

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SARS-CoV-2: DETECÇÃO COLORIMÉTRICA E
ELETROQUÍMICA DO RNA VIRAL EM AMOSTRAS DE SALIVA
HUMANA**

Wyllian Neves Miranda*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de DOUTOR EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

*Bolsista FAPESP

São Carlos – SP

2025

Folha de aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Wyllian Neves Miranda, realizada em 07/07/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite (UTFPR)

Prof. Dr. Mauro Chierici Lopes (UNICENTRO)

Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza (UFSCar)

Prof. Dr. Elton Fabiano Sitta (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, minha família, amigos e minha namorada que sempre me apoiaram, seja na área da química, seja na área das artes. Dedico também, como forma de homenagem, às mais de 714 mil vítimas da COVID-19. Que minhas singelas contribuições possam servir de apoio científico para que nunca mais precisemos passar por um período em que perdemos tantos entes queridos como o que aconteceu de 2019 a 2023.

Citação

Alegações extraordinárias exigem evidências extraordinárias. - Carl Sagan

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha família, aos meus pais por todo o suporte físico e emocional, especialmente meu pai Evaldo por ter se desdobrado em vários para conseguir me manter, me alimentar, me ensinar e me corrigir quando necessário. Agradeço também a minha namorada Clara e aos amigos que mesmo em meio a dificuldades em relação ao tempo, se mantiveram junto a mim nesta jornada.

Agradeço aos órgãos de fomento: FAPESP processo 2021/14139-7, CAPES, CNPQ e FINEP sem os quais seria praticamente impossível conduzir um trabalho como este.

Agradeço ao professor Ronaldo Censi Faria por me aceitar no laboratório, por todas as nossas esclarecedoras conversas e conselhos, sejam em relação ao trabalho ou a vida em geral. Agradeço ao pessoal do LaBiE que foram cruciais para que este estudo pudesse ser desenvolvido. Muito obrigado Tássia, Taíse, Daniel, Evair, Pablo, Sean, Vagner, Ana Paula, Rone, Ana Júlia, Isabella, Gabriela, Sthéfane, Oldair, Thiago, Lucas, Ian, Pedro e Gabriele, pela convivência nestes anos, por todas as conversas, momentos de descontração, discussões sobre o projeto e toda a ajuda, sem vocês e especialmente as doutoras Tássia e Taíse, este trabalho não seria possível.

Não posso deixar de agradecer a todos que me acolheram em São Carlos, todos os membros do grupo Ouroboros, do LIEC, e do departamento de química em geral.

Lista de abreviaturas e siglas

A	Ampère
AUC	Área sob a curva (do inglês <i>Area Under the Curve</i>)
AuNP	Nanopartículas de ouro (AuNP do inglês <i>Gold nanoparticles</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (BSA do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	Sonda de captura de DNA
CE	Contra eletrodo (do inglês <i>Counter Electrode</i>)
COVID-19	Doença do coronavírus (do inglês <i>Coronavirus Disease 2019</i>)
DeD	Dispositivo eletroquímico descartável
DNA	Ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dDNA	Sonda de detecção de DNA
DPV	Voltametria de pulso diferencial (DPV do inglês <i>differential pulse voltammetry</i>)
DTT	DL-ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EDC	Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etil carbodiimida (EDC do inglês <i>N-(3-dimethylaminopropyl) -N'-ethyl carbodiimide hydrochloride</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA do inglês <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EDS	Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (do inglês: <i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês: <i>Electrochemical impedance spectroscopy</i>)

FMA	Ácido ferroceno monocarboxílico (do inglês: <i>Ferrocene monocarboxylic acid</i>)
g	Gramma
HRP	peroxidase de raiz de rábano (HRP do inglês <i>horseradish peroxidase</i>)
I	Corrente
IA	Inteligência Artificial
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
L	Litro
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de detecção
log	Logarítimo
m	mili
mol	Unidade de quantidade de matéria
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MES	Ácido 4-morfolineetanossulfônico
n	nano (10^{-9})
NE	Tampão NE
NE1X	Tampão NE diluído 1 vez
NHS	N-hidroxisuccinimida
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	pico (10^{-12})
pH	Potencial hidrogeniônico
PB	Tampão fosfato salino (PBS do inglês <i>phosphate buffer</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (PBS do inglês <i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PLA	poli (ácido láctico) (PLA do inglês <i>poly (lactic acid)</i>)
PMs	Partículas magnéticas
PMs-cDNA	Partículas magnéticas modificadas com sonda de DNA de captura
PVC	Policloreto de vinila (PVC do inglês <i>polyvinyl chloride</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (RNA do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
r	Coefficiente de correlação linear
RE	Eletrodo de referência (do inglês <i>Reference Electrode</i>)
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR do inglês <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
RT-qPCR	Quantitativo em Tempo Real com Transcrição Reversa (RT-qPCR do inglês <i>Quantitative Real-Time Reverse Transcription Reação em cadeia da polimerase</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor (do inglês, Receiver Operating Characteristic Curve)
RT-LAMP	Amplificação isotérmica medida por loop de transcrição reversa
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>)
SPE	Eletrodos serigrafados (do inglês <i>Screen-Printed Electrode</i>)
SPCE	Eletrodos de carbono serigrafados (do inglês <i>Screen-Printed carbon electrode</i>)
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de fita simples (ssDNA do inglês <i>single-stranded DNA</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
TW20	Tween-20
TE	Tampão tris -HCl e EDTA
V	Volt
VOC	Variante de preocupação (do inglês <i>Variant of Concern</i>)
VOI	Variante de interesse (do inglês <i>Variant of Interest</i>)

VUM	Variante sob monitoramento (do inglês <i>Variant under Monitoring</i>)
VUI	Variante sob investigação (do inglês <i>Variant under investigation</i>)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WE	Eletrodo de trabalho (do inglês <i>working electrode</i>)
μ	micro (10^{-6})

Lista de tabelas

TABELA 3.4.1- Sequência de bases de sondas de captura modificadas com espaçador e amina primária, sonda de detecção modificadas com biotina e alvo utilizados no método colorimétrico.....	18
TABELA 3.4.2- Sequência de bases nos alvos, sondas de captura e detecção para o método eletroquímico.....	20
TABELA 4.7.1- Tabela de comparação dos resultados obtidos para ambos os métodos desenvolvidos	60

Lista de figuras

FIGURA 1.1.1- Etapas envolvidas para a detecção qualitativa do RNA viral utilizando RT-PCR.....	5
FIGURA 1.1.2 – Tipos de testes para COVID-19 clinicamente disponíveis atualmente.	6
FIGURA 1.1.3- Intensidade do sinal imunológico e título viral ao longo dos dias de infecção. Adaptado de Xavier et al (2020) ⁴⁷	7
FIGURA 1.1.4 - Modificações possíveis em partículas magnéticas.	9
FIGURA 3.3.1-Representação esquemática das etapas básicas envolvidas nos ensaios genômicos desenvolvidos.	17
FIGURA 3.5.1- Representação das etapas de preparação e modificação das PMs com cDNA para o método colorimétrico.	21
FIGURA 3.5.2- Representação da etapa de bloqueio das partículas magnéticas utilizados no método colorimétrico.....	22
FIGURA 3.5.3- Etapas realizadas para imobilização da maleimida e posteriormente do cDNA tiolado nas partículas magnéticas.	23
FIGURA 3.6.1-Foto da síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato em ebulição.	24
FIGURA 3.6.2- Representação esquemática representando as etapas envolvidas na imobilização do dDNA nas AuNPs.....	25
FIGURA 3.7.1-Etapas para construção dos dispositivos. 1) Corte do vinil adesivo, 2) Transferência do vinil ao suporte de PVC, 3) Aplicação da tinta condutora, 4) Cura da tinta e remoção da máscara, 5) Delimitação da área eletroativa, 6) Dispositivo pronto com 8 células individuais.	26
FIGURA 3.7.2-Suporte magnético fabricado com impressora 3D.....	27
FIGURA 3.8.1- Ilustração das etapas envolvidas no método genômico com detecção colorimétrica.....	28
FIGURA 3.8.2- Ilustração das etapas envolvidas no método genômico com detecção eletroquímica.....	29

FIGURA 3.8.3- Reações de oxidação e redução das nanopartículas de ouro e representação da resposta de corrente obtida utilizada para a detecção quantitativa do RNA viral em amostras de saliva.....	30
FIGURA 4.1.1- A) Voltamogramas obtidos com os eletrodos descartáveis em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AFM em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com velocidades de varredura variando de 10 mV s^{-1} a 300 mV s^{-1} . B) Valores de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.	31
FIGURA 4.1.2- Espectros de absorção na região do UV-Vis das AuNPs, dDNA e AuNPs-dDNA na diluição de 1/10 e concentrações de 1 e $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	32
FIGURA 4.1.3- Distribuição normal referente ao diâmetro das AuNPs obtida por meio das imagens obtidas de MET.	33
FIGURA 4.1.4- Images do biconjugado formado por MP-cDNA-DNAalvo-dDNA-AuNPs em diferentes ampliações obtidas por microscopia eletrônica de varredura.....	34
FIGURA 4.1.5- Porcentagem de ouro obtidos por EDS dos bioconjugados MP-cDNA-DNAalvo-dDNA-AuNPs quando o método foi aplicado em solução do branco e em diferentes concentrações de DNA alvo	35
FIGURA 4.2.1- Aplicação do teste genômico em amostras de saliva de indivíduo saudável com e sem a fortificação de ssDNA alvo, demonstrando a diferença de cor entre um teste negativo incolor e o positivo em azul.	36
FIGURA 4.2.2- A) Espectros de absorção no UV-Visível obtidos pela aplicação do ensaio genômico em amostras fortificadas com diferentes concentrações de ssDNA utilizadas como alvo. B) Curva de calibração obtida para a detecção de ssDNA. $n = 3$. C) Soluções coloridas obtidas quando da aplicação do método nas amostras fortificadas antes da adição da solução de HCl (o ponto escuro dos tubos são os conjugados de MPs aderidos a parede do tubo devido ao campo magnético gerado pelos ímãs presentes no suporte).....	37

FIGURA 4.3.1- Curvas analíticas do ensaio genômico para a detecção do ssDNA com sequência idêntica à do RNA 1A utilizando diferentes tampões para a conjugação das PMs-cDNA	39
FIGURA 4.3.2- Concentrações avaliadas no ensaio genômico para o RNA alvo 1A utilizando PMs-cDNA bloqueadas com etanolamina e tampão TT.....	40
FIGURA 4.3.3- Concentrações avaliadas no ensaio genômico para o ssDNA alvo 1A com o sem DTT no tampão de hibridização.	42
FIGURA 4.3.4- Curvas analíticas obtidas utilizando o ensaio genômico para o ssDNA 1A alvo utilizando diferentes condições para o tampão PBS na segunda etapa de incubação e lavagem.	43
FIGURA 4.3.5- Suportes para manipulação das MPs nos poços das microplacas para as etapas de captura e separação. A) Suporte inferior e superior. B) Suportes superior e inferior montados na microplaca. C) Retenção de ímãs dentro dos espaços presentes na microplaca.	44
FIGURA 4.3.6- Suportes magnéticos utilizados para a etapa de leitura óptica. A) Suporte inferior e superior. B) Suportes montados na microplaca. C) suporte superior removido, ficando somente os ímãs que vão atrair as partículas magnéticas na parede lateral dos poços permitindo a leitura óptica.	45
FIGURA 4.3.7- Fotos da microplaca de 96 poços com o suporte e os ímãs posicionadas entre cada quatro poços. O teste colorimétrico foi aplicado em amostras de saliva fortificada.	45
FIGURA 4.3.8- Concentrações avaliadas na aplicação do ensaio genômico para detecção do ssDNA 1A alvo utilizando a microplaca bloqueada previamente com BSA e sem bloqueio.	46
FIGURA 4.3.9- Foto do ensaio na microplaca com e sem bloqueio pela proteína BSA.	47
FIGURA 4.4.1- Respostas de concentração de RNA viral obtidas com a aplicação do ensaio genômico em amostras de saliva de indivíduos saudáveis (verde) e pacientes diagnosticados com COVID-19 (vermelho).	48

FIGURA 4.4.2- Curvas ROC para RNA alvo utilizando o ensaio genômico. Respostas do sujeito de saúde versus paciente com COVID-19, $p < 0,001$	49
FIGURA 4.4.3- Diagrama de pontos interativo da concentração alvo de RNA em amostras de saliva, *t-test, $p = 0,0047$ (MedCalc Statistical Software).	50
FIGURA 4.5.1- DPVs obtidos para concentrações do alvo 1A de 0, 5, 50, 500, 5000 e 50000 fmol L^{-1} e valores de corrente em função da concentração do alvo 1A.	51
FIGURA 4.6.1- Voltamogramas de Pulso Diferencial realizado com eletrodos descartáveis contendo AuNPs utilizando solução HCl e NaCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólitos de suporte. Os voltamogramas foram obtidos após a etapa de oxidação cronoamperométrica das AuNPs.	52
FIGURA 4.6.2. Avaliação do efeito da diluição da amostra da saliva na resposta de corrente quando da determinação de RNA viral utilizando o ensaio genômico.	53
FIGURA 4.6.3- Comparação entre amostra de saliva coletada com Salivette em azul, e com tubo falcon, em vermelho.	54
FIGURA 4.6.4- Comparação de tempos diferentes de incubação para o bioconjugado em função da resposta de corrente	55
FIGURA 4.6.5- Valores de corrente de pico obtidos nas coletas de amostra de saliva por 5 dias.	56
FIGURA 4.6.6- Teste de interferência com Influenza, Salmonella e Herpes na concentração de 500pM e SARS-CoV-2 de 5pM.	57
FIGURA 4.6.7- Detecção de RNA viral utilizando o método proposto em amostras de saliva de indivíduos com diagnósticos positivos confirmados por RT-PCR	58
FIGURA 4.6.8- Curva ROC com $\text{AUC} = 1$ e gráfico de pontos apresentando a linha de corte entre uma amostra positiva e negativa.	59
FIGURA 4.6.9- Diagrama de pontos interativo da concentração alvo de RNA em amostras de saliva, *t-test, $p = 0,0047$ (MedCalc Statistical Software).	59

Resumo

SARS-CoV-2: DETECÇÃO COLORIMÉTRICA E ELETROQUÍMICA DO RNA VIRAL EM AMOSTRAS DE SALIVA HUMANA. O surgimento e a rápida disseminação de vírus respiratórios e sistêmicos têm marcado de forma significativa o cenário da saúde global nas últimas décadas. Do HIV ao SARS-CoV-2, agentes virais têm provocado crises sanitárias com alto custo humano e econômico, reforçando a importância de estratégias eficazes de vigilância, diagnóstico e contenção. Apesar da redução nos óbitos devido à vacinação, a testagem em massa continua sendo uma medida essencial, mas ainda insuficiente no Brasil devido às limitações de custo, acessibilidade e infraestrutura. Este trabalho teve como objetivo desenvolver ensaios moleculares mais simples, rápidos e de menor custo para detecção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de saliva. Foram desenvolvidos dois métodos: um colorimétrico, compatível com microtubos ou microplacas de 96 poços, e outro eletroquímico, aplicável em células unitárias ou arranjos de oito células. Os ensaios são baseados no uso de partículas magnéticas funcionalizadas com grupos carboxila para a captura do alvo a partir do ancoramento de sondas de DNA complementares às sequências do gene N, presente no RNA de SARS-CoV-2. A detecção e quantificação são realizadas sem necessidade de etapas de modificação do eletrodo, extração ou amplificação do material genético. As condições experimentais foram otimizadas e testadas tanto em amostras de saliva fortificadas quanto em amostras reais de pacientes já diagnosticados pela técnica padrão. Foram obtidos limites de detecção e quantificação que variam de fmol L^{-1} a pmol L^{-1} com ampla faixa linear, a sensibilidade e especificidade dos métodos foram determinados a partir da construção de uma curva ROC de análise preditiva e comparados ao método padrão RT-PCR.

Abstract

SARS-CoV-2: COLORIMETRIC AND ELECTROCHEMICAL DETECTION OF VIRAL RNA IN HUMAN SALIVA SAMPLES. The emergence and rapid spread of respiratory and systemic viruses have significantly marked the global health scenario in recent decades. From HIV to SARS-CoV-2, viral agents have caused health crises with high human and economic costs, reinforcing the importance of effective surveillance, diagnosis, and containment strategies. Despite the reduction in deaths due to vaccination, mass testing remains an essential measure, but still insufficient in Brazil due to limitations in cost, accessibility, and infrastructure. This work aimed to develop simpler, faster, and lower-cost molecular assays for the detection of SARS-CoV-2 RNA in saliva samples. Two methods were proposed: a colorimetric method, compatible with microtubes or 96-well microplates, and an electrochemical method, applicable in unit cells or arrays of eight cells. The assays are based on the use of magnetic particles functionalized with carboxyl groups to capture the target by anchoring DNA probes complementary to the sequences of the N gene, present in the SARS-CoV-2 RNA. Detection and quantification are performed without the need for electrode modification, extraction or amplification of genetic material. The experimental conditions were optimized and tested both on fortified saliva samples and on real samples from patients already diagnosed using the standard technique. Limits of detection and quantification ranging from fmol L^{-1} to pmol L^{-1} with a wide linear range were obtained. The sensitivity and specificity of the methods were determined by constructing a ROC curve for predictive analysis and compared to the standard RT-PCR method.

Sumário

1 - Introdução	1
1.1 - Coronavírus e a COVID-19	2
1.1.1 - Métodos de detecção de biomarcadores e a COVID-19.....	4
1.1.2 - Partículas Magnéticas (PMs) e sua utilização em métodos analíticos	8
1.1.3 - Nanopartículas de ouro (AuNPs) como marcador de biomoléculas	10
1.1.4 - Sensores eletroquímicos descartáveis (SED)	11
2 - Objetivo Geral.....	13
2.1 - Objetivos específicos	13
3 - Procedimento experimental	14
3.1 - Reagentes e soluções	14
3.2 - Instrumentação.....	15
3.3 - Estratégias utilizadas nos métodos desenvolvidos	16
3.3.1 - Etapas envolvidas na detecção colorimétrica e eletroquímica do RNA de SARS-CoV-2.....	16
3.4 - Sequências de ssDNA sintéticos utilizadas neste estudo	17
3.4.1 - Oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do método colorimétrico	18
3.4.2 - Oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do método eletroquímico.....	19
3.5 - Partículas magnéticas (PMs).....	20
3.5.1 - Imobilização do cDNA nas partículas magnéticas - método colorimétrico	20
3.5.2 - Imobilização do cDNA nas partículas magnéticas para o método eletroquímico.....	22

3.6 - Síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs).....	23
3.6.1 - Imobilização do dDNA nas AuNPs.....	24
3.7 - Fabricação dos dispositivos eletroquímicos descartáveis.....	25
3.7.1 - Definição dos eletrodos e serigrafia	25
3.8 - Estratégias utilizadas para a detecção do material genético	27
3.8.1 - Etapas envolvidas no método colorimétrico.....	27
3.8.2 - Etapas envolvidas no método genomagnético com detecção eletroquímica.....	28
3.8.3 - Reações na detecção eletroquímica	29
4 - Resultados e discussão.....	30
4.1 - Caracterizações	30
4.1.1 - Caracterização do ensaio genomagnético com detecção eletroquímica	30
4.1.2 - Espectrofotometria na região do UV-Visível do dDNA, AuNPs e conjugado AuNP-dDNA	32
4.1.3 - Caracterização das partículas.....	33
4.2 - Aplicação do ensaio genomagnético com detecção colorimétrica em amostras fortificadas	36
4.3 - Otimizações dos parâmetros do ensaio genomagnético com detecção colorimétrico	37
4.3.1 - Tampões de imobilização dos cDNAs nas PMs.....	38
4.3.2 - Bloqueio das PMs realizada após a conjugação com cDNA.....	40
4.3.3 - Composição do tampão de hibridização	41
4.3.4 - Composição do tampão para a formação do complexo biotina-estreptavidina	42

4.3.5 - Otimizações com aplicação do método em microplaca de 96 poços	43
4.4 - Aplicação do ensaio genômico com detecção colorimétrica em amostras reais confirmadas por RT-PCR.....	47
4.5 - Ensaio genômico com detecção eletroquímica em amostras de saliva fortificadas.....	50
4.6 - Otimizações do ensaio eletroquímico.....	51
4.6.1 - Estudo do eletrólito de suporte	51
4.6.2 - Avaliação da diluição da amostra de saliva.....	52
4.6.3 - Avaliação do tipo frasco utilizado para a coleta de saliva.....	53
4.6.4 - Avaliação do tempo de incubação	54
4.6.5 - Acompanhamento do título viral ao longo dos dias	55
4.6.6 - Testes de interferência na presença do material genético de outros vírus.....	56
4.6.7 - Aplicação do método eletroquímico em amostras de saliva de indivíduos saudáveis e pacientes com COVID-19 confirmadas por RT-PCR	57
4.7 - Comparação dos métodos desenvolvidos	60
5 - Conclusões	61
6 - Referências.....	63

1 - Introdução

Nas últimas 4 décadas, o mundo tem sido exposto a recorrentes epidemias em grande escala de novos vírus emergentes. Dentre estes, estão o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da gripe (H1N1), Ebola (EBOV), Zika Vírus (ZIKV), Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e recentemente a Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), responsável pela doença COVID-19¹.

Em 12 de dezembro de 2019, na província de Wuhan China, foi hospitalizado um paciente portador de uma grave doença respiratória com manifestações clínicas semelhantes à pneumonia viral. Em cerca de um mês após este ocorrido, pelo menos 1.975 casos foram relatados desde este primeiro paciente². A princípio, por conta de várias similaridades, pensou-se que poderia ser uma infecção por um novo vírus influenza, ou até mesmo outros vírus respiratórios, tal como o coronavírus responsável pela síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) de 2002³.

No início de janeiro de 2020, o agente causador da pneumonia foi identificado como um novo coronavírus por vários laboratórios independentes localizados na China⁴. Em um período muito curto de tempo o vírus se espalhou para mais de 45 países e o número de indivíduos infectados aumentou rapidamente em escala global, causando um alarme internacional. A América Latina foi exceção até 25 de fevereiro de 2020, quando o Ministério da Saúde do Brasil confirmou o primeiro caso e em março de 2020, o surto da COVID-19 foi considerada pela OMS como uma pandemia mundial^{5,6}.

Desde o início da pandemia de COVID-19, 777,7 milhões casos de infecção e mais de 7,1 milhões de óbitos já foram confirmados no mundo todo. Até junho de 2025, o Brasil atingiu a marca de 39,2 milhões de casos e mais de 716,1 mil óbitos confirmados como vítimas da Covid-19⁷ e estes números continuam aumentando. As ondas de infecção em curso resultam de mutações no genoma

viral que levam a novas variantes e que vêm ocorrendo em vários países⁸⁻¹¹. Esforços têm sido feitos para a vacinação em massa, contudo, SARS-CoV-2 continua sendo uma preocupação de saúde pública global.

Dados obtidos da organização mundial da saúde e outras organizações estimam um número de mortes em excesso que varia de 19,23 milhões a 36,18 milhões além dos mais de 7,1 milhões de óbitos por COVID-19 já confirmados¹².

Na vigilância genômica do SARS-CoV-2, em 2025 foram registrados 2.129 sequenciamentos na plataforma GISAID, realizados pela Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, referentes a amostras de casos de covid-19 coletadas entre as semanas epidemiológicas 01 e 19. Nesse período, foram identificadas 116 diferentes linhagens circulantes, com destaque para a LP.8.1.4, JN.1.11 e JN.1.16.¹³.

Apesar das quedas no número de novos casos e de mortes observadas no país, ainda há uma preocupação quanto a necessidade de se manter as medidas de prevenção, controle e enfrentamento à disseminação do coronavírus, o que inclui a necessidade de testagem em massa da população e em especial pelo aumento de casos observados em diferentes países no mundo.

1.1 - Coronavírus e a COVID-19

Os coronavírus são membros da subfamília Orthocoronavirinae da família *Coronaviridae* e da ordem *Nidovirales* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)¹⁴. Esta subfamília consiste em quatro gêneros α , β , γ e δ , e são encontrados em uma ampla seleção de espécies animais, incluindo camelos, bovinos, gatos, morcegos, porcos e humanos^{15,16}. Dentre estes quatro gêneros, o β -coronavírus é o que leva a ocorrência de doenças que incluem a SARS-CoV, síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), que apresenta um espectro clínico variando de infecções assintomáticas a quadros graves que envolvem os sistemas respiratório, entérico, hepático e neurológico de humanos e animais^{15,17,18}.

Os coronavírus são vírus envelopados com diâmetro de 60 a 130 nm que contêm um genoma de ácido ribonucleico (RNA) altamente diversificado de fita simples de sentido positivo, com tamanho variando de 26 a 32 mil bases, contendo um dos maiores genomas entre os vírus de RNA^{19,20}. Esse vírus pode apresentar capsídeos pleomórficos (tendendo a globular) e ter projeções radiais superficiais como uma coroa, daí o nome coronavírus²⁰. Estudos apontam que SARS-CoV-2 compartilha 79,5% de identidade de sequência com o SARS-CoV, e 96,2% da identidade geral da sequência do genoma com o RaTG13 um coronavírus de morcego^{21,22}.

Utilizando do mesmo receptor que o SARS-CoV, o SARS-CoV-2 invade as células humanas a partir da enzima ACE2 (*Angiotensin Converting Enzyme 2*)²³, contudo, a análise filogenética revelou que o SARS-CoV-2 se enquadra no subgênero *Sarbecovirus* do gênero *Betacoronavirus*, e, portanto, é distinto do SARS-CoV²⁴. Resultados recentes encontrados na península Indochina apontam que o coronavírus tenha surgido de modo natural, mas a origem exata do vírus permanece uma incógnita^{25,26}.

Variantes do SARS-CoV-2 têm sido associadas ao aumento da transmissibilidade, resistência à neutralização e gravidade da doença. A vigilância genômica do SARS-CoV-2 em andamento em todo o mundo melhorou a capacidade de identificar e reportar rapidamente essas variantes. Existem atualmente um grande número de variantes, e baseado em seus perfis clínicos e epidemiológicos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) designou as atuais em circulação como variantes de preocupação (VOC), variantes de interesse (VOI) ou variantes sob monitoramento (VUM)²⁷. Até junho de 2025, as variantes Alpha, Beta, Gamma, Delta, Ômicron e suas cepas tiveram o maior impacto global em termos de transmissão e evasão imunológica²⁸.

Da mesma forma que outros vírus, as principais vias de infecção se dão a partir do contato direto com aerossóis de pessoas infectadas e contato indireto

com superfícies contaminadas seguido do toque nos olhos, nariz ou boca. Apenas alguns metros de distância já bastam para a contaminação acontecer e em condições favoráveis o vírus pode viajar pelo ar a até 10 metros de distância²⁹⁻³¹. Podendo variar de 1 a 14 dias após o contato, o período médio de incubação é estimado em 6,5 dias^{32,33}, contudo, existem relatos no qual o período de incubação de um portador assintomático chegou a 19 dias³⁴, dificultando, assim, a estratégia de quarentena sugerida pela OMS.

Dentre as manifestações clínicas, os casos leves de COVID-19 apresentam febre, tosse, cansaço e perda do olfato como os sintomas mais comuns. Nas manifestações moderadas destacam-se náusea, dor de cabeça, dores abdominais e diarreia. Os sintomas graves envolvem dificuldade respiratória, perda de fala ou mobilidade e dores no peito^{33,35,36}.

1.1.1 - Métodos de detecção de biomarcadores e a COVID-19

Devido aos sintomas serem semelhantes aos de um resfriado, gripe e até outras síndromes respiratórias sazonais, o diagnóstico e o isolamento precoces de pacientes infectados são essenciais para retardar a disseminação viral. De acordo com as diretrizes da OMS, a confirmação da infecção por COVID-19 deve ser feita pela detecção de sequências únicas de ácido ribonucléico (RNA) do SARS-CoV2, visando os genes N, E, S e RdRp³⁷.

Pode ser observado que o surgimento da variante Ômicron não modificou as metodologias já estabelecidas no diagnóstico laboratorial¹³. A aplicação do método considerado padrão ouro para o diagnóstico de COVID-19 envolve a detecção do RNA viral pela transcrição reversa em tempo real e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Esta técnica apesar de muito bem estabelecida não era amplamente disponível em análises clínicas de rotina, no entanto, com a pandemia global, ela se tornou mais difundida, especialmente em países desenvolvidos. O RT-PCR envolve etapas complexas como a necessidade de extração do RNA,

transcrição para DNA e vários ciclos de aquecimento e resfriamento, exigindo quantidades relativamente elevadas de reagentes como enzimas, primers e nucleotídeos. A técnica tem sido utilizada de forma qualitativa, sendo os protocolos ainda mais complexos para detecção quantitativa do material genético do vírus^{38,39}. A FIGURA 1.1.1 ilustra de forma simplificada as etapas envolvidas para a utilização do RT-PCR

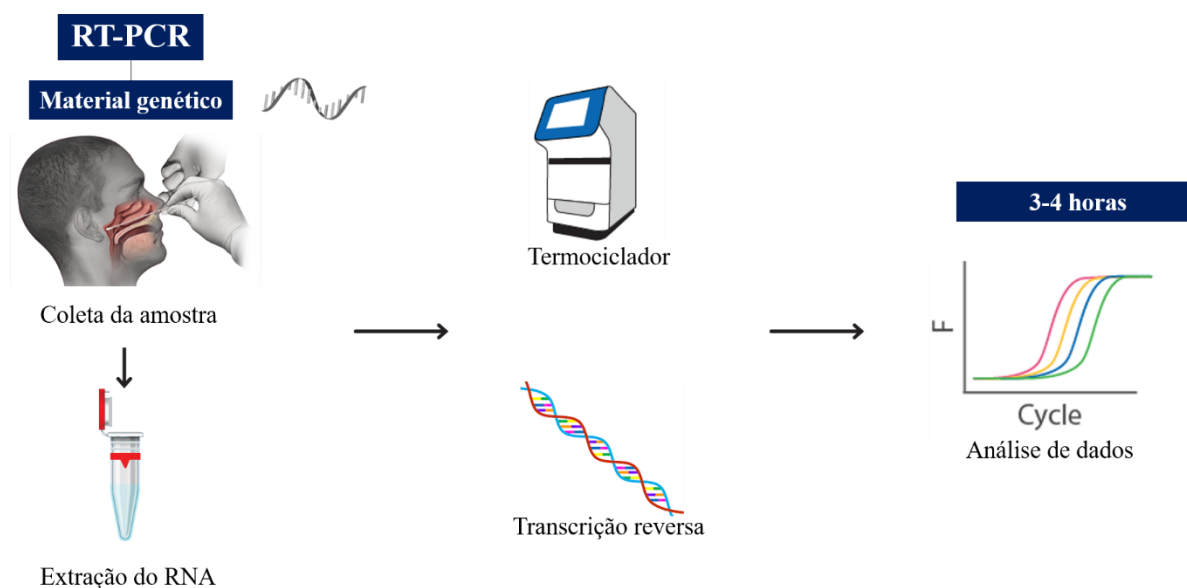


FIGURA 1.1.1- Etapas envolvidas para a detecção qualitativa do RNA viral utilizando RT-PCR

Mesmo sendo a principal técnica para o diagnóstico da COVID-19 apresentando elevada sensibilidade e especificidade clínica, a técnica de RT-PCR apresenta algumas importantes limitações principalmente quanto ao custo elevado e necessidade de pessoal técnico especializado passando por eventuais falso-positivos e falso-negativos^{40,41}. Apesar de muito pouco comum, houve um importante caso recente na Inglaterra em que investigações concluíram que mais de 43 mil testes RT-PCR, de um único laboratório, apresentaram resultados falso-negativos^{42,43}.

Como apresentado na FIGURA 1.1.2, além do RT-PCR outros métodos de diagnóstico estão disponíveis como os testes rápidos ou imunocromatográficos e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), que apesar de disponível inclusive em

países subdesenvolvidos, não foi utilizado em escala na pandemia⁴⁴. Os testes rápidos têm como vantagens a capacidade de serem realizados em campo sem equipamentos laboratoriais especiais com facilidade de execução e interpretação simples, no entanto, não permitem a quantificação do antígeno e tendem a apresentar problemas de falsos negativos e positivos sendo utilizados para triagem inicial devendo o diagnóstico ser confirmado por outra técnica como o RT-PCR.

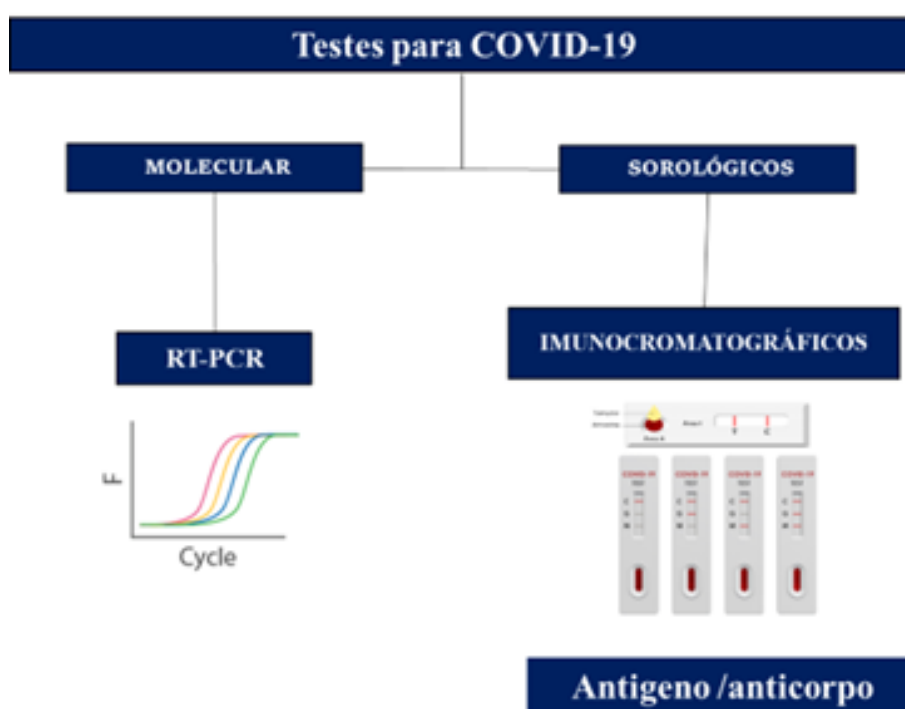


FIGURA 1.1.2 – Tipos de testes para COVID-19 clinicamente disponíveis atualmente.

A falta de acurácia no diagnóstico pode estar relacionada não somente ao tipo de técnica, mas também por conta do tempo entre infecção e coleta da amostra, o tipo de biomarcador a ser detectado e o tipo de material biológico coletado. Sendo que estes parâmetros podem inviabilizar a detecção no estágio inicial da doença, dificultando um diagnóstico preciso. Como demonstrado na FIGURA 1.1.3, o sistema imune de pacientes infectados começa a produzir anticorpos IgM e IgG anti-nucleocapsídeo viral somente após 7-10 dias da infecção inicial sendo, portanto, inviável a detecção destes para o diagnóstico inicial da doença^{45,46}.

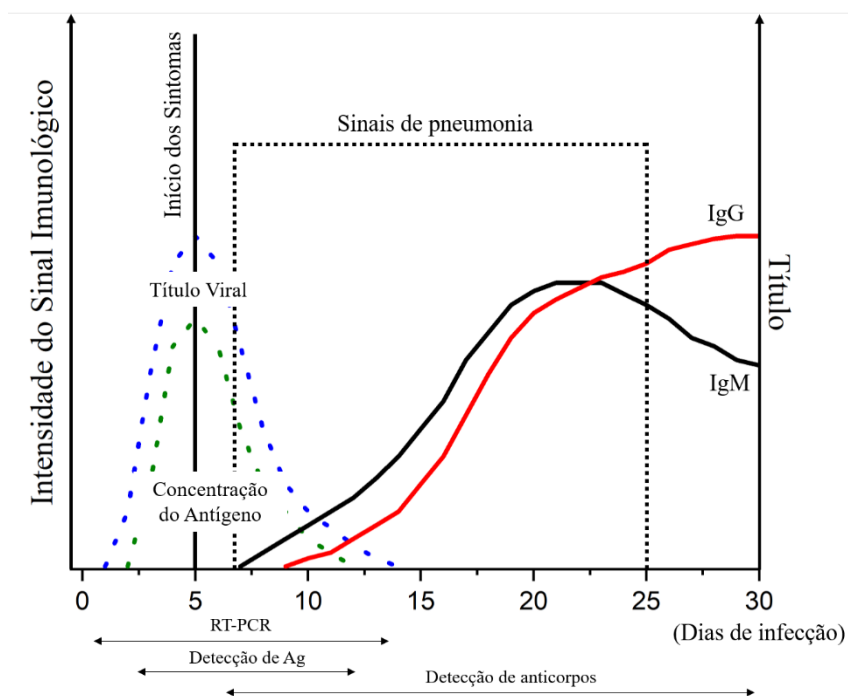


FIGURA 1.1.3- Intensidade do sinal imunológico e título viral ao longo dos dias de infecção. Adaptado de Xavier et al (2020)⁴⁷.

Mesmo com o uso de um método que seja capaz de realizar a detecção destes alvos em concentrações muito baixas, a presença destes anticorpos no organismo indica que a carga viral no indivíduo já diminuiu significativamente a ponto do paciente já não estar mais transmitindo a doença.

Outras técnicas que envolvem amplificação gênica, como a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) surgiram como uma alternativa, mas apesar da boa seletividade e eficiência, esta técnica também requer etapas de aquecimento e quantidades significativas de reagentes, além de pessoal treinado, o que dificulta sua aplicação em grande escala^{48,49}.

Apesar disso, atualmente existem novas possibilidades utilizando tecnologias e ferramentas computacionais como *machine learning* e *deep learning* na detecção de biomarcadores onde pesquisas têm integrado inteligência artificial (IA) e técnicas eletroquímicas para criar biossensores⁵⁰⁻⁵².

1.1.2 - Partículas Magnéticas (PMs) e sua utilização em métodos analíticos

A utilização de PMs no desenvolvimento de métodos analíticos tem despertado grande interesse nos últimos anos. Isso se deve principalmente à sua capacidade de permitir a separação e captura do analito de forma simples trazendo grande versatilidade no desenvolvimento de novos métodos de detecção. Isto aliado a elevada área superficial, excelente estabilidade química e física, baixa toxicidade e alta biocompatibilidade das PMs. Com variações de tamanho que vão de escala nanométrica à micrométrica, no qual diferentes compostos podem ser covalentemente immobilizados às PMs permitindo grande versatilidade na capacidade de rapidamente capturar e separar os mais diversos tipos de compostos de uma matriz de amostra tão complexa como amostras de soro, saliva ou urina, fazendo uso de um campo magnético externo gerado por ímãs de baixo custo com os de neodímio-ferro-boro⁵³. As PMs consistem em um núcleo paramagnético ou superparamagnético rodeado por uma camada externa polimérica adequada para a imobilização de biomoléculas. O núcleo magnético é prontamente disponível em diferentes formas de óxido de ferro, entre as quais se destacam as estruturas na forma de magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)⁵⁴. A FIGURA 1.1.4 ilustra as possibilidades de modificação nas PMs.

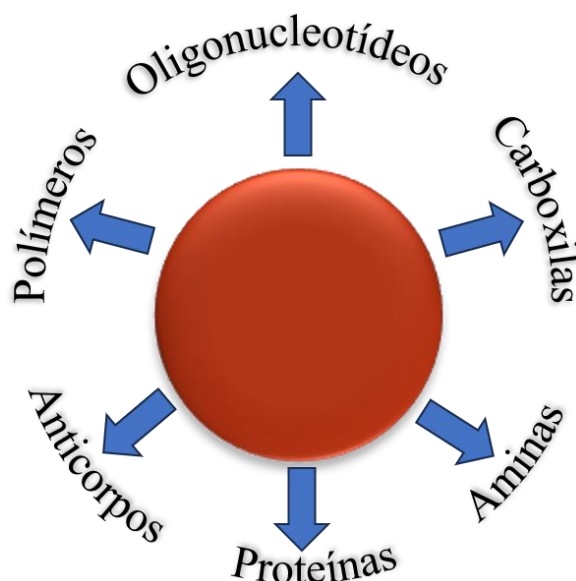


FIGURA 1.1.4 - Modificações possíveis em partículas magnéticas.

O recobrimento das PMs tem como função além de permitir o ancoramento de moléculas voltadas para reconhecimento ou biorechecimento do analito neutralizar as altas energias de superfície que podem levar à agregação das PMs, evitando também atividades químicas que podem levar à sua oxidação com possível perda de propriedades magnéticas⁵⁵. Atualmente existem PMs disponíveis comercialmente, modificadas com diversas biomoléculas que permitem seu uso em diferentes categorias de bioensaios. Assim, é possível adquirir PMs funcionalizadas com uma ampla gama de grupos funcionais como: aminos, carboxilas, aldeídos, epóxidos, ésteres e tosilas, podendo ser utilizados em diferentes estratégias para a imobilização de espécies biológicas⁵⁶⁻⁵⁹.

PMs têm sido amplamente empregadas em métodos colorimétricos e vários métodos eletroanalíticos. Podem melhorar significativamente o desempenho de sensores, pois possibilitam a captura e separação de várias biomoléculas como proteínas e peptídeos⁶⁰, ácidos nucleicos (RNA e DNA)⁶¹, células⁶² e oligonucleotídeos⁶³ além de, em muitos casos, permitir à amplificação do sinal analítico⁶⁴. Estas características são de extrema importância para métodos eletroanalíticos, pois além de minimizar possíveis interferências devido à matriz da amostra, muito comum nesta técnica, as PMs auxiliam na obtenção de baixos

limites de detecção devido tanto a elevada área superficial quanto a possibilidade de preconcentração do analito⁶⁵.

1.1.3 - Nanopartículas de ouro (AuNPs) como marcador de biomoléculas

As AuNPs são de fácil obtenção por diferentes rotas e assim como as PMs, podem ser decoradas com diferentes compostos, de forma que uma ampla gama de grupos funcionais podem ser utilizados para a imobilização de biomoléculas como proteínas e material genético de forma covalente ou por meio de interações eletrostáticas para utilização em diferentes tipos de biossensores⁶⁶⁻⁷³.

Nanopartículas funcionalizadas com DNA podem ser sintetizadas sob condições específicas podendo ser utilizadas para a saturação da superfície das AuNPs com moléculas de DNA de fita simples⁷⁴. Propriedades como estas, levaram AuNPs a ser um excelente candidato para várias aplicações buscando o biorreconhecimento com potenciais aplicações na área médica devido à sua distribuição de tamanho, eficiente modificação de superfície, condutividade, biocompatibilidade atrativa e propriedades eletroquímicas⁷⁵⁻⁷⁸.

Os sensores eletroquímicos baseados em nanopartículas de ouro desempenham um importante papel podendo ser utilizadas como plataforma de imobilização ou como marcador eletroquímico, oferecendo, quando devidamente modificadas, elevada seletividade, sensibilidade e baixo custo para a detecção de sequências específicas de DNA. Estes sensores eletroquímicos se aproveitam da ocorrência de interações em nanoescala entre as sequências alvo, a camada de reconhecimento e a superfície do eletrodo⁷⁹.

Dentre as técnicas eletroquímicas utilizadas, destacam-se a espectroscopia de impedância eletroquímica e técnicas voltamétricas como a voltametria de pulso diferencial que tem sido usada para a detecção de DNA, uma vez que é uma técnica poderosa utilizada para a detecção de íons metálicos em níveis de traço⁸⁰⁻⁸².

O uso de AuNPs na detecção de partículas virais infectantes como os antígenos do vírus SARS-CoV-2 via métodos colorimétricos tem sido relatado na literatura³⁹. Apesar dos atrativos, uma desvantagem na sua utilização é o aumento do sinal do branco analítico resultante da adsorção inespecífica de pequena quantidade de AuNPs, para isto, neste trabalho foram realizados estudos com diferentes soluções de bloqueio visando evitar este tipo de interferência.

1.1.4 - Sensores eletroquímicos descartáveis (SED)

Um SED pode ser definido como um filme condutor depositado sobre um suporte não condutor, sendo o filme condutor parcialmente recoberto com um filme isolante para a definição da área exposta dos eletrodos. Como suporte, os dispositivos podem ser fabricados utilizando materiais poliméricos e a base de papel⁸³⁻⁸⁶.

Os SED são normalmente fabricados empregando técnicas como sputtering⁸⁷, impressão a jato de tinta⁸⁸ e mais amplamente utilizando serigrafia⁸⁹. Os materiais que podem ser empregados na fabricação dos eletrodos são metais^{87,90,91} e mais comumente compostos a base de carbono⁹²⁻⁹⁴. A técnica de serigrafia consiste em depositar a tinta sobre uma máscara ou tela que é previamente fixada sob o suporte isolante, a fim de delimitar a área de interesse na formação dos eletrodos e por meio do qual a tinta a irá entrar em contato com o suporte para ser depositada⁹⁵. A possibilidade do uso de diferentes máscaras permite a preparação de diferentes formatos de eletrodos, como também células eletroquímicas contendo múltiplos eletrodos de trabalho^{83,95,96}.

As etapas envolvidas nessa técnica são: a deposição da tinta, secagem e cura da mesma, seguida pela aplicação de material isolante, a fim de definir as áreas expostas dos contatos elétricos e dos eletrodos. A versatilidade do uso da técnica de serigrafia tem sido amplamente explorada na área de biossensores, devido à facilidade em projetar o melhor formato de eletrodos para a análise desejada e fácil integração à dispositivos portáteis⁹⁷. Estudos descreveram

recentemente várias aplicações e métodos utilizando a construção de diferentes biossensores eletroquímicos para aplicação em análises clínicas sendo projetados por técnicas de serigrafia e associados ou não a dispositivos microfluídicos sendo empregados como biossensores ou genossensores, entre outros^{84,98}.

Pode-se destacar como principal vantagem o fato de os SEDs construídos para ser descartáveis, contudo, eles apresentam ainda várias características atrativas tais como: baixo custo, baixo consumo de amostra e reagentes seja para sua construção ou na aplicação, portabilidade, utilização como dispositivo *point-of-care*⁹⁹, fácil fabricação em grande escala, podendo ser utilizados para uma ampla gama de aplicações e ampla possibilidade de modificação da superfície sensora ou mesmo da tinta proporcionando métodos versáteis de imobilização de materiais biológicos por exemplo¹⁰⁰⁻¹⁰³. Os SEDs têm sido utilizados na detecção e determinação de ampla variedade de analitos, podendo estes ser íons metálicos¹⁰⁴, compostos orgânicos¹⁰⁵, herbicidas¹⁰⁶, carboidratos¹⁰⁷, anticorpos¹⁰⁸, DNA e RNA¹⁰⁹⁻¹¹³.

2 - Objetivo Geral

Desenvolver métodos analíticos para a detecção genômica do vírus SARS-CoV-2 em amostras de saliva utilizando técnicas óticas e eletroquímicas que possam auxiliar no diagnóstico precoce de COVID-19.

2.1 - Objetivos específicos

- Definição das sequências de RNA viral e das sequências de DNA para captura e detecção;
- Promover a imobilização covalente das sondas de DNA de captura e de detecção nas partículas magnéticas e nanopartículas de ouro, e suas devidas caracterizações;
- Construção e avaliação dos dispositivos eletroquímicos descartáveis;
- Avaliar a capacidade dos métodos para a detecção colorimétrica e eletroquímica de sequências de DNA de fita simples idênticas as do RNA viral em amostras de saliva fortificadas;
- Avaliação das figuras de mérito dos métodos a serem desenvolvidos, como definição da região linear, limites de detecção e interferentes;
- Aplicação dos métodos em amostras de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com COVID-19;
- Comparação dos resultados obtidos com a técnica de RT-PCR.

3 - Procedimento experimental

3.1 - Reagentes e soluções

Cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (KH_2PO_4), cloreto de magnésio (MgCl_2), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ditioneitol (DTT), N-hidroxisuccinimida (NHS), cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), Tween-20 (TW20), 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) substrato líquido, etanolamina, HRP-streptavidina (GERPN 1231) e tampão MES (ácido 2-etanossulfônico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Partículas magnéticas com 1 μm funcionalizadas com grupo carboxílico (PMs) foram obtidas da Invitrogen (Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid, Prod. nº 65012, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Albumina de soro bovino (BSA) foi adquirida da Fisher Scientific (Geel, Bélgica) e ácido clorídrico (HCl) foi adquirido da Fluka (S. Harvey St, Muskegon, USA). Tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol L^{-1} (Na_2HPO_4 10 mmol L^{-1} , KH_2PO_4 1,8 mmol L^{-1} , KCl 2,7 mmol L^{-1} , NaCl 137 mmol L^{-1} e pH 7,4), tampão Tris-EDTA (TE) (pH 7,6 – 8,0, 10 mmol L^{-1} Tris-HCl, 1 mmol L^{-1} EDTA), tampão TE-TW20 (TE + 0,05 % Tween 20), tampão NE 10x (pH 7,9, 500 mmol L^{-1} Tris-HCl, 1000 mmol L^{-1} NaCl, 100 mmol L^{-1} MgCl_2 , 10 mmol L^{-1} DTT), tampão NE 1x (pH 7,9, 50 mmol L^{-1} Tris-HCl, 100 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} MgCl_2 , 10 mmol L^{-1} DTT), tampão PBS-TW20 (PBS + 0,05 % de Tween 20), NE-TW20 (NE 1x + 0,05 % de Tween 20). As soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura obtida em um sistema Milli-Q (Millipore, 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25°C, Bedford, EUA); Os oligonucleotídeos sintéticos adquiridos e utilizados para captura, como alvo e para detecção foram dissolvidos segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, em TE (10mM Tris, 1mM EDTA), EDC e NHS foram preparados em água imediatamente antes do uso. Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções eram de pureza analítica.

3.2 - Instrumentação

Para as medidas de pH utilizou-se um pHmetro Digimed DM20 (Digimed, Brasil). As soluções foram preparadas com água purificada obtida em um sistema de purificação Milli-Q da Millipore (Millipore, Bedford, USA).

Nas etapas de hibridização e bioconjugação utilizou-se um termo-agitador da KASVI K80-100 para agitação e lavagem durante as diferentes etapas. Para a centrifugação das nanopartículas de ouro utilizou-se centrífuga Mikro 220R Heitech. Já para a centrifugação dos tubos de coleta de saliva utilizou-se uma Eppendorf 5810R e suportes para o tubo Salivette.

As medidas de espectrofotometria na região do visível foram obtidas utilizando um espectrofotômetro SHIMADZU modelo UV-2550, para os experimentos realizados em microtubos e os realizados em microplaca de ELISA foi utilizado o leitor EZ Read 400 Microplate Reader da Biochrom.

As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando um sistema μ Stat800 (Metrohm, Suíça). O vinil adesivo e o substrato de PVC foram cortados utilizando uma impressora a laser (Two Trees, China). As esferas magnéticas foram homogeneizadas utilizando um banho ultrassônico (modelo USC-1400, UNIQUE) e um agitador de vórtex (modelo AV-2 82328, GEHAKA). O conjunto de eletrodos foi finalizado utilizando uma prensa térmica (modelo PTM 38, F1 fornecido, Brasil), que selou e definiu a área exposta do eletrodo de trabalho (WE). Um suporte foi produzido utilizando uma impressora 3D (Creality, China) com uma área de construção de $235 \times 235 \times 280$ mm e nivelamento automático. As peças impressas foram feitas utilizando filamento PLA (ácido polilático) da 3Dfila, fabricante brasileira.

As Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas dos equipamentos FEI Inspect F50 e FEI Tecnai G2 F20 X-twin 200KV, respectivamente.

3.3 - Estratégias utilizadas nos métodos desenvolvidos

3.3.1 - Etapas envolvidas na detecção colorimétrica e eletroquímica do RNA de SARS-CoV-2.

A estratégia de funcionamento para ambos os sistemas se baseia na hibridização das fitas simples de DNA (ssDNA) utilizada para captura e separação com o RNA do vírus SARS-CoV-2. Neste trabalho, esta etapa pode variar de 30 a 60 minutos e é chamado de incubação ou hibridização, que leva a formação de um híbrido DNA-RNA¹¹⁴.

Nos métodos desenvolvidos são utilizadas duas sondas de ssDNA, uma para captura do RNA alvo (cDNA) e uma segunda para a etapa de detecção (dDNA). A cDNA foi ancorada covalentemente nas partículas magnéticas e a segunda foi modificada de diferentes formas com diferentes marcadores dependendo do método de detecção empregado seja colorimétrico ou eletroquímico. No caso, o dDNA pode ser conjugado com Streptavidina-HRP para o método colorimétrico ou nanopartículas de ouro, no caso do método eletroquímico.

A saliva coletada passa por um processo de aquecimento na temperatura de 65°C por 30 minutos, a fim de expor o RNA viral. Na etapa de captura, há a formação do híbrido DNA-RNA levando a formando de um bioconjugado, envolvendo as partículas magnéticas já modificadas com o cDNA, alvo e o dDNA contendo o biomarcador. Este bioconjugado é separado magneticamente e após as etapas de lavagem segue-se para a etapa de detecção e quantificação. A FIGURA 3.3.1 ilustra de forma resumida as etapas envolvidas e os diferentes métodos de detecção empregados, mais detalhes sobre cada etapa envolvida na aplicação dos métodos são discutidos no item 3.8 -.

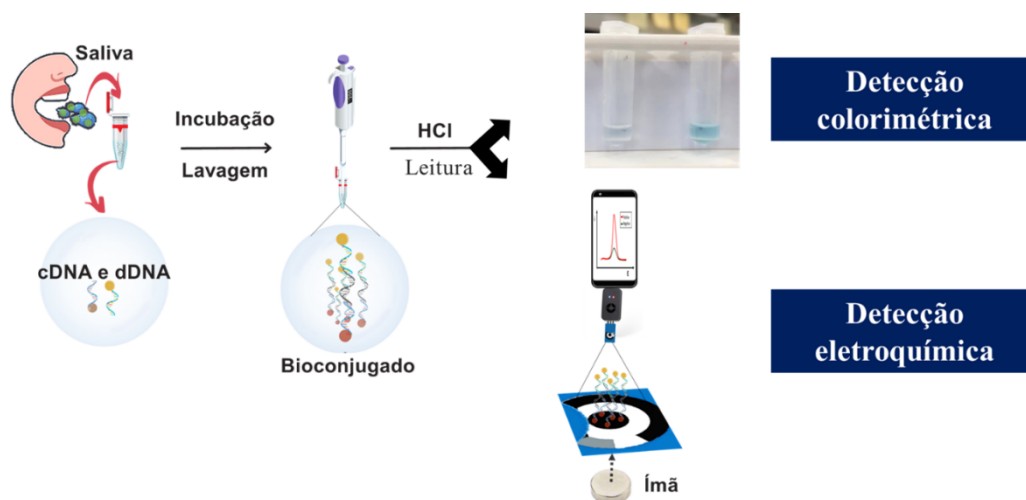


FIGURA 3.3.1-Representação esquemática das etapas básicas envolvidas nos ensaios genômicos desenvolvidos.

3.4 - Sequências de ssDNA sintéticos utilizadas neste estudo

No desenvolvimento do ensaio genômico, foram avaliadas regiões diferentes do gene do vírus SARS-CoV-2, baseadas na fosfoproteína do nucleocapsídeo (N), denominados região 1A. Estas também foram utilizadas para o diagnóstico da COVID-19 via técnica de RT-PCR, por serem específicas para vírus SARS-CoV-2.

Foram sintetizadas sequências de oligonucleotídeos, complementares as sequências alvo do RNA viral, denominadas sondas de DNA para captura, cDNA, e sondas de DNA para detecção, dDNA. A sequência de ssDNA utilizada como padrão, com sequência similar a região alvo do RNA viral, foi obtido da *Exxtend* Biotecnologia (Brasil) e as sondas de captura e detecção foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA). As sondas contêm em suas extremidades um espaçador C6 sendo utilizado um grupo terminal amino ou tiol, utilizado para o ancoramento dessas sondas com as nanopartículas de interesse, por meio de ligação covalente, ou do grupo biotina, no caso do método colorimétrico.

As soluções contendo as sequências de DNA sintético foram preparadas conforme as orientações do fabricante sendo aliquotadas e estocadas em temperatura de -20°C na concentração estoque de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, até a utilização.

3.4.1 - Oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do método colorimétrico

Neste estudo foi utilizado um oligonucleotídeo de sequência similar à sequência alvo do RNA do vírus SARS-CoV-2 (1A), sequência de DNA para a captura de cada segmento do RNA alvo, além da sequência de DNA para a etapa de detecção, conforme representado na TABELA 3.4.1

Oligonucleotídeo	Sequência	Modificador
Sonda de Captura 1A	[AmC6] 5' TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG 3'	Amina Primária
Sequência alvo 1A para o gene N de SARS-CoV-2 dDNA	5' TGA TAA TGG ACC CCA AAA TCA GCG AAA TGC ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC CTC AGA TTC AAC TGG CAG TAA CCA GA 3'	-
Sonda de Detecção 1A	5' GGG TCC ACC AAA CGT AAT GC 3' [BtnTg]	Biotina

TABELA 3.4.1- Sequência de bases das ssDNA utilizadas como sondas de captura modificadas com espaçador e amina primária, sonda de detecção modificadas com biotina e alvo utilizados no método colorimétrico.

O cDNA foi ancorado em partículas magnéticas via reação de acoplamento com uso de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinamida (NHS), descritos em mais detalhes nos itens 3.5.1 -e 3.5.2 - respectivamente. O dDNA biotinilado e o conjugado MP-cDNA foram adicionados na solução da amostra promovendo a etapa de hibridização, em seguida as etapas de captura e separação do RNA viral de amostras de saliva e posteriormente a detecção via oxidação do TMB produzindo uma coloração azul,

após este tempo, foi adicionado 50 uL de solução HCl 0,2M interrompendo a reação enzimática via desnaturação da enzima HRP e modificando a cor para amarelo, que sinaliza o final da reação.

3.4.2 - Oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do método eletroquímico

Devido à presença do grupamento amina nas bases nitrogenadas: adenina, guanina e citosina, a imobilização covalente das sequências de DNA contendo grupo terminal amino nas partículas utilizando-se de reações de amidação via EDC/NHS, pode não levar a uma orientação preferencial. Para atingir esse objetivo e garantir uma orientação preferencial na imobilização entre o cDNA e as partículas magnéticas, optamos por incorporar o modificador tiol nesta abordagem. A inclusão do modificador tiol se mostrou crucial, uma vez que sua presença permite um maior controle no processo de imobilização nas AuNPs, promovendo maior efetividade quanto ao número de sondas em orientação preferencial disponíveis para hibridização com o alvo. As sequências utilizadas podem ser observadas com detalhes na TABELA 3.4.2, na qual [ThiC6] se refere ao espaçador ligado ao modificador tiol e os números 5' e 3' presentes nas extremidades do DNA, se referem aos grupos fosfato e hidroxila ligados aos carbonos 5 e 3 da pentose respectivamente¹¹⁵.

Oligonucleotídeo	Sequência	Modificador
Sonda de Captura 1A cDNA	[ThiC6] 5' GTC TAA GTT GAC CGT CAT TGG TCT 3'	Tiol
Sequência alvo 1A para o gene N de SARS-CoV-2	5' TGA TAA TGG ACC CCA AAA TCA GCG AAA TGC ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC CTC AGA TTC AAC TGG CAG TAA CCA GA 3'	-
Sonda de Detecção	5' GGG TCC ACC AAA CGT AAT	Tiol

dDNA	GC[ThiC6] 3'	
------	--------------	--

TABELA 3.4.2- Sequência de bases dos ssDNA nos alvos, sondas de captura e detecção para o método eletroquímico

3.5 - Partículas magnéticas (PMs)

3.5.1 - Imobilização do cDNA nas partículas magnéticas - método colorimétrico

PMs com tamanho aproximado de 1 μm (Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid, Invitrogen) contendo grupos carboxílicos foram utilizadas para ancorar as cDNA. A representação das etapas envolvidas na modificação das PMs é apresentada na FIGURA 3.5.1 e foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante com algumas adaptações. Esta modificação se inicia pela agitação do frasco contendo as PMs por 15 minutos em agitador na velocidade de 1000 rpm. Após, 100 μL de PMs comerciais (1,0 mm de diâmetro) foram dispersas em 1 mL de tampão MES 100 mmol L^{-1} pH 4,8 e com o auxílio de um suporte magnético foram separadas e seguida por nova etapa de lavagem com o mesmo tampão. Depois da remoção do sobrenadante, foram adicionados às PMs 1 mL de uma solução de cDNA 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparada em uma solução mista de EDC 10 mg mL^{-1} e NHS 2,5 mg mL^{-1} dissolvidos em água ultrapura. As PMs foram deixadas em agitação suave por cerca de 15 h à temperatura ambiente ^{59,116,117}.

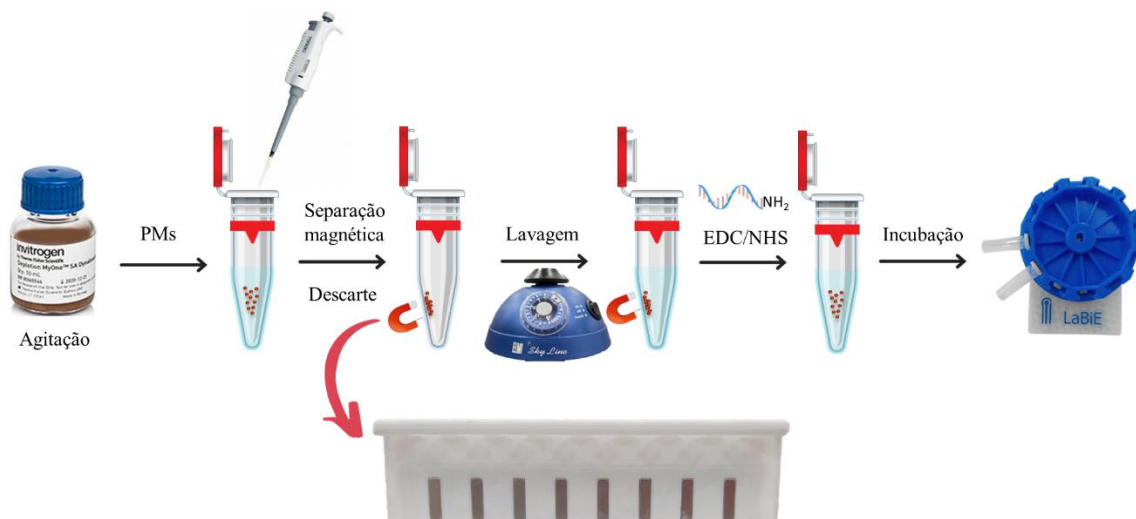


FIGURA 3.5.1- Representação das etapas de preparação e modificação das PMs com cDNA para o método colorimétrico.

Após esse tempo, o cDNA foi covalentemente ancorado as MPs via o grupamento amina presente nas sondas. O conjugado obtido foi separado magneticamente sendo o sobrenadante removido e lavado três vezes com tampão Tris 10 mmol L^{-1} , EDTA 1 mmol L^{-1} , Tween 20 0,05% (TE-TW).

Devido à grande área superficial das PMs, se faz necessário promover o bloqueio dos sítios ativos livres presentes na superfície da partícula a fim de evitar interações não específicas com o material genético na etapa de hibridização. O procedimento é descrito na FIGURA 3.5.2, para isto, foram realizadas três etapas de bloqueio de 30 minutos em agitação lenta, adicionando 1mL de solução de etanolamina 1 mol L^{-1} e lavado 3 vezes com tampão TE-TW após cada bloqueio. O conjugado obtido foi redisperso em 1 mL de tampão TE-TW e foi mantido sob refrigeração por até 3 semanas.

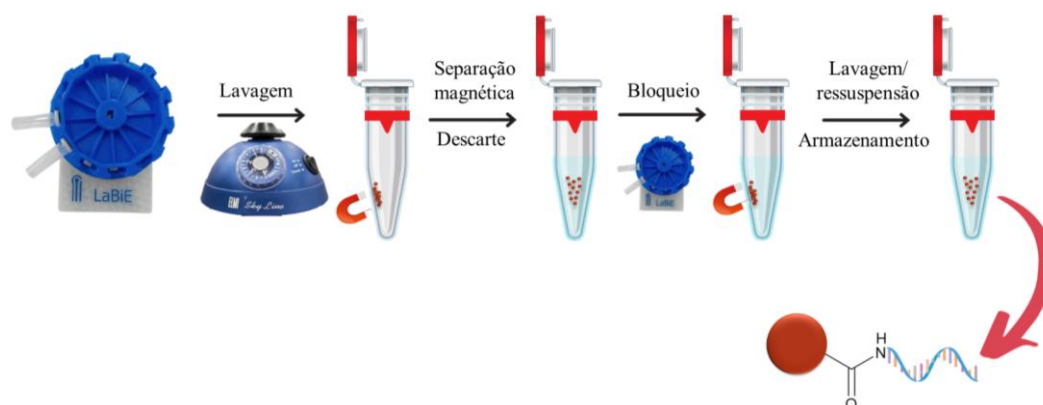


FIGURA 3.5.2- Representação da etapa de bloqueio das partículas magnéticas utilizados no método colorimétrico

3.5.2 - Imobilização do cDNA nas partículas magnéticas para o método eletroquímico

A imobilização das cDNA nas PMs foi realizada levando em conta o protocolo fornecido pelo fabricante com algumas adaptações. Esta, inicia-se pela agitação do frasco contendo as PMs por 15 minutos em agitador na velocidade de 1000 rpm. Após isto, as PMs foram dispersas em 1,0 mL de tampão MES (Ácido 2-morfolinoetanossulfônico, 100 mmol L^{-1}) pH 4.8 e, com o auxílio de um suporte magnético, separadas por 2 minutos seguido por nova etapa de lavagem com o mesmo tampão. Depois da remoção do sobrenadante, foi adicionado às PMs 1,0 mL de uma solução mista de EDC 10 mg mL^{-1} e NHS $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ dissolvidos em água ultrapura. A mistura foi agitada suavemente por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, as PMs foram lavadas três vezes com tampão Tris-EDTA 100 mmol L^{-1} pH 8 contendo 0,05% de Tween-20 (TE-TW) com cada lavagem durando 2 minutos. Após as lavagens, 5 mg de 1-2(-aminoetil) maleimida dissolvida em 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a dispersão contendo as PMs conjugadas com cDNA, seguido de 900 μL de tampão TE-TW e foram então agitadas suavemente durante 14 horas à $25 \text{ }^{\circ}\text{C}^{118-120}$. Após nova etapa de lavagem, foi realizado o bloqueio dos sítios ativos livres presentes na superfície da partícula magnética a fim de evitar interações não específicas. A

FIGURA 3.5.3 ilustra as etapas envolvidas na modificação, para isto, foram realizadas três etapas de 30 minutos em agitação lenta, adicionando 1mL de solução de etanolamina 1 mol L⁻¹ e lavado 3 vezes com tampão TE-TW após cada bloqueio. Em seguida, foi adicionado 10 µL da solução contendo 100 µM de cDNA sendo mantido em agitação suave e temperatura ambiente por 8 horas. Após a etapa de lavagem, o conjugado obtido foi redisperso em 1 mL de tampão TE-TW e mantido sob refrigeração.

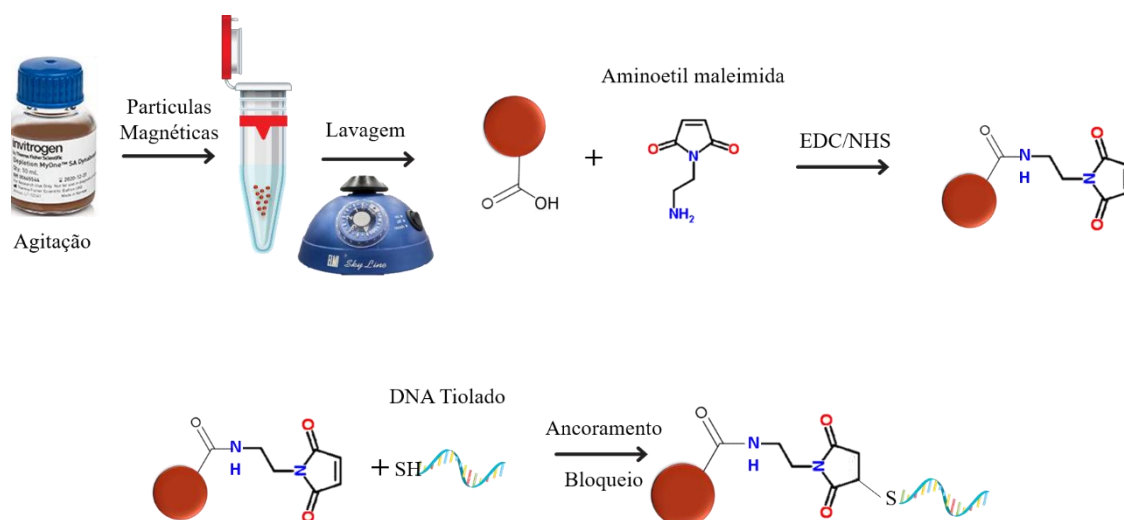


FIGURA 3.5.3- Etapas realizadas para imobilização da maleimida e posteriormente do cDNA tiolado nas partículas magnéticas.

3.6 - Síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs)

As AuNPs foram sintetizadas conforme o procedimento proposto por Turkevich et al.¹²¹ em que o citrato teve a função de agente redutor além de fornecer carga negativa para a superfície das AuNPs, atuando como estabilizante e prevenindo que as partículas se aglomerem. Inicialmente, um volume de 200 mL de HAuCl₄·3H₂O 0,01 % m/v preparado em água ultrapura foi aquecido sob agitação vigorosa até a ebulição. Posteriormente, 5,0 mL de uma solução de citrato de sódio 40,0 mmol L⁻¹ foi adicionado rapidamente à solução, e a mistura foi agitada até a mudança de coloração para vermelho como pode ser observado na FIGURA 3.6.1. A agitação foi mantida sem aquecimento até a dispersão atingir

a temperatura ambiente¹²¹. As AuNPs sintetizadas foram protegidas da luz e armazenadas sob refrigeração.



FIGURA 3.6.1-Foto da síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato em ebulição.

3.6.1 - Imobilização do dDNA nas AuNPs

Devido a aglomerações entre as nanopartículas de ouro em meio salino, o tampão citrato precisou ser substituído. Para a modificação foi adotado o seguinte protocolo: em um tubo livre de DNA/RNA, foi adicionado 990 μL da dispersão de AuNPs, então foi adicionado 10 μL de uma solução de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sonda de detecção, resultando em uma solução de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dDNA-SH. Em seguida foi mantido sob agitação suave durante 15 horas e após centrifugação redisperso em tampão fosfato pH 7,4¹²². O procedimento está ilustrado na FIGURA 3.6.2 e bioconjugado formado foi armazenado protegido da luz na temperatura de 4 °C.

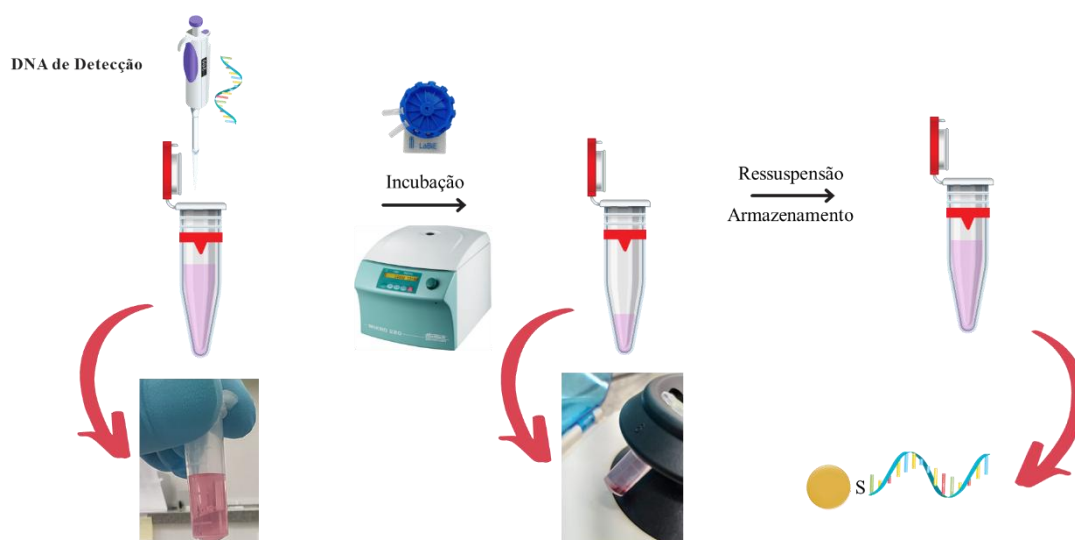


FIGURA 3.6.2- Representação esquemática representando as etapas envolvidas na imobilização do dDNA nas AuNPs.

3.7 - Fabricação dos dispositivos eletroquímicos descartáveis

3.7.1 - Definição dos eletrodos e serigrafia

A fim de otimizar os estudos e permitir a detecção de mais de uma amostra simultaneamente, foi desenhado um arranjo de eletrodos. Para isto uma máscara com o desenho dos eletrodos foi desenvolvida utilizando um vinil adesivo e um equipamento de corte a laser foi utilizado para promover o recorte levando ao negativo dos eletrodos para posterior serigrafia. Após o recorte foi realizada a retirada das partes não necessárias e utilizado o vinil como molde para a serigrafia. Para isto, os eletrodos foram desenhados e o arquivo exportado no formato do software LightBurn, após o ajuste dos parâmetros de velocidade e profundidade do corte com o laser, o adesivo vinílico foi recortado com o desenho dos eletrodos. Após a remoção das partes indesejadas, o vinil foi aderido diretamente sobre um substrato de PVC e utilizado como máscara negativa para deposição da tinta condutora de carbono. Depois desta etapa, a cura da tinta foi realizada por meio de tratamento térmico à 60 °C por 60 min. A representação esquemática do procedimento completo para fabricação dos eletrodos está demonstrada na FIGURA 3.7.1

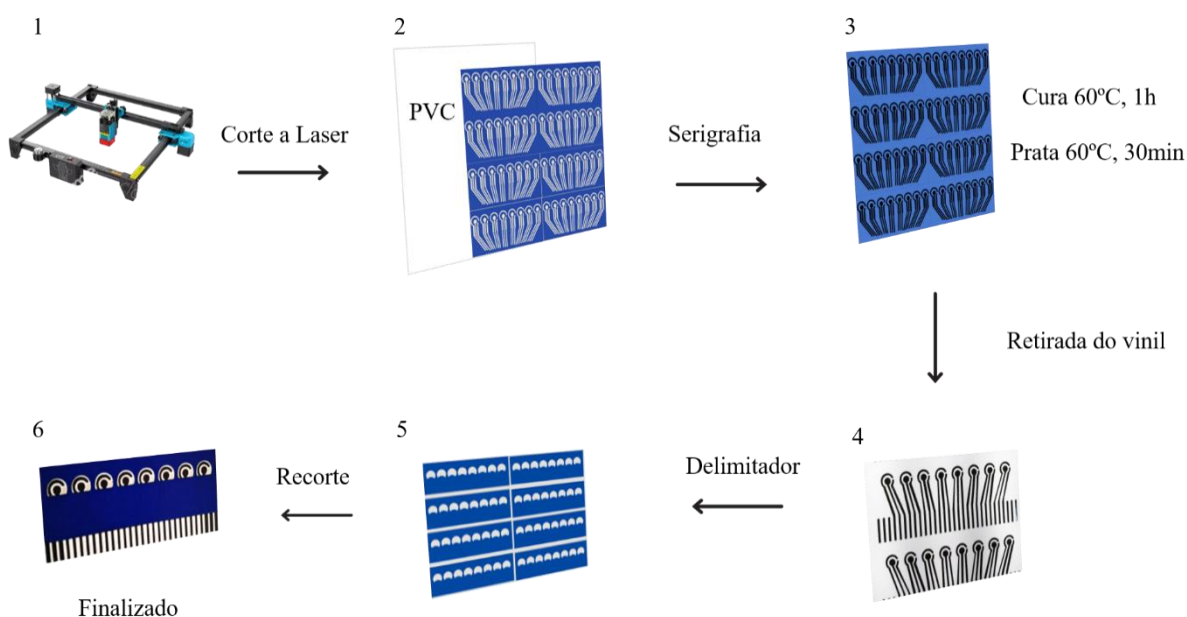


FIGURA 3.7.1-Etapas para construção dos dispositivos. 1) Corte do vinil adesivo, 2) Transferência do vinil ao suporte de PVC, 3) Aplicação da tinta condutora, 4) Cura da tinta e remoção da máscara, 5) Delimitação da área eletroativa, 6) Dispositivo pronto com 8 células individuais.

No que diz respeito ao eletrodo de referência, uma vez concluído o processo de deposição e cura da tinta de carbono, procedeu-se à aplicação de tinta de Ag/AgCl sobre a superfície previamente preparada com a tinta de carbono. Essa etapa foi seguida por um ciclo de cura de 30 minutos, mantendo a temperatura constante a 60 °C. Em seguida foi realizada a retirada do adesivo vinílico, e adicionado um delimitador de área para cada eletrodo no arranjo de 8 células independentes. Após isto, seguiu-se com uma etapa de prensagem por 200 segundos a uma temperatura de 120° C finalizando a construção do dispositivo^{58,113,117,123}.

Além disso, utilizando técnica de impressão 3D foram fabricados suportes magnéticos com ímãs de neodímio ajustados ao tamanho dos eletrodos de trabalho, a fim de atrair o bioconjugado à superfície do eletrodo para a etapa de detecção conforme representação apresentada na FIGURA 3.7.2.

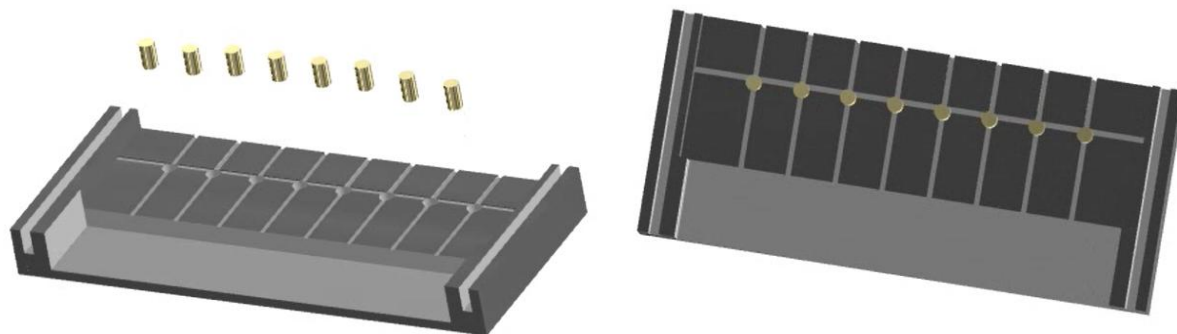


FIGURA 3.7.2-Suporte magnético fabricado com impressora 3D.

3.8 - Estratégias utilizadas para a detecção do material genético

3.8.1 - Etapas envolvidas no método colorimétrico

O ensaio genomagnético colorimétrico desenvolvido envolve 3 etapas. Uma vez preparadas as PMs com dDNA, estas são adicionadas à amostra juntamente com a dDNA contendo a biotina e após a etapa de hibridização por 30 minutos é realizada a lavagem e ressuspensão do bioconjugado obtido. A próxima etapa envolve a adição do conjugado Streptavidina-HRP seguida de incubação também por 30 minutos. Após a lavagem é realizada a adição do agente cromóforo TMB a fim de promover a mudança de coloração para azul, no caso do resultado ser positivo. A detecção ocorre após adição de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com o intuito de finalizar a reação do TMB com o peróxido de hidrogênio e o oxigênio presente no ar. A FIGURA 3.8.1 apresenta uma ilustração resumido as etapas envolvidas.

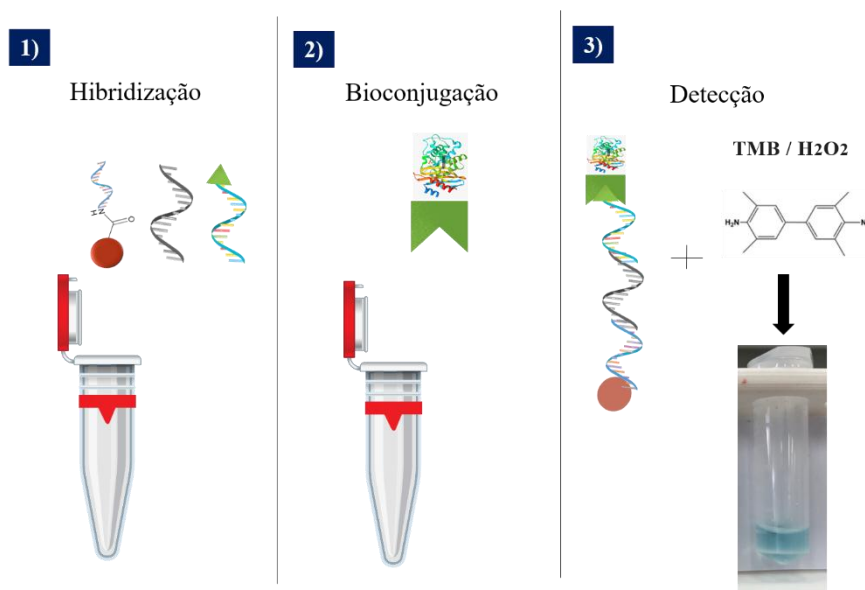


FIGURA 3.8.1- Ilustração das etapas envolvidas no método genomagnético com detecção colorimétrica.

3.8.2 - Etapas envolvidas no método genomagnético com detecção eletroquímica

Na FIGURA 3.8.2 são apresentadas as etapas envolvidas no método com detecção eletroquímica. Neste caso, o método depende da fabricação dos eletrodos descartáveis, do preparo das PMs modificadas com dDNA e das AuNPs com dDNA para captura e detecção, respectivamente. Para a aplicação do teste as PMs-cDNA e AuNPs-dDNA foram adicionadas a amostra de saliva e incubados por tempo a ser definido, a fim de promover a hibridização com o RNA alvo. Desta forma, uma vez o alvo capturado e separado, a detecção pode ser realizada em somente uma célula eletroquímica a partir de uso de um mini potenciostato acoplado a um celular, ou a partir de um multipotenciostato possibilitando a medição de um arranjo com 8 células independentes. A detecção neste caso, ocorre via propriedades eletroquímicas das AuNPs.

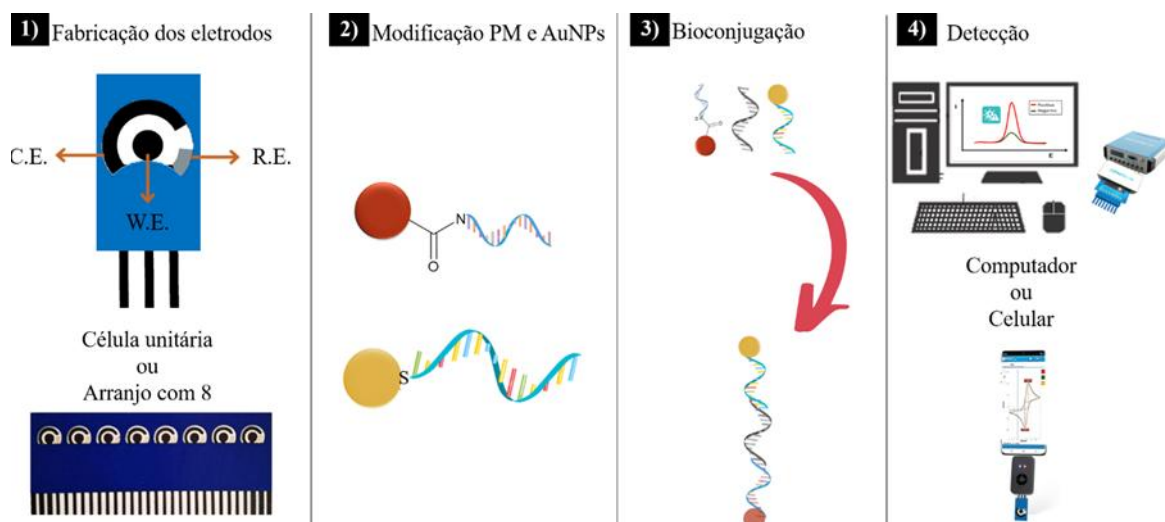


FIGURA 3.8.2- Ilustração das etapas envolvidas no método genômico com detecção eletroquímica.

3.8.3 - Reações na detecção eletroquímica

A detecção eletroquímica foi iniciada adicionando o bioconjugado contendo o alvo capturado sobre a superfície do eletrodo de trabalho sem modificação. As MPs contendo o alvo são atraídas e retidas na superfície do eletrodo pelos ímãs presentes no suporte 3D. Em seguida, é adicionada solução de HCl na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e a detecção se dá realizada via a aplicação de um potencial de $+1,25 \text{ V}$ por um período de 120 segundos seguida de varredura para potenciais mais negativos. Desta forma, ocorre inicialmente a oxidação do ouro presente nas AuNP levando a formação do complexo tetracloroaurato (III). Imediatamente após a etapa de oxidação é feita a etapa de redução do complexo formado, resultando em um sinal analítico proporcional a quantidade de material genético capturada durante o ensaio. As reações envolvidas no processo podem ser observadas na FIGURA 3.8.3.

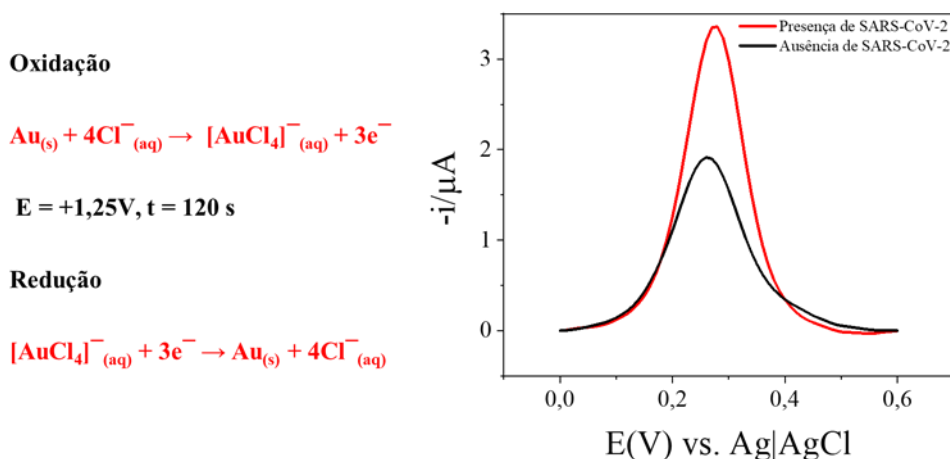


FIGURA 3.8.3- Reações de oxidação e redução das nanopartículas de ouro e representação da resposta de corrente obtida utilizada para a detecção quantitativa do RNA viral em amostras de saliva.

4 - Resultados e discussão

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos, divididos em diferentes itens e subitens, de acordo com os experimentos realizados para cada um dos dois métodos propostos.

4.1 - Caracterizações

4.1.1 - Caracterização do ensaio genômico com detecção eletroquímica

Inicialmente realizou-se a construção dos eletrodos e caracterização eletroquímica destes conforme descrito no item 3.1. Para isto foram realizados experimentos utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC) variando a velocidade de varredura entre 10 a 300 mV s^{-1} realizadas em meio de 1 mmol L^{-1} de ácido ferroceno monocarboxílico (AFM) em 0,5 mol L^{-1} de KCl em pH 8,0 como eletrólito de suporte. Na FIGURA 4.1.1 são apresentados os voltamogramas cíclicos (VCs) registrados e os valores de corrente de pico anódico obtidos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura no qual observa-se uma

relação linear, que pode ser representada pela equação: $i_p (\mu\text{A}) = -0,617 + 1,216x$ com coeficiente de correlação (R^2) de 0,993.

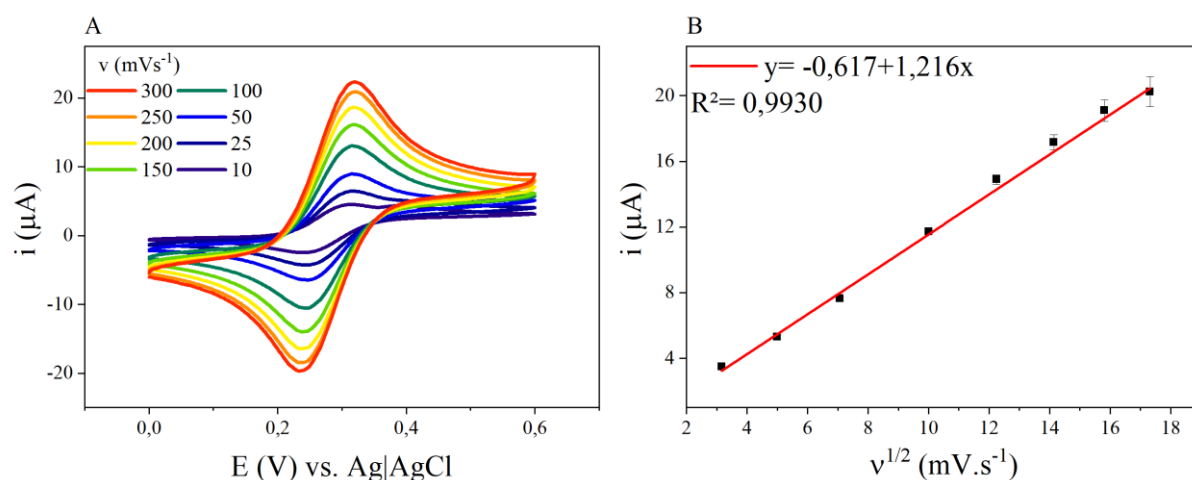


FIGURA 4.1.1- A) Voltamogramas obtidos com os eletrodos descartáveis em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AFM em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com velocidades de varredura variando de 10 mV s^{-1} a 300 mV s^{-1} . B) Valores de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

A diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico foi em média de $77,5 \text{ mV}$ sendo este valor superior ao valor de 59 mV esperado para processos reversíveis. Contudo, o comportamento observado pode estar relacionado influência de diferentes fatores, como o parâmetro alfa que se refere ao ponto de coleta da corrente durante a voltametria *stair-case*, e parâmetros como a resistividade da tinta de carbono que se reflete na diferença nos potenciais de pico¹²⁴.

A razão das correntes de pico anódico e catódico (I_{pa}/I_{pc}) em cada velocidade de varredura avaliada foi próxima de 1, indicando que o AFM apresentou processo redox com característica reversível do dispositivo construído. Baseando-se na equação de Randles-Sevcik, os resultados obtidos demonstram que o processo de transferência de massa ocorre por controle difusional¹²⁵.

Os resultados obtidos indicam que o dispositivo construído apresentou um comportamento eletroquímico similar a outros relatados na literatura e baseados

no uso de tinta de carbono, apontando o potencial de aplicação deste para a realização dos estudos voltados para a detecção dos transcritos virais de SARS-CoV-2.

4.1.2 - Espectrofotometria na região do UV-Visível do dDNA, AuNPs e conjugado AuNP-dDNA

Para monitorar a conjugação entre o dDNA e as AuNPs, realizou-se análises por Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, registrando os espectros de absorção tanto do dDNA quanto das AuNPs antes e depois do processo de conjugação. Analisando a FIGURA 4.1.2, na curva em preto pode-se observar o surgimento de uma banda de absorção com pico na região dos 520 nm, característica das AuNPs¹²⁶. Em verde, aparece uma banda com pico em aproximadamente 255 nm, característica dos oligonucleotídeos, atribuída à absorção típica de DNAs e RNAs.

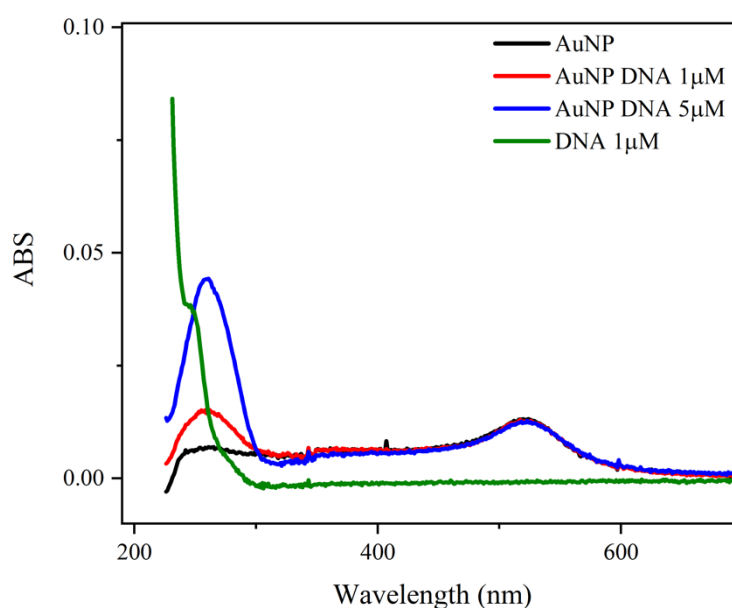


FIGURA 4.1.2- Espectros de absorção na região do UV-Vis das AuNPs, dDNA e AuNPs-dDNA na diluição de 1/10 e concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As curvas em vermelho e azul, da figura, são os espectros das AuNPs após a conjugação com o dDNA, em diferentes concentrações, evidenciando modificações no perfil de absorção, o que sugere a imobilização do ssDNA ocorreu sobre as nanopartículas. Para evitar saturação do sinal, todos os espectros

foram obtidos utilizando uma diluição de 1/10, pois as AuNPs puras apresentavam espectros com valores muito altos de absorbância.

4.1.3 - Caracterização das partículas

A caracterização das AuNPs foi realizada com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) cujos resultados podem ser observados na FIGURA 4.1.3, em diferentes ampliações. Pode-se observar que as AuNPs apresentam morfologia esférica e distribuição normal com diâmetro médio das partículas de 13 nm.

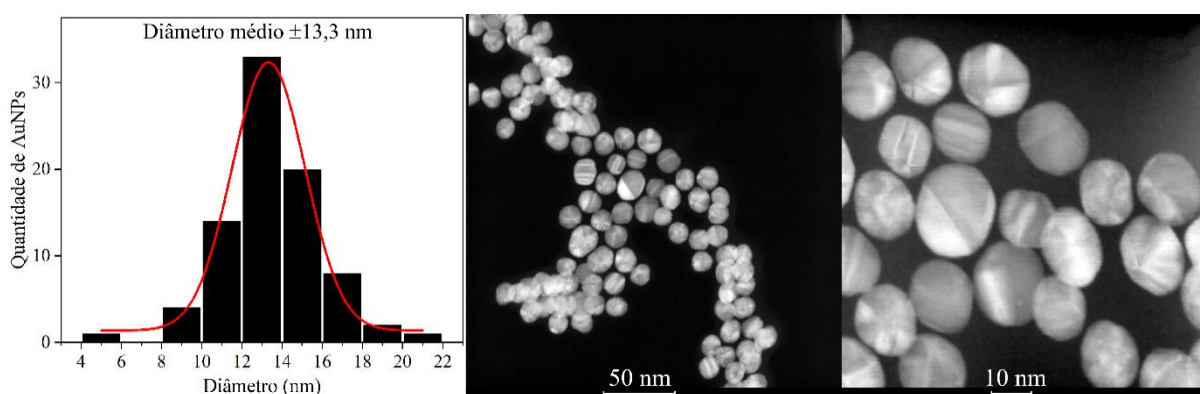


FIGURA 4.1.3- Distribuição normal referente ao diâmetro das AuNPs obtida por meio das imagens obtidas de MET.

Também foi possível realizar caracterizações das MPs conjugadas com cDNA que foram aplicadas juntamente com as AuNP-dDNA para captura e separação do DNA alvo por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtida em diferentes ampliações com a escala de 50 e 20 μm respectivamente.

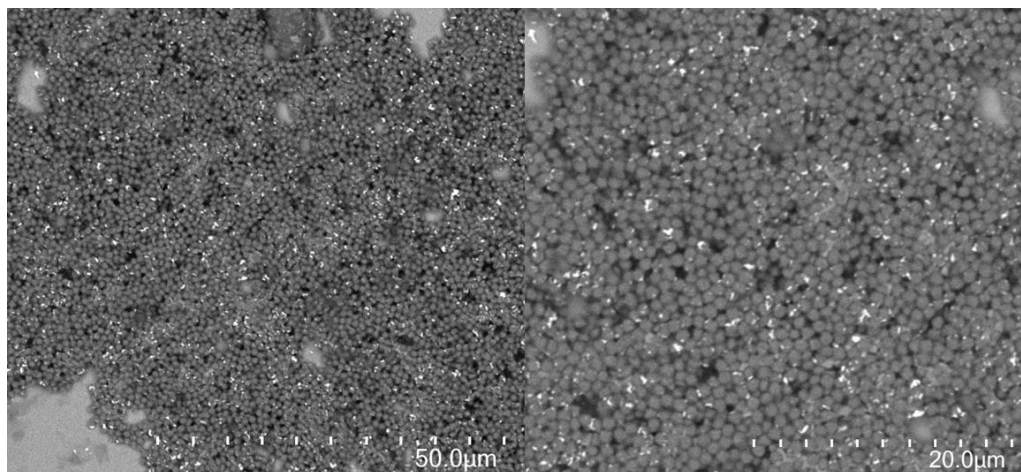


FIGURA 4.1.4- Imagens do biconjugado formado por MP-cDNA-DNAalvo-dDNA-AuNPs em diferentes ampliações obtidas por microscopia eletrônica de varredura

Na FIGURA 4.1.4 é possível observar pequenas partículas acinzentadas e de morfologia esférica. Estas esferas observadas na imagem são indicativas da presença das partículas magnéticas presentes no bioconjugado. Em conjunto com a imagem foi realizado também a obtenção dos espectros de Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) do ensaio completo, contendo o branco analítico e duas concentrações afim de verificar a alteração nas quantidades do biomarcador eletroquímico, as AuNPs, nas diferentes amostras. A FIGURA 4.1.5 apresenta os resultados na forma de gráfico de barras com a percentagem de ouro encontrados nos diferentes conjugados. Nesta é possível observar que a quantidade de ouro presente na amostra aumenta de acordo com o aumento da concentração. Isto pode ser uma evidência de que a etapa de bioconjugação foi bem-sucedida, bem como que o ensaio genomagnético é viável. A presença de ouro na solução do branco, indica que há uma absorção não específica, sistematicamente observada quando se trabalha com as MPs para detecção de biomarcadores, sendo este efeito verificado em outros trabalhos do grupo.

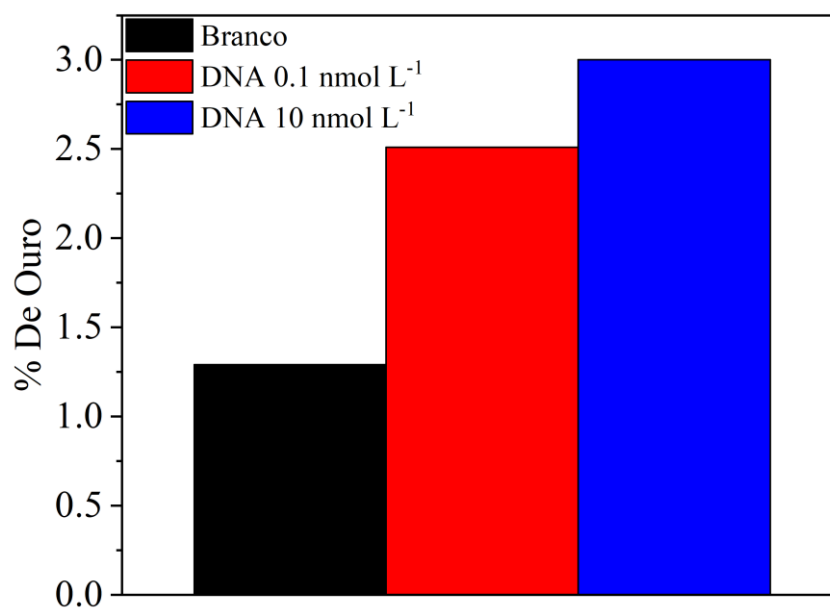


FIGURA 4.1.5- Porcentagem de ouro obtidos por EDS dos bioconjugados MP-cDNA-DNAalvo-dDNA-AuNPs quando o método foi aplicado em solução do branco e em diferentes concentrações de DNA alvo

4.2 - Aplicação do ensaio genômico com detecção colorimétrica em amostras fortificadas

Para a realização deste ensaio, utilizou-se 180 μL de saliva de indivíduo saudável fortificada com o ssDNA, com sequência similar ao do RNA alvo, 20 μL de cada um dos conjugados PM-cDNA e dDNA-AuNPs descritos com detalhes no item 3.5.1 -. Após as etapas de incubação e lavagem, foi adicionado o reagente TMB promovendo o aparecimento da coloração indicativo de diagnóstico positivo. A FIGURA 4.2.1 mostra os resultados qualitativos, onde amostras de saliva sem ssDNA (tubo esquerdo) são incolores, enquanto em amostras fortificadas com ssDNA (tubo direito) ocorre a mudança de coloração para azul.

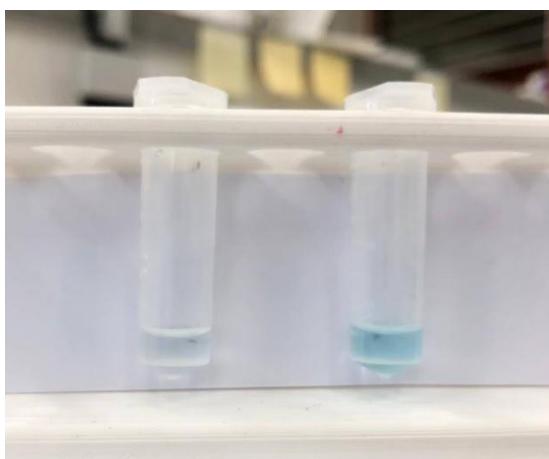


FIGURA 4.2.1- Aplicação do teste genômico em amostras de saliva de indivíduo saudável com e sem a fortificação de ssDNA alvo, demonstrando a diferença de cor entre um teste negativo incolor e o positivo em azul.

A fim de avaliar a resposta quantitativa do método e avaliar a faixa de concentração de trabalho foram utilizadas amostras de saliva fortificadas com diferentes quantidades de ssDNA. A FIGURA 4.2.2A apresenta os espectros obtidos, com banda de absorção máxima em torno de 450 nm, nos quais podem ser observado o aumento da absorbância quando a concentração de ssDNA aumentou de 4,5 para 45.000,0 pmol L^{-1} . Conforme demonstrado na FIGURA 4.2.2B, o ensaio apresentou uma excelente correlação linear entre a absorbância e o log da concentração de ssDNA que pode ser representada pela expressão ABS

$= -0,0101 + 0,0583 \log [\text{RNA alvo}]$ (pmol L^{-1}), com um coeficiente de correlação de 0,994. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram $0,92 \text{ pmol L}^{-1}$ e $2,80 \text{ pmol L}^{-1}$, respectivamente.

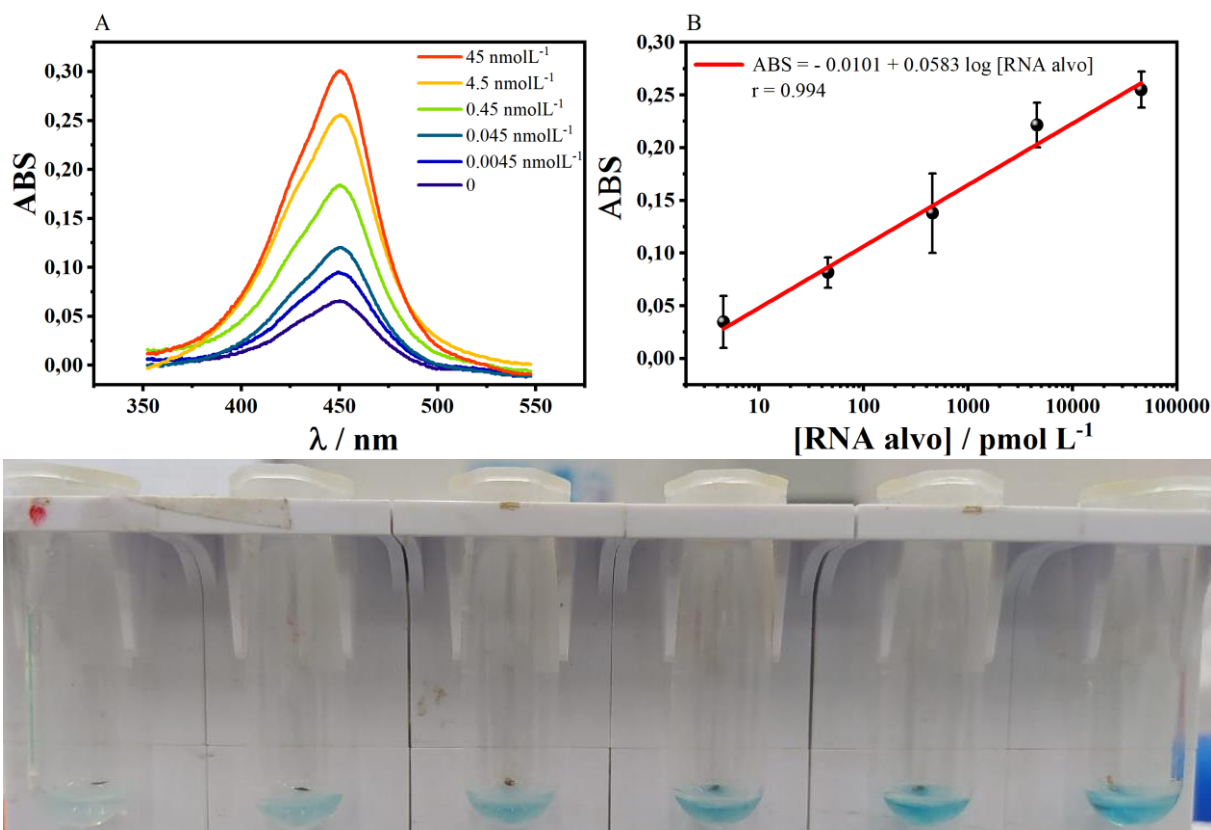


FIGURA 4.2.2- A) Espectros de absorção no UV-Visível obtidos pela aplicação do ensaio genomagnético em amostras fortificadas com diferentes concentrações de ssDNA utilizadas como alvo. B) Curva de calibração obtida para a detecção de ssDNA. $n = 3$. C) Soluções coloridas obtidas quando da aplicação do método nas amostras fortificadas antes da adição da solução de HCl (o ponto escuro dos tubos são os conjugados de MPs aderidos a parede do tubo devido ao campo magnético gerado pelos ímãs presentes no suporte).

4.3 - Otimizações dos parâmetros do ensaio genomagnético com detecção colorimétrica

O método proposto possui um número significativo de variáveis e ao longo dos anos nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com uso de MPs no desenvolvimento de métodos para detecção de biomarcadores. Desta forma, alguns parâmetros utilizados aqui foram baseados na experiência prévia do grupo com as partículas magnéticas, as diferentes soluções-tampão e alguns parâmetros

de protocolos já bem estabelecidos, bem como com parâmetros comumente utilizados em laboratórios de análises clínicas e das áreas afins muitas vezes recomendações de grupos de pesquisa parceiros destas áreas.

Neste sentido, a fim de buscar as melhores condições para o ensaio e obtenção do sinal analítico, algumas otimizações foram realizadas, como os parâmetros para a incubação das PMs com cDNA em diferentes soluções tampão, bloqueio das PM-cDNA, composição das soluções de tampão de incubação, lavagem e condição de hibridização foram avaliados.

4.3.1 - Tampões de imobilização dos cDNAs nas PMs

Uma etapa anterior a aplicação do ensaio, envolve a conjugação das PMs com a sonda de DNA de captura. Nessa etapa ocorre a ligação covalente do modificador via grupo amina primária proveniente do cDNA com os grupos carboxilas presentes na superfície das PMs, por meio dos agentes de acoplamento EDC/NHS. Inicialmente, avaliou-se a modificação das PMs com cDNA com a sonda diluída em diferentes meios, sendo estes água, tampão Tris, MES e TE. A recomendação do fornecedor das sondas era para promover a diluição em tampão TE^{127,128}. Entretanto, o tris(hidroximetil) aminometano, que é um dos componentes majoritários do tampão, possui um grupo amina primária que pode vir a se ligar com os grupos carboxilas das PMs, competindo com o modificador da cDNA. Por esse motivo, outros solventes foram avaliados para serem utilizados na reação de acoplamento. A FIGURA 4.3.1 apresenta os resultados das curvas analíticas obtidas com o ensaio genômico para o alvo ssDNA, similar ao RNA 1A do vírus, com a imobilização das PMs-cDNA em diferentes meios.

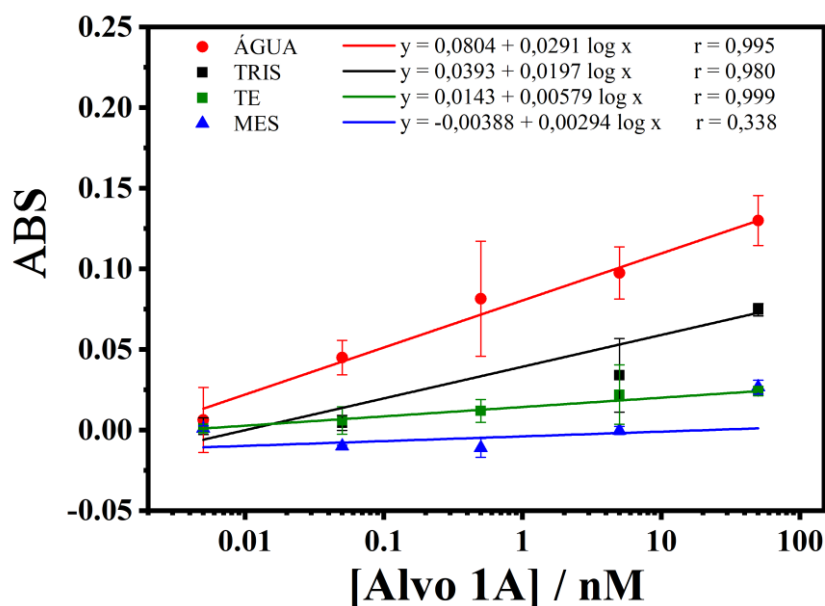


FIGURA 4.3.1- Curvas analíticas do ensaio genômico para a detecção do ssDNA com sequência idêntica à do RNA 1A utilizando diferentes tampões para a conjugação das PMs-cDNA

Nota-se uma maior sensibilidade da curva analítica obtida para o alvo quando se utiliza as PMs-cDNA preparadas com água. Já as curvas obtidas com a preparação do conjugado PMs-DNA em soluções tampão Tris e TE observa-se uma menor sensibilidade, o que pode estar relacionado com uma menor quantidade de ligações entre as cDNAs com PMs devido a competição com as moléculas de tris(hidroximetil) aminometano presentes nas soluções tampão. Se uma menor quantidade de cDNA foi conjugada as PMs, conseqüentemente, uma menor quantidade de RNA alvo hibridizará, levando a um menor sinal analítico. Apesar do MES (ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico) ser um tampão usualmente apropriado para as ligações de acoplamento com EDC, já que é desprovido de grupos aminas e carboxilas, este não demonstrou efeito satisfatório, gerando um resultado inconsistente com o esperado. Deste modo, a água foi escolhida como solvente para diluição dos agentes de acoplamento EDC/NHS e imobilização do cDNA nas PMs.

4.3.2 - Bloqueio das PMs realizada após a conjugação com cDNA

Também foi avaliado o bloqueio das PMs após conjugação com as cDNA utilizando para isto etanolamina e tampão TT (250 mmol L⁻¹ Tris pH 8 + 0,01 % Tween 20). O objetivo desta etapa é bloquear os sítios de ligações livres e assim evitar interações não específicas. Etanolamina e Tris são, geralmente, as principais escolhas como agentes de bloqueio pois contêm grupos hidroxila hidrofílicos sem a presença de grupos funcionais carregados (Thermo Scientific, 2011). A FIGURA 4.3.2 apresenta os resultados das curvas analíticas obtidas com o ensaio genômico para o alvo ssDNA usando as PMs-cDNA bloqueadas com etanolamina e tampão TT.

Observa-se uma maior sensibilidade da curva analítica obtida para o alvo 1A quando se utiliza as PMs-cDNA bloqueadas com tampão TT quando comparado com o bloqueio com a solução de etanolamina. Este resultado está de acordo com a recomendação do fabricante das PMs (Invitrogen, 2013) e a condição de bloqueio com TT foi então utilizada nos demais experimentos.

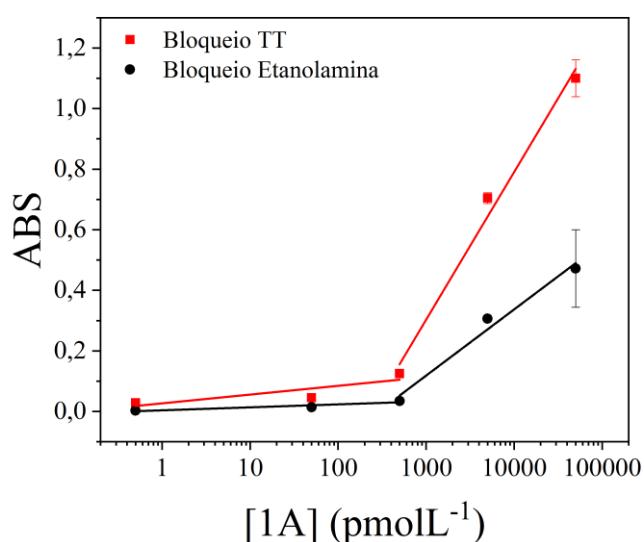


FIGURA 4.3.2- Concentrações avaliadas no ensaio genômico para o RNA alvo 1A utilizando PMs-cDNA bloqueadas com etanolamina e tampão TT.

4.3.3 - Composição do tampão de hibridização

A composição do tampão de hibridização é crítica para controlar a eficiência do processo de hibridização. Os fatores que influenciam a hibridização das sondas com o RNA alvo formando o híbrido RNA/DNA são temperatura, pH, concentração de sais e presença de solventes orgânicos¹²⁹. Durante a primeira etapa de incubação, para hibridização das sondas com o alvo ssDNA utilizou-se o tampão NE10X (pH 7.9, 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol L⁻¹ DTT).

Muitos protocolos de biologia molecular usam tampões baseados em Tris. Este tem boa capacidade de tamponamento na faixa de pH biologicamente relevante (em torno do pKa do Tris, 8,1 a 25 °C) e não afeta significativamente a hibridização^{130,131}. Como os ácidos nucleicos são moléculas polianiónicas altamente carregadas, a presença de íons metálicos em soluções, como os íons Na⁺ e Mg²⁺, neutralizam as cargas negativas e blindam a repulsão eletrostática, o que aumenta a flexibilidade dos ácidos nucleicos e, conseqüentemente, auxilia no processo de hibridização¹³²⁻¹³⁴.

Como o ensaio proposto é realizado a temperatura ambiente, foi avaliado, na composição do tampão de hibridização, a adição da molécula de DTT, uma vez que esta possui a propriedade de reduzir a estabilidade térmica das ligações permitindo que a hibridização seja realizada a uma temperatura mais baixa^{135,136}. A FIGURA 4.3.3 apresenta os resultados das curvas analíticas obtidas com o ensaio genômico para o alvo 1A com e sem DTT no tampão de hibridização.

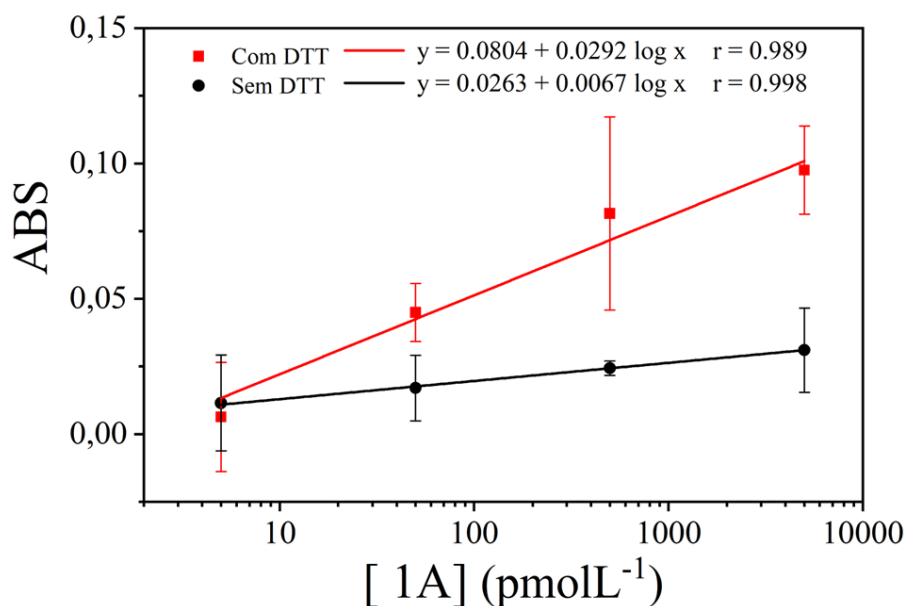


FIGURA 4.3.3- Concentrações avaliadas no ensaio genômico para o ssDNA alvo 1A com o sem DTT no tampão de hibridização.

Nota-se que o uso do DTT no ensaio aumentou a sensibilidade analítica do teste indicando que esta atua contribuindo para melhorar a hibridização. Por esse motivo, seguiu-se os ensaios utilizando o DTT no tampão de hibridização.

4.3.4 - Composição do tampão para a formação do complexo biotina-estreptavidina

O ensaio genômico colorimétrico envolve duas etapas de incubação, a primeira na qual promove-se a hibridização do alvo com as sondas específicas de captura e separação e uma segunda etapa de incubação, que envolve a interação da proteína estreptavidina do conjugado estreptavidina-HRP com a biotina presente na sonda dDNA. Nesta etapa, a incubação do bioconjugado e as etapas de lavagem foram realizadas com o tampão PBS, este tampão é popularmente usado em aplicações biológicas, pois permite atingir o pH e concentração de íons necessária para a maioria das proteínas¹³⁷, incluindo as do vírus SARS-CoV-2¹³⁸.

Ao tampão PBS foi adicionado 0,05% de Tween 20 (TW) 0,1% e a proteína albumina de soro bovino (BSA) durante a etapa de incubação e/ou

lavagem do ensaio a fim de evitar interações não específicas. A FIGURA 4.3.4 apresenta os resultados das curvas analíticas obtidas com o ensaio genômico para o ssDNA alvo, com sequência similar ao RNA 1A do vírus, para os experimentos propostos.

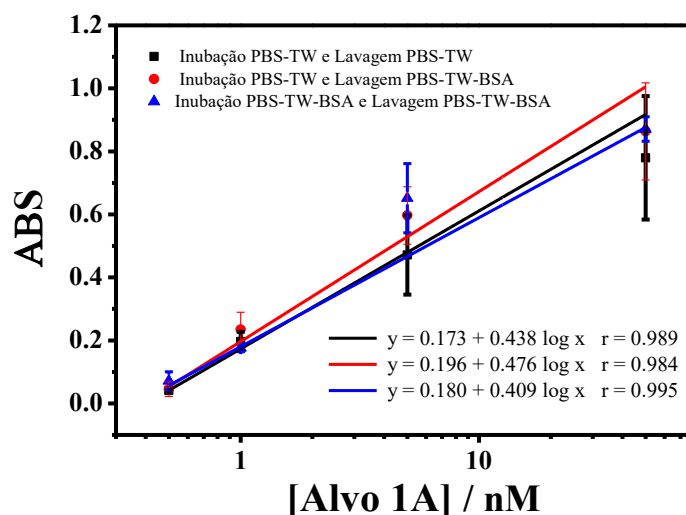


FIGURA 4.3.4- Curvas analíticas obtidas utilizando o ensaio genômico para o ssDNA 1A alvo utilizando diferentes condições para o tampão PBS na segunda etapa de incubação e lavagem.

Observando-se as curvas analíticas obtidas para o experimento descrito, nota-se que não há diferença significativa na sensibilidade analítica entre as três condições avaliadas. O objetivo da adição da proteína BSA era evitar ligações não-específicas durante o ensaio e as adsorções não desejadas da enzima HRP na parede do tubo/poço. Apesar disso, não se obteve o resultado esperado (maior sensibilidade analítica) com a adição do BSA em nenhuma das etapas. Logo, a solução tampão PBS-TW foi utilizada nas etapas de incubação e lavagem, uma vez que minimiza o uso de reagentes.

4.3.5 - Otimizações com aplicação do método em microplaca de 96 poços

O ensaio inicialmente pensado para ser aplicado individualmente foi posteriormente adaptado para ser executado em microplacas de 96 poços como forma de garantir realizar o estudo em um número significativo de amostras ao

mesmo tempo. Essa abordagem permite a quantificação do RNA viral usando espectrofotômetros para microplacas, que são de baixo custo quando comparado com a técnica de RT-PCR e são amplamente disponíveis em laboratórios de análises clínicas e mesmo nos menores estabelecimentos. Para isto, desenvolveu-se um suporte magnético utilizando impressora 3D para manipular magneticamente as MPs nas amostras. O suporte possui quatro partes, sendo duas para lavagem, FIGURA 4.3.5. e duas para a etapa de detecção FIGURA 4.3.6. O dispositivo foi previsto para se encaixar em diferentes microplacas disponíveis comercialmente. As ponteiros de pipeta podem ser inseridas no fundo do poço das microplacas devido a capacidade de colocar e remover ímãs à base de Nd-Fe-B (neodímio), permitindo que o usuário execute todas as etapas do ensaio descrito e até mesmo mantenha os ímãs na microplaca durante a realização das medidas ópticas realizada em o leitor de ELISA.

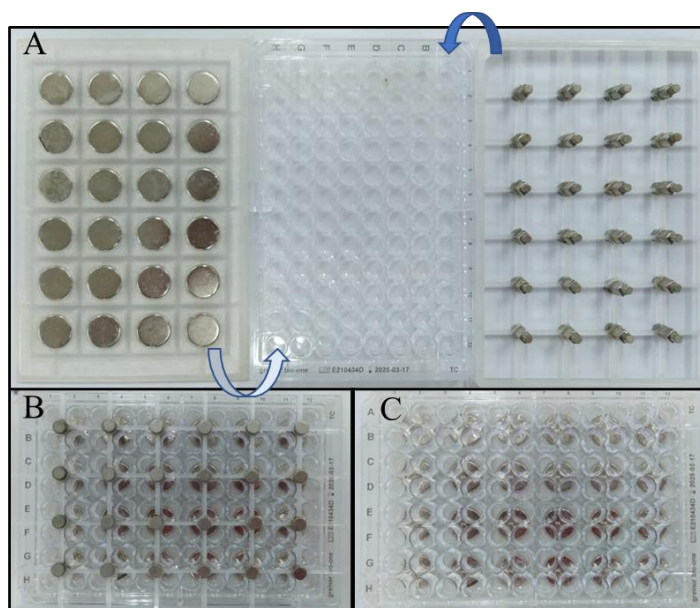


FIGURA 4.3.5- Suportes para manipulação das MPs nos poços das microplacas para as etapas de captura e separação. A) Suporte inferior e superior. B) Suportes superior e inferior montados na microplaca. C) Retenção de ímãs dentro dos espaços presentes na microplaca.

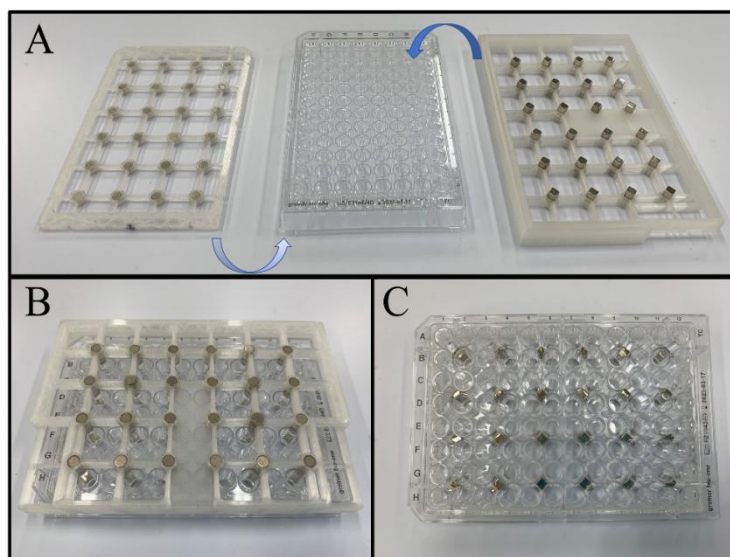


FIGURA 4.3.6- Suportes magnéticos utilizados para a etapa de leitura óptica. A) Suporte inferior e superior. B) Suportes montados na microplaca. C) suporte superior removido, ficando somente os ímãs que vão atrair as partículas magnéticas na parede lateral dos poços permitindo a leitura óptica.

Os resultados obtidos com a aplicação do ensaio genômico com detecção colorimétrica em amostras de saliva utilizado a placa de 96 poços são demonstrados na FIGURA 4.3.7. A cor amarela é formada quando ocorre a adição da de solução de parada (HCl) indicando um resultado positivo para a presença de RNA de SARS-CoV-2 na amostra de saliva.

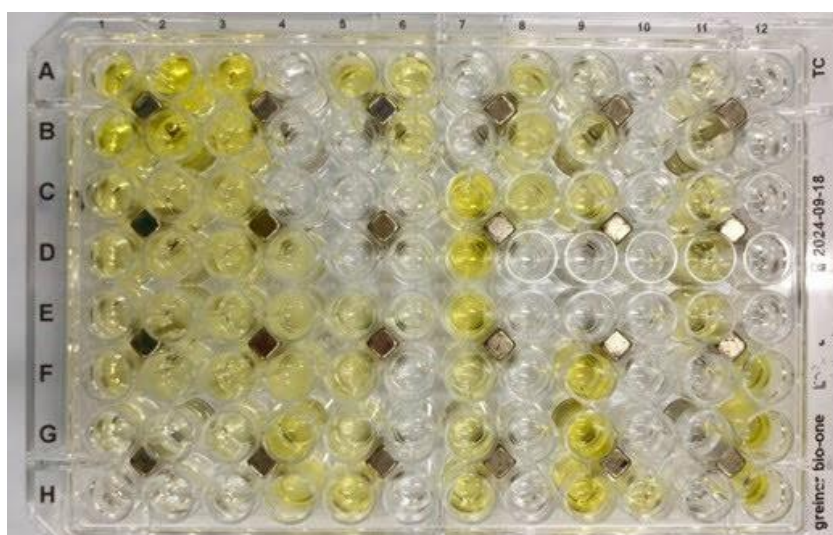


FIGURA 4.3.7- Fotos da microplaca de 96 poços com o suporte e os ímãs posicionadas entre cada quatro poços. O teste colorimétrico foi aplicado em amostras de saliva fortificada.

As microplacas possuem superfície com alta capacidade de ligação/adsorção e proteínas, pois são desenvolvidas para aplicadas em testes de imunoabsorção ELISA. Desta maneira, a fim de tentar minimizar a adsorção dos componentes da amostra de saliva e até mesmo as próprias PMs/reagentes utilizados no ensaio, o que poderia levar a possíveis erros (como resultado falso-positivo) no ensaio, testou-se um bloqueio da placa antes de realização do teste. Para isso, uma placa foi bloqueada com uma solução de BSA 1% preparada em PBS + TW20 0,1% pH 7,4, deixando essa solução por aproximadamente 16 h. A FIGURA 4.3.8 mostra os resultados para as curvas analíticas obtidas com o ensaio genomagnético do RNA alvo 1A para os experimentos com e sem bloqueio da microplaca.

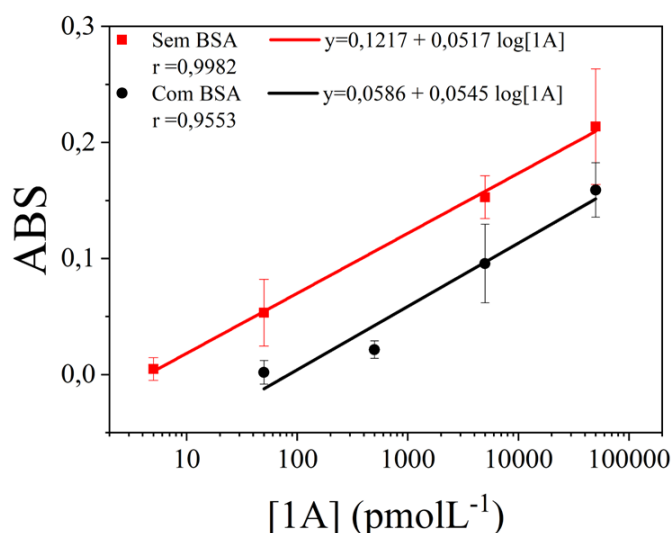


FIGURA 4.3.8- Concentrações avaliadas na aplicação do ensaio genomagnético para detecção do ssDNA 1A alvo utilizando a microplaca bloqueada previamente com BSA e sem bloqueio.

Observa-se que a aplicação do ensaio utilizando a placa previamente bloqueada com solução de BSA 1% apresentou uma curva analítica com menor intervalo linear e maior limite de detecção. Esse efeito também pode ser notado visualmente com as intensidades de cores obtidas após o teste, conforme mostra a FIGURA 4.3.9, com colorações amarelas mais intensas sem o bloqueio com o

BSA. Por esse motivo, optou-se por não fazer pré-tratamento na microplaca antes do ensaio e utilizá-las conforme enviada pelo fabricante.

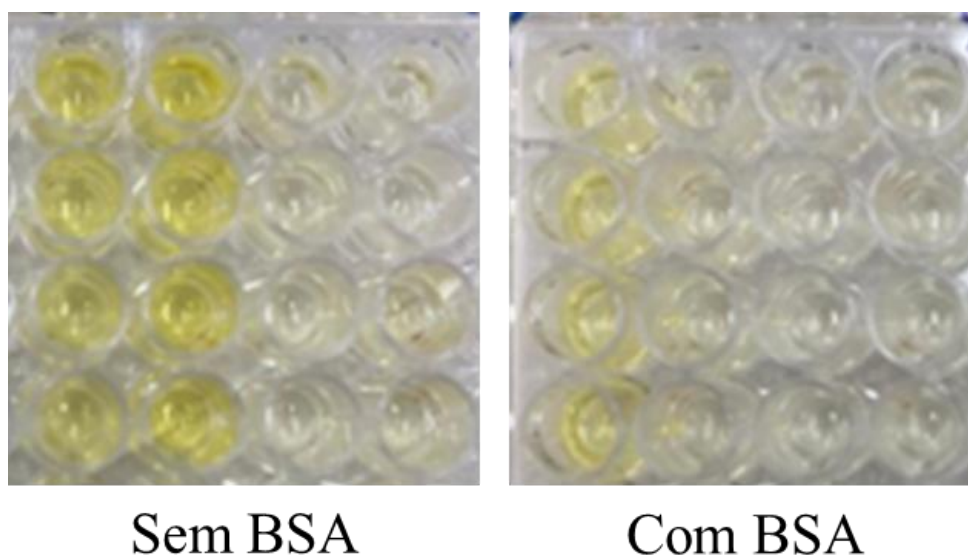


FIGURA 4.3.9- Foto do ensaio na microplaca com e sem bloqueio pela proteína BSA.

4.4 - Aplicação do ensaio genomagnético com detecção colorimétrica em amostras reais confirmadas por RT-PCR

As amostras de salivas de pacientes infectados com o SARS-CoV-2 foram analisadas e comparadas com amostras de saliva de indivíduos saudáveis confirmadas por RT-PCR. Inicialmente, as amostras de saliva passaram por tratamento térmico com o objetivo de promover a inativação do vírus. Esse tratamento consistiu em aquecer as amostras em um banho seco por 15 min a 80 °C. Essa etapa foi realizada com o objetivo de permitir a manipulação das amostras de forma segura, sendo todo o procedimento realizado em um Laboratório de Biossegurança Nível 2. Para o ensaio, um volume de 180 μ L de amostra de saliva foi utilizado em cada poço da microplaca.

A FIGURA 4.4.1 apresenta um gráfico de barras com as respostas de absorvância obtidas em função da concentração de RNA do SARS-CoV-2 em amostras de saliva referente as coortes compostas por pacientes diagnosticados

com COVID-19, confirmados via técnica de RT-PCR e de indivíduos saudáveis.

As amostras foram consideradas positivas se os valores do Limiar do Ciclo (Ct) estivessem abaixo de 40 e a unidade de concentração apresentada é relativa à fita simples de DNA com sequência similar à da região 1A do RNA do vírus. Os resultados demonstram a capacidade do ensaio genômico para identificar as amostras negativas e positivas. O método apresentou diferença significativa nos níveis alvo de RNA obtidos pelo ensaio entre amostras negativas e positivas (teste t, $p = 0,0047$).

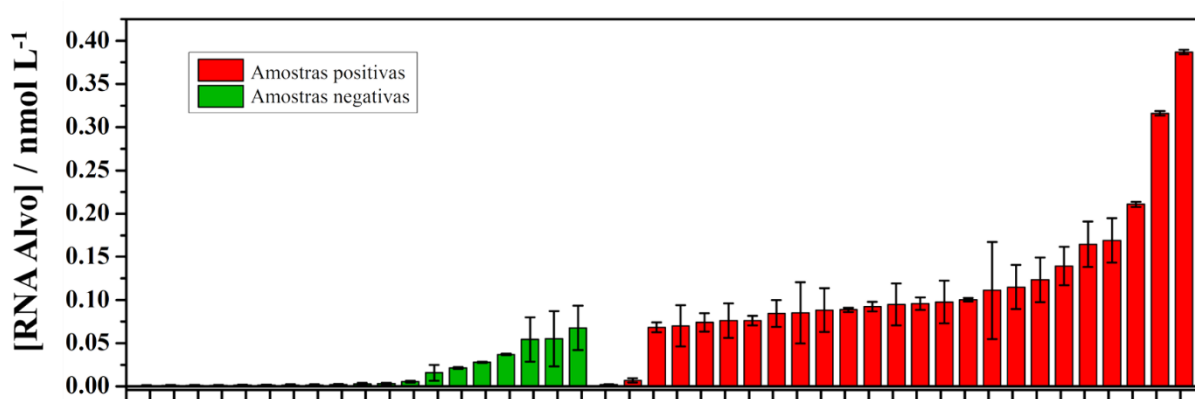


FIGURA 4.4.1- Respostas de concentração de RNA viral obtidas com a aplicação do ensaio genômico em amostras de saliva de indivíduos saudáveis (verde) e pacientes diagnosticados com COVID-19 (vermelho).

Para avaliar a capacidade do método em diferenciar as duas coortes, analisou-se as respostas obtidas por meio da curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*). A curva ROC é utilizada para determinar a precisão discriminativa do método para diferenciar entre os grupos de indivíduos saudáveis de pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2. Para tanto, tomou-se o RT-PCR para o vírus SARS-CoV-2 como técnica ouro e analisou-se as medidas de desempenho diagnóstico (sensibilidade, especificidade e acurácia) do método. A curva ROC para a determinação do RNA do SARS-CoV-2 em saliva utilizando o ensaio genômico proposto é apresentada na FIGURA 4.4.2. A partir dos resultados obtidos, a área sobre a curva ROC (AUC) foi de 0,955, que é considerado um excelente valor e indica a boa capacidade do método de

diferenciar as amostras positivas das negativas, uma vez que o valor máximo da AUC é de 1.

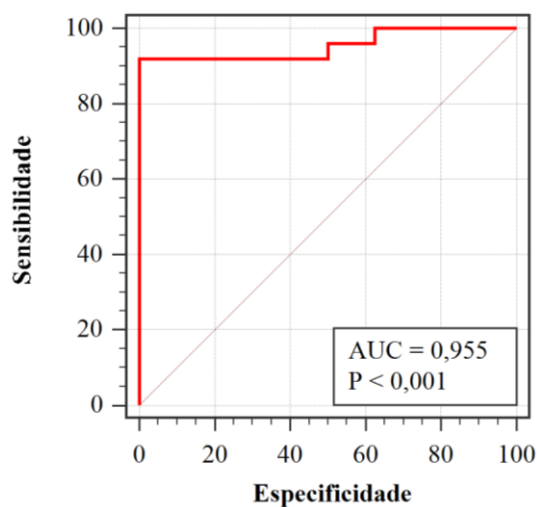


FIGURA 4.4.2- Curvas ROC para RNA alvo utilizando o ensaio genômico. Respostas do sujeito de saúde versus paciente com COVID-19, $p < 0,001$.

Os resultados obtidos com o método são apresentados como diagrama de pontos na FIGURA 4.4.3. O método proposto permitiu diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2 com 92% de sensibilidade e 100,0% de especificidade. O valor de corte ideal obtido foi $> 67,7$ pmol L⁻¹, baseado no índice de Youden¹⁶⁻²¹, e esse resultado sugere que o ensaio proposto apresenta uma excelente capacidade de discriminação entre as coortes, indicando a sua viabilidade para a detecção do RNA do SARS-CoV-2.

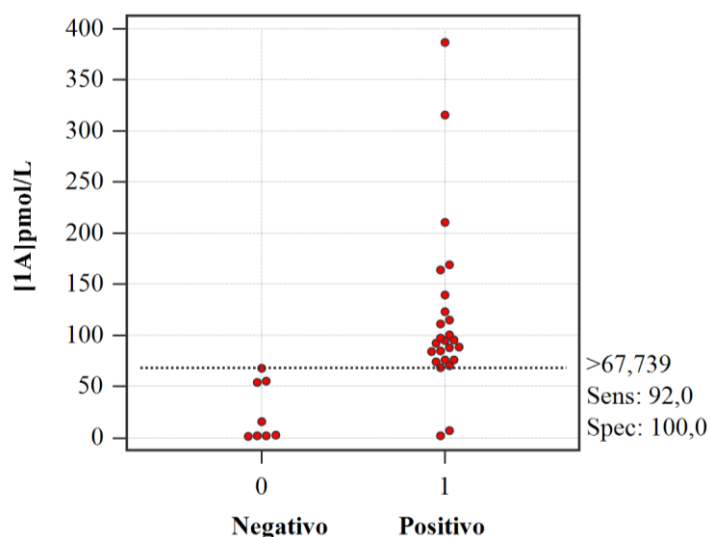


FIGURA 4.4.3- Diagrama de pontos interativo da concentração alvo de RNA em amostras de saliva, *t-test, $p = 0,0047$ (MedCalc Statistical Software).

Uma característica atraente deste teste é o fluxo de trabalho simplificado: uma amostra de saliva é adicionada diretamente à solução presente no poço, seguida por uma etapa de hibridização e uma etapa de bioconjugação. Essas etapas reduzem a complexidade, o tempo e os custos da detecção do vírus SARS-CoV-2, quando comparado com o teste RT-PCR. O teste genomagnético também demonstra a capacidade de ser aplicado como teste *point-of-care*, pois pode ser utilizado para a detecção individual e qualitativamente por meio da identificação visual da mudança de cor. Além disso, pode ser aplicado quantitativamente e, assim, monitorar a carga viral de um indivíduo ou a resposta ao tratamento em aproximadamente 90 minutos.

4.5 - Ensaio genomagnético com detecção eletroquímica em amostras de saliva fortificadas

Foram preparadas amostras de saliva fortificadas com ssDNA em diferentes concentrações, as etapas envolvidas no ensaio com detecção eletroquímica são descritas com detalhes no item 3.8.2 -. As respostas de corrente foram utilizadas para a construção da curva analítica, são apresentadas na FIGURA 4.5.1. A equação da reta obtida foi $i(\mu\text{A}) = 5377,8 + 342,7 \times \log[1A] \text{ (pmol L}^{-1}\text{)}$, com R^2 de 0,96. Adicionalmente, a faixa linear obtida foi de 5 até 50.000 fmol L^{-1} e os limites de detecção e quantificação, foram calculados em de 0,86 e 2,63 fmol L^{-1} , respectivamente.

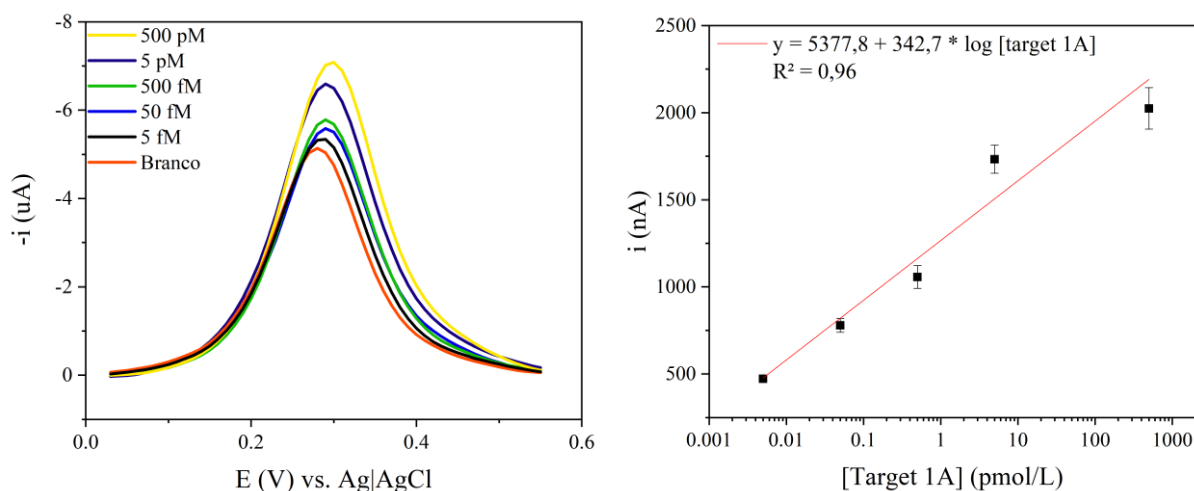


FIGURA 4.5.1- DPVs obtidos para concentrações do alvo 1A de 0, 5, 50, 500, 5000 e 50000 fmol L^{-1} e valores de corrente em função da concentração do alvo 1A.

4.6 - Otimizações do ensaio eletroquímico

4.6.1 - Estudo do eletrólito de suporte

Foram realizados estudos referentes ao tipo de eletrólito de suporte a ser utilizado nas medidas eletroquímicas envolvendo a dissolução das AuNPs via oxidação por cronoamperometria seguida da etapa de redução via técnica voltamétrica. Nesta etapa, utiliza-se HCl diluído, pois em meio ácido e na presença de íons cloreto o processo de oxidação é facilitado levando a formação do íon complexo tetracloroaurato(III). No entanto, mesmo sendo a solução de HCl diluída, sendo a concentração utilizada de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, há um receio por partes dos grupos parceiros da área de saúde de que a manipulação desta solução implica em riscos devido a sua acidez. Desta forma, foram realizados testes com solução somente de NaCl como eletrólito de suporte e de soluções mais diluídas de HCl na presença de NaCl.

Para a medida eletroquímica referente ao teste com HCl, foi pipetado sobre a superfície do eletrodo de trabalho um volume de $50 \mu\text{L}$ de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ a fim de verificar o perfil voltamétrico na ausência das nanopartículas. Posteriormente, em outra célula eletroquímica foi adicionado $25 \mu\text{L}$ de uma

dispersão de nanopartículas de ouro e adicionado 25 μL de HCl cobrindo completamente a área delimitada pelo vinil. De modo semelhante, para o teste com NaCl, foi adicionado sobre a superfície do eletrodo de trabalho 50 μL de NaCl 0,2 mol L^{-1} a fim de verificar o perfil voltamétrico na ausência das nanopartículas. Novamente em outra célula eletroquímica, foi adicionado 25 μL das nanopartículas de ouro utilizando 25 μL de NaCl como eletrólito de suporte. As respostas de corrente obtidas são apresentadas na FIGURA 4.6.1, onde pode-se observar os picos em 0,3V característicos da redução do ouro, e ainda, que a intensidade da corrente na presença de HCl é superior em relação ao NaCl, sendo assim, optamos por utilizar HCl como previsto inicialmente.

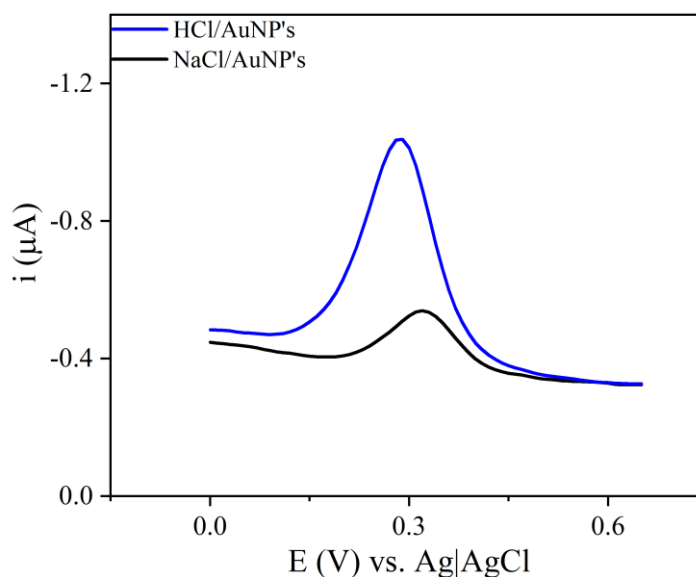


FIGURA 4.6.1- Voltamogramas de Pulso Diferencial realizado com eletrodos descartáveis contendo AuNPs utilizando solução HCl e NaCl 0,2 mol L^{-1} como eletrólitos de suporte. Os voltamogramas foram obtidos após a etapa de oxidação cronoamperométrica das AuNPs.

4.6.2 - Avaliação da diluição da amostra de saliva

Na sequência, foram realizadas diluições de 1/500, 1/1000 e 1/10000 de uma amostra de saliva de paciente diagnosticado com COVID-19 via RT-PCR escolhida aleatoriamente dentre as amostras disponíveis a fim de verificar qual a melhor condição em termos de diluição da amostra para detecção do RNA viral.

Observando a FIGURA 4.6.2, é possível visualizar que as amostras positivas se diferenciam do branco analítico por um intervalo de corrente de no mínimo 700 nA, o que pode ser um bom indicativo de que a presença do RNA viral tem relação direta com o aumento da corrente obtida. A pequena variação nas respostas obtidas com as diluições de 1/500 e 1/1000 indicam que possivelmente estava-se trabalhando em uma condição de saturação, desta forma, a condição que apresentou o maior sinal foi a diluição de 1/1000, sendo esta, mantida nos ensaios posteriores.

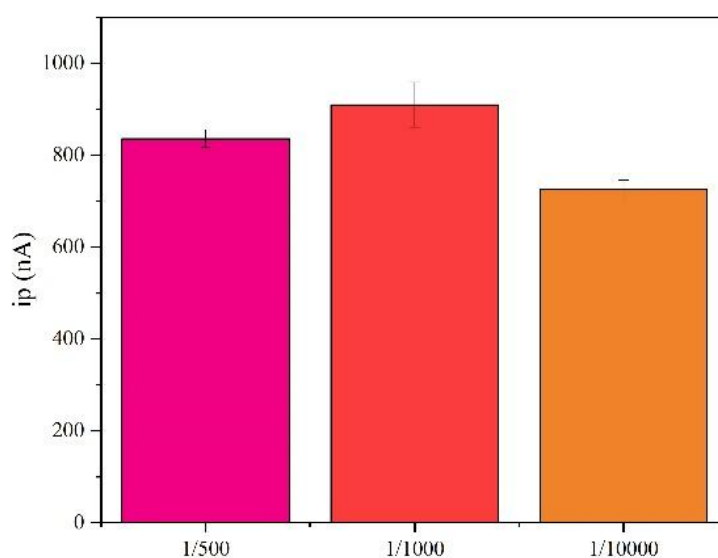


FIGURA 4.6.2. Avaliação do efeito da diluição da amostra da saliva na resposta de corrente quando da determinação de RNA viral utilizando o ensaio genomagnético.

4.6.3 - Avaliação do tipo frasco utilizado para a coleta de saliva

Com o objetivo de entender a influência das diferentes formas e fracos de coleta de saliva na resposta eletroquímica, ensaios comparativos foram realizados utilizando tubos Falcon e tubos Salivette. A FIGURA 4.6.3 apresenta a comparação utilizando amostras reais de saliva de um paciente com diagnóstico de COVID-19 confirmado pela presença do RNA de SARS-CoV-2 via RT-PCR.

As amostras foram coletadas simultaneamente e, foram manipuladas seguindo os protocolos estabelecidos para o laboratório de biossegurança nível 2

(NB2), inativadas mediante aquecimento a uma temperatura de 65°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e analisadas no mesmo dia para garantir a preservação do material genético. Cada amostra foi identificada, codificada e transferida para tubos *ependorf* livres de DNAases e RNAases para evitar degradação química, e armazenadas no ultrafreezer a uma temperatura de -80°C.

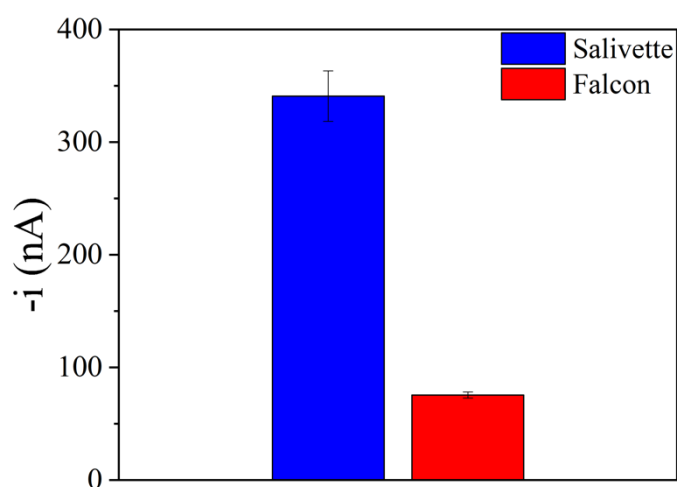


FIGURA 4.6.3- Comparação entre amostra de saliva coletada com Salivette em azul, e com tubo falcon, em vermelho.

4.6.4 - Avaliação do tempo de incubação

Utilizando um arranjo com 8 eletrodos, fabricados conforme o descrito no item 3.7 -, foi possível avaliar o comportamento do método em função do tempo de incubação para a formação do bioconjugado. Para isto, o experimento foi realizado utilizando-se de uma amostra positiva e de acordo com o mesmo protocolo estabelecido para as amostras acima mencionadas. Observando a FIGURA 4.6.4, é possível notar que o tempo de incubação de 40 minutos (em verde) levou a um maior sinal de corrente de pico de redução frente aos outros.

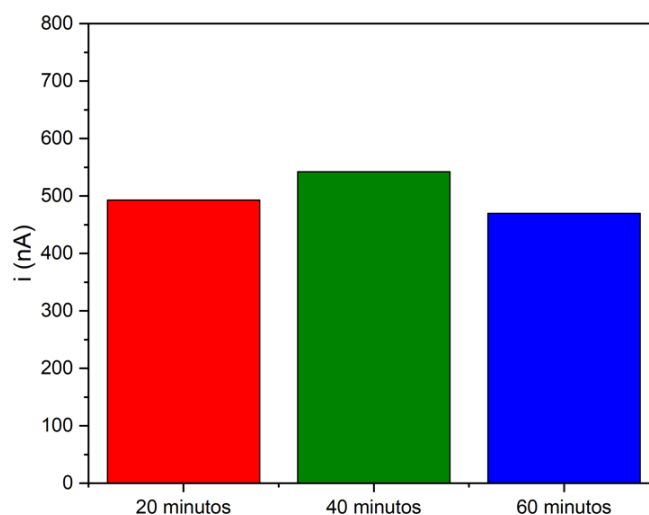


FIGURA 4.6.4- Comparação de tempos diferentes de incubação para o bioconjugado em função da resposta de corrente

A condição com maior sinal analítico foi mantida nos ensaios posteriores, acreditamos que é possível diminuir ainda mais o tempo de incubação sem afetar de forma significativa a sensibilidade do mesmo, testes futuros são necessários para a confirmação desta informação.

4.6.5 - Acompanhamento do título viral ao longo dos dias

Foi possível realizar o acompanhamento e a coleta diária de amostras de saliva de um paciente com diagnóstico confirmado de COVID-19. Essa abordagem permitiu não apenas monitorar a carga viral ao longo dos dias de infecção, mas também identificar flutuações no nível de RNA viral, fornecendo informações sobre o padrão de eliminação do vírus pelo organismo. A FIGURA 4.6.5 traz os valores de corrente de pico obtidos a partir da análise da saliva coletada durante 5 dias, no mês de abril de 2024, onde o paciente foi infectado possivelmente por alguma subvariante da variante Ômicron do coronavírus.

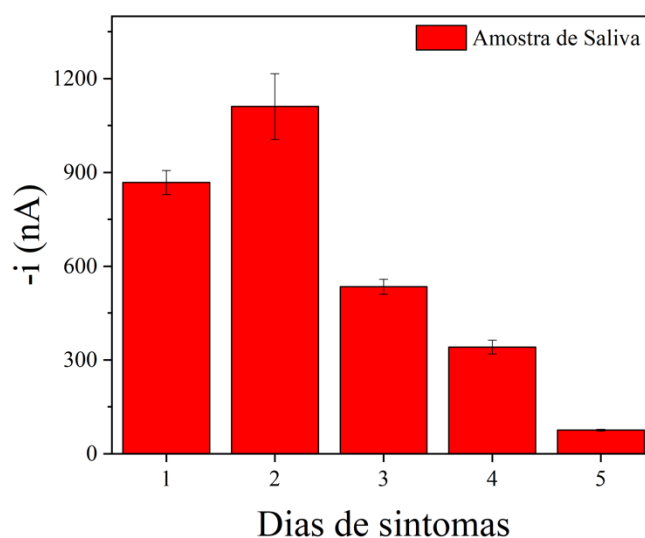


FIGURA 4.6.5- Valores de corrente de pico obtidos nas coletas de amostra de saliva por 5 dias.

Ao comparar esses dados com os descritos na literatura ⁴⁶, foi possível notar as tendências observadas, como o pico de carga viral nos primeiros dias após o início dos sintomas e o gradual declínio ao longo do período de infecção.

4.6.6 - Testes de interferência na presença do material genético de outros vírus

Para avaliar possíveis interferências de outros agentes biológicos, realizou-se uma série de experimentos utilizando materiais genéticos de Influenza, Salmonella e Herpes, com o intuito de verificar se a presença desses patógenos poderia alterar o resultado do ensaio. Cada patógeno foi adicionado em concentrações 100 vezes maiores do que a do DNA sintético de SARS-CoV-2, em concordância com as recomendações encontradas na literatura para a simulação de cenários com ocorrência de contaminação cruzada. A análise da FIGURA 4.6.6 sugere que a presença desses materiais genéticos praticamente não alterou o sinal de resposta, sendo um indicativo da especificidade do método proposto para o diagnóstico do SARS-CoV-2, mesmo em amostras que possam conter outros organismos patogênicos, que pode ser o caso, quando se trata de amostras reais.

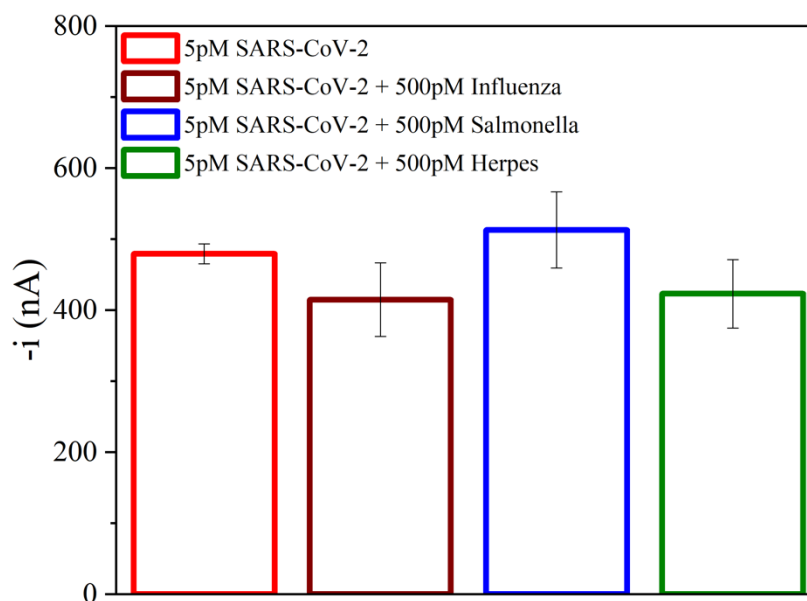


FIGURA 4.6.6- Teste de interferência com Influenza, Salmonella e Herpes na concentração de 500pM e SARS-CoV-2 de 5pM.

4.6.7 - Aplicação do método eletroquímico em amostras de saliva de indivíduos saudáveis e pacientes com COVID-19 confirmadas por RT-PCR

Foram analisadas um total de 20 amostras reais de saliva. Dentre estas, 10 amostras eram de indivíduos com diagnóstico confirmado de COVID-19 (positivas) e 10 eram de indivíduos saudáveis, confirmadas por RT-PCR como negativas. Os valores de corrente de pico obtidos para as amostras analisadas são demonstrados na FIGURA 4.6.7, em vermelho estão representadas as amostras positivas, indicando a presença de SARS-CoV-2 na amostra. Já na cor verde, estão as amostras negativas, que não indicaram a presença do vírus. É importante destacar que ao longo dos ensaios, foi observado que as amostras provenientes de parceiros sem um protocolo antes da coleta forneciam sinais incoerentes, até menores que o branco analítico. Já as amostras de parceiros que exigiam um protocolo rigoroso de limpeza oral antes coletar a saliva, apresentavam um sinal coerente com os resultados apresentados via RT-PCR. Isto pode ser uma evidência de que a higiene antes da coleta de saliva é essencial para o sucesso do

teste. A saliva é uma matriz complexa que pode conter resquícios de alimentos, que podem comprometer a eficácia do método.

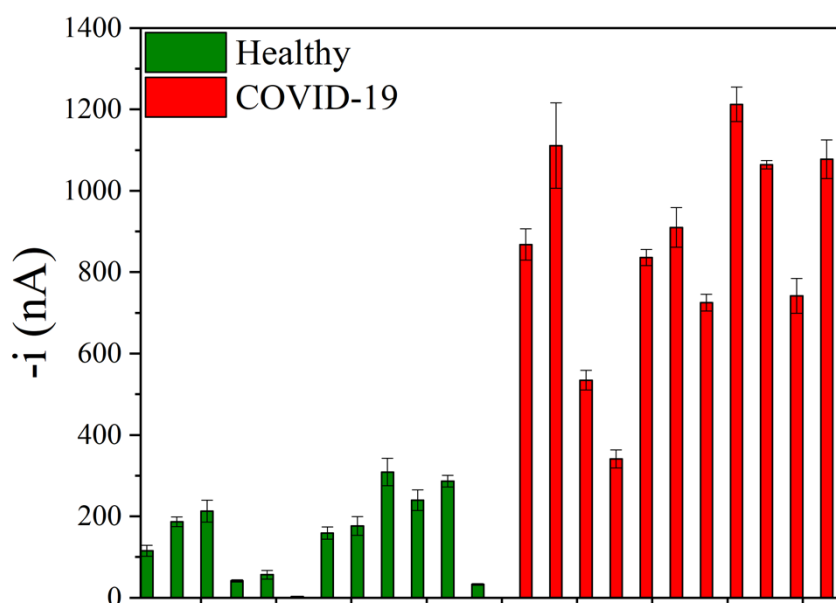


FIGURA 4.6.7- Detecção de RNA viral utilizando o método proposto em amostras de saliva de indivíduos com diagnósticos positivos confirmados por RT-PCR

Com estes dados, foi possível construir uma curva ROC (Receiver Operating Characteristic) e um gráfico de pontos, ambos comumente utilizados pela ANVISA e outros órgãos, para avaliação de métodos diagnósticos com o intuito de determinar a sua capacidade discriminatória em diferenciar verdadeiros positivos e negativos. A FIGURA 4.6.8 apresenta uma curva ROC com área sob a curva (AUC) igual a 1 indicando que o método consegue distinguir entre amostras positivas e negativas.

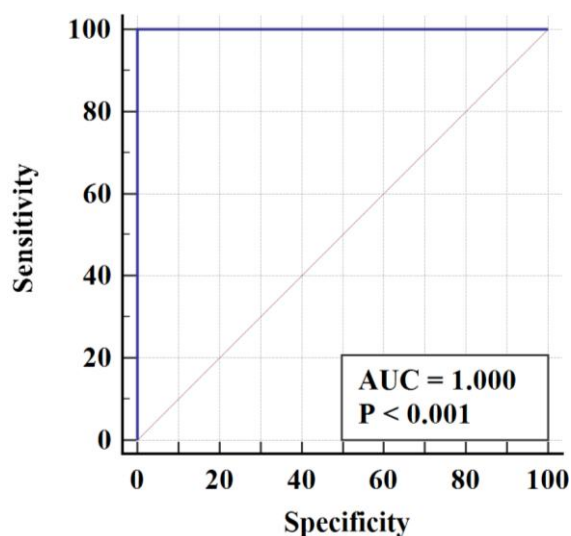


FIGURA 4.6.8- Curva ROC com AUC = 1 e gráfico de pontos apresentando a linha de corte entre uma amostra positiva e negativa.

O gráfico de pontos permite visualizar individualmente os resultados de cada amostra, divididas entre os grupos representados pelos números 0 e 1, sendo negativo e positivo respectivamente. A FIGURA 4.6.9 apresenta a linha de corte, que foi estabelecida em 309 nA, separando claramente as amostras dos dois grupos. Amostras com valores de corrente acima de 309 nA foram classificadas como positivas, enquanto amostras abaixo desse valor foram classificadas como negativas.

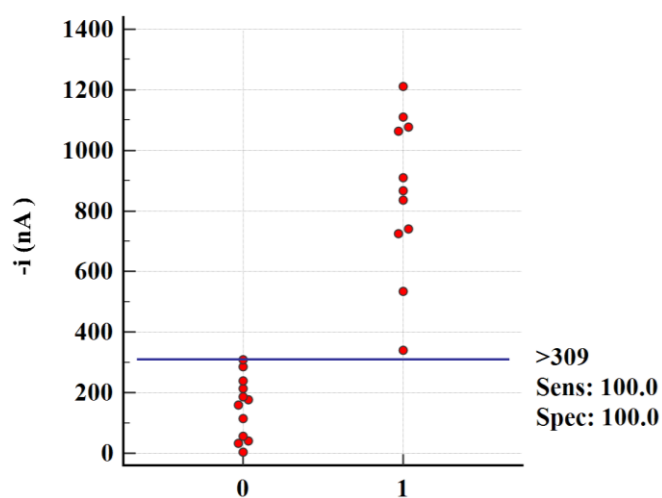


FIGURA 4.6.9- Diagrama de pontos interativo da concentração alvo de RNA em amostras de saliva, *t-test, $p = 0,0047$ (MedCalc Statistical Software).

4.7 - Comparação dos métodos desenvolvidos

A TABELA 3.4.1 apresenta uma comparação de ambos os métodos desenvolvidos demonstrando parâmetros como tipo de amostra, tipo de técnica, material detectado, limites de detecção e quantificação, além de faixa linear de trabalho e volume de amostra utilizada. Onde podem ser observados os resultados obtidos para cada método.

Método	Tipo de amostra	Deteccção	Técnica	LD	LQ	Faixa Linear	Volume de amostra
Colorimétrico	Saliva	RNA	UV-vis	0.92 pM	2.80 pM	4.5 pM - 45 nM	180 µL
Eletroquímico	Saliva	RNA	DPV	0.86 fM	2.63 fM	5 fM - 500 pM	10 µL

TABELA 4.7.1- Tabela de comparação dos resultados obtidos para ambos os métodos desenvolvidos

Analisando ambos os métodos, pode se destacar que estes apresentam resultados consistentes com os resultados de RT-PCR obtidos com equipamentos de menor custo em relação ao método padrão. O método colorimétrico apresenta a possibilidade de processamento de um maior número de amostras simultâneas, enquanto que o método eletroquímico oferece a leitura de até 8 amostras simultâneas e possibilidade de análises *point-of-care*.

5 - Conclusões

Neste trabalho foi apresentado o desenvolvimento de um ensaio genomagnético colorimétrico e um ensaio eletroquímico, ambos para a detecção do RNA viral de SARS-CoV-2, utilizando o gene N como alvo. Os métodos desenvolvidos envolvem o uso de PM modificadas com sondas de DNA utilizadas como sonda de captura do RNA viral e sonda de detecção modificadas com marcador eletroquímico e óptico. Foram realizadas otimizações em relação a composição das soluções tampão empregadas nas etapas imobilização dos DNAs de captura nas partículas magnéticas, composição das soluções de incubação e lavagem, tubo utilizado para coleta de saliva e também em relação as diluições utilizadas e potenciais reações cruzadas como na presença de DNAs de outros vírus. Os resultados demonstraram ampla faixa linear e com desvios inferiores a 15%, compatíveis com os critérios aceitos para ensaios biológicos. Para o método colorimétrico os valores de limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,92 e 2,80 pmol L⁻¹ respectivamente. Já para o método eletroquímico os valores de LD e LQ foram 3,08 fmol L⁻¹ e 9,32 fmol L⁻¹.

Além disso, foi possível realizar análises a partir de amostras de saliva de indivíduos saudáveis e de pacientes diagnosticados com COVID-19 previamente confirmadas pelo método padrão ouro onde estas apresentaram excelentes resultados em termos sensibilidade e especificidade clínica. Neste âmbito, foi possível realizar a coleta e testagem de amostras de saliva de um paciente com COVID-19 por 5 dias seguidos, onde os valores de corrente obtidos podem ser associados a carga viral na amostra de saliva, estes resultados se mostraram de acordo o esperado e com o descrito na literatura.

Os testes desenvolvidos se enquadram na categoria moleculares e se destacam pela simplicidade e eficácia, comparado ao RT-PCR que é essencialmente qualitativo, apresentando vantagens em termos volume e preparo simplificado de amostra, tempo de análise, e menor custo. Os ensaios propostos podem ser realizados em cerca de 1:30h no caso do ensaio colorimétrico e 60

minutos para o eletroquímico, onde ambos permitem não só a identificação, mas também a quantificação dos alvos. Não obstante, o uso de saliva como matriz de análise viabiliza a autocoleta por ser uma via menos invasiva que os métodos convencionais com o *swab*, facilitando a testagem em larga escala, especialmente em regiões de infraestrutura limitada. Os métodos desenvolvidos são versáteis e podem ser adaptados para a detecção do material genético de outros agentes patogênicos. Assim, este trabalho oferece uma contribuição significativa à detecção de biomarcadores e à democratização de testes moleculares, promovendo maior equidade no acesso à saúde. Dados referentes a esta pesquisa estão armazenados na rede institucional da UFSCar, de acordo com as regras da FAPESP, e podem ser obtidos através do contato com o pesquisador responsável: rcfaria@ufscar.br.

6 - Referências

1. Broughton, J. P. *et al.* CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology* **38**, 870–874 (2020).
2. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
3. Liu, J. *et al.* Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology* **92**, 491–494 (2020).
4. Chen, Y., Liu, Q. & Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology* **92**, 418–423 (2020).
5. Rodriguez-Morales, A. J. *et al.* COVID-19 in Latin America: The implications of the first confirmed case in Brazil. *Travel Medicine and Infectious Disease* **35**, 101613 (2020).
6. WHO. Situation Report-52. (2020).
7. Ritchie, H. *et al.* Coronavirus Pandemic (COVID-19). *Our World in Data* (2020).
8. Tang, J. W., Tambyah, P. A. & Hui, D. S. Emergence of a new SARS-CoV-2 variant in the UK. *Journal of Infection* **82**, e27–e28 (2021).
9. Tegally, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* **592**, 438–443 (2021).
10. Faria, N. R. *et al.* Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* **372**, 815–821 (2021).
11. Voloch, C. M. *et al.* Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Virology* **95**, (2021).
12. Roser, M., Ritchie, H., Ortiz-Ospina, E. & Hassell, J. Excess mortality during the Coronavirus pandemic (COVID-19) - Our World in Data. *OurWorldInData.org* 1–18 (2020).
13. Ministério da Saúde. Plano Nacional de Expansão da Testagem para Covid-19 - PNE-Teste. *Governo Federal do Brasil* <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/covid-19/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/plano-nacional-de-expansao-da-testagem-para-covid-19.pdf/view> (2022).
14. ICTV. Taxonomy history. *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2021).

15. Cui, J., Li, F. & Shi, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* **17**, 181–192 (2019).
16. Woo, P. C. Y. *et al.* Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *Journal of Virology* **86**, 3995–4008 (2012).
17. Yin, Y. & Wunderink, R. G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology* **23**, 130–137 (2018).
18. Zumla, A., Chan, J. F. W., Azhar, E. I., Hui, D. S. C. & Yuen, K.-Y. Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options. *Nature Reviews Drug Discovery* **15**, 327–347 (2016).
19. Schoeman, D. & Fielding, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal* **16**, 69 (2019).
20. Cascella, M., Rajnik, M., Aleem, A., Dulebohn, S. C. & Di Napoli, R. *Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)*. *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
21. Zhou, H. *et al.* Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell* **184**, 4380–4391.e14 (2021).
22. Liu, K. *et al.* Binding and molecular basis of the bat coronavirus RaTG13 virus to ACE2 in humans and other species. *Cell* **184**, 3438–3451.e10 (2021).
23. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology* **5**, 562–569 (2020).
24. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* **382**, 727–733 (2020).
25. Mallapaty, S. Closest known relatives of virus behind COVID-19 found in Laos. *Nature* (2021) doi:10.1038/d41586-021-02596-2.
26. Temmam, S. *et al.* Coronaviruses with a SARS-CoV-2-like receptor-binding domain allowing ACE2-mediated entry into human cells isolated from bats of Indochinese peninsula. (2021) doi:10.21203/RS.3.RS-871965/V1.
27. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. *Who* <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (2021).
28. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern.

- [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern).
29. Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A. & Goyal, S. M. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transboundary and Emerging Diseases* **68**, 296–312 (2021).
 30. van Doremalen, N. *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine* **382**, 1564–1567 (2020).
 31. Deng, H., Yan, X. & Yuan, L. Human genetic basis of coronavirus disease 2019. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **6**, 344 (2021).
 32. Alene, M. *et al.* Serial interval and incubation period of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* **21**, 257 (2021).
 33. Lei, S. *et al.* Clinical characteristics and outcomes of patients undergoing surgeries during the incubation period of COVID-19 infection. *EClinicalMedicine* **21**, 100331 (2020).
 34. Bai, Y. *et al.* Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA* **323**, 1406 (2020).
 35. Nehme, M. *et al.* COVID-19 Symptoms: Longitudinal Evolution and Persistence in Outpatient Settings. *Annals of Internal Medicine* **174**, 723–725 (2021).
 36. WHO. Coronavirus. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3 (2021).
 37. WHO Guidance Note. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 11 September 2020. *World Health Organization (WHO)* 20 (2020).
 38. Chu, D. K. W. *et al.* Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* **66**, 549–555 (2020).
 39. Ventura, B. Della *et al.* Colorimetric test for fast detection of SARS-COV-2 in nasal and throat swabs. *ACS Sensors* **5**, 3043–3048 (2020).
 40. Shen, M. *et al.* Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **10**, 97–101 (2020).
 41. Tahamtan, A. & Ardebili, A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **20**, 453–454 (2020).

42. Grierson, J., Morris, S. & Mason, R. Covid PCR tests: at least 43,000 in UK may have had false negatives. *The Guardian* (2021).
43. BBC. Covid: False negatives blamed for high case rates in West of England. *BBC News* (2021).
44. Choe, J. *et al.* Diagnostic performance of immunochromatography assay for rapid detection of IgM and IgG in coronavirus disease 2019. *Journal of Medical Virology* **92**, 2567–2572 (2020).
45. Magno, L. *et al.* Desafios e propostas para ampliação da testagem e diagnóstico para COVID-19 no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* **25**, 3355–3364 (2020).
46. Xavier, A. R. *et al.* COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **56**, 1–9 (2020).
47. Xavier, A. R. *et al.* COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **56**, e3232020 (2020).
48. Yu, L. *et al.* Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clinical Chemistry* **66**, 975–977 (2020).
49. Kobayashi, G. S. *et al.* A Novel Saliva RT-LAMP Workflow for Rapid Identification of COVID-19 Cases and Restraining Viral Spread. *Diagnostics* **11**, 1400 (2021).
50. Garcia-Junior, M. A. *et al.* Artificial-Intelligence Bio-Inspired Peptide for Salivary Detection of SARS-CoV-2 in Electrochemical Biosensor Integrated with Machine Learning Algorithms. *Biosensors* **15**, 75 (2025).
51. Dong, D. *et al.* The Role of Imaging in the Detection and Management of COVID-19: A Review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* **14**, 16–29 (2021).
52. Kumar, N., Shetti, N. P., Jagannath, S. & Aminabhavi, T. M. Electrochemical sensors for the detection of SARS-CoV-2 virus. *Chemical Engineering Journal* **430**, 132966 (2022).
53. Fabiani, L. *et al.* Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. *Biosensors and Bioelectronics* **171**, 112686 (2021).
54. Ali, A. *et al.* Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications* **Volume 9**, 49–67 (2016).

55. PALECEK, E. & FOJTA, M. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta* **74**, 276–290 (2007).
56. Wang, H., Wang, J., Timchalk, C. & Lin, Y. Magnetic Electrochemical Immunoassays with Quantum Dot Labels for Detection of Phosphorylated Acetylcholinesterase in Plasma. *Analytical Chemistry* **80**, 8477–8484 (2008).
57. Kudr, J., Klejdus, B., Adam, V. & Zitka, O. Magnetic solids in electrochemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **98**, 104–113 (2018).
58. de Oliveira, T. R., Fonseca, W. T., de Oliveira Setti, G. & Faria, R. C. Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes. *Talanta* **195**, 480–489 (2019).
59. Otieno, B. A. *et al.* On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* **53**, 268–274 (2014).
60. Safarik, I. & Safarikova, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology* vol. 2 1–17 em <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7> (2004).
61. Obata, K., Tajima, H., Yohda, M. & Matsunaga, T. Recent developments in laboratory automation using magnetic particles for genome analysis. *Pharmacogenomics* **3**, 697–708 (2002).
62. Pamme, N. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip* **6**, 24–38 (2006).
63. Carinelli, S., Kühnemund, M., Nilsson, M. & Pividori, M. I. Yoctomole electrochemical genosensing of Ebola virus cDNA by rolling circle and circle to circle amplification. *Biosensors and Bioelectronics* **93**, 65–71 (2017).
64. Chikkaveeraiah, B. V., Mani, V., Patel, V., Gutkind, J. S. & Rusling, J. F. Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum. *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 4477–4483 (2011).
65. Krishnan, S., Mani, V., Wasalathanthri, D., Kumar, C. V. & Rusling, J. F. Attomolar Detection of a Cancer Biomarker Protein in Serum by Surface Plasmon Resonance Using Superparamagnetic Particle Labels. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 1175–1178 (2011).
66. Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H. & Sedighimoghaddam, B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research* **9**, 17–22

- (2016).
67. Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. & Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **382**, 607–609 (1996).
 68. Sastry, M., Rao, M. & Ganesh, K. N. Electrostatic Assembly of Nanoparticles and Biomacromolecules. *Accounts of Chemical Research* **35**, 847–855 (2002).
 69. Wang, G., Zhang, J. & Murray, R. W. DNA Binding of an Ethidium Intercalator Attached to a Monolayer-Protected Gold Cluster. *Analytical Chemistry* **74**, 4320–4327 (2002).
 70. Lepoitevin, M., Lemouel, M., Bechelany, M., Janot, J.-M. & Balme, S. Gold nanoparticles for the bare-eye based and spectrophotometric detection of proteins, polynucleotides and DNA. *Microchimica Acta* **182**, 1223–1229 (2015).
 71. Jang, H. *et al.* Identification of genetically modified DNA found in Roundup Ready soybean using gold nanoparticles. *Microchimica Acta* **183**, 2649–2654 (2016).
 72. Lu, L., Wu, J., Li, M., Kang, T. & Cheng, S. Detection of DNA damage by exploiting the distance dependence of the electrochemiluminescence energy transfer between quantum dots and gold nanoparticles. *Microchimica Acta* **182**, 233–239 (2015).
 73. Azizah, N., Hashim, U., Gopinath, S. C. B. & Nadzirah, S. Gold nanoparticle mediated method for spatially resolved deposition of DNA on nano-gapped interdigitated electrodes, and its application to the detection of the human Papillomavirus. *Microchimica Acta* **183**, 3119–3126 (2016).
 74. Amina, S. J. & Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *International Journal of Nanomedicine* **Volume 15**, 9823–9857 (2020).
 75. Castañeda, M. T., Alegret, S. & Merkoçi, A. Electrochemical Sensing of DNA Using Gold Nanoparticles. *Electroanalysis* **19**, 743–753 (2007).
 76. Li, Y., Schluesener, H. J. & Xu, S. Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin* **43**, 29–41 (2010).
 77. Hutter, E. & Maysinger, D. Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity. *Trends in Pharmacological Sciences* **34**, 497–507 (2013).
 78. Niemeyer, C. M. & Simon, U. DNA-Based Assembly of Metal Nanoparticles. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2005**, 3641–3655 (2005).

79. Rasheed, P. A. & Sandhyarani, N. Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments. *Microchimica Acta* vol. 184 981–1000 em <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2143-1> (2017).
80. Liu, G. & Lin, Y. Electrochemical Quantification of Single-Nucleotide Polymorphisms Using Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 10394–10401 (2007).
81. Sun, A.-L., Zhang, Y.-F. & Wang, X.-N. Sensitive voltammetric determination of DNA via a target-induced strand-displacement reaction using quantum dot-labeled probe DNA. *Microchimica Acta* **182**, 1403–1410 (2015).
82. March, G., Nguyen, T. & Piro, B. Modified Electrodes Used for Electrochemical Detection of Metal Ions in Environmental Analysis. *Biosensors* **5**, 241–275 (2015).
83. Taleat, Z., Khoshroo, A. & Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). *Microchimica Acta* **181**, 865–891 (2014).
84. Arduini, F. *et al.* Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **79**, 114–126 (2016).
85. Afonso, A. S., Uliana, C. V., Martucci, D. H. & Faria, R. C. Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. *Talanta* **146**, 381–387 (2016).
86. Imamura, A. H. *et al.* Monitoring cellulose oxidation for protein immobilization in paper-based low-cost biosensors. *Microchimica Acta* **187**, 272 (2020).
87. Kokkinos, C., Economou, A. & Giokas, D. Paper-based device with a sputtered tin-film electrode for the voltammetric determination of Cd(II) and Zn(II). *Sensors and Actuators B: Chemical* **260**, 223–226 (2018).
88. Tortorich, R., Shamkhalichenar, H. & Choi, J.-W. Inkjet-Printed and Paper-Based Electrochemical Sensors. *Applied Sciences* **8**, 288 (2018).
89. Janeczek, K. *et al.* Assessment of electromechanical properties of screen printed polymer nanopastes. *Materials Science and Engineering: B* **178**, 511–519 (2013).
90. Carvalhal, R. F., Simão Kfourir, M., de Oliveira Piazzetta, M. H., Gobbi, A. L. & Kubota, L. T. Electrochemical Detection in a Paper-Based Separation Device. *Analytical Chemistry* **82**, 1162–1165 (2010).

91. Queirós, R. B., Guedes, A., Marques, P. V. S., Noronha, J. P. & Sales, M. G. F. Recycling old screen-printed electrodes with newly designed plastic antibodies on the wall of carbon nanotubes as sensory element for in situ detection of bacterial toxins in water. *Sensors and Actuators B: Chemical* **189**, 21–29 (2013).
92. Cincotto, F. H., Fava, E. L., Moraes, F. C., Fatibello-Filho, O. & Faria, R. C. A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers. *Talanta* **195**, 62–68 (2019).
93. de Araujo Andreotti, I. A. *et al.* Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **840**, 109–116 (2019).
94. Pradela-Filho, L. A. *et al.* Glass varnish-based carbon conductive ink: A new way to produce disposable electrochemical sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **305**, 127433 (2020).
95. Nascimento, V. B. & Angnes, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. *Química Nova* **21**, 614–629 (1998).
96. Yamanaka, K., Vestergaard, M. & Tamiya, E. Printable Electrochemical Biosensors: A Focus on Screen-Printed Electrodes and Their Application. *Sensors* **16**, 1761 (2016).
97. Torre, R., Costa-Rama, E., Nouws, H. P. A. & Delerue-Matos, C. Screen-Printed Electrode-Based Sensors for Food Spoilage Control: Bacteria and Biogenic Amines Detection. *Biosensors* **10**, 139 (2020).
98. Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P. & Jabbour, G. E. Inkjet Printing-Process and Its Applications. *Advanced Materials* **22**, 673–685 (2010).
99. Shanmugam, N. R., Muthukumar, S. & Prasad, S. Ultrasensitive and low-volume point-of-care diagnostics on flexible strips – a study with cardiac troponin biomarkers. *Scientific Reports* **6**, 33423 (2016).
100. Thiyagarajan, N., Chang, J.-L., Senthilkumar, K. & Zen, J.-M. Disposable electrochemical sensors: A mini review. *Electrochemistry Communications* **38**, 86–90 (2014).
101. Wu, L. & Qu, X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. *Chemical Society Reviews* **44**, 2963–2997 (2015).
102. Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S. & Tkac, J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry* **60**, 69–80 (2016).
103. Huang, L., Jia, Z., Liu, H., Pi, X. & Zhou, J. Design of a Sandwich Hierarchically Porous Membrane with Oxygen Supplement Function for

- Implantable Glucose Sensor. *Applied Sciences* **10**, 2848 (2020).
104. Bui, M.-P. N., Brockgreitens, J., Ahmed, S. & Abbas, A. Dual detection of nitrate and mercury in water using disposable electrochemical sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **85**, 280–286 (2016).
 105. Chen, J.-C., Shih, J.-L., Liu, C.-H., Kuo, M.-Y. & Zen, J.-M. Disposable Electrochemical Sensor for Determination of Nitroaromatic Compounds by a Single-Run Approach. *Analytical Chemistry* **78**, 3752–3757 (2006).
 106. Sharma, P., Sablok, K., Bhalla, V. & Suri, C. R. A novel disposable electrochemical immunosensor for phenyl urea herbicide diuron. *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 4209–4212 (2011).
 107. García, M. & Escarpa, A. Disposable electrochemical detectors based on nickel nanowires for carbohydrate sensing. *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 2527–2533 (2011).
 108. Song, W. *et al.* Fabrication of streptavidin functionalized silver nanoparticle decorated graphene and its application in disposable electrochemical sensor for immunoglobulin E. *Electrochemistry Communications* **31**, 16–19 (2013).
 109. Marrazza, G., Chianella, I. & Mascini, M. Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection. This paper was presented at the Fifth World Congress on Biosensors, Berlin, Germany, 3–5 June 1998.1. *Biosensors and Bioelectronics* **14**, 43–51 (1999).
 110. Zouari, M., Campuzano, S., Pingarrón, J. M. & Raouafi, N. Competitive RNA-RNA hybridization-based integrated nanostructured-disposable electrode for highly sensitive determination of miRNAs in cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics* **91**, 40–45 (2017).
 111. Santos, D. J. A. dos *et al.* An electrochemical genomagnetic assay for detection of SARS-CoV-2 and Influenza A viruses in saliva. *Biosensors and Bioelectronics* **255**, (2024).
 112. Fonseca, W. T. *et al.* Ultrasensitive magnetogenoassay for detection of microRNA for diagnosis of metastatic lymph nodes in head and neck cancer using disposable electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **352**, 131040 (2022).
 113. Nascimento, E. D. *et al.* COVID-19 diagnosis by SARS-CoV-2 Spike protein detection in saliva using an ultrasensitive magneto-assay based on disposable electrochemical sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **353**, 131128 (2022).
 114. Rich, A. Discovery of the Hybrid Helix and the First DNA-RNA Hybridization. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 7693–7696 (2006).

115. Li, Z., Jin, R., Mirkin, C. A. & Letsinger, R. L. Multiple thiol-anchor capped DNA–gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Research* **30**, 1558–1562 (2002).
116. Freitas, T. A. *et al.* Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device. *Talanta* **205**, 120110 (2019).
117. de Oliveira, T. R. *et al.* Early Diagnosis of Alzheimer’s Disease in Blood Using a Disposable Electrochemical Microfluidic Platform. *ACS Sensors* **5**, 1010–1019 (2020).
118. Northrop, B. H., Frayne, S. H. & Choudhary, U. Thiol–maleimide “click” chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity. *Polymer Chemistry* **6**, 3415–3430 (2015).
119. Link, M., Li, X., Kleim, J. & Wolfbeis, O. S. Click Chemistry Based Method for the Preparation of Maleinimide-Type Thiol-Reactive Labels. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 6922–6927 (2010).
120. Hoyle, C. E., Lowe, A. B. & Bowman, C. N. Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis. *Chemical Society Reviews* **39**, 1355–1387 (2010).
121. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **11**, 55 (1951).
122. Castañeda, M. T., Alegret, S. & Merkoçi, A. Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles. *Electroanalysis* vol. 19 743–753 [em https://doi.org/10.1002/elan.200603784](https://doi.org/10.1002/elan.200603784) (2007).
123. Uliana, C. V., Peverari, C. R., Afonso, A. S., Cominetti, M. R. & Faria, R. C. Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker. *Biosensors and Bioelectronics* **99**, 156–162 (2018).
124. Nie, Z. *et al.* Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab Chip* **10**, 477–483 (2010).
125. Lee, S.-H., Fang, H.-Y. & Chen, W.-C. Amperometric glucose biosensor based on screen-printed carbon electrodes mediated with hexacyanoferrate–chitosan oligomers mixture. *Sensors and Actuators B: Chemical* **117**, 236–243 (2006).
126. Verma, H. N., Singh, P. & Chavan, R. M. Gold nanoparticle: Synthesis and characterization. *Veterinary World* **7**, 72–77 (2014).
127. Barbara, R., Karin, F., Claus, V., Martin, W. & Peter, R. Impact of Long-

- Term Storage on Stability of Standard DNA for Nucleic Acid-Based Methods. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 4260–4262 (2010).
128. Sigma-Alcrich. Oligonucleotide Handling & Stability. <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/genomics/dna-and-rna-purification/oligonucleotide-handling-and-stability> (2022).
 129. KAUR, K. & KAUR, M. *ADVANCED DIAGNOSTIC TECHNIQUES*. (DENTOMED PUBLICATION HOUSE, 2021).
 130. Pat Heslop-Harrison; Trude Schwarzacher. Practical In Situ Hybridization - BUFFERS AND OTHER SOLUTIONS. <https://www.le.ac.uk/biology/phh4/probuffer.htm> (2006).
 131. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
 132. Tan, Z.-J. & Chen, S.-J. Electrostatic Free Energy Landscapes for DNA Helix Bending. *Biophysical Journal* **94**, 3137–3149 (2008).
 133. Lipfert, J., Doniach, S., Das, R. & Herschlag, D. Understanding Nucleic Acid–Ion Interactions. *Annual Review of Biochemistry* **83**, 813–841 (2014).
 134. Dave, N. & Liu, J. Fast Molecular Beacon Hybridization in Organic Solvents with Improved Target Specificity. *The Journal of Physical Chemistry B* **114**, 15694–15699 (2010).
 135. Varma, A. & Oelmüller, R. *Advanced Techniques in Soil Microbiology*. (Springer Berlin Heidelberg, 2007).
 136. Russell, S., Meadows, L. A. & Russell, R. R. Sequential Versus Simultaneous Scanning and Channel Crosstalk. in *Microarray technology in practice* 112–113 (Academic Press, 2008).
 137. Tan, J. M., Bullo, S., Fakurazi, S. & Hussein, M. Z. Preparation, characterisation and biological evaluation of biopolymer-coated multi-walled carbon nanotubes for sustained-delivery of silibinin. *Scientific Reports* **10**, 16941 (2020).
 138. Perchetti, G. A., Huang, M.-L., Peddu, V., Jerome, K. R. & Greninger, A. L. Stability of SARS-CoV-2 in Phosphate-Buffered Saline for Molecular Detection. *Journal of clinical microbiology* **58**, e01094-20 (2020).