

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

**DESENVOLVIMENTO E CONSTRUÇÃO DE PLATAFORMAS
ANALÍTICAS PORTÁTEIS PARA DETECÇÃO DE RNA VIRAL
VISANDO O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

Daniel Júnior Almeida dos Santos*

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 CAPES

São Carlos – SP

2024



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 Daniel Júnior Almeida dos Santos, realizada em 27/08/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG)

Prof. Dr. André Santiago Afonso (UFVJM)

Profa. Dra. Cristiane Canan (UTFPR Medianeira)

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho (UFSCar)

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

“A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento real. É uma viagem, nunca uma chegada”. **Karl Popper...**

“Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza e, no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferia morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.”
Johann Joachim Becher.

“Senhor, fazei de mim um instrumento da Vossa paz” “Onde há amor e sabedoria, não tem temor e nem ignorância”. **São Francisco de Assis**

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida;

A meu pai Geraldo Almeida (in memoriam) que onde estiver sempre vela por mim;

A minha mãe Terezinha dos santos; A minha irmã Janete Aparecida Almeida pela inspiração. A minha sobrinha Hérika Danielle Almeida Vidal pela parceria neste período de doutoramento e aos meus irmãos Jairo e Dário pelo apoio e incentivo e sempre compreensíveis com as ausências;

O professor Dr. Ronaldo Censi Faria pela oportunidade de ser seu orientando e por tudo que me ensinou tanto âmbito técnico quanto âmbito pessoal ao qual serei eternamente grato;

Ao professor Dr. Oldair Donizeti Leite e a Dra. Tássia Regina de Oliveira pela amizade e pelas imensas contribuições feita a este trabalho;

A todos amigos e colegas da universidade, aos membros do grupo de pesquisa e a todos que estiveram comigo compartilhando todos os momentos;

Ao LABBES (Laboratório de Analítica, Bioanalítica, Biossensores, Eletroanalítica e Sensores) da UFScar (Universidade Federal de São Carlos) na pessoa do Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho pelas parcerias e contribuições.

A todos órgãos de fomento, em especial a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo bolsa concedida;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Muito

Obrigado a todos!

Lista de abreviaturas

ABS	Acrilonitrila butadieno estireno (ABS do inglês <i>acrylonitrile butadiene styrene</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (BSA do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
DeD	Dispositivo eletroquímico descartável
DNA	Ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (DPV do inglês <i>differential pulse voltammetry</i>)
DTT	DL-ditiotreitol
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>)
FDM	Filamento de deposição fundida (FDM do inglês <i>fused deposition filament</i>)
GNRs	Nanobastões de ouro (GNRs do inglês <i>gold nanorods</i>)
HCR	Reação em cadeia de hibridização (HCR do inglês <i>Hybridization chain reaction</i>)
HQ	Hidroquinona

HRP	peroxidase de raiz do rábano (HRP do inglês <i>horseradish peroxidase</i>)
HSL	Matiz, saturação e luminosidade (HSL do inglês <i>hue, saturation, and lightness</i>)
HSI	Matiz, saturação e intensidade (HSI do inglês <i>hue, saturation, and intensity</i>)
HSV	Matiz, saturação e valor (HSV do inglês <i>hue, saturation, and value</i>)
ID	Imagens digitais
m-bio	magneto-bioconjugado
MES	Ácido 4-morfolineetanossulfônico
NE	Tampão NE
NHS	N-hidroxisuccinimida
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>)
PDE	Plataforma para detecção eletroquímica
PETG	Poli tereftalato de etileno modificado com glicol (PETG do inglês)
PID	Plataforma com detecção com detecção por imagem digital
PLA	poli (ácido láctico) (PLA do inglês <i>poly (lactic acid)</i>)
PM	Partículas magnéticas

PVC Policloreto de vinila (PVC do inglês *polyvinyl chloride*)

(polyethylene terephthalate glycol) são bastante utilizados.

PRRSV Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV do inglês *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*)

RNA Ácido ribonucleico (RNA do inglês *ribonucleic acid*)

RT-PCR Transcrição Reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

RT-qPCR Quantitativo em Tempo Real com Transcrição Reversa (RT-qPCR do inglês *Quantitative Real-Time Reverse Transcription Reação em cadeia da polimerase*)

scDNA Sonda de captura de DNA

sdDNA Sonda de detecção de DNA

ssDNA Ácido desoxirribonucleico de fita simples (ssDNA do inglês *single-stranded DNA*)

TE Tampão tris -HCl e EDTA

TMB 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

Tris-HCl Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano

TW20 Tween-20

Lista de tabelas

TABELA 1.1- Técnicas de detecção de vírus e suas características.....	5
TABELA 3.1- Sequências das fita simples de DNA utilizadas como alvos, scDNA e sdDNA referentes aos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A.	30
TABELA 4.1- Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no presente trabalho com a literatura envolvendo métodos eletroquímicos para detecção de SARS-CoV-2 e/ou Influenza A.	51
TABELA 4.2- Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no presente trabalho com a literatura, envolvendo técnica de análise para detecção do vírus Influenza A.	61

Lista de figuras

FIGURA 1.1- Histórico das doenças causadas pelo vírus Influenza.	2
FIGURA 1.2- Histórico das doenças causadas pelos Coronavírus.	3
FIGURA 3.1- Procedimento para obtenção dos dispositivos eletroquímicos: 1) Corte do template no vinil adesivo; 2) Transferência do vinil para a folha de transparência; 3) Deposição da tinta de carbono, 4) Cura da tinta de carbono; 5) Aplicação da tinta de Ag AgCl; 6) Cura da tinta de Ag AgCl; 7) Remoção do vinil adesivo; 8) Corte e aplicação do delimitador; 9) Aquecimento e prensagem dos eletrodos; 10) Eletrodos prontos para uso.	18
FIGURA 3.2- Representação do desenho da PDE com vistas inferior, superior e lateral pronto para impressão feito no programa Inventor Pro 2023.	19
FIGURA 3.3- Projeto da PID: A) base do dispositivo B) placa de detecção C) câmara de detecção.	22
FIGURA 3.4- Imagem do PID: A) placa de 66 poços; B) base; C) câmara de detecção; D) orifício de entrada da câmera digital; E) câmera digital; F) câmera digital posicionada; G) alinhamento da placa com a câmera digital; H) fonte de iluminação; I) delimitação da área de captura de imagem; J) início captura das imagens na primeira linha de poços; K) início captura das imagens na segunda linha de poços.	23
FIGURA 3.5- Imagem real do PID construído. A) placa sob a base B) conjunto câmara de detecção, base e placa C) conjunto câmara de detecção, base, placa e interface de detecção.	24
FIGURA 3.6- Interface da PID A) componentes eletrônicos da PDI B) captura de tela do programa de controle SisGARQ C) vista lateral esquerda D) vista lateral direita F) vista frontal G) vista em perspectiva.	26

- FIGURA 3.7-** Interface do programa de controle SisGARQ ao final do processamento das medidas obtidas com o PID. 28
- FIGURA 3.8-** Modificação das PM A) imobilização covalente da scDNA com as PM B) etapa de bloqueio dos grupos carboxila ativados por EDC/NHS não imobilizados covalentemente com scDNA. 32
- FIGURA 3.9-** Etapas do ensaio genomagnético utilizado para a captura e separação tanto do RNA viral SARS-CoV-2 quanto do Influenza. 34
- FIGURA 3.10-** A) Representação do m-bio formado B) Componentes dos m-bio da SARS-CoV-2 e Influenza A. 35
- FIGURA 3.11-** Etapa de detecção do RNA alvo previamente capturado pela técnica eletroquímica de DPV. 36
- FIGURA 3.12-** Etapa de detecção do RNA alvo por imagem digital. 37
- FIGURA 4.1-** O sistema de detecção em que um celular conectado a um mini potenciostato fica alojado em um suporte produzido por uma impressora 3D. O mini potenciostato, por sua vez, é conectado a um dispositivo eletroquímico descartável, e, abaixo dele, há um ímã de neodímio fixado no suporte. 38
- FIGURA 4.2-** Estudo da influência da resposta de corrente para a detecção do RNA viral usando HRP e com poli-HRP em diferentes diluições; A) resposta obtidas para HRP e B) para poli-HRP, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 40
- FIGURA 4.3-** Avaliação da influência da diluição da amostra, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 41
- FIGURA 4.4 -** Influência da concentração de sdDNA utilizada para na imobilização das PM na resposta o teste genomagnético, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 42
- FIGURA 4.5-** Avaliação do tempo de hibridização: A) das MP contendo as sondas na captura e o alvo SARS-CoV-2; B) do tempo de incubação do bioconjugado strep-poli-HRP com m-bio contendo o alvo já capturado, Valor obtido descontando o

branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 43

FIGURA 4.6- Avaliação da influência da quantidade de MP, contendo o alvo capturado, a ser adicionado na superfície do eletrodo, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 44

FIGURA 4.7- Avaliação da reprodutibilidade de medidas voltamétricas de oito eletrodos, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 45

FIGURA 4.8- Otimização de parâmetros utilizados na DPV sendo A) E_{step} B) t_{pulse} C) E_{pulse} , Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 46

FIGURA 4.9- Avaliação da reação cruzada para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A. A) branco do ensaio do SARS-CoV-2(BS); Branco do ensaio do SARS-CoV-2 + alvo Influenza A (BS + AI); ensaios do SARS-CoV-2 (ES); ensaio do SARS-CoV-2 + alvo Influenza A (ES +AI). B) branco do ensaio da Influenza A (BI); branco do ensaio da Influenza A + alvo SARS-CoV-2 (BI +AS); ensaio da Influenza A (EI); ensaio da Influenza A + alvo SARS-CoV-2 (EI + AS), Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3). 47

FIGURA 4.10- A) Respostas de DPV obtidas pela aplicação do ensaio genômico utilizando amostra negativa de saliva fortificada com SARS-CoV-2 na faixa de concentração de 5,0 a 600,0 fmol L⁻¹. DPV parâmetros aplicados: $v = 0,01 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{pulse} = 0,012\text{V}$, $E_{step} = 0,12\text{V}$, and $t_{pulse} = 0,040\text{s}$. B) Cuva de calibração para-SARS-CoV-2. C) Curvas DPV obtidas para o alvo do vírus Influenza A na faixa de concentração de 1,0 a 500,0 fmol L⁻¹. Parâmetros DPV aplicados: $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$, $E_{pulse} = 0,012 \text{ V}$, $E_{step} = 0,12 \text{ V}$, e $t_{pulse} = 0,040 \text{ s}$. D) Curvada de calibração para vírus Influenza A. (n = 3). 49

FIGURA 4.11- A) Curva ROC para detecção do RNA do SARS-CoV-2 usando o ensaio genômico. B) Diagrama de pontos interativo referentes a detecção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de saliva. Ponto de corte >46,5 pmol L⁻¹ (*teste t, p <0,001; MedCalc, n=3). C) Curva ROC para o vírus Influenza A. D) Diagrama

de pontos interativo das concentrações alvo de RNAs dos vírus Influenza A em amostras de saliva. Ponto de corte $>14,8 \text{ pmol L}^{-1}$ (*teste t, $p < 0,001$; MedCalc, $n=3$).
..... 54

FIGURA 4.12- Estudo da influência da diluição da amostra de saliva para a detecção alvo para diagnóstico de Influenza A. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 ($n=3$). 56

FIGURA 4.13- Estudo da concentração das sondas de detecção. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 ($n=3$). 57

FIGURA 4.14- Avaliação da influência das diluições da: A) enzima HRP e B) da enzima poli-HRP. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 ($n=3$). 58

FIGURA 4.15- Avaliação dos tempos de: A) hibridização e B) de incubação da enzima poli-HRP. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 ($n=3$). 59

FIGURA 4.16- Resposta de RGB em função da concentração do alvo de RNA da Influenza. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 ($n=3$). 60

Resumo

DESENVOLVIMENTO E CONSTRUÇÃO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS PORTÁTEIS PARA DETECÇÃO DE RNA VIRAL VISANDO O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS. As infecções respiratórias virais representam uma grande ameaça à saúde da população em todo o mundo. Em muitos casos, a COVID-19 apresenta sintomas que podem ser confundidos com a Influenza, doença causada pelos vírus Influenza A. Um ensaio simples, rápido e seletivo, capaz de identificar o agente etiológico e diferenciar as doenças é essencial para proporcionar o correto manejo clínico ao paciente. Aqui, descrevemos o desenvolvimento de um ensaio genomagnético para a captura seletiva do RNA dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A em amostras de saliva empregando dois sistemas portáteis de análises, constituídos de uma plataforma para detecção eletroquímica (PDE) e uma plataforma com detecção por imagem digital (PID). Os métodos propostos apresentaram excelente desempenho na detecção e quantificação do RNA viral, sendo que a PDE apresentou um limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ) de 5,0 fmol L⁻¹ e 8,6 fmol L⁻¹ para SARS-CoV-2 e 1,0 fmol L⁻¹ e 108,9 fmol L⁻¹ para Influenza, respectivamente. Já a PID foi aplicada para detecção do vírus Influenza A e apresentou LoD e LoQ para o de 0,093 pmol L⁻¹ e 0,310 pmol L⁻¹, respectivamente. Os ensaios genomagnéticos foram empregados para avaliar a presença dos vírus em 36 amostras de saliva de voluntários e os resultados foram concordantes com os obtidos pela reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), demonstrando a viabilidade dos métodos proposto para o diagnóstico de COVID-19 e Influenza com capacidade de aplicação no ponto de atendimento.

Palavras chave: Ensaio genomagnético; detecção de RNA; teste molecular; eletrodos descartáveis; imagem digital; modelagem e impressão 3D.

Abstract

DEVELOPMENT AND CONSTRUCTION OF PORTABLE ANALYTICAL PLATFORMS FOR THE DETECTION OF VIRAL RNA AIMING AT THE DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES. Viral respiratory infections represent a major threat to the health of the population around the world. In many cases, COVID-19 presents symptoms that can be confused with Influenza, a disease caused by the Influenza A virus. A simple, rapid, and selective assay, capable of identifying the etiological agent and differentiating the diseases, is essential to provide the correct management clinician to the patient. Here, we describe the development of a genomic assay for the selective capture of SARS-CoV-2 and Influenza A virus RNA in saliva samples using two portable analysis systems, consisting of a platform for electrochemical detection (PDE) and a platform with digital image detection (PID). The proposed methods showed excellent performance in the detection and quantification of viral RNA, with PDE presenting a limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) of 5.0 fmol L^{-1} and 8.6 fmol L^{-1} for SARS-CoV-2 and 1.0 fmol L^{-1} and $108.9 \text{ fmol L}^{-1}$ for Influenza, respectively. PID was applied to detect the Influenza A virus and presented LoD and LoQ for $0.093 \text{ pmol L}^{-1}$ and $0.310 \text{ pmol L}^{-1}$, respectively. Genomagnetic assays were used to evaluate the presence of viruses in 36 saliva samples from volunteers and the results were in agreement with those obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), demonstrating the viability of the proposed methods for diagnosis. of COVID-19 and Influenza with point-of-care capability.

Keywords: Genomagnetic assay; RNA detection; molecular test; disposable electrodes; digital image; 3D modeling and printing.

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 - Doenças infecciosas	1
1.2 - Testes de rotina em análises clínicas	4
1.3 - Partículas magnéticas	7
1.4 - Sondas de DNA.....	8
1.5 - Sensores e biossensores eletroquímicos.....	9
1.6 - Eletrodos impressos.....	10
1.7 - Técnica de serigrafia	11
1.8 - Técnica de modelagem e impressão 3D.....	12
1.9 - Detecção por imagem digital	12
Capítulo 2 - Objetivo.....	14
Capítulo 3 - Experimental	15
3.1 - Materiais, reagentes e equipamentos.....	15
3.2 - Desenvolvimento e construção de um Dispositivo Eletroquímico Descartável.....	16
3.3 - Fabricação de uma Plataforma de Detecção Eletroquímica (PDE) por modelagem e impressão 3D para uso com o DeD.....	18
3.4 - Fabricação da Plataforma de Detecção por Imagem Digital (PID) por modelagem e impressão 3D	20
3.5 - Interface de controle e análise de imagens digitais.....	25
3.6 - Captura e análise das imagens digitais.....	27
3.7 - As sequências de nucleotídeos constituintes do genoma dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A.....	29

3.8	- Modificação das partículas magnéticas com as ssDNAs utilizadas como sondas de captura	29
3.9	- Ensaio genomagnético com as sondas de DNA de detecção conjugada com biotina, de captura do DNA alvo e de incubação com o marcador eletroquímico	33
3.10	- Detecção do RNA alvo via técnica eletroquímica	35
3.11	- Detecção do RNA alvo por imagem digital	36
Capítulo 4 - Resultados e discussão		38
4.1	- Fabricação do suporte DeD por modelagem e impressão 3D	38
4.2	- Otimização dos parâmetros do ensaio genomagnético comum aos dois métodos desenvolvidos	39
4.3	- Avaliação de reatividade cruzada na detecção dos genomas dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A	46
4.4	- Avaliação da capacidade do ensaio genomagnético eletroquímica proposto para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A	48
4.5	- Detecção de RNA dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A em amostras de saliva utilizando o teste genomagnético e DeD	52
4.6	- Plataforma analítica portátil com detecção por imagem digital	55
4.7	- Estudo de reatividade cruzada na presença do vírus SARS-CoV-2 para a detecção da Influenza A com a PID.	62
4.8	- Aplicação da PID para a detecção do RNA do vírus Influenza A em amostras de saliva de pacientes diagnosticados por RT-PCR e de indivíduos saudáveis	64
Capítulo 5 - Conclusões		67
Capítulo 6 - Referências bibliográficas		68
ANEXO I		84
ANEXO II		86

Capítulo 1 – Introdução

1.1 - Doenças infecciosas

Nos últimos 40 anos, o mundo tem sido exposto a epidemias recorrentes e em grande escala de novos vírus emergentes, incluindo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da gripe pandêmica (H1N1), Ebola (EBOV), Zika vírus (ZIKV), e os coronavírus responsáveis pela síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) causadora da COVID-19^{1,2}.

O vírus Influenza é responsável por infecções epidêmicas em todo o mundo causando doenças sazonais graves, que podem ter como consequências quadros graves que levam a hospitalização, internação em terapia intensiva e até a morte³. Existem três tipos principais do vírus da Influenza: Influenza A (HA), Influenza B (HB) e Influenza C (HC). Dos três tipos principais de Influenza, a HA é a mais comum, e pode infectar tanto humanos quanto outros animais, como aves e mamíferos, e possuem subtipos que são baseados em duas proteínas na superfície do vírus: hemaglutinina e neuraminidase. Existem 18 subtipos de hemaglutinina e 11 subtipos de neuraminidase conhecidos em vírus da Influenza A, resultando em uma variedade de subtipos possíveis, como H1N1, H3N2, entre outros⁴. A FIGURA 1.1 traz um pouco do histórico de alguns subtipos da doença⁵⁻⁷.

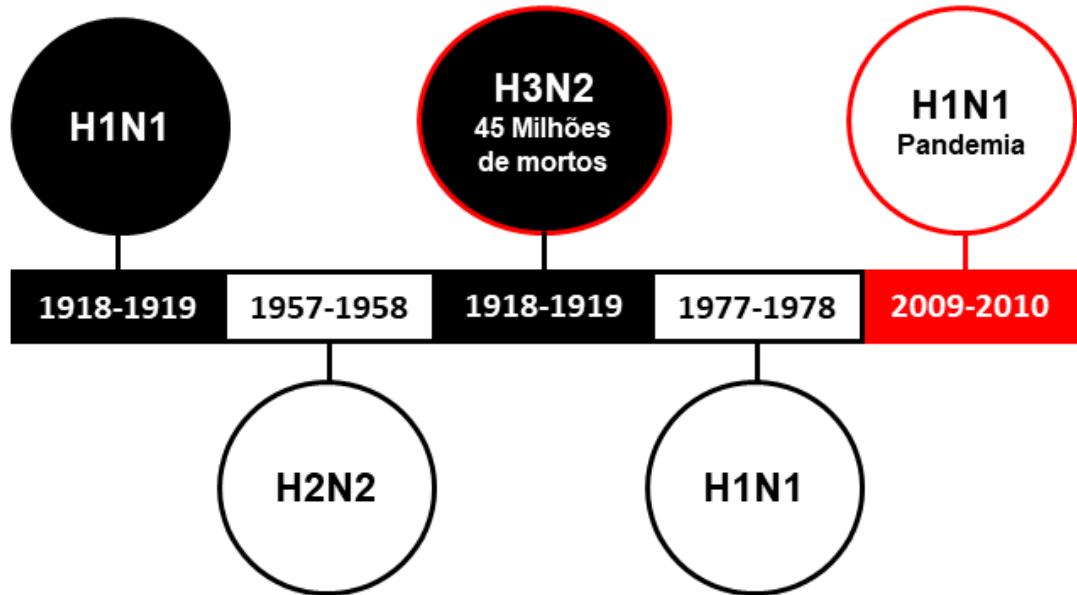


FIGURA 1.1- Histórico das doenças causadas pelo vírus Influenza.

No cenário mais contemporâneo, a Influenza, causada pelo vírus HA, de origem suína, foi um dos subtipos que maior incidência. Com origem no México no início de 2009, a doença se espalhou rapidamente pelo mundo, dando origem a uma pandemia que foi declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de junho do mesmo ano⁸. Em seu primeiro ano de circulação, o vírus H1N1 causou em 2009, cerca de 201.200 óbitos no mundo⁹, sendo que no Brasil, 2.051 óbitos e mais de 44 mil casos da doença foram confirmados, naquele mesmo ano, segundo dados do Ministério da Saúde (MS)¹⁰. Desde então, vários outros subtipos de Influenza A surgiram, causando surtos em diferentes países¹¹.

O coronavírus é uma linhagem de uma grande família de vírus, que foi isolada pela primeira vez na década de 1930, e são comuns em muitas espécies diferentes de

animais, incluindo camelos, bovinos, gatos e morcegos que, em casos raros, são zoonóticos (vírus que são transmitidos entre animais e humanos). Estes vírus podem ser classificados em quatro gêneros (α , β , γ e δ), ¹²⁻¹⁵. Dos quatro gêneros, o β -coronavírus é o que levou a ocorrência das síndromes SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. A FIGURA 1.2 mostra o histórico dessas enfermidades.



FIGURA 1.2- Histórico das doenças causadas pelos Coronavírus.

Os coronavírus são vírus de ácido ribonucleico (RNA do inglês *ribonucleic acid*) que possuem basicamente quatro proteínas estruturais, envelope (E), matriz (M) e nucleocapsídeo (N) e podem causar no indivíduo um espectro clínico variando de infecções assintomáticas a quadros graves ¹⁶.

Os três tipos de coronavírus foram responsáveis por epidemias em grande escala, no entanto, o MERS-CoV apresentou a maior taxa de letalidade, mas a taxa de transmissão do SARS-CoV-2 mostrou-se muito maior que as dos demais, sendo que foi observado capacidade de um indivíduo infectar de uma a três pessoas ¹⁷. Sua transmissão se dá principalmente pela exposição dos indivíduos ao aerossol gerado por uma pessoa infectada. Depois da infecção, este vírus é primeiro observado na mucosa nasal e na boca, e posteriormente nos pulmões, podendo levar a óbito. Tem sido relatado que os vírus também podem causar lesões em diferentes órgãos levando a diversos tipos de sequelas ¹⁸.

1.2 - Testes de rotina em análises clínicas

Os patógenos são um grande desafio para saúde pública mundial que, historicamente, enfrentam enormes dificuldades em identificar e diagnosticar doenças cuja disseminação segue clinicamente oculta. Especialmente em populações vulneráveis, que tem acesso limitado aos procedimentos de controle sanitário e estão mais sujeitos em casos de ameaça viral emergente¹⁹. Um diagnóstico preciso e rápido é crucial para enfrentamento de uma doença e algumas técnicas para detecção de vírus têm sido utilizadas¹⁶. Os testes para diagnóstico dependem do tipo e das características do vírus. Na TABELA 1.1 são apresentadas algumas técnicas de detecção de vírus utilizadas na rotina em análises clínicas e algumas de suas características.

TABELA 1.1-Técnicas de detecção de vírus e suas características

Técnica	Alvo para detecção	Tempo de análise	Amostras	Estágio da doença
Fluxo lateral	Anticorpo (menos comumente Antígeno)	15-20min	Sangue ou Swab oro ou nasofaringe	Estágio avançado para anticorpo e inicial para antígeno
ELISA	Anticorpo (menos comumente Antígeno)	2-4h	Soro ou plasma	Estágio avançado para anticorpo e inicial para antígeno
RT- PCR	RNA	3-4h	Swab oro ou nasofaringe, saliva	Estágios iniciais
Sequenciamento genético	RNA	3 dias	Swab oro ou nasofaringe, saliva	Estágios iniciais

Os testes que envolvem a técnica de fluxo lateral, também chamada de imunocromatográfico ou teste rápido, permitem avaliar a presença ou não de anticorpos ou antígenos no sangue, sendo possível utilizar outros fluidos biológicos^{20,21}. Estes testes requerem muito pouco treinamento para serem utilizados e não dependem de laboratórios especializados. Todavia, a tecnologia tem como desvantagem possíveis falsos positivos devido a possíveis reações cruzadas com compostos similares presentes na matriz da amostra^{22,23}. Como a grande maioria destes testes são para detecção de anticorpo, o seu uso só permite avaliar se o indivíduo tem o vírus em estágio avançado ou mesmo se ele já teve a doença, sendo

mais difícil o diagnóstico nos estágios iniciais devido à baixa sensibilidade. Desta forma, o uso do dispositivo para a testagem em massa com o objetivo de monitorar a população e isolar os indivíduos diagnosticados torna-se limitado²⁴⁻²⁸.

O ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) é uma técnica bem estabelecida para a detecção e quantificação de proteínas, sejam antígenos ou anticorpos e bastante difundida sem laboratórios de análise clínicas ou mesmo hospitais^{29,30}. No entanto, a técnica é largamente aplicada para a detecção de anticorpos, no caso da COVID-19, e como já colocado acima permite somente o diagnóstico tardio a doença. Apesar de a técnica permitir a detecção de várias amostras simultaneamente a técnica é complexa em termos de execução, possui custo relativamente elevado e não tem características para a sua aplicação em larga escala visando uma testagem em massa³¹⁻³³.

A transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) é conhecida como teste molecular e permite o diagnóstico da COVID-19 por meio da detecção do RNA do vírus SARS-CoV-2. A técnica é o padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19 em estágios iniciais sendo utilizada na grande maioria dos casos de forma qualitativa^{34,35}. O RT-PCR é utilizado largamente para a detecção do RNA viral em amostras de Swab oro ou nasofaringe podendo, em alguns casos, ser aplicado em amostras de saliva. Todavia, a técnica possui como desvantagens a elevada complexidade, elevado custo e a muito baixa disponibilidade inclusive em laboratórios de análises clínicas estando mais restrita a grandes centros e a laboratórios de pesquisa, não sendo, portanto, uma técnica viável para aplicação em locais remotos^{13,16,36,37}.

Embora os métodos apresentados estejam disponíveis para o diagnóstico de doenças virais, cada tecnologia possui limitações que incluem limites com relação a precisão ou não apresentam baixos limites de detecção, necessidade de etapas

complexas de preparação da amostra, elevado tempo de resposta, instrumentação de alto custo e elevada complexidade, dificuldade de aplicação em grande escala, necessidade de pessoal técnico altamente qualificado ou ainda baixa ou falta de portabilidade, principalmente visando o diagnóstico precoce em regiões distantes de grandes centros^{14,15,31}.

Portanto, há uma necessidade premente de novos métodos que superem tais limitações e tenham como características a facilidade de operação, portabilidade e disponibilidade em grande escala para testagem em massa e que leve em consideração a versatilidade do vírus em termos da sua capacidade de replicação, com detecção eficiente e rápida e que permita o diagnóstico nos estágios iniciais³⁶.

1.3 - Partículas magnéticas

As partículas magnéticas (PM) são constituídas em sua grande maioria por óxido de ferro (Fe_2O_3 ou Fe_3O_4 ou misturas destes), podendo ou não estar recobertas com outros metais a exemplo do ouro e prata^{38,39}. As PM têm sido utilizadas no desenvolvimento de métodos para detecção de biomarcadores com muito sucesso podendo ser empregadas diretamente sobre o eletrodo, o que pode levar a resposta com amplificação do sinal analítico decorrente da elevada área superficial e das suas propriedades catalíticas^{40,41}.

Outra funcionalidade está relacionada com a possibilidade de captura e separação do biomarcador da matriz da amostra, eliminando assim a possibilidade de interferência, permitindo ainda a pré-concentração do analito e a detecção com amplificação de sinal⁴². A funcionalização das PM permite ter à disposição diferentes grupos funcionais como: grupos tosila⁴³, amino⁴⁴ e carboxílicos³². Estes grupos

podem ser utilizados em diferentes estratégias para a imobilização de espécies biológicas^{43,45} permitindo uma ampla variedade de aplicações quando empregadas em imunoenaios eletroquímicos.

As PM possuem elevada área superficial e capacidade para ancoramento de biocompostos permitindo a captura e separação do analito com uso de ímãs de baixo custo, evitando, assim, a ação de interferentes, bem como é possível obter a amplificação do sinal analítico devido à pré-concentração do analito ou ainda utilizando marcadores eletroquímicos ancorados as partículas em elevado número^{19,33,46}. As características intrínsecas das PM têm atraído grande interesse em aplicações na área de saúde, uma vez que às mesmas podem propiciar limites de detecção ultrabaixos para quantificação de biomarcadores^{47,48,49}.

1.4 - Sondas de DNA

As sondas de DNA são moléculas de ácido desoxirribonucleico de fita simples (ssDNA do inglês *single-stranded DNA*), ou RNA sintéticas que são projetadas para se ligarem especificamente a uma sequência do DNA ou RNA alvo⁵⁰, por meio de pareamento de bases complementares, formando uma dupla hélice estável, permitindo assim a hibridização da sonda com a sequência alvo⁵¹.

As sondas são oligonucleotídeos curtos, fitas simples de DNA ou RNA, compostos de 20 a 60 bases que podem ser ancorados covalentemente a PM^{52,53}, ou se ligarem a alvos com alta afinidade e especificidade^{54,55}. Elas são amplamente utilizadas em técnicas de biologia molecular, como RT-PCR³⁷, hibridização in situ⁵⁶, micro arranjos de DNA⁵⁷, sequenciamento de DNA e RNA⁵⁸, entre outras aplicações.

As sondas de DNA são ferramentas essenciais em muitas áreas da biologia e biotecnologia, permitindo a detecção específica e sensível de sequências de ácidos nucleicos em uma amostra, com uma ampla gama de aplicações, desde diagnósticos

médicos até pesquisa básica em genética e biologia molecular⁵⁹. Outro fator que diz respeito à utilização de sondas de DNA é a estabilidade quando comparadas de fita de RNA ou anticorpos, e assim, proporciona maior dinâmica na execução dos protocolos para detecção de material genético como analitos⁶⁰.

1.5 - Sensores e biossensores eletroquímicos

O número de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido muito significativo nas últimas três décadas⁶¹⁻⁶³. Estes dispositivos têm sido utilizados visando o desenvolvimento de métodos rápidos e altamente sensíveis para detectar diferentes tipos de biomarcadores. Os biossensores são dispositivos analíticos que combinam um componente biológico com um transdutor para identificar e quantificar substâncias específicas. Eles são amplamente utilizados em diversas áreas, como medicina⁶⁴, biotecnologia^{65,66}, segurança alimentar^{67,68}, meio ambiente⁶⁹ e indústria⁷⁰⁻⁷².

Os biossensores consistem basicamente em três componentes: uma interface que irá reconhecer o analito, em geral contendo um composto biológico, um transdutor, que irá fazer a conversão da interação bioquímica em um sinal elétrico mensurável e um dispositivo que irá fazer a leitura do sinal e apresentação do resultado ao operador⁷³. Esses dispositivos são capazes de detectar a presença e/ou concentração de um analito que pode ser um composto biológico como proteína ou material genético⁷⁴ ou, ainda, microrganismos, metabólitos⁷⁵, pesticidas⁷⁶ entre outros alvos⁷⁷⁻⁷⁹.

1.6 - Eletrodos impressos

O grande desafio no desenvolvimento e aplicação de biossensores eletroquímicos na área clínica está em tornar o uso destes dispositivos viáveis como ferramentas de diagnóstico, bem como em avaliações terapêuticas em pontos de atendimento⁸⁰. Neste sentido, o biossensor para monitoramento de glicose é o grande exemplo de sucesso comercial a décadas, e ainda sim, o sistema continua em constante aprimoramento^{81,82}. Outrossim, diferentes métodos para a construção destes dispositivos vêm sendo estudadas, com o intuito de viabilizar a detecção de outros biomarcadores de forma precisa, reprodutível e com baixos limites de detecção⁸³.

A produção de eletrodos impressos tem ganhado grande atenção devido à versatilidade permitindo construir eletrodos descartáveis nos mais diferentes formatos e arquiteturas de forma simples e com baixo custo. O eletrodo impresso pode ser definido como um filme condutor depositado sobre um suporte não condutor, sendo o filme condutor parcialmente recoberto com um filme isolante, para definir a área exposta dos eletrodos e a dos contatos elétricos^{84,85}.

A fabricação de um sistema contendo eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, pode ser realizada em um mesmo suporte formando uma célula eletroquímica completamente descartável. O filme é formado utilizando-se tintas condutoras à base de carbono ou partículas de metais, que podem ser modificadas para conter compostos de interesse como mediadores redox ou nanomateriais⁸⁶.

A vantagem dos eletrodos descartáveis frente aos eletrodos convencionais tradicionais é sua simplicidade, que permite o desenvolvimento de sistemas portáteis que não necessitam de etapas morosas de limpeza e renovação da superfície eletródica⁸⁷. Além da capacidade de produção em larga escala, facilidade em

modificar a superfície eletródica para detecção de diferentes tipos de analitos e, desenvolvimento de sistemas miniaturizados, o que permitam reduzir as quantidades de amostra e reagentes necessárias para a análise^{84,88}.

1.7 - Técnica de serigrafia

A técnica de serigrafia, também conhecida por *screen-printed*, consiste em depositar a tinta sobre uma máscara negativa que é previamente fixada sob o substrato isolante, a fim de delimitar a área de interesse para a formação dos eletrodos⁸⁹. A possibilidade do uso de diferentes máscaras (telas) possibilita a preparação de diferentes formatos de eletrodos, como também células eletroquímicas com diferentes formatos e contendo múltiplos eletrodos de trabalho^{90,91}. As etapas envolvidas nessa técnica são 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 eletrodos⁹².

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 permitir a integração à dispositivos portáteis⁹³. Arduini e colaboradores⁹⁴ apresentam uma revisão sobre a construção de diferentes biossensores eletroquímicos para análises clínicas, e que foram projetados por técnicas de serigrafia, associados à dispositivos microfluídicos baseados em papel, biossensores enzimáticos vestíveis, detecção com uso de celulares, como também imunossensores eletroquímicos inovadores sem o uso de marcadores, genossensores descartáveis, entre outros⁹⁵.

1.8 - Técnica de modelagem e impressão 3D

Com início em 1984, impressão tridimensional (3D) tem se tornado cada vez mais popular no campo lúdico e na ciência. A tecnologia carrega vantagens únicas de prototipagem e permite a fabricação de modelos tridimensionais complexos de maneira simples a custo relativamente baixo^{96,97}.

Entre os métodos de impressão, a modelagem por deposição fundida (FDM) é a mais difundida e consiste na impressão de objetos mediante a sobreposição de um material via extrusão⁹⁸. Dentre os materiais, os filamentos termoplásticos como poli (ácido láctico) (PLA do inglês *polylactic acid*), acrilonitrila butadieno estireno (ABS do inglês *acrylonitrile butadiene styrene*), poli-tereftalato de etileno modificado com glicol (PETG do inglês *polyethylene terephthalate glycol*) são bastante utilizados⁹⁹.

Todavia, dependendo da aplicação, outros materiais têm sido avaliados e, recentemente, a impressão 3D vem possibilitando aos pesquisadores criarem novos materiais, objetos e dispositivos de detecção eletroquímica, com produção em larga escala, com a geometria desejada e geração mínima de resíduos¹⁰⁰.

Diante da versatilidade da impressão 3D, seu uso mostra-se bastante auspicioso em aplicações eletroanalíticas, voltadas para a construção de novos dispositivos sensores com grande potencial para uso no diagnóstico de doenças¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

1.9 - Detecção por imagem digital

As imagens digitais (ID), principalmente aquelas com propriedades colorimétricas, têm sido utilizadas como método alternativo para detecção de espécies de interesse¹⁰⁵. Uma ID é uma matriz bidimensional de informações (pixels) produzida pela conversão da energia luminosa capturada por sensores ou dispositivos de captura⁷⁸. Quando a radiação eletromagnética interage com a matéria, podem

ocorrer fenômenos como absorção, reflexão, dispersão e refração da luz¹⁰⁶, e a cor de um objeto, conforme percebida pelo olho humano, é o resultado do inverso dos componentes da cor absorvida¹⁰⁷.

Nas ID as informações são salvas no modelo de cores RGB, o que significa que cada pixel compõe um conjunto numérico (variando de 0 a 255) associadas à intensidade da cor em determinado ponto nas regiões Vermelho (R), Verde (G) e Azul (B). Num sistema RGB, um pixel é um vetor composto por três cores monocromáticas, que também podem produzir outros modelos, como matiz, saturação e valor (HSV do inglês *hue, saturation, and value*), matriz, saturação e luminosidade (HSL do inglês *hue, saturation, and lightness*) e matiz, saturação e intensidade (HSI do inglês *hue, saturation, and intensity*)^{107,108}.

Diversos dispositivos (como câmeras, webcams, smartphones, scanners de mesa e endoscópios, entre outros) podem ser utilizados para obter ID que capturem cenas coloridas bidimensionais, em que a intensidade da cor está relacionada à concentração do analito¹⁰⁹. Normalmente são necessárias adaptações para obter uma imagem nítida da mistura reacional, como ajustes na distância focal ou intensidade de iluminação constante para se obter um ambiente uniformemente iluminado, ou fazer ajustes relacionados à geometria tridimensional que compõe a mistura a uma taxa de reação alvo da medição analítica. Essas modificações são particularmente importantes em protocolos de determinação analítica envolvendo ID, no qual são inerentes os fenômenos de absorção, reflexão, dispersão ou refração da luz com a matéria¹¹⁰.

Capítulo 2 - Objetivo

O presente estudo teve por objetivo desenvolver um método genômico para detectar o RNA dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza em amostras de saliva utilizando métodos de detecção eletroquímica e por imagem digital, construir plataformas portáteis utilizando tecnologias de modelagem e impressão 3D e explorar o potencial destas visando o diagnóstico precoce de COVID-19 e Influenza A.

Capítulo 3 - Experimental

3.1 - Materiais, reagentes e equipamentos

A albumina sérica bovina (BSA do inglês *bovine serum albumin*) e estreptavidina- peroxidase de raiz do rábano (HRP do inglês *horseradish peroxidase*) (strep-HRP), estreptavidina-poli-HRP (poli-strep-HRP) (solução de 2 mL GERPN1231-Sigma), peróxido de hidrogênio 30% e hidroquinona (HQ, $\geq 99\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

A tinta de carbono (Electrodag423SS) e de Ag/AgCl (C2051014P10) foram adquiridas da Henkel e Gwent Electronic Materials, respectivamente. O vinil adesivo e o PVC foram adquiridos no mercado local. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra purificada, com condutividade não inferior a 18 M Ω cm, obtida de um sistema Millipore Milli-Q (Bedford, EUA).

O cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, cloreto de magnésio, cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil) - N'-etil carbodiimida (EDC), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), DL-ditiotreitol (DTT), N-hidroxisuccinimida (NHS), tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), Tween-20 (TW20) e tampão ácido 4-morfolineetanossulfônico (MES) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As PM carboxiladas (Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, Invitrogen, com diâmetro de 1 μ m) foram adquiridas da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). O ácido clorídrico foi adquirido da Fluka (S. Harvey St, Muskegon, EUA).

A solução salina tamponada com fosfato (PBS do inglês *phosphate buffer saline*) foi preparada misturando: 10 mmol L⁻¹ de fosfato, 2,7 mmol L⁻¹ de KCl e 137 mmol L⁻¹ de NaCl, o pH era 7,4. Os seguintes tampões também foram preparados: Tampão Tris-EDTA (TE) (pH 7,6-8,0): Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹;

Tampão TE-TW20: tampão TE + 0,05% TW 20, Tampão NE-10x: (pH 7,9): 500 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1,0 mol L⁻¹ NaCl, 100 mmol L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol L⁻¹ TDT; Tampão NE -1x: (pH 7,9), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 100 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, DTT 10 mmol L⁻¹; PBS-TW20: PBS + 0,05% TW 20; e NE-TW20: Tampão NE -1x + 0,05% TW 20.

Um medidor de pH SATRA modelo PHS3BW foi utilizado para medições de pH. Os estudos eletroquímicos foram realizados utilizando um mini potenciostato portátil Sensit/SMART™ Smartphone potentiost (PalmSens, Holanda). O corte do adesivo de vinil foi realizado em impressora a laser (Two Trees, fabricada na China). A homogeneização dos PM foi realizada em banho ultrassônico (modelo USC - 1400, UNIQUE) e agitador de tubo vórtex (modelo AV-2 82328, GEHAKA).

A preparação final do dispositivo eletroquímico descartável (DeD) foi realizada com auxílio de uma impressora de corte a laser Two Trees-TTS-55 Pro, uma prensa térmica (Modelo PTM 38 da F1 - Brasil) para selar e delimitar a área exposta do WE e uma estufa de secagem e esterilização modelo SL-100/81 para cura das tintas.

Foi utilizada uma impressora 3D (modelo Creality, China) para a construção de um suporte com mesa medindo 235 × 235 × 280 mm com nivelamento automático e as peças foram impressas em filamentos de PLA e ABS da 3Dfila. A câmera tipo sonda, lâmpadas de LED e Raspberry pi foram adquiridos no comércio local.

3.2 - Desenvolvimento e construção de um Dispositivo Eletroquímico Descartável

O DeD foi construído usando o método descrito por Afonso et al.¹¹¹. O DeD é composto por um eletrodo de trabalho à base de carbono não modificado, um eletrodo de pseudo-referência de Ag/AgCl (RE) e um contra eletrodo (CE) que foram

impressos sobre uma folha de policloreto de vinila (PVC do inglês *poly-vinyl chloride*) utilizada como substrato.

O dispositivo foi projetado usando um programa de modelagem e em seguida foi criada uma máscara negativa usando um adesivo de vinil, que foi cortado em uma impressora de corte a laser. Posteriormente, a máscara de vinil foi transferida para a lâmina de PVC. Em seguida, a tinta de carbono foi espalhada sobre a máscara de vinil com auxílio de um rodo. Após, o sistema foi colocado em estufa e mantido a 90°C por 60 min para cura da tinta. Uma vez finalizada a cura da tinta Ag/AgCl foi aplicada, com auxílio de um pincel, para formar o eletrodo de referência e em seguida levado à estufa por 30 min a 60°C. Em seguida, o adesivo vinílico foi removido e uma máscara de vinil foi fixada para delimitar a área do eletrodo de trabalho e do contato elétrico e o DeD estava pronto para uso. A representação do procedimento de fabricação do DeD é apresentada na FIGURA 3.1.

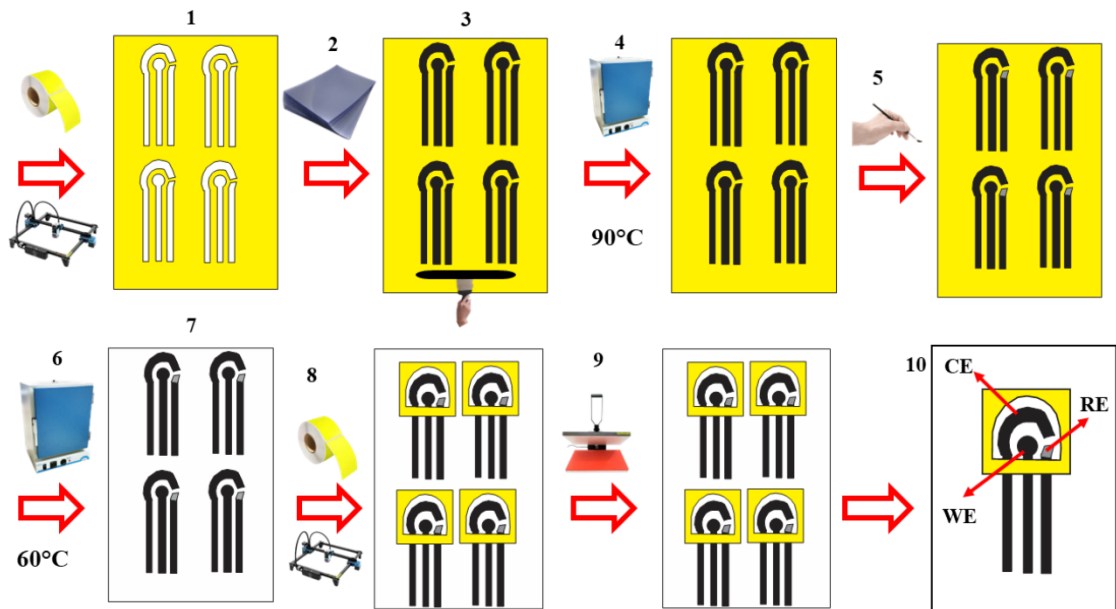


FIGURA 3.1- Procedimento para obtenção dos dispositivos eletroquímicos: **1)** Corte do template no vinil adesivo; **2)** Transferência do vinil para a folha de transparência; **3)** Deposição da tinta de carbono, **4)** Cura da tinta de carbono; **5)** Aplicação da tinta de Ag|AgCl; **6)** Cura da tinta de Ag|AgCl; **7)** Remoção do vinil adesivo; **8)** Corte e aplicação do delimitador; **9)** Aquecimento e prensagem dos eletrodos; **10)** Eletrodos prontos para uso.

3.3 - Fabricação de uma Plataforma de Detecção Eletroquímica (PDE) por modelagem e impressão 3D para uso com o DeD

O DeD foi utilizado sem nenhuma modificação, sendo necessário o uso de um pequeno ímã posicionado externamente sob o eletrodo de trabalho para o seu uso. Para facilitar o uso do sistema, foi desenvolvida e construída por modelagem e impressão 3D a PDE cuja imagem é apresentada na FIGURA 3.2. A PDE foi projetada para suportar o DeD e ser utilizada com um potenciostato portátil acoplado a um celular para controle a aquisição de dados. A PDE foi fabricada utilizando uma

impressora 3D e foi utilizado o filamento PLA. O filamento PLA é constituído de matéria-prima renovável, de fácil produção, biodegradável e de baixo custo¹¹². Além disso, o PLA não requer altas temperaturas em comparação com outros materiais de impressora 3D, o que torna menos provável que a extrusora apresente problemas durante a impressão, o que não é incomum com outros filamentos, tornando as peças resistentes e com ótimo acabamento¹¹³. O protótipo foi desenvolvido e modelado utilizando o programa Autodesk Inventor Pro 2023 e fatiado no Ultimaker Cura versão 4.8.0.

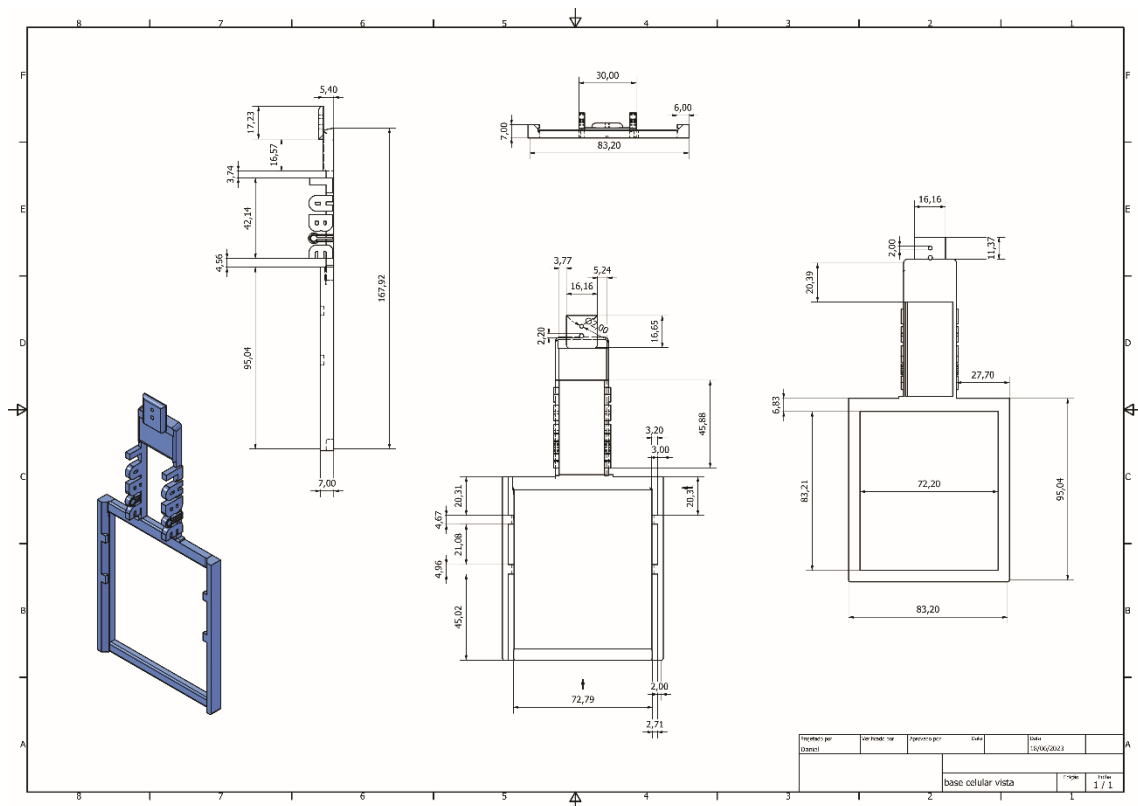


FIGURA 3.2- Representação do desenho da PDE com vistas inferior, superior e lateral pronto para impressão feito no programa Inventor Pro 2023.

3.4 - Fabricação da Plataforma de Detecção por Imagem Digital (PID) por modelagem e impressão 3D

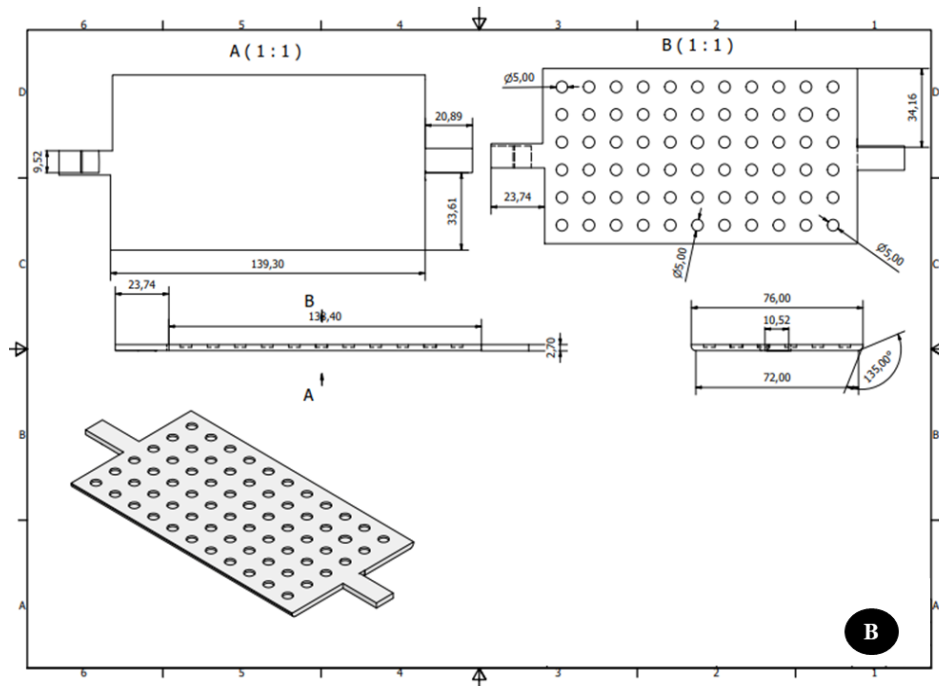
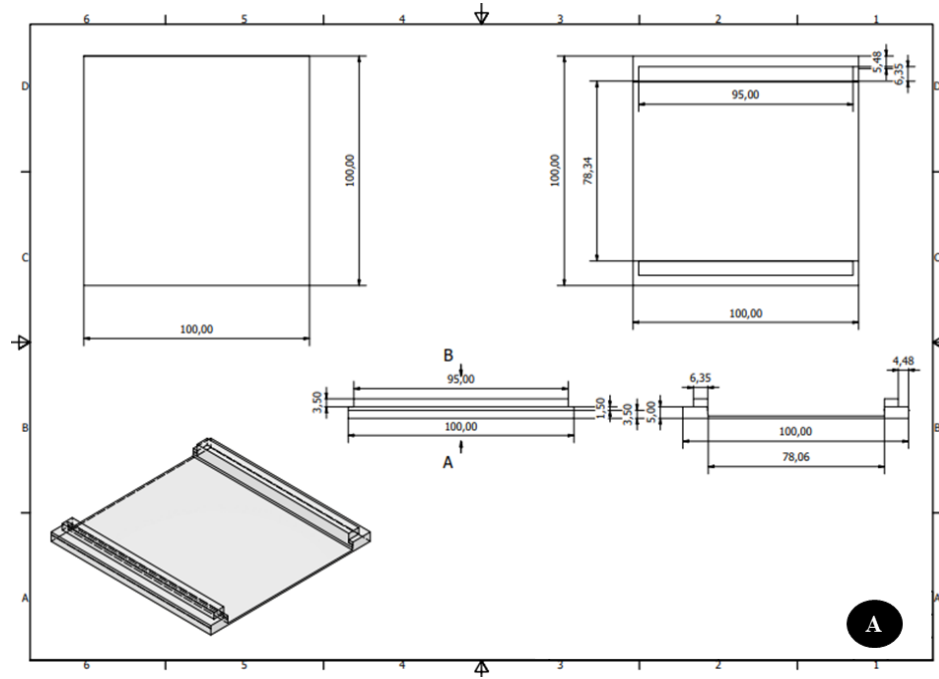
A plataforma de detecção por imagem digital (PID) foi construída por modelagem e impressão 3D e foi desenvolvida para que o protocolo fosse executado de forma ágil e eficiente. A PID foi fabricada em 3 partes utilizando dois tipos de material, filamento PLA e ABS.

O PLA apresenta algumas vantagens quando comparado a outros filamentos, como já discutido no tópico 3.4, porém, apresenta algumas desvantagens como baixa resistência a altas temperaturas, sendo mais permeável à água do que outros materiais, como o ABS, o que limita a sua aplicação em determinados ambientes que possuem alta umidade e mesmo em solução aquosa^{114,115}.

O ABS apresenta algumas vantagens em ambientes úmidos, como baixa absorção de umidade e boa resistência química e mecânica. Devido à baixa capacidade de absorção de água, o ABS é um material ideal para aplicações em soluções aquosas¹¹⁶. Além disso, o ABS é resistente a muitos produtos químicos comuns e possui boa resistência mecânica, tornando-o adequado para aplicações nas quais a peça a ser impressa necessite entrar em contato com produtos químicos ou suportar cargas significativas. Ele também é flexível e pode ser facilmente moldado, usinado ou cortado, bem como soldado ou colado¹¹⁷.

Assim, foram impressas duas partes do PID em PLA, a saber: a base de dimensões de aproximadamente 100 x 100 x 8,5 mm conforme FIGURA 3.3A, e a câmara de detecção de dimensões 100 x 100 x 110 mm com 6 furos na parte superior, de 8 mm de diâmetro cada, para encaixe da câmera digital conforme FIGURA 3.3C. A terceira parte foi impressa em filamento ABS e constitui de uma placa com 66 poços em que cada poço possui 5 mm de diâmetro e 1,6 mm de profundidade. Os

poços estão distribuídos em 6 linhas, cada linha contendo 11 poços conforme mostrado na FIGURA 3.3B.



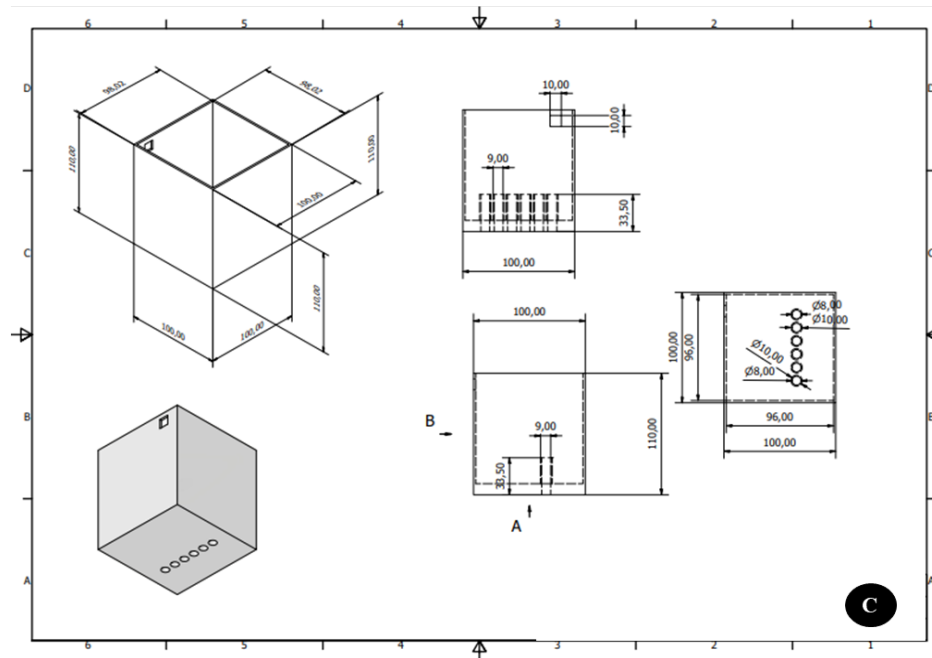


FIGURA 3.3- Projeto da PID: A) base do dispositivo B) placa de detecção C) câmara de detecção.

A PID possuiu três partes principais, sendo uma placa contendo 66 poços (FIGURA 3.4A), uma base no qual a placa desliza sobre (FIGURA 3.4B) e um câmara de detecção (FIGURA 3.4C) que se encaixa na base. A parte superior do câmara de detecção possui seis orifícios (FIGURA 3.4D) onde a câmara digital (FIGURA 3.4E) é posicionada oportunamente (FIGURA 3.4F). Uma vez que a câmara está posicionada, desliza-se a placa sobre a base (FIGURA 3.4G), e posteriormente, delimita-se a região de interesse para captura das imagens digitais. Neste momento, havendo necessidade, é feito o ajuste na iluminação da câmara de detecção, ajustando a fonte de luz que fica localizada na parte de trás da câmara de detecção (FIGURA 3.4H).

Com os devidos ajustes de posicionamento da câmara inicia-se as medidas de cada poço, sequencialmente dentro da primeira linha (FIGURA 3.4J). Ao final da

captura das imagens da primeira linha, posiciona-se a câmera em outro orifício (FIGURA 3.4K) e inicia a medida sequencialmente na segunda linhas de poços e assim sucessivamente. A FIGURA 3.4 descreve essas etapas.

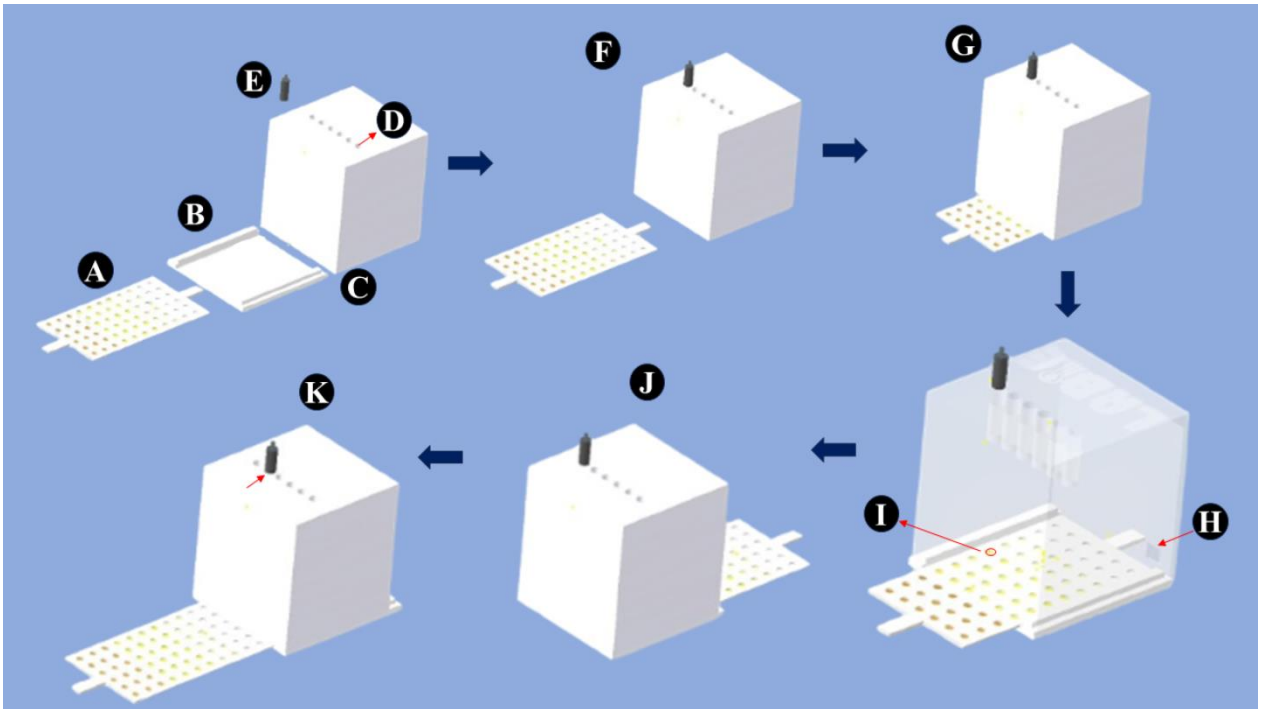


FIGURA 3.4- Imagem do PID: A) placa de 66 poços; B) base; C) câmara de detecção; D) orifício de entrada da câmera digital; E) câmera digital; F) câmera digital posicionada; G) alinhamento da placa com a câmera digital; H) fonte de iluminação; I) delimitação da área de captura de imagem; J) início captura das imagens na primeira linha de poços; K) início captura das imagens na segunda linha de poços.

A câmara de detecção se encaixa perfeitamente na base, gerando um ambiente fechado com espaço apenas para encaixar a placa que contém os poços, que desliza livremente na base. A FIGURA 3.5 mostra a imagem real do sistema.

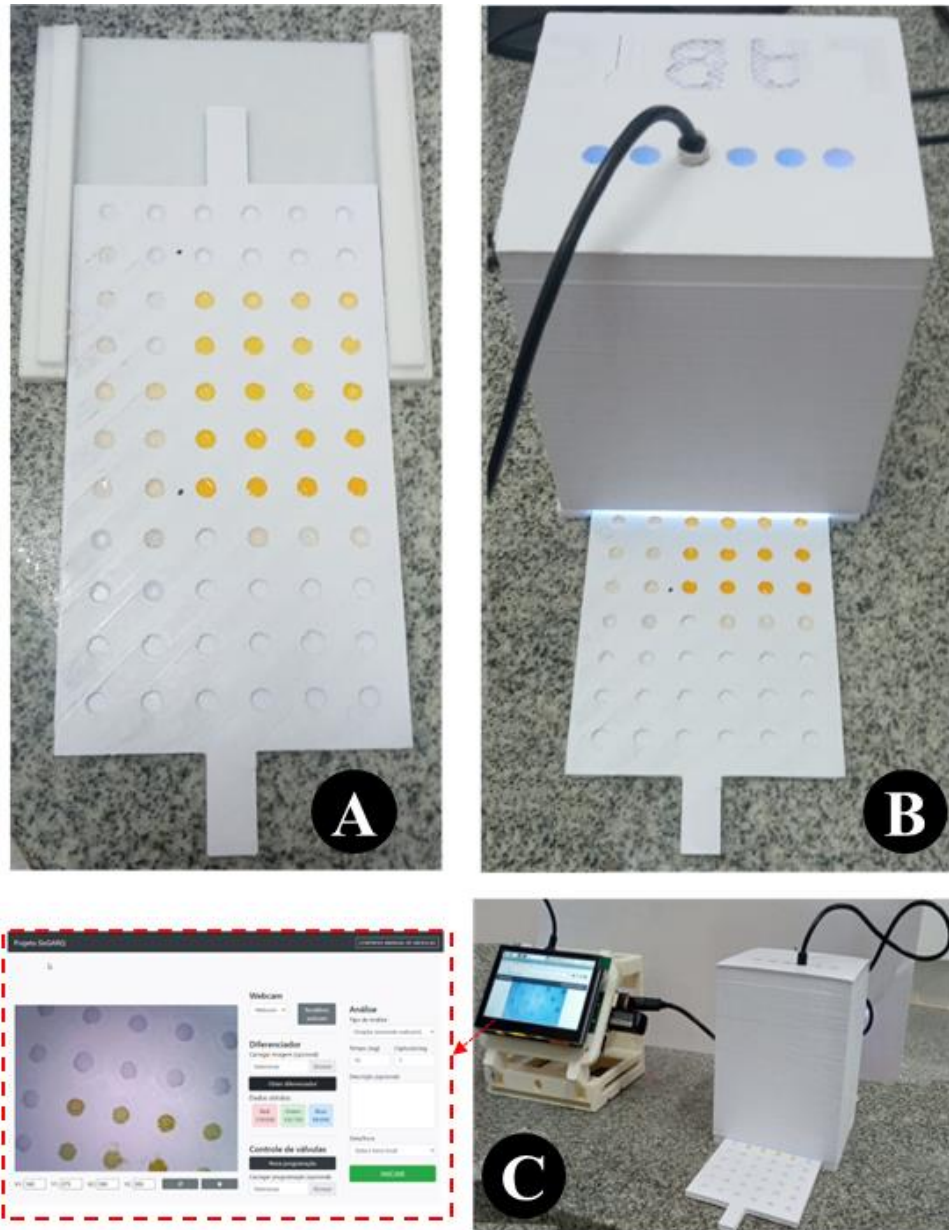


FIGURA 3.5- Imagem real do PID construído. A) placa sob a base B) conjunto câmara de detecção, base e placa C) conjunto câmara de detecção, base, placa e interface de detecção.

A placa contendo os poços é deslocada manualmente até a área de interesse das medidas para cada poço de reação, mantendo assim constante a luminosidade sobre a área de interesse de captura da imagem. As imagens capturadas pela câmera digital carregam informações da luz refletida dos poços, onde ocorrem as reações químicas de interesse.

3.5 - Interface de controle e análise de imagens digitais

Um programa de interface gráfica do usuário (SisGARQ) foi criado, em linguagem Python, e implementado em ambiente web empregando a ferramenta Framework Flask. O programa faz o gerenciamento de uma câmera digital e a aquisição das imagens. Ele permite ainda o controle de um conjunto de até 8 válvulas solenoides de 3 vias (não utilizadas neste trabalho). Essa parte do trabalho foi desenvolvida em parceria com Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UFTPR). Na FIGURA 3.6 são apresentadas a interface de controle e análise de imagens digitais, a capturas de tela do programa de controle SisGARQ e os componentes eletrônicos da PDI.

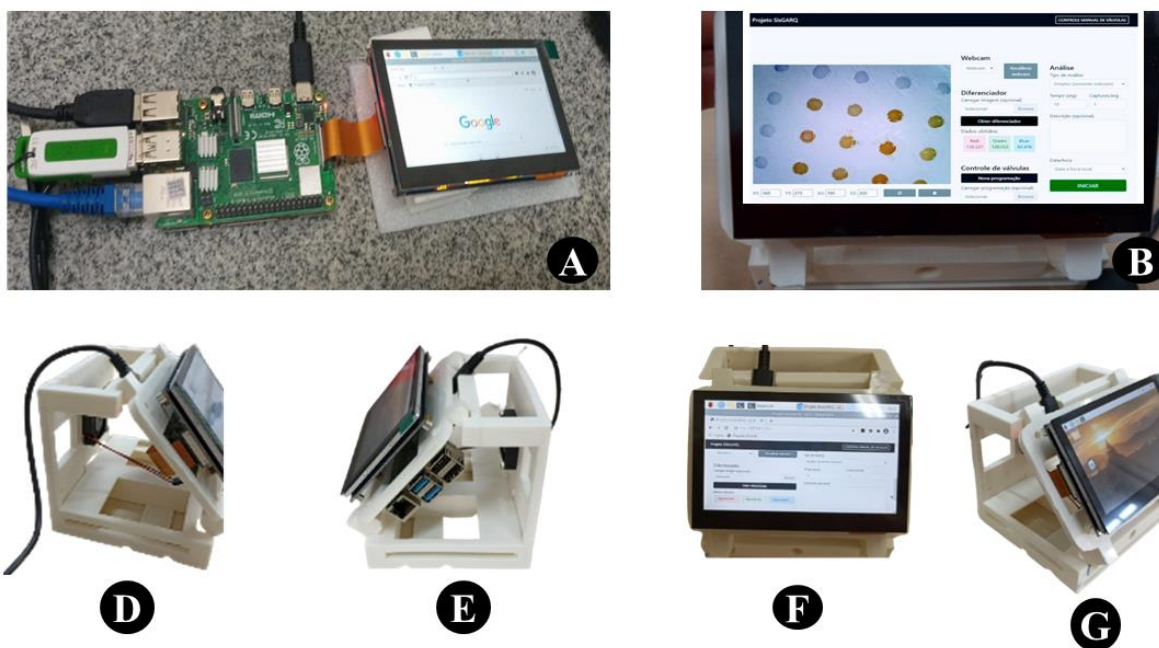


FIGURA 3.6- Interface da PID A) componentes eletrônicos da PID B) captura de tela do programa de controle SisGARQ C) vista lateral esquerda D) vista lateral direita E) vista frontal F) vista em perspectiva G) vista em perspectiva.

A biblioteca utilizada para a obtenção e tratamento das imagens foi a OpenCV Contrib-Python, que permitem o uso das funcionalidades da Open Source Computer Vision Library, uma biblioteca com centenas de algoritmos de visão computacional.

Uma placa com os poços preenchidas com as amostras foi posicionada na PID e a imagem capturada pela câmera foi exibida em tempo real do lado esquerdo da tela. Na região central da tela, tem-se os controles relacionados ao diferenciador (obtenção os valores de R, G e B, referentes as amostras e ao lado, o sistema para controle das válvulas solenoides (que não foi utilizado neste trabalho).

No lado direito da tela apresenta-se as opções relacionada ao gerenciamento do tempo de captura das imagens, bem como a frequência de captura das imagens por segundo. Após o término do procedimento de análise, uma nova janela é aberta

permitindo que o analista tenha acesso aos resultados (na forma de gráficos e planilha de resultados), incluindo outras informações como data, hora da análise, imagens e resultados dos valores de RGB processados.

3.6 - Captura e análise das imagens digitais

Para realização das medidas empregando a câmera digital, seleciona-se uma região de interesse da imagem digital (retângulo em vermelho na FIGURA 3.5). Preliminarmente, realiza-se a captura da imagem do branco, e na sequência, as informações dos pixels da imagem da região delimitada. Os valores médios de R, G e B são calculados e armazenados pelo programa, dados estes, que são utilizados como sinal analítico. A resposta analítica obtida é baseada no cálculo da norma vetorial^{108,109} empregando os valores médios de RGB obtidas do processamento das imagens e utilizando a seguinte equação, baseada na proposta por Gaiao et al.¹¹⁸:

$$\text{Sinal} = \sqrt{(dr - cr)^2 + (dg - cg)^2 + (db - cb)^2}$$

Em que “d” e “c” representam os valores de RGB obtidos na leitura do branco e das regiões de interesse e, “r”, “g”, e “b” representam as informações de cor “red”, “green” e “blue” respectivamente.

Ao final do processamento das medidas, o perfil dos resultados é exibido numa página, onde é possível exportar os dados da análise, o arquivo compactado contendo as imagens (extensão bmp) e/ou um arquivo dos resultados em planilha formato .xlsx, da norma vetorial calculada e valores de RGB extraídos como mostra a FIGURA 3.7.

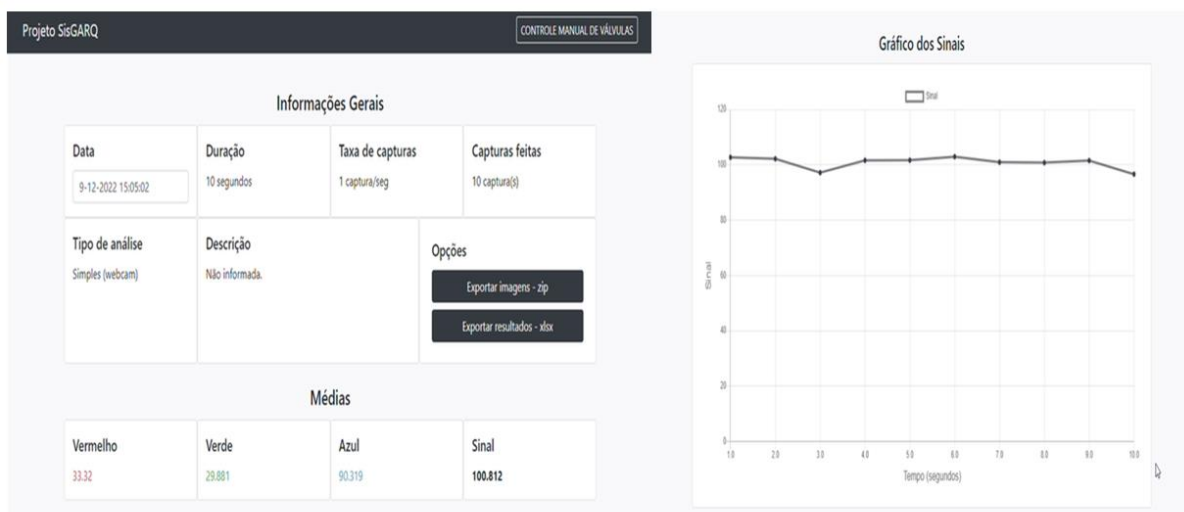


FIGURA 3.7- Interface do programa de controle SisGARQ ao final do processamento das medidas obtidas com o PID.

Considerando o comportamento linear entre a norma vetorial, ou seja, a função que atribui um valor escalar a um vetor, que, no contexto de imagens digitais, pode correlacionar uma série de pixels as características extraídas da imagem¹¹⁹, é possível calcular o número de pixels da imagem capturada pela câmera digital, e assim, pode-se estimar a concentração do analito de interesse¹²⁰. Nestas medidas, as configurações da câmera e do ambiente, tais como brilho, foco e exposição, são mantidas constantes para garantir a estabilidade do sinal^{121–123}.

3.7 - As sequências de nucleotídeos constituintes do genoma dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A

As sequências de nucleotídeos constituintes do genoma do vírus SARS-CoV-2 e Influenza A foram obtidas do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando como referência o GenBank 43740575 para o vírus SARS-CoV-2 e GenBank MT639854.1 para Influenza A. O genoma do vírus SARS-CoV-2 e do genoma do vírus Influenza A são mostradas no ANEXO I.

3.8 - Modificação das partículas magnéticas com as ssDNAs utilizadas como sondas de captura

As PM foram modificadas com sondas ssDNA com sequências complementares a regiões específicas do RNA dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A. Para o SARS-CoV-2, a sequência de ssDNA utilizada como alvo foi complementar a uma região do gene N, e para o Influenza A, a sequência alvo foi específica para a região do gene M1. A TABELA 3.1 apresenta as sequências de ssDNA adquiridas para serem utilizadas como alvos, como scDNAs e como sondas de DNA de detecção (sdDNA).

TABELA 3.1- Sequências das fita simples de DNA utilizadas como alvos, scDNA e sdDNA referentes aos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A.

Identificação	Sequência (5'-3')	Modificador
sequência alvo do gene N do SARS-CoV-2	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	-
scDNA do SARS-CoV-2	[AmC6] TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG	Amina primária
sdDNA do SARS-CoV-2	GGG TCC ACC AAA CGT AAT GC [BtnTg]	Biotina
sequência alvo do gene vírus Influenza A	GCCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTATGTT CCCGAGATCGCCGAGATCG	-
scDNA do vírus Influenza A	[AmC6] TACGTTTCGACCTCGGTTAGAAG	Amina primária
sdDNA do vírus Influenza A	ATCTCGGCTTTGAGGGGGCCTGA [BtnTg]	Biotina

A modificação das PM foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, Invitrogen, 1,0 μm de diâmetro). Resumidamente, a modificação iniciou com a agitação do frasco contendo as PM por 10 min. Em seguida, 100 μl da dispersão de PM foram dispersos em 1 mL de MES 100 mmolL^{-1} pH 4,8 e agitados por 2 min.

Em seguida, as PM foram separadas magneticamente em suporte magnético por 2 min, seguido da remoção do sobrenadante. À dispersão contendo as PM lavados foi adicionado 1 mL da solução composta por 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de scDNA, 10,0

mg mL⁻¹ de EDC e 2,5 mg mL⁻¹ de NHS preparada em água pura. A dispersão foi deixada sob agitação suave durante 6 h à temperatura ambiente para imobilização covalente da sonda de scDNA na superfície das PM, como apresenta FIGURA 3.8A.

Após este tempo, as PM-scDNA foi separada magneticamente por 2 min e o sobrenadante foi removido. Em seguida, as PM foram dispersas em 250 mmol L⁻¹ de Tris-HCl com 0,05% de TW20 e mantidos sob agitação por 30 min. Neste caso, o Tris-HCl tem a função de bloquear os grupos carboxila ativado com EDC/NHS que eventualmente não se ligaram na scDNA. Esta etapa foi repetida mais duas vezes. A FIGURA 3.8B traz a representação das etapas desse processo.

1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC) é um agente de reticulação de comprimento zero solúvel em água. Ele tem sido usado em uma variedade de técnicas de conjugação para acoplar grupos carboxila a amins primárias. O EDC primeiro forma um intermediário éster ativo que então sofre substituição nucleofílica na presença de um nucleófilo forte, como uma amina primária.

A reticulação EDC é geralmente realizada em tampões desprovidos de carboxilas estranhas ou amins primárias em pH fisiológico. Embora a química da reticulação EDC seja bem conhecida, as reações de reversão podem limitar sua utilidade. O produto intermediário O-acilisourea pode ser facilmente hidrolisado, revertendo para a molécula carboxilato original.

Para superar essa limitação, O N-Hidroxisuccinimida (NHS) tem sido usada para formar um segundo intermediário mais estável antes da aminação. Este método EDC/NHS aprimorado tem sido usado em uma ampla gama de aplicações, como a imobilização de revestimentos carboximetilados em poços de ensaio imunoenzimático.

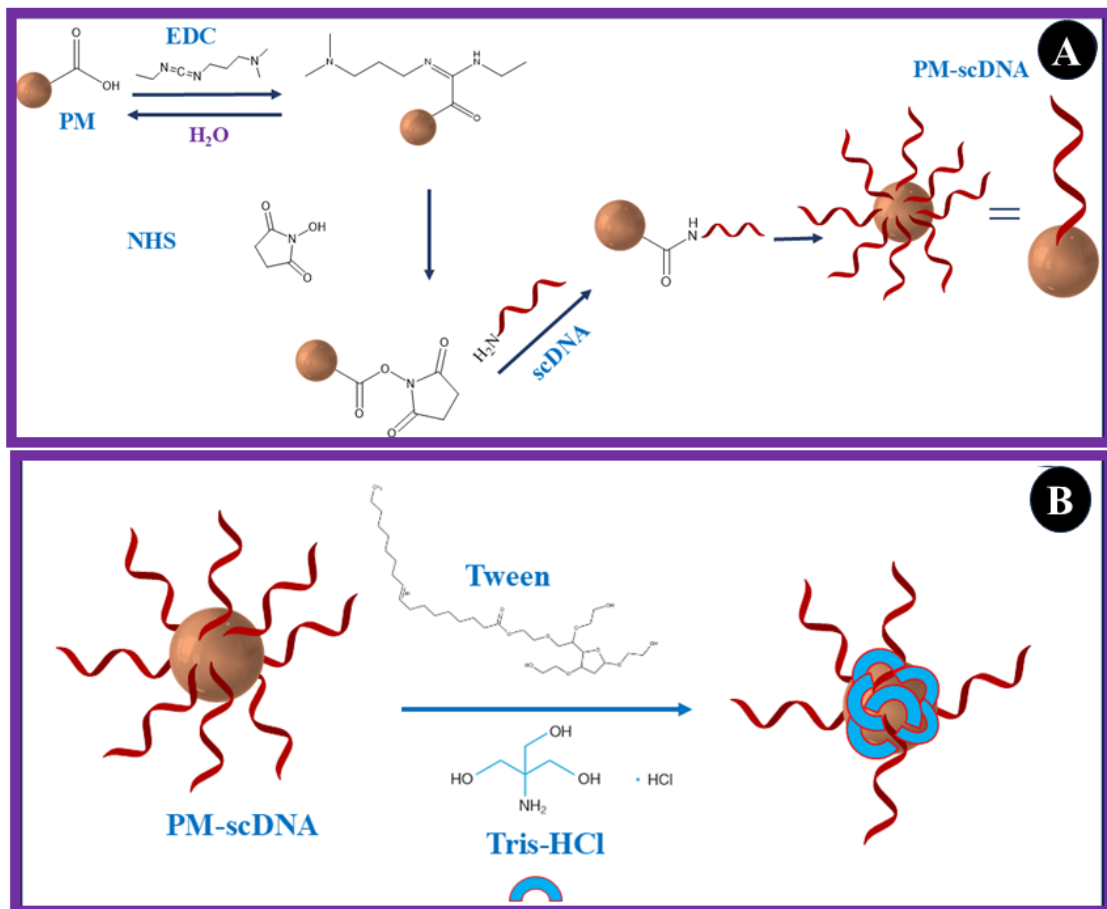


FIGURA 3.8- Modificação das PM A) imobilização covalente da scDNA com as PM B) etapa de bloqueio dos grupos carboxila ativados por EDC/NHS não imobilizados covalentemente com scDNA.

As PM-scDNA resultantes foram lavadas com tampão NE no processo de modificação e logo após foi ressuspensão em 1 mL do mesmo tampão e armazenado sob refrigeração por até três semanas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. As modificações das PM com as scDNA dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A foram realizadas separadamente e utilizadas posteriormente para captura de alvos nas amostras de saliva.

3.9 - Ensaio genomagnético com as sondas de DNA de detecção conjugada com biotina, de captura do DNA alvo e de incubação com o marcador eletroquímico

As etapas do ensaio genomagnético são apresentadas na FIGURA 3.9. O procedimento iniciou com a coleta de amostras de saliva em um tubo falcon (FIGURA 3.9A). Em seguida, a amostra foi aquecida a 60°C para promover a inativação do vírus, expondo o material genético (FIGURA 3.9B).

Para a avaliação da amostra coletada foi realizada a preparação da solução contendo a sdDNA conjugada com biotina. Assim, foi realizada a diluição do sdDNA adquirido com tampão TE pH entre 7,6 e 8,0 para obter-se uma solução de concentração final de 2 μ M. A captura do DNA alvo foi realizada por meio da incubação avaliando diferentes tempos em um agitador rotatório lento 6 RPM e volumes diversos de amostra de saliva fortificada com o DNA alvo, 20 μ L tampão NE 10x, 10 μ L das PM-scDNA e 10 μ L da sdDNA-biotina 2 μ M. Após a incubação, foi realizada a separação magnética e posterior retirada do sobrenadante e lavagem com tampão NE 1X contendo 0,05% TW20 como mostra a FIGURA 3.9C.

Logo após, foi adicionado à dispersão 200 μ L do conjugado strep-HRP diluída 1:5000 em PBS pH 7,4 contendo 0,1% TW20 e 1% de BSA e mantido em incubação, em tempo a ser definido, em temperatura ambiente. Depois, foram realizados os procedimentos de separação magnética e de lavagem por 3x com tampão PBS pH 7,4 contendo 0,1% TW20 e 1% BSA (FIGURA 3.9D). Em seguida foi realizada a redispersão em 50 μ L de PBS pH 7,4, e assim, obteve-se o magneto-bioconjugado (m-bio) contendo o vírus SARS-CoV-2 e vírus Influenza A como mostra a FIGURA 3.9E.

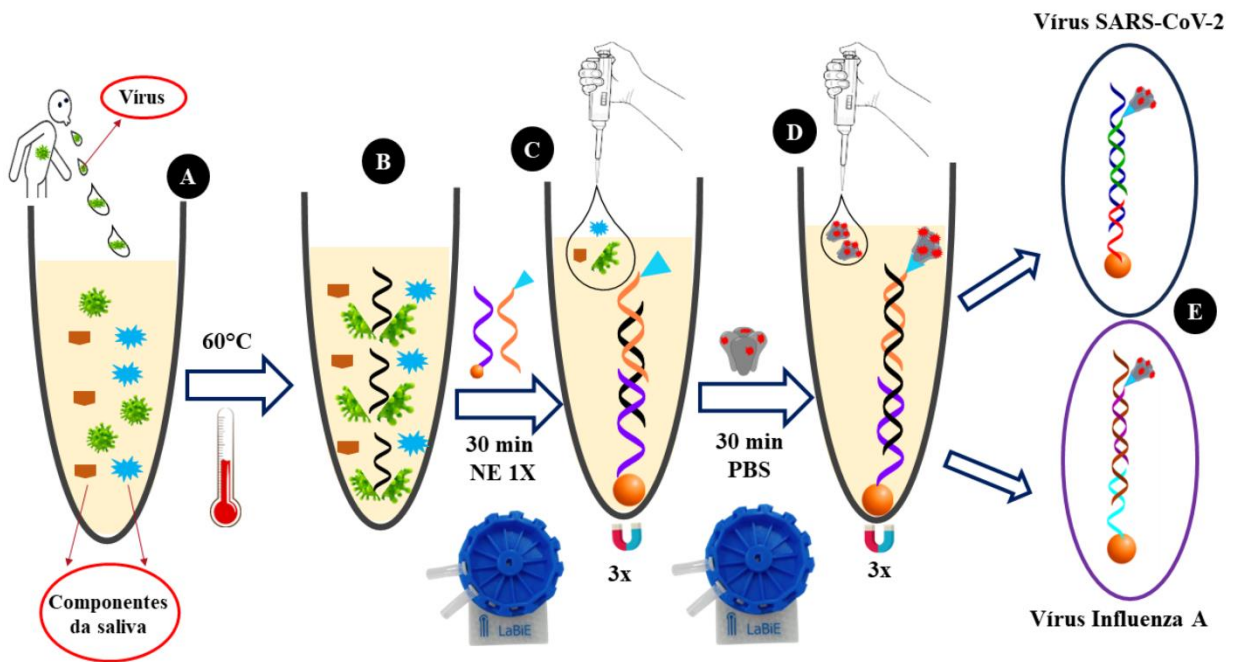


FIGURA 3.9- Etapas do ensaio genômico utilizado para a captura e separação tanto do RNA viral SARS-CoV-2 quanto do Influenza.

Ao final destas etapas, tem-se o m-bio formado como representado na FIGURA 3.10A. Como as PM possuem grande área superficial, os scDNA encontram-se distribuídos por toda a superfície, de modo que em uma única PM pode ocorrer a ligação de um número significativo de alvos.

O m-bio formado com SARS-CoV-2 é composto por PM + scDNA SARS-CoV-2 + alvo SARS-CoV-2 + sdDNA SARS-CoV-2 + biotina + strep-poli-HRP e o m-bio com o vírus Influenza A é composta por PM + scDNA Influenza A + alvo Influenza A + sdDNA Influenza A + biotina + strep-poli-HRP como mostra a FIGURA 3.10B.

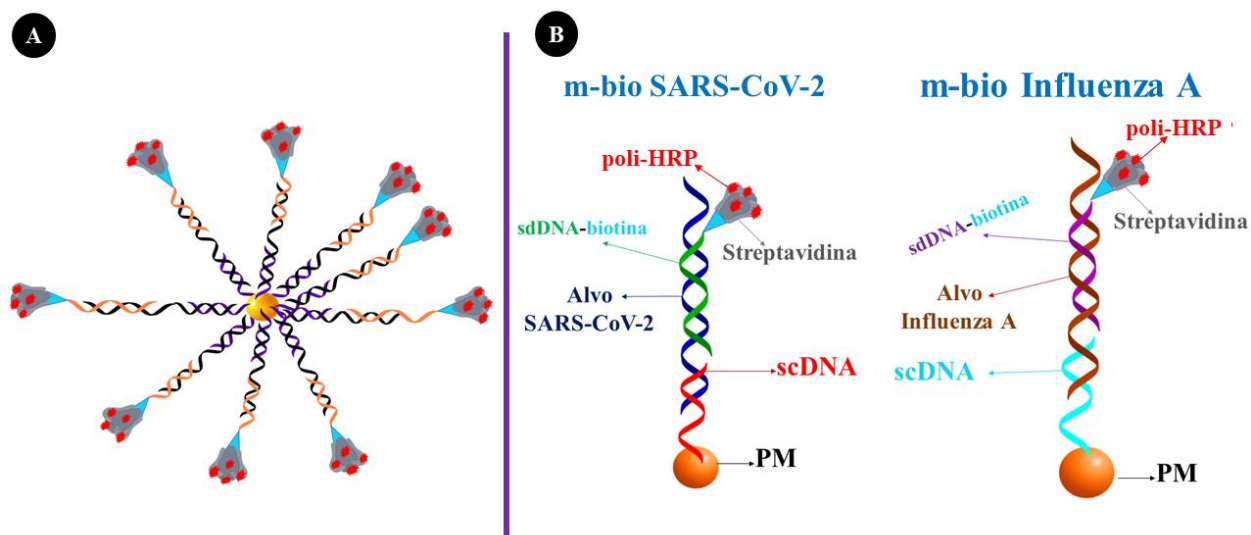


FIGURA 3.10- A) Representação do m-bio formado B) Componentes dos m-bio da SARS-CoV-2 e Influenza A.

3.10- Detecção do RNA alvo via técnica eletroquímica

A detecção do RNA viral, que foi previamente capturado e separado conforme descrito acima, foi realizada eletroquimicamente via um DeD contendo o eletrodo de trabalho e um pequeno imã localizado externamente sob eletrodo de trabalho. Assim, sobre a superfície do eletrodo foi adicionado 5 μL da dispersão do m-bio contendo o RNA alvo capturado. Sobre o m-bio, foi adicionado uma mistura de HQ 1,0 mmol L^{-1} e H_2O_2 1,0 mmol L^{-1} . As soluções de HQ e H_2O_2 que foram preparadas previamente antes do uso em tampão PBS pH 6.5. A resposta eletroquímica inicia-se pela reação da enzima HRP, que se encontra na forma reduzida, em contato com seu substrato H_2O_2 . Esta reação faz com que a HRP sofra processo de oxidação. Uma vez oxidada, a HRP irá reduzir promovendo a oxidação da HQ presente no meio formando a benzoquinona (BQ). Então, aplica-se um potencial no eletrodo que irá promover a redução da BQ em HQ que irá participar do ciclo catalítico. As correntes de pico

catódica geradas, referente à redução da BQ em HQ são proporcionais a concentração do RNA alvo. A FIGURA 3.11 ilustra a etapa de detecção do método proposto.

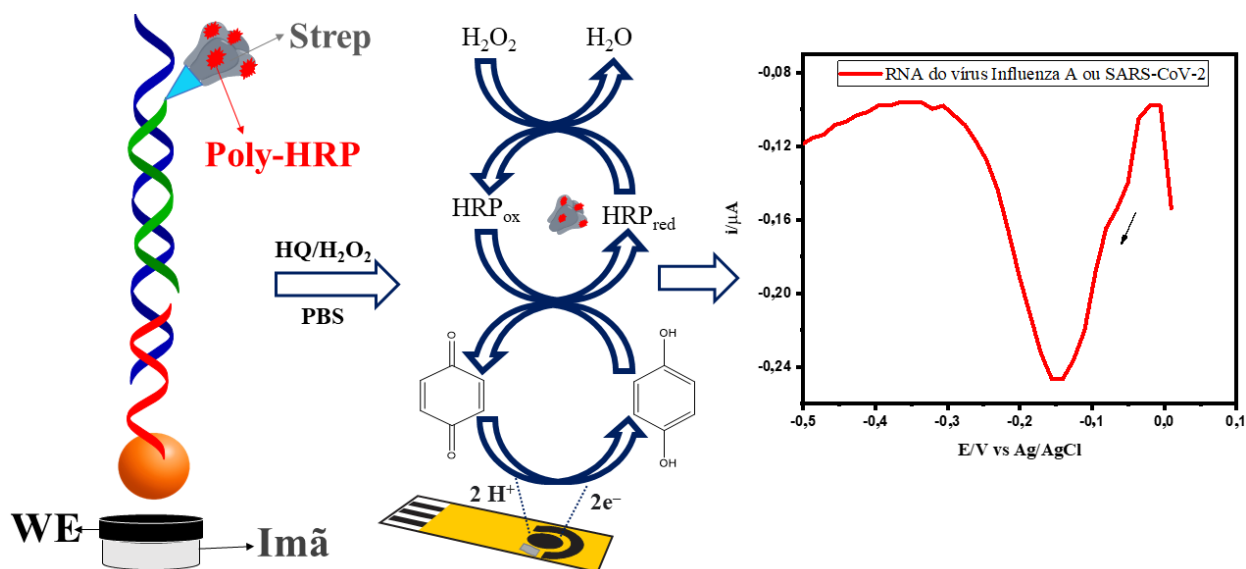


FIGURA 3.11- Etapa de detecção do RNA alvo previamente capturado pela técnica eletroquímica de DPV.

3.11 - Detecção do RNA alvo por imagem digital

A detecção do RNA viral, previamente capturado e separado conforme descrito no tópico 3.9, foi realizada via captura de imagem digital dos poços da placa PDE. Para isto, 5 μL do m-bio foi transferido para um micro tubo e, em seguida foi adicionado 30 μL de uma solução comercial composta por TMB e H_2O_2 . A mistura foi levada a agitação por 2 min e, nesta etapa, a enzima HRP que se encontra na sua forma reduzida, entra em contato com o substrato H_2O_2 sendo oxidada. A HRP oxidada promove a oxidação do TMB presente no meio, formando um intermediário de cor azul. Após o tempo de 2 min foi adicionado uma solução HCl 0,2 mol L^{-1} , com objetivo de inibir a atividade catalítica da HRP, fazendo com que a solução

adquirir uma coloração amarela. Logo após, o tubo foi levado para um estante magnética e 20 μL do sobrenadante foi transferido do tubo para os poços da placa feita por impressão 3D. Em seguida, foram realizadas as capturas das imagens. A FIGURA 3.12 mostra as etapas de detecção.

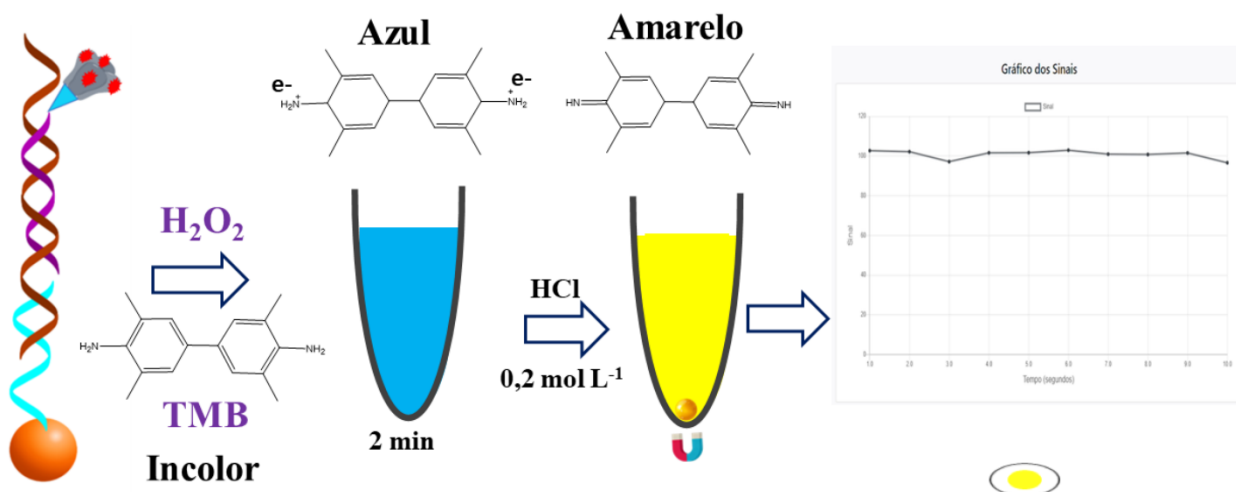


FIGURA 3.12- Etapa de detecção do RNA alvo por imagem digital.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

4.1 - Fabricação do suporte DeD por modelagem e impressão 3D

Considerando que o ensaio genômagnético proposto requer a utilização de um pequeno ímã posicionado externamente sob o eletrodo de trabalho, desenvolvemos um suporte impresso em 3D capaz de suportar o DeD, o potenciostato portátil e o smartphone, o que ajuda a manter a portabilidade de todo o conjunto eletroquímico. O PDE foi fabricado por modelagem e impressão 3D, e permitiu com que o ímã ficasse perfeitamente alinhado com o eletrodo de trabalho facilitando seu uso. A FIGURA 4.1 traz imagem real da PDE construída e do sistema com os seus constituintes.

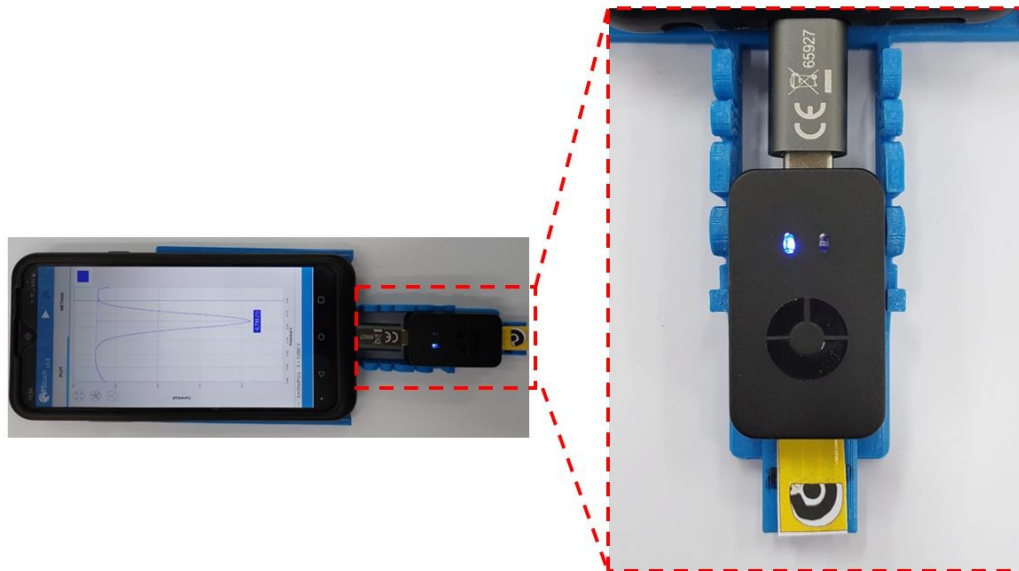


FIGURA 4.1- O sistema de detecção em que um celular conectado a um mini potenciostato fica alojado em um suporte produzido por uma impressora 3D. O mini potenciostato, por sua vez, é conectado a um dispositivo eletroquímico descartável, e, abaixo dele, há um ímã de neodímio fixado no suporte.

4.2 - Otimização dos parâmetros do ensaio genomagnético comum aos dois métodos desenvolvidos

O ensaio genomagnético proposto envolveu a utilização de PM decoradas com as scDNA de sequências complementares ao RNA de cada vírus. Estas foram utilizadas para captura e separação magnética dos RNA dos vírus da solução da amostra. Simultaneamente ao PM-scDNA, um segundo sdDNA biotinilado foi adicionado à amostra. As sdDNA-biotina possuem uma sequência complementar ao RNA viral em uma região próxima à sequência do scDNA. Dessa forma, após a captura e separação do RNA viral da amostra complexa de saliva, a biotina presente no sdDNA foi empregada como ligante para o bioconjugado composto por estreptavidina e HRP ou poli-HRP. Então, o RNA viral pode ser facilmente detectado e quantificado usando a HRP como marcador eletroquímico.

Os diferentes parâmetros foram avaliados utilizando amostras de saliva de indivíduos saudáveis, caracterizadas por RT-PCR e negativo para os vírus SARS-CoV-2 e Influenza A. Estas amostras foram fortificadas com 50 fM de ssDNA, ambos com sequências idênticas a dos RNAs de cada vírus. Essa condição foi adotada para todas as etapas de otimização.

Os estudos com RNA alvo da SARS-CoV-2 e Influenza A foram feitos nas mesmas condições de forma independente. Ambos os ensaios apresentaram respostas semelhantes, e se diferem apenas nos valores de intensidade de corrente, que poderá ser observado mais adiante. Todavia, os resultados apresentados a seguir corresponde aos ensaios com RNA alvo da SARS-CoV-2 e, mais adiante serão apresentados também os resultados correspondentes ao ensaio com RNA alvo da Influenza A.

Os parâmetros avaliados incluíram a diluição da amostra de saliva, concentração das sondas, diluição do bioconjugado strep-HRP e strep-poli-HRP, os

tempos de hibridização e incubação e o volume de m-bio adicionado ao DeD, além de parâmetros da técnica eletroquímica utilizada para a detecção.

O primeiro parâmetro estudado foi a influência do uso da estreptavidina conjugada com HRP e com poli-HRP na resposta do ensaio genomagnético ¹²⁴. Este estudo tem como objetivo avaliar se a poli-HRP irá permitir um ganho na resposta de corrente devido a maior quantidade de peroxidases disponíveis quando comparado com a strep-HRP. Para isso, foi utilizado uma mesma solução contendo os RNA, que foram capturados e separados magneticamente. Neste estudo, foram adicionados HRP e com poli-HRP em diluições definidas com base nas recomendações do fabricante. Para HRP foram avaliadas as diluições de 1:500, 1:5000 e 1:15000 e as diluições de 1:5000, 1:15000 e 1:45000 foram utilizadas para a poli-HRP. Os resultados para a melhor condição de diluição da HRP e poli-HRP são mostrados nas FIGURA 4.2A e FIGURA 4.2B, respectivamente.

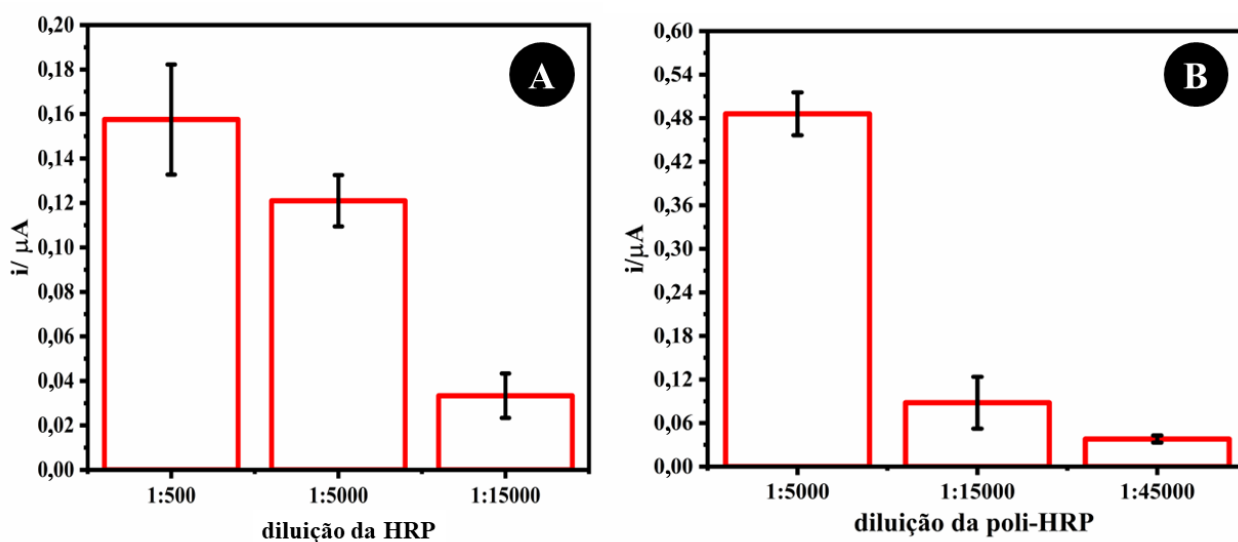


FIGURA 4.2- Estudo da influência da resposta de corrente para a detecção do RNA viral usando HRP e com poli-HRP em diferentes diluições; A) resposta obtidas para HRP e B) para poli-HRP, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

Nestes estudos, tanto HRP quanto poli-HRP apresentaram um melhor desempenho quando em soluções menos diluídas. A investigação também mostrou que a poli-HRP permitiu um ganho na resposta de corrente devido a maior quantidade de peroxidases disponíveis quando comparado com a strep-HRP.

As amostras de saliva também foram avaliadas quanto as suas diluições em PBS, variando em 2, 5 ou 10 vezes. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 4.3.

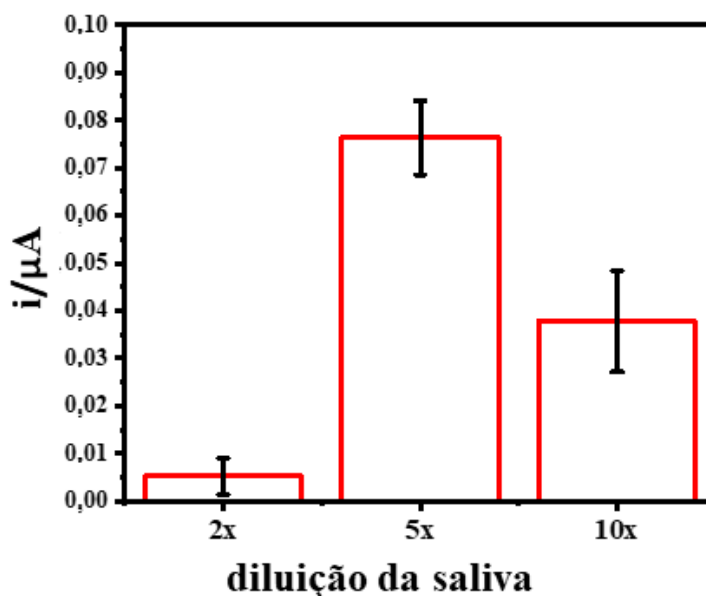


FIGURA 4.3- Avaliação da influência da diluição da amostra, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

A diluição 2 vezes apresentou o menor sinal de corrente possivelmente devido às elevadas concentrações de alguns dos componentes presentes na saliva, como proteínas, principalmente a mucina, e outros compostos, que podem adsorver ou aglutinar as MP diminuindo sua capacidade de se ligar ao alvo ssDNA, reduzindo assim a resposta eletroquímica¹²⁵ (LEVINE, 1993). Na diluição da amostra de saliva

a 10 vezes também houve diminuição do sinal eletroquímico, provavelmente, neste caso, devido à significativa diminuição da concentração do alvo¹²⁶ (Humphrey and Williamson, 2001). Assim, a diluição 5x foi escolhida para as análises posteriores.

Outro parâmetro avaliado foi a concentração de sdDNA utilizada para a imobilização nas PM. No estudo foram avaliadas três concentrações: 1,0; 2,0 e 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os resultados são apresentados na FIGURA 4.4. O aumento da concentração da sonda sdDNA levou a um aumento do sinal analítico nas condições avaliadas, indicando que um maior número de sondas foi imobilizado nas PM e está foi a concentração escolhida.

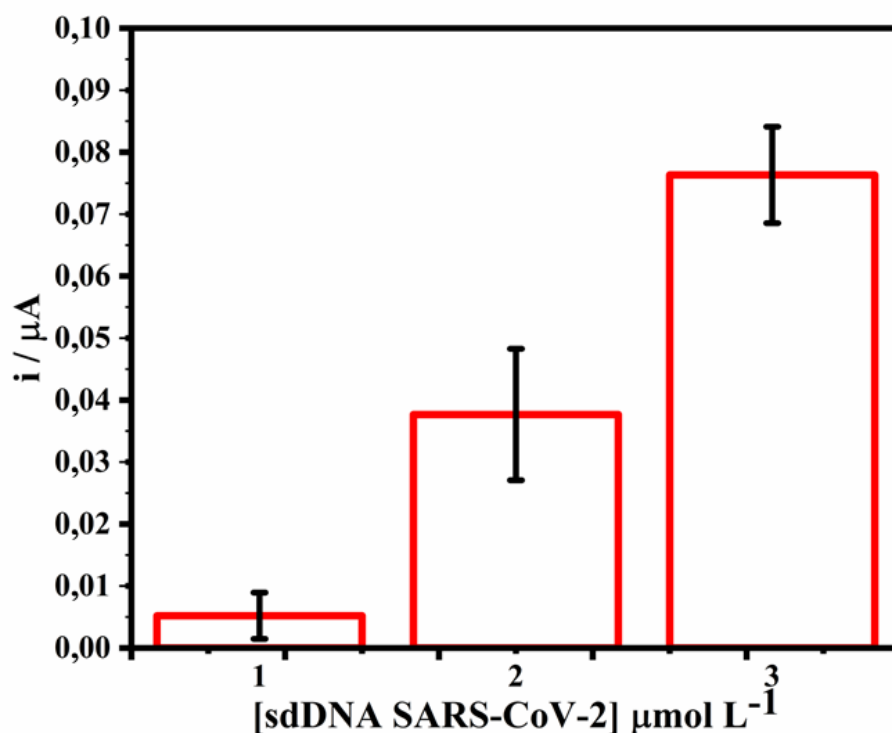


FIGURA 4.4 - Influência da concentração de sdDNA utilizada para na imobilização das PM na resposta o teste genômico, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

Avaliou-se também os tempos empregados para a hibridização entre MB-cpDNA e ssDNA com o ssDNA utilizado como alvo e a incubação entre o m-bio obtidos e a strep-poli-HRP. As FIGURAS 4.5A e 4.5B mostram que, para ambos os parâmetros avaliados, foi observado um ligeiro aumento no sinal analítico quando tempos maiores foram aplicados. Seria esperado um maior impacto na resposta eletroquímica, principalmente nos tempos maiores de incubação, porém, a grande quantidade de HRP apresentada na strep-poli-HRP pode ser responsável pela saturação dos sinais observados nos diferentes tempos avaliados. Com base nos resultados apresentados, considerando a intensidade da resposta de corrente e o erro, foram escolhidos os tempos de 20 min para as etapas hibridização e de incubação.

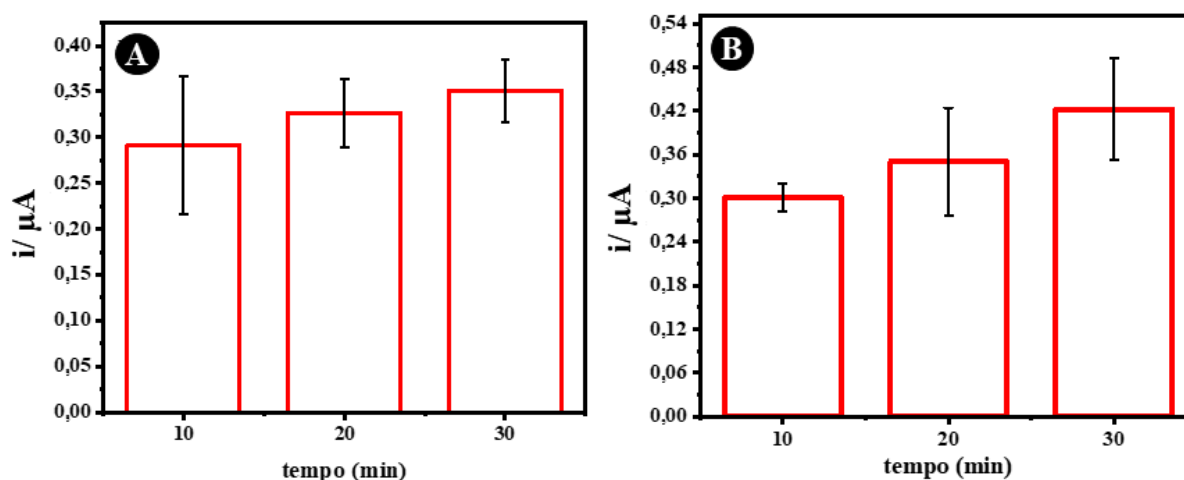


FIGURA 4.5- Avaliação do tempo de hibridização: A) das MP contendo as sondas na captura e o alvo SARS-CoV-2; B) do tempo de incubação do bioconjugado strep-poli-HRP com m-bio contendo o alvo já capturado, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

Um outro parâmetro avaliado foi a quantidade de MP contendo o alvo já capturado e a strep-poli-HRP, na superfície do eletrodo. Foram investigados diferentes volumes, no caso 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μL , e, conforme pode ser observado na FIGURA 4.6, o aumento da quantidade de MP adicionada na superfície do eletrodo leva a um aumento na resposta de corrente, devido, conseqüentemente, a maior quantidade de alvo capturado. A saturação na resposta de corrente foi obtida com a adição de um volume de 25 μL , no entanto, o volume de 20 μL apresentou uma boa intensidade de corrente com pequena dispersão e, portanto, foi escolhido como parâmetro a ser utilizado nos testes.

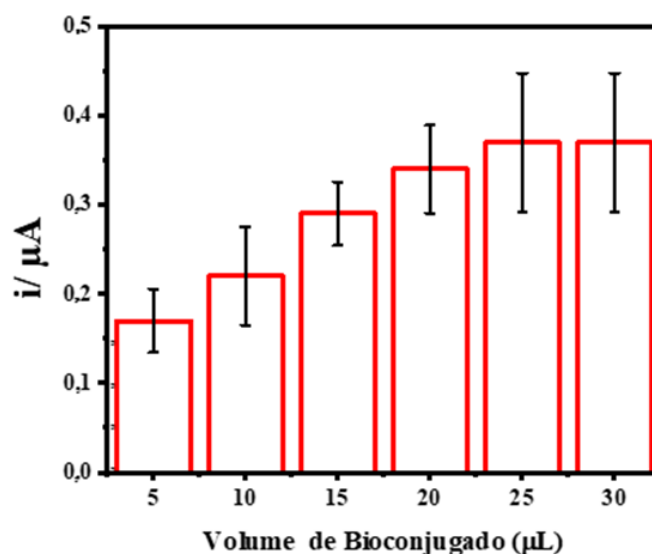


FIGURA 4.6- Avaliação da influência da quantidade de MP, contendo o alvo capturado, a ser adicionado na superfície do eletrodo, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

A FIGURA 4.7 apresenta os resultados de outro parâmetro estudado, que é a reprodutibilidade do método. No estudo utilizando 8 eletrodos não foi observada uma diferença significativa nos valores de corrente medidos na ausência e na presença do

alvo. Essa constância nos resultados sugere que os eletrodos construídos assim como o ensaio foram realizados de forma consistente e possuem propriedades similares, garantindo a reprodutibilidade das medidas voltamétricas.

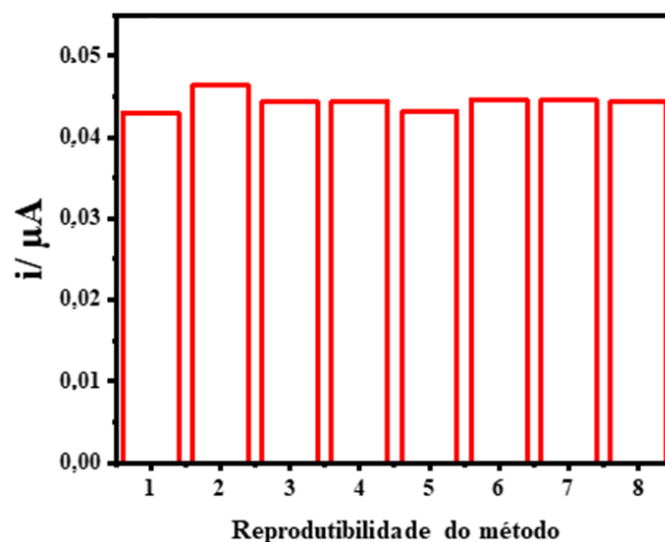


FIGURA 4.7- Avaliação da reprodutibilidade de medidas voltamétricas de oito eletrodos, Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

A escolha adequada de alguns parâmetros na DPV são cruciais para garantir a melhor resposta de corrente e, assim, obter melhores resultados para a detecção e quantificação do analito. Os parâmetros eletroquímicos avaliados foram a amplitude de pulso (E_{step}) na faixa de 0,08, 0,12, 0,16 e 0,20 V; o potencial de pulso (E_{pulse}) na faixa de 0,012, 0,024, 0,036 e 0,048 V, e o tempo de pulso (t_{pulse}) na faixa de 0,035, 0,040, 0,045 e 0,050 s. Os resultados destes estudos são mostrados na FIGURA 4.8. Os parâmetros que apresentaram resposta de corrente de maior magnitude foram $E_{\text{step}} = 0,12\text{V}$, $t_{\text{pulse}} = 0,040\text{s}$ e $E_{\text{pulse}} = 0,012\text{V}$ condições estas adotadas para os demais experimentos.

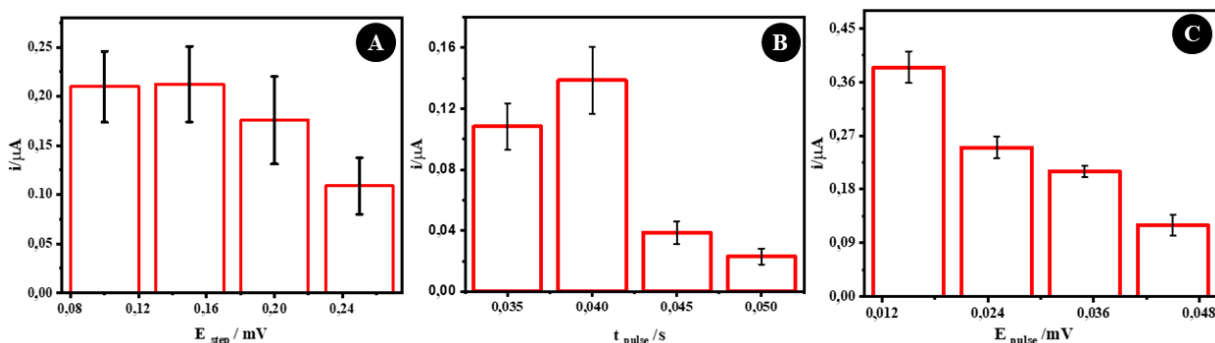


FIGURA 4.8- Otimização de parâmetros utilizados na DPV sendo A) E_{step} B) t_{pulse} C) E_{pulse} , Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

4.3 - Avaliação de reatividade cruzada na detecção dos genomas dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A

Ambas as doenças respiratórias apresentam sintomas característicos semelhantes, o que pode interferir no diagnóstico clínico e, conseqüentemente, dificultar o manejo e controle das doenças¹²⁷. As sequências das sondas de captura e detecção para os vírus SARS-CoV-2 e Influenza A foram definidas baseadas em informações presentes no banco de dados do NCBI e foram escolhidas regiões que não possuíam homologias. Avaliamos a reatividade cruzada de cada scDNA e sdDNA contra o ssDNA de SARS-CoV-2 e Influenza A. Para isso, uma amostra de saliva negativa para SARS-CoV-2 e para Influenza A, avaliadas por RT-PCR, foi fortificada com ssDNA de cada vírus e foram analisadas pelo ensaio genômico eletroquímico proposto, FIGURA 4.9.

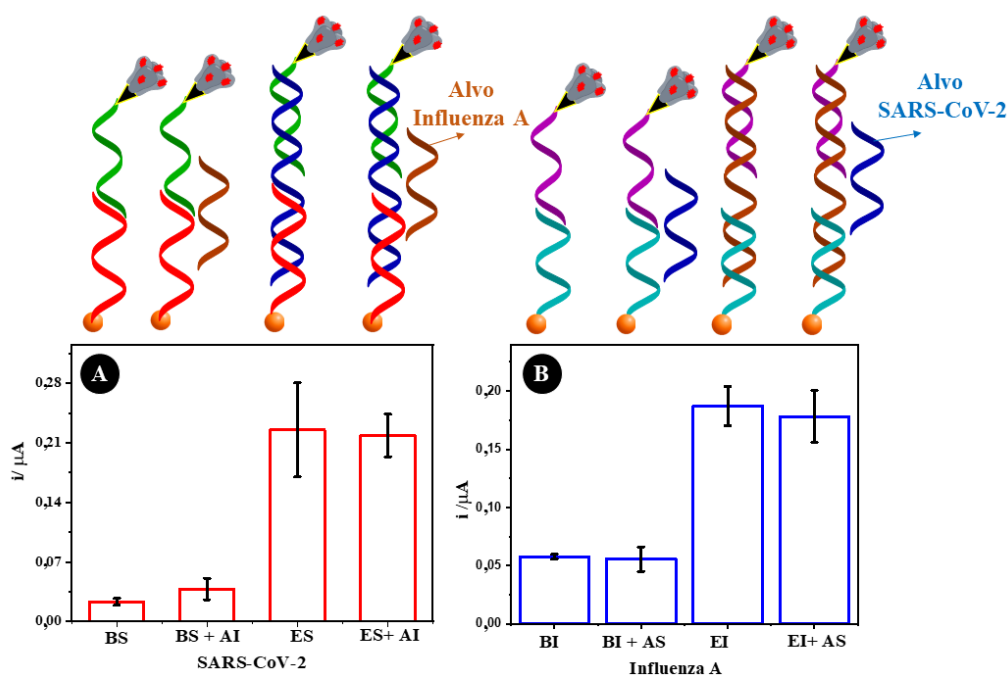


FIGURA 4.9- Avaliação da reação cruzada para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A. A) branco do ensaio do SARS-CoV-2(BS); Branco do ensaio do SARS-CoV-2 + alvo Influenza A (BS + AI); ensaios do SARS-CoV-2 (ES); ensaio do SARS-CoV-2 + alvo Influenza A (ES +AI). B) branco do ensaio da Influenza A (BI); branco do ensaio da Influenza A + alvo SARS-CoV-2 (BI +AS); ensaio da Influenza A (EI); ensaio da Influenza A + alvo SARS-CoV-2 (EI + AS), Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo SARS-CoV-2 ou Influenza A de 50fM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

Como pode ser observado, não há indicativo de reatividade cruzada entre as sondas e os alvos de ssDNA para cada vírus. Os resultados confirmaram a seletividade do ensaio genomagnético proposto indicando a capacidade do novo teste em detectar e quantificar cada vírus individualmente.

4.4 -Avaliação da capacidade do ensaio genômico eletroquímico proposto para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A

Após avaliar a influência dos diferentes parâmetros e definir as melhores condições para o protocolo, o ensaio foi aplicado em amostra de saliva negativa fortificada com cada um dos alvos de ssDNA. O método apresentou uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de cada alvo, no intervalo de 5,0 fmol L⁻¹ a 600,0 fmol L⁻¹ para SARS-CoV-2 e de 1,0 fmol L⁻¹ a 500,0 fmol L⁻¹ para vírus Influenza A, respectivamente. Os limites da detecção ($LoD = 3,3s/b$) e quantificação ($LoQ = 10,0s/b$) obtidos foram de 5,0 fmol L⁻¹ e 8,6 fmol L⁻¹ para SARS-CoV-2 e de 1,0 fmol L⁻¹ e 108,9 fmol L⁻¹ para vírus Influenza A, respectivamente. A FIGURA 4.10 apresenta os voltamogramas obtido em cada concentração e a curva de calibração para os vírus SARS-CoV-2 e Influenza A.

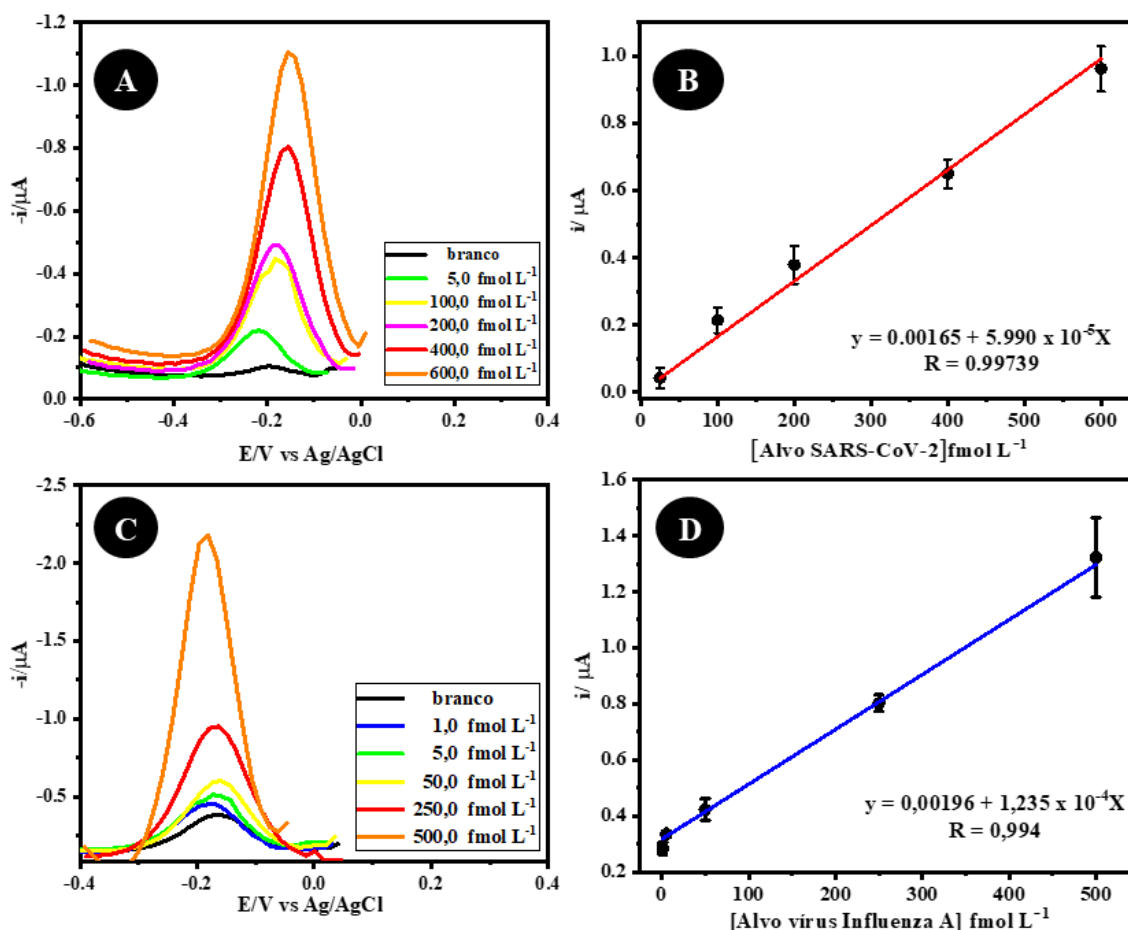


FIGURA 4.10- A) Respostas de DPV obtidas pela aplicação do ensaio genômico utilizando amostra negativa de saliva fortificada com SARS-CoV-2 na faixa de concentração de 5,0 a 600,0 fmol L^{-1} . DPV parâmetros aplicados: $v = 0,01 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{\text{pulse}} = 0,012\text{V}$, $E_{\text{step}} = 0,12\text{V}$, and $t_{\text{pulse}} = 0,040\text{s}$. B) Cuva de calibração para-SARS-CoV-2. C) Curvas DPV obtidas para o alvo do vírus Influenza A na faixa de concentração de 1,0 a 500,0 fmol L^{-1} . Parâmetros DPV aplicados: $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$, $E_{\text{pulse}} = 0,012 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 0,12 \text{ V}$, e $t_{\text{pulse}} = 0,040 \text{ s}$. D) Curvada de calibração para vírus Influenza A. ($n = 3$).

As figuras de méritos obtidos referentes ao ensaio genômico baseado no uso de DeD foram comparados com outros trabalhos da literatura. A TABELA 4.1 apresenta os valores de LoD apresentados por diferentes trabalhos da literatura para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A que envolveram o uso de detecção eletroquímica, discriminando os diferentes alvos detectados e as amostras empregadas.

TABELA 4.1- Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no presente trabalho com a literatura envolvendo métodos eletroquímicos para detecção de SARS-CoV-2 e/ou Influenza A.

Alvo	Amostras	LoD		Referência
		SARS-CoV-2	Influenza A	
Anticorpo	Sangue e saliva	0,25 pmol L ⁻¹	-	*128
Anticorpo	Soro	-	0,95 pmol L ⁻¹	*129
RNA	Cultura celular	0,80 pmol L ⁻¹	-	*130
RNA	Saliva	0,02 pmol L ⁻¹	-	*131
RNA	Solução Padrão	-	0,8 nmol L ⁻¹	*132
RNA	Soro	-	1,0 pmol L ⁻¹	*133
RNA	Solução Padrão	130,0 nmol L ⁻¹	1,6 nmol L ⁻¹	**7
RNA viral	Saliva	0,005 pmol L⁻¹	0,001 pmol L⁻¹	**Este trabalho

*Eletrodo modificado, **Eletrodo sem modificação

Como pode ser observado, a maioria dos trabalhos descritos utilizam eletrodos modificados e, apesar de bons resultados, torna-se um limitador em uma eventual aplicação comercial pois, as etapas de modificação dependem de insumos e instrumentação extra além de equipe com treinamento específico. Os trabalhos de Grabowska et al.¹³² e Gerstl et al.⁷ apresentaram excelentes resultados. Todavia, os experimentos foram realizados apenas em soluções padrões e, desta forma, não temos evidências de como estes métodos se comportariam em um cenário de

amostras reais envolvendo matrizes complexas o que pode levar a possíveis interferências. Os trabalhos de Lee et al.¹²⁹ e Cajigas et al.¹²⁸ apresentaram resultados interessantes, todavia, os métodos que envolvem anticorpos são mais eficientes para o diagnóstico da doença quando está encontra-se em estágios mais avançados⁸⁰, consequentemente gerando diagnóstico tardio. Frente aos trabalhos reportados na literatura este trabalho apresentou excelentes valores de LoD envolvendo métodos o uso de eletrodos descartáveis sem necessidade de modificações.

4.5 -Detecção de RNA dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A em amostras de saliva utilizando o teste genomagnético e DeD

O ensaio genomagnético proposto foi aplicado em amostras de saliva de indivíduos saudáveis e pacientes com COVID-19 ou Influenza A do Hospital Universitário da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (USP) e aprovado pelo Comitê de Ética da UFSCar (CAAE 31508820.7.0000.5504).

As Coortes de indivíduos saudáveis e pacientes com diagnóstico de COVID-19 e Influenza A. Foram testadas 36 amostras de saliva e os resultados são mostrados na FIGURA 4.11. As amostras foram analisadas, sem qualquer etapa de extração ou transcrição, aplicando apenas o tratamento térmico para inativar o vírus.

Neste estudo, foi avaliada a capacidade do ensaio genomagnético de distinguir entre amostras de saliva infectadas com SARS-CoV-2 ou Influenza A e amostras saudáveis. A análise da curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) para COVID-19 apresentou como resultado uma área sob a curva (AUC) de 0,921 ($p < 0,001$) (FIGURA 4.11A) o que é um resultado considera muito bom^{134,135}.

A FIGURA 4.11B apresenta o diagrama de pontos interativo com os resultados em termos de concentração para indivíduos negativos e positivos para SARS-CoV-2 e apresenta um ponto de corte ideal de $46,5 \text{ pmol L}^{-1}$, com base no índice de Youden¹³⁶. O ponto de corte pode ser empregado com o valor mínimo para diferenciar indivíduos saudáveis e infectados por SARS-CoV-2 com sensibilidade de 75,9% e especificidade de 95,8%.

Da mesma forma, o teste genômico eletroquímico foi aplicado para diagnóstico de Influenza e os resultados são mostrados nas FIGURAS 4.11C e 4.11D. A AUC obtida pela curva ROC foi de 0,881 ($p < 0,001$), o que pode ser considerado um bom valor e indica a notável capacidade do método em diferenciar amostras positivas de negativas¹³⁵.

O diagrama de pontos interativo com as coortes positiva e negativa apresentou ponto de corte ideal de $14,8 \text{ pmol L}^{-1}$ segundo o índice de Youden¹³⁶. Com base nesse limiar, o teste apresentou sensibilidade de 87,5% e especificidade de 85,0%. Esses resultados demonstram que o ensaio genômico pode ser utilizado como uma alternativa rápida e confiável ao RT-PCR para o diagnóstico da COVID-19 e da Influenza A.

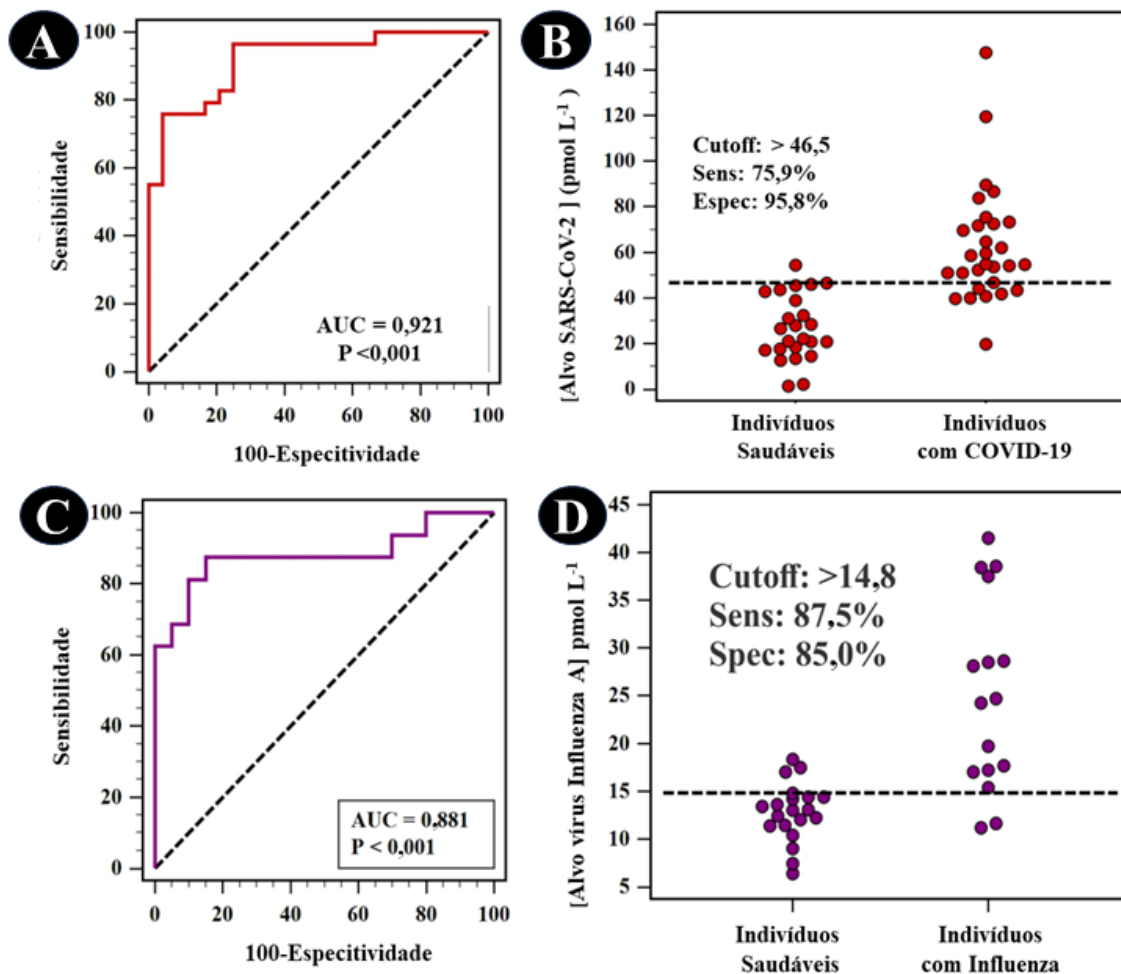


FIGURA 4.11- A) Curva ROC para a detecção do RNA do SARS-CoV-2 usando o ensaio genômico. B) Diagrama de pontos interativo referente à detecção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de saliva. Ponto de corte $>46,5 \text{ pmol L}^{-1}$ (*teste t, $p < 0,001$; MedCalc, $n=3$). C) Curva ROC para o vírus Influenza A. D) Diagrama de pontos interativo das concentrações alvo de RNAs dos vírus Influenza A em amostras de saliva. Ponto de corte $>14,8 \text{ pmol L}^{-1}$ (*teste t, $p < 0,001$; MedCalc, $n=3$).

Uma das limitações que pode comprometer o ensaio é a baixa carga viral na amostra devido ao período de latência do vírus, em que ainda não há título viral

suficiente na amostra, o que pode afetar a sensibilidade (ou seja, a taxa de verdadeiro positivo) do teste genômico eletroquímico baseado em saliva e afetar as taxas de falsos negativos¹³⁷. Outro ponto, está relacionado a relativamente instabilidade química do RNA que pode sofrer degradação, assim a qualidade da amostra e o armazenamento adequado são parâmetros importantes na obtenção de resultados precisos¹³⁸.

Assim, algumas estratégias podem ser avaliadas para melhorar a detecção e a sensibilidade sem perder a especificidade, como a análise das amostras imediatamente após a coleta (evitando ciclos de congelamento e descongelamento). Pela simplicidade e características *point-of-care*, o teste proposto é uma alternativa importante para no uso no local de atendimento, e apresenta a capacidade de discriminar entre COVID-19 e Influenza A, o que é muito importante, já que os sintomas iniciais são muito semelhantes. Outra vantagem é o fluxo de trabalho simplificado, pois uma amostra de saliva é diluída diretamente no tampão de ensaio, seguida de uma etapa de hibridização, o que reduz a complexidade e o custo do teste. Por fim, podemos concluir que o teste proposto pode ser facilmente aplicado para diagnóstico de COVID-19 e Influenza A, pois atende aos requisitos como boa precisão, rapidez, simplicidade e baixo custo.

4.6 - Plataforma analítica portátil com detecção por imagem digital

A PID foi empregada apenas no ensaio da Influenza A e o ensaio genômico descrito acima para uso com o DeD foi também aplicado neste novo método. Para este estudo, foram utilizadas amostras de saliva de indivíduos saudáveis, caracterizadas por RT-PCR e negativo para o vírus Influenza A que foram fortificadas com 50 pM de ssDNA com a sequência idêntica à do RNA do vírus Influenza A. Essa condição foi adotada para todas as etapas de otimização. Foram

avaliadas as concentrações das sondas de detecção, os tempos de hibridização e incubação e a diluição da strep-poli-HRP.

A viabilidade da detecção de RNA viral em amostras de saliva foi avaliada por meio do PID, para isto, inicialmente, foram estudadas três condições de diluição da amostra de saliva: 2, 5 e 10 vezes, sendo os resultados apresentados na FIGURA 4.12.

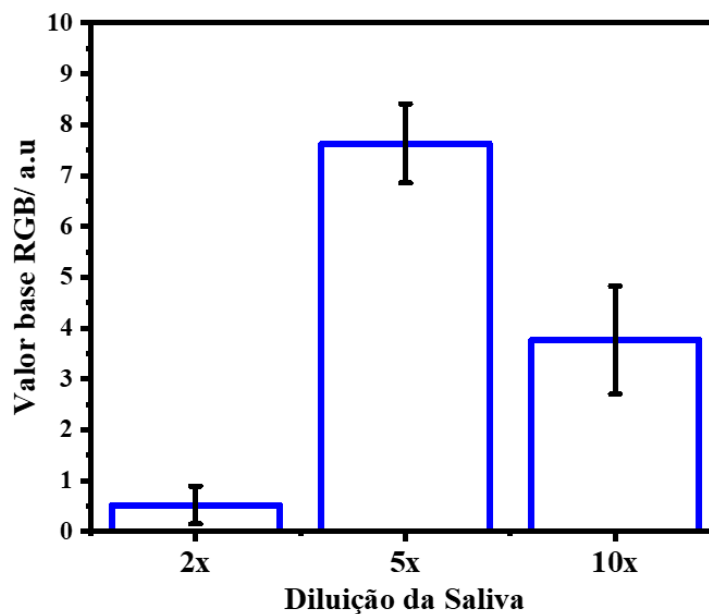


FIGURA 4.12- Estudo da influência da diluição da amostra de saliva para a detecção alvo para diagnóstico de Influenza A. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

A condição de diluição que apresentou a melhor resposta foi de 5 vezes, apresentado uma boa diferenciação do sinal em relação ao sinal de fundo. A diluição 2x apresentou uma resposta menor que, possivelmente, está relacionada a presença de componentes da saliva em maior concentração, como a mucina, que pode aglutinar as partículas magnéticas, levando à sua perda no processo de lavagem e, conseqüentemente, à diminuição da concentração alvo. Por outro lado, na diluição

10 vezes da saliva, é possível que a amostra tenha sido muito diluída, causando baixa concentração do alvo e possivelmente levando a uma resposta com valor mais baixo. Nesse sentido, adotou-se a diluição 5 vezes como a melhor condição para este teste.

Outro parâmetro avaliado foi a concentração de sdDNA utilizada para a imobilização nas PM. No estudo foram avaliadas três concentrações: 1,0; 2,0 e 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os resultados são apresentados na FIGURA 4.13.

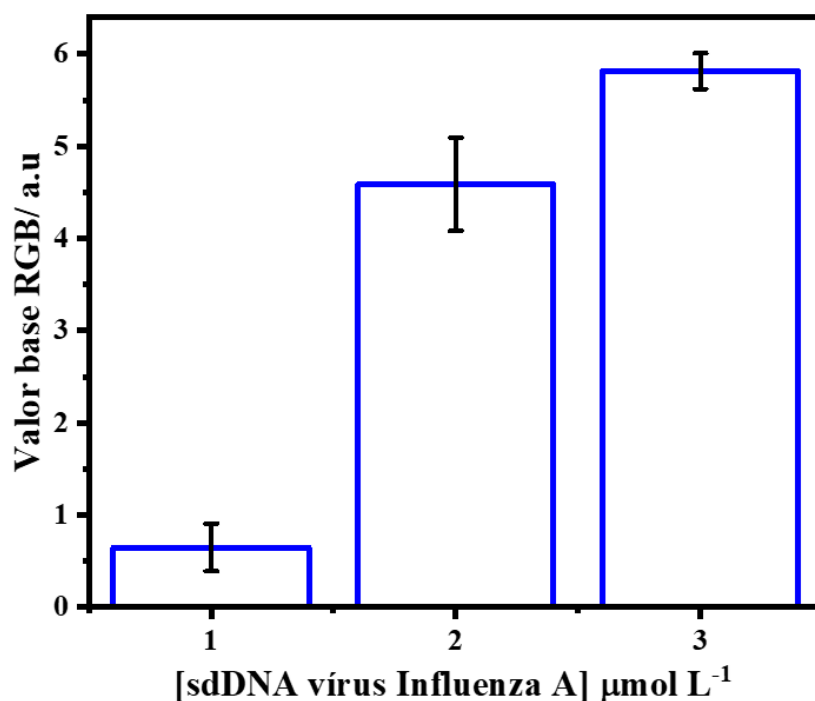


FIGURA 4.13- Estudo da concentração das sondas de detecção. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

O aumento da concentração das sondas é diretamente proporcional ao aumento da resposta analítica, isso ocorre, possivelmente, porque o aumento da concentração das sondas proporciona a captura de um maior número de sequências do analito, gerando assim aumento na resposta de RGB. Nesse sentido, adotou-se 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como condição ótima.

Outro parâmetro estudado foi o tempo de incubação da enzima, e foram investigadas a influências das duas formas das enzimas em diferentes diluições, HRP nas diluições 1:500, 1:5000, 1:15000 e poli-HRP nas diluições 1:5000, 1:15000, 1:45000. Os resultados para melhor diluição de HRP e poli-HRP são mostrados nas FIGURAS 4.14A e 4.14B respectivamente.

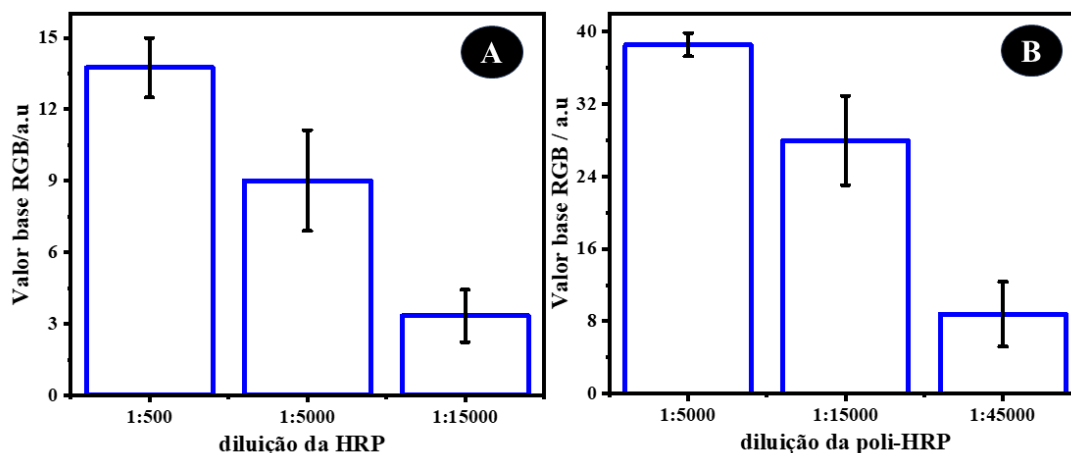


FIGURA 4.14- Avaliação da influência das diluições da: A) enzima HRP e B) da enzima poli-HRP. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

Nestes estudos, tanto HRP quanto poli-HRP apresentaram um melhor desempenho quando em soluções menos diluídas. A investigação também mostrou que a poli-HRP permitiu um ganho na resposta de corrente devido a maior quantidade de peroxidases disponíveis quando comparado com a strep-HRP.

Os tempos de hibridização das PM contendo as sondas e o tempo de incubação com a strep-poli-HRP foram investigados utilizando os tempos de 10, 20 e 30 min. O estudo da variável tempo para hibridização da sonda e incubação da enzima é mostrado nas FIGURAS 4.15A e 4.15B respectivamente. Observa-se que o aumento do tempo leva a um aumento proporcional na resposta de RGB, isso possivelmente ocorre porque quanto mais tempo as sondas e/ou enzimas ficam expostas, mais

ligações são formadas levando, conseqüentemente, a um aumento do na resposta analítica. Desta forma, estabeleceu-se o tempo de 30 min sendo a condição mais adequada.

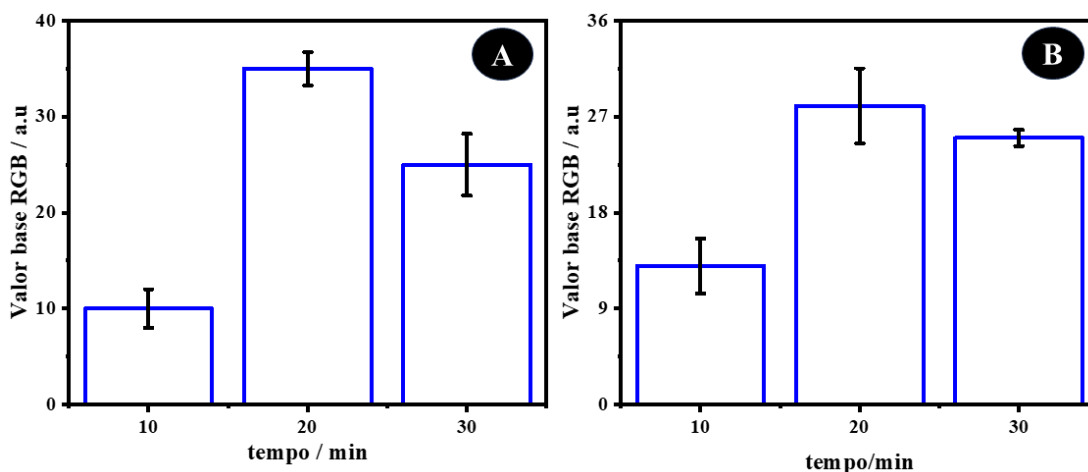


FIGURA 4.15- Avaliação dos tempos de: A) hibridização e B) de incubação da enzima poli-HRP. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

A sensibilidade do método, o que influencia o LoD e LoQ, pode ser derivada de técnicas de calibração multivariada, muito importante na validação estatística¹³⁹ (Bauza et al., 2012).

Existem vários experimentos possíveis para determinar dos limites, incluindo aqueles baseados na inspeção visual (para método instrumentais e não instrumentais), na relação sinal/ruído, na média e desvio padrão de leituras de amostras brancas, no desvio padrão, intercepto ou inclinação da curva de calibração^{140,141}.

A aplicação de um procedimento analíticos que apresentem ruído de linha de base, é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos da amostra e, assim, auxilia na quantificação da menor concentração detectável do alvo¹⁴². Outrossim,

Após otimizar e encontrar as melhores condições, o teste foi aplicado em amostras com concentrações crescentes do alvo.

Uma relação linear da resposta de RGB com a concentração alvo de RNA da Influenza A foi obtida na faixa de concentração de 1,0 pmol L⁻¹ a 500,0 pmol L⁻¹. O método proposto apresentou um LoD baixo de 0,093 pmol L⁻¹ e um LoQ de 0,31 pmol L⁻¹. A FIGURA 4.16 apresenta a resposta de RGB obtida em função da concentração do alvo de RNA da Influenza A.

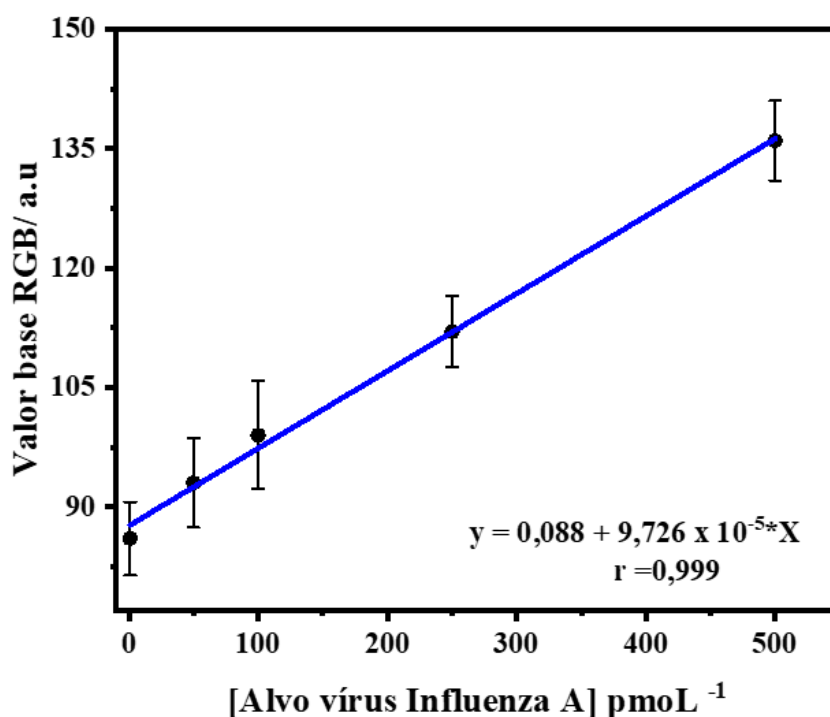


FIGURA 4.16- Resposta de RGB em função da concentração do alvo de RNA da Influenza. Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

As figuras de mérito obtidas no ensaio genômico baseado na PID foram comparados com outros trabalhos da literatura. A TABELA 4.2 apresenta o LoD de diferentes métodos reportados na literatura para a detecção do vírus Influenza A que faz uso de detecção por imagem.

TABELA 4.2- Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no presente trabalho com a literatura, envolvendo técnica de análise para detecção do vírus Influenza A.

Método de detecção	Tempo/min	LoD	Amostra	Alvo	Ref.
*HCR juntamente com gravação GNRs	40	1,25 nmol L ⁻¹	Soro fortificado	Ácido nucléico	143
Imagem de fluorescência	80	0,21; 0,12 e 0,16 nmol L ⁻¹	Plasma	RNA de H1N1; H9N2 e H3N2	144
ELISA digital	80	2,00 fmolL ⁻¹	Swab nasofaríngeo	Influenza A Núcleo proteína	145
* Imagem de fluorescência - hairpin	120	0,06 nmol L ⁻¹	Amostras reais de RNA intracelular	miRNA H1N1	146
Colorimetria e imagem digital	60	10,60 pmolL ⁻¹	Tecido infectado	RNA de (PRRSV)	147
Colorimetria e imagem digital	40	0,093 pmolL⁻¹	Saliva	RNA vírus Influenza A	Este trabalho

HCR - Reação em cadeia de hibridização (do inglês *Hybridization chain reaction*), nanobastões de ouro (GNRs do inglês *gold nanorods*), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV do inglês *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*)

* usou técnica de amplificação

Os parâmetros analíticos obtidos do ensaio genômico baseados em imagens foram comparados com outros trabalhos da literatura, por exemplo, o

trabalho de Leirs et al. ¹⁴⁵ atingiu LoD de 2 fmol L⁻¹ via detecção por ELISA digital que, apesar do bom desempenho do teste, depende de equipamentos de custo elevado e que é de operação complexas, mais ainda do que a o ELISA tradicional. Já Lim et al. ¹⁴⁶ em seu trabalho com detecção de miRNA atingiu um LoD de 0,06 nmol L⁻¹ via detecção por leitura de fluorescência, porém, o manuseio de miRNAs via hairpin depende de uma etapa de aquecimento, o que torna o teste mais longo e de maior complexidade. No trabalho de Zhang et al. ¹⁴⁴ para detecção de RNA, o LoD ficou entre 0,12-0,21 nmol L⁻¹ via detecção por leitura de fluorescência e, embora tenha um bom desempenho, o LoD obtido não é dos mais baixos.

4.7 - Estudo de reatividade cruzada na presença do vírus SARS-CoV-2 para a detecção da Influenza A com a PID.

A COVID-19 e a Influenza apresentam semelhanças nos sintomas dificultando o diagnóstico clínico inicial. Tais sintomas podem variar de pessoa para pessoa e um diagnóstico definitivo e precoce pode ajudar a controlar a doença e evitar complicações graves. Neste estudo, uma amostra de saliva de indivíduo saudável foi fortificada com ssDNAs com sequência semelhante à do genoma da Influenza A e do SARS-CoV-2 para avaliar a possibilidade de resposta cruzada e os resultados são mostrados na FIGURA 4.17.

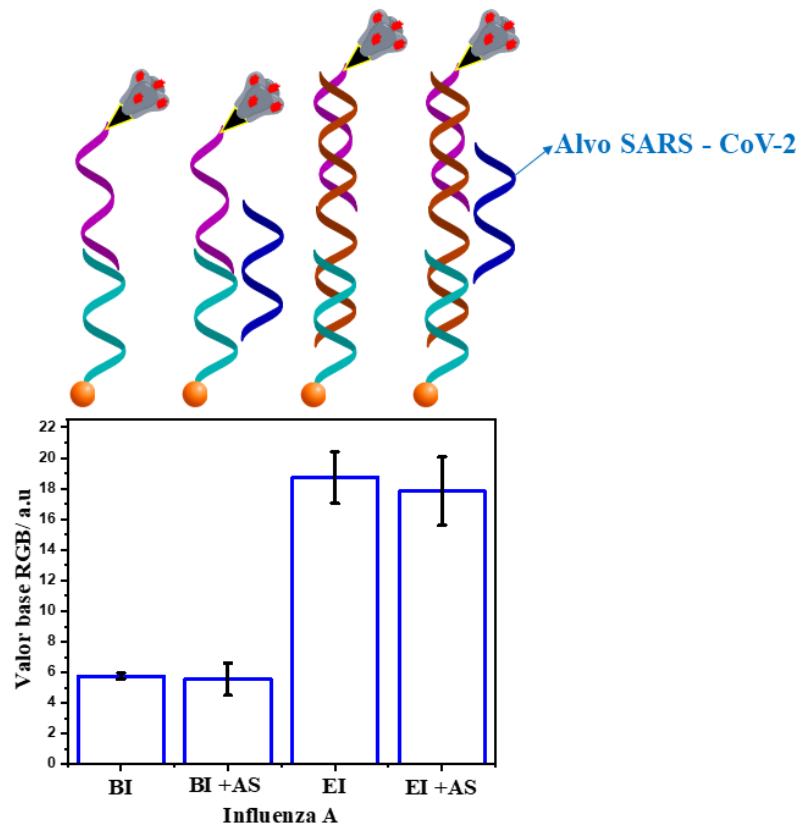


FIGURA 4.7- Avaliação da reação cruzada para detecção do vírus Influenza A, branco do ensaio da Influenza A (BI); branco do ensaio da Influenza A + alvo SARS-CoV-2 (BI +AS); ensaio da Influenza A (EI); ensaio da Influenza A + alvo SARS-CoV-2 (EI + AS), Valor obtido descontando o branco com concentração do alvo Influenza A de 50pM em tampão PBS pH 6,5 (n=3).

Como podemos observar, nas condições descritas, a presença do SARS-CoV-2 não levou a uma interferência significativa no ensaio para detecção da Influenza A nas amostras fortificadas de saliva confirmando a seletividade do teste proposto.

4.8 - Aplicação da PID para a detecção do RNA do vírus Influenza A em amostras de saliva de pacientes diagnosticados por RT-PCR e de indivíduos saudáveis

Um total de 36 amostras de saliva, incluindo pacientes diagnosticados com Influenza e indivíduos saudáveis, foram avaliadas diluindo a saliva em tampão NE 1x. As FIGURAS 4.18A e 4.18B mostram o resultado combinado de todas as amostras utilizando a estratégia de ensaio. As amostras foram testadas sem qualquer tipo de extração, apenas tratamento térmico realizado para a inativação do vírus.

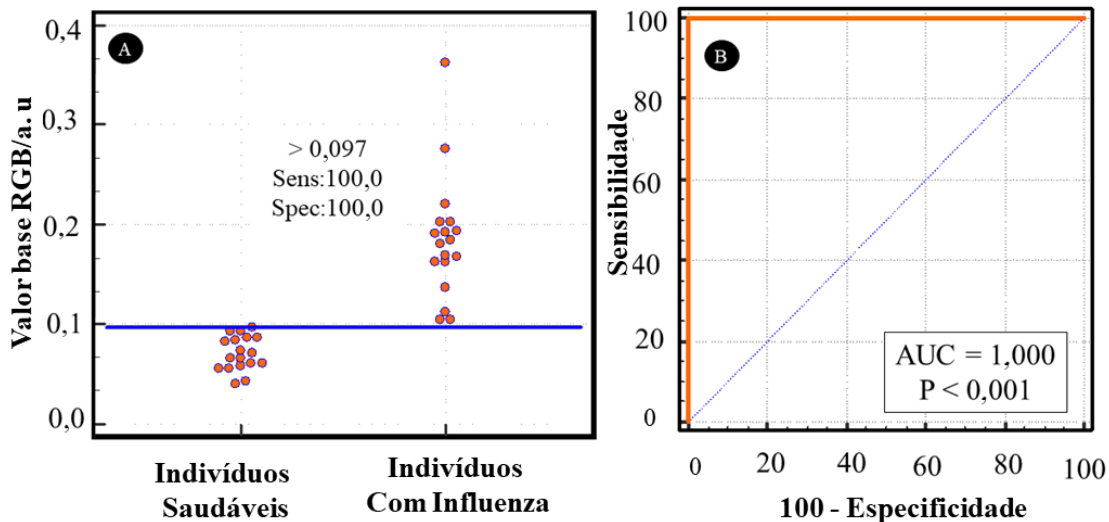


FIGURA 4.18- Detecção de RNA do vírus Influenza em amostras de saliva: A) Diagrama de pontos interativo referente as amostras de saliva avaliadas utilizando a detecção por imagem. B) Curva ROC para detecção de RNA viral. n = 36 (MedCalc).

Como pode ser observado, o teste diagnóstico para influenza atingiu 100% de sensibilidade e especificidade, o que significa que o teste pode identificar corretamente todos os indivíduos com Influenza (taxa de verdadeiro positivo de 1) e identificar corretamente todos os indivíduos saudáveis (taxa de falso positivo de 0).

Isso ocorre porque a curva ROC tem uma AUC de 1. Uma AUC de 1 indica discriminação perfeita e é o valor mais alto possível.

Para assegurar que a implementação das plataformas desenvolvidas, foi realizada uma estimativa dos custos envolvidos no projeto. O valor considera todos os insumos necessários incluindo: materiais, equipamentos e outros custos indiretos. É importante salientar que o valor da estimativa pode sofrer alterações conforme volume de compra, tendência, oferta ou natureza do comprador.

Além das plataformas, tem-se ainda os custos dos insumos para realização dos ensaios. Assim, considerando os volumes de soluções e sondas utilizadas, estima-se que o custo por teste é inferior a R\$1,50 no uso da PID. Já a PDE, teria o adicional do custo do dispositivo eletroquímico.

Uma vantagem das plataformas é o aproveitamento dos materiais construídos por modelagem e impressão 3D, que podem ser reciclados e/ou reaproveitados. Além disso, PID pode ser realizado utilizando diferentes tipos de câmera, o que pode diminuir ainda mais os custos. A tela da PDE também pode ser substituída por um monitor comum, assim como o programa pode ser utilizado em qualquer computador, com ou sem acesso à internet.

A PDE trabalha com qualquer tipo de celular com sistema operacional Android com ou sem acesso à internet. O mini potenciostato opera tanto em celulares quanto em computador, com a mesma interface operacional. As características da PDE e PID possibilita a utilização de ambas em locais remotos, fora de centros especializados.

Além disso, utilizamos sondas de DNA que são mais estáveis quimicamente do que o RNA e as sondas de DNA possuem custos mais baixos do que RNA e também do que anticorpos e antígenos.

Um outro ponto importante da proposta desenvolvida é a sua versatilidade. O protocolo desenvolvido permite a detecção de material genético da Influenza A e

SARS-CoV-2, mas também poderá ser adaptada facilmente para outros alvos buscando o diagnóstico de outras doenças.

Um diferencial das sondas utilizadas neste trabalho é capacidade de detectar mais de um subtipo das doenças. As sondas utilizadas para o ensaio da SARS-CoV-2 foram construídas para capturar todas variantes do vírus SARS-CoV-2. Já as sondas utilizadas para o ensaios da Influenza A tem a capacidade de detectar em uma única amostra os subtipos: H2N2, H8N4, H2N1, H10N9, H4N3, H1N2, H11N3, H3N2, H7N2, H2N7, H4N8, H13N2, H3N6, H10N7, H2N9, H3N3, H13N8, H1N1, H6N7, H1N3, H9N7, H5N1, H3N8, H11N1, H11N8, H5N2, H12N6, H5N3, H4N2, H2N3, H10N8, H12N5, H9N2, H7N5, H4N6, H6N8, H13N6, H11N9, H11N2, H13N9, H6N1, H6N2, H16N3, H12N2, H5N6, H10N3, H6N6, H2N4, H5N5, H7N3, H14N4, H3N1, H4N1, H7N9, H7N6, H10N4, H14N3, H2N5, H9N1, H5N8 e H7N7.

Capítulo 5 - Conclusões

Neste trabalho, desenvolvemos um ensaio genômico utilizando como técnica eletroquímica e também imagem digital para detecção e quantificação de RNA dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A em amostras de saliva. O método desenvolvido envolve o uso de PM modificados com ssDNA utilizadas como sondas para captura e separação de RNA viral e uma segunda sonda de ssDNA com biotina utilização de poli-strep-HRP como marcador eletroquímico e óptico. O método foi realizado utilizando plataformas que foram desenvolvidas e prototipadas por modelagem e impressão 3D utilizando materiais plásticos ou outros materiais de baixo custo e a fim de torná-los mais acessíveis, visando obter dispositivos para diagnósticos de baixo custo. O ensaio foi aplicado em amostras de pacientes diagnosticados por RT-PCR para COVID-19 e Influenza A e indivíduos saudáveis apresentando excelentes resultados em termos de sensibilidade e especificidade clínica indicando sua capacidade para diagnóstico de ambas as doenças. Os testes moleculares desenvolvidos se destacam pela simplicidade e eficácia, comparado ao RT-PCR, apresentando vantagens em termos de tempo de análise, preparo simplificado da amostra e baixo custo. Os ensaios propostos podem ser realizados em cerca de 60 min e permite não só a identificação, mas também a quantificação dos alvos, lembrando que o RT-PCR, que é o padrão ouro para o diagnóstico de COVID-19 e Influenza, é essencialmente qualitativo. A utilização das plataformas que foram desenvolvidas facilita o manuseio pelo operador, tornando o teste mais simples e rápido. Além disso, as plataformas podem ser utilizadas diversas vezes, podem ser produzidas em maior escala, bem como serem recicladas e/ou reaproveitadas.

Capítulo 6 - Referências bibliográficas

1. Broughton, J. *et al.* Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-based DETECTR Lateral Flow Assay. *medRxiv* 1–28 (2020) doi:10.1101/2020.03.06.20032334.
2. Funari, R., Chu, K. Y. & Shen, A. Q. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein by gold nanospikes in an opto-microfluidic chip. *Biosens Bioelectron* 169, 112578 (2020).
3. Wang, C. H. *et al.* Reactivity and sensitivity of commercially available influenza rapid diagnostic tests in Japan. *Sci Rep* 11, 1–11 (2022).
4. Team, N. S.-O. I. A. (H1N1) V. I. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *New England journal of medicine* 360, 2605–2615 (2009).
5. Reid, A., Taubenberger, J. & Fanning, T. Pandemic Influenza Virus Infection. *Nat Rev Microbiol* 2, 909–914 (2004).
6. Steinhauer, D. A. & Skehel, J. J. Genetics of influenza viruses. *Annual Review of Genetics* vol. 36 305–332 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.052402.152757> (2002).
7. Gerstl, F., Loessl, M., Borggraefe, V. & Baeumner, A. J. Multiplexed electrochemical liposomes applied to the detection of nucleic acids for Influenza A, Influenza B and SARS-CoV-2. *Anal Bioanal Chem* (2024) doi:10.1007/s00216-024-05145-8.
8. Bellei, N., Thaís, ; & Melchior, B. *H1N1: Pandemia e Perspectiva Atual H1N1: Overview and Perspectives.*
9. Fátima S Dawood, S. J. , L. F. , M. W. S. , S. L. , R. J. G. , L. V. G. , X. X. , C. B. P. , T. M. U. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *New England Journal of Medicine* 360, 2605–2615 (2009).

10. MS. *Aspectos Epidemiológicos*. https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/g/gripe-influenza/situacao-epidemiologica/informe-tecnico-de-influenza_2009-2010-2011_janeiro-2012.pdf (2012).
11. Lee, V. J. *et al.* Advances in measuring influenza burden of disease. *Influenza and other Respiratory Viruses* vol. 12 3–9 Preprint at <https://doi.org/10.1111/irv.12533> (2018).
12. Cui, J., Li, F. & Shi, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 181–192 (2019).
13. Ravi, N., Cortade, D. L., Ng, E. & Wang, S. X. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosens Bioelectron* 165, 112454 (2020).
14. Samson, R., Navale, G. R. & Dharne, M. S. Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19. *3 Biotech* 10, 1–9 (2020).
15. Jiao, J. *et al.* DNA nanoscaffold-based SARS-CoV-2 detection for COVID-19 diagnosis. *Biosens Bioelectron* 167, 112479 (2020).
16. Ekrami, E. *et al.* Potential Diagnostic Systems for Coronavirus Detection: a Critical Review. *Biol Proced Online* 22, 21 (2020).
17. Riou, J. & Althaus, C. L. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Eurosurveillance* 25, 1–5 (2020).
18. Yin, Y. & Wunderink, R. G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology* vol. 23 130–137 Preprint at <https://doi.org/10.1111/resp.13196> (2018).
19. Zhu, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* 382, 727–733 (2020).

20. Deenin, W. *et al.* Electrochemical lateral-flow device for rapid COVID-19 antigen-diagnostic testing. *Bioelectrochemistry* 152, (2023).
21. Koczula, K. M. & Gallotta, A. Lateral flow assays. *Essays Biochem* 60, 111–120 (2016).
22. Zhang, Y. *et al.* Recent Progress on Rapid Lateral Flow Assay-Based Early Diagnosis of COVID-19. *Front Bioeng Biotechnol* 10, 1–17 (2022).
23. Hanafiah, K. M. *et al.* Development of Multiplexed Infectious Disease Lateral Flow Assays: Challenges and Opportunities. *Diagnostics* 7, 1–9 (2017).
24. Boonham, N. *et al.* Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Res* 186, 20–31 (2014).
25. Li, Z. *et al.* Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 92, 1518–1524 (2020).
26. Cui, F. & Zhou, H. S. Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. *Biosens Bioelectron* 165, 112349 (2020).
27. Green, K. *et al.* What tests could potentially be used for the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages. *The Centre for Evidence-Based Medicine develops, promotes and disseminates better evidence for healthcare* 1–13 (2020).
28. Samson, R., Navale, G. R. & Dharne, M. S. Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19. *3 Biotech* 10, 1–9 (2020).
29. Leirs, K. *et al.* Bioassay Development for Ultrasensitive Detection of Influenza A Nucleoprotein Using Digital ELISA. *Anal Chem* 88, 8450–8458 (2016).
30. Kasetsirikul, S. *et al.* Detection of the SARS-CoV-2 humanized antibody with paper-based ELISA. *Analyst* 145, 7680–7686 (2020).

31. White, J. R. *et al.* Identification and genomic characterization of the first isolate of bluetongue virus serotype 5 detected in Australia. *Vet Med Sci* 5, 129–145 (2019).
32. 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. *Biosens Bioelectron* 26, 4477–4483 (2011).
33. Ding, C., Zhang, Q. & Zhang, S. An electrochemical immunoassay for protein based on bio bar code method. *Biosens Bioelectron* 24, 2434–2440 (2009).
34. VUNSH, R., ROSNER, A. & STEIN, A. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology* 117, 561–569 (1990).
35. Elden, L. J. R. Van, Nijhuis, M., Schipper, P., Schuurman, R. & Loon, A. M. Van. Simultaneous Detection of Influenza Viruses A and B Using Real-Time Quantitative PCR -- van Elden et al_ 39 (1) 196 -- *Journal of Clinical Microbiology*. *Journal of Microbiology* 39, 196–200 (2001).
36. Nguyen, T., Bang, D. D. & Wolff, A. 2019 Novel coronavirus disease (COVID-19): Paving the road for rapid detection and point-of-care diagnostics. *Micromachines (Basel)* 11, 1–7 (2020).
37. Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30, 1292–1305 (2002).
38. Silva, T. A., Moraes, F. C., Janegitz, B. C. & Fatibello-Filho, O. Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: a review. *J Nanomater* 2017, (2017).
39. Vidotti, M., Carvalhal, R. F., Mendes, R. K., Ferreira, D. C. M. & Kubota, L. T. Biosensors based on gold nanostructures. *J Braz Chem Soc* 22, 3–20 (2011).

40. de Oliveira, T. R., Martucci, D. H. & Faria, R. C. Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay. *Sens Actuators B Chem* 255, 684–691 (2018).
41. Pg, M. B. F., Ic, T. C., Rosane, I. & Pq, W. Z. O. Comparação entre eletrodos contendo peroxidase obtida do pinhão e HRP comercial imobilizadas em nanopartículas de poliuretano Conclusões. 34 (2009).
42. Otieno, B. A. *et al.* Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay. *Biosens Bioelectron* 22, 3–20 (2016).
43. 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).
44. Wang, H., Wang, J., Timchalk, C. & Lin, Y. Magnetic electrochemical immunoassays with quantum dot labels for detection of phosphorylated acetylcholinesterase in plasma. *Anal Chem* 80, 8477–8484 (2008).
45. Otieno, B. A. *et al.* On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers. *Biosens Bioelectron* 53, 268–274 (2014).
46. Navale, G. R., Thripuranthaka, M. & Late, Dattatray J Shinde, S. S. Antimicrobial Activity of ZnO Nanoparticles against Pathogenic Bacteria and Fungi. *JSM Nanotechnology and Nanomedicine* 3, 1033 (2015).
47. Holzinger, M., Goff, A. Le & Cosnier, S. Nanomaterials for biosensing applications: A review. *Front Chem* 2, 1–10 (2014).
48. Kudr, J., Klejdus, B., Adam, V. & Zitka, O. Magnetic solids in electrochemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98, 104–113 (2018).

49. Materón, E. M. *et al.* Magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review. *Applied Surface Science Advances* 6, (2021).
50. Babaei, A. *et al.* Genosensors as an alternative diagnostic sensing approaches for specific detection of virus species: A review of common techniques and outcomes. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 155, (2022).
51. Livshits, M. A. & Mirzabekov, A. D. Theoretical analysis of the kinetics of DNA hybridization with gel-immobilized oligonucleotides. *Biophys J* 71, 2795–2801 (1996).
52. Dehghani, Z. *et al.* Magnetic beads modified with Pt/Pd nanoparticle and aptamer as a catalytic nano-bioprobe in combination with loop mediated isothermal amplification for the on-site detection of Salmonella Typhimurium in food and fecal samples. *Food Control* 121, 107664 (2021).
53. Shen, C. *et al.* A novel sandwich-like cytosensor based on aptamers-modified magnetic beads and carbon dots/cobalt oxyhydroxide nanosheets for circulating tumor cells detection. *Sens Actuators B Chem* 331, 129399 (2021).
54. Farzin, L., Sadjadi, S., Sheini, A. & Mohaghehpour, E. A nanoscale genosensor for early detection of COVID-19 by voltammetric determination of RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) sequence of SARS-CoV-2 virus. *Microchimica Acta* 188, (2021).
55. Cajigas, S., Alzate, D., Fernández, M., Muskus, C. & Orozco, J. Electrochemical genosensor for the specific detection of SARS-CoV-2. *Talanta* 245, (2022).
56. Adachi, D. *et al.* Comprehensive detection and identification of human coronaviruses, including the SARS-associated coronavirus, with a single RT-PCR assay. *J Virol Methods* 122, 29–36 (2004).
57. Noppakuadrittidej, P. *et al.* Development of peptide nucleic acid-based bead array technology for Bacillus cereus detection. *Sci Rep* 13, (2023).

58. Dorey, A. & Howorka, S. Nanopore DNA sequencing technologies and their applications towards single-molecule proteomics. *Nature Chemistry* vol. 16 314–334 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41557-023-01322-x> (2024).
59. Xiao, X., Li, H., Zhao, L., Zhang, Y. & Liu, Z. Oligonucleotide aptamers: Recent advances in their screening, molecular conformation and therapeutic applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 143, 112232 (2021).
60. Poole, A., Penny, D. & Sjöberg, B. M. Methyl-RNA: An evolutionary bridge between RNA and DNA? *Chem Biol* 7, R207–R216 (2000).
61. Švancara, I. *et al.* Critical Reviews in Analytical Chemistry Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis Electroanalysis. 8347, (2010).
62. Zima, J. *et al.* A review on electrodes modified with ionic liquids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 656, 2–16 (2011).
63. Schröfel, A. *et al.* Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - A review. *Acta Biomater* 10, 4023–4042 (2014).
64. Cui, F. & Zhou, H. S. Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. *Biosens Bioelectron* 165, 112349 (2020).
65. Xu, Y. & Wang, E. Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochim Acta* 84, 62–73 (2012).
66. Kim, S.-E., Tieu, M. Van, Hwang, S. Y. & Lee, M.-H. Magnetic Particles: Their Applications from Sample Preparations to Biosensing Platforms. *Micromachines (Basel)* 11, 302 (2020).
67. de Oliveira, T. R., Martucci, D. H. & Faria, R. C. Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay. *Sens Actuators B Chem* 255, 684–691 (2018).

68. Otieno, B. A. *et al.* Simple disposable microfluidic device for Salmonella typhimurium detection by magneto-immunoassay. *Biosens Bioelectron* 22, 3–20 (2016).
69. Muñoz, J. & Pumera, M. Accounts in 3D-Printed Electrochemical Sensors: Towards Monitoring of Environmental Pollutants. *ChemElectroChem* 7, 3404–3413 (2020).
70. Silva, T. A., Zanin, H., Corat, E. J. & Fatibello-Filho, O. Simultaneous Voltammetric Determination of Paracetamol, Codeine and Caffeine on Diamond-like Carbon Porous Electrodes. *Electroanalysis* 29, 907–916 (2017).
71. Tefera, M., Geto, A., Tessema, M. & Admassie, S. Simultaneous determination of caffeine and paracetamol by square wave voltammetry at poly (4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *Food Chem* 210, 156–162 (2016).
72. Ic, L. S. D. M. & Pq, T. R. L. C. P. Utilização de eletrodo de cobre para classificação de amostras adulteradas de etanol combustível Resultados e Discussão. 2006 (2006).
73. Adachi, D. *et al.* Comprehensive detection and identification of human coronaviruses, including the SARS-associated coronavirus, with a single RT-PCR assay. *J Virol Methods* 122, 29–36 (2004).
74. Wang, J., Xiao, X., Yao, G., Stern, A. & Javidi, B. Synthetic Aperture Integral Imaging Display with Moving Array Lenslet Technique. *IEEE/OSA Journal of Display Technology* 11, 827–833 (2015).
75. Xi, H., Juhas, M. & Zhang, Y. G-quadruplex based biosensor: A potential tool for SARS-CoV-2 detection. *Biosens Bioelectron* 167, 112494 (2020).
76. da Silva, W., Ghica, M. E. & Brett, C. M. A. Choline oxidase inhibition biosensor based on poly(brilliant cresyl blue) – deep eutectic solvent / carbon

nanotube modified electrode for dichlorvos organophosphorus pesticide. *Sens Actuators B Chem* 298, 126862 (2019).

77. Silva, T. A., Moraes, F. C., Janegitz, B. C. & Fatibello-Filho, O. Electrochemical Biosensors Based on Nanostructured Carbon Black: A Review. *J Nanomater* 2017, 4571614 (2017).
78. Pohanka, M. Colorimetric hand-held sensors and biosensors with a small digital camera as signal recorder, a review. *Rev Anal Chem* 39, 20–30 (2020).
79. Caygill, R. L., Blair, G. E. & Millner, P. A. A review on viral biosensors to detect human pathogens. *Anal Chim Acta* 681, 8–15 (2010).
80. Shen, Y., Anwar, T. Bin & Mulchandani, A. Current status, advances, challenges and perspectives on biosensors for COVID-19 diagnosis in resource-limited settings. *Sensors and Actuators Reports* 3, 100025 (2021).
81. de Castro, L. F. *et al.* Salivary diagnostics on paper microfluidic devices and their use as wearable sensors for glucose monitoring. *Anal Bioanal Chem* 411, 4919–4928 (2019).
82. Kumar-Krishnan, S. *et al.* Synthesis of gold nanoparticles supported on functionalized nanosilica using deep eutectic solvent for an electrochemical enzymatic glucose biosensor. *J Mater Chem B* 5, 7072–7081 (2017).
83. Derkus, B. Applying the miniaturization technologies for biosensor design. *Biosens Bioelectron* 79, 901–913 (2016).
84. Taleat, Z., Khoshroo, A. & Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchimica Acta* 181, 865–891 (2014).
85. 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).

86. Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P. & Jabbour, G. E. Inkjet printing-process and its applications. *Advanced Materials* 22, 673–685 (2010).
87. Yamanaka, K., Vestergaard, M. C. & Tamiya, E. Printable electrochemical biosensors: A focus on screen-printed electrodes and their application. *Sensors (Switzerland)* 16, 1–16 (2016).
88. Wu, L. & Qu, X. Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chem Soc Rev* 44, 2963–2997 (2015).
89. Nascimento, V. B. & Angnes, L. Eletrodos fabricados por ‘silk-screen’. *Quim Nova* 21, 614–629 (1998).
90. Yamanaka, K., Vestergaard, M. C. & Tamiya, E. Printable electrochemical biosensors: A focus on screen-printed electrodes and their application. *Sensors (Switzerland)* 16, 1–16 (2016).
91. Taleat, Z., Khoshroo, A. & Mazloun-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchimica Acta* 181, 865–891 (2014).
92. de Oliveira, T. R., Manzine, P. R., Cominetti, M. R., Leite, O. D. & Faria, R. C. Electrochemical magneto-immunoassay for detection of ADAM10 Alzheimer’s biomarker using gold nanoparticles as label. *Talanta* 266, 125042 (2024).
93. 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 (Basel)* 10, (2020).
94. 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).

95. Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P. & Jabbour, G. E. Inkjet printing-process and its applications. *Advanced Materials* 22, 673–685 (2010).
96. Sousa, L. R., Duarte, L. C. & Coltro, W. K. T. Instrument-free fabrication of microfluidic paper-based analytical devices through 3D pen drawing. *Sens Actuators B Chem* 312, 128018 (2020).
97. Rocha, D. P., Squissato, A. L., da Silva, S. M., Richter, E. M. & Munoz, R. A. A. Improved electrochemical detection of metals in biological samples using 3D-printed electrode: Chemical/electrochemical treatment exposes carbon-black conductive sites. *Electrochim Acta* 335, 1–11 (2020).
98. Silva-Neto, H. A. *et al.* Recycling 3D Printed Residues for the Development of Disposable Paper-Based Electrochemical Sensors. *ACS Appl Mater Interfaces* (2023) doi:10.1021/acsami.3c00370.
99. Gross, B., Lockwood, S. Y. & Spence, D. M. Recent advances in analytical chemistry by 3D printing. *Anal Chem* 89, 57–70 (2017).
100. Niranjana, Y. C. *et al.* The Unprecedented Role of 3D Printing Technology in Fighting the COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review. *Materials* 15, (2022).
101. Cardoso, R. M. *et al.* Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review. *Anal Chim Acta* 1118, 73–91 (2020).
102. Cardoso, R. M. *et al.* 3D-Printed graphene/polylactic acid electrode for bioanalysis: Biosensing of glucose and simultaneous determination of uric acid and nitrite in biological fluids. *Sens Actuators B Chem* 307, 127621 (2020).
103. Duarte, L. C., Chagas, C. L. S., Ribeiro, L. E. B. & Coltro, W. K. T. 3D printing of microfluidic devices with embedded sensing electrodes for generating and measuring the size of microdroplets based on contactless conductivity detection. *Sens Actuators B Chem* 251, 427–432 (2017).

104. Kadimisetty, K. *et al.* 3D-printed supercapacitor-powered electrochemiluminescent protein immunoarray. *Biosens Bioelectron* 77, 188–193 (2016).
105. Byrne, L., Barker, J., Pennarun-Thomas, G., Diamond, D. & Edwards, S. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19, 517–522 (2000).
106. Christodouleas, D. C., Nemiroski, A., Kumar, A. A. & Whitesides, G. M. Broadly Available Imaging Devices Enable High-Quality Low-Cost Photometry. *Anal Chem* 87, 9170–9178 (2015).
107. Santos, J. L. O., Leite, O. D., Vieira, A. D. M., Jesus, D. S. & Kamogawa, M. Y. Use of a digital image in flow analysis: Determination of nitrite and nitrate in natural waters. *J Braz Chem Soc* 27, 70–76 (2016).
108. Holkem, A. P. *et al.* A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. *Fuel* 289, 119941 (2021).
109. Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L. & Zhang, G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement* 171, 108829 (2021).
110. Vidal, M., Garcia-Arrona, R., Bordagaray, A., Ostra, M. & Albizu, G. %J T. Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis. 184, 58–64 (2018).
111. 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).
112. Tully, J. J. & Meloni, G. N. A Scientist's Guide to Buying a 3D Printer: How to Choose the Right Printer for Your Laboratory. *Anal Chem* 92, 14853–14860 (2020).

113. Ngo, T. D., Kashani, A., Imbalzano, G., Nguyen, K. T. Q. & Hui, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Compos B Eng* 143, 172–196 (2018).
114. Williams, R. J., Brine, T., Crapnell, R. D., Ferrari, A. G.-M. & Banks, C. E. The effect of water ingress on additively manufactured electrodes. *Mater Adv* 3, 7632–7639 (2022).
115. Williams, R. J. *et al.* Poly(lactic acid) mass transfer properties. *Prog Polym Sci* 86, 85–121 (2018).
116. Vidakis, N. *et al.* Mechanical properties of 3D-printed acrylonitrile-butadiene-styrene TiO₂ and ATO nanocomposites. *Polymers (Basel)* 12, 1–16 (2020).
117. Torrado Perez, A. R., Roberson, D. A. & Wicker, R. B. Fracture Surface Analysis of 3D-Printed Tensile Specimens of Novel ABS-Based Materials. *Journal of Failure Analysis and Prevention* 14, 343–353 (2014).
118. Gaiao, E. da N. *et al.* Digital image-based titrations. *Anal Chim Acta* 570, 283–290 (2006).
119. Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L. & Zhang, G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement (Lond)* 171, (2021).
120. Santos, J. L. O., Leite, O. D., Vieira, A. D. M., Jesus, D. S. & Kamogawa, M. Y. Use of a digital image in flow analysis: Determination of nitrite and nitrate in natural waters. *J Braz Chem Soc* 27, 70–76 (2016).
121. Lima, M. B., Andrade, S. I. E., Barreto, I. S., Almeida, L. F. & Araújo, M. C. U. A digital image-based micro-flow-batch analyzer. *Microchemical Journal* 106, 238–243 (2013).
122. Silva Lyra, W. *et al.* Digital image-based flame emission spectrometry. *Talanta* 77, 1584–1589 (2009).

123. Andrade, S. I. E. *et al.* A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in water. *Microchemical Journal* 109, 106–111 (2013).
124. Sharafeldin, M. *et al.* Detecting cancer metastasis and accompanying protein biomarkers at single cell levels using a 3D-printed microfluidic immunoarray. *Biosens Bioelectron* 171, (2021).
125. Levine, M. J. Development of Artificial Salivas. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 4, 279–286 (1993).
126. Humphrey, S. P. & Williamson, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85, 162–169 (2001).
127. Tang, X. *et al.* Comparison of Hospitalized Patients With ARDS Caused by COVID-19 and H1N1. *Chest* 158, 195–205 (2020).
128. Torrente-Rodríguez, R. M. *et al.* SARS-CoV-2 RapidPlex: A Graphene-Based Multiplexed Telemedicine Platform for Rapid and Low-Cost COVID-19 Diagnosis and Monitoring. *Matter* 3, 1981–1998 (2020).
129. Lee, D., Bhardwaj, J. & Jang, J. Paper-based electrochemical immunosensor for label-free detection of multiple avian influenza virus antigens using flexible screen-printed carbon nanotube-polydimethylsiloxane electrodes. *Sci Rep* 12, 1–11 (2022).
130. Cajigas, S., Alzate, D., Fernández, M., Muskus, C. & Orozco, J. Electrochemical genosensor for the specific detection of SARS-CoV-2. *Talanta* 245, (2022).
131. Catunda, L. G. da S. *et al.* SARS-CoV-2 detection enabled by a portable and label-free photoelectrochemical genosensor using graphitic carbon nitride and gold nanoparticles. *Electrochim Acta* 451, 142271 (2023).

132. Grabowska, I. *et al.* Single electrode genosensor for simultaneous determination of sequences encoding hemagglutinin and neuraminidase of avian influenza virus type H5N1. *Anal Chem* 85, 10167–10173 (2013).
133. Lee, T. *et al.* Fabrication of electrochemical biosensor consisted of multi-functional DNA structure/porous au nanoparticle for avian influenza virus (H5N1) in chicken serum. *Materials Science and Engineering C* 99, 511–519 (2019).
134. Mandrekar, J. N. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *Journal of Thoracic Oncology* 5, 1315–1316 (2010).
135. Zweig, M. H. & Campbell, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39, 561–577 (1993).
136. Fluss, R., Faraggi, D. & Reiser, B. Estimation of the Youden Index and its Associated Cutoff Point. *Biometrical Journal* 47, 458–472 (2005).
137. Jarvis, K. F. & Kelley, J. B. Temporal dynamics of viral load and false negative rate influence the levels of testing necessary to combat COVID-19 spread. *Sci Rep* 11, 9221 (2021).
138. Ott, I. M. *et al.* Stability of SARS-CoV-2 RNA in Nonsupplemented Saliva - Volume 27, Number 4—April 2021 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg Infect Dis* 27, 1146–1150 (2021).
139. Bauer, G., Wegscheider, W. & Ortner, H. M. *Limits of Detection in Multivariate Calibration*. *Fresenius J Anal Chem* vol. 340 (1991).
140. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Anal Chem* 68, 305A-309A (1996).

141. Taverniers, I., De Loose, M. & Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 23, 535–552 (2004).
142. Pomerantsev, A. L., Vtyurina, D. N. & Rodionova, O. Y. Limit of detection in qualitative analysis: Classification Analytical Signal approach. *Microchemical Journal* 195, 109490 (2023).
143. Zhao, X. *et al.* Smartphone-assisted point-of-care testing of nucleic acids based on hybridization chain reaction, magnetic beads, and gold nanorods etching. *Sens Actuators B Chem* 392, (2023).
144. Zhang, R.-Q., Hong, S.-L., Wen, C.-Y., Pang, D.-W. & Zhang, Z.-L. Rapid detection and subtyping of multiple influenza viruses on a microfluidic chip integrated with controllable micro-magnetic field. *Biosens Bioelectron* 100, 348–354 (2018).
145. Leirs, K. *et al.* Bioassay Development for Ultrasensitive Detection of Influenza A Nucleoprotein Using Digital ELISA. *Anal Chem* 88, 8450–8458 (2016).
146. Lim, J. *et al.* Highly Sensitive in Vitro Diagnostic System of Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Infection with Specific MicroRNA as a Biomarker. *ACS Omega* 4, 14560–14568 (2019).
147. Yu, M. *et al.* A smartphone-based portable biosensor for colorimetric detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Sens Actuators B Chem* 396, (2023).

ANEXO I

O genoma do vírus SARS-CoV-2: região da fosfoproteína N do nucleocapsídeo

Identificação no GenBank: 43740575

1 atgtctgata atggaccca aatcagcga aatgcacccc gcattacgtt tggaggacce
 61 tcagattcaa ctggcagtaa ccagaatgga gaacgcagtg gggcgcgcatc aaaacaacgt
 121 cggccccaag gttaccxaa taatactgcg tcttgggtca ccgctctcac tcaacatggc
 181 aaggaagacc ttaaattccc tcgaggacaa ggcgttccaa ttaacaccaa tagcagtcca
 241 gatgacaaa ttggctacta ccgaagagct accagacgaa ttcgtgggtg tgacggtaaa
 301 atgaaagatc tcagtccaag atggtattc tactacctag gaactgggccc agaagctgga
 361 cttcctatg gtgctaacia agacggcatc atatgggtg caactgaggg agccttgaat
 421 acacaaaag atcacattgg cacccgcaat cctgctaaca atgctgcaat cgtgctacia
 481 cttctcaag gaacaacatt gccaaaaggc ttctacgcag aaggagcag aggcggcagt
 541 caagcctct ctcgttctc atcacgtagt cgcaacagtt caagaaattc aactccaggc
 601 agcagttagg gaacttctc tgctagaatg gctggcaatg gcggtgatgc tgctcttgct
 661 ttgctgctgc ttgacagatt gaaccagctt gagagcaaaa tgtctggtaa aggccaacia
 721 caacaaggcc aaactgtcac taagaatct gctgctgagg cttctaagaa gcctcggcaa
 781 aaacgtactg ccactaaagc atacaatgta acacaagctt teggcagacg tggccagaa
 841 caaacccaag gaaattttgg ggaccaggaa ctaatcagac aaggaactga ttacaaacat
 901 tggccgcaaa ttgcacaatt tgccccagc gettcagcgt tcttcggaat gtcgcgcatt
 961 ggcatggaag tcacacctc gggaacgtgg ttgacctaca caggtgccat caaattggat
 1021 gacaaagatc caaattcaa agatcaagtc attttctga ataagcatat tgacgcatac
 1081 aaaacattcc caccaacaga gcctaaaaag gacaaaaaga agaaggctga tgaaactcaa
 1141 gccttaccgc agagacagaa gaaacagcaa actgtgactc ttcttctgc tgacagattg
 1201 gatgatttct ccaacaatt gcaacaatcc atgagcagtg ctgactcaac tcaggcctaa

O genoma do vírus Influenza A: genes da proteína 2 da matriz do segmento 7 (M2) e da proteína da matriz 1 (M1)

Identificação no GenBank: MT639854.1

1 atgagccttc taaccgaggt cgaaacgtat gttctctcta tcgttccatc aggccccctc
61 aaagccgaga tcgcgagag acttgaagat gtctttgctg ggaaaaacac agatcttgag
121 gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca attctgtcac ctctgactaa ggggatttta
181 gggtttgtt tcacgctcac cgtgccaggt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc
241 caaatgcc tcaatgggaa tggagacca aataacatgg acaaagcagt taaactgtat
301 aggaaactta agagggagat aacgttccat ggggccaaag aaatagctct cagtattct
361 gctggtgcac ttgccagttg catgggcctc atatacaata gaatgggggc tgtaaccact
421 gaagtggcat ttggcctggt atgtgaaca tgtgagcaga ttgctgatte ccagcacagg
481 tctcataggc agatggtggc aacaaccaat ccattaataa aacatgagaa cagaatggtt
541 ttggccagca ctacagctaa ggctatggag caaatggctg gatcaagtga gcaggcagcg
601 gaggccatgg agatagctag tcaggccagg cagatggtgc aggcaatgag agccattggg
661 actcactcta gttccagtac tggcttaaga gatgatcttc ttgaaaattt gcagacctat
721 cagaaacgaa tgggggtgca gatgcaacga ttcaagtgat ccgcttattg ttgccgcaa
781 taccattggg atcttgact tgatattgtg gattcttgat cgtcttttt tcaaatgcgt
841 ctgtcgactc ttcaaacacg gccttaaaag aggcccttct acggaaggag tacctgagtc
901 tatgagggaa gaatatcgaa aggaacagca gaatgctgtg gatgctgacg acagtcattt
961 tgtcagcata gagttggagt aa

ANEXO II

PRODUÇÕES

Biosensors and Bioelectronics 255 (2024) 116210



Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios



An electrochemical genomagnetic assay for detection of SARS-CoV-2 and Influenza A viruses in saliva

Daniel Júnior Almeida dos Santos^a, Tássia Regina de Oliveira^a, Gabriela Martins de Araújo^a, Henrique Pott-Junior^b, Matias Eliseo Melendez^c, Ester Cerdeira Sabino^d, Oldair Donizeti Leite^{a,c,e}, Ronaldo Censi Faria^{a,*,**}

^a Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil

^b Department of Medicine, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil

^c National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, 20231-050, Brazil

^d Institute of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05403-000, Brazil

^e Federal Technological University of Paraná, Campus Medianeira, Medianeira, PR, 85884-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
RNA detection
Molecular test
Genomagnetic assay
Disposable electrodes
3D printing

ABSTRACT

Viral respiratory infections represent a major threat to the population's health globally. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causes COVID-19 disease and in some cases the symptoms can be confused with Influenza disease caused by the Influenza A viruses. A simple, fast, and selective assay capable of identifying the etiologic agent and differentiating the diseases is essential to provide the correct clinical management to the patient. Herein, we described the development of a genomagnetic assay for the selective capture of viral RNA from SARS-CoV-2 and Influenza A viruses in saliva samples and employing a simple disposable electrochemical device for gene detection and quantification. The proposed method showed excellent performance detecting RNA of SARS-CoV-2 and Influenza A viruses, with a limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) of 5.0 fmol L⁻¹ and 8.6 fmol L⁻¹ for SARS-CoV-2, and 1.0 fmol L⁻¹ and 108.9 fmol L⁻¹ for Influenza, respectively. The genomagnetic assay was employed to evaluate the presence of the viruses in 36 saliva samples and the results presented similar responses to those obtained by the real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), demonstrating the reliability and capability of a method as an alternative for the diagnosis of COVID-19 and Influenza with point-of-care capabilities.

DOS SANTOS, Daniel Júnior Almeida et al. An electrochemical genomagnetic assay for detection of SARS-CoV-2 and Influenza A viruses in saliva. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 255, p. 116210, 2024.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116210>

COLABORAÇÕES

Electrochimica Acta 451 (2023) 142271



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.journals.elsevier.com/electrochimica-acta

SARS-CoV-2 detection enabled by a portable and label-free photoelectrochemical genosensor using graphitic carbon nitride and gold nanoparticles

Lucas Gomes da Silva Catunda^{a,b,*}, Thiago Martimiano do Prado^a, Tássia Regina de Oliveira^c, Daniel Júnior Almeida dos Santos^c, Nathalia Oezau Gomes^a, Daniel Souza Correa^b, Ronaldo Censi Faria^c, Sérgio Antonio Spinola Machado^{a,*}

^a Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP 13560-970, Brazil

^b Nanotechnology National Laboratory for Agriculture (LNNA), Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP 13560-970, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV-2 detection
Photoelectrochemical (PEC) sensor
Saliva test
Miniaturized platform
Arduino

ABSTRACT

Fast, sensitive, simple, and cheap sensors are highly desirable to be applied in the health system because they improve point-of-care diagnostics, which can reduce the number of cases of infection or even deaths. In this context, here we report the development of a label-free genosensor using a screen-printed electrode modified with 2D-carbonylated graphitic carbon nitride (c-g-C₃N₄), poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA), and glutathione-protected gold nanoparticles (GSH-AuNPs) for photoelectrochemical (PEC) detection of SARS-CoV-2. We also made use of Arduino and 3D printing to miniaturize the sensor device. The electrode surface was characterized by AFM and SEM techniques, and the gold nanoparticles by UV-Vis spectrophotometry. For SARS-CoV-2 detection, capture probe DNA was immobilized on the electrode surface. The hybridization of the final genosensor was tested with a synthetic single-strand DNA target and with natural saliva samples using the photoelectrochemistry method. The device presented a linear range from 1 to 10,000 fmol L⁻¹ and a limit of detection of 2.2 and 3.4 fmol L⁻¹ using cpDNA 1A and 3A respectively. The sensibility and accuracy found for the genosensor using cpDNA 1A using biological samples were 93.3 and 80% respectively, indicating the potential of the label-free and portable genosensor to detect SARS-CoV-2 RNA in saliva samples.

DA SILVA CATUNDA, Lucas Gomes et al. SARS-CoV-2 detection enabled by a portable and label-free photoelectrochemical genosensor using graphitic carbon nitride and gold nanoparticles. *Electrochimica Acta*, v. 451, p. 142271, 2023.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142271>