

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

**DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO
ELETROQUIMILUMINESCENTE DE BAIXO CUSTO PARA
DETECÇÃO DO SARS-CoV-2 EM SALIVA**

Táise Helena Oliveira Leite*

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

Orientadora: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

***Bolsista CNPq**

**SÃO CARLOS-SP
2023**



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 da candidata Taíse Helena Oliveira Leite, realizada em 09/03/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Profa. Dra. Juliana Cancino Bernardi (FFCLRP/USP)

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz (UFU)

Prof. Dr. Evandro Piccin (UFMG)

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (UFSCar)

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

“Não existe triunfo sem perda, não há vitória sem sofrimento e não há liberdade sem sacrifício.” J. R. R. Tolkien

“Quando a situação for boa, desfrute-a. Quando a situação for ruim, transforme-a.

E quando não for possível transformá-la, transforme-se.”

Viktor Frankl

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

A Deus.

Aos meus pais Moacir e Maria Celeste, a meu irmão Washington, a toda minha família, amigos e aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, Senhor de toda sabedoria e inteligência, por todas as graças e bênçãos concedidas durante essa jornada e por me permitir chegar até aqui.

A minha FAMÍLIA por todo esforço, amor, carinho, apoio incondicional, incentivo, por serem meu pilar e motivação para que eu pudesse realizar esse sonho. Em especial ao meu IRMÃO, Washington Luís, meu melhor amigo e confidente, por me escutar, sempre me incentivar e me ajudar a achar meu ponto de equilíbrio. Te amo eternamente, meu irmão.

Ao professor Ronaldo Censi Faria pela oportunidade, confiança, orientação incentivo, compreensão e otimismo diário.

Aos meus queridos colegas de trabalho e amigos do LABIE: Camila, Thaísa, Thaiane, Wilson, Vagner, Wyllian, Daniel, Pablo, Evair, Oldair, Gabi e Olívia pela convivência durante esse período de formação e aprendizagem, e por proporcionarem um ambiente de trabalho divertido, agradável e com compartilhamento de conhecimento.

Ao meu querido quarteto, “Ronaldetes”, Karla, Sthéfane e Tássia pela amizade verdadeira e presença constante. Nossos cafés, desabafos, conselhos, apoio, risadas e fofocas. É sempre muito bom compartilhar a vida com vocês, meninas!

Em especial, quero agradecer a minha GRANDE AMIGA e companheira de trabalho, Tássia Regina, que se tornou minha “mainha científica”. Por todos os anos de trabalho e amizade, pela paciência em me orientar, ensinar, pelo companheirismo e preocupações. E principalmente, pelo bom humor e as constantes risadas, tornando essa época de nossas vidas inesquecível.

Aos antigos amigos, que continuaram fazendo parte dessa jornada: João, Gabriel, Analú, Jocely, Letícia Pires, Gregory, Celis, Mitchell, Tamires, Tiago, Adriana,

Júnior, Jeyne, Jéssica e Daniel, muito obrigada pela amizade de vocês e por estarem presentes durante todos esses anos de pós-graduação.

Ao Técnico Rorivaldo, pelas análises de microscopia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, às secretarias Cristina, Luciani e Ariane, e coordenação da pós.

A Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Química pela estrutura fornecida para realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Enfim, a todos **MUITO OBRIGADA!!!**

.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Ampére
AUC	Área sob a curva ROC (do inglês <i>area under the curve</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	Sonda de DNA de captura
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas
dDNA	Sonda de DNA de detecção
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio padrão relativo
ECL	Eletroquimiluminescência
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
g	Gramas
I	Corrente
K_a	Constante de acidez
L	Litro
LD	Limite de detecção
log	Logarítimo
m	mili
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
mol	Unidade de quantidade de matéria
n	nano
NE	Tampão NE
NE 1X	Tampão NE diluído 1 vez
NHS	N-hidroxissuccinimida
NP-Si-Ru	Nanopartículas de sílica ancoradas com complexo de rutênio
p	pico

PAA	Ácido poliacrílico
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDDA	Poli(cloreto de dialildimetilamônio) (do inglês, <i>poly(diallyldimethylammonium) chloride</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMs	Partículas magnéticas
PMs-cDNA	Partículas magnéticas modificadas com sonda de DNA de captura
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Característica de Operação do Receptor (do inglês, <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>)
RT-LAMP	Amplificação isotérmica medida por loop de transcrição reversa
RT-PCR	Transcrição reversa- Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>reverse transcription – polymerase chain reaction</i>)
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2
sDNA	Sequência simples do DNA usada como sonda
SPCE	Eletrodos de carbono serigrafados (do inglês <i>screen-printed carbono electrode</i>)
TPA	Tripopilamina
Tw-20	Tween-20
V	Volt
μ	micro

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1- Principais variantes do vírus SARS-CoV-2.....	5
TABELA 4.1 Sequência de nucleotídeos constituintes do gene nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2*	28
TABELA 4.2- Alvos e sondas de sDNA utilizadas para otimização do ensaio proposto.....	29
TABELA 5.1- Condições avaliadas para o ensaio de hibridização	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Estrutura viral do SARS-CoV-2. Adaptação Bakhshandeh <i>et al</i> ¹¹	
FIGURA 1.2- Mecanismo de infecção e disseminação do coronavírus. Fonte: Behnaz Bakhshandeh <i>et al</i> ¹¹	4
FIGURA 1.3- Alguns fatores que influenciam na variação das manifestações clínicas da COVID-19. Adaptação Bakhshandeh <i>et al</i> ¹¹	5
FIGURA 1.4- Intensidade do resposta imunológica versus dias de infecção e principais testes a serem realizados. Fonte Xavier, A. R <i>et al</i> ²⁸ . IgG (imunoglobulina G) e IgM (imunoglobulina M) são proteínas que protegem as pessoas contra invasores microscópicos como vírus, bactérias, substâncias químicas e toxinas. IgM significa que a pessoa já foi exposta e está na fase ativa da doença havendo a possibilidade de o microrganismo estar circulando no paciente naquele momento. IgG pode indicar que a o indivíduo está na fase crônica e/ou convalescente ou já teve contato com a doença em algum momento da vida e, portanto, para algumas doenças, esses anticorpos funcionam como uma proteção em caso de novo contato com o microrganismo.	7
FIGURA 1.5- Métodos de detecção do vírus SARS-CoV-2 baseados em sensores eletroquímicos: molecular e sorológico.	9
FIGURA 1.6- Diferença estrutural nos açúcares contituíntes do DNA e RNA ⁴⁴	11
FIGURA 1.7- Representação de partículas magnéticas modificada com diferentes biomoléculas.....	12
FIGURA 1.8- Estrutura química do complexo [Ru(bpy) ₃] ²⁺ e do TPA.....	15
FIGURA 1.9- Mecanismo de reação para a geração do radical TPA ^{•60} . 1) Perda de um elétron do nitrogênio. 2) Formação do TPA radicalar com a perda de um hidrogênio do carbono α . 3) transferência de um elétron do carbono para o nitrogênio 4) Formação do TPA radicalar.	15
FIGURA 1.10- Mecanismo de emissão de ECL para o sistema [Ru(bpy) ₃] ²⁺ / TPA ⁵⁸	16

FIGURA 1.11 - Mecanismo de geração de ECL proposto por Bard e colaboradores ⁵⁶	17
FIGURA 4.1 A) Sistema para detecção da ECL B) Sistema para detecção da ECL, compartimento do fotodocumentador fechado para captura de imagens.....	24
FIGURA 4.2- A) Etapas de construção do dispositivo descartável em substrato PVC. A1) Transferência do vinil contendo o layout dos eletrodos; A2) Serigrafia com a tinta de carbono; A3) Cura da tinta de carbono; A4) Aplicação da tinta de Ag/AgCl no eletrodo de referência; A5) Retirada do vinil delimitador; A6) Eletrodos serigrafados com o layout desejado. B) Montagem do dispositivo B1) Aplicação do vinil contendo a delimitação dos eletrodos de trabalho; B2) Aplicação do cartão adesivo delimitador de cada poço do dispositivo; B3) Encaixe do dispositivo no suporte contendo os imãs; B4) Dispositivo pronto para aplicação.....	26
FIGURA 4.3- A) imagem dos elementos para construção do eletrodo; B) Eletrodo com papel cartão delimitando os poços (1) + (2) e suporte impresso contendo os 20 imãs para retenção das partículas magnéticas sobre o eletrodo de trabalho (3) ; C) Imagem final do dispositivo contendo o cartão recortado delimitador de cada poço e no suporte magnético.....	27
FIGURA 4.4- Representação das sequências alvo 1A e 2A com suas respectivas sondas de captura e detecção complementares.	30
FIGURA 4.5- Representação esquemática da modificação das PMs com as sondas de cDNA e bloqueio.....	31
FIGURA 4.6 - Representação esquemática das etapas de síntese das nanopartículas de sílica ancoradas com complexos de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$	32
FIGURA 4.7- Representação esquemática para preparação da sonda de detecção, NP-Si-Ru-dDNA.....	33
FIGURA 4.8- Representação esquemática do método genomagnético proposto envolvendo as etapas de captura e detecção do alvo.	35

FIGURA 4.9- Imagem da tela do programa <i>ImageLab</i> 6.0.1 utilizado para as análises das imagens obtidas pelo fotodocumentador.....	37
FIGURA 5.1- Sistema para detecção por ECL: fotodiodo de silício com pré-amplificador acoplada ao potenciostato μ Stat ECL Dropsens.....	41
FIGURA 5.2- Perfil eletroquimiluminescente obtidos em solução do complexo $[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$ na concentração $1,5 \text{ mg. mL}^{-1}$ utilizando TPA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4 nos eletrodos serigrafados com as tintas Eletrodag (vermelha) e Gwent (azul).....	42
FIGURA 5.3- Perfil eletroquimiluminescente obtido para complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ na superfície do eletrodo na concentração $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando TPA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4, eletrodo serigrafado com tinta Gwent. Inserção: Imagens da emissão de luz, detectadas pela câmera de um celular.	43
FIGURA 5.4- Amperograma obtido com aplicação de potencial igual $+1,2 \text{ V}$ por 150 s , em uma solução de complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando TPA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4.	44
FIGURA 5.5- Materiais testados na construção dos dispositivos eletroquimiluminescente descartáveis.....	45
FIGURA 5.6- Imagens obtidas do fotodocumentador LAS 500 em intervalos de tempo 10s , 20s e 30s , utilizando solução de complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ em TPA 25 mM	46
FIGURA 5.7- Perfil voltamétrico do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3] \text{Cl}_2$ na concentração $6,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4.....	47
FIGURA 5.8- Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos de carbono SPCE, em diferentes velocidades de varredura na presença de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ na concentração $6,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4. Inserção nos gráficos: variação da i_p vs. $v^{1/2}$ dos eletrodos.....	48
FIGURA 5.9- Imagem de MET das nanopartículas de sílicas dopadas com complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ em A) 200 nm , B) 50 nm e C) 20nm . D) Gráfico de	

distribuição de tamanho das nanopartículas. E) Mapeamentos dos elementos presentes nas NPs-Si-Ru.	50
FIGURA 5.10- Espectro de absorvância obtido de uma dispersão aquosa das nanopartículas NPs-Ru-Si na concentração de 0,083 mg mL ⁻¹	51
FIGURA 5.11- (1) Representação da modificação das nanopartículas NPs-Si-Ru com PDDA e PPA. Estruturas químicas das (2) nanopartículas de sílica, (3) PDDA e (4) PAA.....	53
FIGURA 5.12- Espectros de absorção na região do UV-vis, para: a sonda dDNA (verde), as nanopartículas NPs-Si-Ru (vermelho) e a sonda de detecção NPs-Si-Ru-dDNA (azul) na concentração de 5 µM em solução de tampão TE 1 mM, pH 7,6.	54
FIGURA 5.13- Gráfico de barras da amostra do branco e DNA alvo na concentração de 500 pmol L ⁻¹ . Para cada estudo são apresentadas as imagens obtidas com o fotodocumentador para a avaliação do melhor meio a ser utilizado no ensaio de hibridização: (1) Tampão NE 1x; (2) Tampão NE 1x + 1% de BSA; (3) Tampão NE 1x + DNA de salmão; (4) Tampão NE 1x + 1% de BSA + DNA de salmão.	57
FIGURA 5.14- Imagem de emissão de ECL obtida com o fotodocumentador para o estudo da repetibilidade do ensaio de hibridização.....	58
FIGURA 5.15- Gráfico de barras da avaliação do método de incubação: Incubação da sonda de captura e detecção juntas (vermelho) e Incubação das sondas de captura e detecção separadas (amarelo).	60
FIGURA 5.16- Imagens de TEM das PMs-cDNA juntamente com NP-Si-Ru-dDNA após ensaio de hibridização: A) a 2µm e B) Amplificação da imagem. C) Mapeamento por EDX do bioconjugado PMs-cDNA/ NP-Si-Ru-dDNA.	61
FIGURA 5.17- Curva analítica obtida para o DNA alvo contendo sequência similar a região 1A do RNA do vírus SARS-CoV-2 obtida utilizando o genomageto ensaio proposto (<i>n</i> =2). Inserção: imagens obtidas pelo fotodocumentador.....	63

FIGURA 5.18- Curva analítica obtida para o DNA alvo contendo a sequência similar a região do gene 2A do RNA do vírus SARS-CoV-2 obtida através do método de ECL proposto ($n=2$). Inserção das imagens obtidas pelo fotodocumentador.....	64
FIGURA 5.5.19- Representação esquemática das sequências de DNA utilizadas como sondas de detecção e captura e com os alvos 1A e 2A utilizados no ensaio genomagnético.....	65
FIGURA 5.5.20- Curva analítica obtida para o DNA alvo contendo as sequências similares das regiões do gene 1A e 2A do RNA do vírus SARS-CoV-2, obtidas através do teste de ECL proposto ($n=2$). Inserção: imagens obtidas pelo fotodocumentador.....	66
FIGURA 5.21- A) Avaliação da repetibilidade das amostras em dias diferentes e utilizando eletrodos diferentes; B) Apresentação da barras de erros para o estudo de repetibilidade.	68
FIGURA 5.22- Gráfico de barras para as amostras positivas e negativas utilizando as sondas 1A. Inserção das imagens obtidas via fotodocumentador.	69
FIGURA 5.23- A) Curva ROC e B) Diagrama de pontos para a detecção do alvo 1A. Resposta para os pacientes diagnosticados com COVID-19 e indivíduos negativos. C) Gráfico de barras com todas as amostras testadas para detecção do do sequência 1A do vírus SARS-CoV-2. Inserção amplificação da região das amostras negativas.....	70
FIGURA 5.24- Gráfico de barras para as amostras positivas e negativas utilizando as sondas 2A. Inserção das imagens obtidas via fotodocumentador.	72
FIGURA 5.25- A) Curva ROC e B) Diagrama de pontos para a detecção do alvo 2A. Resposta para os indivíduos positivos vs indivíduos negativos. C) Gráfico de barras com todas as amostras testadas para detecção da sequência alvo 2A do vírus SARS-CoV-2, inserção amplificação da região das amostras negativas.....	73
FIGURA 5.26- A) Curva ROC para coorte 1; B) Diagrama de pontos para coorte 1; C) Gráfico de barras para as amostras testadas para detecção dos alvo 1A e 2A	

do vírus SARS-CoV-2. Inserção amplificação da região das amostras negativas.	76
FIGURA 5.27- A) Curva ROC para coorte 2; B) Diagrama de pontos para coorte 2; C) Gráfico de barras para todas as amostras testadas para detecção dos alvos 1A e 2A do vírus SARS-CoV-2. Inserção amplificação da região das amostras negativas.	78
FIGURA 5.28- A) Kit Easy Plus B) Kit Easy C) Kit Easy Mag D) Kit Cellco; 81	

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO ELETROQUIMILUMINESCENTE DE BAIXO CUSTO PARA DETECÇÃO DO SARS-CoV-2 EM SALIVA

Esse trabalho é uma resposta à pandemia da COVID-19, no qual é proposto um novo método para detecção do vírus SARS-CoV-2 em saliva, baseado em ensaio genômico e realizado a temperatura ambiente. O método permite a detecção do RNA viral de forma rápida, sem necessidade de etapas de transcrição e de amplificação do material genético, sendo o sinal obtido por meio da técnica de eletroquimiluminescência (ECL). Para isto, uma plataforma descartável foi desenvolvida permitindo trabalhar com 10 amostras simultaneamente, diminuindo o custo de insumos e reagentes. Foram estudadas duas sequências de nucleotídeos do gene nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2, denominadas sequência 1A e sequência 2A. As curvas de calibração do RNA viral foram avaliadas para duas sequências individualmente, e estas apresentaram-se lineares na faixa de 5,0 fmol L⁻¹ a 5,0 nmol L⁻¹, com coeficiente de correlação linear de 0,999 para sequência 1A e 0,975 para sequência 2A. Coortes de amostras de pacientes positivos e negativos foram avaliadas como método comparativo. A análise da curva Característica de Operação do Receptor (ROC do inglês *Receiver Operating Characteristic*) demonstrou que o método alcançou ótima sensibilidade e especificidade para a sequência 1A, sendo que está se mostrou mais sensível que a sequência 2A. Também, foi realizado o ensaio genômico na presença das duas sequências simultaneamente e avaliando duas coortes diferentes de indivíduos. O método proposto apresentou uma excelente capacidade discriminatória dos indivíduos com COVID-19, com sensibilidade e especificidade de 92%. Para avaliação da exatidão do método foram testadas mais de 200 amostras com resultados de RT-PCR ou teste rápido de antígeno para comparação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A LOW-COST ELECTROCHEMILUMINESCENT DEVICE FOR SARS-CoV-2 DETECTION IN SALIVA

This work is a response to the COVID-19 pandemic, in which a new method for detecting the SARS-CoV-2 virus in saliva based on genome-genetic assay performed at room temperature is proposed. The method allows the detection of viral RNA quickly, without the need for steps of transcription and amplification of the genetic material, the signal being obtained using the electrochemiluminescence (ECL) technique. For this, a disposable platform was developed allowing to work with 10 samples simultaneously, reducing the cost of inputs and reagents. Two nucleotide sequences of the virus nucleocapsid gene were studied, named sequence 1A and sequence 2A. The viral RNA calibration curves were evaluated for two sequences individually, and these were linear in the range of 5.0 fmol L^{-1} to 5.0 nmol L^{-1} , with a linear correlation coefficient of 0.999 for sequence 1A and 0.975 for sequence 2A. Cohorts of positive and negative patient samples were evaluated as a comparative method. The analysis of the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve showed that the method achieved excellent sensitivity and specificity for the 1A sequence, which was more sensitive than the 2A sequence. Also, the test was performed with the presence of the two sequences simultaneously and evaluated in two different cohorts of patients. The proposed method showed an excellent discriminatory ability of individuals with COVID-19, with a sensitivity and specificity of 92%. To assess the accuracy of the method, more than 200 samples were tested with RT-PCR or rapid antigen test results.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Pandemia da COVID-19.....	1
1.1.1.	O vírus SARS-CoV-2	1
1.1.2.	Métodos para detecção do SARS-CoV-2	6
1.2.	Detecção de biomarcadores baseada em ensaio genômico.....	10
1.3.	Eletroquimiluminescência	12
2.	JUSTIFICATIVA.....	20
3.	OBJETIVOS.....	21
3.1.	Objetivos Gerais	21
3.2.	Objetivos Específicos	21
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	22
4.1.	Reagentes e soluções	22
4.2.	Equipamentos	23
4.3.	Sistema para detecção da ECL	24
4.4.	Construção do dispositivo descartável	25
4.5.	Preparo das amostras de saliva	27
4.6.	Sequências de DNA.....	28
4.7.	Preparação das PMs modificadas com sonda <i>c</i> DNA (PMs- <i>c</i> DNA).....	30
4.8.	Síntese do marcador eletroquimiluminescente: nanopartículas de sílica ancorado com o complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (NP-Si-Ru)	31
4.9.	Preparação da sonda de detecção: NP-Si-Ru modificada com sonda <i>d</i> DNA (NP-Si-Ru- <i>d</i> DNA)	32
4.10.	Ensaio genômico e medidas de ECL	33
4.11.	Análise das imagens de ECL obtidas com o fotodocumentador	36
4.12.	Análises estatísticas	37
4.13.	Método comparativo para determinação do vírus SARS-CoV-2	38
4.14.	Participantes	38

4.14.1.	Coorte 1	39
4.14.2.	Coorte 2	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1.	Otimização e caracterização dos eletrodos descartáveis	40
5.1.1.	Otimização da tinta condutora de carbono para serigrafia	40
5.1.2.	Otimização do substrato utilizado na construção do dispositivo descartável.	44
5.1.3.	Caracterizações eletroquímicas dos eletrodos serigrafados.....	46
5.2.	Caracterização das nanopartículas utilizadas no ensaio eletroquimiluminescente.....	48
5.2.1.	Caracterização das NPs-Si-Ru	48
5.2.2.	Caracterização da sonda de detecção NPs-Si-Ru-dDNA	52
5.3.	Otimização do ensaio genômico.....	54
5.3.1.	Estudo das condições de hibridização das sequências de DNA.....	54
5.3.2.	Estudo da repetibilidade do ensaio.....	58
5.3.3.	Estudo das etapas de incubação necessária para hibridização com o alvo ..	59
5.3.4.	Caracterização do Biconjugado PMs-cDNA/NP-Si-Ru-dDNA.....	61
5.3.5.	Desempenho analítico do ensaio genômico.....	62
5.4.	Determinação do RNA viral do SARS-CoV-2 em amostras de saliva	67
5.4.1.	Avaliação da repetibilidade das amostras	67
5.4.2.	Avaliação do método para detecção da sequência alvo 1A	68
5.4.3.	Avaliação do método para detecção da sequência alvo 2A	71
5.4.4.	Avaliação das sequências de nucleotídeos dos alvos 1A e 2A simultaneamente	74
5.4.5.	Avaliação da extração do RNA viral.....	80
6.	CONCLUSÕES.....	84
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pandemia da COVID-19

Em dezembro de 2019 o mundo foi alarmado com o surgimento de um novo vírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), originado em Wuhan, China.¹ O SARS-CoV-2 espalhou-se rapidamente por mais de 200 países dando origem à Pandemia da COVID-19, que vem gerando enormes prejuízos sociais e econômicos. Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde, já são mais de 600 milhões de infectados e mais de 6 milhões de mortes². Desde então, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas na busca de vacinas, tratamento rápido e eficaz contra a doença, além de maior entendimento sobre as causas e consequências da contaminação, sintomas e surgimento de novas variantes relacionadas às mutações virais^{1,3-5}.

O Brasil, recentemente tornou-se o segundo país com maior número de mortes, ficando atrás apenas dos Estados Unidos². Com a vacinação, o número de mortes reduziu consideravelmente⁶. Entretanto, devido ao surgimento de novas variantes e subvariantes, eventualmente há uma disseminação maior do vírus e consequente aumento no número de mortes. É crucial compreender os fatores e mecanismos de disseminação do vírus para orientar medidas de saúde pública e limitar a transmissão, além de ser necessárias ferramentas de diagnóstico para um maior controle pandêmico^{7,8}.

1.1.1. O vírus SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é pertencente à extensa família dos coronavírus e são vírus que podem infectar animais e humanos. O coronavírus humano é conhecido desde meados da década de 1960. Atualmente, são mais de 39 espécies e 27 subgêneros conhecidos pertencentes a família *coronaviridae*, sendo que desses, pelo menos 7 coronavírus são responsáveis por causar infecções respiratórias em humanos. Nos últimos anos a família *coronaviridae* foi

responsável por pelo menos 3 epidemias: o SARS-CoV em 2002 na China, o MERS-CoV em 2012 no Oriente Médio e recentemente o SARS-CoV-2 na China⁹⁻¹¹.

Em relação a estrutura do SARS-CoV-2, esse é um vírus de RNA de fita simples envelopado, de sentido positivo, com genoma de 26 a 32 kb. Além do RNA viral, o vírus possui em sua estrutura proteínas não estruturais e proteínas estruturais como, a *Spike* (S), membrana glicoproteína (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), sendo que vários processos virais são dependentes dessas proteínas, como a entrada nas células hospedeiras até a formação de novas partículas virais⁹⁻¹¹. A estrutura do SARS-CoV-2 pode ser observada na FIGURA 1.1.

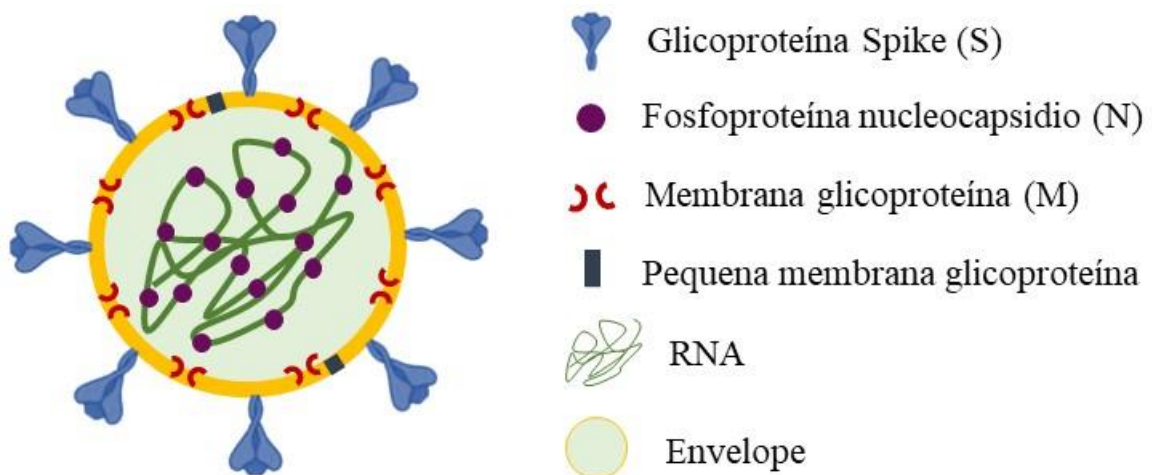


FIGURA 1.1- Estrutura viral do SARS-CoV-2. Adaptação Bakhshandeh *et al*¹¹

A glicoproteína S é uma proteína transmembrana que se encontra na superfície externa do vírus e é a principal responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira. Isso ocorre por meio da interação da partícula do vírus com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que é o principal receptor expresso em células do trato respiratório inferior. Com esse mecanismo, o vírus se propaga por diferentes tipos de células suprimindo as respostas de anticorpos neutralizantes do vírus^{9,11-14}.

A proteína M determina a forma do envelope viral, que funciona como uma pequena proteína transmembrana através de ligações com as outras proteínas estruturais. Ademais, esta proteína contribui para o empacotamento do genoma do RNA viral^{9,11,14}.

O constituinte estrutural do SAR-CoV-2 é a proteína N ou nucleocapsídeo, que está ligada ao genoma de RNA do vírus. Essa proteína participa de vários processos referentes ao genoma viral, incluindo o ciclo de replicação dos vírus, a sinalização do genoma viral e a reação das células hospedeiras às infecções virais^{11,15}.

A proteína E ou envelope é uma sequência, na maior parte, hidrofílica de aminoácidos com alguns seguimentos hidrofóbicos. Está envolvida nos processos de produção e maturação do vírus, através da interação com a proteína da membrana da célula hospedeira^{9,11,15}.

O mecanismo de infecção do SARS-CoV-2 (FIGURA 1.2) ocorre pela interação da proteína *Spike* com o receptor celular primário ACE2, conforme apresentado na FIGURA 2. A ACE2 é abundantemente expressa em vários órgãos, como o coração, pulmões, trato gastrointestinal e rins¹¹. Quando o vírus se liga ao receptor ACE2 são induzidos danos graves no miocárdio e a disfunção nos pulmões e outros órgãos como os rins e o coração^{9,11,16,17}.

Após a fixação do vírus ao receptor, este entra no citosol da célula hospedeira e ocorre a fusão entre as membranas viral e celular. Imediatamente após a entrada do vírus na célula, a glicoproteína S é clivada, então, forma endocitose e endossomos de baixo pH, ativando assim a fusão das membranas dentro dos endossomos. Com a junção entre a membrana do vírus e a membrana celular, é liberado o genoma do vírus no citoplasma. Em seguida, ocorre a tradução de genes de réplica do vírus de RNA, após esse processo o RNA viral é sintetizado e os complexos de replicação viral são coletados.

Os RNAs subgenômicos atuam como mRNAs para os genes estruturais do vírus. O próximo passo é a ligação e tradução das glicoproteínas

estruturais do vírus, incluído S, M e E para o retículo endoplasmático. Os genomas virais que codificam proteínas estruturais são encapsulados e tornam-se vírus maduros. Por fim, os vírus são transmitidos por vesículas para a membrana da célula hospedeira e são liberados por exocitose. Após ser levada para a superfície celular, a proteína S estabelece a fusão celular entre células infectadas e saudáveis, ocasionando em uma grande célula multinucleada que dissemina o vírus no hospedeiro e proporciona condições para a identificação de anticorpos específicos contra o vírus^{9,11,18}.

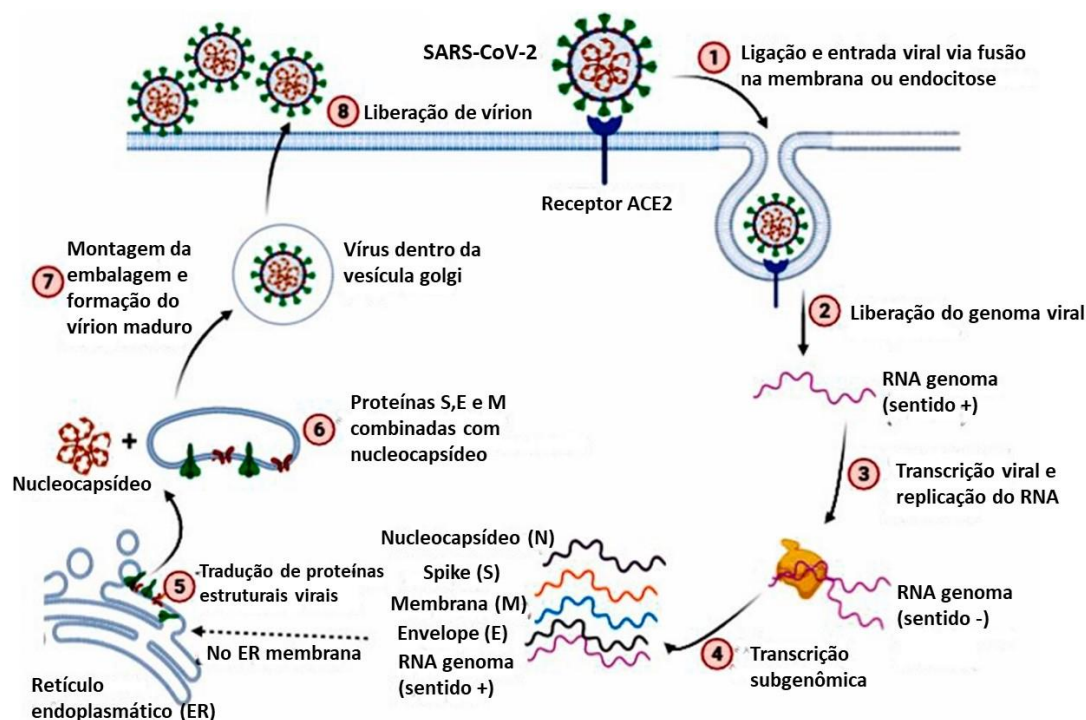


FIGURA 1.2- Mecanismo de infecção e disseminação do coronavírus. Fonte: Behnaz Bakhshandeh *et al*¹¹

Existem vários fatores conhecidos e desconhecidos, que podem influenciar na taxa de gravidade ou características clínicas da COVID-19 (FIGURA 1.3), como mutações e variabilidade genética do vírus e susceptibilidade genética do hospedeiro¹¹. Embora o genoma do SARS-CoV-2 seja mais estável, ele apresenta alta taxa de mutação dinâmica, quando comparados com outros vírus de RNA, como o MERS-CoV e o SARS-CoV. Observa-se também que a taxa de infecção e mortalidade pela COVID-19 pode

ser influenciada pela etnia ou origens genéticas, nas diferentes áreas geográficas, além das condições clínicas dos hospedeiros¹¹.



FIGURA 1.3- Alguns fatores que influenciam na variação das manifestações clínicas da COVID-19. Adaptação Bakhshandeh *et al*¹¹.

As mutações do SARS-CoV-2 são alarmantes, uma vez que a grande preocupação da comunidade científica e médica é o surgimento de uma nova variante que escape da imunidade do hospedeiro, seja resistente a medicamentos ou vacinação, assim surgindo um vírus mais infeccioso ou mortal¹⁹. A Organização Mundial de Saúde listou as variantes mais preocupantes do SARS-CoV-2 que surgiram até o momento²⁰, e estas estão apresentadas na TABELA 1.1. Os sintomas, taxa de gravidade e de contágio diferem. Há também a presença de subvariantes, como a Ômicron BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, NQ1^{21,22} e existem ainda outras cepas sob vigilância, porém ainda sem significância clínica

TABELA 1.1- Principais variantes do vírus SARS-CoV-2.

Variantes	Ômicron	Alfa	Beta	Gama	Delta
País de origem	Vários países	Reino Unido	África do Sul	Brasil	Índia
Ano	Nov-2021	Set-2020	Mai-2020	Nov-2020	Out-2020

Fonte Organização Mundial da Saúde: atualizado 29/11/2022²⁰

Sabe-se que o controle eficaz da COVID-19 é baseado na detecção dos padrões de mutação do vírus. No entanto, a detecção de todas as mutações no SARS-CoV-2 e suas relações com alterações patológicas é quase impossível, principalmente devido a indivíduos assintomáticos, o que torna o monitoramento pelas autoridades de saúde ainda mais difícil¹¹. Neste sentido, é essencial o uso de métodos de diagnóstico cada vez mais sensíveis, rápidos e acessíveis, capazes de identificar a doença mesmo em indivíduos sem sintomas.

1.1.2. Métodos para detecção do SARS-CoV-2

Atualmente, a vacinação é a principal forma de prevenção e controle da disseminação do vírus. No entanto, ainda há casos de contaminação, morte e surgimento de novas variantes, que vem causando novas ondas de contaminação e elevando o número de mortes. Sendo assim, ainda é necessário cuidados específicos e diagnóstico precoce para controle pandêmico. A testagem em massa da população é uma das principais formas de controle da disseminação da COVID-19, uma vez que o diagnóstico correto permite o isolamento do paciente e tratamento adequado, conseqüentemente diminuindo a taxa de transmissão e o número de mortes²³⁻²⁶.

O tempo de incubação do SARS-CoV-2 no organismo é de 2 a 14 dias, podendo permanecer assintomático em alguns indivíduos. Em se tratando do diagnóstico da COVID-19 é de extrema importância atentar a janela imunológica de forma a permitir identificar o comportamento da doença ao longo do tempo. O gráfico (FIGURA 1.4), demonstra a intensidade da resposta imunológica durante o período de infecção desde o momento da infecção. Infere-se que até o 5º dia após a infecção há um aumento da concentração de antígeno, devido ao processo de replicação do vírus, e na maioria dos casos, há o início dos sintomas. Então, a concentração de antígeno tende a diminuir até o 14º dia de infecção quando a concentração de anticorpos produzidos pelo organismo aumenta. Nesse sentido, é fundamental a observação do início dos sintomas como referência para o período

de infecção, de modo a optar pelo melhor teste para diagnóstico correto da COVID-19^{27,28}.

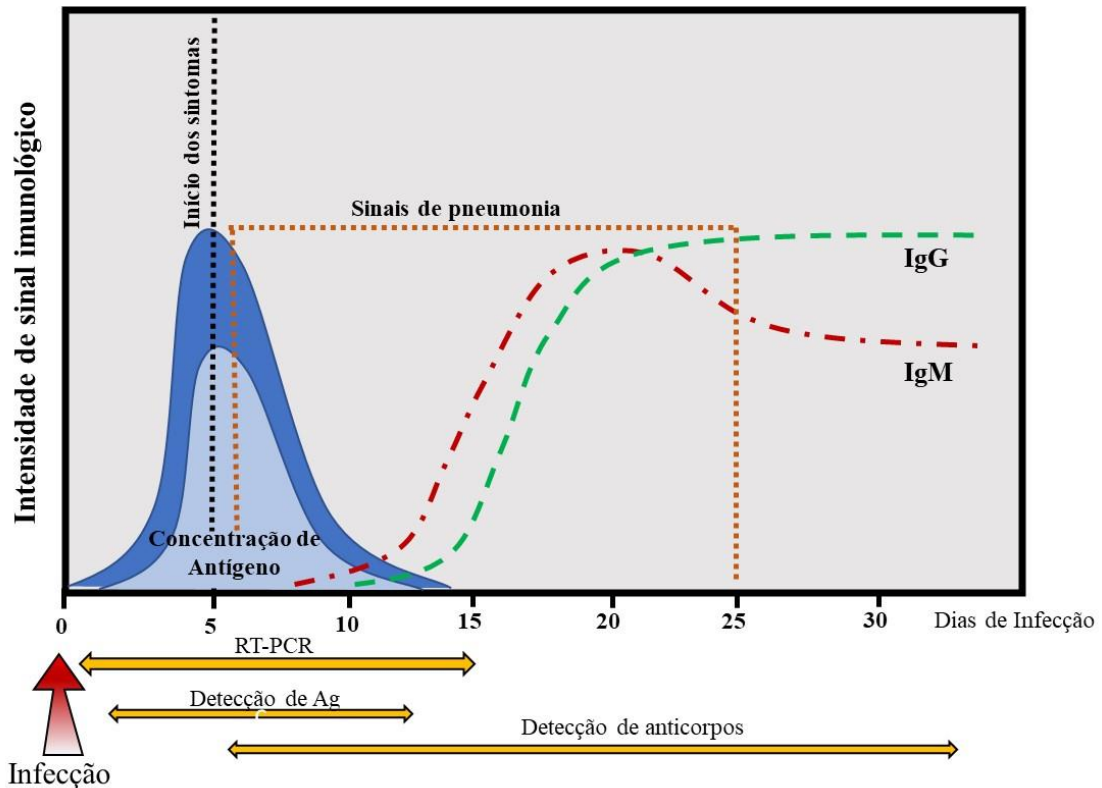


FIGURA 1.4- Intensidade do resposta imunológica versus dias de infecção e principais testes a serem realizados. Fonte Xavier, A. R *et al*²⁸. IgG (imunoglobulina G) e IgM (imunoglobulina M) são proteínas que protegem as pessoas contra invasores microscópicos como vírus, bactérias, substâncias químicas e toxinas. IgM significa que a pessoa já foi exposta e está na fase ativa da doença havendo a possibilidade de o microrganismo estar circulando no paciente naquele momento. IgG pode indicar que a o indivíduo está na fase crônica e/ou convalescente ou já teve contato com a doença em algum momento da vida e, portanto, para algumas doenças, esses anticorpos funcionam como uma proteção em caso de novo contato com o microrganismo.

Durante os últimos três anos já foram desenvolvidos ou adaptados inúmeros testes para a detecção da COVID-19. O RT-PCR ainda é a técnica padrão ouro no diagnóstico preciso nos estágios iniciais e recomendado pela OMS²⁹, no entanto, é um teste de custo elevado de pouco acesso em muitos países,

como o Brasil, e demanda um longo tempo para obtenção do resultado. Já os métodos sorológicos são baseados na detecção de anticorpos e a produção de anticorpos leva um tempo médio de 5 a 10 dias após a infecção. Dispositivos sensores também vêm sendo desenvolvidos, mas até o momento nenhum sensor específico para COVID-19 é empregado na prática clínica de forma regular³⁰. Todavia, estes são uma aposta favorável como ferramenta de diagnóstico, já que são sensíveis, rápidos e fornecem resultados confiáveis e a um custo mais acessível quando comparado com o RT-PCR³⁰.

Os testes imunocromatográficos, também chamados de testes rápidos, baseados na técnica de *lateral flow* são os mais utilizados quando se trata de diagnóstico rápido para a COVID-19²⁶. São encontrados facilmente em farmácias, sendo o tempo de obtenção do resultado em torno de 15 min, podendo detectar tanto anticorpos quanto antígenos. Entretanto, esses testes apresentam limites de detecção altos ocasionando em diagnóstico menos preciso que o RT-PCR.

Outros dois testes que ganharam destaque no diagnóstico da COVID-19 foram o método de amplificação isotérmica medida por loop de transcrição reversa (RT-LAMP) e o método baseado em repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR). O RT-LAMP, utiliza como amostra *swab* respiratório e é um teste de triagem confiável e rápido que pode ser usado em campo ou em condições não laboratoriais^{31,32}. Entretanto, em um estudo de revisão realizado por Raiyang Pu e colaboradores³³ foi relatado que o RT-LAMP apresenta uma sensibilidade de 94% em RNA purificado em amostras de pacientes com COVID-19 e 78% em amostras brutas, além de ser propenso a resultados falso-negativos em amostras com baixa carga viral. Ademais, limita-se a apenas uma amostra por teste. Já o CRISPR também tem sido uma grande aposta no diagnóstico preciso da COVID-19, já que apresenta como vantagens rapidez, sensibilidade, precisão e versatilidade. O CRISPR baseia-se em proteínas associadas para detectar produtos de amplificação isotérmica, de modo que o sinal

é gerado somente quando há presença da sequência correta do RNA viral. Apesar de ser um diagnóstico viável com inúmeras vantagens, principalmente quando comparado ao RT-PCR, ainda há a necessidade de aprimoramento da técnica para fornecer uma plataforma livre de ampliações indesejadas e que requerem instrumentação complexas³⁴⁻³⁷.

Em se tratando de biossensores eletroquímicos para o diagnóstico da COVID-19, estes têm inúmeras vantagens como elevada seletividade, sensibilidade e baixo custo. Muitos estudos estão sendo realizados baseados em diferentes técnicas eletroquímicas e emprego de diferentes biomarcadores para a doença.³⁸ Para a detecção do SARS-CoV-2 (FIGURA 1.5) os biomarcadores mais usados no desenvolvimento de sensores são sequências do RNA viral, o nucleocapsídeo do vírus, anticorpos e a proteína *Spike*, sendo que a proteína *Spike* é um alvo promissor devido a sua alta afinidade com o receptor ACE2, sendo que alguns estudos indicam que essa afinidade tende a aumentar com as mutações virais^{11,39}.

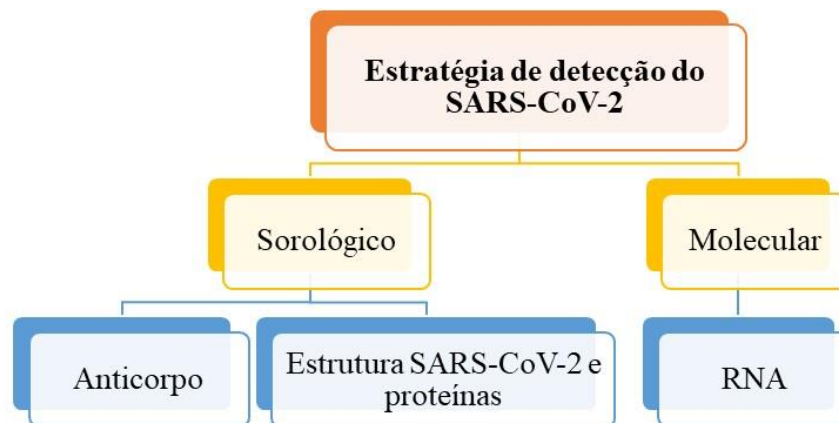


FIGURA 1.5- Métodos de detecção do vírus SARS-CoV-2 baseados em sensores eletroquímicos: molecular e sorológico.

Além da detecção do vírus é importante o monitoramento dos sintomas e progressão da COVID-19. Para isso, biossensores baseados na detecção de biomarcadores inflamatórios, hematológicos, imunológicos e bioquímicos também têm sido estudados. Para o desenvolvimento desses biossensores, os tipos de amostras são variáveis sendo utilizado saliva, soro,

plasma, *swab*, urina, entre outras. No entanto, ainda há muito o que se avançar para alcançar um dispositivo eletroquímico que possa ser utilizado no pronto atendimento^{30,38-40}.

1.2. Detecção de biomarcadores baseada em ensaio genômagnético

A aplicação de técnicas que utilizam ácidos nucleicos, combinados com a sensibilidade e portabilidade dos transdutores eletroquímicos ou ópticos, no desenvolvimento de métodos de diagnóstico tem demonstrado um progresso significativo na literatura. Estes podem converter a especificidade das reações de hibridização em um sinal analítico, auxiliando na obtenção de informações sobre alvos importantes para investigações clínicas, ambientais ou forenses⁴¹. O uso dos ácidos nucleicos na construção dos biossensores têm como principal vantagem o baixo custo, principalmente quando comparados aos imunossensores, uma vez que antígenos e anticorpos têm custos comparativamente mais elevados, e alta especificidade devido as ligações específicas das bases nitrogenadas constituintes dos ácidos nucleicos.

O DNA é constituído das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C), sendo uma das diferenças na constituição do DNA para o RNA é a substituição da base uracila (U) para timina (T). Outra diferença é a presença de um grupo hidroxila a mais no açúcar ribose do RNA em comparação com o açúcar desoxirribose do DNA (FIGURA 1.6), essa diferença na constituição pode fazer com que o DNA seja cerca de 100 vezes mais estável que o RNA, visto que o grupo hidroxila a mais em sua estrutura química, favorecendo reações de hidrólise e tornando o RNA menos estável^{42,43}.

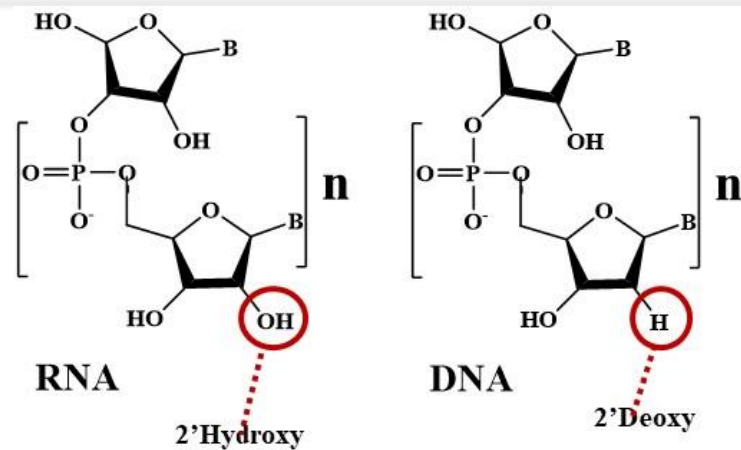


FIGURA 1.6- Diferença estrutural nos açúcares contituíntes do DNA e RNA⁴⁴.

Genossensores são biossensores que usam em sua constituição material genético como DNA e RNA com a função de biorreceptor^{45,46}. Outra característica favorável dos genossensores é a versatilidade para o diagnóstico de diferentes tipos de doenças que tenham material genético como biomarcadores. Por exemplo, podem ser utilizados para diagnósticos de diferentes tipos de câncer, doenças genéticas e doenças causadas por vírus, como a COVID-19, ou bactérias^{45,47,48}.

A detecção utilizando genossensores, pode ser auxiliada utilizando diferentes materiais nos ensaios de hibridização como as partículas magnéticas e/ou nanopartículas marcadas com metais como ouro, prata, cádmio, entre outros, resultando em: separação eficiente, abordagem simples, resultados rápidos, detecção de múltiplos analitos, baixo custo e baixa geração de resíduos⁴¹. Quando se alia PMs aos genossensores, com a função de captura e separação e/ou detecção dos analitos, alguns autores utilizam o termo ensaios genomagnéticos ou biossensores genomagnéticos.

As partículas magnéticas têm sido amplamente utilizadas para a captura e separação bem como para a detecção com amplificação do sinal analítico nos ensaios genomagnéticos. Estas são constituídas, em geral, por uma dispersão de óxido de ferro (Fe_2O_3 ou Fe_3O_4), possuindo propriedades paramagnéticas ou superparamagnéticas. Em alguns casos, podem ser recobertas com metais como ouro ou prata. As PMs podem ser modificadas com diferentes

grupos funcionais como, grupos tosila, amino ou carboxílico, permitindo diferentes estratégias de imobilização covalente de biomoléculas e utilizadas uma ampla variedade de aplicações analíticas. Além disso, as PMs possuem uma elevada área superficial, possibilitando o ancoramento de um grande número de biomoléculas (FIGURA 1.7), levando genossensores com excelente desempenho⁴⁹⁻⁵⁴.

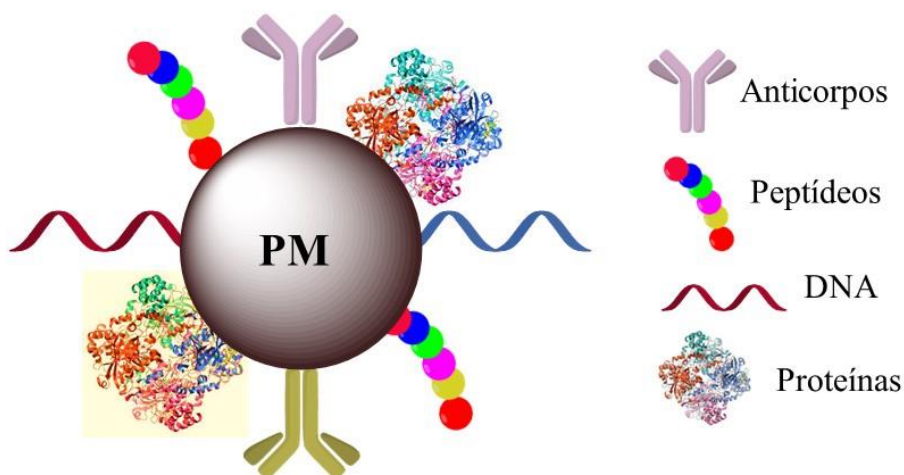


FIGURA 1.7- Representação de partículas magnéticas modificada com diferentes biomoléculas.

Nos protocolos de ensaio genomagnético, após a captura do analito da amostra, as PMs bioconjugadas são separadas, por meio do uso de uma estante magnética, sendo que durante as etapas de lavagem há eliminação dos interferentes presentes na matriz da amostra, permitindo minimizar ligações não específicas. Além disso, as PMs bioconjugadas podem ser ressuspendidas em um volume menor de forma a permitir a pré-concentração do analito e assim levar a uma amplificação do sinal analítico, obtendo limites de detecção extremamente baixos mesmo em amostras diluídas ou complexas^{49,50}.

1.3. Eletroquimiluminescência

De forma simples, a eletroquimiluminescência (ECL), ou quimiluminescência eletrogerada, é uma forma especial de quimiluminescência, no qual a reação emissora de luz é precedida por uma reação eletroquímica⁵⁵⁻⁵⁸.

A luminescência envolve a produção de luz por espécies que passam por reações de transferência de elétrons altamente energéticas⁵⁸. A luz pode ser emitida por meio de vários processos luminescentes, que incluem fotoluminescência (PL), quimiluminescência (CL), bioluminescência (BL) e eletroquimiluminescência (ECL). A ECL é uma forma de CL, já que a produção de luz envolve espécies que podem sofrer reações de transferência de elétrons altamente energéticas⁵⁹. Todavia, a luminescência em CL é iniciada e controlada pela mistura e fluxo dos reagentes necessários, enquanto que na ECL a luminescência é controlada pela aplicação de um potencial no eletrodo^{55,56,60}.

A emissão de luz durante a eletrólise remota a década de 1920, mas os primeiros estudos detalhados de ECL foram descritos por Hercules e Bard *et al* em meados da década de 1960. Desde então, a ECL tornou-se uma técnica analítica versátil e amplamente utilizada nas áreas de imunoensaios, genoensaio, em controle de qualidade de alimentos e água, identificação de metais tóxicos, pequenas moléculas, proteínas, células, bactérias ou vírus, tecnologias de microscopia, enfim, uma gama de aplicações. Já foram desenvolvidos sistemas comerciais⁵⁹ que usam a ECL para detectar muitos analitos clinicamente importantes como, α -fetoproteína, digoxina, tirotopina, proteínas, hormônios e anticorpos. Todas essas aplicações são possíveis devido à alta sensibilidade e seletividade, fácil manipulação, rapidez de análise e versatilidade de amostras, que são realizáveis através da técnica de ECL. A literatura apresenta uma vasta série de artigos e capítulos de livros publicados abordando essa temática^{57-59,61-64}.

A ECL depende da produção de espécies eletroativas e luminescente (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, complexos metálicos, pontos quânticos ou nanopartículas) em solvente orgânico aprótico nas superfícies do eletrodo. Em seguida, essas espécies passam por reações de transferência de elétrons de alta energia para gerar estados excitados, emitindo luz. A energia de excitação é obtida a partir da recombinação de espécies oxidadas e reduzidas^{61,62}.

Nas principais aplicações práticas, a ECL ocorre em meio aquoso. No entanto, a oxidação de espécies luminescentes é difícil de ser alcançada em meio aquoso devido à formação de íons da própria água (H^+ e OH^-). Então a reação de ECL envolve a participação de co-reagentes de sacrifício, que são oxidados juntamente com as espécies luminescentes, na superfície do eletrodo, gerando um agente redutor forte, que envolve algumas transformações químicas⁶¹.

Os luminóforos utilizados nos sistemas de ECL geralmente são apontados em três classes: sistemas orgânicos, sistemas inorgânicos e sistemas nanomateriais. Os sistemas inorgânicos compreendem principalmente complexos de rutênio, irídio, ósmio e, mais recentemente, platina⁶¹. Os sistemas orgânicos incluem antracenos, fluorenos, tieniltriazóis, luminol e seus derivados. Dentre esses luminóforos, os tris(2,2'-bipiridina) rutênio (II) e o luminol são os mais bem sucedidos em amplas aplicações comerciais, mas há inúmeras pesquisas na busca de novos luminóforos que sejam mais baratos, menos tóxicos e com a eficiência de intensidade de emissão desejada^{61,62,64}.

Dentre os sistemas mais utilizados para geração de ECL, o grande destaque é os tris (2,2'-bipiridina) rutênio (II), juntamente com a tripropilamina (TPA). Esse sistema co-reagente, foi utilizado a primeira vez em 1970, sendo ideal para meios aquosos. Nesse sistema, o complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ funciona como luminóforo e o TPA como reagente de sacrifício. A emissão de luz ocorre em aproximadamente 610 nm e é baseada nas transições de carga metal ligante (MLCT) $d\pi \rightarrow \pi^*$ do complexo de rutênio^{58,64,65}. Na FIGURA 1.8 são apresentadas as estruturas químicas do complexo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ e do TPA.

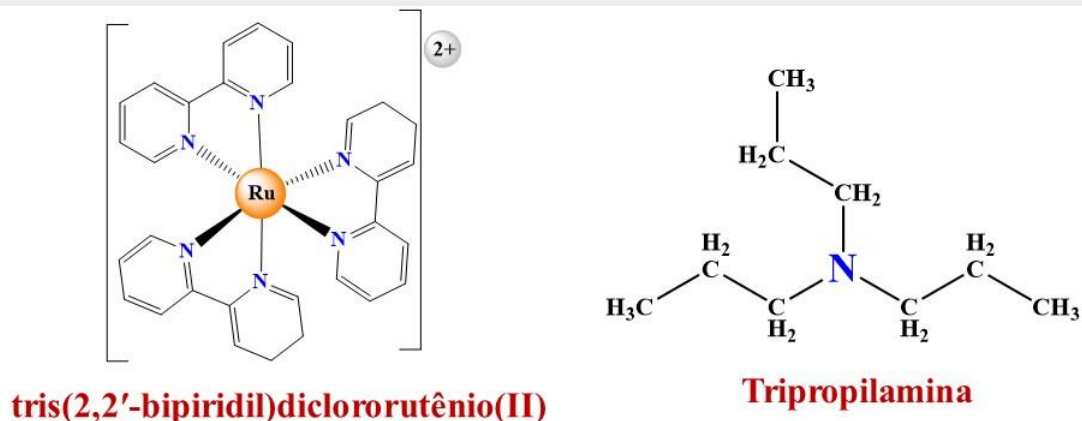


FIGURA 1.8- Estrutura química do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ e do TPA.

A reação de geração de ECL é complexa. Há inúmeras propostas para explicar os mecanismos de emissão. Bard e colaboradores^{56,60} realizaram inúmeros estudos na busca do entendimento desse mecanismo. Uma das propostas se baseia na oxidação simultânea do TPA com o complexo de rutênio⁵⁸. Estudos eletroquímicos de várias aminas alifáticas indicam uma possível via de reação para o TPA, conforme descrito na FIGURA 1.9.

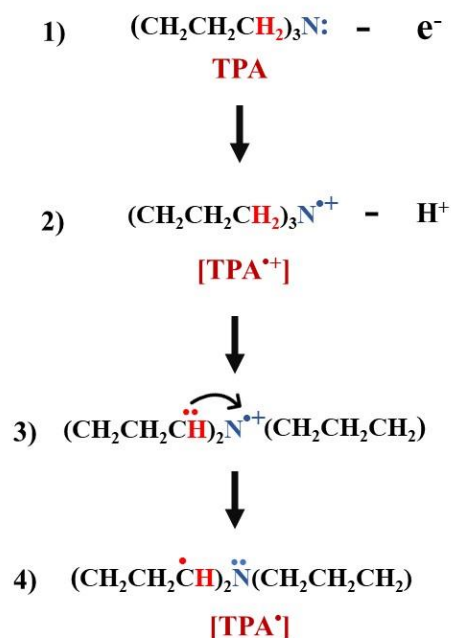


FIGURA 1.9- Mecanismo de reação para a geração do radical TPA^{\bullet} ⁶⁰. 1) Perda de um elétron do nitrogênio. 2) Formação do TPA radicalar com a perda de um hidrogênio do carbono α . 3) transferência de um elétron do carbono para o nitrogênio 4) Formação do TPA radicalar.

Após a oxidação, acredita-se que o cátion radicalar, $\text{TPA}^{\bullet+}$, de vida curta, perca um próton de um carbono α para formar o intermediário fortemente redutor TPA^{\bullet} . Este radical pode, então, reduzir o $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ e este quando retorna ao seu estado fundamental emite luz em 610 nm ⁵⁸. A FIGURA 1.10 apresenta de forma simplificada o esquema do mecanismo de emissão do sistema $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} / \text{TPA}$, explicado anteriormente⁶⁵.

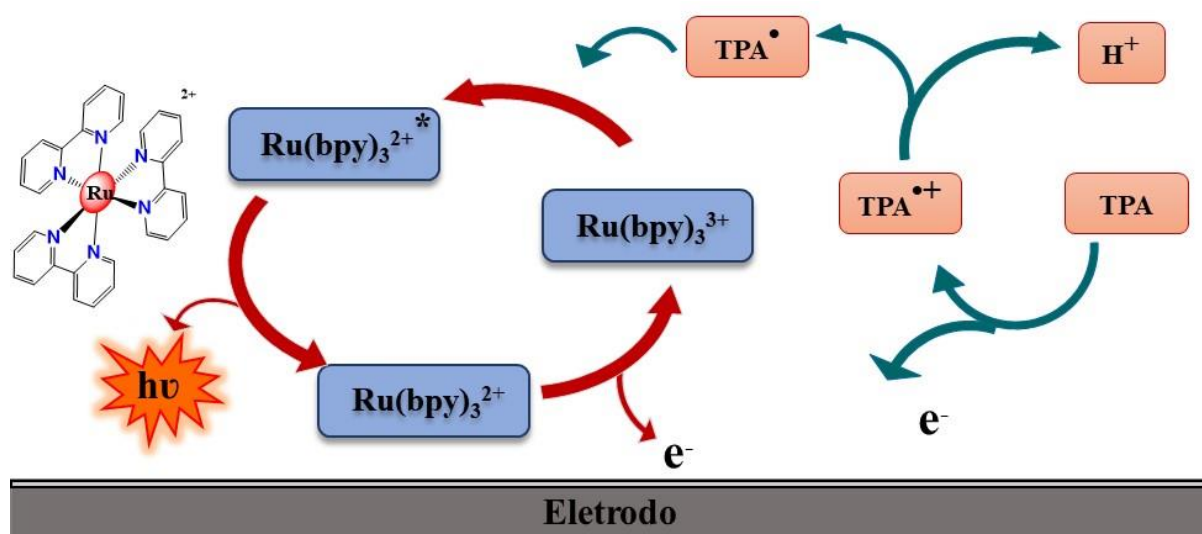


FIGURA 1.10- Mecanismo de emissão de ECL para o sistema $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} / \text{TPA}$ ⁵⁸.

Outros mecanismos propostos por Miao e Bard ⁵⁶, buscando explicar a geração de ECL via reação do complexo de rutênio com a TPA, são apresentados na FIGURA 1.11. No entanto, nenhum dos mecanismos propostos levam em conta uma série de observações feitas para sistemas de ECL, como a forte dependência do material do eletrodo e dos surfactantes que influenciam na oxidação direta do TPA ⁶⁶⁻⁶⁹.

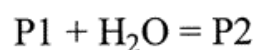
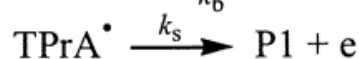
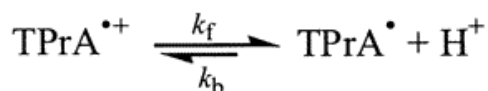
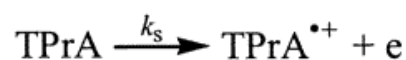
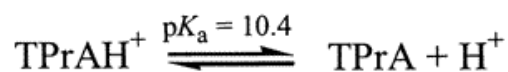
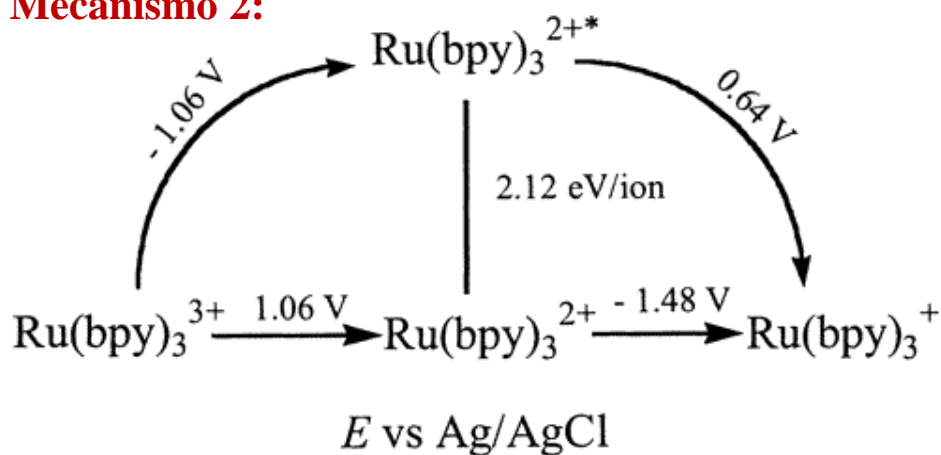
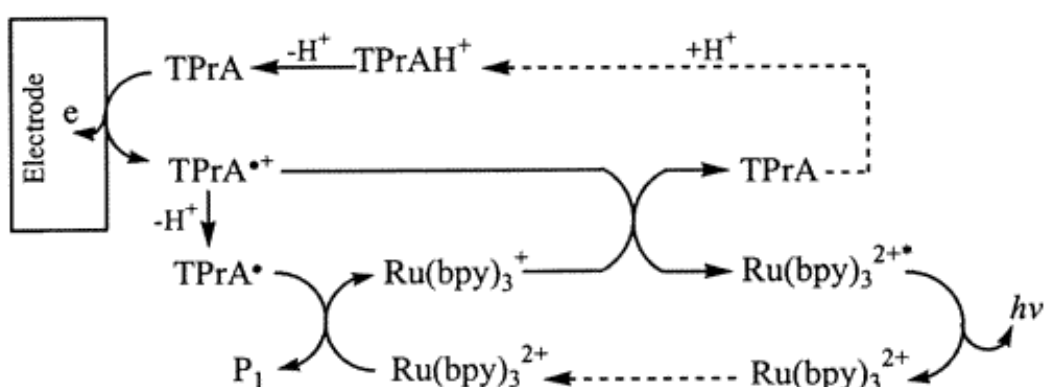
Mecanismo 1:**Mecanismo 2:****Mecanismo 3:**

FIGURA 1.11 - Mecanismo de geração de ECL proposto por Bard e colaboradores⁵⁶.

Em relação a detecção do SARS-CoV-2 utilizando a técnica de ECL, vários artigos já foram publicados com novos métodos sendo desenvolvidos para o possível diagnóstico. Utilizando principalmente, sistemas a base do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ e seus derivados, seja no desenvolvimento de imunoenaios, genoensaios, ou ainda biossensores estruturados, com aplicação em variados tipos de amostras.

Hosseini e colaboradores⁷⁰, desenvolveram um imunossensor de ECL sanduíche baseado na detecção de proteína *Spike* do SARS-CoV-2, obtendo sensibilidade e alto rendimento, com faixa linear de 10 ng mL^{-1} a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de detecção (LD) de $1,93 \text{ ng mL}^{-1}$ com tempo de análise de cerca de 90 min.

Já Jiang *et al*⁷¹ desenvolveram um método altamente sensível baseado em um ensaio genomagnético de ECL com hibridização de sonda dupla, usando como alvo o gene ORF1ab do vírus SARS-CoV-2, lançando mão de sondas marcadas com complexo de rutênio e biotina. Foi medida a intensidade de ECL gerada, obtendo uma faixa linear de $0,1 \text{ fmol L}^{-1} \sim 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e LD de $0,1 \text{ fmol L}^{-1}$, sendo o ensaio realizado em 30 min.

Esteban *et al*⁴⁰, desenvolveram um imunossensor de ECL para rastrear o vírus SARS-CoV-2 em águas residuais. Modificando as superfícies dos eletrodos com nanotubos de carbono para amplificar os sinais de ECL, foi possível a detecção da proteína *Spike* no nível de pg mL^{-1} em rios e águas residuais urbanas.

Laura Gutiérrez-Gálvez e colaboradores⁷² desenvolveram biossensores nanoestruturados de ECL para a detecção do DNA do vírus SARS-CoV-2, utilizando nanomateriais de ouro para modificar eletrodos descartáveis. Nanotubos de carbono foram utilizados como co-reagentes na ECL anódica do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ e a hibridização foi detectada pela variação no sinal de ECL. Esse método alcançou um limite de detecção de 514 amol L^{-1} .

Estes são apenas alguns trabalhos que têm sido desenvolvidos nesses últimos três anos de pandemia. Como mencionado anteriormente, a ECL é uma

técnica versátil e com grande potencial de aplicação, com inúmeras ideias para serem aplicadas no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para a COVID-19. O método apresentado nesse trabalho é baseado em análises de imagens obtidas via fotodocumentador, da emissão luz gerada por ECL, para a detecção de sequências de nucleotídeos específicas do RNA viral do SARS-CoV-2, empregando um ensaio genomagnético.

2. JUSTIFICATIVA

As pesquisas e estudos relacionados ao novo coronavírus SARS-CoV-2 encontram-se em andamento. Há ainda muito que se descobrir, no decorrer dos próximos anos, necessitando de toda atenção da comunidade científica. Sabe-se que uma das principais formas de controle da pandemia, é a testagem em massa da população, pois assim é possível identificar de forma rápida e eficaz os pacientes contaminados e tomar as medidas necessárias para o controle da disseminação do vírus. Deste modo, controlando a disseminação pode-se evitar o surgimento de novas variantes.

Como os sintomas iniciais da COVID-19 são semelhantes a outras doenças respiratórias, como gripe e influenza A, é importante diferenciá-las e identificá-las para o direcionamento do tratamento adequado.

Além de tudo isso, é de extrema importância o conhecimento e o desenvolvimento de novas tecnologias que possam ser adaptadas ao surgimento de novas doenças que ameacem a humanidade.

Levando em consideração o que foi mencionado, esse trabalho propõe o desenvolvimento de um método de diagnóstico para a COVID-19 com análise rápida e visando baixo custo, que possibilite a testagem em massa da população e que possa auxiliar no controle da disseminação do vírus SARS-CoV-2. O método desenvolvido tem ainda a possibilidade de adaptação para outras doenças que envolvam a detecção de material genético, utilizando detecção via a técnica de ECL e baseado em ensaio genômico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O presente estudo teve por objetivo desenvolver um método analítico de forma simples, de baixo custo e com detecção rápida de sequências de RNA viral, visando a detecção molecular do SARS-CoV-2 em amostras reais de pacientes infectados confirmados pela técnica de RT-PCR ou antígeno.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar um arranjo de eletrodos descartáveis;
 - Definir sequências de RNA do vírus para a detecção e das sequências de sDNA a serem utilizadas para captura e detecção;
 - Realizar a síntese e caracterização de nanopartículas de sílica mesoporosa dopadas com complexo de rutênio;
 - Otimizar e estabelecer as melhores condições para o genoensaio proposto;
 - Avaliar o desempenho do método proposto frente a soluções padrão preparadas em tampão;
 - Aplicar o método desenvolvido em amostras de saliva de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com COVID-19.
 - Comparar com a técnica de RT-PCR em tempo real e teste de antígeno.
-

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e soluções

- Cloreto de potássio (Synth)
 - Cloreto de sódio (Synth)
 - Tripropilamina (TPA) (Sigma-Aldrich)
 - Ciclohexano (Merk)
 - 1-hexanol (Sigma Aldrich)
 - Tetraetil ortosilicato (TOES) (Merk)
 - Triton X100 (Synth)
 - Solução de amônia (Synth)
 - Álcool etílico (P.A.) (Synth)
 - Acetona (P.A) (Synth)
 - Cloreto de trisbipiridinarutênio(II) ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$) (Sigma-Aldrich)
 - Tween 20 (Tw-20) (Sigma Aldrich)
 - Cloreto de magnésio (Synth)
 - DL-Ditiotreitol (DTT) (Sigma Aldrich)
 - Dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimide hidrocloreto (EDC) (Sigma Aldrich)
 - Ácido etilenodiaminotetraacético (Synth)
 - N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Aldrich)
 - Tris-hidrocloreto (Tris-HCl) (Sigma Aldrich)
 - Cloreto de poli(dialildimetilamonio)(PDDA) (Sigma Aldrich)
 - Ácido poliacrílico (PAA) (Sigma Aldrich)
 - Etanolamina (Sigma Aldrich)
 - Ácido 4-morfoleneetanosulfônico (Tampão MES) (Sigma Aldrich)
 - Partículas magnéticas carboxiladas (Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid, Invitrogen, 1 μm) (Thermo Fisher Scientific)
-

-
- Tinta de carbono (C2160602D2 Gwent Electronic Materials Ltd, UK)
 - Tinta de Ag/AgCl (C2051014P10, Gwent Electronic Materials Ltd, UK)
 - Eletodag (423SS)

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções eram de pureza analítica. Tampão Tris-EDTA (TE) consistindo de 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 7,6 – 8,0. Tampão TE com Tween 20 0,05% (m/v) (TE-Tw). Tampão NE 10X consistindo de 500 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1000 mmol L⁻¹ NaCl, 100 mmol L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol L⁻¹ DTT, pH 7,9. Tampão NE 1X consistindo de 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol L⁻¹ DTT, pH 7,9. Tampão NE 1X com Tween 20 0,05% (m/v) (NE 1X – Tw). Tampão TT (Tris-HCl com Tween 20 0,05 % m/v).

As soluções tampão foram preparadas a partir de seus respectivos sais e todas as soluções citadas foram preparadas com água deionizada ($\rho = 18,2$ M Ω cm) obtida com um sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, USA).

4.2. Equipamentos

Para medidas de absorção na região do ultravioleta-visível foi utilizado um espectrofotômetro SHIMADZU modelo 2550.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um μ potenciostato portátil da Dropsens, μ StatECL S/N: USTECL3150457A USB INPUT 5V DC 1A (Methron, Espanha), conectado a um computador contendo o *software* Dropview 8400.

As medidas da intensidade de eletroquimiluminescência foram realizadas utilizando um fotodocumentador ImageQuant LAS 500. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software Image Lab 6.0.1.

Para as medidas de pH, utilizou-se um pHmetro Digimed DM20 (Digimed, Brasil). As pesagens foram feitas utilizando-se balança analítica OHAUS modelo PX224BR/E com precisão de 0,01 mg.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de dispersão de energia (EDX) foram obtidas do equipamento FEI Tecnai G2 F20 X-twin 200KV.

Para a fabricação dos eletrodos descartáveis, utilizou-se uma impressora de recorte Silhouette Cameo (Silhouette, Brasil) e uma plotter de recorte (F1 Suprimentos, Brasil).

4.3. Sistema para detecção da ECL

O sistema utilizado nas medidas de ECL (FIGURA 4.1) consiste de um computador, um μ potenciostato, um fotodocumentador e o dispositivo descartável, ao qual é adicionado soluções de TPA com bioconjugado final formado no ensaio.



FIGURA 4.1 **A)** Sistema para detecção da ECL **B)** Sistema para detecção da ECL, compartimento do fotodocumentador fechado para captura de imagens.

4.4. Construção do dispositivo descartável

Os dispositivos desenvolvidos são descartáveis e foram construídos com material de baixo custo e encontrados, em sua maioria, no mercado local. O dispositivo é composto por um eletrodo de trabalho de carbono (*WE*) contendo um arranjo com 20 regiões sensoras, um eletrodo de referência (*RE*) Ag/AgCl e um contra eletrodo (*CE*). Este, foi construído por método serigráfico, sendo o desenho dos padrões contendo os formatos dos dispositivos e dos eletrodos gerados com o *software* Silhouette Studio. Usou-se a impressora de corte Silhouette Cameo (Silhouette America, Inc.) para recortar um filme de vinil adesivo no formato dos dispositivos de interesse. Após a impressão, as porções indesejadas foram retiradas usando uma pinça, deixando o molde dos eletrodos como uma máscara negativa. Em seguida, o vinil com o molde foi transferido para uma folha de PVC (0,5 mm de altura). A tinta de carbono (C2051014P10, Gwent Electronic Materials Ltd) foi então aplicada utilizando-se um pequeno rodo. Após a cura da tinta por 60 minutos a 60 °C, a tinta de Ag|AgCl (C2051014P10, Gwent Electronic Materials Ltd) foi depositada como o eletrodo de pseudo-referência, seguido de cura por 30 minutos a 60 °C. Na sequência, a máscara de vinil foi removida e um processo de laminação foi utilizado para definir a área geométrica e isolar os eletrodos. Nesta etapa, foi utilizada novamente vinil adesivo devidamente cortado na impressora de corte e colocado sobre a folha de PVC contendo os eletrodos. Aplicou-se calor e pressão por meio de uma prensa aquecida a 120 °C por 120 s, aguardando resfriamento por 30 min, obtendo-se os eletrodos prontos para o uso. Após esta etapa, um adesivo de vinil foi aplicado, que foi previamente cortado com a impressora de recorte de forma a gerar os spots referentes as regiões sensores. Este adesivo foi colado sobre o eletrodo de trabalho. Por fim foi adicionado um cartão adesivo dupla face de modo a delimitar a área dos poços para adição das amostras. A FIGURA 4.2 apresenta um esquema do processo de construção do arranjo de eletrodos.

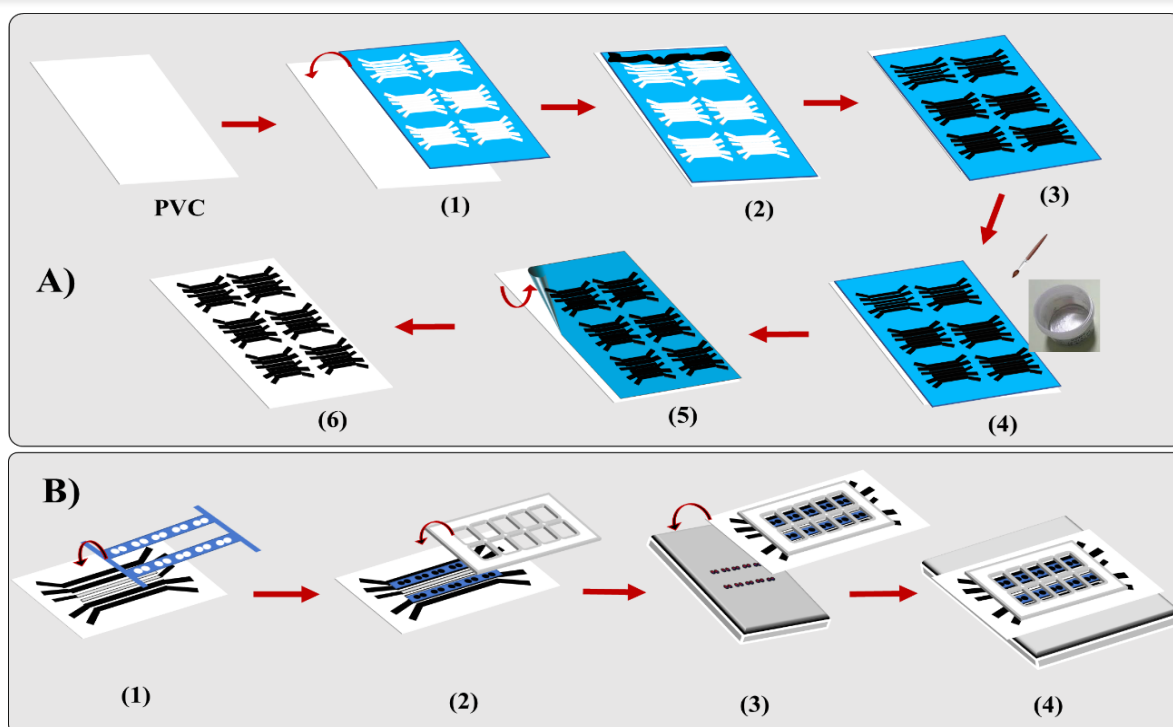


FIGURA 4.2- A) Etapas de construção do dispositivo descartável em substrato PVC. **A1)** Transferência do vinil contendo o layout dos eletrodos; **A2)** Serigrafia com a tinta de carbono; **A3)** Cura da tinta de carbono; **A4)** Aplicação da tinta de Ag/AgCl no eletrodo de referência; **A5)** Retirada do vinil delimitador; **A6)** Eletrodos serigrafados com o layout desejado. **B)** Montagem do dispositivo **B1)** Aplicação do vinil contendo a delimitação dos eletrodos de trabalho; **B2)** Aplicação do cartão adesivo delimitador de cada poço do dispositivo; **B3)** Encaixe do dispositivo no suporte contendo os ímãs; **B4)** Dispositivo pronto para aplicação.

Na FIGURA 4.3 são apresentadas as imagens dos elementos para a construção dos eletrodos, FIGURA 4.3A: cartão adesivo (1), eletrodo serigrafado com 20 *spots* (2) e o suporte, impresso em impressora 3D, contendo 20 ímãs (3). Na FIGURA 4.3B sobre os eletrodos é aderido um cartão de adesivo de polietileno recortado de forma a delimitar as regiões sensoras formando poços para a adição das soluções. Na FIGURA 4.3C é apresentado a montagem do dispositivo final, finalizado para adição das soluções e medidas de ECL.

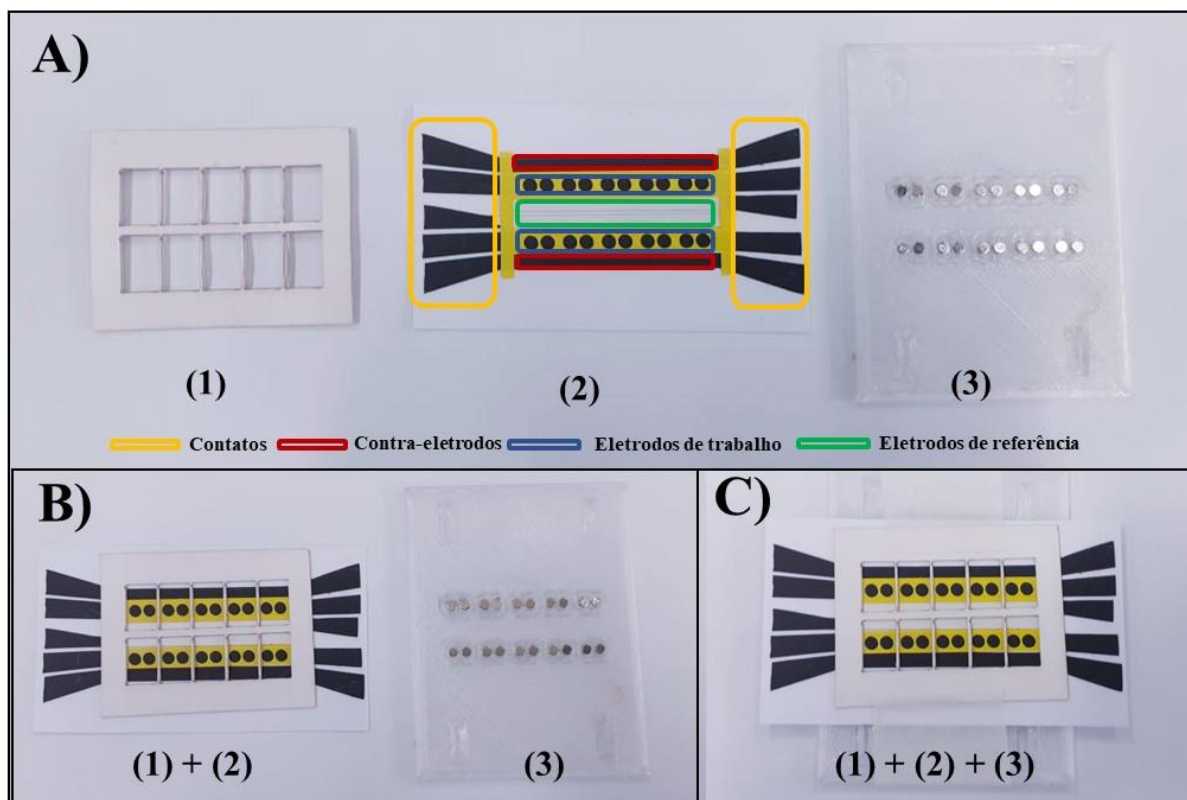


FIGURA 4.3- **A)** imagem dos elementos para construção do eletrodo; **B)** Eletrodo com papel cartão delimitando os poços **(1) + (2)** e suporte impresso contendo os 20 ímãs para retenção das partículas magnéticas sobre o eletrodo de trabalho **(3)**; **C)** Imagem final do dispositivo contendo o cartão recortado delimitador de cada poço e no suporte magnético.

4.5. Preparo das amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas tanto de indivíduos diagnosticados com a COVID-19, quanto de indivíduos saudáveis. Para tal foi utilizado tubo *falcon* de 15 mL ou tubo tipo *salivette*. Após coleta, as amostras passaram por um processo de inativação do vírus por meio de tratamento térmico. Esse tratamento consistiu em aquecer a amostra a 90°C por 20 min ou 95°C a 5 min. A realização do tratamento térmico permitiu a manipulação das amostras de forma segura, sendo todo o procedimento realizado em Laboratório de Biossegurança Nível 2 (NB2) no Departamento de Química da UFSCar. Por fim, as amostras foram diluídas 10 vezes em tampão NE 1x para análise.

4.6. Sequências de DNA

No desenvolvimento do ensaio genômico, foram avaliadas regiões diferentes do gene do vírus SARS-CoV-2, baseado na fosfoproteína do nucleocapsídeo (N), denominados região 1A e região 2A. Estas também são utilizados para o diagnóstico da COVID-19 na técnica de RT-PCR, por serem específicas para vírus SARS-CoV-2. A seguir é apresentado a sequência de nucleotídeos do vírus na TABELA 4.1 são 1260 pb constituintes. Em destaque temos as regiões da sequência nucleotídeo alvo 1A em verde (80 pb) e a sequência de nucleotídeos alvo 2A em azul (80pb), utilizadas nesse trabalho.

TABELA 4.1 Sequência de nucleotídeos constituintes do gene nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2*

```

1 atgtctgata atggaccca aaatcagcga aatgcacccc gcattacgtt tgggtgaccc
61 tcagattcaa ctggcagtaa ccagatgga gaacgcagtg gggcgcgatc aaaacaacgt
121 cggccccaag gtttaccxaa taatactgcg tcttggttca cgctctcac tcaacatggc
181 aaggaagacc ttaaattccc tcgaggacia ggcgttcaa ttaacaccaa tagcagtcca
241 gatgaccaa ttggctacta ccgaagagct accagacgaa ttcgtggtgg tgacggtaaa
301 atgaaagatc tcagtccaag atggtatttc tactacctag gaactgggcc agaagctgga
361 cttccctatg gtgctaacia agacggcatc atatgggtg caactgaggg agccttgaat
421 acacaaaaag atcacattgg caccgcaat cctgctaaca atgctgcaat cgtgctacia
481 cttcctcaag gaacaacatt gccaaaaggc ttctacgcag aaggagcag agggggcagt
541 caagcctctt ctcgttcctc atcacgtagt cgcaacagtt caagaaattc aactccaggc
601 agcagtaggg gaacttctcc tgctagaatg gctggcaatg gcggtgatgc tgctcttgct
661 ttgctgctgc ttgacagatt gaaccagctt gagagcaaaa tgtctggtaa aggccaaacia
721 caacaaggcc aaactgtcac taagaaatct gctgctgagg cttctaagaa gcctcggcia
781 aaacgtactg ccactaaagc atacaatgta acacaagctt tcggcagacg tgggtccagaa
841 caaacccaag gaaatthtgg ggaccagga ctaatcagac aaggaactga ttacaaacat
901 tggccgcaaa ttgcacaatt tgccccagc gcttcagcgt tcttcggaat gtcgcgcat
961 ggcatggaag tcacacctc ggaacgtgg ttgacctaca caggtgcat caaattggat
1021 gacaaagatc caaatttcaa agatcaagtc atthtctga ataagcatat tgacgcatac
1081 aaaacattcc caccaacaga gcctaaaaag gacaaaaaga agaaggctga tgaaactcaa
1141 gccttaccgc agagacagaa gaaacagcaa actgtgactc ttcttctgc tgacagattg
1201 gatgatttct ccaacaatt gcaacaatcc atgagcagtg ctgactcaac tcaggcctaa

```

* NCBI Reference Sequence: NC_045512.2 (identificação *GenBank*: gene ID: 43740575)

Foram sintetizadas sequências de oligonucleotídeos, complementares as sequências alvo do RNA viral, denominadas sondas de DNA para captura e sondas de DNA para detecção. O DNA alvo foi obtido da *Exxtend* Biotecnologia (Brasil) e as sondas foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA). As sondas possuem em sua extremidade um espaçador C6 e modificador amino que permite o ancoramento dessas sondas com as nanopartículas de interesse, por ligação covalente. A TABELA 4.2 apresenta as sequências de *s*DNA sintetizadas.

TABELA 4.2- Alvos e sondas de *s*DNA utilizadas para otimização do ensaio proposto.

Nome	Sequência	Modificador	Tm (°C)
	5' -TGA TAA TGG ACC CCA AAA		
Sequência de <i>ss</i> DNA Alvo 1A	TCA GCG AAA TGC ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC CTC AGA TTC AAC TGG CAG TAA CCA GA -3'	-	74
Sonda de Captura – <i>c</i> DNA 1A	[AmC6] 5' -TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG -3'	Amina Primária	66,2
Sonda de Detecção - <i>d</i> DNA 1A	5' -GGG TCC ACC AAA CGT AAT GC- 3' [AmC6]	Amina Primária	66,2
	5'-GCA ACT GAG GGA GCC TTG		
Sequência de <i>ss</i> DNA Alvo 2A	AAT ACA CCA AAA GAT CAC ATT GGC ACC CGC AAT CCT GCT AAC AAT GCT GCA ATC GTG CTA CA -3'	-	74
Sonda de Captura - <i>c</i> DNA 2A	[AmC6] -5' -TGT AGC ACG ATT GCA GCA TTG-3'	Amina Primária	67,1
Sonda de Detecção- <i>d</i> DNA 2A	5'- ATT GCG GGT GCC AAT GTG AT-[AmC7]	Amina Primária	69,6

A FIGURA 4.4 apresenta as sequências de nucleotídeos sintetizadas para o alvo 1A e alvo 2A, e indica as regiões de ligação complementares as sondas de captura e detecção para as sequências alvo.



FIGURA 4.4- Representação das sequências alvo 1A e 2A com suas respectivas sondas de captura e detecção complementares.

Os oligonucleotídeos foram aliquotados e estocados em temperatura de -20°C na concentração estoque de $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$, até a utilização. A descongelamento foi realizado em banho de gelo.

4.7. Preparação das PMs modificadas com sonda cDNA (PMs-cDNA)

As PMs, $1\ \mu\text{m}$ de diâmetro, foram modificadas (FIGURA 4.5) seguindo o protocolo proposto pelo fabricante *Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid, Invitrogen*. Inicialmente, as PMs foram mantidas em banho ultrassônico por 10 minutos e agitadas em vórtex por 5 minutos para dispersão e homogeneização. Em seguida, $50\ \mu\text{L}$ das PMs foram dispersas em $1\ \text{mL}$ de tampão *MES* $100\ \text{mM}$ pH 4,8. Estas foram lavadas três vezes com o mesmo tampão, com auxílio da estante magnética, que permitiu a separação das PMs e descarte da solução tampão. Após as etapas de lavagem, foi adicionado $1\ \text{mL}$ de solução cDNA, $2\ \mu\text{mol L}^{-1}$, preparada em mistura de EDC $60\ \text{mmol L}^{-1}$ e NHS $22\ \text{mmol L}^{-1}$ em água ultrapura. Esta solução foi mantida em incubação a temperatura ambiente por 16 horas para ancoragem de cDNA sobre as PMs. Após tempo de incubação, o bioconjugado PMs-cDNA foi separado magneticamente e removido o

sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão TT (Tampão Tris-HCl 250 mM pH 7,5-8 com 0,01% de Tween 20) e foi mantido em incubação sob agitação por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes, a fim de bloquear os sítios de ligações livres e evitar ligações não específicas. Por fim, o bioconjugado foi disperso em 1 mL de TE-Tw20 e armazenado sob refrigeração a 4°C na geladeira até o uso.

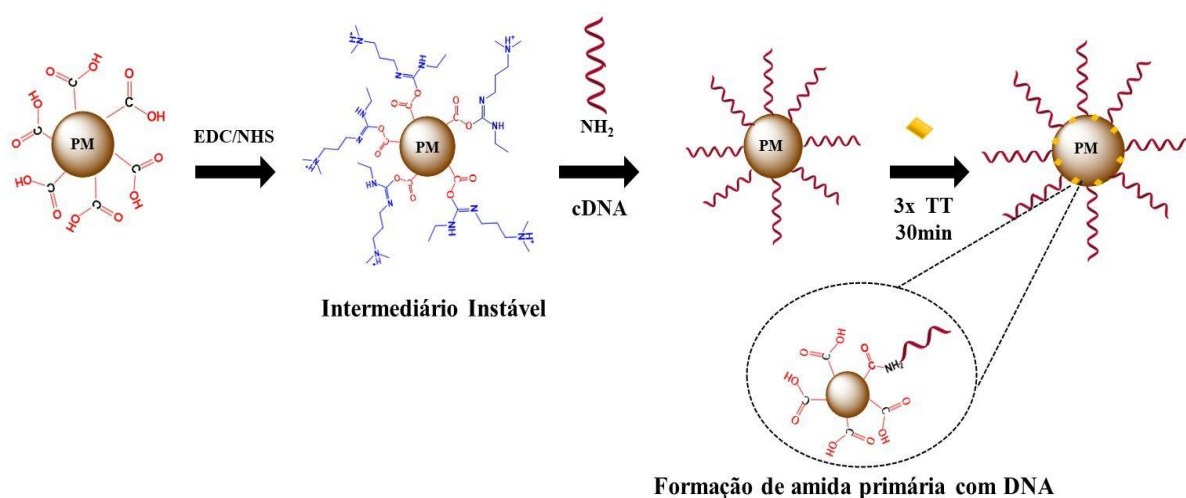


FIGURA 4.5- Representação esquemática da modificação das PMs com as sondas de cDNA e bloqueio.

4.8. Síntese do marcador eletroquimiluminescente: nanopartículas de sílica ancorado com o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (NP-Si-Ru)

Essa síntese foi baseada nos trabalhos de Sardesai *et al*⁷³ e Fangyuan Gai *et al*⁷⁴, baseados em um método de microemulsão água/óleo. Em um balão de fundo redondo (FIGURA 4.6), foi adicionado 1800 µL de Triton X 100, 1800 µL de *n*-hexanol, 7500 µL de ciclo hexano e 340 µL de solução do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ na concentração 0,04 M em água ultrapura. Essa mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 µL de TOES e 60 µL de solução de amônia e mantido em agitação vigorosa por 24 h a temperatura ambiente, protegido da luz. Após este tempo, adicionou-se 20 mL de acetona para promover a precipitação. O sólido laranja obtido (NP-Si-Ru) foi

separado por centrifugação e lavado com água e etanol. Por fim, foi deixado em estufa por 1h para secagem. O pó obtido foi transferido para um frasco âmbar e armazenado a 4°C para posterior utilização.

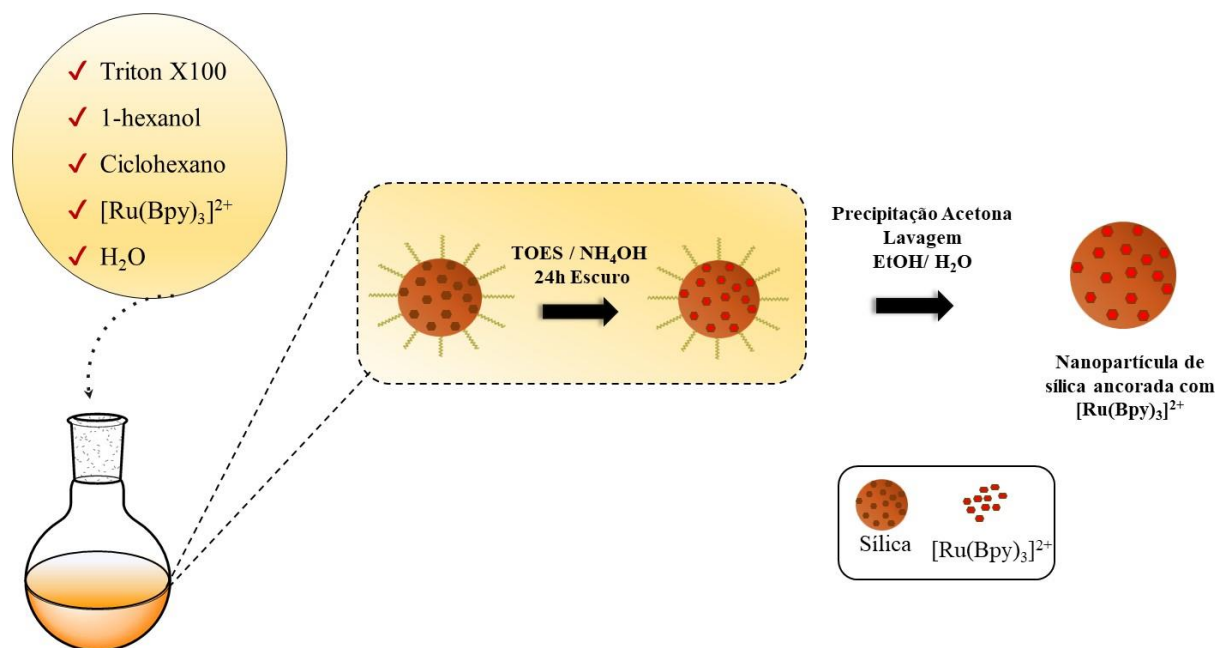


FIGURA 4.6 - Representação esquemática das etapas de síntese das nanopartículas de sílica ancoradas com complexos de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$.

4.9. Preparação da sonda de detecção: NP-Si-Ru modificada cm sonda *d*DNA (NP-Si-Ru-*d*DNA)

Para a imobilização da sonda de DNA de detecção (*d*DNA) nas nanopartículas de sílica ancoradas com complexo de rutênio (NP-Si-Ru) foi realizado conforme apresentado na FIGURA 4.7: Pesou-se 2 mg do composto NP-Si-Ru e adicionou-se 1 mL de água ultrapura. Essa suspensão foi mantida no banho ultrassônico por 2 horas para completa dispersão e homogeneização das nanopartículas. Em seguida, a solução foi centrifugada e eliminou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de PDDA na concentração de 0,033 mg/mL, e manteve-se em incubação e agitação por 30 minutos. Após tempo de incubação, a dispersão foi centrifugada e lavada três vezes com água ultrapura. Após a lavagem, adicionou-se 1 mL de PAA na concentração 0,033 mg/mL e manteve-se novamente por 30 minutos em incubação. Em seguida, a dispersão foi

centrifugada e lavada três vezes com água ultrapura. Na sequência foi preparada uma mistura de EDC de concentração $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e NHS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura e adicionou-se a sonda de detecção *d*DNA, $4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esta solução foi mantida em incubação a temperatura ambiente por 16 horas, para imobilização de *d*DNA nas nanopartículas NP-Si-Ru. Após tempo de incubação, o bioconjugado NP-Si-Ru-*d*DNA foi separado por centrifugação e sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 1 mL tampão TT (Tampão Tris-HCl 250 mM pH 8 com 0,01% de Tween 20), este foi mantido em incubação por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes, a fim de bloquear os sítios de ligações livres e evitar ligações não específicas. Por fim, o bioconjugado foi disperso em 1 mL de TE-Tw20 e armazenado sob refrigeração a 4°C na geladeira até o uso.

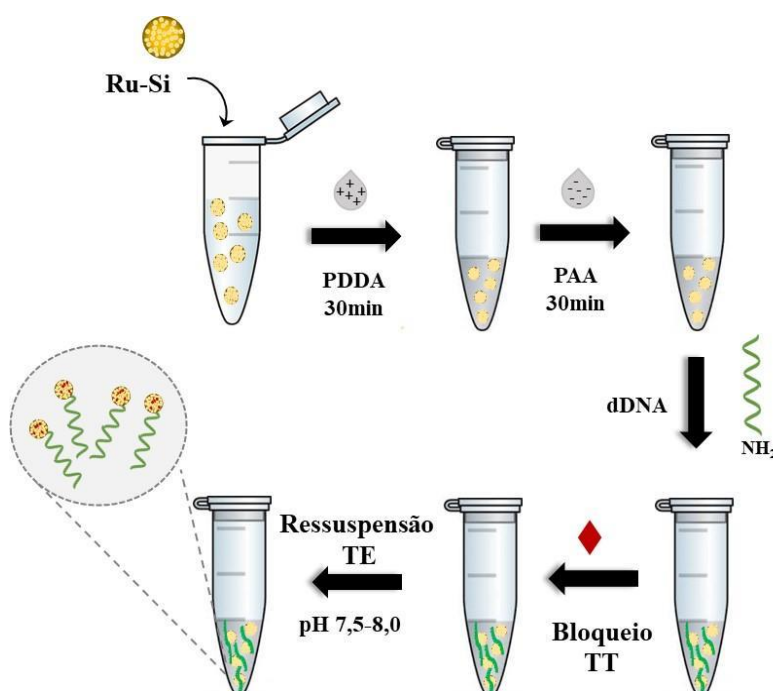


FIGURA 4.7- Representação esquemática para preparação da sonda de detecção, NP-Si-Ru-*d*DNA.

4.10. Ensaio genômico e medidas de ECL

Para os estudos envolvendo o ensaio genômico foram adicionados a um microtubo 180 μL de tampão NE 1X, 20 μL de saliva, 5 μL de PM-*c*DNA e 5 μL de NP-Si-Ru-*d*DNA. Esta mistura foi incubada por 30 minutos

a temperatura ambiente e sob agitação lenta. A etapa de incubação foi realizada com o objetivo de promover a hibridização da sequência alvo (1A ou 2A) com as sondas de captura e detecção.

Após o tempo de incubação, realizou-se etapas de lavagem da mistura por separação magnética com o auxílio de uma estante magnética por 4 minutos. Retirou-se o sobrenadante com uma pipeta volumétrica e adicionou-se tampão NE 1X + Tw20 (0,05% m/v) para lavagem, deixando em agitação lenta por 2 min. Os procedimentos de separação e lavagem foram realizados três vezes.

Em seguida, adicionou-se ao microtubo 40 μ L de solução de TPA 50 mmol L⁻¹. Essa solução foi transferida para superfície do eletrodo de trabalho sobre as diferentes regiões sensoras e contendo o suporte com ímãs na região posterior do dispositivo. Em seguida o sistema foi acoplado a um μ potenciostato. Para detecção do alvo, foi aplicado um potencial de 1,2 V vs Ag/AgCl por 160 s, enquanto o dispositivo encontra-se dentro do gabinete do fotodocumentador ImageQuant LAS 500. Desta forma, durante a aplicação do potencial, a ECL é gerada e as imagens são concomitantemente detectadas, sendo a intensidade de ECL proporcional à concentração do alvo, no caso das amostras o RNA viral. Na FIGURA 4.8, são apresentadas as etapas de captura e detecção.

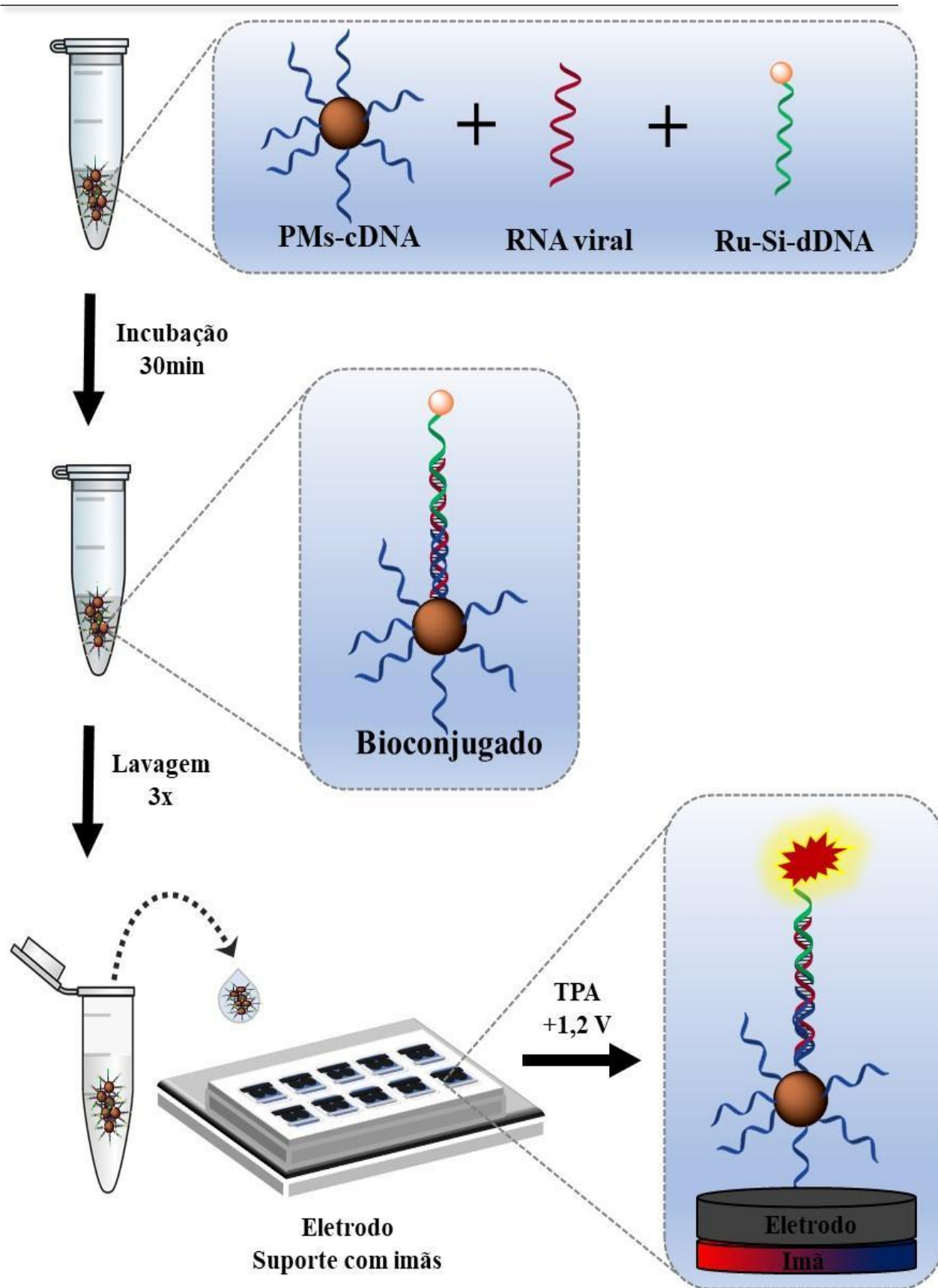


FIGURA 4.8- Representação esquemática do método genomagnético proposto envolvendo as etapas de captura e detecção do alvo.

Esse mesmo procedimento foi utilizado para a detecção das sondas 1A e 2A simultaneamente. A única alteração, foi a adição de 5 μ L de PM-*c*DNA e 5 μ L de NP-Si-Ru-*d*DNA referentes a sonda 1A e 5 μ L de PM-*c*DNA e 5 μ L de NP-Si-Ru-*d*DNA referentes a sonda 2A. Totalizando 10 μ L de sondas de captura e 10 μ L de sondas de detecção durante o ensaio.

4.11. Análise das imagens de ECL obtidas com o fotodocumentador

As imagens de luz emitida nos spots via reação de ECL foram registradas utilizando o fotodocumentador e analisadas pelo programa *ImageLab* 6.0.1 (FIGURA 4.9). Para isso foi selecionado, na imagem obtida pelo fotodocumentador, a área que se deseja analisar. Neste caso, uma área circular padronizadas do tamanho de cada eletrodo de trabalho é delimitada e a análise é feita baseada no valor do volume, calculada pelo programa *ImageLab* 6.0.1. Essa ferramenta é utilizada para identificar a intensidade de sinal de bandas, pontos ou qualquer outro tipo de dado de uma imagem, utilizados em outras técnicas como eletroforese, *Western Blot*, entre outras. Nesse trabalho o valor do volume integral, fornecido no programa, é o sinal analítico utilizado, e seu valor é atribuído para cada amostra.

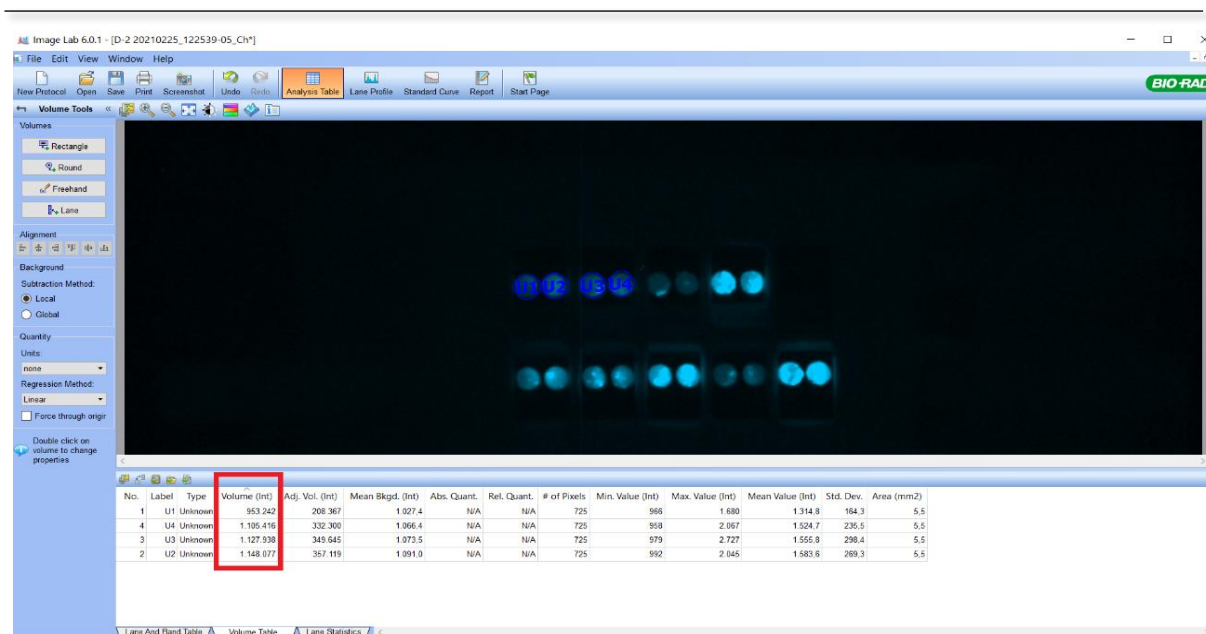


FIGURA 4.9- Imagem da tela do programa *ImageLab* 6.0.1 utilizado para as análises das imagens obtidas pelo fotodocumentador.

4.12. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas pelos programas + e OriginPro 8.6. A curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) foi utilizada para avaliar a sensibilidade e especificidade do método desenvolvido.

A curva é um importante meio para avaliar a precisão no desenvolvimento de métodos para diagnóstico. Para a construção da curva *ROC*, traça-se um diagrama que corresponde a sensibilidade (verdadeiros positivos) em função de 100-especificidade (falsos positivos) para um conjunto de valores de “ponto de corte”^{75–77}.

A sensibilidade é a aptidão do teste em detectar amostras verdadeiramente positivas, ou seja, detectar corretamente as amostras dos pacientes contaminados com a COVID-19, sendo calculada como:

$$\text{Sensibilidade (100\%)} = \frac{(\text{Verdadeiro positivos})}{(\text{Falsos negativos} + \text{Falsos Positivos})}$$

A especificidade é a capacidade do método em detectar os falsos positivos, ou seja, a capacidade de identificar corretamente as amostras dos indivíduos não contaminados com o SARS-CoV-2, sendo calculada da seguinte forma:

$$100 - \text{Especificidade}(\%) = \frac{(\text{Falsos positivos})}{(\text{Verdadeiros negativos} + \text{Falsos Positivos})}$$

A área sob a curva ROC (AUC do inglês *area under the curve*) é o parâmetro da precisão do teste de diagnóstico. Quanto mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do diagrama, melhor é sua diferenciação entre os indivíduos contaminados e não contaminados. Os valores da *AUC* variam de 0 a 1, sendo que um valor de zero sugere um teste sem nenhuma precisão, enquanto um *AUC* igual a 1 sugere um teste totalmente preciso⁷⁷.

4.13. Método comparativo para determinação do vírus SARS-CoV-2

Para a validação do método desenvolvido, os resultados obtidos foram comparados com a técnica de RT-PCR ou com teste de detecção de antígeno, nas mesmas amostras.

Estes testes foram realizados na Faculdade de Medicina da USP no Instituto de Medicina Tropical, no Laboratório coordenado pela Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino, em São Paulo - SP. E no Laboratório DNA Consult localizado na cidade de São Carlos-SP.

4.14. Participantes

Os níveis de RNA viral estudados foram detectados em amostras de saliva de pacientes divididos em duas *coortes* de indivíduos de sexo e faixa etária variável. Todas as intervenções envolvendo os participantes da pesquisa, foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCar, número

66076017.3.0000.5504. O termo de consentimento livre e esclarecido foi dado por todos os participantes antes da participação no estudo.

4.14.1. Coorte 1

As amostras de saliva foram cedidas pelo Laboratório coordenado da Profa. Dra. Ester Sabino, no Instituto de Medicina Tropical na Faculdade de Medicina da USP. As amostras, cerca de 200 μ L ou 300 μ L, foram coletadas em tubo falcon, inativadas a 95°C por 20 min e armazenadas a -20°C.

4.14.2. Coorte 2

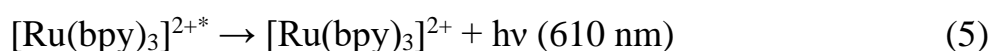
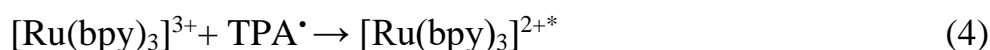
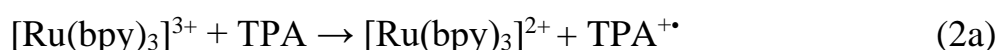
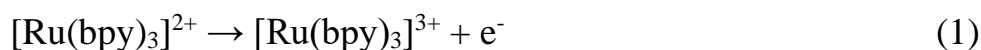
As amostras de saliva foram cedidas pelo Laboratório DNA Consult em São Carlos-SP. As amostras, cerca de 1 mL, foram coletadas em tubo falcon e armazenadas a -20°C. Estas foram inativas cerca de 1 hora antes do ensaio a uma temperatura de 95°C por 5 min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização e caracterização dos eletrodos descartáveis

5.1.1. Otimização da tinta condutora de carbono para serigrafia

A primeira etapa otimizada nesse trabalho foi a avaliação e determinação da tinta de carbono a ser utilizada na construção dos eletrodos. Como já mencionado, a ECL é um meio de converter energia elétrica em luz e envolve a produção de intermediários a partir de precursores estáveis na superfície de um eletrodo. Esses intermediários reagem sob uma variedade de condições para formar estados excitados que emitem luz⁵⁸. As etapas para a geração ECL são mostradas nas equações (1) a (5). A ECL é gerada devido à redução do complexo de rutênio mediada pela oxidação direta de TPA na superfície do eletrodo. Uma via concorrente envolve a geração de ECL por oxidação eletroquímica direta do complexo, que pode então reagir com o radical TPA gerando ECL.^{58,73,78}:



Especificamente para esse estudo de otimização, a ECL gerada foi detectada utilizando uma câmera fotodiodo de silício com pré-amplificador acoplada ao um potenciostato $\mu\text{Stat ECL Dropsens}$ (FIGURA 5.1).

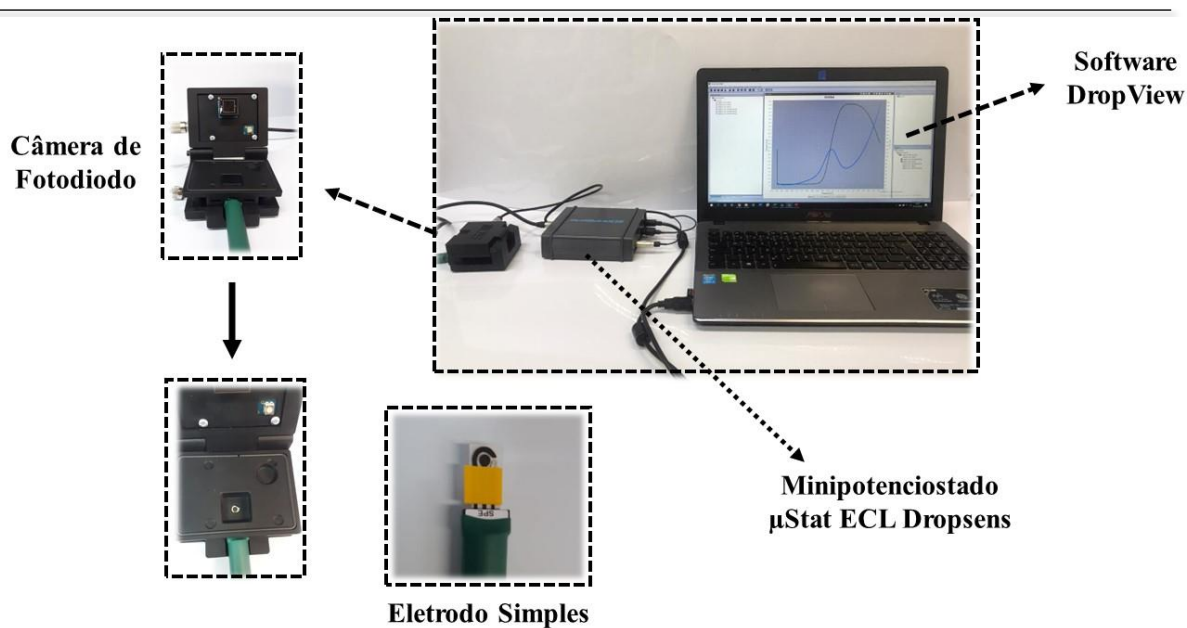


FIGURA 5.1- Sistema para detecção por ECL: fotodiodo de silício com pré-amplificador acoplada ao potenciostato μ Stat ECL Dropsens.

Neste estudo foram avaliadas duas marcas diferentes de tintas, a Electrodag 423 SS (ED) e a Gwent Electronic Materials Ltd (GW). Para este experimento, uma solução do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3] \text{Cl}_2$ na concentração $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada na presença de TPA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,5 e foi adicionado $60 \mu\text{L}$ dessa solução na superfície dos eletrodos serigrafados com as diferentes tintas e estes foram acoplados ao potenciostato. As medidas eletroquimiluminescente foram realizadas, com varredura de potencial de 0,6 V a 1,3 V, e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . A FIGURA 5.2 apresenta o perfil eletroquimiluminescente obtido para as duas tintas.

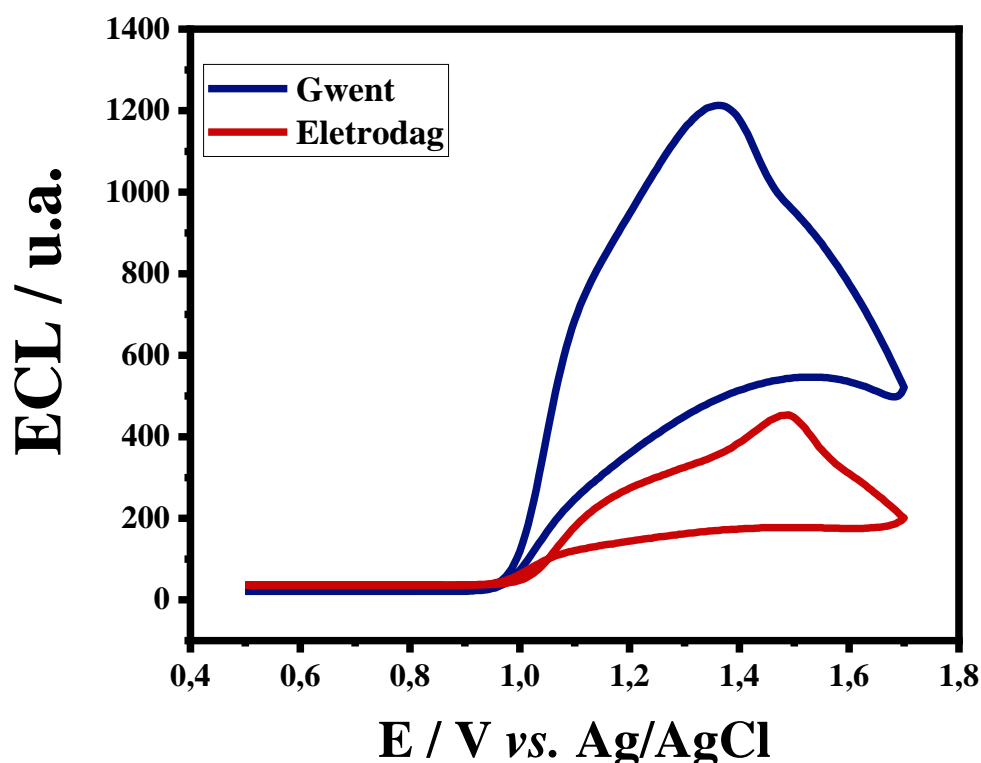


FIGURA 5.2- Perfil eletroquimiluminescente obtidos em solução do complexo [Ru(Bpy)₃]²⁺ na concentração 1,5 mg. mL⁻¹ utilizando TPA 0,1 mol L⁻¹ em PBS pH 7,4 nos eletrodos serigrafados com as tintas Eletrodag (vermelha) e Gwent (azul).

O máximo da resposta eletroquimiluminescente ocorreu em torno de +1,3 V. Foi observado que a intensidade de corrente de pico e de ECL foi maior para o eletrodo serigrafado com a tinta Gwent, máximo de 1200 u.a. de ECL, quando comparado com o eletrodo serigrafados com a tinta Eletrodag, máximo de 450 u.a. de ECL, ou seja, houve um aumento de quase três vezes na intensidade de ECL quando utilizada a tinta Gwent, levando a escolha desta para a continuidade dos experimentos.

A diferença na intensidade de ECL observada entre as tintas, provavelmente deve-se a composição destas. Zu e Bard ⁷⁹, relatam que a intensidade de ECL é menor em superfícies mais hidrofílicas, pois estas dificultam a oxidação de TPA. A tinta Eletrodag pode ter em sua composição um

maior número de grupos funcionais contendo oxigênio, como carboxilas, hidroxilas, e outros grupos polarizantes, o que proporciona uma característica mais hidrofílica ao material, causando o efeito observado.

Para melhor compreensão do fenômeno da ECL, deu-se continuidade aos estudos para verificar a estabilidade da resposta. Verificou-se que quando realizadas sucessivas varreduras sobre os eletrodos serigrafados com a tinta *Gwent* houve diminuição da intensidade de corrente e também de ECL, como mostrado na FIGURA 5.3. Uma possível explicação para esse efeito é a baixa estabilidade do radical TPA^{\bullet} que é consumido à medida que a reação acontece⁶⁵. A inserção na FIGURA 5.3, apresenta as imagens da emissão da luz para o primeiro e segundo ciclos voltamétrico, obtidas com auxílio de uma câmera de celular, no qual claramente observa-se a diminuição da intensidade de luz gerada quando comparados o primeiro e o segundo ciclo.

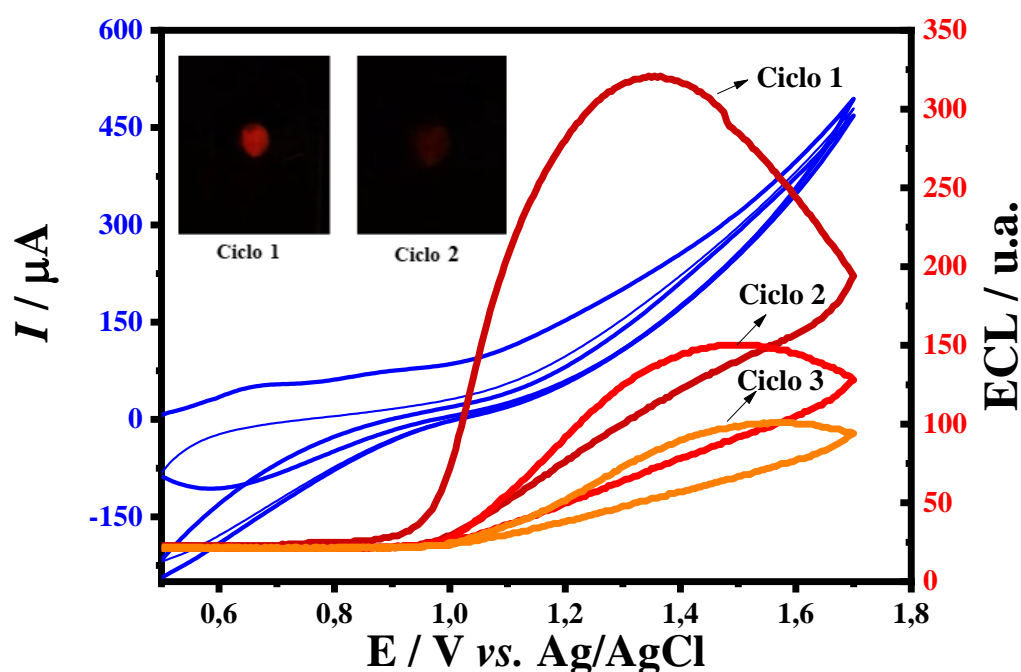


FIGURA 5.3- Perfil eletroquimiluminescente e voltamétrico obtido para complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ na superfície do eletrodo na concentração $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando TPA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4, eletrodo serigrafado com tinta *Gwent*. Inserção: Imagens da emissão de luz, detectadas pela câmera de um celular.

Essa diminuição na intensidade de ECL com o decorrer do tempo é notável quando realizados experimento amperométrico com auxílio do eletrodo com 20 *spots* e utilizando o fotodocumentador. A FIGURA 5.4 apresenta um amperograma, com a aplicação de um potencial de +1,2 V por 150 segundos. Pode-se observar o decaimento da corrente com o passar do tempo. Esse estudo permitiu definir as condições e o tempo de aplicação do potencial para os experimentos realizados neste trabalho.

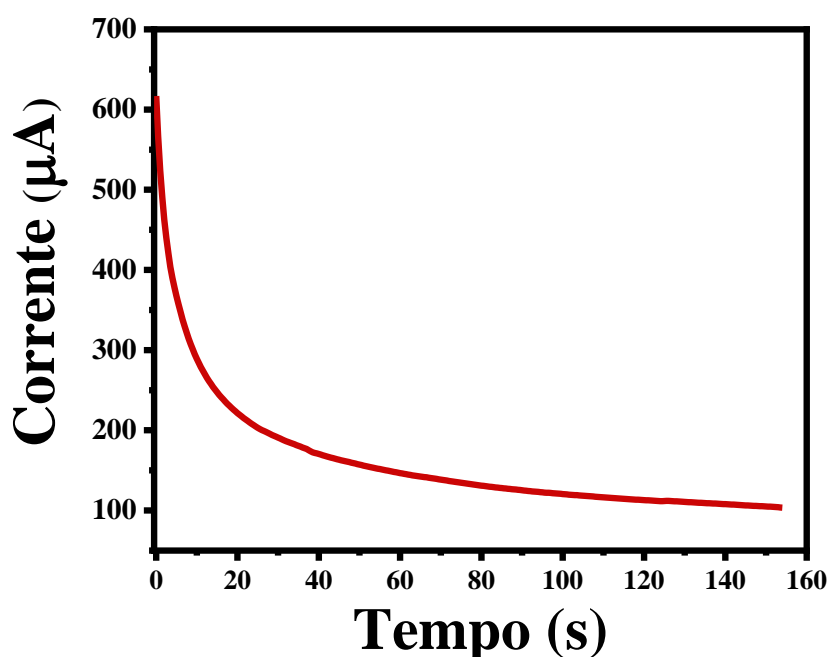


FIGURA 5.4- Amperograma obtido com aplicação de potencial igual +1,2 V por 150 s, em uma solução de complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando TPA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4.

5.1.2. Otimização do substrato utilizado na construção do dispositivo descartável

Neste trabalho, buscou-se a construção de um dispositivo descartável com o maior número de regiões sensoras possíveis, objetivando um maior número de análises por medidas para desenvolver um método capaz de trabalhar com diferentes analitos ao mesmo tempo. Para isso, foi necessário a otimização do

layout dos eletrodos e do substrato utilizado para a construção dos dispositivos, buscando uma maior repetibilidade. Esse experimento foi realizado utilizando o fotodocumentador LAS 500 e ao μ Potenciostado μ Stat ECL Dropsens, como apresentado na parte experimental item 4.2.

Os materiais testados foram o poliéster, poliamida (laminado cobreado) e folha de PVC, como apresentado na FIGURA 5.5. Também foram testados diferentes *layouts*, variando o número de regiões sensoras. As variações e *layout* testados estão apresentados no apêndice. O PVC foi o material que apresentou menor desvio padrão relativo (DPR intra eletrodos de 9,9% e DPR entre eletrodos de 12%), considerando $n = 20$, sendo n o número de região sensoras, quando utilizado o sistema com fotodocumentador e como sonda a solução do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando TPA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4.



FIGURA 5.5- Materiais testados na construção dos dispositivos eletroquimiluminescente descartáveis.

Também foi estudado o tempo necessário de aplicação do potencial para obtenção das imagens durante a medida. Foi selecionado um tempo de registro para as imagens com intervalo mínimo de 10s (tempo mínimo de registro do equipamento). A partir deste tempo, o equipamento faz um somatório das imagens obtidas, aumentando a nitidez destas. Os tempos testados foram de 10 a 100 segundos. Foi observado (FIGURA 5.6) que a partir do tempo de 20s a emissão de luz, na concentração de solução do complexo de rutênio e TPA testadas, é tão alta que se inicia a saturação em alguns *spots* (imagens em

vermelho), não permitindo a utilização destas imagens para as análises quantitativas.

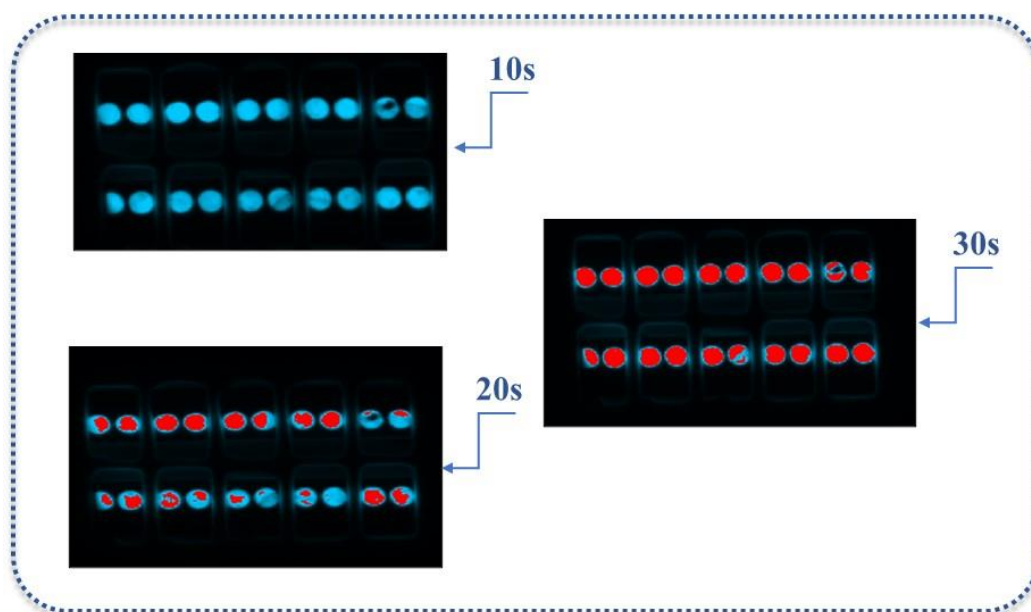


FIGURA 5.6- Imagens obtidas do fotodocumentador LAS 500 em intervalos de tempo 10s, 20s e 30s, utilizando solução de complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ em TPA 25 mM.

5.1.3. Caracterizações eletroquímicas dos eletrodos serigrafados

Os estudos de reprodutibilidade dos eletrodos serigrafados SPCE (do inglês, *screen-printed carbon electrode*) no substrato PVC foram realizados utilizando um eletrodo simples acoplado ao μ Potenciostato μ Stat ECL Dropsens. Utilizou-se como sonda redox o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, uma vez que este foi o marcador eletroquimiluminescente utilizado nos ensaios biológicos.

Foram analisadas a reprodutibilidade dos eletrodos por meio das medidas de corrente, obtendo um valor de DPR entre as células eletroquímicas variando de 6% a 3%, respectivamente. Para medida da corrente eletroquímica foi utilizada a técnica de voltametria cíclica, no qual foi analisada a intensidade do pico anódico do par redox Ru (II)/ (Ru (III), em torno de 1,0 V (FIGURA 5.7).

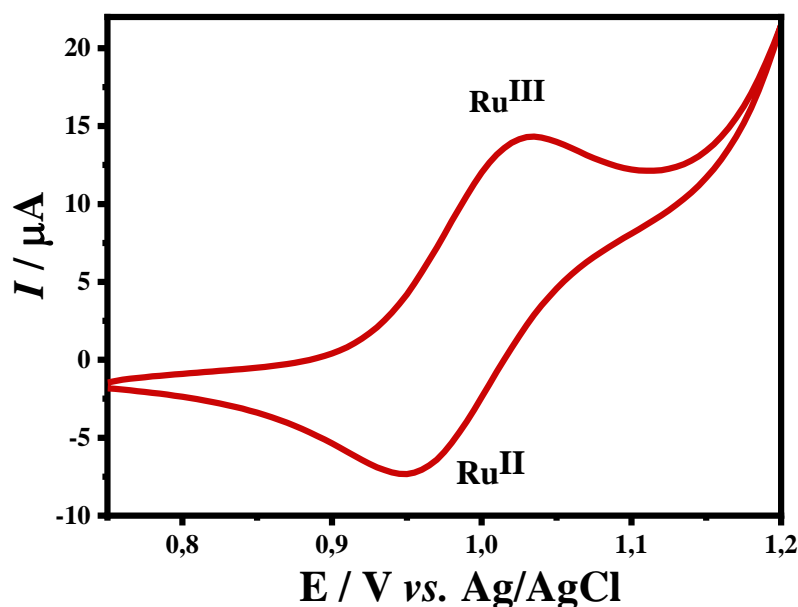


FIGURA 5.7- Perfil voltamétrico do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3] \text{Cl}_2$ na concentração $6,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4.

Para verificação da área eletroativa, foram realizados estudos de voltametria cíclica, usando uma solução de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3] \text{Cl}_2$ na concentração $6,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A FIGURA 5.8 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura para o SPCE, mostrando a variação da intensidade de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (i_p vs. $v^{1/2}$). Usando a equação de Randles-Sevcik⁸⁰, a área eletroativa de superfície foi estimada e comparada com a área geométrica da superfície do eletrodo ($3,14 \text{ mm}^2$). A área de superfície eletroativa obtida foi de $3,0 \text{ mm}^2$ para o eletrodo de carbono sem modificação. Deve-se levar em conta que a tinta de carbono possui uma quantidade significativa de material polimérico em sua composição e que é não condutor.

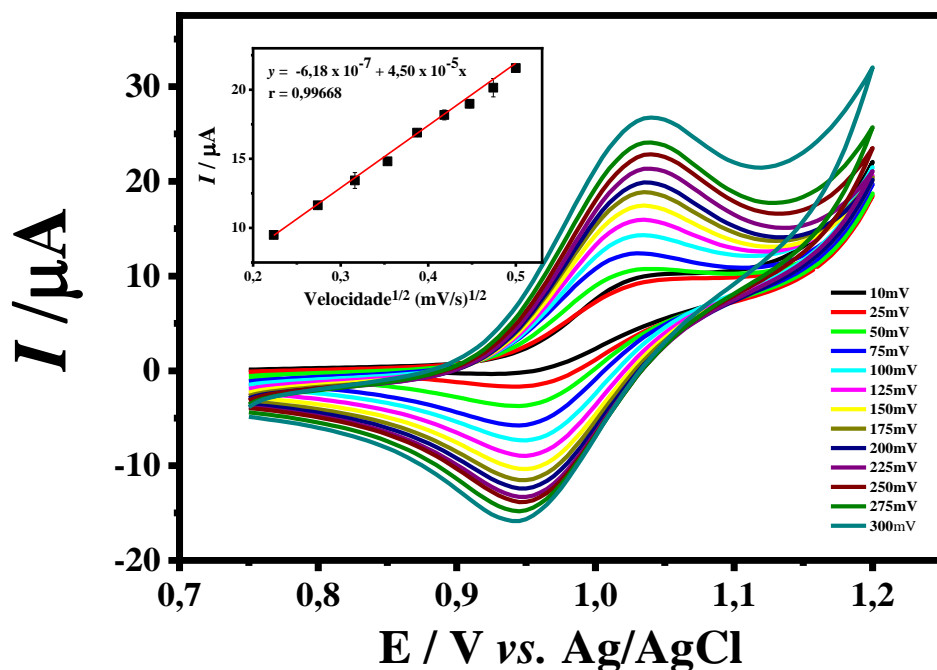


FIGURA 5.8- Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos de carbono SPCE, em diferentes velocidades de varredura na presença de [Ru(bpy)₃]Cl₂ na concentração $6,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4. Inserção nos gráficos: variação da i_p vs. $v^{1/2}$ dos eletrodos.

5.2. Caracterização das nanopartículas utilizadas no ensaio eletroquimiluminescente

5.2.1. Caracterização das NPs-Si-Ru

A síntese para formação das nanopartículas de sílica ancoradas com o complexo de [Ru(bpy)₃]²⁺, luminóforo, foi realizada pelo método de microemulsão água e óleo. Assim, o Triton X-100 foi utilizado como surfactante, o n-hexanol como co-surfactant, o ciclohexano como óleo, o ortossilicato de tetraetila (TOES) como precursor de sílica e o hidróxido de amônia como catalisador. A hidrólise controlada do TOES na microemulsão leva à formação de nanopartículas monodispersas, que favorece a ancoragem no complexo de rutênio no interior das cavidades da sílica^{73,81}.

O luminóforo é ancorado às nanopartículas em três etapas: primeiramente é solubilizado em água, depois o precursor de silicato forma o envoltório e por último ocorre a remoção do surfactante. A baixa polaridade do meio reacional da microemulsão permite que as partículas do luminóforo se agreguem enquanto a rede de sílica é formada. Por meio da interação eletrostática entre o complexo, carregado positivamente, e a sílica carregada negativamente, o luminóforo pode ser efetivamente aprisionado dentro das partículas de sílica. Portanto, os luminóforos são ancorados dentro das nanopartículas, de modo que a superfície das partículas pode ser usada para imobilizar covalentemente as biomoléculas. Além disso, os luminóforos são bem protegidos do oxigênio dissolvido quando encapsuladas na rede da nanopartícula de sílica. Esse método permite a conjugação de biomoléculas com os luminóforos, opticamente estáveis, que de outra forma não são possíveis para ligações diretas com biomoléculas^{73,81}.

As nanopartículas obtidas por meio desta síntese, foram caracterizadas pelas técnicas de espectrometria molecular na região do UV-visível (UV-vis), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia por dispersão de energia (EDX).

As técnicas de microscopia eletrônica são amplamente utilizadas na caracterização e investigação da microestrutural de materiais importantes, principalmente por se tratar de uma análise rápida⁸². Dessa forma, as técnicas de microscopia eletrônica foram utilizadas na análise qualitativa das NP-Si-Ru sintetizadas nesse trabalho.

Conforme as imagens obtidas pela técnica MET, na FIGURA 5.9, as nanopartículas de sílica com o luminóforo apresentaram-se uniformes, com diâmetro médio de 54 nm. Observa-se também o gráfico de mapeamento por EDX, que permitiu a identificação e confirmação dos elementos presentes como: sílica e rutênio, além de carbono e nitrogênio presentes na constituição dos ligantes bipyridínicos do complexo.

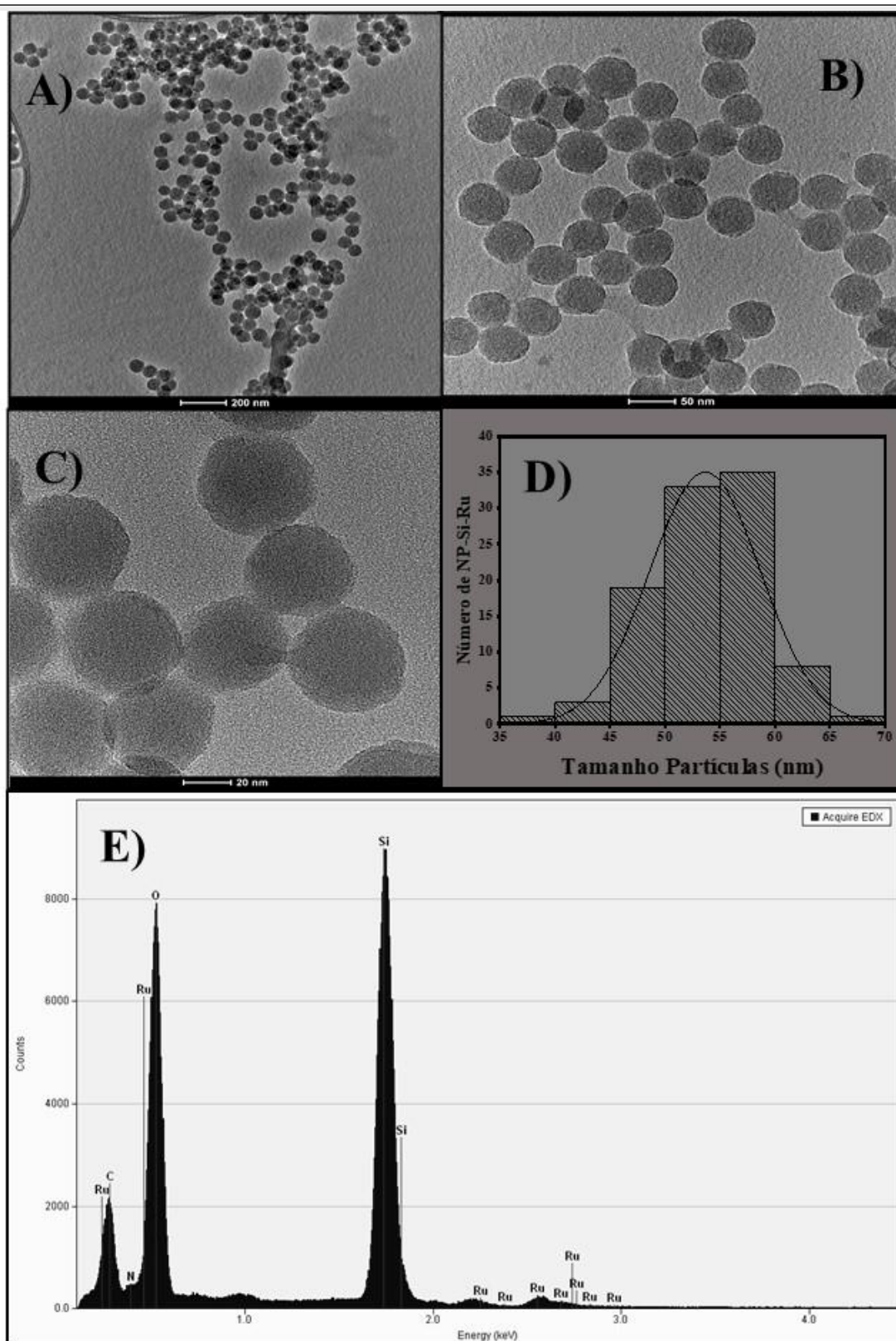


FIGURA 5.9- Imagem de MET das nanopartículas de sílicas dopadas com complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ em A) 200 nm, B) 50 nm e C) 20nm. D) Gráfico de distribuição de tamanho das nanopartículas. E) Mapeamentos dos elementos presentes nas NPs-Si-Ru.

A espectroscopia UV-Vis pode ser utilizada para avaliar diferentes espécies moleculares que absorvem na radiação ultravioleta e visível, podendo ser empregada para análises quantitativas e qualitativas⁸³. Sendo assim, esta técnica foi utilizada para caracterizar e determinar a quantidade do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ presente nas partículas de sílica.

A FIGURA 5.10 apresenta o espectro de absorbância de uma solução preparada do composto NPs-Si-Ru na concentração de $0,083 \text{ mg mL}^{-1}$. Pode-se observar duas bandas característica do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, uma em 289 nm referente a banda de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bipyridínicos, e outra banda em 457 nm referente a transição de carga metal ligante (TCML) das órbitas $d\pi \rightarrow \pi^*$ ⁷⁸.

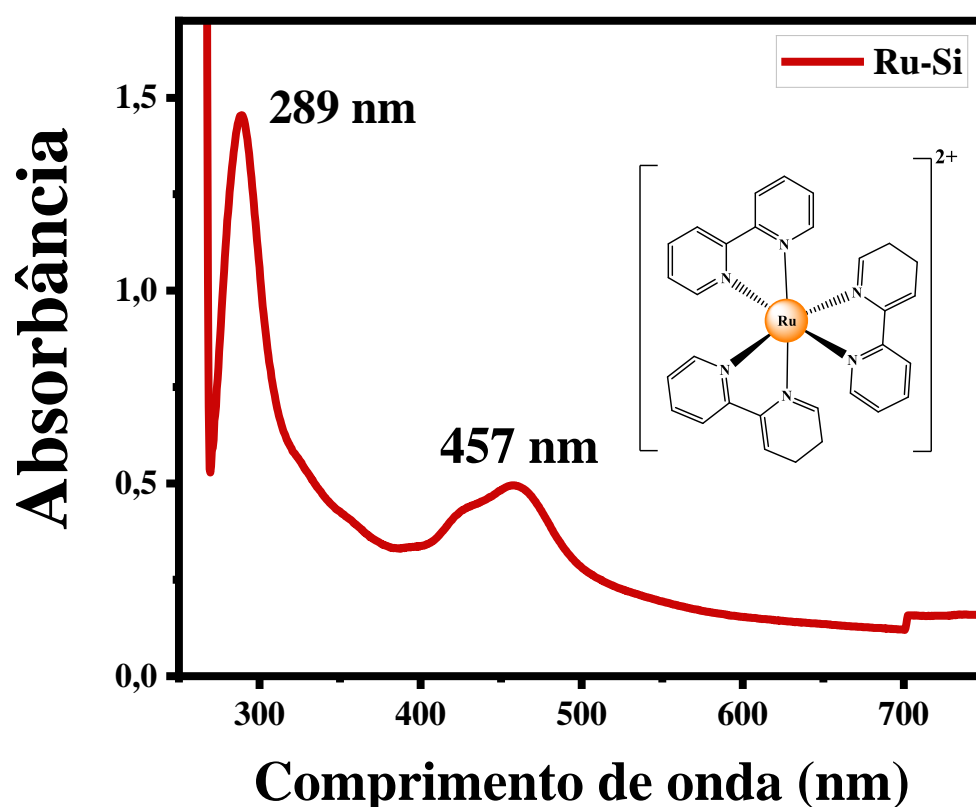


FIGURA 5.10- Espectro de absorbância obtido de uma dispersão aquosa das nanopartículas NPs-Ru-Si na concentração de $0,083 \text{ mg mL}^{-1}$.

Utilizando a Lei de *Lambert Beer* ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) é possível calcular aproximadamente a concentração de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ presente nas nanopartículas de sílica. Para tal, utilizou-se a absorvância no comprimento de onda de 457 nm, que é igual a 0,500 e a absorvidade molar (ϵ) do complexo igual a $14163 \text{ cm}^{-1}/\text{M}$ ⁸⁴. Dessa forma, obteve-se uma concentração aproximada de $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para o complexo.

Considerando-se a massa molar de Tris-(2,2-bipiridina) diclororutênio (II) hexahidratado é $748,62 \text{ g mol}^{-1}$, foi possível estimar que a concentração de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ nas nanopartículas NPs-Ru-Si era de $0,02695 \text{ mg mL}^{-1}$, o que corresponde a 32,5% m/m (complexo rutênio/nanopartículas).

5.2.2. Caracterização da sonda de detecção NPs-Si-Ru-dDNA

De posse das nanopartículas NPs-Si-Ru sintetizadas e caracterizadas, estas foram modificadas covalentemente com sondas de *d*DNA de detecção, visando a aplicação para detecção do RNA viral. As NPs-Si-Ru foram modificadas com PDDA e PAA conforme descrito por Kadimisetty e colaboradores⁸⁵. Esta modificação leva a formação de uma bicamada baseada em interações eletrostáticas entre a sílica, (carregada negativamente), o PDDA (carregado positivamente) e o PAA (carregado negativamente), FIGURA 5.11. A camada externa, composta de PAA, possui grupos carboxílicos disponíveis que são ativados pela reação com EDC/NHS, permitindo que estes se liguem covalentemente aos grupos amina presentes nas sondas de *d*DNA, formando uma amida. O EDC é responsável pela formação de um intermediário instável, enquanto NHS ajuda na solubilização do EDC em água e formação de um intermediário mais estável⁸⁶.

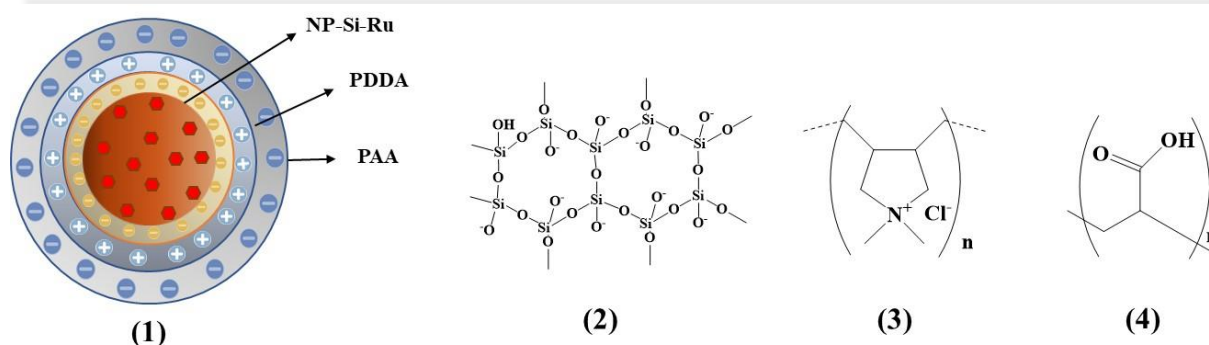


FIGURA 5.11- (1) Representação da modificação das nanopartículas NPs-Si-Ru com PDDA e PPA. Estruturas químicas das (2) nanopartículas de sílica, (3) PDDA e (4) PAA.

Buscando verificar a eficiência da conjugação das NP-Si-Ru com a sonda de *d*DNA para formação da sonda de detecção, foi realizada a caracterização por espectroscopia de UV-visível. Assim, foram comparados os espectros de absorção da sonda de *d*DNA, da NPs-Si-Ru e da conjugação final NPs- Si-Ru-*d*DNA. Os espectros de absorção são apresentados na FIGURA 5.12.

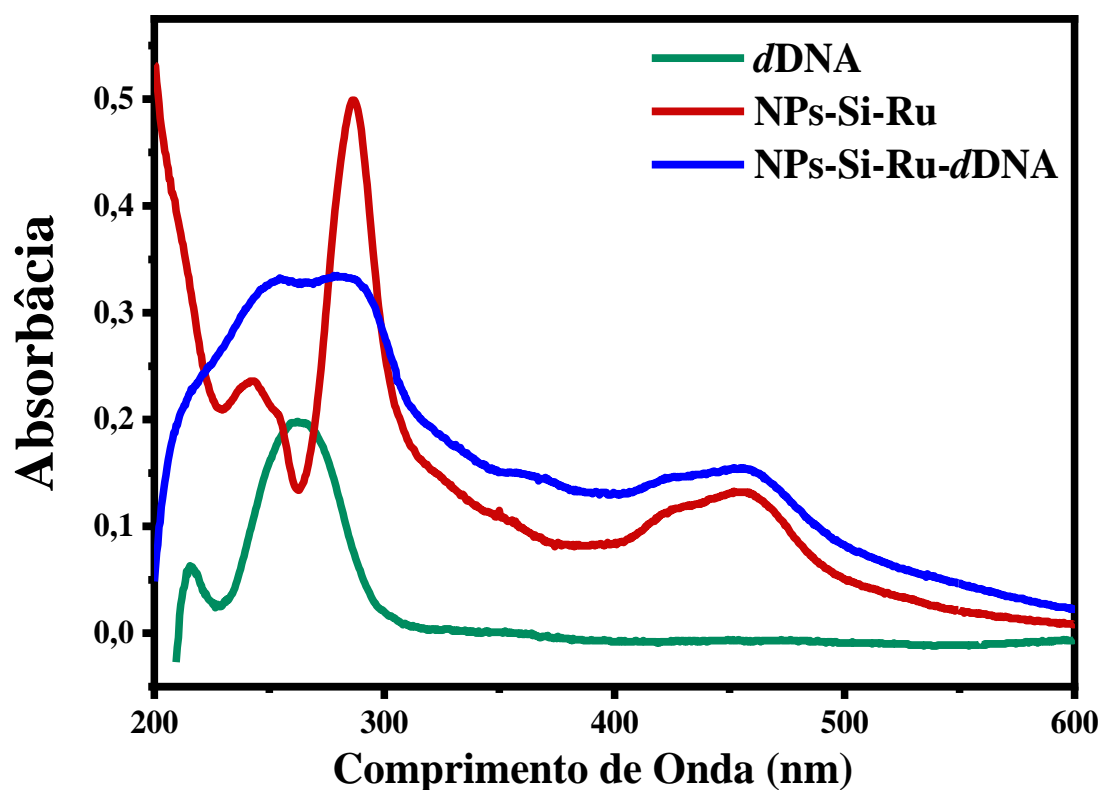


FIGURA 5.12- Espectros de absorção na região do UV-vis, para: a sonda dDNA (verde), as nanopartículas NPs-Si-Ru (vermelho) e a sonda de detecção NPs-Si-Ru-dDNA (azul) na concentração de 5 μ M em solução de tampão TE 1 mM, pH 7,6.

Analisando os espectros de absorção apresentados, pode-se observar a banda de absorção máxima (do espectro em verde), característica do dDNA em torno de 260 nm que são atribuídas as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações duplas das bases nitrogenadas que constituem o DNA. No espectro do das NPs-Si-Ru (vermelho), tem-se as duas bandas características, uma em 289 nm referente a banda de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bipyridínicos e outra banda em 457 nm referente a transição de carga metal ligante (TCML) das órbitas $d\pi \rightarrow \pi^*$. Já no espectro de absorção da sonda de captura formada, NPs-Si-Ru-dDNA (azul), é possível observar o alargamento da banda em torno de 260 nm e permanência da banda em torno de 457 nm, o que sugere um resultado positivo na formação da sonda de captura, através da ligação covalente entre o dDNA e as NPs-Si-Ru⁷⁸.

5.3. Otimização do ensaio genomagnético

5.3.1. Estudo das condições de hibridização das sequências de DNA

Biossensores que utilizam em sua constituição material genético como DNA e RNA são denominados genossensores. Em contrapartida, quando se utiliza partículas magnéticas (PMs) para separação, captura e/ou detecção no desenvolvimento de um genossensor, estes são denominados genomagnéticos^{45,46,87,88}. Portanto, o método desenvolvido neste trabalho é baseado em um ensaio genomagnético, uma vez que utiliza DNA juntamente com PMs. Sendo assim, uma vez caracterizado os eletrodos e a sonda de detecção que serão utilizadas no desenvolvimento do método de ECL, deu-se início a otimização do ensaio genomagnético proposto. Para a otimização do método, utilizou-se amostras de saliva (20 μ L) fortificadas com o alvo (500 pM), que são

fitas simples de *s*DNA com sequência similar à do RNA alvo. A escolha por se trabalhar com fita simples de DNA na otimização do método é devido ao DNA ser uma molécula mais estável que o RNA. Essa diferença na estabilidade se dá pela presença de um grupo hidroxila no açúcar pentose do RNA que não está presente na estrutura do DNA. Esse grupo favorece reações de hidrólise, fazendo com que o DNA seja cerca de 100 vezes mais estável que o RNA⁴²⁻⁴⁴. As sondas utilizadas possuem sequências de nucleotídeos correspondentes às da região 1A e 2A do RNA do vírus SARS-CoV-2, que neste trabalho serão denominadas de sonda 1A e sonda 2A, respectivamente.

Na hibridização ocorre o pareamento das bases nitrogenadas complementares do DNA/RNA. No método proposto, esse pareamento ocorre entre a sonda de captura e o alvo, e a sonda de detecção e o alvo. Vários fatores podem influenciar no processo de hibridização tais como temperatura, pH, concentração de sais e presença de solventes orgânicos⁸⁹.

A composição do tampão de hibridização é crítica para controlar a eficiência do processo. Durante a etapa de incubação para hibridização das sondas com o alvo 1A e 2A utilizou-se o tampão NE1x (pH 7.9, 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol L⁻¹ DTT). Muitos protocolos de biologia molecular usam tampões baseados em Tris. Devido este possuir uma boa capacidade tamponante na faixa de pH de interesse para aplicações biológicas (pKa 8,1 a 25 °C) e não alterar a hibridização^{90,91}. A presença dos íons metálicos em soluções, como os íons Na⁺ e Mg²⁺, neutralizam as cargas negativas e diminuem a repulsão eletrostática, uma vez que os ácidos nucleicos são moléculas polianiónicas altamente carregadas. Esse fato aumenta a flexibilidade da fita de DNA e, conseqüentemente, auxilia o processo de hibridização^{92,93,94}. Sendo assim, o tampão NE foi definido como a melhor escolha para a realização do ensaio de hibridização.

Como o ensaio proposto é realizado em temperatura ambiente, foi adicionado na composição do tampão de hibridização o DTT. Este composto

possui a propriedade de reduzir a estabilidade térmica das ligações, permitindo que a hibridização seja realizada em temperatura ambiente^{95,96}.

Outro procedimento para melhorar a eficiência da hibridização foi a utilização de agentes bloqueadores de ligações não específicas, podendo contribuir para o aumento das relações sinal/ruído e sinal/branco. Por conseguinte, foram testados dois agentes bloqueadores, a BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) e DNA de esperma de salmão^{97,98}, sendo avaliados de forma comparativa visando a diminuição do branco e o aumento do sinal analítico.

Quatro condições diferentes foram analisadas, buscando avaliar qual o melhor para a hibridização do DNA alvo com as sondas de captura e detecção, e melhor diferenciação do sinal/branco. As condições avaliadas estão apresentadas na TABELA 5.1, e o ensaio foi realizado seguindo o protocolo descrito na parte experimental 4.10, sendo que na solução tampão foram adicionadas as concentrações de BSA e DNA de salmão.

TABELA 5.1- Condições avaliadas para o ensaio de hibridização

Tampão	Bloqueador	Condições
NE	-	(1)
NE	100 µg/mL de DNA de Salmão	(2)
NE	1% BSA	(3)
NE	100 µg/mL DNA de Salmão + 1% BSA	(4)

Os resultados obtidos com este estudo são mostrados no gráfico, FIGURA 5.13, sendo o experimento realizado em triplicata. Observa-se que a intensidade de sinal de ECL sofre redução ou não há diferenciação significativa quando comparado o sinal do branco com DNA alvo, utilizando o DNA de esperma de salmão ou BSA. Alguns estudos mostram que o uso de alguns bloqueadores ou detergente pode diminuir a intensidade do sinal de ECL, uma vez

que podem tornar o meio mais hidrofílico dificultando as reações de transferência de carga entre a TPA e o complexo de rutênio⁹⁹.

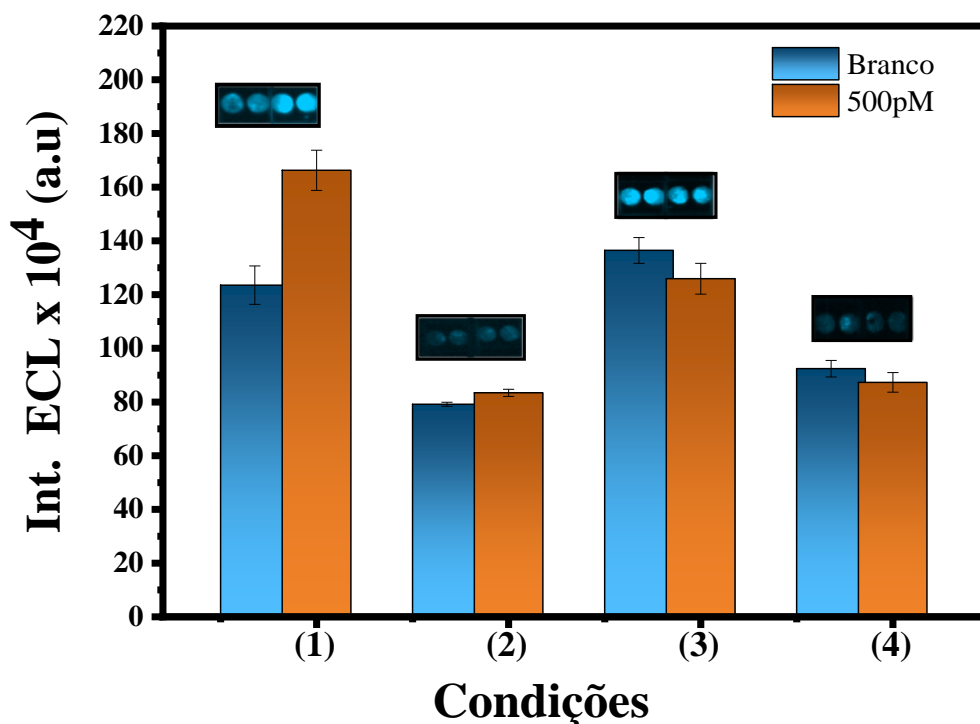


FIGURA 5.13- Gráfico de barras da amostra do branco e DNA alvo na concentração de 500 pmol L⁻¹. Para cada estudo são apresentadas as imagens obtidas com o fotodocumentador para a avaliação do melhor meio a ser utilizado no ensaio de hibridização: (1) Tampão NE 1x; (2) Tampão NE 1x + 1% de BSA; (3) Tampão NE 1x + DNA de salmão; (4) Tampão NE 1x + 1% de BSA + DNA de salmão.

A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que a melhor condição para que ocorra a hibridização das sondas de detecção e captura é aquele contendo apenas tampão NE 1x e saliva. Visto que, além de se obter um sinal de melhor intensidade de ECL, é também a condição no qual se consegue uma melhor diferenciação entre a intensidade do sinal do branco em relação a intensidade de sinal do DNA alvo. É interessante mencionar que o alto valor de intensidade do sinal do branco (S_b) observado, pode ser explicado pela possível adsorção da sonda de detecção nas PMs durante a etapa de incubação, já que as

PMs possuem uma área superficial grande (1 μm de diâmetro) em relação as nanopartículas de sílica (100 nm de diâmetro). Apesar das etapas de lavagem, não foi possível diminuir a intensidade de S_b . Para trabalhos futuros é interessante estudar outros tipos de bloqueadores e condições que possam minimizar a intensidade do sinal do branco.

5.3.2. Estudo da repetibilidade do ensaio

Avaliou-se a repetibilidade do ensaio de hibridização nas superfícies dos eletrodos. Para isso, foi selecionado uma concentração de 5 nmol L^{-1} de DNA alvo, realizado o ensaio de hibridização descrito na parte experimental e em seguida foi realizada as medidas de intensidade de ECL com o fotodocumentador. A FIGURA 5.14 mostra a imagem obtida após 100 s de aplicação de potencial. É importante mencionar que durante o estudo de otimização dos eletrodos, as imagens eram obtidas em intervalos de tempo de 10 s devido à alta concentração de sonda utilizada. Quando se realizou o ensaio de hibridização, as concentrações de sonda são mais baixas, por isso é necessário um acúmulo das imagens até o tempo de 100 s para uma maior nitidez e avaliação coerente.

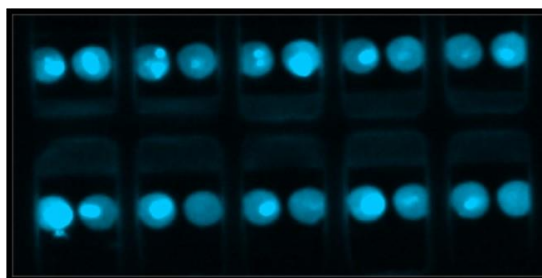


FIGURA 5.14- Imagem de emissão de ECL obtida com o fotodocumentador para o estudo da repetibilidade do ensaio de hibridização.

No dispositivo confeccionado, a área é delimitada por duas regiões sensoras. Cada uma dessas regiões representa um ensaio de hibridização, portanto temos 10 ensaios diferentes sendo realizados simultaneamente. O DPR médio foi

9,04%, em um arranjo com 20 regiões sensoras ($n = 20$), demonstrando uma boa precisão intra-dispositivo.

5.3.3. Estudo das etapas de incubação necessária para hibridização com o alvo

Visando a eficiência do processo de hibridização do alvo com as sondas de captura e detecção, foram avaliadas duas formas diferentes de incubação. A primeira foi realizada em uma única etapa, incubando as sondas de captura e detecção juntamente com o alvo. Ou seja, ao mesmo tempo adicionar sonda de captura (5 μ L) e sonda de detecção (5 μ L) na saliva fortificada e mantendo um tempo de incubação de 30 minutos. A segunda foi realizada em duas etapas inicialmente adicionou-se a sonda de captura (5 μ L) na saliva fortificada, deixando por 30 minutos. Após este tempo, procedeu-se com a lavagem, seguida da adição da sonda de detecção (5 μ L) e incubou-se novamente por 30 minutos, seguido de nova lavagem. Neste processo, o tempo total de incubação foi de aproximadamente 1 hora.

Os dados obtidos nesse estudo são apresentados no gráfico de barras (FIGURA 5.15), esse experimento foi realizado em triplicata. Observa-se que a adição das sondas de captura e detecção em uma única etapa de incubação, gerou uma resposta com maior intensidade de ECL e uma melhor diferenciação do sinal do branco, o que sugere uma maior eficiência na hibridização. Deste modo, este procedimento foi escolhido para a continuidade dos estudos.

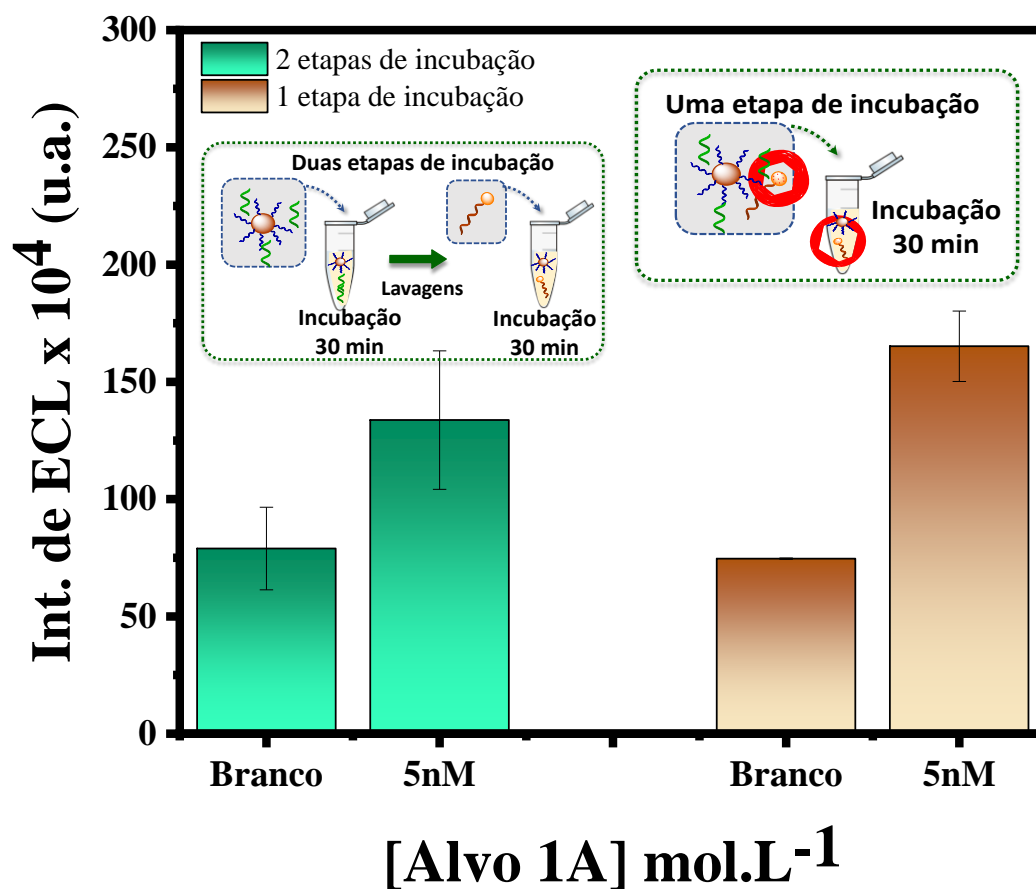


FIGURA 5.15- Gráfico de barras da avaliação do método de incubação: Incubação da sonda de captura e detecção juntas (vermelho) e Incubação das sondas de captura e detecção separadas (amarelo).

Durante os processos de lavagem, sempre há uma pequena perda de PMs, devido à adição e retirada de solução, o que pode ser uma possível explicação para a menor intensidade de sinal na incubação em duas etapas. Além da maior intensidade do sinal, a incubação em uma única etapa é mais vantajosa, quando busca-se um menor tempo para o ensaio, o que pode aumentar frequência analítica.

5.3.4. Caracterização do Biconjugado PMS-cDNA/NP-Si-Ru-dDNA

Para confirmação que o processo de hibridização foi efetivo, o bioconjugado obtido após a realização do ensaio, foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET). O bioconjugado formado pelas PMS-cDNA juntamente com NP-Si-Ru-dDNA é apresentado nas imagens de MET na FIGURA 5.16.

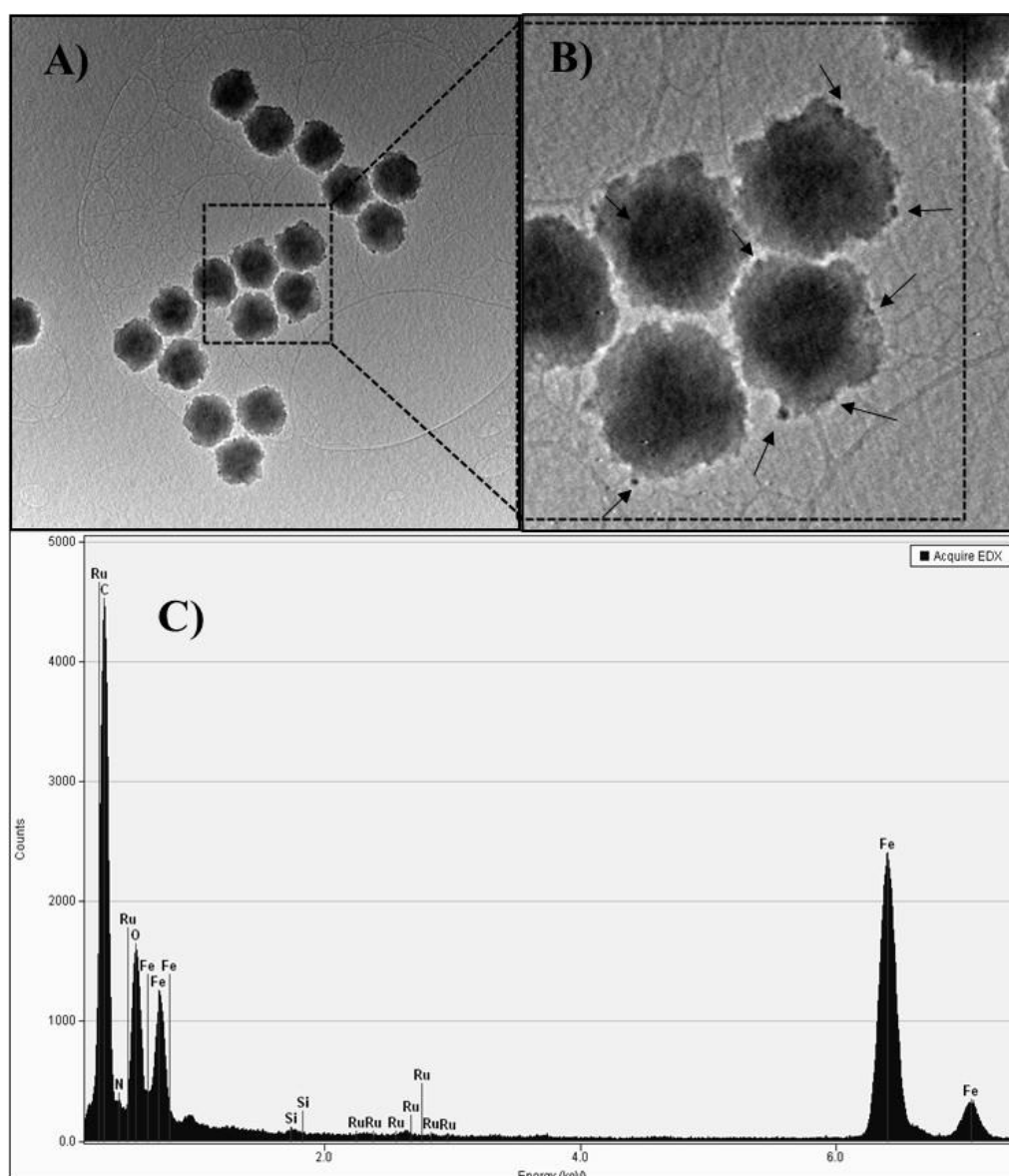


FIGURA 5.16- Imagens de TEM das PMS-cDNA juntamente com NP-Si-Ru-dDNA após ensaio de hibridização: **A)** a 2 μ m e **B)** Amplificação da imagem. **C)** Mapeamento por EDX do bioconjugado PMS-cDNA/ NP-Si-Ru-dDNA.

Analisando as imagens, podemos observar em torno das PMs (esferas maiores) pequenos sinais de coloração mais escura, que são as esferas de NP-Si-Ru-*d*DNA (100 nm), indicadas pelas setas na FIGURA 5.16B. Para confirmação desta hipótese, foi realizado a caracterização por EDX, buscando a identificação dos elementos presentes após o ensaio genômico e a formação do bioconjugado. A FIGURA 5.16C apresenta o mapa com os picos dos elementos encontrados, onde pode-se observar a presença dos elementos rutênio, sílica, ferro, carbono e nitrogênio, confirmando a efetividade do ensaio.

5.3.5. Desempenho analítico do ensaio genômico

Para a avaliação do desempenho analítico do ensaio foram construídas curvas analíticas com o *s*DNA alvo sintético, tanto para a sequência alvo 1A quanto para a sequência alvo 2A. A FIGURA 5.17 apresenta as diferentes concentrações avaliadas do alvo 1A. O valor do branco foi subtraído dos resultados obtidos. O método desenvolvido apresentou resposta linear na faixa ampla de concentração entre 5,0 fmol L⁻¹ a 5,0 nmol L⁻¹. A equação, obtida via regressão linear, pode ser expressa por $ECL = 1,37 \times 10^6 + 4,63 \times 10^5 \log [1A]$ (pmol L⁻¹) com um coeficiente de correlação (*r*) de 0,999. Este coeficiente indica uma boa correlação linear entre a resposta de intensidade de ECL e concentração de DNA alvo com sequência similar a região 1A do vírus SARS-CoV-2. O limite de detecção (LD) foi considerado como o primeiro ponto da região linear¹⁰⁰ sendo este de 5,0 fmol L⁻¹.

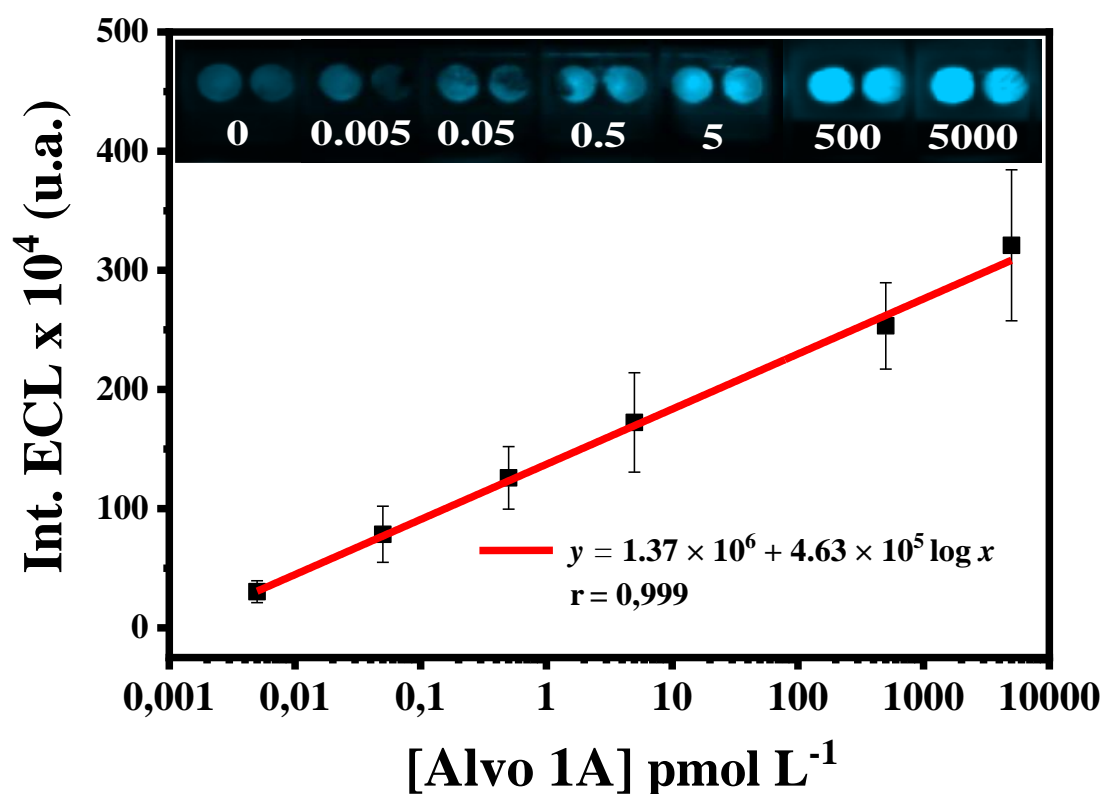


FIGURA 5.17- Curva analítica obtida para o DNA alvo contendo sequência similar a região 1A do RNA do vírus SARS-CoV-2 obtida utilizando o genomagneto ensaio proposto ($n=2$). Inserção: imagens obtidas pelo fotodocumentador.

De forma similar avaliou-se a resposta analítica para o alvo 2A, FIGURA 5.18. Novamente ampla faixa de concentração foi obtida, variando entre 5,0 fmol L⁻¹ a 5,0 nmol L⁻¹. A equação obtida pode ser expressa por $ECL = 8,7 \times 10^6 + 6,08 \times 10^5 \log [2A]$ (pmol L⁻¹) e com r de 0,975, indicando novamente uma boa correlação linear e o LD obtido foi igual ao do outro alvo de 5,0 fmol L⁻¹.

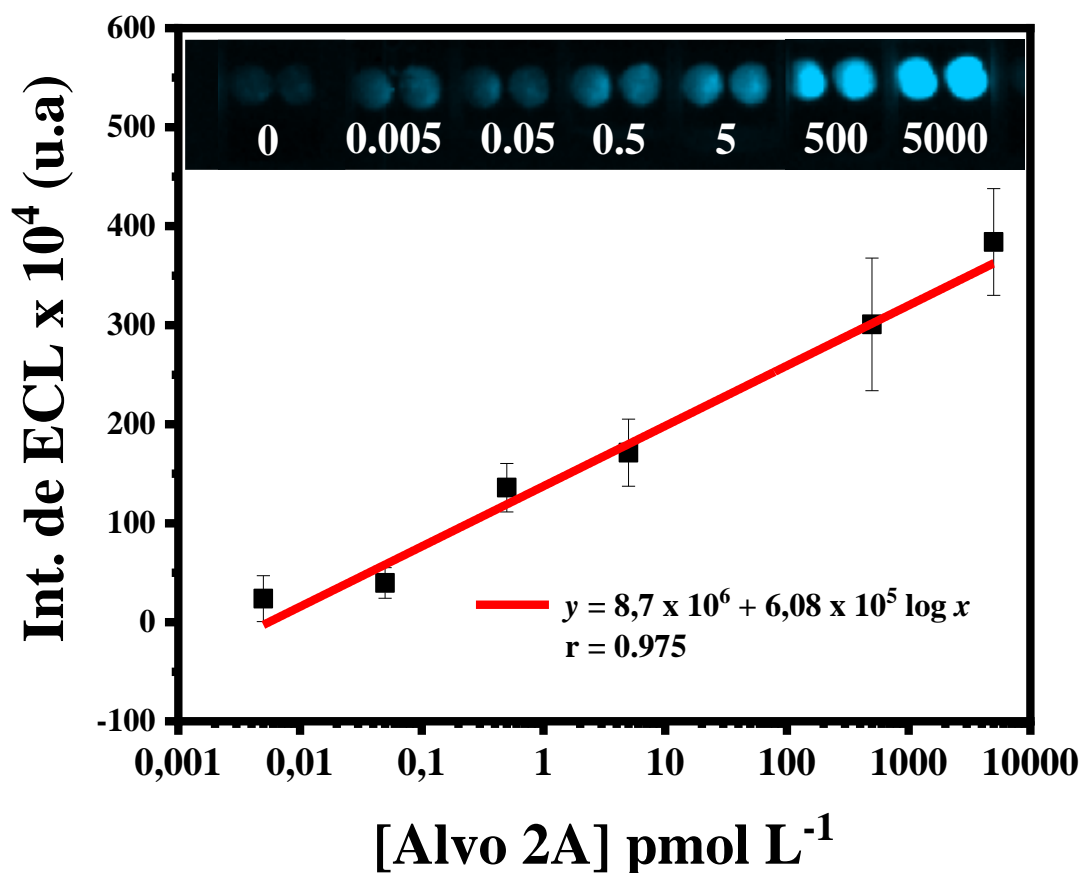


FIGURA 5.18- Curva analítica obtida para o DNA alvo contendo a sequência similar a região do gene 2A do RNA do vírus SARS-CoV-2 obtida através do método de ECL proposto ($n=2$). Inserção das imagens obtidas pelo fotodocumentador.

Após o estudo das sequências alvos 1A e 2A individualmente, foi avaliado o resultado da incorporação destes dois alvos simultaneamente em uma amostra de saliva no desempenho analítico do ensaio. Para isso, uma amostra de saliva de 20 μ L foi fortificada com a adição de 5 μ L de sonda de captura 1A e 5 μ L de sonda de captura 2A em 176 μ L de tampão NE 1x, 2 μ L do alvo 1 A e 2 μ L do alvo 1A. Na FIGURA 5.19 é apresentada uma representação esquemática das sondas de captura e detecção juntamente com o alvo.

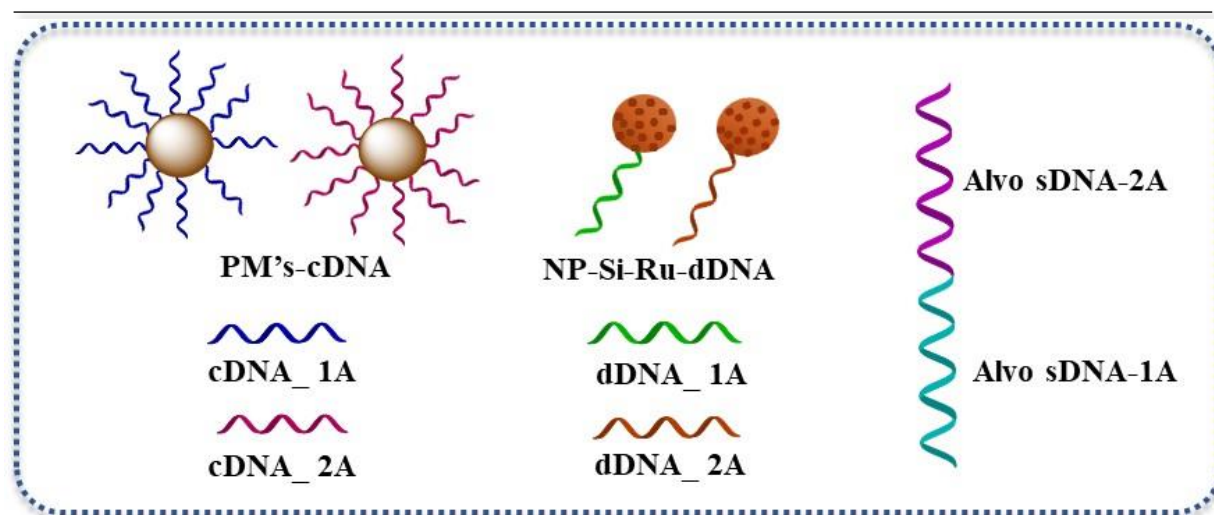


FIGURA 5.5.19- Representação esquemática das seqüências de DNA utilizadas como sondas de detecção e captura e com os alvos 1A e 2A utilizados no ensaio genomagnético.

No estudo foram analisadas diferentes concentrações contendo os alvos 1A e 2A em proporções iguais. O valor do branco está devidamente subtraído do resultado obtido. A curva analítica (FIGURA 5.20) apresentou resposta linear na faixa de concentração entre $5,0 \text{ fmol L}^{-1}$ a $5,0 \text{ nmol L}^{-1}$. A equação pode ser expressa por $ECL = 1,18 \times 10^7 + 3,02 \times 10^6 \log [1A + 2 A]$ (pmol L^{-1}) com r de 0,999 e LD de $5,0 \text{ fmol L}^{-1}$.

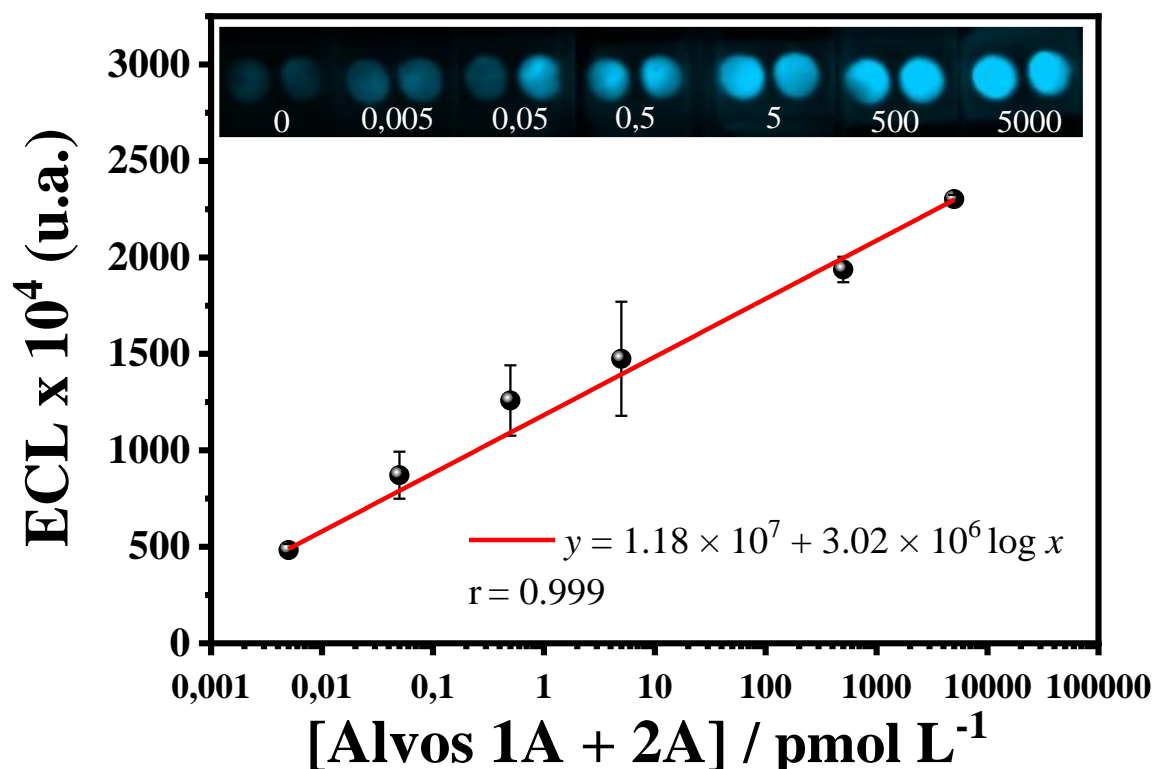


FIGURA 5.5.20- Curva analítica obtida para o DNA alvo contendo as sequências similares das regiões do gene 1A e 2A do RNA do vírus SARS-CoV-2, obtidas através do teste de ECL proposto ($n=2$). Inserção: imagens obtidas pelo fotodocumentador.

Analisando os resultados da FIGURA 5.20 é possível observar uma boa diferenciação nas imagens (inserção) obtidas pelo fotodocumentador nas diferentes concentrações de estudo. Há um aumento considerável nos valores da intensidade de ECL, observado no gráfico, e um aumento significativo no coeficiente angular. No entanto, este é um resultado esperado uma vez que as quantidades de sonda de detecção e captura tiveram suas concentrações duplicadas.

É importante mencionar que nas três curvas analíticas apresentadas verifica-se a boa precisão dos dispositivos, constatada pelas pequenas barras de erro. Esse fato mostra a boa capacidade do método desenvolvido em detectar concentrações muito baixas dos alvos 1A e/ou 2A, trazendo como benefício a

possibilidade de detecção de carga viral baixa do vírus SARS-CoV-2. Ou seja, a detecção correta pode acontecer tanto no início quanto no fim da infecção, possibilitando o isolamento correto do paciente e um melhor controle pandêmico.

5.4. Determinação do RNA viral do SARS-CoV-2 em amostras de saliva

Para este estudo, as amostras de saliva de indivíduos infectados com o SARS-CoV-2 foram analisadas e comparadas com amostras de saliva de indivíduos saudáveis. A princípio, as amostras de saliva passaram por tratamento térmico, como descrito na parte experimental item 4.4. Esta etapa foi realizada com objetivo de permitir a manipulação das amostras de forma segura, sendo o procedimento do ensaio realizado no laboratório de Biossegurança Nível 2. A maior parte das amostras testadas, possuem o teste de RT-PCR com resultado positivo ou negativos, para fins de comparação e avaliação da exatidão do método desenvolvido neste trabalho. Já outras amostras foram avaliadas com uso de testes rápidos de antígeno.

A avaliação do método proposto utilizando as coortes de amostras positivas e negativas foi realizada primeiramente avaliando a sequência de nucleotídeo do alvo 1A, a sequência de nucleotídeo do alvo 2A e por último as sequências alvos 1A e 2A simultaneamente no ensaio.

5.4.1. Avaliação da repetibilidade das amostras

Antes de dar continuidade, avaliou-se a estabilidade das amostras a serem utilizadas nos ensaios. Para isso, foram feitos estudos de repetibilidade, selecionando duas amostras classificadas como positivas e duas amostras classificadas como negativas. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando as sondas referente ao alvo 1A. Avaliou-se a repetibilidade dessas amostras em intervalos de 15 dias utilizando dispositivos diferentes. Na FIGURA 5.21A, podemos observar a variação da intensidade de ECL nos três dias avaliados, para

amostras positivas e negativas. Na FIGURA 5.21B, tem-se o gráfico apresentando a barra de erro durante os dias avaliados.

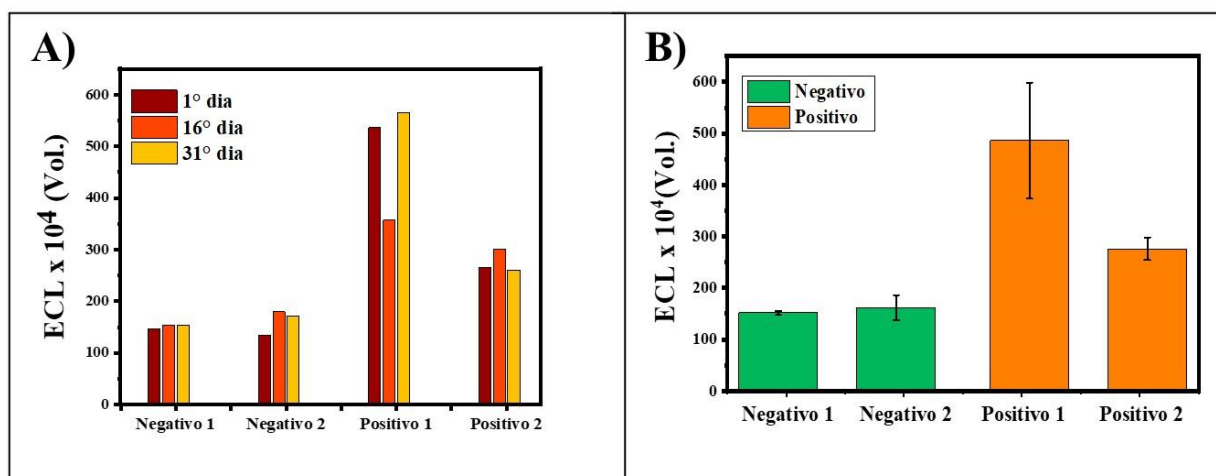


FIGURA 5.21- **A)** Avaliação da repetibilidade das amostras em dias diferentes e utilizando eletrodos diferentes; **B)** Apresentação da barras de erros para o estudo de repetibilidade.

Observou-se que as amostras apresentaram uma boa repetibilidade, com DPR de 3% e 15% para as amostras negativas e DPR 23% a 8% para as amostras positivas, sendo os valores aceitáveis em se tratando de amostras biológicas, que é considerado abaixo de 15%^{101,102}. O DPR de 23% para a amostra positivo 1, pode ser explicada pelas características da amostra, baixa estabilidade do RNA, efeitos do processamento manual do ensaio. Por estes motivos, optou-se por realizar a avaliação das amostras no máximo de 30 dias.

5.4.2. Avaliação do método para detecção da sequência alvo 1A

Após as etapas de realização do ensaio genômico, foram realizadas medidas de ECL das amostras (coorte 1) no fotodocumentador para o registro das imagens. A FIGURA 5.22 apresenta um exemplo do gráfico de barras juntamente com as imagens obtidas pelo fotodocumentador das respostas de intensidade de ECL obtidas em função da concentração de RNA do SARS-CoV-2. As amostras de saliva são referentes a coorte 1 compostas por 5 indivíduos

diagnosticados com COVID-19 (positivos), confirmados via técnica de RT-PCR, e 5 indivíduos saudáveis (negativos), para o alvo 1A.

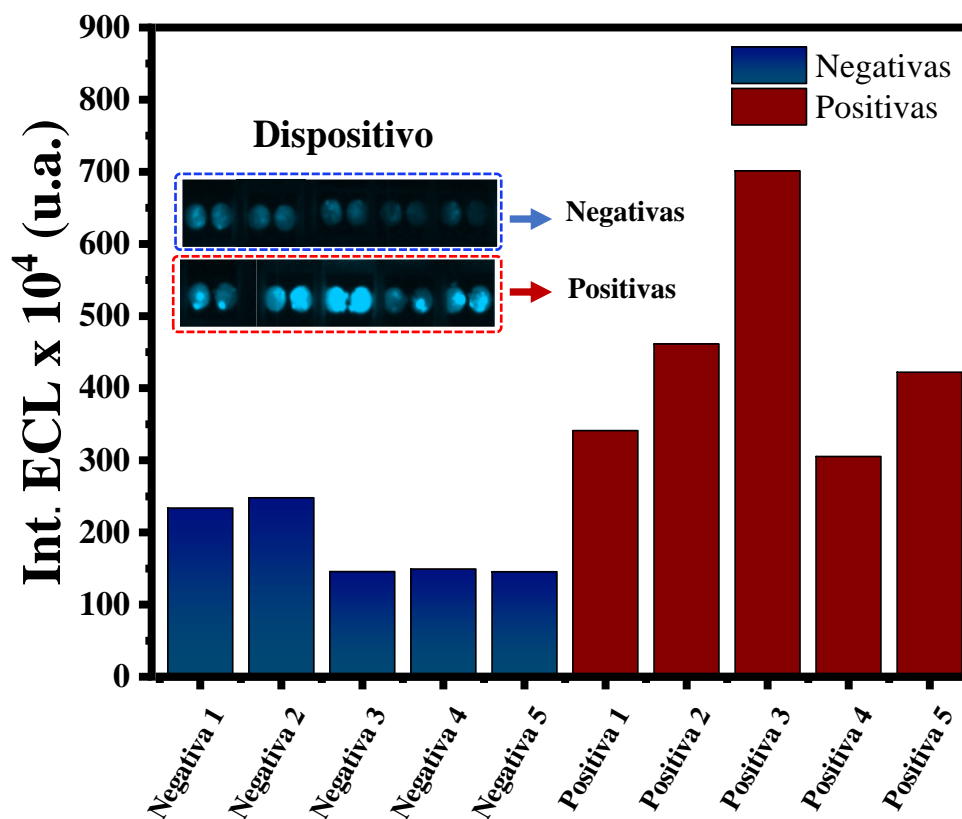


FIGURA 5.22- Gráfico de barras para as amostras positivas e negativas utilizando as sondas 1A. Inserção das imagens obtidas via fotodocumentador.

Analisando o gráfico, observa-se uma excelente diferenciação das amostras positivas frente as amostras negativas. Nas imagens obtidas pelo fotodocumentador verifica-se a diferença na intensidade de luz gerada, sendo que as positivas apresentam maior intensidade de luz que as negativas.

Ademais, foram testadas 80 amostras para o alvo 1A, sendo 40 amostras positivas e 40 amostras negativas. Para avaliar a sensibilidade e especificidade do método desenvolvido, foi construída a curva ROC que é utilizada como um importante meio de avaliar a capacidade do método para diagnóstico da COVID-19 (FIGURA 5.23).

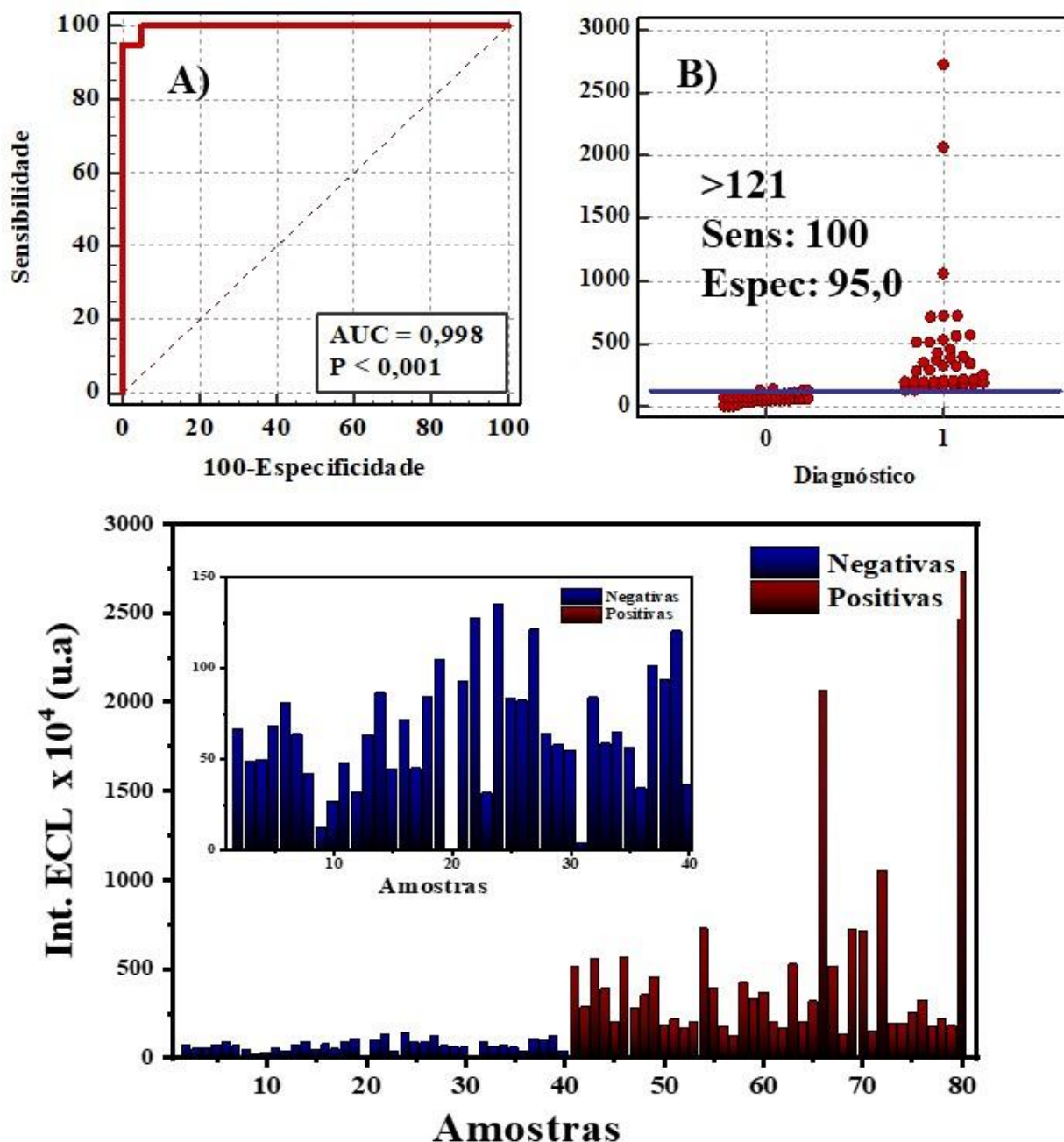


FIGURA 5.23- A) Curva ROC e B) Diagrama de pontos para a detecção do alvo 1A. Resposta para os pacientes diagnosticados com COVID-19 e indivíduos negativos. C) Gráfico de barras com todas as amostras testadas para detecção do do sequência 1A do vírus SARS-CoV-2. Inserção amplificação da região das amostras negativas.

Quando se trata da sensibilidade de um teste de diagnóstico, este reflete o percentual de resultados positivos entre as pessoas que possuem

determinada doença ou estado clínico. Já quando se fala de especificidade, este representa a aptidão do mesmo teste ser negativo para indivíduos que não apresentam a doença^{103,104}. Um método ideal seria aquele que apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, mas, na prática isso raramente acontece. Analisando a curva ROC juntamente com o diagrama de pontos da FIGURA 5.23, percebe-se que o genoensaio eletroquimiluminescente proposto alcançou 95% de sensibilidade e 100% de especificidade (ponto de corte $> 121 \times 10^4$).

O valor de AUC foi de 0,998, pode-se considerar que valores de AUC em torno de 0,5 sugere nenhuma discriminação (teste não consegue diferenciar pacientes com e sem a doença), valores entre 0,7 e 0,8 é considerável aceitável, de 0,8 a 0,9 é considerado bom, e AUC maior que 0,9 é considerado excelente. Assim, pode-se afirmar que o diagnóstico é realizado de maneira excelente.

Por fim, perscrutando todos os dados obtidos até o momento na validação do método para o alvo 1A, pode-se inferir que o método desenvolvido possui excelente capacidade de diferenciação entre as amostras positivas e negativas, esse resultado sugere um diagnóstico seguro quando avaliado para alvo 1A.

5.4.3. Avaliação do método para detecção da sequência alvo 2A

O mesmo estudo para avaliação do método foi realizado para o alvo 2A do vírus SARS-CoV-2. O gráfico em barras da FIGURA 5.24 apresenta a diferenciação das amostras positivas em relação as amostras negativas. A inserção das imagens obtidas via fotodocumentador mostra a diferença de intensidade luz entre as amostras.

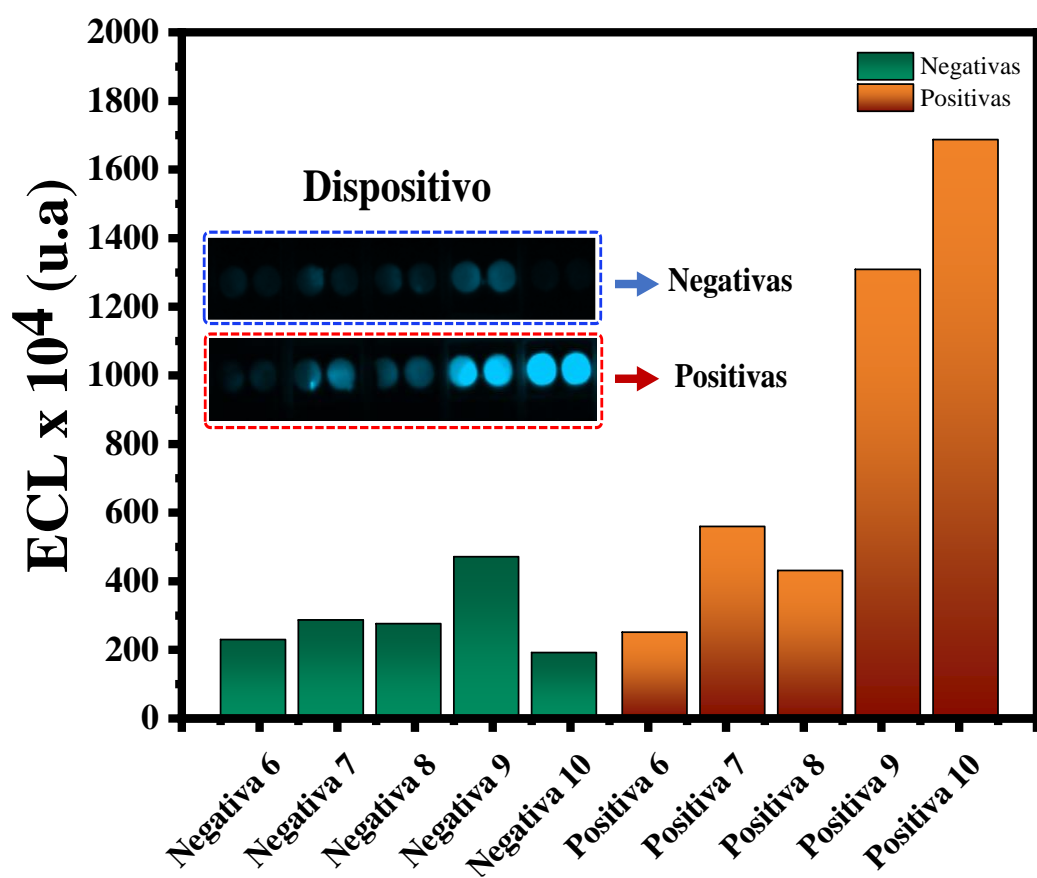


FIGURA 5.24- Gráfico de barras para as amostras positivas e negativas utilizando as sondas 2A. Inserção das imagens obtidas via fotodocumentador.

No total foram testadas 60 amostras para a sequência alvo 2A, sendo 30 amostras positivas e 30 amostras negativas. Essas amostras também foram avaliadas usando a curva ROC (FIGURA 5.25), sendo que os dados obtidos pela curva ROC juntamente com o diagrama de pontos mostra que o método alcançou 56,7% de sensibilidade e 100% de especificidade (ponto de corte $> 212 \times 10^4$), na diferenciação das amostras positivas e negativas. O valor de AUC foi de 0,794, sendo esse valor considerado aceitável para o diagnóstico utilizando o alvo 2A.

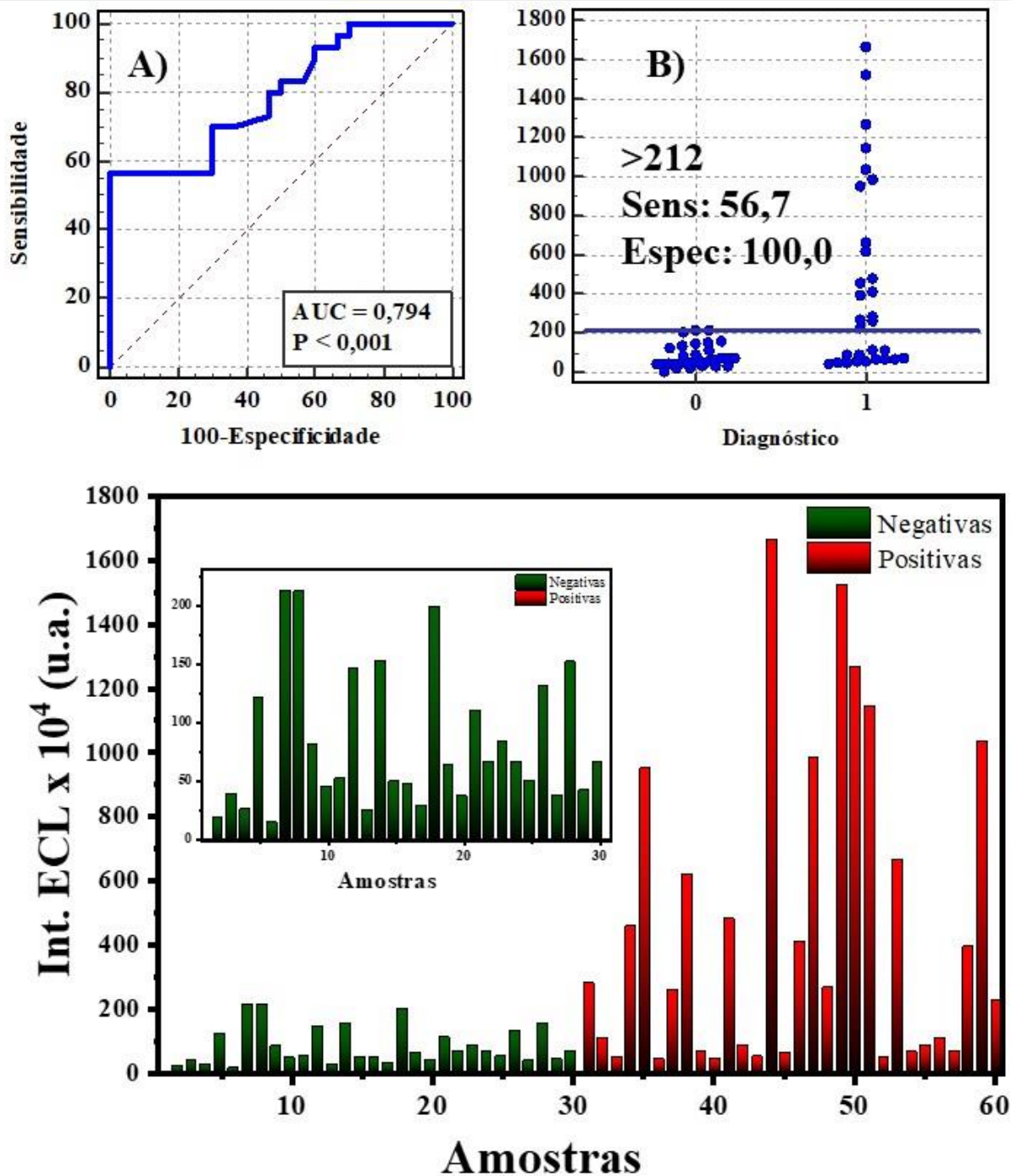


FIGURA 5.25- **A)** Curva ROC e **B)** Diagrama de pontos para a detecção do alvo 2A. Resposta para os indivíduos positivos vs indivíduos negativos. **C)** Gráfico de barras com todas as amostras testadas para detecção da sequência alvo 2A do vírus SARS-CoV-2, inserção amplificação da região das amostras negativas.

Analisando os dados obtidos, quando se trata do alvo 2A, pode-se concluir que quando comparada o alvo 1A os resultados são inferiores. O alvo 1A

possui uma maior sensibilidade do que o alvo 2A, o que gera uma menor confiabilidade do resultado de diagnóstico quando se utiliza este alvo.

Na busca de uma possível explicação para essa menor sensibilidade e diferenciação das amostras positivas e negativas, pode-se sugerir a diferença de tamanho e constituição entre essas duas sondas. Quando analisadas as estruturas dos ácidos nucleicos que constituem essas sondas, pode-se observar que a sonda de captura 1A é maior, possuindo 24 bases nitrogenadas, enquanto a sonda de captura 2A possui 21 bases nitrogenadas em sua constituição. Além disso, observa-se que a sonda 1A possui maior porcentagem de bases citosina e guanina em sua constituição do que a sonda de detecção 2A. Sabe-se que ligações C-G são mais fortes do que as ligações A-T ou A-U, uma vez que elas possuem três ligações de hidrogênio, enquanto as A-T ou A-U possuem apenas duas ligações de hidrogênio¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Portanto, essas diferenças sugerem uma possível explicação para a maior sensibilidade da sonda 1A em comparação a sonda 2A. Deste modo, o alvo 1A é mais confiável em se tratando de resultado de diagnóstico do que o alvo 2A, com base nos resultados do método proposto neste trabalho. É importante mencionar que os estudos mostrados anteriormente foram realizados na coorte 1, as amostras fornecidas pela IMT-USP.

5.4.4. Avaliação das sequências de nucleotídeos dos alvos 1A e 2A simultaneamente

Avaliadas a detecção do alvo 1A e 2A separadamente nas amostras de saliva positivas e negativas, buscou-se avaliar a detecção dos dois alvos simultaneamente no ensaio. Neste estudo foi utilizando duas coortes diferentes de amostras, a coorte 1 e a coorte 2. Esse fato permite uma amostragem mais ampla em condições diferentes de armazenamento e coleta, com isso podendo provar o método em diferentes condições de análises.

Para isto, foram testadas 50 amostras para a coorte 1, sendo 25 positivas e 25 negativas. Para a coorte 2, foram analisadas 50 amostras, sendo 25

positivas e 25 negativas. Assim, totalizou-se 100 amostras testadas para ensaio utilizando as sondas 1A e 2A simultaneamente.

Como mencionado na parte experimental, existem diferenças entre a coorte 1 e a coorte 2 em relação ao tempo de inativação das amostras, ao armazenamento e a quantidade de amostras de saliva coleta em cada tubo.

A FIGURA 5.26 apresenta a curva ROC, o diagrama de pontos e o gráfico de barras para as amostras testadas da coorte 1. Observando a curva *ROC* e o diagrama de pontos para a coorte 1 podemos notar que está possui um valor de AUC igual 0,808, considerado um valor bom. No entanto, o método apresenta uma sensibilidade de 60% e especificidade de 95% (valor de corte $> 537 \times 10^4$), o que não indica uma excelente diferenciação das amostras positivas e negativas. Portanto, o diagnóstico apresenta confiabilidade duvidosa. Quando se analisa o gráfico de barras (FIGURA 5.26C) para todas as amostras testada na coorte 1, observar-se uma alta intensidade de ECL e a menor diferenciação entre essas amostras, uma vez que é possível identificar um número considerável de amostras positivas com intensidade de sinal de ECL menos intenso que as amostras negativas.

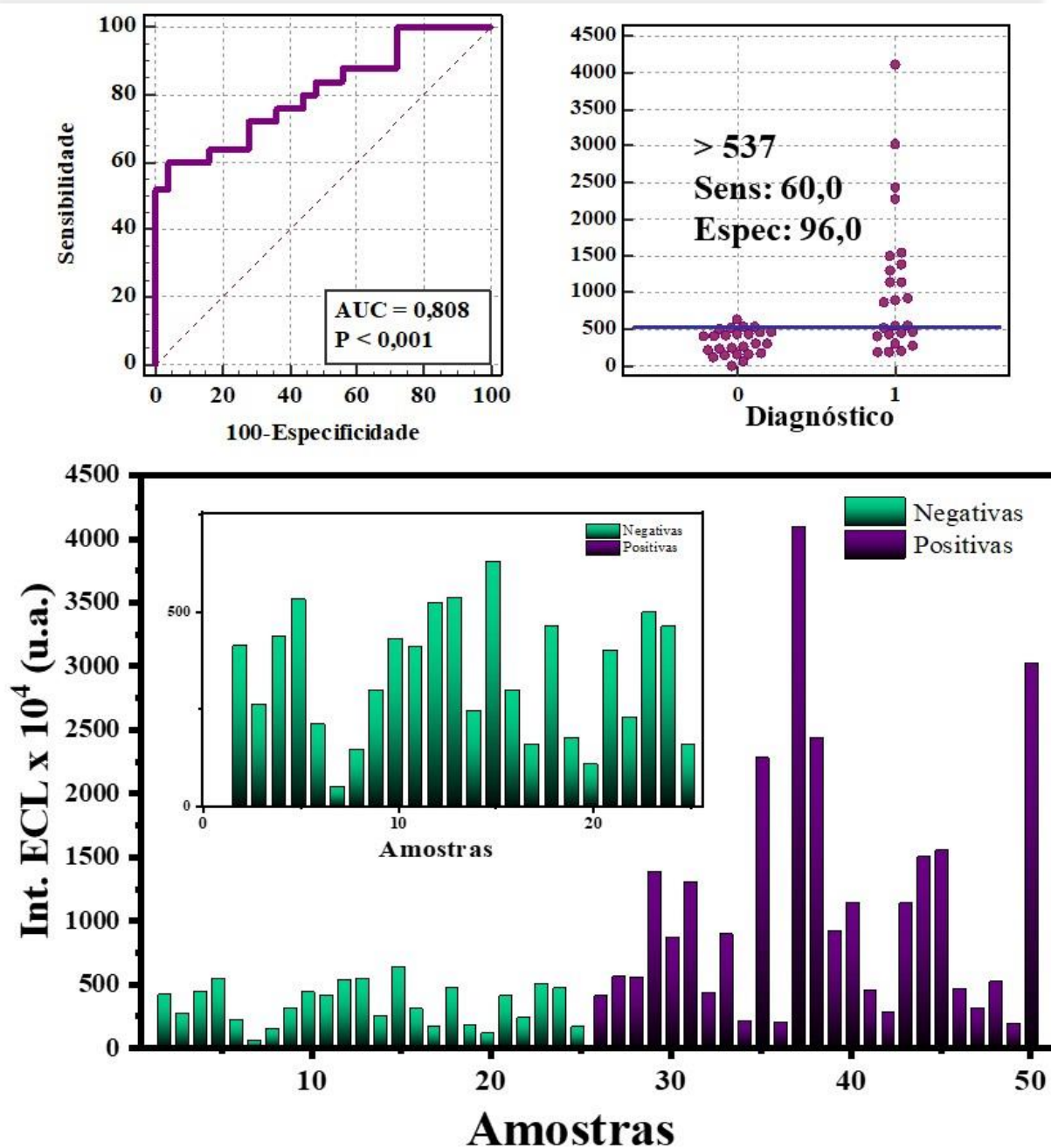


FIGURA 5.26- A) Curva ROC para coorte 1; B) Diagrama de pontos para coorte 1; C) Gráfico de barras para as amostras testadas para detecção dos alvo 1A e 2A do vírus SARS-CoV-2. Inserção amplificação da região das amostras negativas.

Já quando analisamos os dados obtido no ensaio com as amostras da coorte 2, pode-se notar um resultado mais favorável, como observado na FIGURA 5.27, que apresenta a curva ROC, o diagrama de pontos e o gráfico de barras de todas as amostras testadas para na detecção dos alvos 1A e 2A simultaneamente.

Os dados da curva ROC da FIGURA 5.27 mostra um valor de AUC de 0,978 para a coorte 2, que é considerado um valor excelente. Além, disso o método apresentou uma sensibilidade e especificidade de 92% (valor de corte $>221 \times 10^4$) para as amostras dessa coorte que foram testadas. Apesar da intensidade de ECL ser menor quando comparada com a coorte 1, é nítido a maior diferenciação das amostras dos indivíduos positivos das amostras dos indivíduos negativos. Essa menor intensidade de ECL observada pode ser explicada pelo maior tempo de armazenamento da sonda de detecção quando realizado os experimentos para a coorte 2.

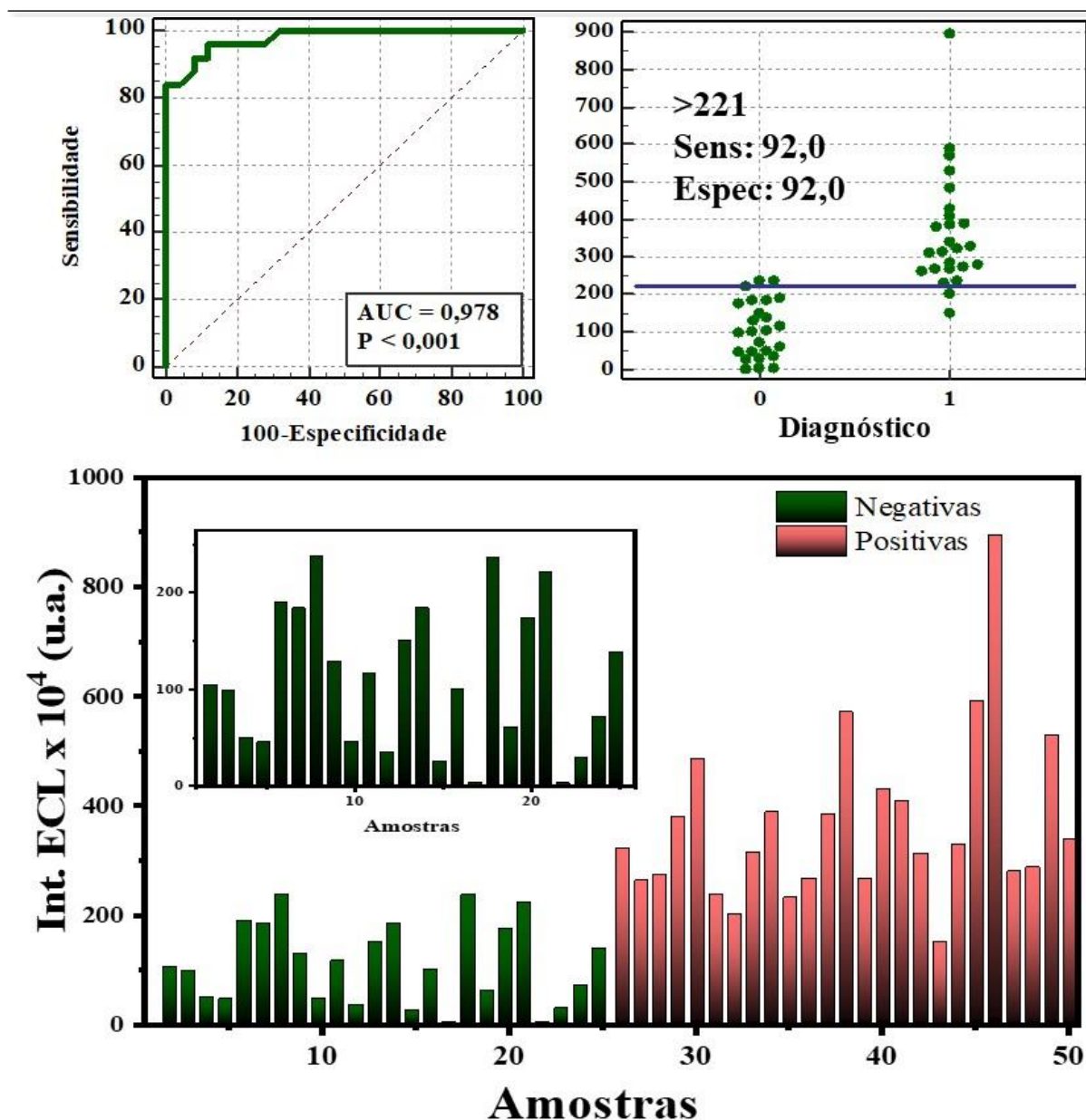


FIGURA 5.27- A) Curva ROC para coorte 2; B) Diagrama de pontos para coorte 2; C) Gráfico de barras para todas as amostras testadas para detecção dos alvos 1A e 2A do vírus SARS-CoV-2. Inserção amplificação da região das amostras negativas.

Buscando entender as diferenças nos resultados obtidos nas diferentes amostragens, pode ser considerado alguns fatores: Quando as amostras da coorte 1 foram testadas para a detecção dos alvos 1A e 2A simultaneamente, estás já haviam passado por processo de congelamento e descongelamento e armazenadas em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ há mais de três meses. O volume de amostras recebido

dessa coorte foi de cerca de 200 μL , sendo que volumes pequenos dificultam a obtenção de uma amostra mais límpida, que diminuem os interferentes da amostra e do ensaio. Já quando analisamos as amostras da coorte 2, estas foram inativadas e logo em seguida realizado o ensaio, sem passar por processo de congelamento e descongelamento. O volume recebido, dessas amostras, foi de cerca de 1 mL, sendo que procedimento de coleta exige do indivíduo um volume de 5 mL de saliva, o que permitiu a obtenção de uma amostragem de saliva mais límpida e com menos interferentes na análise, do que as amostras da coorte 1.

Portanto, considerando que estas coortes são provenientes de locais diferentes, é de extrema importância levar em conta a manipulação e estocagem dessas amostras, uma vez que esta detectando RNA viral, um material genético instável. Sabe-se que o RNA do SARS-CoV-2 permanece relativamente estável em amostras de saliva entre 21 e 26 dias quando armazenadas por 4 °C ou -20 °C^{108,109} e, no máximo, 92 dias quando armazenadas em -80 °C¹⁰⁹. Deve-se evitar etapas de congelamento e descongelamento, já que aumenta a possibilidade da perda desse material. Além disso, as salivas são amostras complexas, apesar da facilidade de coleta. Assim, alimentação, higiene bucal e tempo de armazenagem, são variáveis que podem influenciar na detecção do alvo de interesse.

Baseado em alguns experimentos realizados em nosso laboratório, pode-se observar que a forma mais adequada de se realizar a coleta da amostra, sujeita a menor interferência e melhor resultado é:

- Coletar a saliva após 30 min de higiene bucal;
- Não ingerir água;
- Coletar em tubo do tipo *salivette* (que faz uma pré-filtragem da saliva).

Além disso, logo após a inativação já deve ser realizado o ensaio proposto. Caso não seja possível, o ideal é armazenar a saliva sem fazer a inativação, uma vez que a inativação quebra a capa de envelope viral, tornando o

material genético exposto. Portanto, em cada etapa de congelamento e descongelamento, há perda considerável do RNA viral.

De maneira geral, analisando todos os ensaios de detecção dos alvos 1A, 2A e 1A junto com 2A, é observado nos gráficos de diagrama de pontos que há uma porcentagem de pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2 que o ensaio não consegue detectar. Esses resultados falsos-negativos podem ser atribuídos à baixa carga viral presente na amostra de saliva do paciente infectado ou até mesmo a degradação do RNA viral após longos tempos e/ou inadequado armazenamento e coleta da amostra. É possível que tenha ocorrido degradação referente aos ciclos de congelamento e descongelamento, uma vez que recebíamos as amostras sem maiores informações sobre coleta e estocagem.

5.4.5. Avaliação da extração do RNA viral

Com o objetivo de tentar melhorar a sensibilidade do diagnóstico, ou seja, tentar reduzir ou eliminar os resultados falsos negativos, optou-se por avaliar o ensaio genômico com amostras de saliva após extração do RNA viral. Quatro kits extração de ácidos nucleicos comerciais foram utilizados (*Easy Extract DNA-RNA*, o *Easy Plus Extract DNA-RNA*, *Cellco* e o *Easy Mag*). A FIGURA 5.28 apresenta os resultados obtidos para o ensaio genômico após a extração do material genético. Para este estudo foram testadas 10 amostras positivas e 10 amostras negativas da coorte 2, para cada kit de extração.

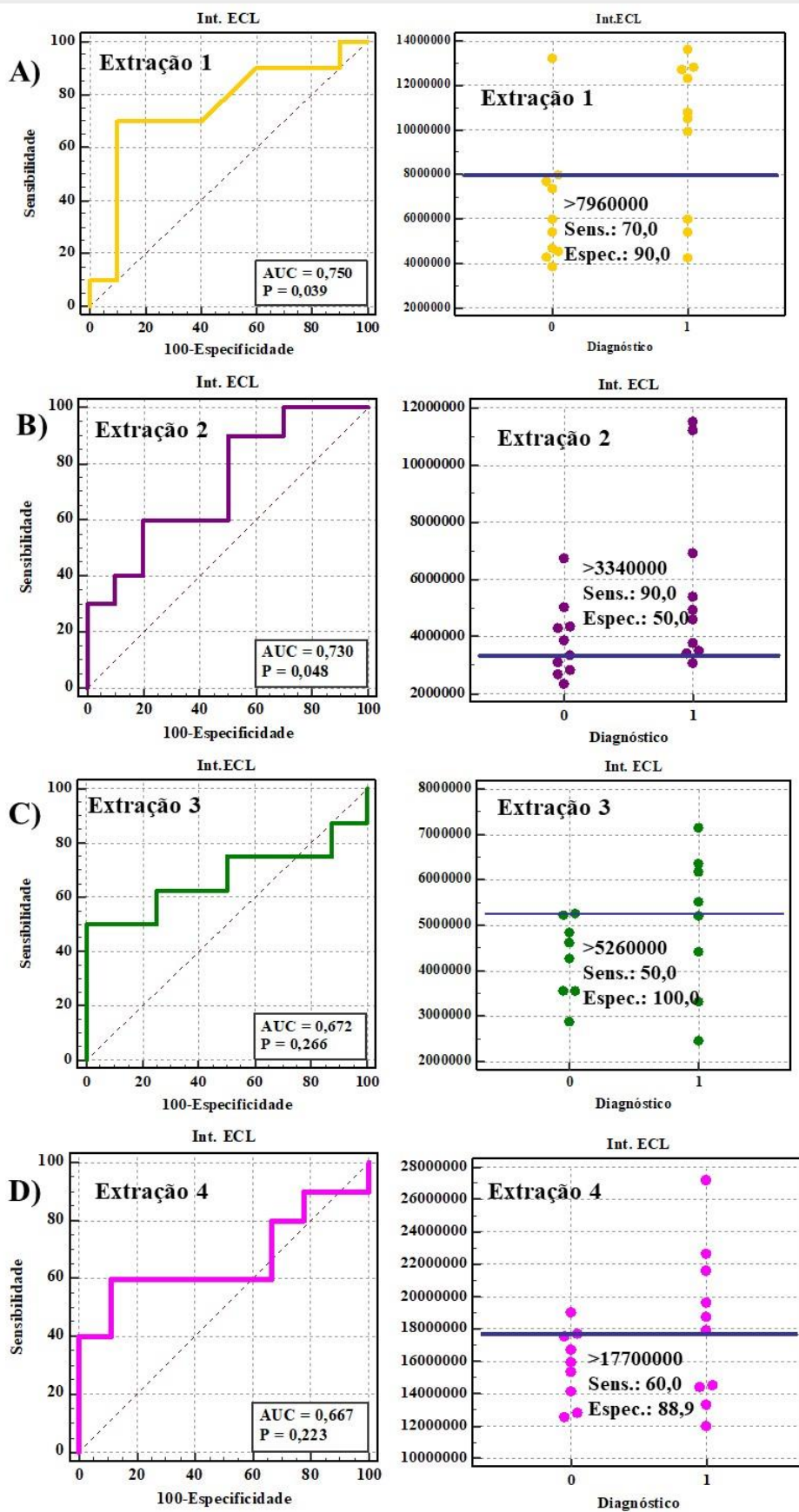


FIGURA 5.28- A) Kit Easy Plus B) Kit Easy C) Kit Easy Mag D) Kit Cellco;

Após analisar as amostras que passaram pela extração do RNA viral, observou-se uma inferior precisão discriminativa para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes infectados, frente às amostras que foram analisadas de forma bruta, ou seja, sem etapas de extração. Como as amostras analisadas já estavam estocadas por um longo período, o RNA viral pode ter sido degradado e, conseqüentemente, não detectado, levando a baixa precisão encontrada. A maior dificuldade na validação do método é o acesso às amostras recém coletadas e/ou coletadas/armazenadas adequadamente. Além do mais, todos os kits de extração testados requerem muitas etapas de manipulação das amostras, gerando perdas. Como nosso método não requer etapas de amplificação, quaisquer perdas de amostras são significativas e podem influenciar nos resultados obtidos. Também podem ser considerados dificuldades de bioreconhecimento ou concentração das sondas de captura e detecção na superfícies das nanopartículas de sílicas e nas partículas magnéticas.

6. CONCLUSÕES

Um novo dispositivo descartável para uso da técnica de eletroquimiluminescência de baixo custo foi construído e otimizado para a detecção dos biomarcadores genéticos do novo vírus SARS-CoV-2. Este método possibilita a análise de até 10 amostra simultâneas em um único dispositivo.

A detecção via ECL é rápida e permite a utilização de imagens para análises dos resultados. Não exige etapas de transcrição e amplificação do material genético, o que diminui os custos de reagentes e suplementos. Além disto, o ensaio pode ser realizado em temperatura ambiente e exige apenas uma etapa de hibridização.

Foram testadas duas sequências genéticas diferentes do vírus SARS-CoV-2, a sequência 1A e a sequência 2A. Sendo que o alvo 1A apresentou maior seletividade que o alvo 2A nas coortes de amostras investigadas. No entanto, para uma conclusão segura, seria necessário a avaliação dos dois alvos em amostras nas mesmas condições de armazenamento e estocagem e uma avaliação por RT-PCR no mesmo dia de realização do teste.

O desenvolvimento de métodos baseados na detecção de RNA viral necessita de procedimentos bem definidos, principalmente quando se trata das etapas de coleta e armazenamento das amostras, devido à baixa estabilidade desse material genético, que pode comprometer a confiabilidade dos resultados obtidos e avaliação da exatidão do método.

O número de amostras testada foi significativo para a validação do método desenvolvido e os resultados foram comparados com resultados obtidos via RT-PCR e teste de antígeno para essas amostras. Assim, pode-se afirmar que o método proposto apresentou uma boa precisão e exatidão com excelentes valores de sensibilidade e especificidade clínica.

A sequência 1A apresentou maior sensibilidade do que a sequência 2A. No entanto, esse não é um resultado conclusivo já que a avaliação do método,

nessas sequências, foi realizada em condições e dias diferentes não permitindo uma comparação adequada.

Os resultados obtidos são promissores e indicam que um novo método de diagnóstico pode vir e ser utilizado para auxiliar no diagnóstico e no controle da disseminação viral. O método desenvolvido pode também ser adaptado e vir a ser utilizado para o diagnóstico de outras doenças baseadas na detecção de material genético.

Esse método foi patenteado sob o número de processo BR 10 2021 018419 1 no Instituto Nacional da propriedade industrial.

REFERÊNCIAS

1. HE, F. J.; TAN, M.; SONG, J.; & MACGREGOR, G. A. “Emergence of a Novel Human Coronavirus Threatening Human Health.” *Nat. Med.* 2020 263, 26 (3): 317, 2020.
 2. Painel do Coronavírus da OMS (COVID-19) | Painel de controle do coronavírus da OMS (COVID-19) com dados de vacinação <https://covid19.who.int/> (accessed Jan 20, 2023).
 3. MAXMEN, A. “More than 80 Clinical Trials Launch to Test Coronavirus Treatments.” *Nature*, 578 (7795): 347, 2020.
 4. LI, G.; & DE CLERCQ, E. “Therapeutic Options for the 2019 Novel Coronavirus (2019-NCoV).” *Nat. Rev. Drug Discov.*, 19 (3): 149, 2020.
 5. PUHACH, O.; MEYER, B.; & ECKERLE, I. “SARS-CoV-2 Viral Load and Shedding Kinetics.” *Nat. Rev. Microbiol.* 2022, : 1, 2022.
 6. CAVANAUGH, A. M.; FORTIER, S.; LEWIS, P.; ARORA, V.; JOHNSON, M.; GEORGE, K.; TOBIAS, J.; LUNN, S.; MILLER, T.; THOROUGHMAN, D.; & SPICER, K. B. “COVID-19 Outbreak Associated with a SARS-CoV-2 R.1 Lineage Variant in a Skilled Nursing Facility After Vaccination Program — Kentucky, March 2021.” *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 70 (17): 639, 2021.
 7. LAMERS, M. M.; & HAAGMANS, B. L. “SARS-CoV-2 Pathogenesis.” *Nat. Rev. Microbiol.*, 20 (5): 270, 2022.
 8. SHERIDAN, C. “Coronavirus and the Race to Distribute Reliable Diagnostics.” *Nat. Biotechnol.*, 38 (4): 382, 2020.
 9. HARDENBROOK, N. J.; & ZHANG, P. “A Structural View of the SARS-CoV-2 Virus and Its Assembly.” *Curr. Opin. Virol.*, 52: 123, 2022.
 10. ORTIZ-PRADO, E.; SIMBAÑA-RIVERA, K.; GÓMEZ- BARRENO, L.; RUBIO-NEIRA, M.; GUAMAN, L. P.; KYRIAKIDIS, N. C.; MUSLIN, C.; JARAMILLO, A. M. G.; BARBA-OSTRIA, C.; CEVALLOS-ROBALINO, D.; SANCHES-SANMIGUEL, H.; UNIGARRO, L.;
-

-
- ZALAKEVICIUTE, R.; GADIAN, N.; & LÓPEZ-CORTÉS, A. “Clinical, Molecular, and Epidemiological Characterization of the SARS-CoV-2 Virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a Comprehensive Literature Review.” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 98 (1): 115094, 2020.
11. BAKHSHANDEH, B.; JAHANAFROOZ, Z.; ABBASI, A.; GOLI, M. B.; SADEGHI, M.; MOTTAQI, M. S.; & ZAMANI, M. “Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in Structure, Function, and Pathogenicity of the Virus.” *Microb. Pathog.*, 154: 104831, 2021.
 12. ASTUTI, I.; & YSRAFIL. “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An Overview of Viral Structure and Host Response.” *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, 14 (4): 407, 2020.
 13. WU, A.; PENG, Y.; HUANG, B.; DING, X.; WANG, X.; NIU, P.; MENG, J.; ZHU, Z.; ZHANG, Z.; WANG, J.; SHENG, J.; QUAN, L.; XIA, Z.; TAN, W.; CHENG, G.; & JIANG, T. “Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-NCoV) Originating in China.” *Cell Host Microbe*, 27 (3): 325, 2020.
 14. YIN, C. “Genotyping Coronavirus SARS-CoV-2: Methods and Implications.” *Genomics*, 112 (5): 3588, 2020.
 15. CHANG, T. J.; YANG, D. M.; WANG, M. L.; LIANG, K. H.; TSAI, P. H.; CHIOU, S. H.; LIN, T. H.; & WANG, C. T. “Genomic Analysis and Comparative Multiple Sequences of SARS-CoV2.” *J. Chinese Med. Assoc.*, 83 (6): 537, 2020.
 16. RATRE, Y. K.; KAHAR, N.; BHASKAR, L. V. K. S.; BHATTACHARYA, A.; & VERMA, H. K. “Molecular Mechanism, Diagnosis, and Potential Treatment for Novel Coronavirus (COVID-19): A Current Literature Review and Perspective.” *3 Biotech*, 11 (2): 94, 2021.
 17. BANSAL, M. “Cardiovascular Disease and COVID-19.” *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, 14 (3): 247, 2020.
 18. RAJ, S.; CHANDEL, V.; RATHI, B.; & KUMAR, D. “Understanding the
-

-
- Molecular Mechanism(s) of SARS-CoV2 Infection and Propagation in Human to Discover Potential Preventive and Therapeutic Approach.” *Coronaviruses*, 1 (1): 73, 2020.
19. DYSON, L.; HILL, E. M.; MOORE, S.; CURRAN-SEBASTIAN, J.; TILDESLEY, M. J.; LYTHGOE, K. A.; HOUSE, T.; PELLIS, L.; & KEELING, M. J. “Possible Future Waves of SARS-CoV-2 Infection Generated by Variants of Concern with a Range of Characteristics.” *Nat. Commun.* 2021 121, 12 (1): 1, 2021.
 20. Tracking SARS-CoV-2 variants <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (accessed Jan 20, 2023).
 21. Como o SARS-CoV-2 combate nosso sistema imunológico | Ciência | AAAS <https://www.science.org/content/article/how-sars-cov-2-battles-our-immune-system> (accessed Jan 20, 2023).
 22. VOGEL, G. “New Omicron Strains May Portend Big COVID-19 Waves.” *Science* (80-.), 377 (6614): 1479, 2022.
 23. MACHADO, B. A. S.; HODEL, K. V. S.; BARBOSA-JÚNIOR, V. G.; SOARES, M. B. P.; & BADARÓ, R. “The Main Molecular and Serological Methods for Diagnosing COVID-19: An Overview Based on the Literature.” *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 40, 13 (1): 40, 2020.
 24. DAGAN, N.; BARDA, N.; KEPTEN, E.; MIRON, O.; PERCHIK, S.; KATZ, M. A.; HERNÁN, M. A.; LIPSITCH, M.; REIS, B.; & BALICER, R. D. “BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting.” *N. Engl. J. Med.*, 384 (15): 1412, 2021.
 25. THOMPSON, M. G.; BURGESS, J. L.; NALEWAY, A. L.; TYNER, H. L.; YOON, S. K.; MEECE, J.; OLSHO, L. E. W.; CABAN-MARTINEZ, A. J.; FOWLKES, A.; LUTRICK, K.; KUNTZ, J. L.; DUNNIGAN, K.; ODEAN, M. J.; HEGMANN, K. T.; STEFANSKI, E.; EDWARDS, L. J.; SCHAEFER-SOLLE, N.; GRANT, L.; ELLINGSON, K.; GROOM, H. C.; ZUNIE, T.; THIESE, M. S.; IVACIC, L.; WESLEY, M. G.; LAMBERTE,
-

-
- J. M.; SUN, X.; SMITH, M. E.; PHILLIPS, A. L.; GROOVER, K. D.; YOO, Y. M.; GERALD, J.; BROWN, R. T.; HERRING, M. K.; JOSEPH, G.; BEITEL, S.; MORRILL, T. C.; MAK, J.; RIVERS, P.; HARRIS, K. M.; HUNT, D. R.; ARVAY, M. L.; KUTTY, P.; FRY, A. M.; & GAGLANI, M. “Interim Estimates of Vaccine Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Health Care Personnel, First Responders, and Other Essential and Frontline Workers — Eight U.S. Locations, December 2020–March 2021.” *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 70 (13): 495, 2022.
26. LEE, L. Y.; ROZMANOWSKI, S.; PANG, M.; CHARLETT, A.; ANDERSON, C.; HUGHES, G. J.; BARNARD, M.; PETO, L.; VIPOND, R.; SIENKIEWICZ, A.; HOPKINS, S.; BELL, J.; CROOK, D. W.; GENT, N.; WALKER, A. S.; PETO, T. E.; & EYRE, D. W. “SARS-CoV-2 Infectivity by Viral Load, S Gene Variants and Demographic Factors and the Utility of Lateral Flow Devices to Prevent Transmission.” *medRxiv*, 14: 2021.03.31.21254687, 2021.
27. QUESADA, J. A.; LÓPEZ-PINEDA, A.; GIL-GUILLÉN, V. F.; ARRIERO-MARÍN, J. M.; GUTIÉRREZ, F.; & CARRATALA-MUNUERA, C. “Incubation Period of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Rev. Clin. Esp.*, 221 (2): 109, 2021.
28. XAVIER, A. R.; SILVA, J. S.; ALMEIDA, J. P. C. L.; CONCEIÇÃO, J. F. F.; LACERDA, G. S.; & KANAAN, S. “COVID-19: Clinical and Laboratory Manifestations in Novel Coronavirus Infection.” *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, 56: 1, 2020.
29. MARTÍN, J.; TENA, N.; & ASUERO, A. G. “Current State of Diagnostic, Screening and Surveillance Testing Methods for COVID-19 from an Analytical Chemistry Point of View.” *Microchem. J.*, 167 (February): 106305, 2021.
30. RAVINA; KUMAR, A.; MANJEET; TWINKLE; SUBODH; NARANG,
-

-
- J.; & MOHAN, H. “Analytical Performances of Different Diagnostic Methods for SARS-CoV-2 Virus - A Review.” *Sensors Int.*, 3: 100197, 2022.
31. KITAJIMA, H.; TAMURA, Y.; YOSHIDA, H.; KINOSHITA, H.; KATSUTA, H.; MATSUI, C.; MATSUSHITA, A.; ARAI, T.; HASHIMOTO, S.; IUCHI, A.; HIRASHIMA, T.; MORISHITA, H.; MATSUOKA, H.; TANAKA, T.; & NAGAI, T. “Clinical COVID-19 Diagnostic Methods: Comparison of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) and Quantitative RT-PCR (QRT-PCR).” *J. Clin. Virol.*, 139: 104813, 2021.
 32. PU, R.; LIU, S.; REN, X.; SHI, D.; BA, Y.; HUO, Y.; ZHANG, W.; MA, L.; LIU, Y.; YANG, Y.; & CHENG, N. “The Screening Value of RT-LAMP and RT-PCR in the Diagnosis of COVID-19: Systematic Review and Meta-Analysis.” *J. Virol. Methods*, 300: 114392, 2022.
 33. SUBSOONTORN, P.; LOHITNAVY, M.; & KONGKAEW, C. “The Diagnostic Accuracy of Isothermal Nucleic Acid Point-of-Care Tests for Human Coronaviruses: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Sci. Reports* 2020 101, 10 (1): 1, 2020.
 34. NGAMSOM, B.; ILES, A.; KAMITA, M.; KIMANI, R.; WAKABA, P.; RODRIGUEZ-MATEOS, P.; MUNGAI, M.; DYER, C. E.; WALTER, C.; GITAKA, J.; & PAMME, N. “A Sample-to-Answer COVID-19 Diagnostic Device Based on Immiscible Filtration and CRISPR-Cas12a-Assisted Detection.” *Talanta Open*, 6: 100166, 2022.
 35. WANG, S.; HU, J.; SUI, C.; HE, G.; QU, Z.; CHEN, X.; WANG, Y.; GUO, D.; & LIU, X. “Accuracy of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) to Diagnose COVID-19, a Meta-Analysis.” *Microb. Pathog.*, 165: 105498, 2022.
 36. SOH, J. H.; BALLEZA, E.; ABDUL RAHIM, M. N.; CHAN, H. M.; MOHD ALI, S.; CHUAH, J. K. C.; EDRIS, S.; ATEF, A.; BAHIELDIN,
-

-
- A.; YING, J. Y.; & SABIR, J. S. M. "CRISPR-Based Systems for Sensitive and Rapid on-Site COVID-19 Diagnostics." *Trends Biotechnol.*, 40 (11): 1346, 2022.
37. JOHNSTON, M.; CEREN ATES, H.; GLATZ, R. T.; MOHSENIN, H.; SCHMACHTENBERG, R.; GÖPPERT, N.; HUZYLY, D.; URBAN, G. A.; WEBER, W.; & DINCER, C. "Multiplexed Biosensor for Point-of-Care COVID-19 Monitoring: CRISPR-Powered Unamplified RNA Diagnostics and Protein-Based Therapeutic Drug Management." *Mater. Today*, 2022.
38. PAL, M.; MUINAO, T.; PARIHAR, A.; ROY, D. K.; BORUAH, H. P. D.; MAHINDROO, N.; & KHAN, R. "Biosensors Based Detection of Novel Biomarkers Associated with COVID-19: Current Progress and Future Promise." *Biosens. Bioelectron.* X, 12: 100281, 2022.
39. WEI, H.; ZHANG, C.; DU, X.; & ZHANG, Z. "Research Progress of Biosensors for Detection of SARS-CoV-2 Variants Based on ACE2." *Talanta*, 251: 123813, 2023.
40. GUERRERO-ESTEBAN, T.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, C.; VILLAMANSO, A. M.; REVENGA-PARRA, M.; PARIENTE, F.; & LORENZO, E. "Sensitive SARS-CoV-2 Detection in Wastewaters Using a Carbon Nanodot-Amplified Electrochemiluminescence Immunosensor." *Talanta*, 247: 123543, 2022.
41. WANG, J.; & ERDEM, A. "Genomagnetic Electrochemical Biosensors Joseph Wang 1 , Arzum Erdem 2 1." : 431, .
42. Why is DNA (and not RNA) a stable storage form for genetic information?
| Biochemistry Revisited
<http://biochemistryrevisited.blogspot.com/2008/01/why-is-dna-and-not-rna-stable-storage.html> (accessed Jan 23, 2023).
43. WANG, S.; & KOOL, E. T. "Origins of the Large Differences in Stability of DNA and RNA Helices: C-5 Methyl and 2'-Hydroxyl Effects." *Biochemistry*, 34 (12): 4125, 1995.
-

-
44. DNA OU RNA? EIS A QUESTÃO – POR QUE O DNA (E NÃO O RNA) É A MOLÉCULA QUE ARMAZENA A INFORMAÇÃO GENÉTICA? | <https://netnature.wordpress.com/2014/08/25/dna-ou-rna-eis-a-questao-por-que-o-dna-e-nao-o-rna-e-a-molecula-que-armazena-a-informacao-genetica/> (accessed Jan 23, 2023).
 45. BABAEI, A.; POUREMAMALI, A.; RAFIEE, N.; SOHRABI, H.; MOKHTARZADEH, A.; & DE LA GUARDIA, M. “Genosensors as an Alternative Diagnostic Sensing Approaches for Specific Detection of Virus Species: A Review of Common Techniques and Outcomes.” *Trends Anal. Chem.*, 155: 116686, 2022.
 46. RADECKI, J.; & RADECKA, H. “Mechanisms of Analytical Signals Generated by Electrochemical Genosensors: Review.” *J. Mex. Chem. Soc.*, 59 (4): 276, 2015.
 47. ANSAH, F.; KRAMPA, F.; DONKOR, J. K.; OWUSU-APPIAH, C.; ASHITEI, S.; KORNU, V. E.; DANKU, R. K.; CHIRAWURAH, J. D.; AWANDARE, G. A.; ANIWEH, Y.; & KANYONG, P. “Ultrasensitive Electrochemical Genosensors for Species-Specific Diagnosis of Malaria.” *Electrochim. Acta*, 429: 140988, 2022.
 48. SHEN, M.; ZHOU, Y.; YE, J.; ABDULLAH AL-MASKRI, A. A.; KANG, Y.; ZENG, S.; & CAI, S. “Recent Advances and Perspectives of Nucleic Acid Detection for Coronavirus.” *J. Pharm. Anal.*, 10 (2): 97, 2020.
 49. CENTI, S.; LASCHI, S.; & MASCINI, M. “Improvement of Analytical Performances of a Disposable Electrochemical Immunosensor by Using Magnetic Beads.” *Talanta*, 73 (2): 394, 2007.
 50. HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; & DE LA GUARDIA, M. “Iron and Iron-Oxide Magnetic Nanoparticles as Signal-Amplification Elements in Electrochemical Biosensing.” *TrAC Trends Anal. Chem.*, 72: 1, 2015.
 51. KURAMITZ, H. “Magnetic Microbead-Based Electrochemical Immunoassays.” *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (1): 61, 2009.
-

-
52. XU, Y.; & WANG, E. "Electrochemical Biosensors Based on Magnetic Micro/Nano Particles." *Electrochim. Acta*, 84: 62, 2012.
 53. MANI, V.; WASALATHANTHRI, D. P.; JOSHI, A. A.; KUMAR, C. V.; & RUSLING, J. F. "Highly Efficient Binding of Paramagnetic Beads Bioconjugated with 100-000 or More Antibodies to Protein-Coated Surfaces." *Anal. Chem.*, 84 (23): 10485, 2012.
 54. PAL, S.; & ALOCILJA, E. C. "Electrically Active Magnetic Nanoparticles as Novel Concentrator and Electrochemical Redox Transducer in Bacillus Anthracis DNA Detection." *Biosens. Bioelectron.*, 26 (4): 1624, 2010.
 55. FORSTER, R. J.; BERTONCELLO, P.; & KEYES, T. E. "Electrogenerated Chemiluminescence." 2009.
 56. MIAO, W.; CHOI, J. P.; & BARD, A. J. "Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-Bipyridine)Ruthenium(II), (Ru(Bpy)₃²⁺)/Tri-n-Propylamine (TPrA) System Revisited - A New Route Involving TPrA⁺ Cation Radicals." *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (48): 14478, 2002.
 57. Eletroquimioluminescência - uma visão geral | Tópicos do ScienceDirect <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/electrochemiluminescence> (accessed Dec 7, 2022).
 58. RICHTER, M. M. "Electrochemiluminescence (ECL)." *Chem. Rev.*, 104 (6): 3003, 2004.
 59. MIAO, W. "Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications." *Chem. Rev.*, 108 (7): 2506, 2008.
 60. BARD, A. j. *Electrogenerated Chemiluminescence*, 1st editioa ed. Boca Raton, 2004.
 61. MA, C.; CAO, Y.; GOU, X.; & ZHU, J. J. "Recent Progress in Electrochemiluminescence Sensing and Imaging." *Anal. Chem.*, 2015.
 62. LI, L.; CHEN, Y.; & ZHU, J. J. "Recent Advances in Electrochemiluminescence Analysis." *Anal. Chem.*, 89 (1): 358, 2017.
-

-
63. JU, H.; LAI, G.; & YAN, F. "Electrochemiluminescent Immunosensing." *Immunosensing Detect. Protein Biomarkers*, : 171, 2017.
 64. MIAO, W.; CHOI, J. P.; & BARD, A. J. "Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-Bipyridine)Ruthenium(II), (Ru(Bpy)₃²⁺)/Tri-n-Propylamine (TPrA) System Revisited - A New Route Involving TPrA⁺ Cation Radicals." *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (48): 14478, 2002.
 65. RICHTER, M. M. "Electrochemiluminescence (ECL)." No. 32004.
 66. ZU, Y.; & BARD, A. J. "Electrogenerated Chemiluminescence. 66. The Role of Direct Coreactant Oxidation in the Ruthenium Tris(2,2')Bipyridyl/Tripropylamine System and the Effect of Halide Ions on the Emission Intensity." *Anal. Chem.*, 72 (14): 3223, 2000.
 67. ZU, Y.; & BARD, A. J. "Electrogenerated Chemiluminescence. 67. Dependence of Light Emission of the Tris(2,2')Bipyridylruthenium(II)/Tripropylamine System on Electrode Surface Hydrophobicity." *Anal. Chem.*, 73 (16): 3960, 2001.
 68. KATHLEEN, L. H.; COX, A.; & DANIELSON, N. D. "Chemiluminescence Detection of Amino Acids, Peptides, and Proteins Using Tris-2,2'-Bipyridine Ruthenium (III)." <http://dx.doi.org/10.1080/00032719008052438>, 23 (2): 195, 2006.
 69. GROSS, E. M.; PASTORE, P.; & WIGHTMAN, R. M. "High-Frequency Electrochemiluminescent Investigation of the Reaction Pathway between Tris(2,2'-Bipyridyl)Ruthenium(II) and Tripropylamine Using Carbon Fiber Microelectrodes." *J. Phys. Chem. B*, 105 (37): 8732, 2001.
 70. HOSSEINI, M.; SOBHANIE, E.; SALEHNIA, F.; XU, G.; RABBANI, H.; NAGHAVI SHEIKHOLESLAMI, M.; FIROOZBAKHTIAN, A.; SADEGHI, N.; HOSSEIN FARAJOLLAH, M.; REZA GANJALI, M.; & VOSOUGH, H. "Development of Sandwich Electrochemiluminescence Immunosensor for COVID-19 Diagnosis by SARS-CoV-2 Spike Protein
-

-
- Detection Based on Au@BSA-Luminol Nanocomposites.” *Bioelectrochemistry*, 147: 108161, 2022.
71. JIANG, C.; MU, X.; LIU, S.; LIU, Z.; DU, B.; WANG, J.; & XU, J. “A Study of the Detection of SARS-CoV-2 ORF1ab Gene by the Use of Electrochemiluminescent Biosensor Based on Dual-Probe Hybridization.” *Sensors* 2022, Vol. 22, Page 2402, 22 (6): 2402, 2022.
72. GUTIÉRREZ-GÁLVEZ, L.; DEL CAÑO, R.; MENÉNDEZ-LUQUE, I.; GARCÍA-NIETO, D.; RODRÍGUEZ-PEÑA, M.; LUNA, M.; PINEDA, T.; PARIENTE, F.; GARCÍA-MENDIOLA, T.; & LORENZO, E. “Electrochemiluminescent Nanostructured DNA Biosensor for SARS-CoV-2 Detection.” *Talanta*, 240: 123203, 2022.
73. SARDESAI, N.; & RUSLING, J. “Electrochemiluminescent Immunosensor for Detection of Protein Cancer Biomarkers Using Carbon Nanotube Forests and [Ru- (Bpy) 3] 2 + -Doped Silica Nanoparticles W.” : 4968, 2009.
74. LU, D.; GAI, F.; QIAO, Z.; WANG, X.; & WANG, T. “Ru(Bpy)₂(Phen-5-NH₂)₂⁺ Doped Ultrabright and Photostable Fluorescent Silica Nanoparticles.” : 51591, 2016.
75. KRZANOWSKI, W. J.; & HAND, D. J. “ROC Curves for Continuous Data.” *ROC Curves Contin. Data*, : 1, 2009.
76. METZ, C. E. “ROC Analysis in Medical Imaging: A Tutorial Review of the Literature.” *Radiol. Phys. Technol.*, 1 (1): 2, 2008.
77. MANDREKAR, J. N. “Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment.” *J. Thorac. Oncol.*, 5 (9): 1315, 2010.
78. MIAO, W.; & BARD, A. J. “Determination of Immobilized DNA and C-Reactive Protein on Au (111) Electrodes Using Tris (2 , 2 ' -Bipyridyl) Ruthenium (II) Labels.” 75 (21): 5825, 2003.
79. ZU, Y.; & BARD, A. J. “Dependence of Light Emission of the Tris (2 , 2 ') Bipyridylruthenium (II)/ Tripropylamine System on Electrode Surface Hydrophobicity.” 73 (16): 3960, 2001.
-

-
80. NIKOLELI, G.; SIONTOROU, C. G.; & NIKOLELIS, D. P. *Prototype Biosensing Devices: Design and Microfabrication Based on Nanotechnological Tools for the Rapid in the Field Detection of Food Toxicants and Environmental Pollutants*. Elsevier Inc., 2018.
 81. LU, D.; GAI, F.; QIAO, Z. A.; WANG, X.; WANG, T.; LIU, Y.; & HUO, Q. "Ru(Bpy)₂(Phen-5-NH₂)₂⁺ Doped Ultrabright and Photostable Fluorescent Silica Nanoparticles." *RSC Adv.*, 6 (57): 51591, 2016.
 82. FALCONE, R.; SOMMARIVA, G.; & VERITÀ, M. "WDXRF, EPMA and SEM/EDX Quantitative Chemical Analyses of Small Glass Samples." *Microchim Acta*, 155: 137, 2006.
 83. SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, J.; & CROUCH, S. *Fundamentos de Química Analítica.*, 9^o edição ed. São Paulo, 2018, 2018.
 84. Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)
<https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/085.html> (accessed Jan 23, 2023).
 85. KADIMISETTY, K.; MALLA, S.; SARDESAI, N. P.; JOSHI, A. A.; FARIA, R. C.; LEE, N. H.; & RUSLING, J. F. "Automated Multiplexed ECL Immunoarrays for Cancer Biomarker Proteins." *Anal. Chem.*, 87 (8): 4472, 2015.
 86. HERMANSON, G. . *Introduction to Bioconjugation. Bioconjugate Techniques*, 2013.
 87. BARTOSIK, M.; DURIKOVA, H.; VOJTESEK, B.; ANTON, M.; JANDAKOVA, E.; & HRSTKA, R. "Electrochemical Chip-Based Genomagnetic Assay for Detection of High-Risk Human Papillomavirus DNA." *Biosens. Bioelectron.*, 83: 300, 2016.
 88. ZHAO, X.; TAPEC-DYTIOCO, R.; WANG, K.; & TAN, W. "Collection of Trace Amounts of DNA/MRNA Molecules Using Genomagnetic Nanocaptors." *Anal. Chem.*, 75 (14): 3476, 2003.
 89. KAUR, K., & KAUR, M. *ADVANCED DIAGNOSTIC TECHNIQUES*.
-

-
- DENTOMED PUBLICATION HOUSE., 2021.
90. SCHWARZACHER., P. H.-H. T. Practical In Situ Hybridization - BUFFERS AND OTHER SOLUTIONS. <https://www.le.ac.uk/Biology/Phh4/Probuffer.Htm>.
 91. SAMBROOK, J., & RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Vol 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.
 92. DAVE, N.; & LIU, J. “Fast Molecular Beacon Hybridization in Organic Solvents with Improved Target Specificity.” *J. Phys. Chem. B*, 114 (47): 15694, 2010.
 93. LIPFERT, J.; DONIACH, S.; DAS, R.; & HERSCHLAG, D. Understanding Nucleic Acid-Ion Interactions. 2014. Vol. 83.
 94. TAN, Z. J.; & CHEN, S. J. “Electrostatic Free Energy Landscapes for DNA Helix Bending.” *Biophys. J.*, 94 (8): 3137, 2008.
 95. RUSSELL, S., MEADOWS, L. A., & RUSSELL, R. R. Microarray Technology in Practice. Elsevier Science., 2008.
 96. VARMA, A., & OELMÜLLER, R. Advanced Techniques in Soil Microbiology. Springer Berlin Heidelberg., 2007.
 97. DNA de esperma de salmão, cortado (10 mg/mL) https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM9680?gclid=CjwKCAiA3KefBhByEiwAi2LDHJU1ZduCUNU5G5VHQ42V3GJHL-c7UABIJ3JMqQD1HOPIXX30RAX1WxoCwfwQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAiA3KefBhByEiwAi2LDHJU1ZduCUNU5G5VHQ42V3GJHL-c7UABIJ3JMqQD1HOPIXX30RAX1WxoCwfwQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!606515189508!!!g!!!16893189581!143415109412&cid=bid_sap_rst_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_awa_con (accessed Feb 13, 2023).
 98. “Salmon Sperm DNA Solution.”
 99. ZU, Y.; & BARD, A. J. “Electrogenerated Chemiluminescence. 67. Dependence of Light Emission of the
-

-
- Tris(2,2')Bipyridylruthenium(II)/Tripropylamine System on Electrode Surface Hydrophobicity.” *Anal. Chem.*, 73 (16): 3960, 2001.
100. “ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95) APPROVAL BY CPMP November 1994 DATE FOR COMING INTO OPERATION.” 1995.
101. VASHIST, S. K.; & LUONG, J. H. T. *Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays*. Elsevier Inc., 2018.
102. STÖCKL, D.; D’HONDT, H.; & THIENPONT, L. M. “Method Validation across the Disciplines-Critical Investigation of Major Validation Criteria and Associated Experimental Protocols.” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 877 (23): 2180, 2009.
103. DZIAK, J. J.; COFFMAN, D. L.; LANZA, S. T.; LI, R.; & JERMIIN, L. S. “Sensitivity and Specificity of Information Criteria.” *Brief. Bioinform.*, 21 (2): 553, 2020.
104. GHAALIQ, A.; MB, L.; FRCA, C.; MCCLUSKEY, A.; & MB, B. “Clinical Tests: Sensitivity and Specificity.” *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, 8 (6): 221, 2008.
105. WAIN-HOBSON, S. “The Third Bond.” *Nat.* 2006 4397076, 439 (7076): 539, 2006.
106. GIL, A.; BRANCHADELL, V.; BERTRAN, J.; & OLIVA, A. “An Analysis of the Different Behavior of DNA and RNA through the Study of the Mutual Relationship between Stacking and Hydrogen Bonding.” *J. Phys. Chem. B*, 113 (14): 4907, 2009.
107. RUTLEDGE, L. R.; CAMPBELL-VERDUYN, L. S.; & WETMORE, S. D. “Characterization of the Stacking Interactions between DNA or RNA Nucleobases and the Aromatic Amino Acids.” *Chem. Phys. Lett.*, 444 (1–3): 167, 2007.
-

-
108. ALFARO-NÚÑEZ A, CRONE S, MORTENSEN S, ROSENSTIERNE MW, FOMSGAARD A, MARVING E, NIELSEN SH, JØRGENSEN MGP, POLACEK C, COHEN AS, N. C. “SARS-CoV-2 RNA Stability in Dry Swabs for Longer Storage and Transport at Different Temperatures _ Enhanced Reader.Pdf.” *Transbound Emerg Dis.*, 69: 189, 2022.
109. OTT, I. M.; STRINE, M. S.; WATKINS, A. E.; BOOT, M.; KALINICH, C. C.; HARDEN, C. A.; VOGELS, C. B. F.; CASANOVAS-MASSANA, A.; MOORE, A. J.; MUENKER, M. C.; NAKAHATA, M.; TOKUYAMA, M.; NELSON, A.; FOURNIER, J.; BERMEJO, S.; CAMPBELL, M.; DATTA, R.; CRUZ, C. S. D.; FARHADIAN, S. F.; KO, A. I.; IWASAKI, A.; GRUBAUGH, N. D.; WILEN, C. B.; & WYLLIE, A. L. “Stability of SARS-CoV-2 RNA in Nonsupplemented Saliva.” *Emerg. Infect. Dis.*, 27 (4): 1146, 2021.
-

APÊNDICE

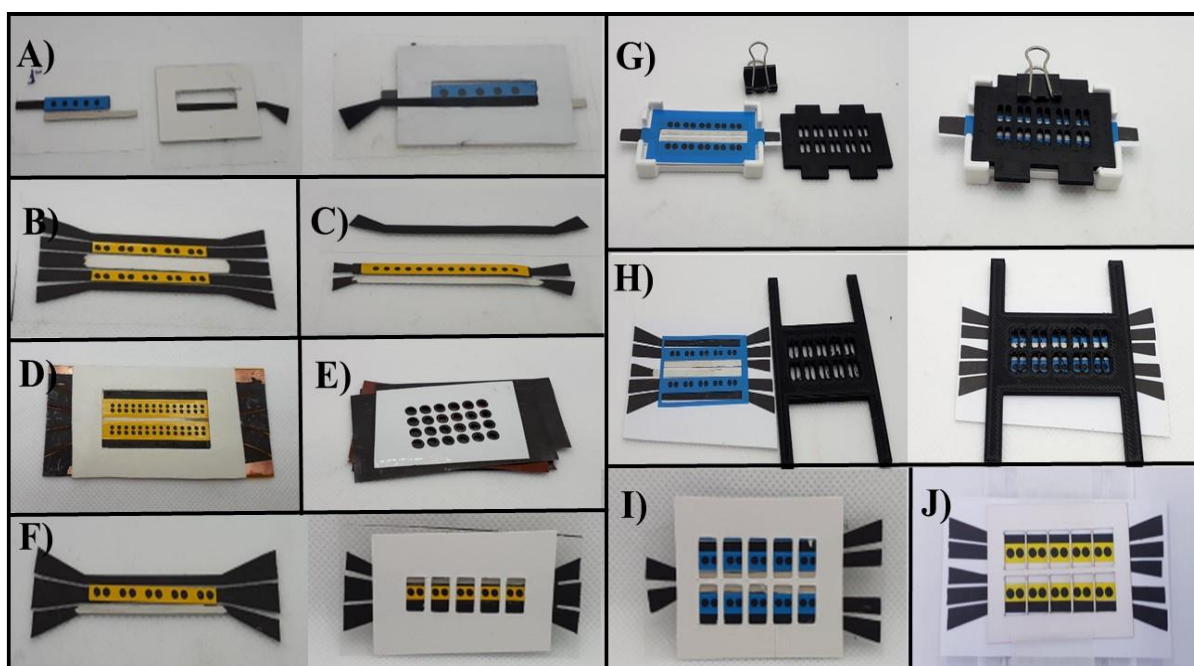


FIGURA. A) Substrato transparência, canal microfluídico com 5 eletrodos de trabalho; B) Substrato transparência, com eletrodo de referência compartilhado e 20 eletrodos de trabalho; C) Substrato transparência, sistema microfluídico com 14 eletrodo de trabalho; D) Substrato poliéster de cobre com 56 eletrodos de trabalho;. E) Substrato poliéster de cobre com 24 eletrodos de trabalho; F) Substrato transparência com 10 eletrodos de trabalho; G) Substrato PVC com 20 eletrodos de trabalho, contra-eletrodo de material... impresso em impressora 3D; H) Substrato PVC Substrato PVC com 20 eletrodos de trabalho, contra-eletrodo impresso em impressora 3D; I) Substrato PVC com 20 eletrodos de trabalho conectado apenas por um lado; J) Substrato PVC com 20 eletrodos de trabalho conectado pelos dois lados.