

IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO COM PEPTÍDEO SINTÉTICO MIMÉTICO DE HSP60

Matheus B. Garcez¹; Gustavo C. Diniz²; Domingos R. Santos-Neto¹; Lizandra N. Castro¹; Ilanna C. Lopes³; Jessica S. Stefano¹; Luiz R. G. e Silva⁴; Iranaldo S. da Silva¹; Luiza M. F. Dantas¹

¹Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís - MA

²Instituto Federal do Maranhão - IFMA, São Luís – MA

³Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Grajaú – MA

⁴Colégio Universitário – UFMA, São Luís – MA

matheus.garcez@discente.ufma.br

Palavras-Chave: Imunossensor, *Mycobacterium leprae*, HSP60.

Introdução

Milhares de pessoas são infectadas todos os anos pela *Mycobacterium leprae*, patógeno causador da hanseníase. Dentre os países com maiores índices, encontram-se a Índia e Brasil liderando o ranking em primeiro e segundo lugar, respectivamente, países esses que apresentam baixos índices de desenvolvimento social. [1–3] É uma doença classificada como tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS).[4]

A hanseníase é uma doença crônica que atinge a pele e os nervos periféricos causando desde lesões leves até lesões mais graves como deformidades nos membros, o que compromete as atividades cotidianas do paciente. [5] A rota de transmissão ainda não é totalmente conhecida, mas grande parte dos pesquisadores acredita que ocorra por meio de gotículas de aerossóis expelidas por pacientes com alta carga bacteriana. [6]

A cura pode ser alcançada submetendo o paciente a um tratamento chamado de poliquimioterapia (PQT) desenvolvida pela OMS em 1982, que consiste em administrar diversos medicamentos capazes de combater a *M. leprae*, tais como dapsona, rifampicina, clofazimina, minociclina, entre outros. [7] Porém, a hanseníase ainda pode deixar sequelas. Para mitigar os riscos de incapacidade física, o diagnóstico precoce é a principal estratégia. O teste de esfregaço de pele (baciloscopia) é um dos principais métodos de avaliação do paciente com suspeita de hanseníase, porém é um teste muito doloroso e ainda assim pacientes com baixa cargas bacterianas podem apresentar baciloscopia negativa. [8]

Portanto, há grande necessidade de desenvolver métodos de diagnóstico sensíveis, específicos e de fácil aplicação no local de coleta da amostra (point-of-care), sem demandar profissionais altamente especializados ou transporte das amostras. Sendo assim, peptídeos sintéticos e materiais recombinantes estão sendo cada vez mais explorados para desenvolvimento de métodos de diagnósticos precoce da hanseníase. [9]

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 epítopo mais exposto. [10, 11]

A fim de aproveitar o efeito sinergético dos peptídeos sintéticos, que podem apresentar atividade antigênicas, e a sensibilidade das técnicas eletroanalíticas, este trabalho teve como objetivo desenvolver um imunossensor eletroquímico, baseado na especificidade do peptídeo sintético MPML14, mimético da proteína de choque térmico 60 (heat shock protein 60 – HSP60) presente em *Mycobacterium leprae* [12], capaz de diferenciar soros positivos (SP) e negativos (SN) para hanseníase através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) utilizando um eletrodo de ouro serigrafado.

Material e Métodos

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 mol L⁻¹ (pH 7,4) e H₂SO₄ (Isofar, 85%) 0,5 mol L⁻¹ foram utilizadas como eletrólito suporte nas medidas eletroquímicas e armazenadas sob refrigeração. As soluções de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (Synth, 99% e 98,5%) e glutaraldeído (GTA) (Sigma-Aldrich, 25%) foram preparadas diariamente para evitar degradação. A solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] foi preparada dissolvendo o soluto em tampão fosfato 0,1 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 (ASB) (Sigma Aldrich, 98%) e as amostras de *pools* de soro sanguíneo positivo (SP) e negativo (SN) foram diluídas em tampão fosfato 0,1 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.

O eletrodo serigráfico de ouro (screen-printed gold electrode – SPGE) foi submetido a uma ativação eletroquímica em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, aplicando potenciais de 1,2 V e -0,35 V por 10 s cada, seguidos por 10 ciclos de voltametria cíclica (VC) a 0,1 V s⁻¹. A eficácia da ativação foi verificada com 15 ciclos de VC a 100 mV s⁻¹. [12]

O SPGE ativado foi imerso em solução de 3AMP 1,0 mmol L⁻¹ por 15 min, seguido de lavagem com água desionizada em abundância. Em seguida, 7,0 µL de uma solução contendo 0,05 mol L⁻¹ de EDC e 0,25 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 deionizada. A mistura do peptídeo MPML14, ASB e GTA (680,0 mg L⁻¹, 3,2% e 0,2%, respectivamente) foi preparada previamente antes de cada uso. Foram depositados 10,0 µL desta mistura na superfície do eletrodo e, após a secagem, o biossensor (BIO) estava pronto para uso. [9]

As amostras de soro positivo (SP) e negativo (SN) foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) e um volume de 15,0 µL foi immobilizado na superfície do biossensor (BIO/SN e BIO/SP) por 30 min em ambiente úmido para evitar a evaporação. [13] Após a lavagem com tampão fosfato, o Imunossensor foi analisado.

Resultados e Discussão

Inicialmente, foi avaliado o perfil voltamétrico do SPGE em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, antes e após o tratamento eletroquímico, Figura 1A. 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. 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 1B. Para as correntes de pico de oxidação e redução, houve aumento 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 $\Delta E_p = 0,10 \text{ V}$, enquanto para o SPGE sem pré-tratamento obteve-se $\Delta E_p = 0,51 \text{ V}$, representando uma melhora de 80% em relação ao ΔE_p do eletrodo não tratado. Essa diferença indica que o pré-tratamento removeu material orgânico presente na tinta de ouro, aumentando a área eletroativa disponível no eletrodo.[14] Deste modo, o SPGE tratado apresentou um sistema com melhor reversibilidade, evidenciado pelo menor ΔE_p , indicando uma relação de taxa de transferência de elétrons/taxa de transferência de massa maior. [15]

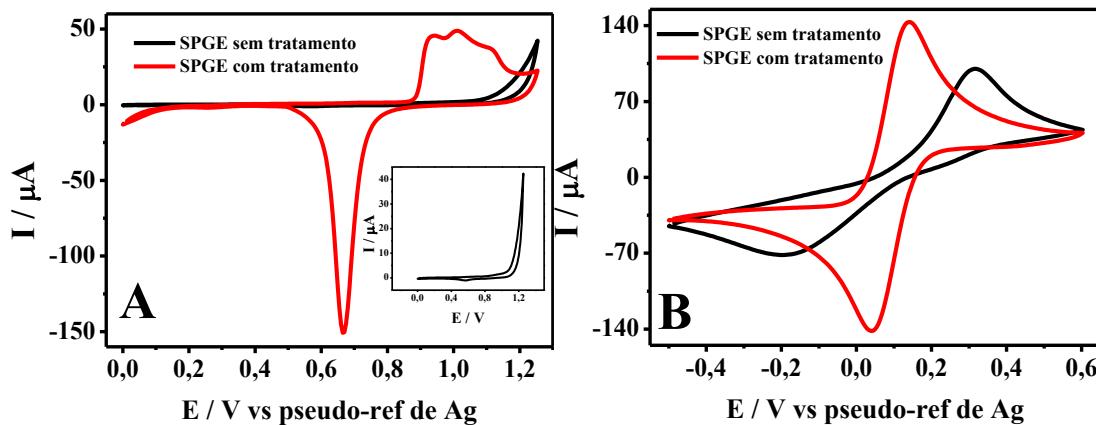


Figura 1: (A) VC em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} com SPGE sem tratamento e com tratamento, insert: SPGE sem tratamento. (B) VC em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/-4}$ 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 com SPGE sem tratamento e com tratamento. Passo de potencial de 5 mV, velocidade de 100 mVs^{-1} .

A EIS também foi usada para avaliar a eficácia do tratamento eletroquímico e os resultados podem ser observados na Figura 2. 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. [12] 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 imunossensor.

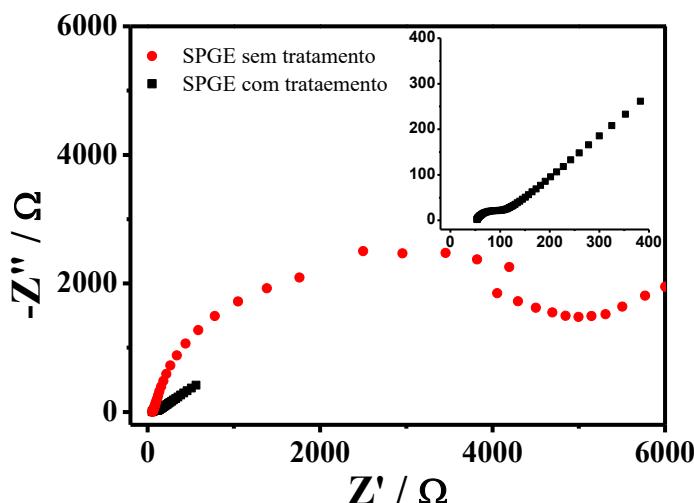


Figura 2: Gráfico de Nyquist com SPGE sem e com tratamento, insert: SPGE sem tratamento. Condições experimentais: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/-4}$ 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 na faixa de frequência de 1.10^5 - 0,1 Hz.

A cada etapa da fabricação do imunossensor 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. 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 significativa após as 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 3A está representado os gráficos de Nyquist correspondente às diferentes etapas da

fabricação do imunossensor, acompanhadas pelo gráfico de barras com os valores de resistência à transferência de carga (Figura 3B).

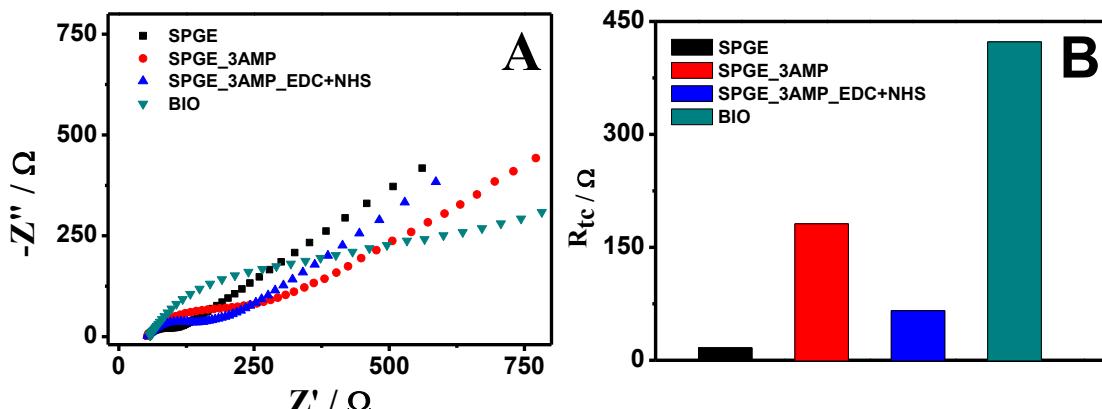


Figura 3: (A) Gráfico de Nyquist em diferentes etapas de fabricação do imunossensor. (B) Efeito da etapa de modificação sobre o valor da resistência à transferência de carga. Condições experimentais: $[Fe(CN)_6]^{3-/4}$ 5 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 na faixa de frequência de 1.10⁵ – 0,1 Hz.

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. Os grupos carboxílicos presentes na extremidade do 3AMP repelem as cargas negativas da sonda redox dificultando a transferência eletrônica. [16]

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. [17] 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. [18]

Na última etapa da construção do imunossensor, forma-se um filme na superfície do eletrodo, no qual 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. [19] A albumina de soro bovino (ASB) foi utilizada para bloquear grupos reativos, reduzindo as ligações não específicas, diminuindo a probabilidade de resultados falsos negativos. [20] O GTA foi utilizado para aumentar a estabilidade do imunossensor. Ele é um agente de reticulação, capaz de formar ligações cruzadas entre grupos aminas livres, formando bases de Schiff. [21, 22] 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 .

Na Figura 4A, é representado as respostas da EIE para o BIO, BIO/SP e BIO/SN. A EIE do BIO teve uma resistência à transferência de carga (R_{tc}) menor com valor de 271,0 Ω , 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 Ω , respectivamente (Figura 4B). Essa diferença pode ser atribuída à presença de anticorpos no pool de amostras SP, que se ligam especificamente ao peptídeo MPML14, bloqueando de maneira mais acentuada a superfície do imunossensor. 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. 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 diferem a um nível de 90% de confiança.

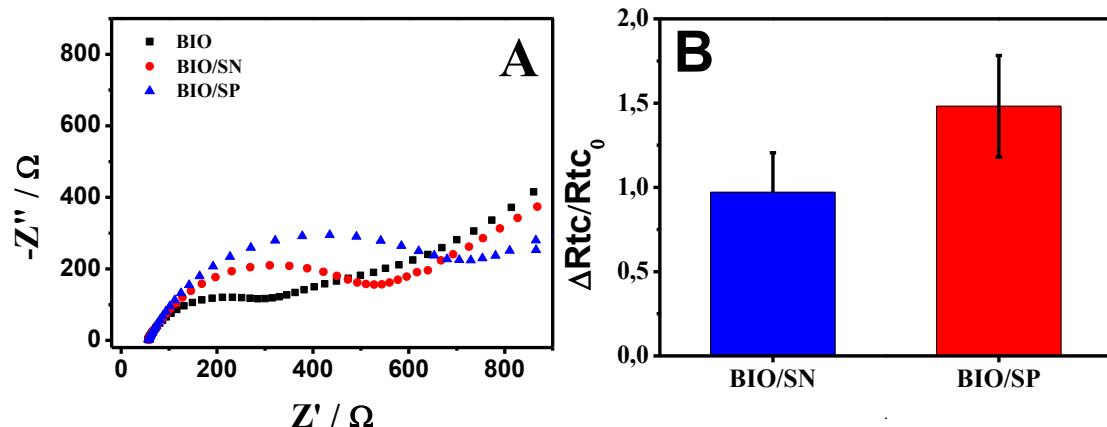


Figura 4: (A) Gráfico de Nyquist com BIO, BIO/SN e BIO/SP. (B) variação relativa de R_{tc} do BIO após incubação com SN (1:100) e SP (1:100). Condições experimentais: $[Fe(CN)_6]^{3/-4}$ 5 mmol L⁻¹ em T. Fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 na faixa de frequência de 1.10^5 – 0,1 Hz.

Conclusões

O imunossensor eletroquímico desenvolvido, baseado no peptídeo sintético MPML14 mimético da HSP60 de *Mycobacterium leprae*, apresentou desempenho promissor para o diagnóstico da hanseníase. O tratamento eletroquímico do eletrodo foi essencial para deixar a superfície mais limpa e condutiva, resultando em melhor resposta eletroquímica. A aplicação do imunossensor em amostras de soro positivo e negativo, por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica, permitiu observar diferenças significativas nos valores de resistência à transferência de carga, especialmente para o BIO/SP, indicando interações específicas entre o peptídeo MPML14 (antígeno) e os anticorpos presentes na amostra positiva. Esses resultados evidenciam o potencial do dispositivo baseado no peptídeo sintético MPML14 associado à EIE, para contribuir com testes rápidos para o diagnóstico da hanseníase em ambientes point-of-care.

Entretanto, é importante destacar que os ensaios foram realizados com número limitado de amostras e utilizando pools de soro, o que restringe a generalização dos resultados. Assim, futuros estudos devem incluir maior diversidade de amostras clínicas e análises estatísticas mais robustas, a fim de validar o desempenho do dispositivo em condições reais de diagnóstico.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras: FAPEMA (00930/22); CNPq e CAPES (Finance Code 001) pelo apoio financeiro. E pela bolsa de estudos fornecida pela CAPES.

Referências

1. Carvalho RS, Foschiani IM, Costa MRSN, et al (2018) 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 37:1863–1867. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3320-9>
2. Gama RS, Gomides TAR, Gama CFM, et al (2018) High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. BMC Infect Dis 18:153. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3056-2>
3. Rosa TLSA, Leal-Calvo T, Tavares IF, et al (2024) Whole blood transcriptomics reveals the enrichment of neutrophil activation pathways during erythema nodosum leprosum reaction. Front Immunol 15:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1366125>

4. Ribeiro G de C, Lages D dos S, Lages ATC, et al (2023) Profile of the leprosy endemic in the district of Murrupula, Nampula, Mozambique: A population-based study. *Rev Soc Bras Med Trop* 56:. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0321-2022>
5. Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, et al (2022) Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence* 13:1985–2011. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2141987>
6. Cabral N, de Figueiredo V, Gandini M, et al (2022) Modulation of the Response to *Mycobacterium leprae* and Pathogenesis of Leprosy. *Front Microbiol* 13:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918009>
7. Acebrón-García-de-Eulate M, Blundell TL, Vedithi SC (2021) Strategies for drug target identification in *Mycobacterium leprae*. *Drug Discov Today* 26:1569–1573. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.026>
8. Afonso AS, Madurro JM, Brito-Madurro AG (2021) Electrochemical DNA Biosensor for *Mycobacterium leprae* Identification. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 64:. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021210030>
9. Yotsumoto Neto S, Sousa Lima MI, Ferreira Pereira SR, et al (2019) Immunodiagnostic of leprosy exploiting a photoelectrochemical platform based on a recombinant peptide mimetic of a *Mycobacterium leprae* antigen. *Biosens Bioelectron* 143:111625. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111625>
10. Qi H, Dang Q, Dong M, et al (2014) Electrogenerated chemiluminescence peptide-based bioassay. *Rev Anal Chem* 33:. <https://doi.org/10.1515/revac-2014-0015>
11. Vanova V, Mitrevska K, Milosavljevic V, et al (2021) Peptide-based electrochemical biosensors utilized for protein detection. *Biosens Bioelectron* 180:113087. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113087>
12. Zhang J, Song S, Wang L, et al (2007) A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA. *Nat Protoc* 2:2888–2895. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.419>
13. Lima TM, Leal DM, Ferreira ZC, et al (2025) Development and Optimization of a Cost-Effective Electrochemical Immunosensor for Rapid COVID-19 Diagnosis. *Biosensors (Basel)* 15:67. <https://doi.org/10.3390/bios15020067>
14. da Silva SM, Squissato AL, Rocha DP, et al (2020) Improved anodic stripping voltammetric detection of zinc on a disposable screen-printed gold electrode. *Ionics (Kiel)* 26:2611–2621. <https://doi.org/10.1007/s11581-019-03379-6>
15. YAMADA H, YOSHII K, ASAHI M, et al (2022) Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals. *Electrochemistry* 90:22–66082. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>
16. Neto SY, Souto DEP, de Andrade HM, et al (2018) Visible LED light driven photoelectroanalytical detection of antibodies of visceral leishmaniasis based on electrodeposited CdS film sensitized with Au nanoparticles. *Sens Actuators B Chem* 256:682–690. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.202>
17. Ertekin Ö, Özürk S, Özürk Z (2016) Label Free QCM Immunobiosensor for AFB1 Detection Using Monoclonal IgA Antibody as Recognition Element. *Sensors* 16:1274. <https://doi.org/10.3390/s16081274>
18. Li D, Feng Y, Zhou L, et al (2011) Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Chim Acta* 687:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.12.018>
19. Vashist SK (2012) Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics* 2:23–33. <https://doi.org/10.3390/diagnostics2030023>
20. Blasques RV, de Oliveira PR, Kalinke C, et al (2023) Flexible Label-Free Platinum and Bio-PET-Based Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2. *Biosensors (Basel)* 13:190. <https://doi.org/10.3390/bios13020190>
21. Akyilmaz E, Yorgancı E (2008) A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. *Biosens Bioelectron* 23:1874–1877. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.03.001>
22. Zhang L, Zhang Q, Zheng Y, et al (2018) Study of Schiff base formation between dialdehyde cellulose and proteins, and its application for the deproteinization of crude polysaccharide extracts. *Ind Crops Prod* 112:532–540. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.056>