



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023023495-0 A2

(22) Data do Depósito: 09/11/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
20/05/2025

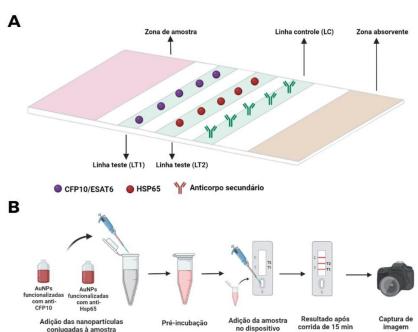
(54) Título: BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO COMBINADAS DE BIOMARCADORES DA TUBERCULOSE, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DO BIOSENSOR, USO DO BIOSENSOR

(51) Int. Cl.: G01N 33/577.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): VALTENCIR ZUCOLOTTO; ISABELLA SAMPAIO DO NASCIMENTO; VINICIUS CAUAN MENDES DA SILVA.

(57) Resumo: BIOSENSOR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO COMBINADAS DE BIOMARCADORES DA TUBERCULOSE, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DO BIOSENSOR, USO DO BIOSENSOR. A presente invenção refere-se a um biosensor para o diagnóstico da tuberculose a partir da detecção simultânea e quantitativa de dois biomarcadores da doença pelo modelo competitivo. O biosensor é formado por 3 áreas retangulares constituídas por diferentes papéis: zona de amostra, formada por fibra de vidro; zona de detecção, por nitrocelulose; e a zona absorvente, por celulose. A detecção dos alvos acontece na zona de detecção, na qual encontram-se duas linhas testes, uma formada pelo complexo CFP-10/ESAT-6 e a outra contendo proteínas Hsp65 imobilizadas.



BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO COMBINADAS DE BIOMARCADORES DA TUBERCULOSE, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DO BIOSSENSOR, USO DO BIOSSENSOR

CAMPO DE INOVAÇÃO

[001] A presente invenção se insere nos campos de Saúde, Analítica e Biotecnologia, especificamente na área de diagnóstico de tuberculose, e consiste em dispositivos para detecção rápida e quantificação de biomarcadores da tuberculose como ferramenta de diagnóstico rápido.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

[002] A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb* ou MTB) e que representa um problema de saúde pública mundial. A TB é transmitida pelo ar através da tosse, espirro ou até mesmo pela fala (AZMI et al., 2021). A forma mais comum da doença é a pulmonar, quando a bactéria infecta e se instala nos pulmões. Entretanto, em casos de comprometimento do sistema imune, a *M. tb* pode infectar outras regiões, como olhos e trato gastrointestinal, levando à forma extrapulmonar da doença - que representa cerca de 20% dos casos notificados. O patógeno ainda tem a capacidade de se esquivar do sistema imune e permanecer em um estado inativo no indivíduo, desencadeando a infecção latente. Nesse caso, os indivíduos não apresentam sintomas e não atuam como transmissores do agente (ZHOU et al., 2021; ALLAHYARTORKAMAN et al., 2019).

[003] Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), até a chegada da pandemia de COVID-19, a TB era a principal causa de mortes entre as doenças causadas por agentes infecciosos únicos. Em 2020, cerca de 10 milhões de pessoas

no mundo contraíram a TB, dentre as quais, aproximadamente 1,3 milhões morreram em decorrência da infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, a carga viral é uma das mais altas, classificando-o como um país prioritário para controle da doença segundo a OMS. Em 2021, aproximadamente 68 mil casos foram relatados, que representa uma taxa de incidência de 32,0 casos/100 mil habitantes. Em relação ao número de óbitos, desde 2011 registra-se entre 4.500 e 4.600 casos por ano, representando um coeficiente de, aproximadamente, 2,2 óbitos/100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Para o tratamento adequado da doença e o monitoramento efetivo da distribuição geográfica e do número de casos da TB, é imprescindível que se tenha um método de diagnóstico rápido e preciso.

[004] O diagnóstico inicial da tuberculose é realizado com base no quadro clínico do indivíduo, por meio da observação dos sintomas relatados intrinsecamente somado a análise dos aspectos epidemiológicos, como histórico de contato com pessoas infectadas e condições crônicas (por exemplo, *diabetes mellitus*). Todavia, como os sintomas são inespecíficos, o diagnóstico precisa ser confirmado pela detecção direta ou indireta da *M. tb* para que se inicie o tratamento (SULIS et al., 2016). Dentre as ferramentas de diagnóstico convencionais mais aplicadas, temos a baciloscopia de escarro, radiografia de tórax e cultura de escarro. O método mais utilizado em regiões endêmicas, por ser barato e rápido, é a baciloscopia de escarro. Entretanto, esse método apresenta baixa sensibilidade para indivíduos imunocompetentes e com coinfecção por HIV, além de não conseguir discriminar *M. tb* de outras micobactérias não

tuberculosas que são frequentes em algumas regiões (SARRO et al., 2018). Em relação aos outros dois métodos, na radiografia de tórax há a exposição à radiação e apresenta baixa especificidade, e as culturas de escarro, apesar de apresentarem alta sensibilidade, levam cerca de 2 a 8 semanas para fornecer o diagnóstico, o que pode atrasar o início do tratamento (ACHARYA et al., 2020; SAKTIAWATI et al., 2019). Ademais, essas metodologias de diagnóstico convencionais necessitam de infraestrutura laboratorial e de operadores especializados, o que compromete a aplicação em ambientes remotos onde a infecção prevalece.

[005] Diante disso, novas estratégias de detecção foram desenvolvidas para facilitar o diagnóstico da tuberculose. Entre essas metodologias, podemos citar o teste LF-FAM (do inglês, *lateral flow urine lipoarabinomannan*), o qual é usado para detecção da lipoarabinonoma (FAM) liberada durante a replicação da bactéria no hospedeiro. Entretanto, esse teste é indicado e tem melhor resultado com pacientes com a doença avançada e HIV-positivos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Além disso, outros testes moleculares para diagnóstico rápido foram desenvolvidos, como o GeneXpert® MTB/RIF, o teste de amplificação isotérmica para diagnóstico da tuberculose (TB-LAMP) e o Truenat™ MTB®. No entanto, são métodos mais complexos, que apresentam limitações quanto a portabilidade e simplicidade das medidas (SHETE et al., 2019; HAN et al., 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Portanto, é necessário que novas ferramentas *point-of-care* sejam desenvolvidas a fim de oferecer um diagnóstico da tuberculose rápido e simples. Nesse sentido, os biossensores são promissores.

[006] Os biossensores consistem em dispositivos analíticos compostos por uma camada de biorreconhecimento, formada por biomoléculas que reconhecem a molécula que se deseja detectar. O evento de biorreconhecimento gera alterações físico-químicas que são convertidas por um transdutor em um sinal mensurável (GUPTA & KAKKAR, 2018). Na área da saúde, para aplicação no diagnóstico de tuberculose, alguns biossensores são reportados:

(i) No documento US10837956B2, um dispositivo biosensor compreendendo nanopartículas de ouro revestidas com dodecanotiol ou nanotubos de carbono de parede simples revestidos com 2-metil-2-buteno para detecção de compostos orgânicos voláteis indicativos de tuberculose é descrito.

(ii) No documento EP2997371B1, um método de sorodiagnóstico baseado na detecção de anticorpos em mamíferos para抗ígenos lipídicos derivados de *Mycobacterium tuberculosis* é descrito. Nessa invenção, os autores aplicaram a abordagem de eletroimpedância para aprimorar a sensibilidade do teste.

[007] Apesar dessas metodologias forneceram vantagens significativas em relação aos métodos de diagnósticos clássicos, observa-se a necessidade de equipamentos auxiliares para análise dos sinais, o que compromete a aplicabilidade em ambientes com recursos escassos. Sendo assim, os dispositivos baseados em papel são atraentes. Essas plataformas surgiram como ferramentas *point-of-care*, visto que apresentam diversas vantagens que viabilizam sua aplicação, como: baixo custo de produção; fácil armazenamento; biocompatível com amostras biológicas; facilidade de modificação por biomoléculas; e apresenta um

descarte fácil e seguro (MARTINEZ *et al.*, 2010). Dentre os biossensores baseados em papel, destacam-se os baseados em fluxo lateral, como os testes rápidos realizados em farmácia que estão desempenhando papel essencial na detecção de COVID-19, por exemplo.

[008] O ensaio de fluxo lateral (do inglês, *lateral flow assay* - LFA) consiste em tiras de papel feitas com diferentes materiais montadas em uma disposição específica sobre um suporte de sustentação. Um LFA tradicional é dividido em quatro partes principais: 1) região de amostra: onde a amostra é aplicada, geralmente feita de celulose ou fibra de vidro; 2) região de conjugação: onde encontra-se o bioconjugado (marcador, como uma nanopartícula, ligado a um biorreceptor, como DNA ou anticorpo) responsável por reconhecer o analito, sendo feita de fibra de vidro; 3) região de detecção: onde as linhas de teste e controle são impressas, normalmente feita de nitrocelulose; 4) região absorvente: responsável por absorver o fluido de maneira contínua, geralmente feita de celulose (KASETSIRIKUL, SHIDDIKY & NGUYEN, 2020).

[009] O princípio de funcionamento dos LFA é simples e pode ser aplicado por meio de duas estratégias: modelo sanduíche e competitivo. No primeiro deles, a amostra é aplicada na região de amostra e, caso ela contenha o analito, ele será capturado pelos biorreceptores ligados a transdutores (como as nanopartículas de ouro), o que resulta na primeira interação analito-receptor. Por força de capilaridade, o conjugado flui para a zona de detecção, passando pela linha de teste, onde os conjugados contendo o analito são capturados - indicando a presença do alvo -, e

pela linha controle, onde os conjugados excedentes são capturados - indicando o funcionamento do teste. Já no modelo competitivo, o analito na amostra e analito marcado competem pelo biorreceptor na linha de teste ou o analito na amostra e analito na linha de teste competem pelo biorreceptor marcado, ambos resultando numa diminuição da intensidade da linha de teste na presença do alvo (QUESADA-GONZÁLEZ & MERKOÇI, 2015; PAROLO *et al.*, 2020). Portanto, percebe-se que os dispositivos de fluxo lateral podem ser utilizados como ferramentas simples, rápidas e aplicadas em diagnóstico *point-of-care* para diferentes tipos de doenças, incluindo infecciosas, como a tuberculose, como relatado por Banerjee e Jaiswal (ARIFFIN *et al.*, 2020). Entretanto, não se identificou a aplicação da ferramenta de maneira quantitativa para complementar a análise qualitativa visual amplamente relatada na literatura, tornando inovadora a ferramenta aqui descrita. Outros ensaios de fluxo lateral também já foram relatados, incluindo alguns específicos para testes envolvendo a tuberculose:

(i) No documento EP3232197A1, os autores descrevem um LFA contendo uma linha de teste para detecção de um analito único da doença. A área de detecção consiste em um antígeno da tuberculose para formar a linha teste e uma proteína de controle.

(ii) No documento EP1478395B1, um kit de imunoensaio para detectar ao menos um anticorpo específico para *Mycobacterium tuberculosis* é descrito. Nessa invenção, os autores modificam o ensaio de fluxo lateral com duas linhas teste: a primeira é composta por um antígeno específico da *Mycobacterium tuberculosis* e a segunda, formada por

antígenos comuns em todas as micobactérias.

[010] Diante da viabilidade como uma ferramenta *point-of-care*, os ensaios de fluxo lateral são utilizados para o diagnóstico de várias doenças por meio da detecção de diferentes biomarcadores. Os biomarcadores consistem em características mensuráveis de processos biológicos, os quais podem ser normais, processos patogênicos ou respostas à intervenção farmacológicas. Como exemplo podemos citar moléculas que têm expressão alterada em uma doença ou que são liberadas por agentes patogênicos e que, portanto, seu monitoramento pode ser usado para detecção e tratamento de enfermidades (STRIMBU & TAVEL, 2010). Os biomarcadores da tuberculose são moléculas encontradas em indivíduos infectados e que podem ser da própria *Mycobacterium tuberculosis* ou resultado da resposta imune do hospedeiro. Assim, elas podem ser usadas para o diagnóstico rápido frente às técnicas usadas atualmente (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2020). A patologia da tuberculose, assim como a resposta do hospedeiro, mostra-se complexa, com um perfil amplo de biomarcadores. Relata-se mais de 300 biomarcadores relevantes para a tuberculose, incluindo citocinas inflamatórias, anticorpos do hospedeiro, proteínas do hospedeiro e antígenos da TB, por exemplo WYKOWSKI et al., 2021; WALLIS et al., 2013; FU & XIE, 2013). Portanto, a identificação de moléculas com um potencial para diagnosticar a tuberculose de maneira assertiva, em diferentes estágios da infecção, não é um processo de dedução trivial e mostra-se um desafio e uma necessidade urgente para barrar a progressão da doença. Com base em um trabalho sistemático e exaustivo, os inventores propuseram a proteína

Hsp65 e o complexo de proteínas CFP-10/ESAT-6 como promissoras para o diagnóstico precoce da tuberculose.

[011] A CFP-10 (proteína de filtrado de cultura de 10 kDa) é uma proteína secretada pela *Mycobacterium tuberculosis* durante a fase de crescimento do patógeno e secretadaativamente pelas cepas das bactérias, sendo reconhecida como o antígeno mais abundante durante a infecção (RAFIQUE et al., 2018). Essa proteína, quando secretada, interage de maneira estável com outro biomarcador relevante, a ESAT-6, formando um complexo heterodímero 1:1 das proteínas (RENSHAW et al., 2005). Além disso, a secreção dessa proteína acontece de maneira precoce; logo, pode ser utilizada como um biomarcador para diagnóstico da tuberculose em fases iniciais da infecção. A CFP-10 já foi usada para diagnóstico da tuberculose em diferentes amostras, como soro, urina e escarro. Um imunoensaio bioeletrônico foi usado para detecção da CFP-10 em amostras clínicas diretas e não processadas de urina e soro e foi capaz de detectar concentrações de 1,1 a 5,9 nM para em amostras de soro, por exemplo (MOHD AZMI et al., 2021; SEIFERT et al., 2021). A utilização desse biomarcador para desenvolvimento de testes rápidos já foi relatada em algumas invenções, como:

(i) No documento US6841159B2, os autores descrevem um kit de imunoensaio de fluxo lateral como ferramenta de diagnóstico rápido para determinar a exposição de indivíduos a *Mycobacterium tuberculosis* por meio da detecção da presença de anticorpos específicos contra antígenos micobacterianos. Nessa invenção, os autores descrevem a possibilidade de imobilização de diferentes antígenos para formar as linhas teste, incluindo as proteínas CFP-10 e ESAT-6.

[012] São reportados na literatura outros dispositivos de fluxo lateral para identificação da CFP-10 e ESAT-6 (SEELE *et al.*, 2023; BANERJEE & JAISWAL, 2018; PINXTEREN *et al.*, 2000). Por exemplo, em Pinxteren *et al.*, embora proponha um teste de diagnóstico usando o complexo proteico CFP10/ESAT6 como biomarcador, seu método envolve uma abordagem invasiva, que inclui a injeção dos抗ígenos para estimular a resposta imune do paciente. Além disso, verifica-se que após vários dias, uma amostra de sangue do paciente é coletada e o nível de um produto da resposta imune, a proteína IFN-gama, é determinado. É importante ressaltar que o teste descrito difere significativamente da proposta na presente invenção, pois o biossensor proposto oferece detecção rápida, com resultados disponíveis em aproximadamente 15 minutos, é um procedimento não invasivo, permite a quantificação precisa e simultânea de dois biomarcadores da tuberculose, apresentando vantagens substanciais em comparação com a abordagem anterior.

[013] Cabe ressaltar que não foi encontrado nenhum dispositivo em que a análise qualitativa foi complementada com a quantificação da biomolécula, estratégia inovadora que contribui para o auxílio no diagnóstico da tuberculose em diferentes estágios da infecção. Além disso, as ferramentas já desenvolvidas foram voltadas para a identificação exclusiva desse biomarcador, sendo que o dispositivo biossensor aqui proposto, além da identificação desse complexo proteico, é capaz de identificar um segundo biomarcador e contribuir com a melhora no diagnóstico da tuberculose, com redução de resultados falsos negativos.

[014] A proteína Hsp65, da classe das proteínas de

choque térmico (do inglês, *heat-shock proteins* - Hsp's), é secretada em resposta à reação do hospedeiro durante a infecção - aumentando o nível conforme a infecção progride - e está relacionada com a patogênese da doença, visto que induz respostas imunes celulares e humorais (MUDALIAR et al., 2006; SHEKHAWAT et al., 2016). Essa proteína é encontrada em formas extracelulares da doença, como na tuberculose genital (SUBRAMANI et al., 2017). Além disso, a Hsp65 já foi detectada em diferentes tipos de amostra, como soro e líquido cefalorraquidiano (SHEKHAWAT et al., 2014; MUDALIAR et al., 2006). Portanto, esse biomarcador se mostra promissor para o diagnóstico da tuberculose em sua forma ativa, incluindo as formas da doença em que não envolvem somente os pulmões. Esse biomarcador já foi também utilizado para desenvolvimento de kits para testes moleculares, como:

(i) No documento US7732589B2, é descrito o desenvolvimento de um kit para o diagnóstico e identificação de micobactérias, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por um par de primers para amplificação do gene hsp65.

[015] Logo, percebe-se que esse biomarcador é alvo de métodos moleculares, como também relatado por Rocha et al., que, apesar de rápido e simples, necessita de uma complexidade laboratorial maior que os testes de fluxo lateral (ROCHA at al., 1999), visto que o método baseia-se na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo altamente específico, porém apresentando limitações quanto à necessidade de um equipamento robusto, o termociclador, que não é portátil, e à exigência de pessoal especializado para sua realização. Sendo assim, até então

não se relataram ferramentas de fluxo lateral para a identificação dessa biomolécula de maneira qualitativa e quantitativa, como proposto na presente invenção, utilizando um dispositivo de fluxo lateral.

[016] Apesar desses biomarcadores poderem ser usados para diagnóstico da tuberculose, a detecção e monitoramento de analitos únicos pode ser uma fonte errônea de resultados, visto que falsos negativos ou falsos positivos podem ser obtidos pela inespecificidade, por exemplo, quando outras doenças também resultam na alteração dos níveis da molécula biomarcadora. Até onde sabemos, não existe nenhum relato de um teste que integre a detecção de dois biomarcadores específicos da doença, o que aumentaria a seletividade e precisão do teste. Os testes de fluxo lateral disponíveis para outras doenças se baseiam na detecção qualitativa de biomarcadores. No entanto, em muitas doenças, é comum que haja variações nos níveis de um biomarcador específico. Portanto, torna-se fundamental realizar uma análise quantitativa, ou seja, determinar a concentração desse biomarcador. Esse enfoque quantitativo também se mostra valioso ao avaliar a eficácia do tratamento, permitindo verificar se a concentração do biomarcador atingiu os valores considerados normais em pessoas saudáveis.

[017] Diante disso, de maneira distinta e inesperada, a presente invenção propõe o desenvolvimento de um biossensor de papel baseado em fluxo lateral para detecção simultânea e quantitativa de biomarcadores da Tuberculose, a proteína Hsp65 e o complexo proteico CFP-10/ESAT-6. Esse dispositivo, que combina a detecção simultânea e quantitativa, oferece um teste mais preciso, rápido, portátil e inovador para o

diagnóstico *point-of-care* da doença, podendo ser usado adicionalmente para monitorar a eficácia do tratamento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção tem por objetivo propor um biossensor para o diagnóstico da tuberculose a partir da detecção simultânea e quantitativa de dois biomarcadores da doença pelo modelo competitivo. O biossensor é formado por três (3) áreas retangulares constituídas por diferentes papéis: zona de amostra, formada por fibra de vidro; zona de detecção, por nitrocelulose; e a zona absorvente, por celulose. A detecção dos alvos acontece na zona de detecção, na qual encontram-se duas linhas testes, uma formada pelo complexo CFP-10/ESAT-6 e a outra contendo proteínas Hsp65 imobilizadas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[019] A Figura 1A mostra a representação esquemática da montagem e modificação do dispositivo.

[020] A Figura 1B mostra o procedimento experimental realizado para a realização dos testes de detecção e otimização.

[021] A Figura 2A apresenta as tiras após 25 min de corrida das amostras contendo as proteínas na concentração de 40 µg/mL.

[022] A Figura 2B mostra a detecção quantitativa da intensidade das linhas testes.

[023] A Figura 3A mostra a detecção da CFP-10/ESAT-6 com variação da concentração.

[024] A Figura 3B mostra a curva analítica para a detecção da CFP-10/ESAT-6 ($R^2=0,971$).

[025] A Figura 4A mostra a detecção da Hsp65 com

variação da concentração.

[026] A Figura 4B mostra a curva analítica para a detecção da Hsp65 ($R^2=0,984$).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[027] A presente invenção refere-se a um dispositivo biossensor de papel baseado em fluxo lateral para detecção simultânea e quantitativa de biomarcadores da Tuberculose, a proteína Hsp65 e o complexo proteico CFP-10/ESAT-6, oferecendo um teste mais preciso, rápido, portátil e inovador para o diagnóstico *point-of-care* da doença, podendo ser usado adicionalmente para monitorar a eficácia do tratamento.

Montagem e funcionalização do biosensor

[028] O biosensor proposto é fabricado em uma configuração de três camadas retangulares, formando três regiões específicas: 1) Zona de amostra, composta por fibra de vidro; 2) Zona de detecção, por nitrocelulose; 3) Zona absorvente, por celulose. As três zonas, respectivamente, foram cortadas nas dimensões: 2,1 cm x 0,3 cm; 2,4 cm x 0,3 cm; 1,7 x 0,3 cm.

[029] Além disso, a zona de detecção foi modificada com as biomoléculas por meio de uma impressora. As linhas de testes foram modificadas com as proteínas CFP-10/ESAT-6 (linha de teste - LT1) e Hsp65 (linha de teste - LT2) nas concentrações, respectivamente, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL. Especificamente, para a detecção do complexo CFP-10/ESAT-6 (MBS505078/MyBioSource) foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CFP10 (MBS601269/MyBioSource) e para a detecção da Hsp65 (MBS806961/MyBiosource) foram utilizados anticorpos monoclonais anti-Hsp65 (MBS310272/MyBioSource). A funcionalização dos anticorpos com as nanopartículas de

ouro (AuNPs) foi realizada utilizando o kit InnovaCoat® Gold 20 nm (Expedon - Inglaterra), seguindo o protocolo previamente estabelecido pelo fornecedor.

[030] Ainda, a fim de analisar o funcionamento correto, também foi impressa a linha controle (LC), composta por anticorpos secundários que se ligam aos anticorpos de ratos do tipo IgG. O biosensor montado e previamente modificado está representado na Figura 1A.

Análises Quantitativas

[031] A presente invenção se propõe a oferecer um método de diagnóstico quantitativo, além do resultado qualitativo fornecido pelo ensaio de fluxo lateral. Para isso, utilizando um smartphone, realizou-se a captura de imagens das tiras após um tempo fixo de aplicação da amostra (solução tampão fortificada com os biomarcadores). Nos testes de otimização, as fotos foram capturadas após 25 min, enquanto para a construção das curvas analíticas as fotos foram registradas após 15 min. Com o software ImageJ, realizou-se a divisão da imagem nos canais RGB (do inglês, Red, Green and Blue) e utilizou-se o canal verde, o qual maximiza a sensibilidade da análise em ensaios que empregam rótulos vermelhos (como AuNPs). A partir do perfil do gráfico obtido, extraíram-se os valores da intensidade que foram utilizados para a construção de gráficos de barras, a fim de comparar os parâmetros testados e a seletividade, e para a curva analítica, com o objetivo de encontrar uma relação entre intensidade e concentração do analito.

Teste de Detecção

[032] O procedimento adotado para a detecção dos biomarcadores consistiu na pré-incubação de dois conjuntos

de nanopartículas (AuNPs funcionalizadas com anti-HSP65 - conjugado 1 - e AuNPs funcionalizadas com anti-CFP10 - conjugado 2) com a amostra (solução tampão fortificada com os biomarcadores), como mostrado na Figura 1B. Após o tempo de incubação, aplicou-se a amostra no biosensor e capturaram-se imagens das tiras após 15 min de corrida para as análises quantitativas.

[033] Os testes de detecção foram conduzidos inicialmente avaliando os biomarcadores separadamente, utilizando a concentração de 40 µg/mL para o complexo CFP-10/ESAT-6 e para a proteína Hsp65. Para isso, incubaram-se 20 µL da amostra contendo um dos biomarcadores durante 5 min com 10 µL de AuNPs funcionalizadas com os respectivos anticorpos (5 µL de cada um dos conjugados) e aplicou-se na zona de amostra. Após 5 min de corrida, aplicaram-se 15 µL de PBS para que nanopartículas remanescentes pudessem chegar à zona de detecção. O resultado, após 25 min de corrida, pode ser observado na Figura 2A.

[034] Nas três amostras testadas, observou-se uma corrida homogênea e rápida, visto que levou cerca de 4 min para o fluxo atingir a zona absorvente do biosensor. Como pode ser observado na amostra negativa (PBS), ambas as linhas testes ficaram nitidamente marcadas, que é o esperado no modelo competitivo, visto que as nanopartículas conjugadas com os anticorpos ficaram disponíveis para se ligarem nas proteínas das linhas. Para a detecção da CFP-10/ESAT-6, apesar de se observar a marcação da linha de teste (LT1), houve uma diminuição significativa da intensidade, que é corroborada com a análise quantitativa (Figura 2B). A diminuição da intensidade indica que a maior parte dos

conjugados se ligaram nas proteínas presentes na amostra e os conjugados restantes se ligaram a LT1, mostrando que o biosensor foi capaz de detectar as proteínas alvo. O mesmo resultado foi observado para os testes de detecção da Hsp65.

[035] Comparado com a amostra negativa, a aplicação da amostra positiva resultou na diminuição da intensidade da LT2, que mostra que o biosensor foi capaz de detectar essa proteína. Além disso, observou-se a marcação da LC em todos os testes, que mostra que o biosensor funcionou corretamente, visto que os conjugados foram capturados pelos anticorpos dessa região.

[036] Apesar de o biosensor ter apresentado o resultado esperado para o modelo competitivo, realizou-se uma intensa investigação e otimização dos parâmetros experimentais a fim de encontrar a melhor combinação das condições que contribuissem com a melhora do desempenho analítico do biosensor.

Teste de Otimização: Bloqueio da Membrana

[037] Um dos parâmetros que pode influenciar o funcionamento de um dispositivo de fluxo lateral é o bloqueio dos sítios ativos da membrana que compõe a zona de detecção, pois interações inespecíficas entre os biomarcadores presentes na amostra e a membrana podem ocorrer durante o fluxo da amostra, resultando em falso positivo ou falso negativo. Para isso, realizaram-se testes com o bloqueio da membrana utilizando 100 µL de BSA 1% em PBS durante 5 min, seguida de lavagem tripla com 1 mL de PBS. Após o bloqueio dos sítios ativos, realizaram-se os testes de detecção nas mesmas condições da detecção inicial: incubação prévia de 20 µL de amostra com 10 µL de conjugados durante 5 min, com

aplicação adicional de PBS após 5 min de corrida.

[038] Em todos os testes com as diferentes amostras, o biosensor apresentou um fluxo homogêneo e rápido, com cerca de 4 min de corrida até a amostra atingir a zona absorvente. O bloqueio dos sítios ativos, apesar de ser importante para o desempenho analítico do biosensor, não se mostrou crucial nos resultados observados pois não houve uma diferença significativa da intensidade da linha teste entre as tiras sem bloqueio e as com bloqueio para as três amostras testadas. Entretanto, observou-se que nas tiras sem o bloqueio dos sítios ativos, há deposição das nanopartículas de ouro remanescentes na membrana após 30 min de aplicação da amostra, que resulta na formação de um ruído vermelho de fundo que pode, por exemplo, comprometer a análise quantitativa. Uma vez que o bloqueio não influenciou no desempenho analítico, os experimentos subsequentes foram realizados com tiras sem bloqueio e com as fotos capturadas após 15 min de corrida para evitar a influência do ruído nas análises.

Teste de otimização: Volume de Conjugado

[039] Nos testes anteriores, observou-se um excesso de nanopartículas na zona absorvente que poderiam influenciar as análises quantitativas, uma vez que o volume do conjugado é um parâmetro importante nos modelos competitivos. Em alta concentração, os conjugados capturam a proteína alvo disponível na amostra, no entanto, por estar em excesso, parte fica disponível para se ligar nas proteínas da linha teste, resultando na marcação da linha e em falso negativo. Diante disso, realizou-se o teste de otimização do conjugado visando diminuir a intensidade das linhas testes na amostra

positiva. Para isso, realizaram-se testes com o conjugado concentrado - como feito nos testes iniciais - e com o conjugado diluído: 2,5 µL de cada um dos conjuntos de nanopartículas funcionalizadas com 5 µL de PBS para completar o volume de aplicação de 30 µL utilizado nos testes anteriores.

[040] Em todos os testes, as linhas controles ficaram nitidamente marcadas, revelando que, mesmo em um volume de conjugado menor, o biosensor continuou funcionando. Na detecção da CFP-10/ESAT-6, percebe-se uma diminuição da intensidade da linha teste, o que mostra que a otimização do volume do conjugado influenciou na detecção da proteína, tornando o biosensor mais sensível e capaz de detectar concentrações menores desse biomarcador. Para a Hsp65, não houve uma diferença da sensibilidade em comparação com os resultados anteriores. Além do desempenho do biosensor, otimizar o volume de conjugado é importante para o custo final do dispositivo, ou seja, diminuir o volume implica em diminuir o custo. Portanto, para os experimentos seguintes, foram utilizados 2,5 µL de conjugado para cada um dos biomarcadores.

Teste de otimização: Volume de Amostra

[041] Apesar do resultado positivo em relação ao volume de conjugado, outro parâmetro extremamente importante é o volume de amostra, visto que, quanto maior o volume, maior será a quantidade de analito para saturar os sítios de reconhecimento dos conjugados e resultar em um diagnóstico mais sensível. Diante disso, realizaram-se testes com um menor volume de amostra (20 µL de amostra incubada com 5 µL de conjugados mais 5 µL de PBS) e outro com um volume maior

(25 µL de amostra incubada com 5 µL de nanopartículas funcionalizadas).

[042] Uma das formas de interpretar o resultado quantitativo do biosensor é analisar a razão S/N (do inglês, *Signal/Noise* - Sinal/Ruído), parâmetro de grande importância que indica a qualidade de uma medida analítica. Nesse caso, o sinal se refere a medida da amostra com o analito, enquanto o ruído consiste nas variações do sinal na ausência do alvo. Tratando-se do modelo competitivo de detecção, na ausência do analito espera-se uma forte marcação da LT, que se refere ao ruído. Por outro lado, na amostra positiva, espera-se que o sinal seja o mais baixo possível devido à baixa intensidade das LT. Diante disso, quanto menor o S/N melhor é o desempenho analítico do biosensor.

[043] A detecção do complexo CFP-10/ESAT-6 utilizando um volume maior de amostra apresentou uma diminuição da intensidade da LT1, assim como do S/N de 0,40 para 0,32. Logo, aumentar o volume de amostra levou à saturação de AuNPs conjugadas que antes ficavam disponíveis para se ligar no alvo na LT1. Já em relação à detecção da Hsp65, em ambos os volumes de amostra, a detecção se mostrou sensível, visto que se observa uma diferença significativa entre as amostras negativa e positiva. Uma redução no S/N de 0,30 para 0,23 ocorreu com o aumento do volume de amostra. Portanto, foi escolhido o volume de 25 µL de amostra para os seguintes testes de otimização.

Teste de otimização: Tempo de Incubação

[044] A partir dos resultados, percebeu-se que a detecção da CPF10/ESAT6 apresentou menor sensibilidade que a da Hsp65. Diante disso, levantou-se a hipótese de que o

tempo de incubação poderia não ser suficiente para que o complexo proteico interagisse com todas as AuNPs funcionalizadas, de modo a saturar todos os sítios possíveis e evitar que os conjugados se ligassem na linha teste. Sendo assim, foram realizados testes variando o tempo de incubação da amostra com os conjugados: sem incubação prévia, incubação por 5 min e incubação por 10 min. Para ambos os biomarcadores, observou-se uma diferença na intensidade da linha teste entre os experimentos realizados com as amostras sem incubação e os testes com incubação prévia. Esse resultado revela que, apesar da detecção acontecer, não realizar a incubação da proteína resulta numa menor interação das proteínas com os conjugados e, consequentemente, em uma maior intensidade da LT. Apesar disso, não houve uma diferença relevante entre as incubações por 5 e 10 min. Portanto, visando tornar o diagnóstico mais rápido, adotou-se o tempo de incubação de 5 min.

Construção das curvas analíticas

[045] Após otimização do biossensor, construíram-se as curvas analíticas para cada um dos biomarcadores, a fim de oferecer um método de diagnóstico quantitativo. Para isso, foram capturadas fotos dos dispositivos e a intensidade das linhas testes foram analisadas seguindo o procedimento de análise quantitativa já descrito. A curva da intensidade em função da concentração do analito foi construída utilizando o software OriginPro.

[046] Para a construção da curva analítica do complexo CFP-10/ESAT-6, foram testadas 5 concentrações diferentes: 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. As fotos capturadas após 15 min de corrida e a curva analítica obtida

estão apresentadas na Figura 3. Observa-se que as intensidades das linhas de teste diminuíram conforme aumentou-se a concentração do analito, comportamento esperado para o modelo competitivo do ensaio de fluxo lateral. Uma relação linear foi obtida entre a intensidade da linha de teste e o logaritmo da concentração do complexo, com uma curva analítica com ajuste (R^2) de 0,971.

[047] Para a construção da curva analítica da detecção da Hsp65, também se utilizaram as concentrações 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. Assim como na construção da curva analítica da CFP-10/ESAT-6, as imagens foram capturadas após 15 min de corrida e podem ser observadas na Figura 4, assim como a curva analítica resultante. Analisando as intensidades obtidas, obteve-se que as linhas de teste diminuíram de intensidade conforme aumentou-se a concentração. Uma relação linear entre a intensidade e o logaritmo da concentração do analito foi obtida, gerando uma curva analítica com um ótimo ajuste (R^2) de 0,984.

Referências bibliográficas

[048] ACHARYA, Bodhraj et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 5, p. 4065-4075, 2020.

[049] ALLAHYARTORKAMAN, Mohammadreza et al. Low diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: A multicenter surveillance. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019.

[050] ARIFFIN, Nazifah, et al. Lateral Flow Immunoassay for Naked Eye Detection of *Mycobacterium*

Tuberculosis. **Journal of Sensors**, vol. 2020, pp. 1-10, 2020.

[051] AZMI, Umi Zulaikha Mohd et al. Aptasensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum utilising CFP10-ESAT6 protein as a selective biomarker.

Nanomaterials, v. 11, n. 9, p. 2446, 2021.

[052] BANERJEE & JAISWAL. Recent Advances in Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay as a Point-of-Care Diagnostic Tool for Infectious Agents and Diseases. **The Analyst**, vol. 143, no. 9, pp. 1970-1996, 2018.

[053] FU, Tiwei; XIE, Jianping. Progress on the Biomarkers for Tuberculosis Diagnosis. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 21, n. 4, p. 379-391, 2011.

[054] GUPTA, Shagun; KAKKAR, Vipan. Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics-A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 115, p. 14-29, 2018.

[055] HAN, Seung Beom et al. The impact of the Xpert MTB/RIF screening among hospitalized patients with pneumonia on timely isolation of patients with pulmonary tuberculosis.

Scientific Reports, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

[056] KASETSIRIKUL, Surasak; SHIDDIKY, Muhammad JA; NGUYEN, Nam-Trung. Challenges and perspectives in the development of paper-based lateral flow assays.

Microfluidics and Nanofluidics, v. 24, n. 2, p. 1-18, 2020.

[057] MARTINEZ, Andres W. et al. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. 2010.

[058] MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico Especial. Tuberculose 2021. p. 39, 2021.

[059] MOHD AZMI, Umi Zulaikha et al. Portable electrochemical immunosensor for detection of Mycobacterium tuberculosis secreted protein CFP10-ESAT6 in clinical sputum samples. **Microchimica Acta**, v. 188, n. 1, p. 1-11, 2021.

[060] MUDALIAR, Anju V. et al. Detection of 65 kD heat shock protein in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patients. **BMC neurology**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2006.

[061] PAROLO, Claudio et al. Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. **Nature protocols**, v. 15, n. 12, p. 3788-3816, 2020.

[062] PINXTEREN et al. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, vol. 7, no. 2, pp. 155-160, Mar. 2000.

[063] QUESADA-GONZÁLEZ, Daniel; MERKOÇI, Arben. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 73, p. 47-63, 2015.

[064] RAFIQUE, Rafia et al. Gold-copper nanoshell dot-blot immunoassay for naked-eye sensitive detection of tuberculosis specific CFP-10 antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 121, p. 111-117, 2018.

[065] RENSHAW, Philip S. et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. **The EMBO journal**, v. 24, n. 14, p. 2491-2498, 2005.

[066] ROCHA et al. Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Hsp65 Gene for Rapid Identification of Mycobacteria in Brazil. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 37, no. 3, pp. 223-229, 1999.

[067] RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Elba et al. Application of

antigenic biomarkers for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 21, n. 11, p. 856-870, 2020.

[068] SAKTIAWATI, Antonia MI et al. Diagnosis of tuberculosis through breath test: a systematic review. **EBioMedicine**, v. 46, p. 202-214, 2019.

[069] SARRO, Yeya DS et al. Simultaneous diagnosis of tuberculous and non-tuberculous mycobacterial diseases: Time for a better patient management. **Clinical microbiology and infectious diseases**, v. 3, n. 3, 2018.

[070] SEELE et al. Development of Gold-Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassays for Rapid Detection of TB ESAT-6 and CFP-10. **Biosensors**, vol. 13, no. 3, p. 354, 2023.

[071] SEIFERT, Marva et al. Detection and quantification of *Mycobacterium tuberculosis* antigen CFP10 in serum and urine for the rapid diagnosis of active tuberculosis disease. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

[072] SHEKHAWAT, Seema D. et al. Heat shock proteins: possible biomarkers in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. **Human Immunology**, v. 75, n. 2, p. 151-158, 2014.

[073] SHEKHAWAT, Seema D. et al. Evaluation of heat shock proteins for discriminating between latent tuberculosis infection and active tuberculosis: A preliminary report. **Journal of infection and public health**, v. 9, n. 2, p. 143-152, 2016.

[074] SHETE, Priya B. et al. Diagnostic accuracy of TB-LAMP for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-

11, 2019.

[075] STRIMBU, Kyle; TAVEL, Jorge A. What are biomarkers. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463, 2010.

[076] SUBRAMANI, Elavarasan et al. Mycobacterial heat shock protein 65 mediated metabolic shift in decidualization of human endometrial stromal cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

[077] SULIS, Giorgia et al. Recent developments in the diagnosis and management of tuberculosis. **NPJ primary care respiratory medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2016.

[078] WALLIS, Robert S. et al. Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 362-372, 2013.

[079] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2020. 2020.

[080] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2021. 2021.

[081] WYKOWSKI, James H. et al. A systematic review of potential screening biomarkers for active TB disease. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 25, p. 100284, 2021.

[082] ZHOU, Yuanyuan et al. Aptamer Detection of Mycobacterium tuberculosis Mannose-Capped Lipoarabinomannan in Lesion Tissues for Tuberculosis Diagnosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 49, 2021.

REIVINDICAÇÕES

1. Biossensor para o diagnóstico de Tuberculose **caracterizado** pelo fato de que compreende três camadas retangulares, formando três regiões específicas: 1) Zona de amostra composta por fibra de vidro; 2) Zona de detecção composta por nitrocelulose; 3) Zona absorvente composta por celulose, em que na zona de detecção encontram-se duas linhas de teste, sendo uma formada pelo complexo CFP-10/ESAT-6 e a outra contendo proteínas Hsp65 imobilizadas.

2. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que é um dispositivo de papel baseado em fluxo lateral para detecção simultânea e quantitativa de biomarcadores da Tuberculose, a proteína Hsp65 e o complexo proteico CFP-10/ESAT-6.

3. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que utiliza nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpos específicos para os biomarcadores.

4. Método de fabricação do biossensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, compreendendo a seguinte etapa:

(a) corte das membranas e montagem das partes do dispositivo;

caracterizado pelo fato de que compreende ainda as seguintes etapas:

(b) modificação da zona de detecção para formação das duas linhas de teste, uma contendo o complexo CFP-10/ESAT-6 e a outra contendo as proteínas HSP65, e

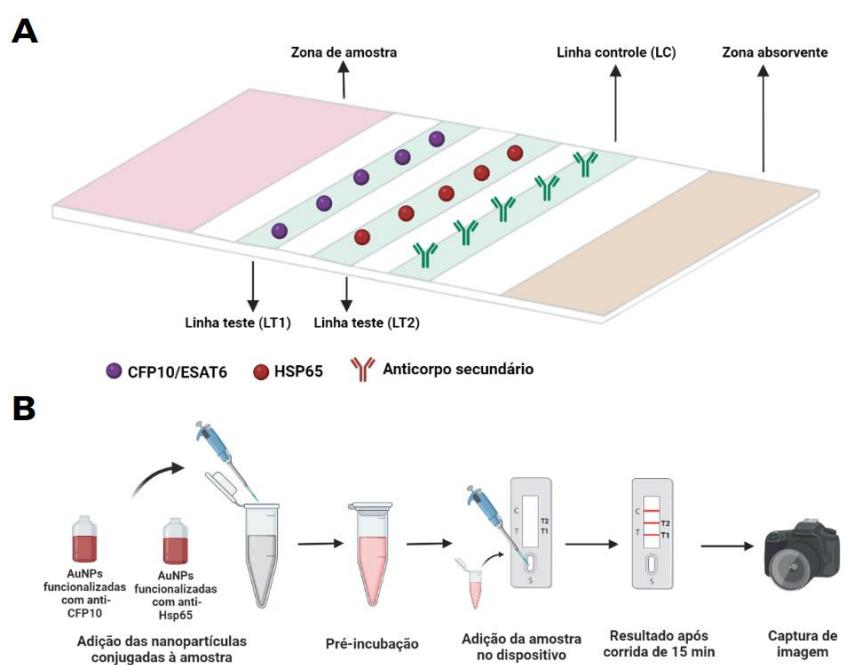
(c) modificação da zona de detecção para formação da linha controle contendo anticorpos secundários.

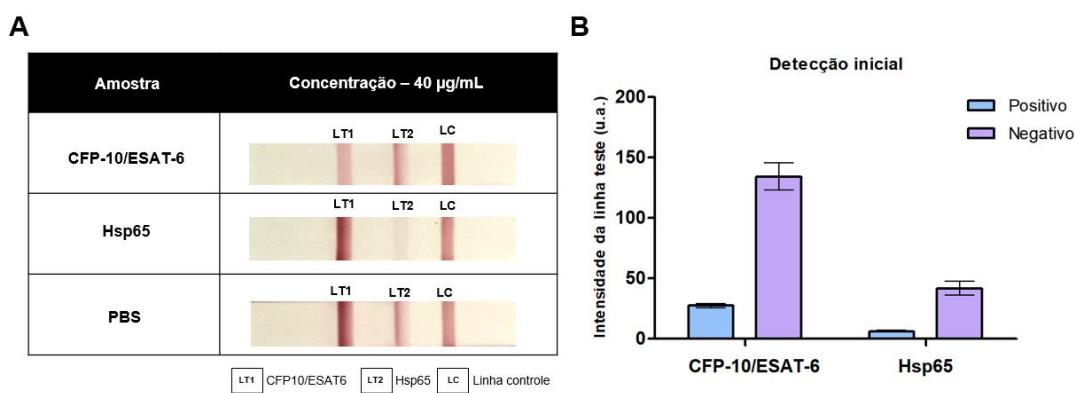
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a zona de detecção é modificada com as biomoléculas por meio de uma impressora, em que as linhas de testes são modificadas com as proteínas CFP-10/ESAT-6 (linha de teste - LT1) e Hsp65 (linha de teste - LT2) nas concentrações, respectivamente, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL.

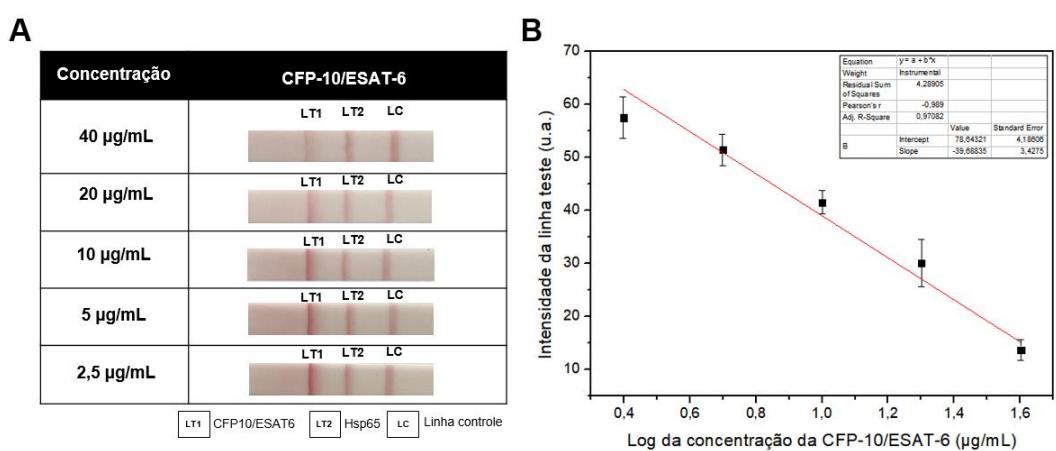
6. Método, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de que para a detecção do complexo CFP-10/ESAT-6 são utilizados anticorpos monoclonais anti-CFP10 e para a detecção da Hsp65 são utilizados anticorpos monoclonais anti-Hsp65.

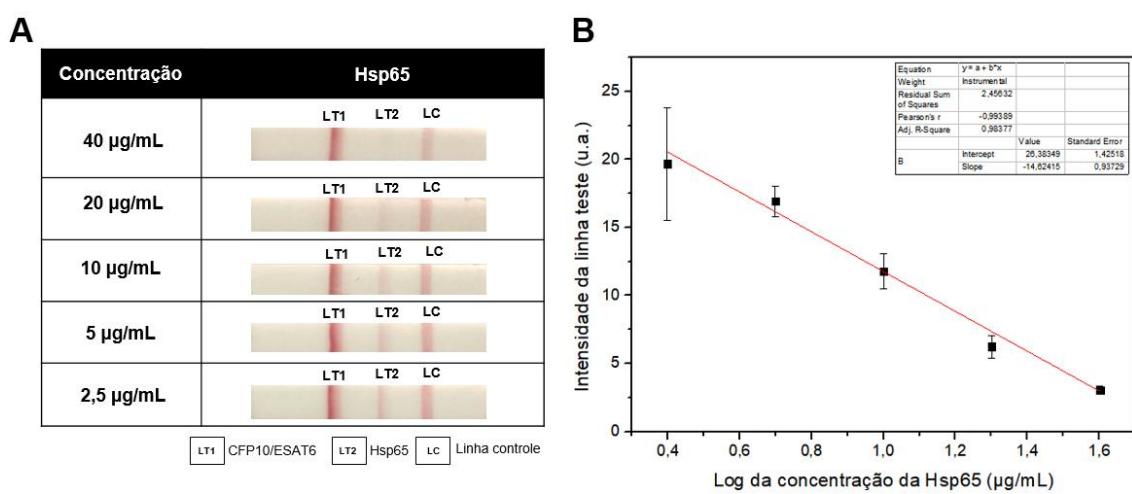
7. Uso do biosensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e fabricado conforme o método definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 6, **caracterizado** pelo fato de ser para a detecção simultânea e quantitativa de biomarcadores da tuberculose.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de oferecer um teste mais preciso, rápido e portátil para o diagnóstico *point-of-care* da doença.

**Figura 1**

**Figura 2**

**Figura 3**

**Figura 4**

RESUMO**BIOSENSOR PARA DETECCÃO E QUANTIFICAÇÃO COMBINADAS DE BIOMARCADORES DA TUBERCULOSE, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DO BIOSENSOR, USO DO BIOSENSOR**

A presente invenção refere-se a um biosensor para o diagnóstico da tuberculose a partir da detecção simultânea e quantitativa de dois biomarcadores da doença pelo modelo competitivo. O biosensor é formado por 3 áreas retangulares constituídas por diferentes papéis: zona de amostra, formada por fibra de vidro; zona de detecção, por nitrocelulose; e a zona absorvente, por celulose. A detecção dos alvos acontece na zona de detecção, na qual encontram-se duas linhas testes, uma formada pelo complexo CFP-10/ESAT-6 e a outra contendo proteínas Hsp65 imobilizadas.