Aggravates Experimental Autoimmune Uveitis in Mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e7912, 19 nov. 2009.
- MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2655, 10 abr. 2014.
- MELINTE, G. et al. DNA sensing technology a useful food scanning tool. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 154, p. 116679, set. 2022.
- MOHAMAD NOR, N.; RIDHUAN, N. S.; ABDUL RAZAK, K. Progress of Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Biosensor Based on Nanomaterial-Modified Electrode. **Biosensors**, v. 12, n. 12, p. 1136, 6 dez. 2022.
- MOIOLA, M.; MEMEO, M. G.; QUADRELLI, P. Stapled Peptides—A Useful Improvement for Peptide-Based Drugs. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3654, 10 out. 2019.

MOLLA, A.; YOUK, J. H. Recent progress on electroanalytical sensing of small molecules and biomolecules using carbon dots: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 127, p. 62–81, nov. 2023.

MONK, K. R.; FELTRI, M. L.; TAVEGGIA, C. New insights on schwann cell development. **Glia**, v. 63, n. 8, p. 1376–1393, 29 ago. 2015.

MONTANHA, J. O. M. et al. ML Flow serological test: complementary tool in leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 98, n. 3, p. 331–338, maio 2023.

MUNGROO, M. R.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Mycobacterium leprae: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104475, dez. 2020.

NAIKOO, G. A. et al. Trends in bimetallic nanomaterials and methods for fourth-generation glucose sensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 162, p. 117042, maio 2023.

NECHACHE, A.; CASSIR, M.; RINGUEDÉ, A. Solid oxide electrolysis cell analysis by means of electrochemical impedance spectroscopy: A review. **Journal of Power Sources**, v. 258, p. 164–181, jul. 2014.

NETO, S. Y. et al. Visible LED light driven photoelectroanalytical detection of antibodies of visceral leishmaniasis based on electrodeposited CdS film sensitized with Au nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 256, p. 682–690, mar. 2018.

NGUYEN, H. H. et al. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 121, 2 jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030: overview**. [s.l.: s.n.].

OSTERYOUNG, J. Pulse voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 4, p. 296, 1 abr. 1983.

ÖZKAN, S. A.; USLU, B.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical Techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 155–181, jul. 2003.

ÖZSOYLU, D.; WAGNER, T.; SCHÖNING, M. J. Electrochemical Cell-based Biosensors for Biomedical Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 713–733, abr. 2022.

PENG, P. et al. Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 152, p. 116605, jul. 2022.

PIERNEEF, L. et al. Detection of anti-M. leprae antibodies in children in leprosy-endemic areas: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009667, 27 ago. 2021.

POHANKA, M. Glucose electrochemical biosensors: The past and current trends. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 16, n. 7, p. 210719, 2021.

QI, H. et al. Electrogenerated chemiluminescence peptide-based bioassay. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 33, n. 4, 1 jan. 2014.

QUEIROZ, E. A. et al. Immunological biomarkers of subclinical infection in household contacts of leprosy patients. **Immunobiology**, v. 224, n. 4, p. 518–525, jul. 2019.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098, 2013.

RIBEIRO, G. DE C. et al. Profile of the leprosy endemic in the district of Murrupula, Nampula, Mozambique: A population-based study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 56, 2023.

ROBINSON, C.; JUSKA, V. B.; O'RIORDAN, A. Surface chemistry applications and development of immunosensors using electrochemical impedance spectroscopy: A comprehensive review. **Environmental Research**, v. 237, p. 116877, nov. 2023.

ROJAS, R. E. et al. IgM anti-phenolic glycolipid I and IgG anti-10-kDa heat shock protein antibodies in sera and immune complexes isolated from leprosy patients with or without erythema nodosum leprosum and contacts. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 65–74, set. 1997.

ROSA, T. L. S. A. et al. Whole blood transcriptomics reveals the enrichment of neutrophil activation pathways during erythema nodosum leprosum reaction. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 23 abr. 2024.

SACCO, A. Electrochemical impedance spectroscopy: Fundamentals and application in dye-sensitized solar cells. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 814–829, nov. 2017.

SAJEER PARAMABATH, M.; VARMA, M. Demystifying <sc>PCR</sc> tests, challenges, alternatives, and future: A quick review focusing on <sc>COVID</sc> and fungal infections. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 51, n. 6, p. 719–728, 24 nov. 2023.

SANTHA, H.; DOBAY, R.; HARSANYI, G. **Uricase enzyme types immobilized in poly-N-methylpyrrole for biosensor applications**. 2nd International IEEE Conference on Polymers and Adhesives in Microelectronics and Photonics. POLYTRONIC 2002. Conference Proceedings (Cat. No.02EX599). **Anais...IEEE**, 2002.

SAUNDERSON, P.; FASTENAU, A. Leprosy in Europe – towards zero leprosy. **Leprosy Review**, v. 93, n. 4, p. 298–310, 1 dez. 2022.

SCHREUDER, P. A. M.; NOTO, S.; RICHARDUS, J. H. Epidemiologic trends of leprosy for the 21st century. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 1, p. 24–31, jan. 2016.

SILVA, M. J. A. et al. Comparative analysis of the leprosy detection rate regarding its clinical spectrum through PCR using the 16S rRNA gene: a scientometrics and meta-analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 21 out. 2024.

SIMON, A. K.; HOLLANDER, G. A.; MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1821, p. 20143085, 22 dez. 2015.

SIWAKOTI, S. et al. Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) with Slit Skin Smear Examination (SSS) to Confirm Clinical Diagnosis of Leprosy in Eastern Nepal. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005220, 27 dez. 2016.

SONG, M. et al. Materials and Methods of Biosensor Interfaces With Stability. **Frontiers in Materials**, v. 7, 15 jan. 2021.

STAN, D. et al. What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? **Processes**, v. 10, n. 4, p. 723, 8 abr. 2022.

SUGAWARA-MIKAMI, M. et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 1985–2011, 31 dez. 2022.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26–37, jan. 2015.

TAN, D.; LI, F.; ZHOU, B. Antifouling Self-Assembled Monolayers for Designing of Electrochemical Biosensors. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 15, n. 9, p. 9446–9458, set. 2020.

TICHTER, T.; MARSHALL, A. T. Electrochemical characterisation of macroporous electrodes: Recent advances and hidden pitfalls. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 34, p. 101027, ago. 2022.

TRIER, N.; HANSEN, P.; HOUEN, G. Peptides, Antibodies, Peptide Antibodies and More. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6289, 13 dez. 2019.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. **Analytical Letters**, v. 44, n. 16, p. 2644–2702, nov. 2011.

VANOVA, V. et al. Peptide-based electrochemical biosensors utilized for protein detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 180, p. 113087, maio 2021.

VASHIST, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. **Diagnosics**, v. 2, n. 3, p. 23–33, 27 ago. 2012.

VOPÁLENSKÁ, I.; VÁCHOVÁ, L.; PALKOVÁ, Z. New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 72, p. 160–167, out. 2015.

WANG, M. et al. Peptide-Derived Biosensors and Their Applications in Tumor Immunology-Related Detection. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 431–441, 11 jan. 2022.

WANG, M. et al. Phage display based biosensing: Recent advances and challenges. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 173, p. 117629, abr. 2024.

WANG, S. et al. Electrochemical impedance spectroscopy. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 41, 10 jun. 2021.

WIKER, H. G.; TOMAZELLA, G. G.; DE SOUZA, G. A. A quantitative view on Mycobacterium leprae antigens by proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1711–1719, ago. 2011.

WINK, TH. et al. Self-assembled Monolayers for Biosensors. **The Analyst**, v. 122, n. 4, p. 43R-50R, 1997.

WU, J. et al. Device integration of electrochemical biosensors. **Nature Reviews Bioengineering**, v. 1, n. 5, p. 346–360, 24 fev. 2023a.

WU, S. et al. Mode of Action of Heat Shock Protein (HSP) Inhibitors against Viruses through Host HSP and Virus Interactions. **Genes**, v. 14, n. 4, p. 792, 25 mar. 2023b.

YAMADA, H. et al. Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals. **Electrochemistry**, v. 90, n. 10, p. 22–66082, 31 out. 2022.

YANG, M.; MCGOVERN, M. E.; THOMPSON, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 346, n. 3, p. 259–275, jul. 1997.

YE, Y.; GUO, H.; SUN, X. Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 389–404, fev. 2019.

YOTSUMOTO NETO, S. et al. Immunodiagnostic of leprosy exploiting a photoelectrochemical platform based on a recombinant peptide mimetic of a Mycobacterium leprae antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 143, p. 111625, out. 2019.

YU, X. et al. Multivariate chemical analysis: From sensors to sensor arrays. **Chinese Chemical Letters**, v. 35, n. 7, p. 109167, jul. 2024.

YUAN, L.; LIU, L. Peptide-based electrochemical biosensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 344, p. 130232, out. 2021.

ZHANG, J. et al. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2888–2895, 8 nov. 2007.

ZHANG, L. et al. Study of Schiff base formation between dialdehyde cellulose and proteins, and its application for the deproteinization of crude polysaccharide extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 532–540, fev. 2018.

ZHANG, M. et al. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 5, p. 363–367, abr. 2001.

ZHOU, J. et al. Molecular epidemiological characteristics of *Mycobacterium leprae* in highly endemic areas of China during the COVID-19 epidemic. **Frontiers in Public Health**, v. 12, 24 jan. 2024.