

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG) INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ) PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KÉZIA GOMES DE OLIVEIRA

Microdispositivo de poliestireno-toner rotacionalmente controlado por um *hand-spinner* e aplicações no diagnóstico molecular de doenças infecciosas

> GOIÂNIA 2022

Processo: Documento: 23070.010109/2022-41 2963181



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[] Dissertação [x] Tese

2. Nome completo do autor

Kézia Gomes de Oliveira

3. Título do trabalho

Microdispositivo de poliestireno-toner rotacionalmente controlado por um hand-spinner e aplicações no diagnóstico molecular de doenças infecciosas

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;

- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro;

- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte**, **Professor do Magistério Superior**, em 09/06/2022, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **KEZIA GOMES DE OLIVEIRA**, **Discente**, em 09/06/2022, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de</u> novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?</u> <u>acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0</u>, informando o código verificador **2963181** e o código CRC **62CFAFBF**.

Referência: Processo nº 23070.010109/2022-41

SEI nº 2963181

KÉZIA GOMES DE OLIVEIRA

Microdispositivo de poliestireno-toner rotacionalmente controlado por um *hand-spinner* e aplicações no diagnóstico molecular de doenças infecciosas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Goiás (UFG) como requisito para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Linha de Pesquisa: Química Analítica

Orientador(a): Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

GOIÂNIA 2022 Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.



14/06/2022 14:17

SEI/UFG - 2834277 - Ata de Defesa de Tese



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº 140 da sessão da Defesa de Doutorado de Kézia Gomes de Oliveira, que confere o título de Doutora em Química, na área de concentração em Química.

Aos 14 (quatorze) dias do mês de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois), a partir das 08h00, via videoconferência, realizou-se a sessão pública da Defesa de Doutorado intitulada "Microdispositivo de poliestireno-toner rotacionalmente controlado por um hand-spinner e aplicações no diagnóstico molecular de doenças infecciosas.". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG), Prof^a. Dr^a. Andrea Rodrigues Chaves (UFG), Prof. Dr. Evandro Piccin (UFMG) e Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (UFG). Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Doutorado, tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Prof^a. Dr^a. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 14 (quatorze) dias do mês de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/04/2022, às 12:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>. https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento= 3069039&infra_sistema=1... ½

assinatura eletrônica

Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professor do Magistério Superior**, em 14/04/2022, às 12:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 14/04/2022, às 12:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Melo Bailao**, **Professor do Magistério Superior**, em 18/04/2022, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto</u> <u>nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.

A autencidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferi</u> <u>r&id_orgao_acesso_externo=0</u>, informando o código verificador **2834277** e o código CRC **B552147F**.



Referência: Processo nº 23070.010109/2022-41

SEI nº 2834277

https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_docum ento=3069039&infra_sistema=1... 2/2

06/07/2022 16:30

SEI/UFG - 3028134 - Despacho



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE QUÍMICA

DESPACHO

Atesto, na condição de presidente da banca examinadora, conforme o item 04 da instrução normativa da PRPG nº 001, de 27 de março de 2020, que o Prof. Dr. Evandro Piccin (UFMG), participou como membro avaliador da banca examinadora de defesa de doutorado intitulada "Microdispositivo de poliestireno-toner rotacionalmente controlado por um hand-spinner e aplicações no diagnóstico molecular de doenças infecciosas" da discente Kézia Gomes de Oliveira, ocorrida aos 14 (catorze) dias do mês de abril de 2022 (dois mil e vinte dois). Essa declaração se fez necessária em virtude da indisponibilidade da assinatura do professore supracitado no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) daUFG.

Prof^a. Dr^a. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG)

Presidente da Banca Examinadora



Documento assinado eletronicamente por Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professor do Magistério Superior, em 06/07/2022, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?</u> acao=documento conferir&id orgao acesso externo=0, informando o código verificador 3028134 e o código CRC E7C8FFF.

Referência: Processo nº 23070.010109/2022-41

SEI nº 3028134

Referência: Processo nº 23070.010109/2022-41

SEI nº 3028134

https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documen to=3280159&infra_sistema=1...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS que me deu fé perante as dificuldades, iluminou e guiou meus caminhos. Me sinto abençoada por todos que cruzaram meu caminho nesses cinco anos de caminhada.

Agradeço a minha família que sempre esteve ao meu lado no decorrer do curso. Em especial aos meus pais, Juscelino de Oliveira e Fátima Gomes, que sempre investiram e admiraram as pequenas e grandes conquistas que fui obtendo em minha vida, o mundo poderia estar desabando, mas vocês sempre estavam comigo, sempre renovando minhas forças e acalmando meu coração, sem vocês eu não conseguira chegar até aqui, amo vocês mais que tudo nessa vida. Agradeço também a minha querida irmã Raizza de Oliveira que sempre celebrou minhas conquistas, e sempre esteve presente em todas as etapas da minha vida, você é tudo para mim, te amo irmã.

Agradeço ao meu esposo Diego Santos, que sempre esteve ao meu lado, me transmitindo segurança e força, enxergando um potencial em mim, que nem eu enxergo. Obrigada meu amor por todo carinho e paciência que você me proporcionou, inclusive nos tempos iniciais de pandemia, que não foram fáceis, nosso laboratório trabalhando todos os dias sem hora de terminar, trocando o dia pela noite, se possível trabalhando até as 4 da manhã, escutando a seguinte frase de nossa orientadora: Nossos maridos vão nos largar, hahaha. Enfim, você não me largou (hahaha), te amo e te admiro demais Diego.

Agradeço também a minha Orientadora Dr. Gabriela Duarte. Agradeço a você por me transmitir segurança, força e perseverança. Obrigada por investir e cuidar de todos nós do laboratório de Biomicrofluídica com tanto carinho. Me lembro que durante 1 ano de pandemia, a UFG paralisada, sem restaurantes ao redor funcionando, ela sempre levava nosso almoço (feito por ela) e lanche da tarde (em especial o bolo de mouse de chocolate) para que pudéssemos prosseguir com a pesquisa. Esses pequenos gestos fizeram toda diferença, muito obrigada. Enfim, não seremos capazes de retribuir tudo que a senhora fez por nós, mas quero deixar o meu agradecimento. Que Deus possa lhe retribuir com muito sucesso na carreira de docente e dias felizes.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Biomicrofluídica: Geovana, Paulo, Marcio e Laura. Gostaria de agradecer a minha atual IC, Laura Abdallah (a pessoa que tem o caderno mais organizado e detalhado que já vi na vida), que me ajudou a conduzir os experimentos realizados nos últimos 6 meses. Geovanina (minha ex IC que hoje está fazendo doutorado na França, muito orgulho) e Paulo (Estrela, que brilha em tudo que faz), a vida tem sido uma jornada de mais de seis anos com vocês. Gostaria de destacar que todos vocês foram muito além de um apoio científico, muito obrigada pelo companheirismo, amizade, pelo incentivo, pelos choros, pelo apelido caminha (só porque eu tinha ciúme das racks que transportavam as reações e não voltavam mais), pelos momentos de alegria as 4 da manhã, em que ninguém estava funcionando muito bem (A caminha entrou na sala do *amplicon*, SOS eu entrei mesmo). Enfim, obrigada pelos vários momentos compartilhados, pelo aprendizado e pelo convívio diário.

Agradeço também as agências de fomento: Capes, FAPEG, CNPqe MPT.

A todos vocês o meu sincero agradecimento. Obrigada!

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	I
	LISTA DE TABELAS	. IX
	LISTA DE ABREVIATURAS	X
	RESUMO	. XI
	ABSTRACT	XIII
	PREFÁCIO	1
	CAPÍTULO 1	7
	1. INTRODUÇÃO	8
	1.1.2 Microdispositivos rotativos e manipulação dos fluidos através de válvulas	s .8
	1.1.1.1 Dispositivos centrífugos livres de eletricidade	. 11
	1.1.1.2 Microdispositivos rotativos de PeT	. 13
	1.2. OBJETIVOS	16
	1.2.1 Objetivo geral	16
	1.2.2 Objetivos específicos	16
	1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
	1.3.1 Caracterização dos filmes de transparências por espectroscopia	3
n	a região do UV-vis	17
	1.3.2. Fabricação dos microdispositivos de PS-T para análise única	17
	1.3.3 Fabricação dos dispositivos multi-análises	20
	1.3.4. Hand-spinner para gerar a força centrífuga	22

1.3.4.1 Avaliação da eficiência da mistura entre a solução contendo as moléculas de DNA amplificadas e o SYBR Green em diferentes tempos de rotação 2	; 22
1.3.4.2 Otimização da mistura no microdispositivo centrífugo2	23
1.3.4.3 Contagem das rotações por minuto (RPM) de um <i>hand-spinner</i> utilizando recurso <i>slow-motion</i> (câmera lenta) de um smartphone	o 24
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 2	6
1.4.1. Composição do Toner da impressora Brother HL-1212W 2	6
1.4.2 Caracterização dos filmes de transparências por espectroscopia na região do UV-vis 2	6
1.4.3 Funcionamento das válvulas passivas de toner 2	8
1.4.4 Otimizações do microdispositivo de PS-T com detecção <i>endpoint</i> 29	Ļ
1.4.8 Otimizações do microdispositivo de PS-T com detecção <i>on-chip</i> utilizando indicador de pH	9
1.4.9 <i>Layout</i> do microdispositivo para detecção simultânea de três	
arboviroses com detecção envolvendo indicador de pH 4	3
1.5. CONCLUSÃO 4	6
REFERÊNCIAS 4	8
CAPÍTULO 25	2
2.1 INTRODUÇÃO 5	3
2.1.1 Novo Coronavírus, COVID-195	3
2.1.1.1 SARS-CoV-2	54
2.1.2 Diagnóstico molecular da COVID-195	6
2.1.3 Amplificação isotérmica mediada por loop pós Transcrição reversa (RT- LAMP)	58
, 2.1.3.1 Mecanismo da LAMP	58
2.1.3.2 Diagnóstico molecular da COVID-19 em microdispositivos utilizando	
ensaios RT-LAMP	3
2. 2 OBJETIVOS	5

2.2.1 Objetivo geral	65
2.2.2 Objetivos específicos	65
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	66
2.3.1. Cultivo do vírus	66
2.3.2. Amostras clínicas	66
2.3.3. Extração de RNA e RT-qPCR	66
2.3.4. Fabricação do microdispositivo centrífugo PS-T	67
2.3.5. Amplificação RT-LAMP de SARS-CoV-2 em um microdispositivo	D
PS-T centrífugo	68
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
2.4.1. RT-LAMP em microdispositivos de PS-T	73
2.4.1.1 Otimização das condições reacionais da RT-LAMP em microdispositivos de PS-T	s . 73
2.4.1.2. Tempo de incubação da reação RT-LAMP em microdispositivos de PS-1	73
2.4.1.3. Limite de detecção, sensibilidade e especificidade	. 74
2.4.4. Avaliação de RT-LAMP em um ensaio de microdispositivo PS-T	ı
centrífugo em amostras clínicas	79
2.5 CONCLUSÃO	81
2.6 REFERÊNCIAS	83
CAPÍTULO 3	89
3.1 INTRODUÇÃO	90
3.1.1 Arboviroses	90
3.1.1.2 Aedes aegypti	. 91
3.1.2 Métodos para diagnósticos das arboviroses	95
3.2 OBJETIVOS 1	03
3.2.1 Objetivo geral 1	03
3.2.2 Objetivos específicos 1	03
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS 1	05

3.3.1. Amostras clínicas de pacientes infectados por arboví	rus 105
3.3.2. Extração e purificação de RNA	105
3.3.3. RT-qPCR	105
3.3.4 Preparo da mistura reacional RT-LAMP	106
3.3.5 Fabricação dos dispositivos PS-T	108
3.3.6 Amplificação RT-LAMP <i>on-chip</i> e detecção visual	109
3.3.7 Detecção <i>off-chip</i> por separação eletroforética em gel 3% 113	de agarose
3.3.8 Sensibilidade e especificidade	113
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.4.1 RT-LAMP em microdispositivos com amplificação e detecção i	i ntegrada 115
3.5 CONCLUSÃO	130
3.6 REFERÊNCIAS	132
CAPÍTULO 4	139
4.1 INTRODUÇÃO	140
4.2 OBJETIVOS	144
4.2.1 Objetivo geral	144
4.2.2 Objetivos específicos	144
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	145
4.3.1. Amostras clínicas de pacientes infectados por arboví	rus 145
4.3.2. Extração e purificação de RNA	145
4.3.3. RT-qPCR	145
4.3.4 Amplificação por RT-LAMP	146
4.3.4.1 RT-LAMP com leitura visual <i>on-chip</i> utilizando indica 148	ador de pH
4.3.4.1.1 Fabricação dos microdispositivos	
4.3.4.1.2 Amplificação e detecção visual <i>on-chip</i>	

4.3.5	Detecção off-chip por separação eletroforética em gel de agaros	е
3%	157	
4.3.6	Sensibilidade e especificidade 1	57
4.4 R	ESULTADOS E DISCUSSÃO 1	59
4.4.2	OTIMIZAÇÕES DA RT-LAMP COM DETECÇÃO VISUAL	
COLOR	IMÉTRICA1	60
4.4.2	.1 Otimização do tempo de amplificação1	60
4.4.2	.2 Sensibilidade e especificidade1	63
4.4.2	.3 RT-LAMP com detecção visual discriminatória de três	
arbovir	oses em microdispositivos de PS-T em formato de CD1	68
4.4.3	. COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS RT-LAMP <i>ON-CHIP</i>	
UTILIZA	ANDO O INTERCALADOR DE DNA SG E O INDICADOR DE PH	
VERME	LHO DE CRESOL 1	71
4.5 C	ONCLUSÃO 1	75
4.6 C	ONCLUSÃO GERAL 1	77
4.8 R	EFERÊNCIAS 1	82
CUR	RICULUM VITAE	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Movimento giratório e as principais forças que agem sobre o *plug* do fluido. P_w = pressão de bombeamento (gerada pela força centrífuga) e sentida pelo fluido. $F_{E=}$ força de Euler (proporcional à aceleração angular), $F_{C=}$ força de Coriolis (perpendicular à frequência de rotação angular e à velocidade do fluido) e F_w = força centrífuga (agindo radialmente para fora) (Borba, 2017)....

Figura 2. Design e componentes do brinquedo giratório hand-
spinner. Adaptado de (Cohen, et al., 2018)......12

Figura 3. Representação das etapas de fabricação do dispositivo rotativo de PS-T. I) superfície de Pe sendo revestida com uma camada dupla de toner, para fabricação da parte intermediária e impressão da válvula de PS-T; II) Recorte do *layout* e reservatórios microdispositivo via Silhouette Studio®; III) Alinhamento das válvulas e das 4 folhas de PS-T; IV) Dispositivo pronto (pós-laminação).....

Figura 4. Representação das partes que compõem os dispositivosde PS-T. A) Fabricação de placas de PS-T contendo topo, base e3 camadas intermediárias. B) Representação esquemática dascâmaras (M,N,E,R) e válvulas (V1-V5) do dispositivo integrado dePS-T após laminação do dispositivo.

Figura 6. Esquema representativo do CD microfluídico. A) Arquitetura microfluídica para fabricação do CD rotativo. B) Dispositivo integrado contendo a representação das câmaras e válvulas e a representação das 9 câmaras interconectadas por um

9

canal no centro do dispositivo. C) Imagem real do dispositivo e do <i>hand-spinner</i> utilizado	22
Figura 7 . Espectro de transmitância no UV-vis de diferentes filmes de transparência. Pe) Poliéster; PS) Poliestireno	27
Figura 8 . Representação do funcionamento da válvula hidrofóbica. A) Pré-rotação – válvula de fecho; B) pós-rotação – ruptura e abertura da válvula; C) pós-rotação - reagentes acessando a câmara de detecção. A capacidade de reter o fluxo dos fluidos é possível devido a presença de uma superfície hidrofóbica (válvula imprimível de toner) entre duas superfícies hidrofílicas (câmaras e canais de PS). Regiões: 1 e 3) regiões hidrofílicas; 2) região hidrofóbica-válvula de toner; 4) câmara de detecção.	29
Figura 9 . Dimensões dos canais e válvula do dispositivo de PS-T. 1) Dimensões e distancias totais dos canais; 2) Dimensões da válvula impressa de toner.	31
Figura 10 . Fotografia de um dispositivo contendo uma válvula de toner com largura de 2 mm. A) dispositivo sem ser submetido a incubação; B) dispositivo submetido a incubação e rompimento da válvula por capilaridade.	33
Figura 11 . Avaliação do posicionamento das válvulas de toner a diferentes distâncias do centro de rotação para controle do fluxo dos fluidos. Captura de imagens do dispositivo após ser submetido a aquecimento. h1) 30 mm; h2) 35 mm e h3) 40 mm, distância calculada do centro de rotação do dispositivo ao início da válvula. Altura h1 sem ruptura da válvula; h2 e h3 com ruptura das válvulas por capilaridade.	33
Figura 12. Diversos <i>layouts</i> testados para fabricação do dispositivo de PS-T com detecção <i>endpoint</i> .	34
Figura 13 . Otimização do <i>layout</i> dos canais que conduzem as soluções até a câmara de detecção, alterando-o para a forma de junção em Y. Mistura dos reagentes pós-rotação, pós-ruptura da válvula de toner que dá acesso a câmara de detecção	35
Figura 14. Demonstração do centro de rotação, capilaridade, sentido do fluido pré e pós-rotação e distância radial percorrida pelos fluidos após a ruptura da válvula. Pré-rotação, fluidos retidos. Pós-rotação, mistura dos fluidos <i>on-chip</i> .	35
Figura 15. Avaliação da homogeneidade da mistura através da distribuição da cor verde pela aplicação de rotações consecutivas em diferentes direções de rotação (movimento de rotação no sentido horário [H] e anti-horário [AH]). (A) Valor do desvio padrão do tom em diferentes velocidades de rotação, a 600 e 1200 RPM	

por 5 s em cada direção. (B) Avaliação da mistura em diferentes tempos de rotação, 5, 10 e 15 s. (C) Avaliação da mistura por bombeamento centrífugo via <i>hand-spinner</i> , sem controle da taxa de rotação, utilizando 3 operadores diferentes.	36
Figura 16. Demonstração do dispositivo contendo 9 câmaras reacionais, para realização de 3 testes RT-LAMP <i>on-chip</i> simultâneos, com detecção <i>endpoint</i> .	39
Figura 17 . Diversos <i>layouts</i> de orifício de ventilação testados visando distanciar o reservatório de entrada das soluções e o orifício de ventilação do dispositivo de PS-T.	41
Figura 18 . Representação das câmaras (M,N,E,R), reservatórios de entrada, válvulas (V1-V5 com níveis de cinza igual a 100%) e orifícios de ventilação do microdispositivo	42
Figura 19. Representação dos reservatórios de entrada das câmaras (M e N) que compõem o dispositivo de PS-T e dos reservatórios de saída de ar presentes em cada câmara reacional.	45
Figura 20. Diversos protótipos testados para fabricação do dispositivo em formato de disco.	46
Figura 21 . Representação dos princípios que envolvem a composição do vírus SARS-CoV-2. Fonte: Autoria Própria	54
Figura 22 . Tempo de sobrevida do SARS-CoV-2 em diferentes superfícies. Dados presentes no texto: <i>Cleaning and disinfection of environmental surfaces in context of COVID-19</i> , 15 maio de 2020 WHO. Fonte: Autoria Própria.	56
Figura 23 . Ilustração da primeira etapa da amplificação LAMP, a etapa não-cíclica. A) representação esquemática das seis regiões distintas do alvo, denominadas, F3c, F2c,F1c, B1,B2 e B3 e dos sítios de hibridização de cada iniciador, FIP e BIP, e externos, F3 e B3. B) Amplificação enzimática LAMP na etapa não-cíclica para formação do intermediário haste-laço (TOMITA <i>et al.</i> , 2008)	60
Figura 24 . A) Representação esquemática da etapa cíclica de amplificação molecular LAMP. B) Exemplo de uma separação eletroforética via gel de agarose, apresentando as múltiplas estruturas (diferentes tamanhos de fragmentos) formadas ao final da LAMP (TOMITA <i>et al.,</i> 2008).	62
Figura 25. Representação das principais etapas do processo de fabricação. I) Filme de poliestireno revestido com toner em ambos	

os lados para compor a camada intermediária (a) e (b) válvula de

iii

toner impressa na superfície do topo e base dos filmes de poliestireno. II) *Layout* do microdispositivo definidos pelo Silhouette Studio®. III) Alinhamento das válvulas e todas as camadas para laminação do microdispositivo PS-T.....

Figura 26. Ilustração esquemática da amplificação e detecção RT-LAMP em microdispositivos PS-T centrífugos: (1) adição de reagentes e selagem com papel de contato transparente; (2) incubação em um termobloco; (3) centrifugação por *hand-spinner* para ruptura da válvula e (4) detecção visual por radiação UV..... **70**

Figura 29. Detecção visual de produtos de amplificação SARS-CoV-2 *via* RT-LAMP em diferentes quantidades de cópias iniciais do alvo (10⁷-10⁻⁶ cópias de DNA). (A) Detecção visual; (B) análise digital das imagens das reações realizadas em triplicata, pelo software ImageJ, para correlação quantitativa com a intensidade da fluorescência. (C) Separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação *off-chip*. NTC, não **75** contém RNA alvo.

Figura 31. Avaliação da especificidade e análise de amostras clínicas por RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2. (A) Detecção visual no chip. (B) Detecção fora do chip: gel de agarose. **79**

Figura 32. Avaliação da especificidade por RT-LAMP on-chip, avaliando 10 amostras positivas e 10 amostras negativas para infecção por SARS-CoV-2. **80**

67

Figura 33. Representação da qLAMP utilizando sondas fluorescentes. A) representação da etapa não-cíclica presente no mecanismo LAMP. B) Representação da geração do sinal fluorescente, através do distanciamento do quencher presente no final da extremidade 3' do iniciador LB. O complexo Fluoróforoquencher é considerado um iniciador duplex incapaz de emitir fluorescência. Na presença da região-alvo, o complexo se desfaz, emitindo fluorescência, na ausência do alvo o iniciador duplex encontra-se sobreposto/emparelhado ao guencher. A geração do sinal fluorescente só é iniciada após o deslocamento do guencher em relação ao fluoróforo (B). O mecanismo da gLAMP ocorre da seguinte forma: Após a produção do intermediário haste-loop (A), o iniciador LB, hibridiza na sua região complementar localizado entre a região B1 e B2 e direciona a enzima DNA polimerase (Bst) para síntese da fita (B). Posteriormente nessa fita sintetizada contendo o fluoróforo *repórter*, o iniciador FIP reconhecer sua região alvo F2c e direciona a enzima para síntese da fita. Essa síntese acarreta no deslocamento do quencher presente na extremidade 3', o que resulta na identificação da fluorescência, como representado na parte B (Adaptado de Yaren et al., 2017).

Figura 34. Representação das etapas de fabricação de dois diferentes microdispositivos rotativos de PS-T. A e B) dispositivo para análise única. A e C) *layout* e alinhamento das partes que compõem os microdispositivos incluindo: reservatórios, parte intermediária e válvula de PS-T. C e D) Representação das 9 câmaras que compõe o microdispositivo para multi-análise em formato de CD.

109

98

Figura 35. Representação da amplificação e detecção RT-LAMP em microdispositivos rotativos de PS-T em quatro etapas. Etapa: A) adição do intercalador de DNA e da mistura reacional contendo os primers DENV-1, ZIKV e CHIKV e incubação da mistura RT-LAMP; sendo DN – controle negativo do iniciador DENV; DPcontrole positivo do iniciadores DENV; DA - Amostra em iniciadores DENV; 3-6) Iniciadores ZIKV, sendo DN – controle negativo do iniciador ZIKV; ZP- controle positivo do iniciadores 111 ZIKV: ZA – Amostra em iniciadores ZIKV: 7-9) Iniciadores CHIKV: sendo CN - controle negativo do iniciador CHIKV; CP- controle positivo do iniciador CHIKV; CA – Amostra em iniciadores CHIKV. B) Encaixe e fixação do microdispositivo ao hand-spinner com auxílio de fita adesiva e posterior centrifugação via hand-spinner aplicando uma força manual em uma das asas livre para rotação; detecção visual on-chip mediante iluminação UV e captura da imagem por smartphone. Fonte: autoria própria.

Figura 36. Representação das etapas necessárias para realização da leitura visual RT-LAMP *on-chip* em CD microfluidico de PS-T. I) Soluções pré-rotação, pós-incubação a 68 °C por 10 min. II) Movimentação das soluções por bombeamento centrífugo utilizando um girador de mão; C) Leitura e interpretação dos resultados on-chip mediante uma iluminação UV. Fonte: autoria própria.

112

122

Figura 38. Limite de detecção do ensaio RT-LAMP *on-chip* por detecção visual *e off-chio*. Amplificação RT-LAMP utilizando diferentes conjuntos de *iniciadores*. A-C) *iniciadores* DENV I. D-F) *iniciadores* ZIKV. G-I) *iniciadores* CHIKV. A, D, G) amplificação *on-chip* de amostra de RNA . B, E, H) amplificação *on-chip* de amostra de soro. C, F, I Reação *off-chip* avaliados por separação eletroforética em gel de agarose 3%.

Figura 39. CD de diagnóstico multi-análise RT-LAMP *on-chip* com detecção *endpoint* para discriminação do tipo de arbovirose presente na amostra clínica. A) detecção do DENV-1 em amostra de clínica de DENV-1; B) detecção do ZIKV amostra de clínica de ZIKV; C) detecção do CHIKV amostra de clínica de CHIKV; 1-3) Iniciadores DENV-1, sendo 1) DN – controle negativo do iniciador DENV; 2) DP- controle positivo dos iniciadores DENV; 3) DA – Amostra em iniciadores DENV; 4-6) Iniciadores ZIKV, sendo 4) DN – controle negativo do iniciadores ZIKV; 5) ZP- controle positivo do iniciadores CHIKV; 6) ZA – Amostra em iniciadores ZIKV; 7-9) Iniciadores CHIKV; sendo 7) CN – controle negativo do iniciador CHIKV; 8) CP- controle positivo do iniciador CHIKV; 9) CA – Amostra em iniciadores CHIKV.

Figura 41. Representação das partes que compõem os dispositivos de PS-T. A) Fabricação de placas de PS-T contendo topo, base e 3 camadas intermediárias. B) Dispositivos de PS-T em formatos de placas contendo 12 câmaras reacionais distribuídas ao longo de 4 colunas e 3 linhas. C) Disposição das câmaras, canais, e válvulas que compõe o dispositivo integrado de

Figura 43.Esquema representativo do CD microfluídico. A)Arquitetura microfluídica para fabricação do CD rotativo. B)Dispositivo integrado contendo 9 câmaras interconectadas no
centro do dispositivo.151

Figura 45. Representação da etapa de automatização dos reagentes RT-LAMP em microdispositivos integrados de PS-T. A automatização por rotação ocorre em duas etapas. Etapa: I) adição dos iniciadores e amostra II) adição da mistura reacional...

Figura 46. *Layout* do dispositivo de PS-T rotacionalmente controlado por *hand-spinner* para detecção simultânea do: DENV, ZIKV e CHIKV. A) Intitulação das câmaras N e M que contém no dispositivo de multi-análise. C) Vedação das câmaras reacionais R1-R9 e D e E) adição dos reagentes em duas etapas. D) adição dos iniciadores e amostra e E) adição da mistura reacional RT-LAMP.

vii

Figura 50. Dispositivo utilizado para caracterizar e discriminar uma única amostra, inserida em três câmaras distintas do disco. Câmaras 1-3 (iniciadores para detecção do DENV), 4-6 (iniciadores para detecção do ZIKV) e 7-9 (iniciadores para detecção do CHIKV). Câmaras 1,4,7 controles internos negativos, câmaras 2,5 e 8 (controle positivo contendo a sequência-alvo), câmaras 3, 6 e 9 (analito, RNA extraído de uma amostra clínica de soro). 1-3) Iniciadores DENV-1, sendo 1) DN – controle negativo do iniciador DENV; 2) DP- controle positivo dos iniciadores DENV; 3) DA – Amostra de RNA em iniciadores DENV; 3-6) Iniciadores ZIKV, sendo 3) DN – controle negativo do iniciador ZIKV; 4) ZPcontrole positivo dos iniciadores ZIKV; 5) ZA – Amostra de RNA em iniciadores ZIKV; 7-9) Iniciadores CHIKV; sendo 7) CN – controle negativo do iniciador CHIKV; 8) CP- controle positivo do iniciador CHIKV; 9) CA – Amostra de RNA em iniciadores CHIKV.

170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de iniciadores para detecção da COVID-19porRT-LAMP	70
Tabela 2: Sequência dos pares de iniciadores utilizados na qPCRpara detecção de arboviroses e suas temperaturas de anelamento.	107
Tabela 3 . Sequência dos iniciadores usados para detecção dearboviroses por RT-LAMP	108
Tabela 4: Sequência dos pares de iniciadores utilizados na qPCRe suas temperaturas de anelamento.	146
Tabela 5. Sequência dos iniciadores usados para RT-LAMP	147

LISTA DE ABREVIATURAS

µTAS – Micro total analysis systems (Microssistemas para análises totais)

BSA – Bovine serum albumine (Albumina de soro bovina)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

LAMP – Loop-mediated isothermal amplification (Amplificação isotérmica mediada por *loop*)

LoD – Lab-on-a-disc

pb – Pares de bases

PCR – Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PeT – Poliéster-toner

Pe – Poliéster

PS – Poliestireno

PS-T- Poliestireno- toner

POC – Point-of-care

RNA – Ácido ribonucleico

RT-LAMP – *Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification* (Amplificação isotérmica mediada por *loop* pós transcrição reversa)

RT-PCR – *Reverse transcription-polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa)

SG- SYBR Green

TEB - Tris-EDTA-Borato

RESUMO

Em muitos lugares ao redor do mundo, infecções virais transmitidas por artrópodes como a dengue, zika e chikungunya e infecções virais respiratórias, tal como o SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2) tornou-se um grave problema de saúde pública. Assim como para todas as doenças de grande impacto social, o diagnóstico preciso e rápido da infecção, pode ser um grande aliado no tratamento e controle adequado da doença. A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) emergiu no ano 2000 como uma importante alternativa para simplificar o diagnóstico de doencas infecciosas. Além disso, uma vantagem da LAMP é que ela permite uma leitura fácil do resultado através da detecção visual. No entanto, esta etapa deve ser realizada com cautela para evitar contaminação e resultados falso-positivos, especialmente nos casos em que há necessidade de abrir o tubo ao final da reação. Neste sentido, a LAMP realizada em plataformas microfluidicas pode minimizar resultados falso-positivos, além de ter potencial para aplicações no point-of-care. Neste estudo, descrevemos dispositivos microfluídicos centrífugos de poliestireno (PS-T) controlados por hand-spinner para diagnóstico molecular da COVID-19, dengue, zika e chikungunya por RT-LAMP, com detecção colorimétrica integrada e automatizada. Os testes RT-LAMP on-chip foram realizados com dois tipos de detecção diferentes: i) adição automatizada de SYBR Green pós-amplificação (RT-LAMP-SG), ii) e adição do indicador de pH, vermelho de cresol, préincubação (RT-LAMP-VC). A amplificação no teste RT-LAMP-SG foi realizada em uma microcâmara com capacidade de 5 µL e o SG foi adicionado em outra câmara com capacidade para 3 µL, e a reação foi controlada termicamente com um termobloco. Ao final do tempo de incubação (10 min), a detecção foi realizada diretamente no dispositivo por detecção visual após rotação do dispositivo por um hand-spinner. Nossos resultados para os testes com detecção via SYBR Green I demonstram que é possível detectar com sucesso SARS-CoV-2, DENV-1, ZIKV e CHIKV nos microdispositivos e o limite de detecção foi de aproximadamente 10⁻³, 660, 30 e 48 cópias do RNA µL⁻¹ respectivamente. Amostras clínicas de COVID-19 foram testadas utilizando o RT-LAMP-SG, bem como pelo RT-qPCR, protocolo demonstrando desempenho comparável ao ensaio CDC para detecção do SARS-CoV-2 RTqPCR. Para a amplificação RT-LAMP-VC apenas a detecção de arboviroses foi avaliada e apresentou limite de detecção de 1050, 15 e 72,5 cópias µL⁻¹ para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV, respectivamente. Dispositivos em formato de CD foram utilizados com sucesso para realização dos três testes simultaneamente (dengue, zika e chikungunya) para ambos os métodos de detecção (RT-LAMP-SG e RT-LAMP-VC). As metodologias descritas neste estudo representam métodos simples, utilizadas aqui para diagnósticos moleculares rápidos de doenças virais infecciosas em microdispositivos descartáveis, ideais para sistemas de teste no point-of-care.

Palavras-chaves: RT-LAMP, microdispositivos de PS-T, válvulas hidrofóbicas de toner, *hand-spinner*.

ABSTRACT

Infections caused by the new coronavirus (SARS-CoV-2) and arthropod-borne viral infections such as dengue, zika and chikungunya have become a severe public health problem. As all diseases have a significant social impact, the accurate and rapid diagnosis of the infection can be instrumental in treating and adequately controlling the disease. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) emerged in 2000 as an essential alternative to simplify the diagnostics of infectious diseases. An advantage of LAMP is that it allows a straightforward reading of the final result through visual detection. However, this step must be performed with caution to avoid contamination and falsepositive results, especially in cases where there is a need to open the tube. In this sense, LAMP performed on microfluidic platforms can minimize falsepositive results and have potential for point-of-care applications. Here, we describe a polystyrene (PS-T) centrifugal microfluidic device manually controlled by a hand-spinner for molecular diagnosis of COVID-19, dengue, zika and chikungunya by RT-LAMP, with integrated and automated colorimetric detection. The confirmatory and discriminatory on-chip RT-LAMP test was performed with two types of detection: i) automated addition of SYBR Green fluorescent dye post-amplification (RT-LAMP-SG), and ii) addition of the pH indicator. cresol red. pre-incubation (RT-LAMP-CR). **RT-LAMP-SG** amplification was performed in a microchamber with a capacity of 5 µL, and the SG was inserted in another chamber with a 3 µL. The reaction was thermally controlled with a thermoblock. At the end of the incubation time (10 min), the detection was performed directly on the device by visual detection after the microdevice spun with a hand-spinner. Our results for the endpoint detection system for LAMP (RT-LAMP-SG) demonstrate that it is possible to detect SARS-CoV-2, DENV-1, ZIKV and CHIKV in the microdevices with a detection limit of approximately 10-3, 660, 30 and 48 RNA copies µL-1 respectively. Clinical samples of patients infected with COVID-19 were tested using our RT-LAMP protocol as well as by conventional RT-qPCR, demonstrating comparable performance to the CDC SARS-CoV-2 RT-gPCR assay. For the RT-LAMP-CR amplification, only the detection of arboviruses was evaluated and presented a detection limit of 1050, 15 and 72.5 copies per µL for detecting DENV-1, ZIKV and CHIKV, respectively. Devices in CD setup were successfully handled performing the three tests simultaneously (dengue. zika and chikungunya) for both detection methods (RT-LAMP-SG and RT-LAMP-CR). The methodologies designated in this study represent simple methods for rapid molecular diagnostics of infectious viral diseases on disposable microdevices, ideal for point-of-care test (POCT) systems.

Keywords: RT-LAMP, PS-T microdevices, hydrophobic toner valves, hand-spinner.

Prefácio

Este prefácio se faz necessário para esclarecer sua configuração final. Esta Tese apresenta o desenvolvimento de metodologias analíticas associadas a detecção de vírus de RNA em microdispositivos a base de poliestireno-toner (PS-T).

O presente trabalho é um estudo que parte desde o desenvolvimento de microdispositivos rotativos de PS-T, até a aplicação no diagnóstico de doenças virais infecciosas. O estudo visa desenvolver testes moleculares baseados em LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) em plataformas microfluídicas à base de filme de poliestireno, o microdispositivo de PS-T. O microdispositivo de poliestireno-toner rotacionalmente controlado por um *hand-spinner* combina o emprego de válvulas de baixo custo (válvulas hidrofóbicas) e a utilização de um sistema centrífugo livre de energia, *handpowered*, adequados para aplicações no *point-of-care*. Esse sistema manual giratório é simples, fácil de aplicar e acessível, não necessitando de fonte de alimentação (baterias) ou microcontroladores.

Os testes desenvolvidos neste estudo têm um caráter inovador em relação ao método tradicional de diagnóstico molecular baseado em RT-LAMP (em microtubos), que requer a adição manual do intercalador de DNA após o término da etapa de incubação (etapa com maior risco de contaminação).

Inicialmente, o estudo tinha como objetivo geral o desenvolvimento de um dispositivo integrado e automatizado para o diagnóstico molecular de arboviroses com altos riscos epidemiológicos como dengue, zika e chikungunya. A amplificação RT-LAMP e detecção visual seria realizada em dispositivos com custo quase zero utilizando um sistema centrífugo manual a base de um *hand-spinner*. Até a data de qualificação, realizada em 18 de fevereiro de 2020, o presente trabalho já havia avançado no desenvolvimento do dispositivo rotativo e da metodologia RT-LAMP com detecção de *endpoint* utilizando o intercalador de DNA SYBR Green I para o diagnóstico de infecção por zika vírus.

No entanto, vinte e dois dias após a qualificação, no dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a COVID-19 como pandemia e medidas restritivas começaram a vigorar com o intuito de conter a propagação do vírus.

Mesmo diante do cenário desconhecido e assustador de uma pandemia, mas tendo em vista a experiência adquirida desde 2015 no desenvolvimento de testes baseados em LAMP, nosso grupo de pesquisa decidiu utilizar a experiência com os testes moleculares e desenvolver um teste baseado em RT-LAMP para o diagnóstico da COVID-19. A intenção era ajudar a testar a população, desejo impulsionado devido à escassez de testes, que foi um grande problema para o Brasil no início da pandemia, especialmente em pequenos centros.

Assim, o desenvolvimento dos testes baseados em RT-LAMP para o diagnóstico da COVID-19 começou em março de 2020. Desta forma, todos os integrantes do laboratório de Biomicrofluídica interromperam seus projetos e passaram se dedicar integralmente ao projeto da COVID-19 juntamente com dois integrantes do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética – LGMC da UFG. Sendo assim, o projeto de desenvolvimento de metodologias RT-LAMP para detecção das arboviroses foi temporariamente interrompido.

O objetivo era oferecer a população um teste simples e de baixo custo para a o diagnóstico da COVID-19 em locais com pouca infraestrutura laboratorial. Vale ressaltar que o projeto da COVID-19 foi iniciado sem nenhum recurso financeiro, sendo inicialmente um grande desafio. A pequena quantidade de reagentes disponíveis naquele momento (menos de um frasco de enzima) era um fator limitante para a continuidade da pesquisa.

Para o desenvolvimento inicial dos testes uma amostra de cultivo inativado foi fornecida pelo Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB-USP. Posteriormente, a parceria com a Tenda Triagem COVID-19 – UFG, lançada em 20 de maio de 2020, auxiliou na obtenção das amostras reais.

Testes RT-LAMP para detecção do SARS-CoV-2 foram inicialmente conduzidos em microtubos. Cerca de dois meses após o início dos experimentos, o dispositivo de poliestireno toner que já havia sido desenvolvido e otimizado no trabalho das arboviroses, foi utilizado para realizar testes para detecção da COVID-19. Os resultados com os microdispositivos foram promissores. No entanto, a escassez de insumos para dar continuidade à pesquisa se tornou um problema real

Diante disso, a pesquisa foi divulgada em mídias locais da capital. Com isso, surgiram algumas oportunidades de financiamento que permitiram a continuidade das pesquisas para o desenvolvimento de testes para identificação do novo coronavírus. Os auxílios financeiros (FAPEG, CNPq e Ministério Público do Trabalho) permitiram tanto adquirir os insumos quanto estruturar o laboratório, que até então era precário em termos de infraestrutura. Desta forma, os resultados do teste COVID-19 em dispositivos rotativos de poliestireno-toner foram obtidos rapidamente, uma vez que toda arquitetura do dispositivo já estava pronta, e vinha sendo desenvolvida desde o início do doutorado.

Os resultados com o teste rápido para detecção da COVID-19 nos dispositivos rotativos foram publicados na revista *Analyst* como o título: *Rapid molecular diagnostics of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with end-point visual detection.*

Com o avanço da pesquisa, outros métodos de detecção visual foram explorados, como o uso de indicadores de pH para detecção visual dos resultados. Inicialmente os testes realizados em escala convencional (microtubos) foram intitulados, sistema *closed-tube*. Esse sistema *closed-tube* foi utilizado em várias campanhas de testagem da população na cidade de Goiânia (mais de 2000 testes) e também em dois hospitais da Capital, na modalidade *point-of-care*, sendo eles o Hospital do Policial Militar (HPM) e Hospital das Clínicas (HC). Os resultados foram bastante satisfatórios em

relação à especificidade (94,20%) e sensibilidade (88,89%) oferecendo a população um diagnóstico qualitativo (SARS-CoV-2 detectado e nãodetectado) da doença. Os dados obtidos nessas testagens foram publicados em duas revistas científicas: *Analytical Methods* e *Journal of the Brazilian Chemical Society*.

Durante esses dois anos de pandemia, o grupo desenvolveu várias campanhas de testagem usando os testes RT-LAMP. A participação nessas campanhas de testes me proporcionou aprendizado e realização profissional. Todo pesquisador tem este sonho, de ver o que desenvolveu na bancada do laboratório sendo útil para as pessoas.

Além das campanhas de testagem populacional, uma transferência de tecnologia do teste rápido para detecção da COVID-19 foi realizada em 2021, disponibilizando amplamente a tecnologia RT-LAMP desenvolvida neste projeto. Como resultado, o teste está atualmente disponível no mercado.

Foram aproximadamente um ano e meio (março de 2020 a agosto de 2021) dedicados exclusivamente aos testes para diagnóstico da COVID-19 que incluíram: participação em campanhas de testagem, transferência de tecnologia e publicação de artigos científicos.

Os estudos para detecção de arboviroses *on-chip* foram retomados nos últimos seis meses do doutorado. Além disso, o conhecimento para a realização de testes RT-LAMP com detecção visual envolvendo indicadores de pH (adquirido durante os testes da COVID-19) foram aplicados em microdispositivos rotativos PS-T, fornecendo novos caminhos para instrumentação simples, que permitiria portabilidade, integração e automação no desenvolvimento de um ensaio molecular RT-LAMP.

Assim, como resultado do desenvolvimento do diagnóstico *on-chip* para detecção de COVID-19 (não previsto inicialmente), e visando incluir na Tese tanto os testes para arbovírus quanto o teste para COVID-19, a Tese foi intitulada: "Microdispositivos de poliestireno-toner rotacionalmente controlados por *hand-spinner* para aplicações no diagnóstico molecular de doenças infecciosas." Desta forma, esta tese foi dividida em quatro

4

capítulos, e um resumo do que será apresentado em cada capítulo segue abaixo:

Capítulo 1, **Desenvolvimento e otimização de microdispositivos centrífugos controlados por** *hand-spinner*; apresenta a fundamentação teórica e o processo de microfabricação para produção dos microdispositivos rotativos. Este capítulo descreve a fabricação e otimização de todos os dispositivos rotativos utilizados neste estudo. Os capítulos posteriores apresentam as aplicações dos dispositivos rotativos, através das metodologias RT-LAMP para diagnóstico de diferentes doenças infecciosas.

Capítulo 2, **Diagnóstico molecular da COVID-19** *on-chip* com detecção *endpoint* utilizando SYBR Green; apresenta a técnica de amplificação de DNA utilizada neste estudo, nomeada, *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), bem como os parâmetros operacionais para aplicação dessa técnica em dispositivos rotativos de PS-T. De modo geral esse capítulo culmina em dois temas principais: i) o uso do teste RT-LAMP em microdispositivos com detecção *endpoint* utilizando intercalador de DNA SYBR Green I e ii) o diagnóstico rápido da COVID-19.

Capítulo 3, **Diagnóstico molecular de arboviroses** *on-chip* com detecção *endpoint* utilizando SYBR Green; apresenta as metodologias baseadas em RT-LAMP para detecção de dengue, zika e chikungunya em dispositivos rotativos de PS-T operados por um *hand-spinner* para automatizar a detecção visual utilizando SYBR Green I. Este capítulo também apresenta um *lab-on-a-disc* capaz de realizar os três testes simultaneamente.

Capítulo 4, **Diagnóstico molecular de arboviroses com detecção visual on-chip utilizando o indicador de pH vermelho de cresol**; apresenta as metodologias baseadas em RT-LAMP para detecção de dengue, zika e chikungunya em dispositivos de PS-T utilizando indicador de pH detecção visual. Este capítulo também apresenta um *lab-on-a-disc* capaz de realizar os três testes simultaneamente. Este capítulo também apresenta uma breve comparação entre os dois métodos de detecção utilizados nesta Tese (SYBR Green e indicador de pH) aplicados na detecção *on-chip*.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MICRODISPOSITIVOS CENTRÍFUGOS CONTROLADOS POR HAND-SPINNER
1. INTRODUÇÃO

1.1.2 Microdispositivos rotativos e manipulação dos fluidos através de válvulas

O conceito de microssistemas de análise total (*Micro total analysis systems*, μTAS) ou também conhecido como *lab-on-a-chip* (LoC) foi introduzido na década de 90 por Manz e colaboradores (1990) e representa um marco para o desenvolvimento de sistemas analíticos microfluídicos por exibirem a possibilidade de integrar duas ou mais etapas de uma análise em um dispositivo único miniaturizado. De modo geral, grande parte dos componentes essenciais para o processamento automatizado de uma análise podem ser acoplados na plataforma LoC (COLTRO *et al.,* 2007; STROHMEIER, *et al.,* 2015; KONG, *et al.,* 2016).

Uma subcategoria dos sistemas LoC, o *Lab-on-a-disc* (LoD) ou também denominado sistema microfluídico centrífugo, tem emergido nos últimos anos por propiciarem novos caminhos para uma instrumentação mais simples, permitindo portabilidade, integração e automatização das análises. Essa subcategoria não requer bombas e interfaces externas para controle dos fluidos e por esse motivo apresentam potenciais para o desenvolvimento de plataformas no *point-of-care* (POC) (KONG, *et al.*, 2016).

Normalmente as plataformas LoD assumem o formato de um CD e permitem a realização de diversas etapas em um único dispositivo através de um mecanismo simples: o bombeamento de fluidos através da adição de uma força centrífuga (KONG *et al.*, 2016). A força centrífuga atua como uma bomba de líquido e impulsiona o fluido radialmente para fora do centro do disco, o que permite o bombeamento do fluido para diferentes câmaras a partir de uma

taxa de rotação estabelecida (STROHMEIER, *et al.*, 2015; JACKSON, *et al.*, 2016; KONG, *et al.*, 2016). Na grande maioria dos dispositivos LoD, o bombeamento do fluido (por centrifugação) é iniciado ou encerrado em um ponto específico dos microcanais através da presença de válvulas de interrupção, categorizadas como válvulas ativas (exigem acionadores externos) ou passivas (acionadas pela velocidade de rotação) (STROHMEIER, *et al.*, 2015; JACKSON, *et al.*, 2016; ZHU, *et al.*, 2018).

As válvulas passivas (dentre elas, as hidrofóbicas ou capilares) apresentam um método simples para manipulação dos líquidos por direcionar e bloquear o fluxo dos fluidos através de um mecanismo simples de mobilização: o diferencial de pressão (KAZEMZADEH, *et al.*, 2015). A força centrífuga atua como um mecanismo de propulsão ultrapassando a pressão capilar e impulsionando o fluido no sentido contrário ao centro de rotação (KIM, *et al.*, 2008; KAZEMZADEH, *et al.*, 2013). De um modo geral as válvulas passivas sofrem ação da força centrífuga, na qual, a pressão de bombeamento estabelece a mobilidade do fluido (GREENWOOD & GREENWAY, 2002; FENG, *et al.*, 2003; EZKERRA, *et al.*, 2011).

A partir do momento que a dinâmica dos fluidos passa a ser direcionada pela aceleração centrífuga, as pseudoforças ou forças dos corpos inerciais passam a agir sob o *plug* do fluido sendo elas: a pseudoforça, de Euler (momento angular causado pela aceleração e desaceleração, velocidade angular) e pseudoforça de Coriolis (perpendicular ao vetor velocidade). A pseudoforça de Coriolis permite o controle e direcionamento (em uma direção específica) para o bombeamento do fluido. Já a pseudoforça de Euler, associada à Lei de Newton proporciona a turbulência do *plug* durante a mistura, pois está diretamente associada à velocidade angular obtida durante a rotação, logo caso a velocidade angular do disco não mude em relação ao tempo, essa força não é gerada. De acordo com Kong e colaboradores (2016) essas pseudoforças afetam a dinâmica dos fluidos mediante as diferentes posições radiais, conforme mostrado na Figura 1 (REN & LEUNG, 2013A; REN & LEUNG, 2013b; KONG, *et al.*, 2016; BORBA, 2017).



Figura 1. Movimento giratório e as principais forças que agem sobre o *plug* do fluido. P_{ω} = pressão de bombeamento (gerada pela força centrífuga) e sentida pelo fluido. $F_{E=}$ força de Euler (proporcional à aceleração angular), F_{C} = força de Coriolis (perpendicular à frequência de rotação angular e à velocidade do fluido) e F_{ω} = força centrífuga (agindo radialmente para fora) (Borba, 2017).

De modo geral, a operação do dispositivo rotativo consiste basicamente em manipulá-lo de modo que, à medida que o dispositivo é girado, o fluido seja empurrado no sentido contrário ao centro de rotação, podendo ser transportado entre diferentes câmaras através de microcanais. A instrumentação utilizada neste tipo de dispositivo pode ser simplificada e normalmente o bombeamento centrífugo é realizado utilizando um motor (que possui rotação controlada), que, por meio de sua rotação, movimenta os fluidos na direção radial, afastando-o do centro de rotação. A taxa de fluxo dos fluidos dentro dos microcanais depende da velocidade de rotação, tamanho do canal, posição da câmara e viscosidade do fluido. Nesse seguimento, o fluxo em microescala é dominado pela largura e *layout* do canal, geometria da câmera de mistura e pressão induzida via rotação (rotações por minuto, RPM) (REN & LEUNG, 2013B; STROHMEIER, *et al.*, 2015; JACKSON, *et al.*, 2016; BORBA, 2017).

Além disso, segundo Reng e Leung (2013a) a qualidade da vazão e dispersão dos fluidos por difusão em dispositivos rotativos está atribuída a duas variáveis: i) o efeito da aceleração e desaceleração do disco rotativo (modo de agitação) por induzir diretamente na obtenção de uma mistura uniforme e a ii) dimensão do microcanal visto que o fluxo do fluido pode ser interrompido, dado que canais estreitos dificultam a mistura, o que torna a mistura por difusão ineficaz (REN & LEUNG, 2013B).

1.1.1.1 Dispositivos centrífugos livres de eletricidade

Uma das vantagens associadas aos microdispositivos centrífugos LoDs incluem o controle do fluxo do fluido através da velocidade de rotação do disco. Nesse contexto, a busca por metodologias e diferentes abordagens para o controle da rotação do disco tornou-se um dos principais alvos dos pesquisadores da área. Na literatura diferentes sistemas centrífugos são descritos, dentre eles, a utilização de sistemas mecânicos composto por motores e monitorados por softwares (KAZEMZADEH, *et al.*, 2015; JACKSON *et al.*, 2016) e também a utilização de sistemas giratórios livres de eletricidade (manuais) (ZHANG, *et al.*, 2018).

Sistemas centrífugos monitorados por softwares apresentam vantagens como propiciar a rotação do disco de maneira controlada e estável, no entanto requer um sistema controlador (aparelho) atuando como sistema de controle do motor. Por outro lado, os sistemas manuais a base de *handpowered* são simples, de fácil aplicabilidade e acessíveis, não necessitando de fonte de alimentação (baterias) nem microcontroladores, além de serem facilmente aplicáveis para uso no POC (ZHANG, *et al.*, 2018; LIU, *et al.*, 2019).

Recentemente, pesquisadores vem descrevendo sistemas microfluidicos centrífugos que não requerem eletricidade, ou seja, não recorrem a uma fonte de alimentação para operar o motor centrífugo. Em 2018, Zhang e colaboradores (2018) fabricaram e personalizaram um sistema centrífugo similar a um peão, totalmente manual, acionado a mão, para detecção multiplexada de ácidos nucleicos de diferentes bactérias (ZHANG, *et al.,* 2018).

Atualmente, existe na literatura alguns trabalhos que utilizam giradores de mão (conhecido como *hand-spinner*) como sistemas centrífugos para manipulação de fluidos (LIU *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020; MICHAEL *et al.*, 2020). O trabalho descrito por Liu e colaboradores (2018) descreve um mecanismo de separação de componentes do sangue (separando plasma e glóbulos vermelhos) através da força centrífuga aplicada pelo movimento de rotação imposto pelo *hand-spinner*. Os trabalhos descritos por Michael e

colaboradores (2020) e Li *et al.,* (2020) descrevem um mecanismo de força centrífuga para concentrar patógenos bacterianos em amostra de urina (MICHAEL et al., 2020).

Neste trabalho iremos demonstrar a utilização de um *hand-spinner*, para controle de válvulas passivas de toner afim de automatizar etapas analíticas, uma vez que esse dispositivo centrífugo é simples, apresenta simplicidade de manuseio e funcionamento, alta eficiência de rotação e não requer eletricidade para manuseio.

Em sua grande maioria esses giradores comerciais são equipados com três asas que apresentam pesos igualmente distribuídos em relação ao centro de rotação (KOO & TAMURA, 2018). A centrifugação é iniciada através de um impulso gerado à mão (força externa) na região das asas do *hand-spinner*. Esse impulso induz as asas a girarem em torno do eixo central através de um mecanismo de rolamento de esferas presente no centro da estrutura plana. Essas esferas promovem a regulação do atrito, reduzindo o atrito durante a rotação, desse modo, embora o impulso seja pouco a velocidade de rotação permanece alta, em decorrência do baixo atrito entre o anel externo e o interno (Figura 2) (COHEN, *et al.*, 2018).



Figura 2. *Design* e componentes do *hand-spinner*. Adaptado de (Cohen, *et al.,* 2018).

1.1.1.2 Microdispositivos rotativos de PeT

Os filmes comerciais de poliéster (Pe) classificado como, materiais poliméricos, receberam destaque na microfluídica em 2003 quando pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP, Brasil) descreveram pela primeira vez a fabricação de um microdispositivo de poliéster-toner (PeT) (DO LAGO *et al.*, 2003). Esse dispositivo apresentou uma fabricação simples e fácil, por ser manufaturado a partir do processo de impressão a laser ou também descrito como xerográfico (impressão direta).

Na fabricação desses dispositivos, o toner como matéria prima, apresenta caráter hidrofóbico e proporciona um aspecto bifuncional: i) define a geometria ou arquitetura fluídica, bem como a criação de microcanais determinados pela região que o toner não é depositado no substrato de Pe e ii) e apresenta propriedade adesiva quando submetido a temperaturas que variam de 100-150 °C (DO LAGO *et al.,* 2003; OUYANG 2013; THOMPSON *et al.,* 2015).

A profundidade dos canais dos dispositivos descritos por Do *Lago et al.,* (2003) dependiam de parâmetros de impressão. Em dispositivos fabricados via camada simples de toner (CTS), os canais apresentam uma profundidade de 6 μ m. Já em dispositivos fabricados via camada dupla de toner (CTD) os canais apresentam uma profundidade com valores aproximados de 12 μ m (DO LAGO *et al.,* 2003; OUYANG *et al.,* 2015).

Visando obter canais mais profundos, em 2011, Duarte *et al.*, modificaram o processo de fabricação anteriormente proposto por Do Lago *et al.* (2003), descrevendo um novo método de fabricação para os dispositivos de PeT: o método PCL (*Print-Cut-Lamination* ou Impressão, corte e laminação). Esse método propiciou a criação de câmaras e canais mais profundos (superiores a 200 µm) através da utilização de múltiplas camadas de PeT, com *layouts* dos canais definidos por uma cortadora a laser. Na etapa de fabricação desses dispositivos canais mais profundos passaram a ser definidos por empilhamento de filmes de poliésteres revestidos com uma camada de toner (DUARTE *et al.*, 2011). Diversos dispositivos fabricados pelo processo de

fabricação *PCL* vem sendo relatados na literatura, variando de três a sete camadas totais de filmes de poliéster (DUARTE *et al.*, 2011; OUYANG *et al.*, 2013; OUYANG *et al.*, 2015; THOMPSON *et al.*, 2015; DUVALL *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; GIMENEZ *et al.*, 2017; GABRIEL *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2019).

Visando aumentar as funcionalidades dos dispositivos de PeT, em 2013, Ouyang e colaboradores descreveram um microdispositivo de PeT com capacidade de integração fluídica através da microfabricação de válvulas hidrofóbicas de toner. O protocolo descrito por Ouyang *et al.*, (2013) manteve o processo de fabricação PCL descrito por Duarte *et al.* (2011), porém propôs a fabricação de válvulas hidrofóbicas modeladas por litografia a laser (impressão direta) (OUYANG *et al.*, 2013).

O funcionamento das válvulas hidrofóbicas de toner baseou-se em alterações do ângulo de contato do substrato de Pe através da deposição de diferentes densidades de toner. Originalmente as superfícies dos filmes de poliéster são hidrofílicas, com ângulo de contato de 51° para água. No entanto, a deposição de toner nesse filme torna a superfície hidrofóbica, apresentando um ângulo de contato de 96-111° (dependendo da escala de cinza, cor e composição do cartucho de toner impressa na superfície do Pe). Essa modificação da superfície do Pe, permite a mobilização de soluções por intermédio das interações hidrofóbicas fluido-superfície, o que leva ao bloqueio do fluxo do fluido dentro de um microcanal (OUYANG *et al.,* 2013).

As válvulas de toner são classificadas como válvulas passivas hidrofóbicas e provaram ser eficazes com soluções aquosas. Essas válvulas apresentam capacidade de fecho, porém são facilmente abertas pela aplicação de uma força centrífuga (frequência de ruptura). As frequências de ruptura são controladas através da arquitetura das válvulas (geometria, tamanho, posição e também da escala de cinza impressa no substrato de Pe). A mistura passiva dos fluidos dentro de um microcanal é acionada pelo bombeamento centrífugo que origina a mobilização do fluido (OUYANG *et al.,* 2013; OUYANG *et al.,* 2015; THOMPSON *et al.,* 2015; DUVALL *et al.,* 2016).

Os objetivos das válvulas de toner são controlar, liberar e direcionar o 14

fluxo dos fluidos em microcanais interconectados a diferentes câmaras presentes nos microdispositivos de PeT (OUYANG *et al.*, 2013; THOMPSON *et al.*, 2015). De modo geral, as válvulas de toner atuam como um método de manipulação fluídica, através da criação de barreiras hidrofóbicas, cujo processo visa interromper a mobilidade do fluido congruente ao rompimento da pressão capilar. A pressão capilar que o fluido exerce na barreira é ultrapassada através da adição de uma força centrífuga que age radialmente para fora, propiciando a ruptura da válvula e posterior mobilidade do fluido no sentido contrário ao centro de rotação (BORBA, 2017).

Na literatura encontram-se alguns trabalhos envolvendo a utilização de válvulas impressas de toner para integração de etapas analíticas em dispositivos microfluídicos de poliéster-toner. Em todos eles o controle da entrada e saída de soluções através das válvulas, baseiam-se em motores centrífugos governados por software (OUYANG *et al.*, 2013; THOMPSON *et al.*, 2015; JACKSON *et al.*, 2016; OUYANG *et al.*, 2016; DUVALL *et al.*, 2016; BORBA, 2017; ARJMAND, *et al.*, 2018). Diante disso, este estudo teve como objetivo utilizar um sistema centrifugo livre de eletricidade (*hand-spinner*) para controle de válvulas hidrofóbicas de toner. Pela primeira vez esse aparato de fácil manuseio foi utilizado com a finalidade de automatizar diferentes etapas para aplicações no diagnóstico molecular em dispositivos microfluídicos.

Ademais, neste estudo o filme de poliéster (Pe) foi substituído por filme de poliestireno (PS) devido a sua maior transparência, facilitando a etapa de detecção visual *on-chip*. Embora o filme de transparência tenha sido trocado neste trabalho, o conceito dos dispositivos de PeT e PS-T são os mesmos, sendo válidas as mesmas considerações.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e otimizar *layouts* de dispositivos centrífugos de poliestireno-toner (PS-T) que melhor se enquadrem nas aplicações em testes moleculares baseados na reação isotérmica de amplificação de DNA (RT-LAMP) com detecção visual *on-chip* para detecção de diferentes patógenos. Os dispositivos deverão apresentar fácil manipulação uma vez que serão controlados por sistemas centrífugos manuais a base de *hand-spinner*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes *designs* do dispositivo para o seu melhor funcionamento, evitando evaporação das soluções e promovendo a homogeneidade das misturas.
- ii) Otimizar os parâmetros das válvulas hidrofóbicas de toner controladas por bombeamento centrifugo.
- iii) Integrar e automatizar duas etapas (amplificação de DNA e detecção visual) em um dispositivo de PS-T através de força centrífuga gerada por um *hand-spinner*.
- iv) Desenvolver o otimizar *layouts* de dispositivos para dois tipos de detecção visual da reação RT-LAMP: i) com SYBR Green pósamplificação (RT-LAMP-SG), ii) com indicador de pH, vermelho de cresol, pré-incubação (RT-LAMP-VC).
- v) Desenvolver e otimizar dispositivos em formato de CD para realização de múltiplas análises RT-LAMP simultaneamente.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Caracterização dos filmes de transparências por espectroscopia na região do UV-vis

As medidas de transmitância dos substratos foram efetuadas no espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 45 da PerkinElmer). Os filmes analisados (Poliéster e Poliestireno) foram cortados a 1 cm². O espectro foi produzido fazendo uma varredura de 200 a 800 nm, de forma a caracterizar a transmitância de cada filme.

1.3.2. Fabricação dos microdispositivos de PS-T para análise única

Filmes de poliestireno (Filipaper InkJet Light, FP02603) recobertos com toner foram utilizados na fabricação dos microdispositivos. Os microchips PS-T foram fabricados usando o protocolo de impressão, corte e laminação (PCL) previamente descrito (DUARTE *et al.,* 2011). No entanto, com o intuito de simplificar o processo de fabricação e reduzir custos, neste trabalho a cortadora a laser foi substituída por uma cortadora *Plotter* de recorte (Silhouete Cameo, Brasil) para criar as arquiteturas multicamadas.

O primeiro dispositivo desenvolvido neste trabalho foi um dispositivo rotativo para integração e automatização da etapa de amplificação de DNA e detecção visual *endpoint* utilizando SYBR Grenn I. Para fabricação deste dispositivo de PS-T foram utilizados 4 filmes de poliestireno, divididos em: topo, base e duas partes intermediárias. A camada inferior (base) e superior (topo) do microdispositivo são películas de poliestireno com espessura média de 100 µm com válvulas hidrofóbicas modeladas por impressão a laser. Já nas

camadas intermediarias os filmes de poliestireno foram recobertos com toner em ambos os lados usando uma impressora a laser (Brother HL-1212W) e com as regiões recortadas pela cortadora, afim de criar as estruturas desejadas.

A impressora foi usada para imprimir as partes intermediárias (dupla camada de toner em cada lado, 100% da escala de cinza) e as válvulas no filme de poliéster (topo e base). A válvulas foram otimizadas utilizando diferentes escalas de cinza (de 80% a 100% em incrementos de 2%) operando a 600 pontos por polegada (ppp). Somente na camada superior (topo) do dispositivo, furos de acesso foram cortados para criar reservatórios de entrada e saída de soluções.

O *layout* das câmaras e canais do dispositivo foram projetados usando o *software* Silhouete Studio®. Posteriormente, as câmaras e canais das camadas intermediárias do dispositivo foram recortados com auxílio de uma *Plotter* de recorte (Silhouete Cameo, Brasil). Todas as camadas foram alinhadas e laminadas juntas usando uma laminadora de escritório (230c - A4) a 160 °C. A Figura 3 mostra as etapas de fabricação do microchip.



Figura 3. Representação das etapas de fabricação do dispositivo rotativo de PS-T. I) superfície de Pe sendo revestida com uma camada dupla de toner, para fabricação da parte intermediária e impressão da válvula de PS-T; II) Recorte do *layout* e reservatórios microdispositivo via Silhouette Studio®; III) Alinhamento das válvulas e das 4 folhas de PS-T; IV) Dispositivo pronto (pós-laminação).

Conforme observado na Figura 3 (IV), cada dispositivo acomodou três câmaras com profundidade de ~248 μ M, sendo uma câmara de reação RT-LAMP, uma câmara para SYBR Green I e uma câmara de detecção. A geometria das câmaras foi projetada para conter diferentes volumes de solução. A câmara de reação RT-LAMP (Câmara 1) foi projetada para conter 5 μ L da mistura principal, a câmara de SybrGreen I (SG) foi projetada para conter 8 μ L da mistura.

Outro *layout* de dispositivo foi desenvolvido neste estudo com o objetivo de realizar múltiplas análises RT-LAMP utilizando indicadores de pH para detecção visual. Entretanto, para a otimização das condições experimentais para cada alvo utilizou-se inicialmente um dispositivo para análise única. A prototipação das estruturas microfluídicas deste dispositivo de análise única foram realizadas de maneira similar a Figura 3, alterando a profundidade (~372 µM) e o *layout* das câmaras criadas via *plotter* de recorte (Silhouette Cameo, Brasil), conforme pode ser observado na Figura 4.





19

A Figura 4 ilustra o *design* de um dispositivo integrado, utilizando válvulas para a liberação e controle de soluções. A válvulas foram otimizadas em relação as posições e escalas de cinza na impressão (de 80% a 100% em incrementos de 2%) operando a 600 pontos por polegada (ppp). O dispositivo integrado acomodou quatro câmaras com geometrias variadas para a manipulação de diferentes volumes de solução. As câmaras M e R apresentaram como figura geométrica uma circunferência, com raios que equidistavam a 2,5 e 1,5 mm, com capacidade de 10 e 7 μ L de solução respectivamente. Já as câmaras de reação E e N foram projetadas para 3 μ L.

1.3.3 Fabricação dos dispositivos multi-análises

O processo de fabricação do dispositivo em formato de CD de poliestireno-toner para multi-análise apresentou dois *layouts* diferentes, a depender do método de detecção visual utilizado.

O primeiro *layout*, utilizado para detecção utilizando SYBR Green I, foi similar ao descrito anteriormente no tópico 1.3.1 (Figura 3) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021) para análise única, modificando apenas a quantidade de câmara reacionais, que ao invés de 1 câmara reacional esse dispositivo conteve 9 câmaras (Figura 5) para realização de 3 testes simultâneos. As 9 câmaras foram distribuídas ao longo de uma semicircunferência de 118 mm de diâmetro (Figura 5C e D). O CD microfluídico foi composto por 4 camadas, como pode ser observado na Figura 5C. Dentre as quatro camadas, duas camadas incluem filmes de poliestireno com válvulas de toner impressas que foram otimizadas na superfície do filme (topo e base) e duas camadas intermediarias contendo o *layout* das câmaras e canais recordados em filmes de poliestireno recobertos uniformemente com duas camadas de toner nos lados superiores e inferiores da transparência.



Figura 5. Representação das etapas de fabricação do microdispositivo rotativo de PS-T multi-análise. A) *layout* e alinhamento das partes que compõem os microdispositivos incluindo: reservatórios, parte intermediária e válvula (6x3 mm). B) Imagem real do dispositivo contendo a representação das câmaras que compõe o microdispositivo para realização de multi-análises e imagem real do *hand-spinner* utilizado.

O segundo *layout*, utilizado para detecção visual com indicador de pH, foi similar ao descrito anteriormente no tópico 1.3.1 (Figura 4), entretanto, ao invés de conter uma única câmara reacional esse dispositivo contém 9 câmaras interconectadas por uma câmara de distribuição central para distribuição automatizada da mistura principal, visando a realização de 3 testes simultâneos (Figura 6). O dispositivo em formato de CD microfluídico foi composto por 5 camadas de poliestireno e apresentou 9 câmaras independentes (Câmaras N1-N9) e uma câmara de distribuição da mistura principal que interconectou 9 câmaras individuais (M) no centro do dispositivo através um canal semi-circular. Ao lado das câmaras de adição da mistura principal encontram-se as câmaras de adição dos iniciadores específicos para cada teste juntamente com a amostra (câmara N). Resumidamente, o dispositivo contou com 9 câmaras reacionais (R), distribuídas ao longo de uma semicircunferência de 118 mm de diâmetro, como pode ser observado na Figura 6.



Figura 6. Esquema representativo do CD microfluídico. A) Arquitetura microfluídica para fabricação do CD rotativo. B) Dispositivo integrado contendo a representação das câmaras e válvulas e a representação das 9 câmaras interconectadas por um canal no centro do dispositivo. C) Imagem real do dispositivo e do *hand-spinner* utilizado.

1.3.4. Hand-spinner para gerar a força centrífuga

Utilizamos um girador de mão para fornecer uma força centrífuga contínua, com apenas o toque de um dedo, fornecendo a abertura da válvula e promovendo a mistura entre soluções.

1.3.4.1 Avaliação da eficiência da mistura entre a solução contendo as moléculas de DNA amplificadas e o SYBR Green em diferentes tempos de rotação

A eficiencia da mistura entre as soluções foi avaliada através da uniformidade da cor fluorescente na câmara de detecção do dispositivo de PS-T. A uniformidade da cor foi avaliada com base nos valores dos desvios padrões da intensidade da cor verde obtida após a abertura da válvula e mistura das soluções (*amplicons* RT-LAMP e SG). Após o final da rotação, as imagens foram obtidas com o auxílio da câmara de celular. As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ, e a intensidade da cor verde foi medida utilizando os canais de cores RGB (red,green,blue).

1.3.4.2 Otimização da mistura no microdispositivo centrífugo

Um estudo preliminar foi realizado para investigar o desempenho do hand-spinner para fornecer uma mistura homogênea das soluções no microdispositivo na etapa de detecção visual endpoint, permitindo a leitura correta dos resultados. Utilizamos como padrão de referência a homogeidade da cor da solução quando a mistura foi realizada em microtubos (completa homogeneidade da solução). Para isso, realizou-se a mistura entre as soluções (amplicons RT-LAMP e SG) em um microtubo e após a agitação em vórtex inseriu-se a mistura na câmara de detecção do dispositivo microfluídico. A eficiência da mistura foi avaliada por análise de cor (fluorescência verde) da solução do amplicon após a mistura com o intercalador de DNA (SYBR Green I), através de capturas de imagens por smartphone. As imagens capturadas foram avaliadas pelo software ImageJ, calculando a intensidade da cor presente na câmara de detecção (em 3 regiões distintas da microcâmara) utilizando a intensidade do verde nos canais de cores RGB (vermelho, verde, azul). Com os dados de intensidade de verde dos três pontos na câmara de detecção calculou-se o desvio padrão da intensidade de cor. Valores de desvios obtidos no padrão de referência foram de ~1 e foram considerados como homogeneidade completa.

Posteriormente, para avaliar a eficiência da mistura no microdispositivo on-chip, 5 µL de solução de produtos RT-LAMP foi inserido na câmara 1, enquanto 3 µL de SYBR Green I foram adicionados à câmara 2. Diferentes protocolos de rotação foram testados usando girador de mão até que a melhor condição de homogeneidade das misturas fosse encontrada. A eficiência da mistura foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão da intensidade da cor verde em diferentes posições da câmara de detecção ao final das etapas de mistura. Um total de cinco microdispositivos por teste foram analisados. Os valores foram comparados com um desvio padrão da cor verde obtido dos reagentes pré-misturados (em um tubo) introduzidos na câmara de detecção (~1).

Para obter um desvio padrão similar ao valor do desvio padrão referência, diferentes parametros foram avaliados incluindo: taxa de rotação (300-1200), tempo de rotação (5-20 s) e sentido de rotação (horario e anti-horário).

Após o final da rotação, as imagens foram obtidas com o auxílio da câmara de celular. As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ, e a intensidade da cor verde foi medida utilizando os canais de cores RGB (red,green,blue).

1.3.4.3 Contagem das rotações por minuto (RPM) de um *hand-spinner* utilizando o recurso *slow-motion* (câmera lenta) de um smartphone

Para contagem de rotações por minuto do *hand-spinner*, foi utilizado o recurso *slow-motion* aplicado em uma câmera do smartphone Moto Z 2 Play (Motorola, Brasil). Os vídeos foram gravados em resolução full HD (1080p) a 60 quadros por segundo (FPS), resolução que permitiu capturar e traduzir em múltiplos quadros todos movimentos obtidos durante a rotação do *hand-spinner*.

Para a gravação do vídeo *slow-motion* alguns parâmetros para concentrar as observações da rotação do dispositivo foram estabelecidos. Inicialmente estabeleceu-se a posição inicial do movimento. Para esse fim, o dispositivo de PS-T foi fixado a uma das asas do girador funcionando como

uma asa marcada para concentrar as observações. Em seguida, um ponto fixo foi anexado e alinhado a sete centímetros (7 cm) da asa marcada.

Após estabelecer o ponto fixo, a gravação foi iniciada e finalizada em um tempo específico monitorado por cronometro. O vídeo posteriormente foi analisado, e a quantidade de rotações em um intervalo de tempo eram proporcionais a quantidade de voltas que o dispositivo de PS-T ultrapassava o ponto fixo, ou seja, retomava à posição inicial.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1. Composição do Toner da impressora Brother HL-1212W

De acordo com a ficha de dados de segurança (*Safety data sheet*) fornecida pela indústria Brother, Ltd., o cartucho de toner preto (TN-1060), apresenta em sua composição, 1) 5-10 % de Sal de N, N-dietil-N-metil-2 - [(2-metil-1-oxo-2- propenil) oxi] etanamínio com polímero de ácido 4-metilbenzenossulfônico (1: 1) com 2-propenoato de butila e etenilbenzeno (*N*,*N*-*Diethyl-N-methyl-2-[(2-methyl-1-oxo-2- propenyl)oxy]ethanaminium salt with 4-methylbenzenesulfonic acid (1:1) polymer with butyl 2-propenoate and ethenylbenzene*); 2) 2,5-5,5% de carbono preto (ligado); 3) 1-2,5 % de *Rosin, fumarated* e 4) uma porcentagem não classificada de resina de poliéster.

1.4.2 Caracterização dos filmes de transparências por espectroscopia na região do UV-vis

Neste estudo, substituímos os filmes de poliéster, comumente utilizados para a fabricação de microdispositivos, por filmes de poliestireno. Essa troca foi realizada visando a etapa de detecção visual da reação RT-LAMP no microdispositivo, uma vez que os filmes de poliestireno são mais transparentes à radiação UV a 320 nm do que os filmes de poliéster, como mostrado na Figura 7, aumentando a sensibilidade da detecção visual *on-chip*.



Figura 7. Espectro de transmitância no UV-vis de diferentes filmes de transparência. Pe) Poliéster; PS) Poliestireno.

Através do espectro de transmitância UV-Vis (Figura 7), foi observado que o filme de poliestireno mostra um espectro de transmitância significativo acima de 290 nm, enquanto as transparências de poliéster mostram um espectro de transmitância significativo apenas acima de 340 nm. Provavelmente o filme de transparência de poliéster funciona como um filtro, não permitindo que a luz ultravioleta atinja a solução de forma efetiva, não causando excitação efetiva e, assim, reduzindo o percentual de transmitância na região visível do espectro. Desse modo, o espectro mostrado na Figura 7 demonstraram que 90,42% da radiação é transmitida por poliestireno em um comprimento de onda de 320 nm em vez de ~50% como observado para o filme de poliéster.

A fim de fornecer uma melhor visualização da fluorescência transmitida diretamente na câmara do microdispositivo e promover um aumento na emissão de fluorescência após a excitação, substituímos o filme de poliéster por filme de poliestireno. Em relação ao desempenho da reação RT-LAMP, o filme de poliestireno apresentou a mesma compatibilidade com os reagentes RT-LAMP que os filmes de poliéster.

1.4.3 Funcionamento das válvulas passivas de toner

Na plataforma microfluídica centrífuga, o fluxo e a mistura de fluidos são estabelecidos por um bombeamento centrífugo. Na falta de uma pressão centrífuga, o fluido não é movimentado (válvula de fecho). No entanto, uma vez que a velocidade de rotação é acionada, a pressão centrífuga supera a pressão capilar e ocasiona a ruptura da válvula (abertura da válvula).

A Figura 8 representa o funcionamento da válvula passiva de toner. As válvulas hidrofóbicas de toner (região 2) interrompem o fluxo direto do fluido delimitado pelas regiões hidrofílicas, 1 e 3. Inicialmente, os fluidos são inseridos na região 1, esses percorrem toda região hidrofílica finalizando na barreira hidrofóbica, a válvula de toner (região 2) (Figura 8A). Posteriormente o dispositivo é submetido à centrifugação, utilizando um *hand-spinner*, desse modo, uma pressão induzida (pressão centrífuga) é gerada e ultrapassa a pressão capilar do sistema, o que ocasiona a ruptura (abertura) da válvula (Figura 8B). Após essa etapa de abertura da válvula, os diferentes fluidos acessam a câmara de detecção (Figura 8C) e a etapa de mistura entre dois reagentes é iniciada.



Figura 8. Representação do funcionamento da válvula hidrofóbica. A) Pré-rotação – válvula de fecho; B) pós-rotação – ruptura e abertura da válvula; C) pós-rotação - reagentes acessando a câmara de detecção. A capacidade de reter o fluxo dos fluidos é possível devido a presença de uma superfície hidrofóbica (válvula imprimível de toner) entre duas superfícies hidrofílicas (câmaras e canais de PS). Regiões: 1 e 3) regiões hidrofílicas; 2) região hidrofóbica-válvula de toner; 4) câmara de detecção.

É importante relatar que, uma vez que a válvula de toner é rompida, a mesma não tem capacidade de fecho novamente, logo o dispositivo é considerado descartável e de uso único (MOHAMMADZADEH *et al.,* 2018; JACKSON *et al.,* 2016).

1.4.4 Otimizações do microdispositivo de PS-T com detecção endpoint

1.4.4.1 Densidade de toner das válvulas e desempenho da barreira hidrofóbica

Segundo Ouyang *et al.,* 2013, filmes de transparência apresentam características hidrofílicas, com ângulos de contato de 51° para água. No entanto, a deposição de toner nessa mesma transparência modifica a propriedade hidrofílica do material e, portanto, altera o ângulo de contato em uma faixa de 96-111° o que torna esse material hidrofóbico (OUYANG *et al.,* 2013). Essa modificação de baixa complexidade permite tanto a delimitação

de microcanais e microcâmaras quanto à interrupção do fluxo do fluido. Além disso, o controle da intensidade de toner depositada no filme, influencia diretamente na frequência de rotação necessária para ruptura dessas barreiras hidrofóbicas.

Nesse trabalho, a eficiência da barreira hidrofóbica da válvula foi verificada mediante a deposição de diferentes densidades de toner (87-100%) na superfície dos filmes de poliestireno. Níveis de escala de cinza, inferiores a 99,4% e resolução inferior a 600 dpi, não apresentaram boa retenção dos fluidos (dados não apresentados).

Ao variar os níveis de escala de cinza, os melhores resultados que garantiram o bom desempenho das válvulas passivas e interromperam de forma eficiente o fluxo dos fluidos dentro dos microcanais, foram: resolução 600 dpi e 100% da escala de cinza, similar aos resultados obtidos por Thompson *et al.*, 2015 e Jackson *et.et al.*, 2016.

A porcentagem de toner fixada a 100% teve como objetivo assegurar que o fluxo dos fluidos seria direcionado apenas via rompimento por pressão adicional (centrifugação) e não por capilaridade (THOMPSON *et al.,* 2015; JACKSON *et al.,* 2016; BORBA, 2017). Hipoteticamente essa alta porcentagem de toner (100%) pode estar relacionada à composição dos cartuchos da marca Brother, considerados cartuchos puramente poliméricos (85-87% de copolímero estireno-acrilato) (OUYANG *et al.,* 2013).

1.4.4.2 Dimensões da válvula de ruptura

As válvulas hidrofóbicas foram construídas baseadas no estudo conduzido por Ouyang *et al.*, 2013 e Thompson *et al.*, 2015. As válvulas impressas de toner presentes no topo e base devem ser alinhadas como uma imagem especular e devem conter uma geometria que exiba no mínimo o comprimento do canal, para garantir a interrupção do fluido (THOMPSON *et al.*, 2015).

Em nossos experimentos optamos por uma válvula com comprimento

superior ao canal, para evitar qualquer ruptura ou vazamento do fluido no decorrer do canal. Este dispositivo foi composto por uma única válvula com comprimento de 6 mm. Essa dimensão foi baseada nas dimensões dos respectivos canais (0,85 mm) que encontram-se separados a uma distância de 2,5 mm (distancia total: 4,20 mm), conforme representado na Figura 9.



Figura 9. Dimensões dos canais e válvula do dispositivo de PS-T. 1) Dimensões e distancias totais dos canais; 2) Dimensões da válvula impressa de toner.

A largura da válvula também foi avaliada, uma vez que a eficiência das válvulas passivas é altamente dependente de sua geometria (BAUER *et al.,* 2019). Apesar da simplicidade de execução, que a torna atraente para dispositivos POCT, problemas relacionados a boa retenção dos fluidos podem normalmente ocorrer durante a operação do dispositivo.

Visando avaliar a retenção de fluidos em função da geometria da válvula de toner, diferentes larguras foram testadas (2-4 mm). Foi verificado que válvulas com largura igual a 2 mm não são adequadas para reter os fluidos. A Figura 10 mostra o movimento do fluido no microcanal, verificado após 1 min de incubação quando se utilizou uma válvula com 2 mm de largura. Conforme observado na Figura 10, o efeito da pressão capilar na superfície dessa válvula foi o suficiente para abri-la. Não obstante esse rompimento acarretou ao esvaziamento completo da câmara, visto que o líquido continuou a fluir na direção do microcanal.



Figura 10. Fotografia de um dispositivo contendo uma válvula de toner com largura de 2 mm. A) dispositivo sem ser submetido a incubação; B) dispositivo submetido a incubação e rompimento da válvula por capilaridade.

A fim de controlar e manipular o fluxo de fluido por ação da pressão centrífuga e não por capilaridade, os seguintes parâmetros da válvula foram fixados neste dispositivo: largura a 3,3 mm, comprimento 6 mm e escala de cinza a 100 %.

1.4.4.3 Posicionamento das válvulas de toner

Para obter uma boa retenção do fluido, o posicionamento das válvulas passivas foi examinado, visou-se estabelecer a mobilidade do fluido via pressão centrífuga, e não por vazamentos ou rompimentos por capilaridade. Avaliou-se o movimento do fluxo de dois líquidos (solução contendo *amplicons* e intercalador SG) posicionando a válvula em diferentes distâncias do centro de rotação, conforme mostra a Figura 11.

A)



Rompimento da válvula Rompimento da válvula

Conforme observado na Figura 11, válvulas mais distantes do centro de rotação geraram alta pressão capilar e de modo consequente promoveram a ruptura (explosão) da válvula. Com intuito de evitar que a força capilar atuasse com um mecanismo de propulsão (impulsionando o fluido para a câmara de detecção) as válvulas foram posicionadas logo abaixo da câmara reacional (entre o final da câmara e o início do microcanal) (Figura 11, h1).

1.4.5 Layout dos dispositivos

Neste estudo, diversos *layouts* foram testados com o objetivo de automatizar a mistura entre as soluções contendo os *amplicons* e o SYBR Green I ao final da reação. A Figura 12 mostra a evolução dos *layouts* testados. Para avaliar o melhor *design* do dispositivo de PS-T, alterações na geometria das câmaras reacionais e alterações no canal foram realizadas.

Figura 11. Avaliação do posicionamento das válvulas de toner a diferentes distâncias do centro de rotação para controle do fluxo dos fluidos. Captura de imagens do dispositivo após ser submetido a aquecimento. h1) 30 mm; h2) 35 mm e h3) 40 mm, distância calculada do centro de rotação do dispositivo ao início da válvula. Altura h1 sem ruptura da válvula; h2 e h3 com ruptura das válvulas por capilaridade.



Figura 12. Diversos *layouts* testados para fabricação do dispositivo de PS-T com detecção *endpoint*.

Parâmetros como o *layout* e geometria dos canais, influenciaram fortemente na eficiência da mistura dos fluidos. Os modelos iniciais apresentavam canais que não se conectavam antes de atingir a câmara de detecção (Figura 12, chips 3-11). O processo consistia em direcionar cada solução individualmente até a câmara de detecção onde era realizada a mistura entre elas. Embora essa metodologia seja simples e facilmente reprodutível, os modelos de microdispositivos 3-11 (Figura 12) foram descartados pois não apresentaram boa eficiência de mistura entre as soluções.

Alternativamente, na tentativa de obter uma maior homogeneidade da cor gerada na câmara de detecção, utilizamos a estratégia de conectar em "Y" os canais que direcionavam os fluidos antes de chegarem à câmara de detecção. Desse modo, os dois líquidos passaram a acessar a câmara de detecção de forma simultânea, iniciando a mistura por difusão no caminho fluídico entre a válvula e a câmara de detecção (Figura 13).



Figura 13. Otimização do *layout* dos canais que conduzem as soluções até a câmara de detecção, alterando-o para a forma de junção em Y. Mistura dos reagentes pósrotação, pós-ruptura da válvula de toner que dá acesso a câmara de detecção.

1.4.6 Mobilidade e mistura automatizada dos reagentes

Demonstramos neste estudo a utilização de um *hand-spinner* como um sistema centrifugo para controle de válvulas hidrofóbicas. A mobilização e homogeneização de dois reagentes induzidos e controlados pela rotação do girador de mão encontra-se ilustrada na Figura 14. Os fluidos presentes nas câmaras 1 e 2 foram mobilizados simultaneamente. Ambos acessaram a câmara de detecção através de uma junção em "Y" interconectado a uma distância radial com Δ r de 18 mm (Figura 14).



Figura 14. Demonstração do centro de rotação, capilaridade, sentido do fluido pré e pós-rotação e distância radial percorrida pelos fluidos após a ruptura da válvula. Pré-rotação, fluidos retidos. Pós-rotação, mistura dos fluidos *on-chip*.

Para monitorar a eficiência da homogeneização dos reagentes em microdispositivos de PS-T, diferentes parâmetros de rotação foram avaliados, dentre eles: i) a velocidade em rotações por min (RPM), ii) o sentido e iii) o tempo de rotação. A Figura 15 apresenta todos esses parâmetros otimizados.

Medimos a velocidade de rotação do *hand-spinner* por meio de vídeos *slow-motion* e observamos que a velocidade máxima chegava a 1200 rpm, variando, em média, entre 600 RPM na velocidade baixa e 1200 RPM na velocidade alta. Os experimentos demonstraram que a rotação necessária para abrir a válvula hidrofóbica com escala de cinza 100% e largura de 3,3 mm foi de 300 RPM, ou seja, essa válvula pode ser facilmente rompida utilizando o bombeamento centrífugo por um *hand-spinner* (Figura 15A).



Figura 15. Avaliação da homogeneidade da mistura através da distribuição da cor verde pela aplicação de rotações consecutivas em diferentes direções de rotação (movimento de rotação no sentido horário [H] e anti-horário [AH]). (A) Valor do desvio padrão do tom em diferentes velocidades de rotação, a 600 e 1200 RPM por 5 s em cada direção. (B) Avaliação da mistura em diferentes tempos de rotação, 5, 10 e 15 s. (C) Avaliação da mistura por bombeamento centrífugo via *hand-spinner*, sem controle da taxa de rotação, utilizando 3 operadores diferentes.

Diferentes velocidades rotacionais foram utilizadas para avaliar a homogeneidade da mistura na câmara de detecção. A homogeneidade da mistura foi avaliada através do desvio padrão da cor verde na câmara de detecção em três pontos distintos. Uma solução considerada completamente homogênea foi misturada em um tubo e a seguir inserida na câmara de detecção, obtendo-se um desvio padrão da cor de ~1. A Figura 15A mostra que a baixa velocidade (600 rpm) e a alta velocidade (1200 rpm) fornecem em microdispositivos uma homogeneização semelhante a mistura em tubos, após girar o dispositivo fixado no *hand-spinner* duas vezes no sentido horário (H) e duas vezes no sentido anti-horário (AH) por 5 segundos em cada direção. Isso significa que mesmo o *hand-spinner* não possuindo uma rotação controlada, é possível obter uma mistura eficiente das soluções, com diferentes rotações aplicadas ao girador de mão.

Para avaliar o tempo de rotação em cada direção e quantas vezes seriam necessárias para produzir uma mistura homogênea, uma série de experimentos foram realizados em tempos diferentes (5–15 s) em sentidos alternados de rotação no sentido horário (H) e anti-horário (AH) (Figura 15B). De acordo com a Figura 15B, o tempo de rotação de 5 s demonstrou o melhor desempenho da mistura de reagentes, observado pela redução do desvio padrão em cada sentido de rotação. Desta forma, uma mistura consideravelmente homogênea (desvio padrão de 1,35) pode ser obtida aplicando 5 s em cada sentido de rotação (totalizando 4 rotações no sentido horário e 4 rotações no sentido anti-horário), finalizando a etapa de rotação em \sim 40 s.

Como não é possível controlar manualmente a velocidade específica usando o *hand-spinner* e por ter pouca força de energia dissipativa (baixo atrito), a variação na taxa de rotação entre diferentes operadores é comum. Desta forma, forças centrífugas, criadas por rotações descontroladas e operadas por diferentes usuários, também foram exploradas a fim de demonstrar que mesmo com as variações existentes de operador para operador é possível chegar a resultados finais semelhantes. Para verificar a reprodutibilidade com usuários diferentes, escolhemos aleatoriamente três adultos (duas mulheres e um homem) para girar o *hand-spinner* e avaliamos a homogeneidade da mistura. De acordo com os dados mostrados na Figura 15C, mesmo com as variações nas taxas de rotação de operador para operador, o matiz de fluorescência mostrou uma distribuição uniforme conforme a mistura foi girada alternadamente no sentido horário (H) e antihorário (AH). A distribuição uniforme foi encontrada para os três operadores no quarto ciclo de rotação por meio dos valores dos desvios-padrão de 1,31, 0,73 e 1,32 para os operadores 1, 2 e 3, respectivamente. Assim, mesmo em velocidades de rotação diferentes, é possível obter resultados semelhantes de homogeneidade da mistura, comprovando que o teste pode ser realizado independentemente do operador.

1.4.7 *Layout* do microdispositivo para detecção simultânea de três arboviroses envolvendo a detecção *endpoint*

Para realização de 3 testes simultâneos, um dispositivo contendo 9 câmaras reacionais e 9 câmaras para inserção do intercalador de DNA foi utilizado. O sucesso desse sistema dependeu inteiramente de todos os parâmetros testados e padronizados anteriormente, como: i) dimensão das válvulas com geometria retangular apresentando 6 x 3,3 mM de largura; ii) parâmetros de impressão com resolução de 600 dpi e escala de cinza a 100%; iii) e posicionamento das válvulas a 30 mm do reservatório de entrada (Figura 16).



Figura 16. Demonstração do dispositivo contendo 9 câmaras reacionais, para realização de 3 testes RT-LAMP *on-chip* simultâneos, com detecção *endpoint*.

O mecanismo detalhado de operação desse dispositivo e sua aplicação para o diagnóstico molecular de dengue, zika e chikungunya encontra-se apresentado no Capítulo 3.

1.4.8 Otimizações do microdispositivo de PS-T com detecção *on-chip* utilizando indicador de pH

1.4.8.1 *Layout* do microdispositivo

Com o objetivo de demostrar o processo de amplificação através da adição sequencial de reagentes e alvos (iniciadores, amostra e mistura reacional) descrevemos outro *layout* de dispositivo acionado por rotação. Diferentemente dos microdispositivos com detecção *endpoint*, em que as válvulas eram rompidas pós-incubação, nesse dispositivo, as válvulas foram rompidas pré-incubação para distribuição dos reagentes. Os reagentes foram

adicionados sequencialmente pré-incubação e a mistura dos diferentes fluidos continuou sendo automatizada pela ação da força centrífuga.

1.4.8.1 Orifícios de ventilação

De acordo com o estudo conduzido por Duvall *et al.*, (2016) avaliar o posicionamento dos orifícios de ventilação é uma alternativa crucial para evitar a evaporação das soluções. De acordo com os autores, os orifícios de ventilação (saída de ar) presentes na câmara reacional devem ser posicionados distantes dos reservatórios de entrada das soluções (DUVALL *et al.*, 2016).

Uma das maiores barreiras enfrentadas nos diversos *layouts* de dispositivos com rompimento da válvula pré-incubação estava relacionada à evaporação da solução. Verificou-se que abertura de todas as válvulas de toner, pré-incubação, possibilitava que durante a etapa de aquecimento as soluções saíssem da câmara reacional e evaporassem seguidamente.

Desse modo, para estabelecer o controle de fluidos e evitar que as soluções presentes na câmara reacional evaporassem, diversos *layouts* de orifícios de ventilação foram avaliados (Figura 17). Dentre os diversos *layouts* avaliados, o dispositivo que apresentou a melhor eficiência encontra-se representado na Figura 17 (chip12).



Figura 17. Diversos *layouts* de orifício de ventilação testados visando distanciar o reservatório de entrada das soluções e o orifício de ventilação do dispositivo de PS-T.

Embora a posição dos orifícios de ventilação tenha sido uma alternativa que minimizou a evaporação das soluções, em decorrência do distanciamento entre os reservatórios de entrada dos fluidos e do orifício de ventilação, outras duas alternativas foram utilizadas para minimizar a evaporação dos reagentes durante o aquecimento. Para garantir o distanciamento entre os reservatórios de entrada dos fluidos e a câmara reacional ligada ao orifício de ventilação, uma câmara foi adicionada e posicionada na região central do dispositivo (Figura 18, câmara E). A câmara E funcionou como uma barreira física, distanciando os reservatórios de entrada e a saída de ar.

Outra estratégia utilizada para minimizar a evaporação dos reagentes, envolveu a adição de duas válvulas, V4 e V5 que permaneceram fechadas durante toda etapa de incubação (Figura 18).



Figura 18. Representação das câmaras (M,N,E,R), reservatórios de entrada, válvulas (V1-V5 com níveis de cinza igual a 100%) e orifícios de ventilação do microdispositivo.

Resumidamente, o microdispositivo acomodou 4 câmaras, sendo 2 câmaras utilizadas para a adição sequencial de reagentes (M e N), 1 câmara atuando como barreira física (E) e 1 câmara utilizada para a realização da amplificação RT-LAMP (câmara R). Os reagentes foram direcionados sequencialmente por rotação utilizando um *hand-spinner*. Para direcionar os iniciadores e amostras, a câmara N foi inicialmente preenchida com 2 μ L de iniciador e 1 μ L do alvo. Essa câmara (N) possui um canal individual bloqueado pela válvula V1, que por rotação a 5s no sentido horário foi rompida.

Após a rotação do dispositivo, o desbloqueio do canal que dá acesso a câmara reacional (câmara R) foi iniciado, através do rompimento das válvulas V1 e V2 (o fluido percorre os canais no sentido radial, e rompe as válvulas presentes nesse percurso V1 e V2). As válvulas V3-V5, por não apresentarem soluções, encontravam-se seladas, o que permitiu a retenção do segundo fluido: a mistura reacional. Nessa etapa, 7 µL da mistura reacional foram inseridos na câmara M. O fluido percorreu por capilaridade toda área

hidrofílica da câmara e foi retido na barreira hidrofóbica, válvula V3. Por rotação a 5 s no sentido horário, a válvula V3 foi rompida por diferencial de pressão, e o fluido percorreu o canal desbloqueado pela válvula V2, acessando a câmara reacional (R).

Finalizado o rompimento das válvulas V1-V3 todos os reagentes encontravam-se na câmara reacional (R). Para promover a homogeneidade da mistura, o dispositivo foi novamente rotacionado, por 40 s, com rotações alternadas entre o sentido horário e anti-horário, totalizando 4 rotações por 5 s no sentido horário e 4 rotações por 5 s no anti-horário. Após essa etapa a incubação da reação RT-LAMP era então iniciada.

O mecanismo detalhado de operação desse dispositivo e sua aplicação no diagnóstico molecular de arboviroses encontra-se apresentado no Capítulo 4.

1.4.9 *Layout* do microdispositivo para detecção simultânea de três arboviroses com detecção envolvendo indicador de pH

Para o diagnóstico simultâneo e discriminatório de três arboviroses utilizando indicador de pH, um novo *layout* do dispositivo centrífugo foi projetado. A plataforma *Lab-on-a-disc*, automatizada por rotação, apresentou nove câmaras de adição da mistura principal interconectadas por uma câmara de distribuição, para adição automatizada de um mix reacional comum a todos os testes. Esta mistura continha todos os reagentes necessários ao teste diagnóstico, exceto os iniciadores específicos de cada teste e a amostra. A estrutura do dispositivo foi constituída por um reservatório de entrada (inserção dos iniciadores e o alvo na câmara N) para cada teste, um reservatório único de entrada (onde é distribuída a mistura reacional para todos os testes) e um reservatório para a saída do ar, presente em cada câmara reacional (Figura 19).


Figura 19. Representação dos reservatórios de entrada das câmaras (M e N) que compõem o dispositivo de PS-T e dos reservatórios de saída de ar presentes em cada câmara reacional.

O sucesso desse sistema dependeu inteiramente do *layout* do dispositivo (Figura 20, chip 9). Uma variedade de *layouts* foi testada e parte deles encontram-se apresentados na Figura 20. Os dispositivos iniciais visavam a distribuição das câmaras em cada asa do *hand-spinner* (Figura 20, 1-3), configuração que exibiu um menor de desempenho de distribuição.



Figura 20. Diversos protótipos testados para fabricação do dispositivo em formato de disco.

A configuração que apresentou melhor desempenho de distribuição encontra-se apresentado na Figura 20 (chip 9). O mecanismo detalhado de operação e aplicação desse dispositivo multi-análise encontra-se apresentado no Capítulo 4.

1.5. CONCLUSÃO

Os dispositivos de poliéster-toner já são bem descritos na literatura para aplicações bioanalíticas. Neste estudo desenvolvemos dispositivos confeccionados de forma similar, entretanto os filmes de poliéster foram substituídos por filmes de poliestireno, devido a sua maior transparência na região UV. Essa maior transparência proporciona maior sensibilidade na detecção visual utilizando SYBR Green nos testes baseados em amplificação isotérmica de DNA que foram utilizados neste trabalho para detecção de patógenos.

Todos os dispositivos apresentados neste trabalho são dispositivos rotativos que envolveram a integração e automatização de etapas analíticas. Para controle dos fluidos nos dispositivos rotativos, demonstramos neste estudo, o uso de um *hand-spinner* como um sistema centrifugo bem-sucedido, de baixo custo, livre de eletricidade e com alta eficiência de rotações para o rompimento de válvulas hidrofóbicas. Enquanto outros sistemas LOD requerem software e equipamentos para automatização por bombeamento centrífugo (KAZEMZADEH, *et al.*, 2015; JACKSON *et al.*, 2016), o uso do *hand-spinner* dispensou a necessidade de instrumentação, o que permitiu uma simples e rápida automatização do dispositivo, além de proporcionar agilidade na obtenção do resultado.

As válvulas hidrofóbicas de toner foram otimizadas em relação a intensidade de escala de cinza na impressão, sendo que em nossas condições experimentais a escala de cinza 100% foi a condição que proporcionou melhores resultados em relação ao controle dos fluidos. Otimizações na geometria e posição das válvulas também foram realizadas para cada *layout* de dispositivo desenvolvido neste estudo, e desta forma as válvulas hidrofóbicas de toner foram usadas com sucesso para controle dos fluidos em todos os dispositivos.

Diversos dispositivos foram projetados para diferentes aplicações, todas elas envolvendo o diagnóstico molecular rápido de doenças infecciosas. Basicamente dois tipos de *layouts* foram desenvolvidos baseados no tipo de detecção visual de interesse. O primeiro *layout* foi desenvolvido para integração e automatização da adição do intercalador de DNA ao final da reação de amplificação de DNA. O segundo *layout* foi desenvolvido para detecção visual utilizando indicador de pH e neste, a automatização da entrega da mistura reacional e dos iniciadores e amostra foi realizada com sucesso. Nos dois *layouts* as válvulas foram controladas com sucesso através do uso do *hand-spinner* e não apresentaram evaporação das soluções durante etapas de aquecimento, que são necessárias para as reações de amplificação de DNA. As integrações e automatizações realizadas nos dispositivos diminuem etapas de pipetagens, o que minimiza problemas com contaminação, que são muito comuns em reações LAMP.

Dispositivos em formato de CD foram confeccionados e otimizados para aplicações em multi-análises RT-LAMP, proporcionando a realização de múltiplos testes de diagnóstico simultaneamente, o que acarreta uma significativa economia de tempo. Os dispositivos aqui desenvolvidos são descartáveis, de baixo-custo e tem grande potencial para aplicações no *point-of-care*.

REFERÊNCIAS

ACHEE, N. L., GRIECO, J. P., VATANDOOST, H., SEIXAS, G., PINTO, J., CHING-NG, L., ... & VONTAS, J. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES**, v.13, n.1, p. e0006822, 2019.

ARJMAND, E. M., SAADATMAND, M., BAKHTIARI, M. R. & EGHBAL, M.,. Design and fabrication of a centrifugal microfluidic disc including septum valve for measuring hemoglobin A1c in human whole blood using immunoturbidimetry method. **Talanta**, V.190, p. 134-139, 2018.

BAUER, M. et al., 2019. Burst valves for commercial microfuidics: a critical analysis. **Microfluid. Nanofluid.**, v. 23, n 7, p. 1-12.

BORBA, J. C. Tese apresentada para o título de doutor em ciências. Microdispositivo giratório de poliéster para integração de preparo de amostra e reação de amplificação para análises genéticas. São Carlos, São Paulo, USP, 2017.

CHIARI, M. F., Nova Metodologia de Diagnóstico para Ehrlichia canis: PCR X LAMP. USP, São Carlos, São Paulo: s.n. 2010.

COHEN, E. J., BRAVI, R. & MINCIACCHI, D., The effect of fidget spinners on fine motor control. **Sci. Rep.,** v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

COLTRO, W. K. T., PICCIN, E., CARRILHO, E., JESUS, D. P. D., SILVA, J. A. F. D., SILVA, H. D. T. D., & LAGO, C. L. D. Microssistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, p. 1986-2000, 2007.

DO LAGO, C. L. et al., A dry process for prodution of microfluidic device based on the lamination of laser-printed polyester films. **Anal. Chem.**, v. 75, n.15, p. 3853-3858, 2003.

DUARTE, G. R. M. et alDynamic solid phase DNA extration and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Anal. Chem.,** v. 83, n.13, p. 5182-5189, 2011.

DUVALL, J. A. et al. A rotationally-driven polyethylene terephthalate microdevice with integrated reagent mixing for multiplexed PCR amplification of DNA. **Analytical Methods**, v. 8, p. 7331-7340, 2016.

ESTRELA, P. F. N. et al. Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. J. Virol. Methods, v. 271, p. 1-5, 2019.

EZKERRA, A., FERNÁNDEZ, L. J. & RUANO-LÓPES, J. M., A microvalve for lab-on-a-chip applications based on electrochemically actuated SU8 cantilevers. **Sens. Actuators, B**, v.155, n.2, p. 505-511, 2011.

FENG, Y. Y., ZHOU, Z. Y., YE, X. Y. & XIONG, H. J., Passive valves based on hydrophobic microfluidics. **Sens. Actuators, A**, v. 108, n.1-3, p. 138-143, 2003.

GABRIEL, E. F., LUCCA, B. G., DUARTE, G. R., & COLTRO, W. K. Recent advances in toner-based microfluidic devices for bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 10, n. 25, p. 2952-2962, 2018.

GANGULI, A, Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomed. Microdevices**, v. 19, n.4, 2017.

GREENWOOD, P. A. & GREENWAY, G. M. Sample manipulation in micro total analytical systems. **TRAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 726-740, 2002.

JACKSON, K. R. et al., DNA purification using dynamic solid-phase extraction on a rotationally-driven polyethylene-terephthalate microdevice. **Anal. Chim. Acta**, v. 937, p. 1-10, 2016.

KAZEMZADEH, A. et al. The effect of contact angles and capillary dimensions on the burst frequency of super hydrophilic and hydrophilic centrifugal microfluidics plataforms, a CFD study. **PLoS One**, v.8, n. 9, 2013.

KAZEMZADEH, A. et al., Guided routing on spinning microfluidic platforms. **RSC Advances**, v. 5, n. 12, p. 8669-8679, 2015.

KIM, J., KIDO, H., RANGEL, R. & MADOU, M. J. Passive flow switching valves on a centrifugal microfluidic platform. **Sens. Actuators, B**, v. 128, n. 2, p. 613-621, 2008.

KONG, L. X., PEREBIKOVSKY, A., MOEBIUS, J., KULINSKY, L., & MADOU, M. Journal of laboratory automation, v. 21, n. 3, p. 323-355, 2016.

KOO, J. & TAMURA, D. Y. Fidget Spinner Battery-LED Unit Ingestion in a 13-Month-Old Boy. **Clin. Pediatr., v.** 57, n.7, p. 857-860, 2018.

LI, Hui; TORAB, Peter; WONG, Pak Kin. Detection of bacterial infection via a fidget spinner. **Nature Biomedical Engineering**, v. 4, n. 6, p. 577-578, 2020.

LIU, C. H. et al. Blood plasma separation using a fidget-spinner. **Anal. Chem**., v. 91, n.2, p. 1247-1253, 2019.

MENDES, G. M. et al. Molecular diagnostics of dengue by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) in disposable polyester-toner microdevices. **J. Braz. Chem. Soc.,** v. 30, n.9, p. 1841-1849, 2019.

MICHAEL, I., KIM, D., GULENKO, O., KUMAR, S., KUMAR, S., CLARA, J., ... & CHO, Y. K. A fidget spinner for the point-of-care diagnosis of urinary tract infection. **Nature Biomedical Engineering**, v. 4, n. 6, p. 591-600, 2020.

MOHAMMADZADEH, A., FOX-ROBICHAUD, A. E. & SELVAGANAPATHY, R. P. Rapid and inexpensive method for fabrication of multi-material multi-layer microfluidic devices. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, V.29, n. 1, 2018.

OLIVEIRA, K. G et al. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. **Analytical Biochemistry**, Volume 534, p. 70-77, 2017.

OUYANG, Y. et al. A disposable laser print-cut-laminate polyester microchip for multiplexed PCR via infra-red-mediated thermal control. **Anal. Chim. Acta**, V.901, p. 59-67, 2015.

OUYANG, Y. et al., Multilevel fluidic flow control in a rotationally-driven polyester film microdevice created using laser print, cut and laminate. **Lab chip**, v. 16, n. 2, p. 377-387, 2016.

OUYANG, Y. et al. Rapid patterning of 'tunable' hydrophobic valves on disposable microchips by laser printer lithography. **Lab chip,** v. 13, n.9, p. 1762-71, 2013

REN, Y. & LEUNG, W. W.-F.,. Numerical and experimental investigation on flow and mixing in batch-mode centrifugal microfluidics. Int. **J. Heat Mass Transfer**, V.60, pp. 95-104, 2013a

RENG, Y. & LEUNG, W. W.-F., Flow and mixing rotating zigzag microchannel. **Chem. Eng. J.,** V.215, p. 561-578, 2013b.

STROHMEIER, O. et al. Centrifugal microfluidic plataforms: advanced unit operations and applications. **Chem. Soc. Rev.,** v. 44, n.17, p. 6187-6229., 2015.

THOMPSON, B. L. et al. Inexpensive, rapid, prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. **Nat. Protoc.,** v. 10, n. 6, p. 875-886, 2015.

TIAN, B. et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loopmediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 86, p. 420-425, 2016.

TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H. & NOTOMI, T., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nat. Protoc.,** v. 3, n.5, p. 877-882, 2008.

ZHANG, L. et al. Hand-powered centrifugal microfluidic platform inspired by the spinning top for sample-to-answer diagnostics of nucleic acids. **Lab Chip**, v. 18, n. 4, p. 610-619, 2018.

ZHU, Y., CHEN, Y. & XU, Y. Interruptible siphon valving for centrifugal microfluidic platforms. **Sens. Actuators, B,** Volume 276, pp. 313-321, 2018.

CAPÍTULO 2

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA COVID-19 ON-CHIP COM DETECÇÃO ENDPOINT UTILIZANDO SYBR GREEN

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Novo Coronavírus, COVID-19

De modo geral, os coronavírus (ordem Nidovirales, família Coronaviridae, subfamília Coronavirinae) são uma grande família de vírus de RNA de fita simples de sentido positivo, com genomas variando de 26 Kb a 32 Kb (FIERABRACCI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; HASÖKSÜZ *et al.*, 2020). São vírus de origem zoonótica, transmitidos de animais para humanos, em que mais de um animal pode agir como hospedeiro intermediário e facilitar a transmissão viral. Um exemplo da ação zoonótica foi a Síndrome respiratória do Médio Oriente (SRME ou MERS) ocasionada por coronavírus MERS (MERS-CoV). Isolado pela primeira vez em 2012, o vírus se espalhou de morcegos para camelos e posteriormente de camelos para humanos ocasionando uma infecção respiratória pelo vírus MERS-CoV (LIU *et al*, 2020)

Em seres humanos, cerca de 6 cepas de coronavírus (CoVs), são capazes de infectar o trato respiratório superior e causar doenças respiratórias leves semelhantes a resfriado comum, sendo elas, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HKU1 (LIU *et al.*, 2020). Apesar dessas cepas de coronavírus humano (HCoV) desencadearem infecções leves no trato superior, outras cepas, como SARS-CoV e MERS-CoV, são consideradas cepas agressivas e podem infectar o trato respiratório inferior e desencadear sintomas mais graves, podendo levar o infectado a óbito (HASÖKSÜZ *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; FIERABRACCI *et al.*, 2020).

A infecção pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 pode leve (resfriado comum) ou grave e fatal. Ocasionalmente, a fatalidade está atribuída a infecção aguda do trato respiratório inferior, que reduz o nível de oxigênio no sangue e acarreta falha no suprimento das demandas metabólicas do organismo desencadeando a insuficiência respiratória aguda. Esses casos são considerados graves e procedimentos invasivos como intubação orotraqueal e ventilação mecânica são formas de prevenir o agravamento clínico e o óbito do paciente (FIERABRACCI *et al.,* 2020; HASÖKSÜZ *et al.,* 2020; LIU *et al.,* 2020).

De modo geral o SARS-CoV-2 é classificado como um betacoronavírus (βCoV) [linhagem B] (LIU *et al.,* 2020). São vírus de RNA de cadeia simples e apresentam 4 proteínas estruturais: proteínas S (spike), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo) (Figura 20). Desse modo, o genoma do vírus codifica dois tipos de proteínas: as proteínas estruturais (estrutura vírica, formam o envelope do vírus, proteínas S, M, E) e as nãoestruturais (proteína N, atuando na replicação viral).



Figura 21. Representação dos princípios que envolvem a composição do vírus SARS-CoV-2. Fonte: Autoria Própria.

2.1.1.1 SARS-CoV-2

Em 31 de dezembro de 2019, um surto de casos com pneumonia altamente infecciosa de causa desconhecida despertou preocupação as autoridades de saúde pública na província de Wuhan, China. Sete dias depois, através de isolamento, sequenciamento e análise filogenética do vírus a doença pode ser classificada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, como síndrome respiratória aguda grave (SARS) de coronavírus 2 (CoV- 2) ou infecção causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (COVID-19) (JIANG *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). De acordo com o comportamento epidemiológico da doença, em menos de um mês, no dia 30 de janeiro de 2020, a doença foi classificada como doença infecciosa com alto risco a população global, sendo declarada uma emergência de saúde pública de preocupação internacional (CANDIDO *et al.*, 2020).

Em um curto período, o surto do SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente pelo mundo, afetando 266 países em todos os continentes (FIERABRACCI *et al.*, 2020). O aumento crescente do número de casos positivos diagnosticados, se tornou um grande problema de saúde pública e em menos de quatro meses, no dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a doença coronavírus (COVID-19) como uma pandemia (SOHRABI *et al.*, 2020; WHO *et al.*, 2020).

A COVID-19 é uma infecção respiratória, e, por se tratar de um vírus respiratório, a circulação do vírus foi facilitada pela circulação humana. A transmissão via aerossóis, gotículas de saliva de pacientes infectados e até por superfícies que continham o vírus na forma viável (potencial infectante) fora das células vivas, por longos períodos de tempo (mais de 24 h) facilitaram a disseminação da doença (Figura 22). Além disso, alguns dados estatísticos sugerem que a transmissão de SARS-CoV-2 advindas de indivíduos assintomáticos ou pré-sintomáticos (cerca de 18 a 56% dos casos) dificultaram a obtenção de dados para o planejamento de ações de prevenção e controle da doença (CANDIDO *et al.,* 2020).



Figura 22. Tempo de sobrevida do SARS-CoV-2 em diferentes superfícies. Dados presentes no texto: *Cleaning and disinfection of environmental surfaces in context of COVID-19*, 15 maio de 2020 WHO. Fonte: Autoria Própria.

Desse modo, uma necessidade de desdobramento de tecnologias de enfrentamento para evitar que o vírus se espalhe com facilidade e rapidez, deu início a uma conscientização mundial levando a medidas restritivas. Entretanto, umas das principais estratégias para a contenção da disseminação do vírus é o diagnóstico precoce da doença.

2.1.2 Diagnóstico molecular da COVID-19

Como acontece com todas as doenças de grande impacto social, o diagnóstico precoce e preciso da infecção causada pela COVID-19 é fundamental para o correto tratamento dos pacientes e para o controle epidemiológico. A capacidade de detectar um agente infeccioso rapidamente em uma pandemia é crucial para o sucesso dos esforços de quarentena, além de uma triagem sensível e precisa para possíveis casos de infecção em pacientes em um ambiente clínico (CHU *et al.,* 2020).

Um método de diagnóstico rápido e sensível, que pode ser realizado

desde o primeiro dia dos sintomas, é vital para conter uma pandemia mundial. Os testes de diagnóstico baseados em reações de amplificação de ácido nucleico podem atingir altos níveis de sensibilidade e especificidade (ZHANG *et al.*, 2020b; (ZHU *et al.* 2020a). A transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR) é o padrão ouro para o diagnóstico molecular de COVID-19 (CORMAN *et al.*, 2020). No entanto, a demanda sem precedentes por reagentes de PCR, em um momento pandêmico, resultou em um efeito de gargalo, reduzindo substancialmente a capacidade de teste à medida que os números de casos aumentaram (YELIN *et al.* 2020). Além disso, RT-qPCR apresenta de alto custo e requer pessoal altamente treinado e equipamentos de laboratório caros (ZHU *et al.*, 2020b).

Atualmente, técnicas isotérmicas de amplificação de ácido nucléico surgiram para superar as limitações da PCR, proporcionando diagnósticos moleculares mais rápidos e de menor custo, o que pode ser especialmente útil para países em desenvolvimento ou na situação atual em que a falta de reagentes de PCR se tornou uma questão preocupante (UDUGAMA *et al.,* 2020). A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica de amplificação que não requer ciclos de aquecimento e resfriamento; portanto, requer instrumentação mais simples do que a PCR (NOTOMI *et al.,* 2000).

A LAMP é baseada na atividade de deslocamento da fita de DNA, o que elimina a necessidade de desnaturação do DNA de fita dupla. O uso de um conjunto de 4-6 iniciadores específicos que são capazes de reconhecer 6-8 regiões diferentes ao longo da sequência alvo fornece a LAMP uma melhor especificidade do que a PCR, onde o alvo é reconhecido em apenas em duas regiões (NOTOMI *et al.* 2000; MORI e NOTOMI, 2009; PARIDA *et al.* 2008) No entanto, por ser uma técnica de amplificação muito sensível, um grande número de *amplicons* é produzido. Por esse motivo, a manipulação de LAMP requer cuidado extra para evitar resultados falso-positivos (KIL *et al.*, 2015). Assim, diversos estudos relatam a importância de realizar a LAMP em ambiente fechado, sem manipular as soluções após o início da reação (TOMITA *et al.*, 2008; HSIEH *et al.*, 2014; KIL *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; LIN et *al.*, 2019).

2.1.3 Amplificação isotérmica mediada por loop pós Transcrição reversa (RT-LAMP)

Os primeiros dados experimentais da amplificação LAMP e RT-LAMP foram publicados no ano 2000 por Notomi e colaboradores (NOTOMI *et al.,* 2000). No entanto a técnica tornou-se popular em 2004, após a detecção rápida (11 minutos) de uma doença respiratória, com rápida disseminação, a pneumonia viral, SARS (síndrome respiratória aguda grave). Segundo o estudo publicado por Thai *et al.,* (2004) o diagnóstico molecular da SARS via RT-LAMP, foi considerado 100 vezes mais sensível que a RT-PCR e a identificação do RNA viral foi possível em 59 amostras clínicas (esfregaços nasais e lavagens da garganta) coletadas de pacientes internados nos hospitais do Vietnã (CHIARI 2010; THAI *et al.,* 2004).

Uma das grandes vantagens da LAMP são os diversos métodos de detecção desenvolvidos para identificação dos *amplicons* (cópias sintetizadas do alvo). A LAMP permite que a detecção seja feita visualmente ao final da reação, dispensando a necessidade de uma etapa adicional de separação dos fragmentos amplificados. Dentre as metodologias *endpoint* disponíveis, estão a eletroforese em gel de agarose (MENDES *et al,* 2019), visualização do precipitado de pirofosfato de magnésio (IZADI *et al.,* 2012), detecção por cromatografia de fluxo lateral utilizando *lateral flow dipstick*,LFD, (YONGKIETTRAKUL *et al.,* 2014) e a detecção dos produtos de amplificação via adição de intercaladores de DNA. Esta última tem demonstrado resultados promissores por propiciar um aumento da sensibilidade quando comparado aos outros métodos de detecção *endpoint* (ZHANG *et al.,* 2014; FISCHBACH *et al.,* 2015;).

2.1.3.1 Mecanismo da LAMP

Para que a amplificação de fragmentos de DNA ocorra por LAMP são necessários de quatro a seis iniciadores específicos, para reconhecer de seis

a oito regiões complementares alvo presentes no molde inicial, a molécula de RNA. Os sítios de hibridização de cada iniciador encontram-se dispostos em seis regiões distintas do gene alvo, sendo denominadas regiões, F3c, F2c, F1c, B1, B2, B3. Os iniciadores externos (F3 e B3) são desenhados para conter a sequência complementar específica de duas regiões distintas no fragmento do genoma (F3c e B3c). Já os iniciadores internos FIP e BIP (*forward inner iniciador e backward inner iniciador*) são desenhados para hibridizarem as regiões, F2c e B2c. Além disso, os iniciadores internos (FIP e BIP) apresentam em sua estrutura uma região complementar aos sítios F1 e B1, regiões que originarão os *loops* por serem complementares as regiões F1c e B1c.

De modo geral, a LAMP é uma técnica de amplificação enzimática por deslocamento da fita de DNA alvo (*template*). A fita é deslocada através da hibridização dos iniciadores juntamente com uma ação enzimática, proporcionada pela enzima *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA polimerase. O deslocamento sucede de duas etapas, denominadas: etapa não-cíclica e cíclica, que ocorrem isotermicamente através da hibridação dos iniciadores internos e externos a uma temperatura fixa (NOTOMI *et al.,* 2000). Resumidamente, na etapa não-cíclica é produzida uma fita DNA-molde (intermediário haste-loop) e na etapa cíclica essa fita molde dá origem a outras fitas de DNA (cópias inversamente alternadas da sequência alvo).

2.1.2.2.1 Etapa Não-Cíclica

Como a LAMP é uma amplificação isotérmica mediada por *loop*, à etapa principal para gerar os produtos LAMP é originar *loops* nas extremidades da fita alvo. E é justamente na fase final da etapa não-cíclica que haverá a formação de um intermediário haste-laço (*loop* em ambas extremidades da fita). De modo geral, na etapa não-cíclica a fita alvo será deslocada pela atuação dos pares de iniciadores externos F3 e B3 que

deslocarão as fitas sintetizadas pelos iniciadores internos, FIP e BIP (NOTOMI *et al.,* 2000)

A Figura 23 propõe uma representação esquemática da etapa nãocíclica.



Figura 23. Ilustração da primeira etapa da amplificação LAMP, a etapa não-cíclica. A) representação esquemática das seis regiões distintas do alvo, denominadas, F3c, F2c,F1c, B1,B2 e B3 e dos sítios de hibridização de cada iniciador, FIP e BIP, e externos, F3 e B3. B) Amplificação enzimática LAMP na etapa não-cíclica para formação do intermediário haste-laço (TOMITA *et al.*, 2008).

A etapa não-cíclica é iniciada logo após a temperatura de atividade da enzima ser atingida (65 - 72 °C). Em um primeiro momento, o iniciador FIP hibridiza a sua região complementar (F2c), presente em um segmento específico de fita dupla ou simples (DNA/RNA). Nessa região hibridizada, o iniciador direciona a enzima *Bst* para dar início a etapa de síntese da fita no sentido 5' \rightarrow 3' [1].

Posteriormente, o iniciador F3 hibridiza a sua sequência complementar [2] (região F3c) e direciona a enzima *Bst* DNA polimerase para extensão da fita no sentido 5' \rightarrow 3'. É nessa etapa que o deslocamento da fita

é iniciado, uma vez que a síntese da fita direcionada pelo *iniciador* F3 promove o deslocamento da fita anteriormente sintetizada pelo *iniciador* FIP [3]. Uma vez que a fita sintetizada pelo iniciador FIP é deslocada, o iniciador BIP hibridiza ao seu sítio de hibridização específico (B2c) e direciona a enzima para a síntese subsequente de sua região complementar alvo (B2c). Finalizada a extensão da fita pelo iniciador BIP, o iniciador B3 reconhece sua região alvo (B3c) e direciona a enzima para a extensão e posterior deslocamento da fita anteriormente sintetizada pelo iniciador BIP. Nessa etapa é formado um intermediário haste-laço (*loop*) que determina o final da etapa não-cíclica.

2.1.2.2.2 Etapa cíclica

A partir do momento que o intermediário haste-laço é formado, a etapa cíclica é iniciada. Nessa etapa, somente os iniciadores internos atuam. A função do intermediário (*loops* nas extremidades 3' e 5' da fita) é justamente de promover a auto-ativação (*auto-primed*) da síntese e o subsequente deslocamento da fita anteriormente sintetizada pelo *iniciador* interno (seja ele FIP ou BIP). A Figura 24 representa esquematicamente essa etapa.



Figura 24. A) Representação esquemática da etapa cíclica de amplificação molecular LAMP. B) Exemplo de uma separação eletroforética via gel de agarose, apresentando as múltiplas estruturas (diferentes tamanhos de fragmentos) formadas ao final da LAMP (TOMITA *et al.*, 2008).

Inicialmente o iniciador FIP que contem a sequência complementar da região F2c, hibridiza na região F2c (presente no *loop* da extremidade 3') e direciona a enzima *Bst* DNA polimerase para síntese da fita. Posteriormente, a fita sintetizada pelo iniciador FIP (7a) é deslocada em decorrência da auto-ativação da síntese proporcionada pelo *loop* presente na extremidade 5'. Em decorrência da auto-ativação do *loop* uma fita com repetição invertida do fragmento alvo é obtida (9 a).

Tanto na fita deslocada (7a), quanto na fita com repetição invertida (9) o *iniciador* BIP reconhece sua região complementar (B2c) e direciona a enzima para síntese da fita. Da mesma forma o *iniciador* FIP, tanto na estrutura intermediária (5) quanto na repetição invertida do alvo (10) o mesmo hibridiza ao seu sítio específico (região F2c).

Após as hibridizações, múltiplas estruturas da sequência alvo são geradas uma vez que os iniciadores internos identificam seus sítios de hibridização tanto em estruturas com uma repetição invertida do fragmento alvo quanto em estruturas intermediárias (haste-laço). E por esse motivo, ao final da etapa cíclica, vários fragmentos de tamanhos diferentes são obtidos, uma vez que a hibridização dos iniciadores internos é repetida durante todo intervalo de incubação (5-12).

Para aumentar exponencialmente a velocidade da amplificação, a técnica LAMP tem sofrido algumas adaptações, como por exemplo, a utilização de iniciadores de *loops* (LF e LB) que tem a função de aumentar exponencialmente a quantidade de *loops* formados na etapa cíclica. Basicamente, esses iniciadores contem a sequência complementar à região *loop* formada nas extremidades 3' e 5', entre a região B1-B2 e F1-F2.

2.1.3.2 Diagnóstico molecular da COVID-19 em microdispositivos utilizando ensaios RT-LAMP

Os sistemas microfluídicos integrados apresentam alternativas promissoras para a realização de diagnósticos *on-chip*. A integração de duas ou mais etapas em microdispositivos permite automatizar as etapas laboratoriais em um único dispositivo, além de proporcionar: i) uma melhor manipulação das soluções; ii) a redução do tempo total de análise; iii) a redução do contato manual com a amostra e reagentes (YANG *et al.* 2020; COLTRO *et al.*, 2007). Desta forma, a microfluídica oferece diversas vantagens para os testes diagnósticos, facilitando a automação e a portabilidade dos testes (COLTRO *et al.*, 2007).

Recentemente, dispositivos microfluídicos construídos a partir de diferentes substratos e protocolos de fabricação diversificados têm sido aplicados para técnicas moleculares de diagnóstico de COVID-19 (ZHU et al., 2020c). Em um estudo publicado recentemente, Ji e colaboradores desenvolveram um diagnóstico completo baseado em RT-qPCR em um disco

microfluídico (dirRT-qPCR). O teste foi realizado em 1,5 horas e detectou o SARS-CoV-2 com 2 × 10¹ cópias de RNA por reação (JI *et al.*, 2020). Soares *et al.* desenvolveram uma plataforma microfluídica centrífuga de PMMA modular integrada e econômica para realizar um ensaio LAMP de 30 min para detecção de SARS-CoV-2. Os autores alcançaram um limite de detecção de 10 2 –10 3 cópias de RNA por reação (SOARES *et al.*, 2020).

Neste estudo nós descrevemos o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico de poliestireno-toner (PS-T) que é controlado rotacionalmente por um *hand-spinner* para diagnóstico molecular por RT-LAMP, capaz de realizar detecção visual *on-chip* por mistura automatizada da solução contendo os *amplicons* com o intercalador de DNA. O microdispositivo integrado e automatizado com detecção *endpoint* via SYBR Green (SG) descrito no Capítulo 1 foi utilizado aqui com o objetivo de desenvolver um método rápido, sensível e automatizado para o diagnóstico molecular de COVID-19 por RT-LAMP. A reação foi desenvolvida usando um bloco de aquecimento simples e detecção visual no microdispositivo usando o intercalador SYBR Green I, auxiliado por uma fonte de UV portátil. As imagens foram obtidas com um smartphone.

Ademais, o bombeamento fluídico, utilizando um girador de mão, livre de eletricidade automatizou com sucesso a etapa de amplificação com a detecção *endpoint* da RT-LAMP.

2. 2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é utilizar um sistema portátil para análises no *point-of-care* composto por microdispositivos controlados por sistemas centrífugos manuais a base de *hand-spinner* que integre e automatize as etapas de amplificação de DNA e detecção visual *endpoint* sem a manipulação manual das soluções após o início da reação. O dispositivo desenvolvido foi aplicado aqui para o diagnóstico molecular baseado em RT-LAMP, da COVID-19.

2.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros operacionais do dispositivo de PS-T controlado por força centrifuga
- ii) Integrar e automatizar a etapa de detecção visual do método molecular RT-LAMP em um dispositivo de PS-T através de força centrífuga gerada por um *hand-spinner*
- Otimizar as condições experimentais para amplificação e detecção do SARS-CoV-2 via RT-LAMP em microdispositivos PS-T partindo de RNAs de amostras clínicas de pacientes infectados.
- iv) Demonstrar a funcionalidade dos dispositivos de PS-T operados por bombeamento centrífugo para diagnóstico da COVID-19.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Cultivo do vírus

O vírus foi cultivado em células VERO, concentrado com 1,6 × 10¹² PFU mL⁻¹ e inativado. O cultivo do vírus foi doado pelo Laboratório de Virologia Clínica e Molecular da Universidade de São Paulo.

2.3.2. Amostras clínicas

Swabs nasofaríngeos foram obtidos de pacientes saudáveis e com COVID-19 durante a pandemia no Brasil em abril de 2020. A confirmação da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 foi obtida a partir dos resultados do RTqPCR. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, com número de protocolo 4.111.485. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes exigidas nacionalmente, seguindo as resoluções CNS 466/12 e CNS 441/11, e em conformidade com as diretrizes institucionais. Além disso, o consentimento foi obtido de todos os pacientes. Todas as amostras foram manipuladas e desativadas primeiramente em uma cabine de nível de biossegurança 2, além do uso de equipamentos de proteção individual.

2.3.3. Extração de RNA e RT-qPCR

Todas as amostras foram submetidas à extração de RNA utilizando o kit BioGene® K204 DNA / RNA Extraction (produzido pela Bioclin, Quibasa Química Básica LTDA; Registro ANVISA: 10269360296), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante.

O kit US CDC SARS-CoV-2 foi usado nos ensaios RT-qPCR. Resumidamente, uma mistura reacional foi feita com um volume de reação de 20 µL contendo: 5 µL de RNA, 13 µL de mix RT-PCR, 2 µL de iniciador marcados com sonda FAM. As misturas de PCR foram incubadas 55 por 15 min, posteriormente a 95 °C por 10 min, com 40 ciclos de 95 °C por 15 se 60 °C por 1 min, utilizando o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems Life technologies. A diluição em série de plasmídeos de controle contendo o gene completo do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 (Integrated DNA Technologies, IA, EUA) foi usada para gerar uma curva padrão para quantificação absoluta (5 a 2 × 10⁵ cópias de RNA viral) e para obter valores de limite de ciclo (*Ct*). Os dados em tempo real foram analisados usando o sistema StepOnePlus ™ fornecido pela Applied Biosystems (Califórnia, EUA).

2.3.4. Fabricação do microdispositivo centrífugo PS-T

Como descrito no Capítulo 1, os microchips PS-T foram fabricados usando um protocolo de impressão, corte e laminado (PCL) descrito anteriormente (DUARTE et al, 2011). Figura 25 mostra as principais etapas do processo de fabricação do dispositivo centrífugo PS-T.



Figura 25. Representação das principais etapas do processo de fabricação. I) Filme de poliestireno revestido com toner em ambos os lados para compor a camada intermediária (a) e (b) válvula de toner impressa na superfície do topo e base dos filmes de poliestireno. II) *Layout* do microdispositivo definidos pelo Silhouette Studio®. III) Alinhamento das válvulas e todas as camadas para laminação do microdispositivo PS-T.

Como descrito anteriormente, as camadas do topo e base dos microdispositivos são filmes de poliestireno com válvulas de toner hidrofóbicas (3,3 mm de largura) impressas em escala de cinza 100% por impressão a laser (Brother HL-1212 W) utilizando um cartucho de toner preto (TN-1060) para definir as barreiras. E as camadas intermediárias são folhas de poliestireno cobertas totalmente com toner em ambos os lados utilizando uma impressora a laser (Brother HL-1212 W), contendo o *layout* de cada câmara definido pelo software Silhouete Studio® e recortado pela *plotter* de recorte (Silhouete Cameo, Brasil).

O projeto do dispositivo conteve três câmaras: i) câmara para realização da RT-LAMP de aproximadamente 5 μ L (câmara 1), ii) câmara para inserção do intercalador de DNA SYBR Green I (1: 70) de aproximadamente 3 μ L (câmara 2) e iii) uma câmara de detecção, com capacidade de aproximadamente 8 μ L, para misturar as soluções 1 e 2 após finalizado o tempo de incubação.

2.3.5. Amplificação RT-LAMP de SARS-CoV-2 em um microdispositivo PS-T centrífugo

As sequências de iniciadores usados para RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2, que foram descritas por Zhang *et al.* 2020 (ZHANG *et al.* 2020b) e são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de iniciadores para detecção da COVID-19 por RT-LAMP.

Iniciador Seq	uência 5'a 3'
F3 CTC	CACCTCATGGTCATGTT
B3 AGC	CTCGTCGCCTAAGTCAA
FIP GAO GA	3GGACAAGGACACCAAGTGTATGGTTGAGCTGGTAGCA
BIP CCA	AGTGGCTTACCGCAAGGTTTTAGATCGGCGCCGTAAC

LF CCGTACTGAATGCCTTCGAGT LB TTCGTAAGAACGGTAATAAAGGAGC

Primeiro, a mistura reacional RT-LAMP foi preparada em um microtubo contendo: 0,2 µM de cada iniciador externo (F3 e B3), 1,6 µM de cada iniciador interno (FIP e BIP), 0,4 µM de cada iniciador de loop (LF e LB), 6 mM MgSO4, 1,0 mM dNTP, 0,48 U μ L⁻¹ de Bst 3.0 DNA polimerase, 0,5 μ L de 10× tampão de amplificação isotérmico [20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, Triton X-100 a 0,1%, 0,11 mg mL⁻¹ BSA e quantidades variáveis de RNA. Antes do uso, as microcâmaras foram passivadas com BSA (5 mg mL⁻¹), conforme descrito em trabalhos anteriores (DE OLIVEIRA et al., 2017, Mendes et al., 2019). Em seguida, os reagentes foram inseridos no microdispositivo, sendo 5 µL da mistura reacional RT-LAMP adicionados à câmara de reação (1) e 3 µL de SYBR Green I (1: 70) adicionados à câmara 2. Para as reações positivas, 0,5 µL de RNA de paciente contaminado com SARS-CoV-2 foram adicionados a câmara 1. Para realização do controle negativo (ausência de RNA do SARS-CoV-2) 0,5 µL de RNA extraído de paciente saudável foi inserido na câmara 1 do dispositivo, totalizando 5 µL de volume de reação. Após pipetar os reagentes, a parte superior do microdispositivo foi selada com papel adesivo contatc transparente para evitar a evaporação das soluções durante o tempo de incubação.

O microdispositivo foi colocado em termobloco (Major Science, Saratoga, CA) a 72 °C durante 10 minutos. No final do tempo de incubação da reação, o papel de contato transparente foi removido da parte superior do microdispositivo e, em seguida, fixou-se o microdispositivo em uma das asas do *hand-spinner* e submeteu-o a rotação manual. Após a rotação, a válvula hidrofóbica de toner se rompeu, o que permitiu o fluxo das soluções contendo os produtos RT-LAMP e da solução do intercalador de DNA SYBR Green I em direção da câmara de detecção (câmara 3). Em seguida, a câmara de detecção foi exposta à luz ultravioleta por meio de um transiluminador ultravioleta (KASVI, São José do Pinhais, PR), contendo uma lâmpada com comprimento de onda de 320 nm, e as imagens foram obtidas com um smartphone (MI 8 Lite, M1808D2TG), com o auxílio de um suporte de acrílico preto para controlar a iluminação arbitrária da sala. O suporte tem formato cúbico (130 × 100 × 100 mm³) com abertura na parte superior para promover acesso à câmera do smartphone e visualização do *chip*.

As principais etapas operacionais do microdispositivo RT-LAMP centrífugo para detecção de SARS-CoV-2 são ilustradas na Figura 26.



Figura 26. Ilustração esquemática da amplificação e detecção RT-LAMP em microdispositivos PS-T centrífugos: (1) adição de reagentes e selagem com papel de contato transparente; (2) incubação em um termobloco; (3) centrifugação por *hand-spinner* para ruptura da válvula e (4) detecção visual por radiação UV.

Posteriormente para comprovar que a fluorescência obtida na reação positiva era de amplificação específica, a solução foi removida da câmara de detecção e submetida a separação eletroforética em gel de agarose 3% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE). A corrida eletroforética foi realizada de 115 min em tampão TBE a 90 V. Em seguida, os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador UV (Figura 27).



Figura 27. Detecção dos produtos de amplificação RT-LAMP. A) *on-chip* visualizando os resultados diretamente na câmara de detecção do dispositivo. B) *off-chip* por separação eletroforética em gel de agarose 3%.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos um importante avanço em relação ao trabalho anteriormente publicado por nosso grupo de pesquisa (DE OLIVEIRA *et al.,* 2017; MENDES *et al.,* 2019). Em nosso artigo anterior sobre RT-LAMP em microdispositivos descartáveis, a detecção visual era feita diretamente na câmara do microdispositivo, no entanto era necessário a adição do intercalador de DNA SG manualmente, com auxílio de uma pipeta. A adição do intercalador era realizada após a reação de amplificação, inserindo 0,5 µL de SG I (1:10 em água) na câmara reacional. Essa etapa final de manipulação dos fluidos, após término da reação de amplificação, requeria a abertura dos reservatórios para acessar a câmara reacional, momento em que grande quantidade de *amplicons* eram formados, proporcionando boas chances de contaminação entre reações.

Este trabalho buscou superar esse problema através da integração e automatização da mistura dos *amplicons* com o SYBR Green. Para permitir essa integração e automatização mais funcionalidades foram incorporadas ao microdispositivo, as válvulas hidrofóbicas de toner descritas anteriormente por Ouyang *et al.* (2013).

As válvulas hidrofóbicas proporcionaram com sucesso o controle do processo de manipulação de dois diferentes fluidos conforme descrito anteriormente no Capítulo 1. Em nosso trabalho as válvulas de toner permitiram confinar a mistura dos *amplicons* e o SYBR Green desde o início da reação.

2.4.1. RT-LAMP em microdispositivos de PS-T

2.4.1.1 Otimização das condições reacionais da RT-LAMP em microdispositivos de PS-T

infectados Para detectar pacientes pelo SARS-CoV-2 no microdispositivo centrífugo PS-T, inicialmente otimizamos a composição da mistura reacional. As concentrações de enzima, iniciadores e dNTP foram otimizadas. Conforme demonstrado em estudos anteriores (DE OLIVEIRA et al., 2017; MENDES et al., 2019) a LAMP realizada em dispositivos microfluídicos requer uma concentração maior de enzima devido à grande relação área/volume da câmara de reação. Neste estudo, observamos que a concentração mínima de enzima para o sucesso da reação foi de 0,48 U µL⁻¹, e essa concentração foi suficiente para o sucesso da reação mesmo com pequenas cópias de RNA. As concentrações otimizadas de dNTPs e iniciadores que demonstraram uma melhor eficiência do RT-LAMP foram: 1,0 mM de dNTP e 0,2 µM de cada iniciador externo (F3 e B3), 1,6 µM de cada iniciador interno (FIP e BIP), e 0,4 µM de cada iniciador de loop (LF e LB).

2.4.1.2. Tempo de incubação da reação RT-LAMP em microdispositivos de PS-T

Para a obtenção de um teste rápido para o diagnóstico de COVID-19, mantendo alta sensibilidade, o tempo de incubação foi otimizado testando os períodos de 5, 10, 15, 20 e 30 min de aquecimento a 72 °C. Os resultados da otimização do tempo de incubação mostraram que 10 minutos foi o menor tempo que produziu quantidades detectáveis de fragmentos na detecção visual e no gel de agarose (Figura 28B). Resultados falso-positivos foram observados com tempos de incubação superiores a 20 min (Figura 28A). Portanto, todos os ensaios foram realizados com 10 minutos de tempo de incubação.



Figura 28. Avaliação do tempo de incubação do RT-LAMP em microdispositivo centrífugo. Nos painéis A: reações NTC (controle não padrão) e B: reações de controle positivo. Em ambos os painéis: M: marcador de peso molecular.

Na maioria dos trabalhos que realizaram a detecção de SARS-CoV-2 por RT-LAMP em microtubos, o tempo ótimo de reação variou de 30 a 60 minutos (LAMB *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020c; SILVA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021). Na maior parte desses artigos os autores utilizaram a versão *Bst* 2.0, e isso explica o tempo mais longo de RT-LAMP. Em nosso estudo anterior, demonstramos que a enzima DNA polimerase *Bst* 2.0 precisa de mais tempo de aquecimento do que a *Bst* 3.0 (MENDES *et al.*, 2019). Além disso, o uso da enzima *Bst* 3.0 diminuiu o custo da reação, pois não requer o uso de uma enzima transcriptase extra e fornece resultados em tempos de análise mais curtos. Uma vez que *Bst* 3.0 fornece o tempo de amplificação mais rápido, e apresenta um alto desempenho, essa é um reagente ideal para uso em métodos de amplificação para o diagnóstico rápido de COVID-19.

2.4.1.3. Limite de detecção, sensibilidade e especificidade

A sensibilidade da RT-LAMP em um PS-T centrífugo foi determinada por diluição em série de RNA de SARS-CoV-2. As reações foram realizadas com quantidades iniciais de RNA variando de 10⁷ a 10⁻⁶ cópias de RNA. A plataforma PS-T centrífuga permitiu a detecção de *amplicons* no gel de agarose em reações que começam com 10⁻⁴ cópias µL⁻¹ de cópias do genoma viral (Figura 29).



Figura 29. Detecção visual de produtos de amplificação SARS-CoV-2 *via* RT-LAMP em diferentes quantidades de cópias iniciais do alvo (10⁷ -10⁻⁶ cópias de DNA). (A) Detecção visual; (B) análise digital das imagens das reações realizadas em triplicata, pelo software ImageJ, para correlação quantitativa com a intensidade da fluorescência. (C) Separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação *off-chip.* NTC, não contém RNA alvo.

A avaliação visual da tonalidade do verde e a análise da intensidade do verde no canal RGB coincidem com os resultados apresentados por separação eletroforética em gel de agarose (Figura 29C).

Uma grande vantagem da reação LAMP é a possibilidade de realizar detecção visual sem a necessidade de eletroforese, permitindo uma leitura fácil e rápida dos resultados. A utilização de reagentes intercaladores de DNA como estratégia de detecção na LAMP, já é bem explorada na literatura (PARIDA *et al.*, 2008; OSCORBIN *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2018). A intensidade de fluorescência para reações positivas varia de acordo com o número de cópias de RNA inicial, como pode ser visto na Figura 29A. Mostramos aqui que a análise da intensidade da cor verde na câmara de detecção, pode ser usada para quantificação semi-quantitativa da carga viral. As imagens foram obtidas com câmera de celular e avaliadas no programa ImageJ. A intensidade da cor foi medida usando o canal verde dos canais de cores RGB (vermelho, verde, azul). A Figura 29B mostra o comportamento linear razoável, com $R^2 = 0.9647$, da intensidade de fluorescência em relação ao número de cópias iniciais de RNA. Os valores do desvio padrão de cor (n= 3) foram calculados e variaram de 0.017 a 6.69. Considerando a captura da imagem pelo celular, os valores de desvio foram satisfatórios, revelando um bom potencial para semi-quantificação da carga viral envolvendo amostras reais.

Ademais, a análise de regressão probit considerando 8 réplicas independentes para cada concentração de RNA, revelou que o limite de detecção com 95% de probabilidade foi de 10⁻³ (-2,91 log₁₀) cópias do RNA SARS-CoV-2, com intervalo de confiança de - 3,58 a -1,29 log₁₀ das cópias iniciais do SARS-CoV-2 (Figura 30).

				В)
N° de cópias iniciais de SARS-CoV-2	N° de Replicatas	N° de Resultados Positivos	Taxa de acerto em %	1,0 8,0 de
1.0 x 10º	8	8	100	
1.0 x 10 ⁻²	8	8	100	
1.0 x 10 ⁻³	8	7	87.5	۳ _{0,2}
1.0 x 10 ⁻⁴	8	6	75	
1.0 x 10 ⁻⁵	8	3	37.5	
1.0 x 10 ⁻⁶	8	0	0	Log_{10} (número de cópias)

Figura 30. Limite de detecção do ensaio SARS-CoV-2. A) Tabela obtida a partir de 8 réplicas de diluições seriais para avaliar o limite de detecção (LOD) do ensaio SARS-CoV-2 RT-LAMP. B) A curva de análise de regressão de probit obtida a partir de 8 réplicas de diluições seriais. A análise de regressão Probit foi calculada usando o software MedCalc (versão 18.11), dando um valor C95 (concentração detectável 95% do tempo) de -2,91 log 10 das cópias iniciais do SARS-CoV-2.

Esse baixo limite de detecção de RT-LAMP significa que a técnica é capaz de detectar a presença de SARS-CoV-2, mesmo em pacientes com baixa carga viral, permitindo o diagnóstico precoce de COVID-19. Atualmente, alguns estudos relatam a detecção molecular de SARS-CoV-2 por LAMP em tubos com um limite de detecção de 0,1–10 cópias μ L⁻¹ (EL-THOLOTH *et al.,* 2020; LU *et al.,* 2020). Um estudo publicado recentemente por Soares *et al.* relata um ensaio de LAMP executada em uma plataforma de microfluidos com base em PMMA com um limite de detecção de 10²-10³ cópias por reação em um tempo de análise de 30 minutos (SOARES e*t al.,* 2020).

Rodriguez-Manzano e colaboradores descreveram um ensaio LAMP em um dispositivo microfluídico de cartucho para a detecção de amostras de RNA de SARS-CoV-2 mostrando um limite de detecção de 10 cópias de RNA por reação em menos de 20 minutos (RODRIGUEZ-MANZANO *et al.*, 2021). Em um estudo relatado por Tian *et al.* (2020) um sistema microfluídico centrífugo totalmente automatizado foi usado para detectar SARS-CoV-2 através de um ensaio RT-LAMP de 70 min com um limite de detecção de 2 cópias por reação (TIAN *et al.*, 2020).

77

O limite de detecção encontrado no presente estudo é inferior aos relatados na literatura, que apresenta grande potencial para o diagnóstico de COVID-19, mesmo no início da infecção. Em um estudo com amostras coletadas durante o curso clínico do COVID-19, Wölfel *et al.*, (2020) demonstrou uma alta carga média de RNA do vírus no início dos sintomas, na fase aguda (que compreende até 5° dia de infecção) é de 6,76 × 10⁵ cópias em amostras de *swab* nasofaríngeo. Considerando que o valor é substancialmente superior ao limite de detecção obtido neste estudo, nossa metodologia apresenta a possibilidade de detectar o vírus desde os primeiros dias de infecção. O limite de detecção de 10⁻³ (-2,91 log 10) cópias de RNA encontrado aqui para a detecção de SARS-CoV-2 foi semelhante ao limite de detecção do vírus Zika utilizando a *Bst* 3.0 com 10 minutos de reação (ESTRELA *et al.*, 2019).

Devido ao limite de detecção impressionantemente baixo, nossa metodologia e plataforma provaram ser uma ferramenta importante que pode ser usada em amostras coletadas imediatamente após o início dos sintomas, permitindo o diagnóstico nos estágios iniciais da infecção quando a detecção de anticorpos ainda é negativa.

A especificidade dos iniciadores usados neste estudo para a detecção de SARS-CoV-2 também foi avaliada, utilizando amostras de vírus influenza, amostra de pacientes saudáveis para COVID-19 e amostras de pacientes infectados com SARS-CoV-2. A fluorescência só foi verificada em amostras que continham o SARS-CoV-2 e não verificada com outras amostras de vírus ou amostras humanas saudáveis (Figura 31), demonstrando o alto nível de especificidade de RT-LAMP.



Figura 31. Avaliação da especificidade e análise de amostras clínicas por RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2. (A) Detecção visual no chip. (B) Detecção fora do chip: gel de agarose.

Esses resultados revelaram que a RT-LAMP em microdispositivo centrífugo PS-T contém alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de COVID-19, além do grande potencial para aplicações em pontos de atendimento (POCT).

2.4.4. Avaliação de RT-LAMP em um ensaio de microdispositivo PS-T centrífugo em amostras clínicas

Avaliamos o desempenho do microdispositivo centrífugo PS-T para o diagnóstico de COVID-19 em amostras clínicas reais. Como prova de conceito da capacidade de nossa plataforma no diagnóstico de COVID-19, utilizamos 20 amostras reais previamente testadas por RT-qPCR. Destas 20 amostras, dez foram negativas e dez testadas como positivas pelo RT-LAMP (Figura 32).


Figura 32. Avaliação da especificidade por RT-LAMP on-chip, avaliando 10 amostras positivas e 10 amostras negativas para infecção por SARS-CoV-2.

As amostras confirmaram 100% de concordância entre o teste baseado em RT-LAMP realizado no dispositivo centrífugo PS-T (com 10 minutos de reação) com os ensaios qPCR, que é considerado o padrão ouro para o diagnóstico molecular de COVID -19.

2.5 CONCLUSÃO

Nós relatamos aqui um ensaio de 10 minutos para a detecção de SARS-CoV-2 com base em uma reação RT-LAMP realizada em um microdispositivo centrífugo descartável. A integração e automatização da reação RT-LAMP com a detecção visual no dispositivo centrífugo permitiu que todo o processo fosse realizado em ambiente fechado, evitando contaminações e resultados falso-positivos. Além disso, a vantagem da detecção visual integrada e automatizada fornecida por uma plataforma de centrifugação sem eletricidade movida a mão, usando um *hand-spinner* proporcionou a obtenção de resultados rápidos, eliminando as etapas de pipetagem manual para inserção do intercalador de DNA.

Nos testes realizados no microchip PS-T, foi possível detectar *amplicons* em reações que começaram com -2,91 log 10 cópias do RNA SARS-CoV-2 (~10⁻³ cópias por reação) com detecção diretamente na câmara de detecção do microdispositivo. Este limite de detecção é significativamente menor do que estudos publicados recentemente que descrevem LAMP em microdispositivos para o diagnóstico de COVID-19 (SOARES *et al.,* 2020; RODRIGUEZ-MANZANO *et al.,* 2021; TIAN *et al.,* 2020).

O baixo limite de detecção encontrado neste estudo deve-se ao fato de que o uso do SYBR Green leva a um aumento da sensibilidade quando comparado a outros métodos de detecção (ZHANG *et al.*, 2014). No entanto, o efeito inibitório do SYBR Green na reação LAMP está bem estabelecido (QUYEN *et al.*, 2019). Por esse motivo, a etapa de adição do intercalador de DNA ao final da reação é necessária. Neste estudo, o dispositivo aqui desenvolvido permitiu a integração desta etapa, representando avanços em relação aos estudos anteriores (DE OLIVEIRA *et al.,* 2017; MENDES *et al.,* 2019). Entretanto, a demanda por extração fora do chip ainda são limitações a serem superadas para a obtenção de um microchip totalmente integrado para diagnóstico molecular.

Também é importante considerar o custo do nosso teste, que é muito menor do que o custo de um teste baseado em qPCR. Enquanto os reagentes para diagnóstico envolvendo a metodologia qPCR, custam, em média, R\$ 100,00 por teste, o diagnóstico usando nossa metodologia e nosso dispositivo custa menos de R\$ 5,00 (incluindo microchips e reagentes).

Os testes baseados em RT-LAMP realizados em um microdispositivo descartável e de baixo custo representam o primeiro passo na aplicação de diagnósticos moleculares para testes *point-of-care*. Todo o sistema pode ser miniaturizado para ter um diagnóstico molecular específico e simples que pode ser levado a um local remoto. Devido à sua operação simples e à falta de instrumentação sofisticada, o RT-LAMP realizado na plataforma centrífuga PS-T pode ser uma ferramenta valiosa para o diagnóstico molecular de COVID-19, especialmente em regiões do mundo com recursos limitados.

2.6 REFERÊNCIAS

CANDIDO, D. S., I. M. CLARO, J. G. DE JESUS, W.M. SOUZA, E.C ET AL. SABINO, AND N. R. FARIA. 2020. "Evolution and Epidemic Spread of SARS-CoV-2 in Brazil." **Compos. Part A Appl. Sci. Manuf**., v. 68, n. 1, p. 1–12, 2020.

CHIARI, M. F. Nova Metodologia de Diagnóstico para Ehrlichia canis: PCR X LAMP. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, USP, São Carlos, SP, 2010.

COLTRO, W. K. T., PICCIN, E., CARRILHO, E., JESUS, D. P. D., SILVA, J. A. F. D., SILVA, H. D. T. D., & LAGO, C. L. D. Microssistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, p. 1986-2000, 2007.

CORMAN, V.M., LANDT, O., KAISER, M., MOLENKAMP, R., MEIJER, A., CHU, D.K.W., BLEICKER, T., BRÜNINK, S., SCHNEIDER, J., SCHMIDT, M.L., MULDERS, D.G.J.C., HAAGMANS, B.L., VAN DER VEER, B., VAN DEN BRINK, S., WIJSMAN, L., GODERSKI, G., ROMETTE, J.L., ELLIS, J., ZAMBON, M., PEIRIS, M., GOOSSENS, H., REUSKEN, C., KOOPMANS, M.P.G., DROSTEN, C., Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 2020.

CHU, D.K.W., PAN, Y., CHENG, S.M.S., HUI, K.P.Y., KRISHNAN, P., LIU, Y., NG, D.Y.M., WAN, C.K.C., YANG, P., WANG, Q., PEIRIS, M., POON, L.L.M. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. **Clinical chemistry**, v. 66, n. 4, p. 549-555, 2020.

DE OLIVEIRA, K. G., BORBA, J. C., BAILAO, A. M., DE ALMEIDA SOARES, C. M., CARRILHO, E., & DUARTE, G. R. M. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. **Analytical biochemistry**, v. 534, p. 70-77, 2017.

EL-THOLOTH, M., BAU, H. H., SONG, J. A single and two-stage, closed-tube, molecular test for the 2019 novel coronavirus (COVID-19) at home, clinic, and points of entry. **ChemRxiv**, 2020.

ESTRELA, P. F. N., DE MELO MENDES, G., DE OLIVEIRA, K. G., BAILÃO, A. M., DE ALMEIDA SOARES, C. M., ASSUNÇÃO, N. A., & DUARTE, G. R.

M. Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. **Journal of virological methods**, v. 271, p. 113675, 2019.

FIERABRACCI, Alessandra; ARENA, Andrea; ROSSI, Paolo. COVID-19: A review on diagnosis, treatment, and prophylaxis. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 14, p. 5145, 2020.

FISCHBACH, J., XANDER, N. C., FROHME, M., & GLÖKLER, J. F. Shining a light on LAMP assays' A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. **Biotechniques**, v. 58, n. 4, p. 189-194, 2015.

HASÖKSÜZ, MUSTAFA, SELCUK KILIÇ, FAHRIYE SARAÇ. 2020. "Coronaviruses and Sars-Cov-2." Turkish J. Med. Sci., vol. 50, no. SI-1, pp. 549–556, 2020.

HSIEH, K., MAGE, P. L., CSORDAS, A. T., EISENSTEIN, M., & SOH, H. T. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). **Chemical communications**, v. 50, n. 28, p. 3747-3749, 2014.

IZADI, A., MOSLEMI, E., & SHAHHOSSEINY, M. H. Comparison of SYBR Green and turbidimetry methods for loop mediated isothermal amplification (LAMP) product detection in diagnosis of hepatitis B virus (HBV). African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 42, p. 7003-7007, 2012.

JI, M., XIA, Y., LOO, J. F. C., LI, L., HO, H. P., HE, J., GU, D. Automated multiplex nucleic acid tests for rapid detection of SARS-CoV-2, influenza A and B infection with direct reverse-transcription quantitative PCR (dirRT-qPCR) assay in a centrifugal microfluidic platform. **Rsc Advances**, v. 10, n. 56, p. 34088-34098, 2020.

JIANG, FANG, LIEHUA DENG, LIANGQING ZHANG, YIN CAI, CHI WAI CHEUNG, AND ZHENGYUAN XIA. 2020. "Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).)," **J. Gen. Intern. Med.,** vol. 35, no. 5, pp. 1545–1549, 2020.

KIL, E.J., KIM, S., LEE, Y.J., KANG, E.H., LEE, M., CHO, S.H., KIM, M.K., LEE, K.Y., HEO, N.Y., CHOI, H.S., KWON, S.T., LEE, S. Advanced loopmediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination. **J. Virol. Methods,** v. 213, p. 68-74, 2015.

KOO, J.; TAMURA, D. Y. Fidget spinner battery-LED unit ingestion in a 13month-old boy. **Clinical Pediatrics**, v. 57, n. 7, p. 857-860, 2018.

LAMB, L. E; BARTOLONE, S. N., WARD, E.; CHANCELLOR, M. B. Rapid detection of novel coronavirus (COVID19) by reverse transcription-loop-

mediated isothermal amplification. **Available at SSRN 3539654-The Lancet**, 2020.

LIU, YEN CHIN, REI LIN KUO, AND SHIN RU SHIH. 2020. "COVID-19: The First Documented Coronavirus Pandemic in History.**Biomed. J.**, vol. 43, no. 4, pp. 328–333, 2020.

LIN, Q., YE, X., HUANG, Z., YANG, B., FANG, X., CHEN, H., & KONG, J. Graphene oxide-based suppression of nonspecificity in loop-mediated isothermal amplification enabling the sensitive detection of cyclooxygenase-2 mRNA in colorectal cancer. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 24, p. 15694-15702, 2019.

LU, R., WU, X., WAN, Z., LI, Y., ZUO, L., QIN, J., ... & ZHANG, C. Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 3, p. 344-347, 2020.

MENDES, G. M., OLIVEIRA, K. G., BORBA, J. C., OLIVEIRA, T. S., FIACCADORI, F. S., NOGUEIRA, M. L., BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M. A.; CARRILHO, E.; DUARTE, G. R. M; Molecular diagnostics of dengue by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) in disposable polyester-toner microdevices. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 30, p. 1841-1849, 2019.

MORI, Y., NOTOMI, T., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **J. Infect. Chemother**. v. 15, n. 2, p. 62-69, 2009.

NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.

OUYANG, Y., WANG, S., LI, J., RIEHL, P. S., BEGLEY, M., & LANDERS, J. P. Rapid patterning of 'tunable'hydrophobic valves on disposable microchips by laser printer lithography. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 9, p. 1762-1771, 2013.

OSCORBIN, I. P., BELOUSOVA, E. A., ZAKABUNIN, A. I., BOYARSKIKH, U. A., & FILIPENKO, M. L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). **Biotechniques**, v. 61, n. 1, p. 20-25, 2016.

PARIDA, M., SANNARANGAIAH, S., DASH, P.K., RAO, P.V.L., MORITA, K.. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev. Med. Virol**., v. 18, n. 6, p. 407-421, 2008.

PARK, G. S., KU, K., BAEK, S. H., KIM, S. J., KIM, S. I., KIM, B. T., & MAENG, J. S. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting severe acute respiratory syndrome coronavirus

2 (SARS-CoV-2). The Journal of Molecular Diagnostics, v. 22, n. 6, p. 729-735, 2020.

SOHRABI, C., ALSAFI, Z., O'NEILL, N., KHAN, M., KERWAN, A., AL-JABIR, A., ... & AGHA, R. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). International journal of surgery, v. 76, p. 71-76, 2020.

QUYEN, T. L., & NGO, T. A. Bang DD, Madsen M, Wolff A. Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting. **Front. Microbiol**, v. 10, p. 1-12, 2019.

RAMACHANDRAN, A., HUYKE, D. A., SHARMA, E., SAHOO, M. K., HUANG, C., BANAEI, N., PINSKY, B. A.; SANTIAGO, J. G. Electric field-driven microfluidics for rapid CRISPR-based diagnostics and its application to detection of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 47, p. 29518-29525, 2020.

RODRIGUEZ-MANZANO, J., MALPARTIDA-CARDENAS, K., MOSER, N., PENNISI, I., CAVUTO, M., MIGLIETTA, L., GEORGIOU, P. Handheld pointof-care system for rapid detection of SARS-CoV-2 extracted RNA in under 20 min. **ACS central science**, v. 7, n. 2, p. 307-317, 2021.

SANTOS, C. A. D., OLIVEIRA, K. G. D., MENDES, G. M., SILVA, L. C., SOUZA JR, M. N. D., ESTRELA, P. F. N., ... & DUARTE, G. R. Detection of SARS-CoV-2 in Saliva by RT-LAMP During a Screening of Workers in Brazil, Including Pre-Symptomatic Carriers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 2071-2077, 2021.

SILVA, L. D. C., DOS SANTOS, C. A., MENDES, G. D. M., OLIVEIRA, K. G. D., DE SOUZA JÚNIOR, M. N., ESTRELA, P. F. N., ... & DUARTE, G. R. M. Can a field molecular diagnosis be accurate? A performance evaluation of colorimetric RT-LAMP for the detection of SARS-CoV-2 in a hospital setting. **Analytical Methods: Advancing Methods and Applications**, 2021.

SOARES, R. R., AKHTAR, A. S., PINTO, I. F., LAPINS, N., BARRETT, D., SANDH, G., YIN, X.; PELECHANO, V.; RUSSOM, A. Point-of-care detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swab samples using an integrated smartphone-based centrifugal microfluidic platform. **medRxiv**, 2020.

SONG, J., EL-THOLOTH, M., LI, Y., GRAHAM-WOOTEN, J., LIANG, Y., LI, J., ... & BAU, H. H. Single-and two-stage, closed-tube, point-of-care, molecular detection of SARS-CoV-2. **Analytical chemistry**, v. 93, n. 38, p. 13063-13071, 2021.

Sohrabi, Catrin, Zaid Alsafi, Niamh O Neill, Mehdi Khan, and Ahmed Kerwan. 2020. Since January 2020 Elsevier Has Created a COVID-19 Resource Centre with Free Information in English and Mandarin on the Novel Coronavirus COVID- 19. The COVID-19 Resource Centre Is Hosted on Elsevier Connect the Company 's Public News and Information. **Int. J. Surg.,** v. 76, pp. 71–76, 2020.

THAI, H. T. C. et al. Development and evaluation of a novel Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Corona virus. **J. Clin. Microbiol**, v. 42, 2004.

TIAN, B. et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loopmediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 86, p. 420-425, 2016.

TIAN, F., LIU, C., DENG, J., HAN, Z., ZHANG, L., CHEN, Q., & SUN, J. A fully automated centrifugal microfluidic system for sample-to-answer viral nucleic acid testing. **Science China Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1498-1506, 2020.

TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H., & NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature protocols**, v. 3, n. 5, p. 877-882, 2008.

UDUGAMA, B., KADHIRESAN, P., KOZLOWSKI, H.N., MALEKJAHANI, A., OSBORNE, M., LI, V.Y.C., CHEN, H., MUBAREKA, S., GUBBAY, J., CHAN, W.C.W. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS nano**, v. 14, n. 4, p. 3822-3835, 2020.

Wang, D. G., Brewster, J. D., Paul, M., & Tomasula, P. M. . Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6048-6059, 2015.

WHO, 2020. Coronavirus disease. World Heal. Organ. 2019, 2633.

WÖLFEL, R., CORMAN, V. M., GUGGEMOS, W., SEILMAIER, M., ZANGE, S., MÜLLER, M. A., WENDTNER, C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465-469, 2020.

WONG, Y. P., OTHMAN, S., LAU, Y. L., RADU, S., & CHEE, H. Y. Loopmediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 3, p. 626-643, 2018.

YANG, Y., CHEN, Y., TANG, H., ZONG, N., JIANG, X., 2020. Microfluidics for Biomedical Analysis. Small Methods. **Small Methods**, v. 4, n. 4, p. 1900451, 2020.

YELIN, I., AHARONY, N., TAMAR, E.S., ARGOETTI, A., MESSER, E., BERENBAUM, D., SHAFRAN, E., KUZLI, A., GANDALI, N., HASHIMSHONY, T., MANDEL-GUTFREND, Y., HALBERTHAL, M., GEFFEN, Y., SZWARCWORT-COHEN, M., KISHONY, R., Evaluation of COVID-19 RTqPCR test in multi sample pools. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2073-2078, 2020. YONGKIETTRAKUL, S., JAROENRAM, W., ARUNRUT, N., CHAREANCHIM, W., PANNENGPETCH, S., SUEBSING, R., KONGKASURIYACHAI, D. Application of loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick for detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **Parasitology international**, v. 63, n. 6, p. 777-784, 2014.

ZHANG, T., WU Q., ZHANG, Z. "Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak." **Curr. Biol**., v. 30, n. 8, p. 1578, 2020a.

ZHANG, Y., ODIWUOR, N., XIONG, J., SUN, L., NYARUABA, R. O., WEI, H., & TANNER, N. A. Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP. **MedRxiv**, 2020b.

ZHANG, X., LOWE, S. B., & GOODING, J. J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 491-499, 2014.

ZHU, X., WANG, X., HAN, L., CHEN, T., WANG, L., LI, H., LI, S., HE, L., FU, X., CHEN, S., XING, M., CHEN, H., WANG, Y., Reverse Transcription loopmediated isothermal amplification combined with nanoparticles-based biosensor for diagnosis of COVID-19. **MedRxiv**, 2020a.

ZHU, H., FOHLEROVÁ, Z., PEKÁREK, J., BASOVA, E., NEUŽIL, P., Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 153, p. 112041, 2020b.

ZHU, H., ZHANG, H., NI, S., KORABEČNÁ, M., YOBAS, L., & NEUZIL, P. The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 130, p. 115984, 2020c.

CAPÍTULO 3

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVIROSES COM DETECÇÃO *ENDPOINT* UTILIZANDO INTERCALADOR DE DNA

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Arboviroses

As arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por vetores artrópodes. São assim designados não somente pela aquisição e transmissão, mas, principalmente, por parte do ciclo replicativo ocorrer nos insetos. A expressão arbovírus vem do termo inglês *athropod-borne virus,* adotada em 1942, que agrupa grupos de infecções virais cujo mecanismo de transmissão ou veiculação do vírus se dá através de artrópodes hematófagos, que ao picar um hospedeiro mamífero (seres humanos e outros animais) transmite um agente infecioso ou patogênico (CONWAY *et al.,* 2014; LOPES *et al.,* 2014). Em todo o mundo, cerca de 545 espécies de arbovírus foram isoladas. Cento e cinquenta das 545 espécies pertencem a cinco famílias: *Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, e causam doenças em humanos (LOPES *et al.,* 2014).

No Brasil mais de 200 arbovírus foram identificados e isolados na região Amazônica, uma das maiores reservas de arbovírus do mundo. (CASSEB *et al.*, 2013). Aproximadamente 40 desses causam doenças aos seres humanos e 6 vem alcançando uma ampla distribuição geográfica, estando envolvidos em epidemias, sendo esses: o complexo de dengue (DENV I-IV), Febre Amarela (YFV), Rocio (ROCV), Oropouche (OROV), Chikungunya (CHIKV), e Mayaro (MAYV) (CASSEB *et al.*, 2013; ROSA, 2016).

Em geral, os arbovírus, possuem dois ciclos de transmissão distintos, o ciclo enzoótico e o ciclo urbano. No ciclo enzoótico, o vírus circula entre os animais silvestres e é transmitido por vetores artrópodes a hospedeiros primatas não-humanos, circulando entre poucas espécies de vertebrados e invertebrados. Nesse caso a circulação do vírus pode acarretar surtos silvestres, denominados epizootias, em que um número elevado de primatas não-humano é infectado ao mesmo tempo em uma mesma região. Em contrapartida, o ciclo urbano, consiste em arbovírus que são capazes de infectar humanos ou animais domésticos, nesse caso esses hospedeiros são considerados hospedeiros acidentais (DONALISIO *et al.,* 2015).

O manejo de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes aegypti têm se constituído um dos principais problemas de saúde pública no mundo, no Brasil, só em 2016, um custo total de mais de R\$ 2,3 bilhões foram gastos (TEICH et al., 2017). No mundo são registrados em média de 100 a 400 milhões casos novos de infecções por ano (KRAEMER et al., 2015; BRADY e HAY, 2020). Esse elevado número de casos se deve a rápida ascensão do mosquito, em decorrência de hábitos sinantrópicos do vetor (BRADY e HAY, 2020).

3.1.1.2 Aedes aegypti

O Aedes aegypti (*Ae. aegypti*) é um inseto da família *Cullicidae*, de acordo com Tabachnick (1991), o mosquito foi originário na África, e posteriormente disseminado em todo mundo. É quase certo que o ancestral da forma doméstica de *Ae. aegypti* viveu na África subsaariana. A entrada do *Ae. Aegypti* no Brasil se deu no final do século 19 e início do século 20, e desde então surtos de febre amarela passaram a ser registradas no Brasil. Em 1849, grande parte da população havia sido contaminada com febre amarela, sendo notificados 90 mil casos em uma população de 266 mil (TABACHNICK, 1991; BENCHIMOL, 2021). Desde a introdução do mosquito vetor o risco de surgimento de infecções urbanas passou a ser uma realidade a ser enfrentada, a expansão do *Ae. aegypti*, implantou-se igualmente em praticamente todo o território brasileiro, sendo observado o contínuo surgimento de surtos da doença (SCHATZMAYR, 2001).

Além da febre amarela, o *Ae. Aegypti* é principal vetor urbano de outras doenças como Dengue, Zika e Chikungunya. Por se tratarem de doenças transmitidas por um mesmo vetor, a circulação concomitante de dengue, zika e chikungunya no Brasil, dificultou o manejo das doenças uma vez que os pacientes infectados apresentavam quadros clínicos semelhantes, indo desde infecções subclínicas (quadro infeccioso assintomático) a infecções clínicas (quadro infeccioso assintomáticos, os quadros de manifestações clínicas podem resultar em sintomas típicos, como: encefalites, febre, exantema, diarreia, mialgia, artralgia, erupção cutânea, entre outros, variando a intensidade dos sinais e sintomas (MORRISON, 2014). Nos quadros de manifestações clínicas atípicas, sintomas como: virulência com casos de acometimento neurológico, articular e hemorrágico e características clínicas com desfechos mais graves em idosos, grávidas, neonatos e crianças também podem ser encontrados (DONALISIO *et al.,* 2017).

3.1.1.2.1 Dengue

A dengue é classificada no Brasil e no mundo, como uma doença emergente e reemergente que se constitui em um problema grave de saúde pública (ABE *et al.*, 2012; TAUIL, 2002). No mundo os países mais afetados encontram-se nas Américas (Américas do Sul, Central e do Norte) além da, África, Caribe, Austrália, China, Índia, Sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico, e Taiwan. Na América do Sul, Brasil, Paraguai, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname, e Equador são as áreas mais atingidas com maior incidência de casos, ademais, nesses países cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob risco de se infectarem durante a proliferação do mosquito vetor (SILVA E SCOPEL, 2008; TAUIL, 2002).

No Brasil a doença foi introduzida no ano de 1981/82 no estado de Roraima sendo declarada posteriormente a primeira grande epidemia em 1986, no estado do Rio de Janeiro: a epidemia de dengue (SCHATZMAYR, 2001).

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, de etiologia viral, com potencial para assumir formas graves e letais na fase aguda. O vírus da dengue (DENV) do gênero Flavivirus, composto por um filamento único de ácido ribonucléico (RNA), pertencente à família *Flaviridae* e apresenta quatro sorotipos virais, imunologicamente distintos, intitulados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, vale destacar que após a infecção por um dos sorotipos, o indivíduo confere imunidade específica duradoura aquele sorotipo específico, mas não para os outros sorotipos (LUPI et al., 2007). O quadro clínico de pacientes infectados por DENV, vão desde casos assintomáticos a casos sintomáticos graves. De acordo com Oliveira et al., (2009) nos casos sintomáticos definidos de dengue clássica (DC) ou hemorrágica (FHD), o indivíduo apresenta febre abrupta e aguda, com duração máxima de 6 dias, seguida de pelo menos dois dos seguintes sintomas: exantema, mialgia, cefaleia, cansaço, dor ao redor dos olhos e incomodo nas articulações (OLIVEIRA et al., 2009). Em média 90% dos casos de dengue são casos predominantes de dengue clássica, contudo, segundo Casali et al., (2004), os números de casos por dengue hemorrágica são preocupantes, uma vez que o número de óbitos por FHD é 34,75 vezes maior que o número de óbitos por dengue clássica (OLIVEIRA et al., 2009; CASALI et al., 2004).

3.1.1.2.2 Chikungunya

De acordo com Morrison (2014) o vírus Chikungunya (CHIKV), é um vírus de RNA da família *Togaviridae* (gênero Alphavirus), originário da África, isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1953. A transmissão autóctone foi registrada em território brasileiro pela primeira vez no ano de 2014, com maior incidência em duas Unidades Federativas: Amapá e Bahia (TAUIL, 2014; HONÓRIO *et al.,* 2015; PATTERSON *et al.,* 2016).

Os sintomas causados por CHIKV são similares ao da dengue e é caracterizado por um início abrupto de febre. A doença chikungunya se traduz como "doença que dobra as articulações", podendo ser altamente debilitante

em casos crônicos (MORRISON, 2014). Os sintomas típicos e característicos das infecções por CHIKV compreendem dores intensas nas articulações, acompanhada de edema ou/e erupções cutâneas. De acordo com Morrison (2014) apenas 5-25% de indivíduos infectados por CHIKV apresentam quadros assintomáticos.

Manifestações clínicas atípicas também são relatadas, como encefalite de tronco cerebral pós-infecção (GAURI *et al.,* 2012), manifestações neurológicas e cardíacas graves (TENUTA *et al.,* 2018), comprometimento dos nervos periféricos da coluna ou também conhecida como mielite transversa aguda (DOS SANTOS *et al.,* 2021) e transmissão vertical passada da mãe para o bebê durante o parto (LEITÃO *et al.,* 2016). O vírus CHIKV não causa má formação nos fetos, no entanto, os recém-nascidos podem apresentar, lesões cutâneas bolhosas, encefalopatia e hiperpigmentação periorbital (MORRISON, 2014; LEITÃO *et al.,* 2016).

3.1.1.2.3 Zika

Dentre os vírus transmitidos pelo mosquito *Ae. aegypti*, o Zika vírus (ZIKV), surgiu como um problema significativo de saúde pública nos últimos anos devido aos diferentes tipos de transmissão e seu impacto devastador no desenvolvimento fetal de seres humanos. O ZIKV também foi associado a uma séria de outras doenças como, uma possível correlação ao ressurgimento da síndrome de Guillain-Barré (GBS), bem como outros problemas neurológicos graves em recém-nascidos, como a microcefalia (CALVERT *et al.,* 2017; SONG *et al.,* 2016; HERRADA *et al.,* 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o ZIKV é um arbovírus da família *Flaviviridae*, cujo principal vetor da doença é o artrópode hematófago *Ae. aegypti*. Todavia, a transmissão do ZIKV pode ocorrer de diversas formas, sendo elas, sexualmente, por transfusão de sangue e também da mãe para o bebê durante o parto ou como resultado da transmissão transplacentária (BESNARD *et al.*, 2014; HERRADA *et al.*, 2018).

A identificação do material genético, o RNA do ZIKV, pode ser detectado em diferentes fluidos corporais como, sangue de 3-1 dias de infecção (ROSSINI *et al.,* 2017), urina de 4 dias-3 semanas de infecção (CAMPOS, *et al.,* 2016; NICASTRI, *et al.,* 2016), sêmen até 6 meses após início dos sintomas (NICASTRI *et al.,* 2016), saliva entre 29-91 dias após início dos sintomas (NICASTRI *et al.,* 2016; BARZON *et al.,* 2016), leite materno, tecidos neurais, vaginais, intestinais, dentre outros (NICASTRI *et al.,* 2016; VASCONCELOS *et al.,* 2018; CAGNO *et al.,* 2019).

No Brasil, o aumento crescente dessas patologias está diretamente relacionado ao ciclo pluvial por propiciar criadouros do mosquito. Nesse sentido, diversas estratégias para o combate da proliferação de mosquitos têm sido desenvolvidas, como: ações da vigilância epidemiológica, mitigação de resistência a inseticidas, avaliação da microevolução de mosquitos, dentre outros, porém o combate ao vetor vem sendo um desafio, visto que os mosquitos apresentam rápidas disseminações. Desse modo, umas das formas mais eficazes para o controle das doenças tem sido o diagnóstico precoce e correto da doença (ACHEE *et al.,* 2019; SUESDEK, 2019; SOUZA-NETO, *et al.,* 2019).

3.1.2 Métodos para diagnósticos das arboviroses

O tratamento adequado da doença e a vigilância epidemiológica do vírus dependem de testes laboratoriais rápidos e precisos. O diagnóstico pode ser realizado por detecção de componentes virais (RNA ou proteínas virais), por ensaios sorológicos através da detecção de imunoglobulinas G e M (IgG e IgM) medindo a concentração de anticorpos contra proteínas virais (resposta imune do hospedeiro), por testes rápidos imunocromatográficos como o teste de antígeno e também por testes de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), que permite a detecção de antígenos e anticorpos através de uma reação enzimática (RODRIGUES *et al.,* 2002).

Os testes de ELISA são testes referência, no entanto são dispendiosos e demorados (4 a 6 h) além de exigir um profissional capacitado

para operação. Em contrapartida os testes imunocromatográficos apresentam praticidade e não requerem muita infraestrutura, nem profissionais altamente qualificados para sua operação (RODRIGUES *et al.,* 2002; GOURINAT *et al.,* 2015).

Uma desvantagem dos testes imunocromatográficos e sorológicos, compreende o período de janela de detecção do antígeno ou anticorpo. Para testes sorológicos através da detecção de IgG e IgM o paciente infectado deve apresentar sintomas em um período compreendido entre 10 ou mais dias antes da coleta de sangue (RODRIGUES *et al.,* 2002; FUMAGALLI, 2018).

Já para testes de antígeno, o paciente deve apresentar sintomas em um período máximo 5 dias. A sensibilidade do teste de antígeno é significativamente aumentada entre o 2° e 3° dia de sintomas (fase aguda), muito embora, Acosta e colaboradores (2014) em seus estudos relatem elevados números de resultados falsos-negativos para infecção por dengue alcançados em testes de antígenos com coletas que compreendem o segundo dia de infecção (ACOSTA *et al.,* 2014),

Dentre os métodos de análises existentes atualmente, as técnicas moleculares, também denominadas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), são conhecidas por sua alta sensibilidade e especificidade, permitindo análises de vírus intimamente relacionados, como por exemplo, dengue, zika e chikungunya, que apresentam quadros clínicos semelhantes e reatividade cruzada sorológica (VASCONCELOS *et al.,* 2018; HERRADA *et al.,* 2018). Nesse sentido, no campo de diagnóstico, os testes mais confiáveis para identificação e diferenciação dessas três arboviroses intimamente relacionadas tem sido a detecção molecular (VASCONCELOS *et al.,* 2018; YIN *et al.,* 2019).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o padrão ouro para o diagnóstico molecular das arboviroses (SONG *et al.,* 2016; VASCONCELOS *et al.,* 2018; HERRADA *et al.,* 2018). Os testes de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) apresentam alta especificidade e sensibilidade e permitem quantificar o número de produtos (cópias) através da correlação entre a intensidade do sinal de fluorescência com a quantidade de cópias de DNA geradas durante a amplificação, correlação denominada *Cycle Threshold*. O *Cycle Threshold* (*Ct*) é definido como o número de ciclo no qual o sinal fluorescente é 10 vezes o desvio padrão do sinal fluorescente da linha de base (sinal das amostras sem controle de modelo). Sendo esse sinal fluorescente o ponto que determina o início da amplificação exponencial.

A carga viral de uma amostra pode ser determinada pelo valor do *Ct* uma vez que o sinal de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA. Assim, quanto maior a carga viral do paciente, mais rápida ocorrerá a amplificação, mais rapidamente será gerado o sinal de fluorescência, menor será o número de ciclos PCR para amplificar esse alvo (*menor Ct*). E, portanto, quanto menor a carga viral, maior será o número de ciclos PCR, menor a intensidade de fluorescência, consequentemente maior o número de *Ct*. Em vista disso, a diminuição do valor de *Ct* corresponde a um aumento do número de cópias (GINZINGER, 2002).

Embora muito bem estabelecida, a PCR exige preparação extensiva de amostras (amostras purificadas livres de inibidores), infraestrutura laboratorial adequada e equipamentos sofisticados, o que dificulta a portabilidade da técnica e adequações para aplicações no *point-of-care* (POC) (SONG *et al.*, 2016).

Nesse sentido, as técnicas isotérmicas de amplificação de ácidos nucléicos surgiram para superar as limitações da PCR, proporcionando diagnósticos moleculares mais rápidos e de menor custo, o que pode ser especialmente útil para países em desenvolvimento. A amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) é uma técnica molecular que tem tido bastante destaque. A LAMP é baseada na atividade de deslocamento da fita, o que elimina a necessidade de desnaturação do DNA de fita dupla. O uso de um conjunto de seis *iniciadores*, capazes de reconhecer seis regiões diferentes ao longo da seqüência-alvo, fornece à LAMP uma alta especificidade (NOTOMI *et al.,* 2000). Além disso, a LAMP é menos afetada pelos inibidores do que a PCR e pode ser realizada diretamente em amostras complexas, livre de extração do material genético (SONG *et al.,* 2016; ESTRELA *et al.,* 2019).

Na literatura a aplicação da RT-LAMP em tempo real (qLAMP) para diferenciação de arboviroses já é relatada (GANGULI et al., 2017; PRIYE et al., 2017; YAREN et al., 2017; SEOK et al., 2020). Diferentemente da PCR em tempo real (qPCR), que utiliza de etapas alternadas de aquecimento e resfriamento da mistura reacional, para hibridização dos iniciadores marcados com sondas fluorogênicas, A LAMP em tempo real (qLAMP) ocorre isotermicamente com ação de sondas inseridas em um dos seis oligonucleotídeos específicos. Yaren e colaboradores (2017) descrevem o desenvolvimento da qLAMP para diferenciação de 3 arboviroses através da utilização de sondas específicas inseridas no final da extremidade 5' do iniciador LB. O mecanismo encontra-se apresentado na Figura 33. De modo geral, assim como a RT-qPCR a quantificação dos ácidos nucleicos decorre dos sinais gerados pelo fluoróforo reporter durante a fase de extensão da fita. O nível de fluorescência, quantificação, identificação e discriminação da arbovirose específica é resultante da hibridização entre os iniciadores que contem a sonda e as cópias geradas no decorrer da reação (YAREN et al., 2017).



Figura 33. Representação da qLAMP utilizando sondas fluorescentes. A) representação da etapa não-cíclica presente no mecanismo LAMP. B) Representação da geração do sinal fluorescente, através do distanciamento do

quencher presente no final da extremidade 3' do *iniciador LB.* O complexo Fluoróforo*quencher* é considerado um iniciador duplex incapaz de emitir fluorescência. Na presença da região-alvo, o complexo se desfaz, emitindo fluorescência, na ausência do alvo o iniciador duplex encontra-se sobreposto/emparelhado ao *quencher*. A geração do sinal fluorescente só é iniciada após o deslocamento do *quencher* em relação ao fluoróforo (B). O mecanismo da qLAMP ocorre da seguinte forma: Após a produção do intermediário *haste-loop* (A), o iniciador LB, hibridiza na sua região complementar localizado entre a região B1 e B2 e direciona a enzima DNA polimerase (*Bst*) para síntese da fita (B). Posteriormente nessa fita sintetizada contendo o fluoróforo *repórter*, o iniciador FIP reconhecer sua região alvo F2c e direciona a enzima para síntese da fita. Essa síntese acarreta no deslocamento do *quencher* presente na extremidade 3', o que resulta na identificação da fluorescência, como representado na parte B (Adaptado de Yaren *et al.*, 2017).

Para transpor a necessidade do uso de sondas fluorescentes que requerem equipamentos de alto custo, algumas metodologias de detecção LAMP têm sido adaptadas para detecção visual *endpoint* utilizando intercaladores de DNA (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; LAU *et al.*, 2010; ESTRELA *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2019). As reações envolvem a adição do intercalador de DNA ao final do tempo de incubação. O intercalador mais amplamente utilizado é o SYBR Green I (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O SYBR Green (SG) é um intercalador de DNA, que ao ligar as cópias da cadeia de DNA original gera fortes sinais de fluorescência sob incidência de uma fonte de radiação UV, que exibe um aprimoramento de fluorescência em média de 100 vezes, se comparado a outros intercaladores, como o brometo de etídio (SINGER *et al.*, 1999). Além de gerar fortes sinais de fluorescência sob incidência de uma fonte de excitação, luz UV, o mesmo é claramente apropriado para detecção a olho nu (KARTHIK *et al.*, 2014; ESTRELA *et al.*, 2019). De acordo com Karthik e colaboradores (2014) a adição de SYBR Green para detecção de produtos LAMP apresenta uma visualização clara e sensível dos resultados, sendo superiores a outros métodos de detecção, como o uso de indicadores metálicos (KARTHIK *et al.*, 2014).

3.2.2.1 Diagnóstico molecular de arboviroses em microdispositivos

O baixo consumo de reagentes, além da geração de pequenas quantidades de resíduos, são vantagens que propiciam o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico em dispositivos microfluidicos (Yin, et al. 2019). Atualmente, o aumento da funcionalidade dos dispositivos microfluidicos, têm beneficiado diversas áreas do conhecimento, dentre elas a área de diagnóstico , que passou a se deslocar cada vez mais para análises e aplicações no POC (BALL *et al.,* 2016; GREENWOOD & GREENWAY, 2002; YIN *et al.,* 2019).

Na busca por diagnósticos remotos, as análises no POC surgiram como uma excelente alternativa em decorrência de vantagens como: i) instrumentação de baixo custo, ii) evita o transporte de amostras do paciente, iii) disponibiliza acessibilidade e iv) viabiliza um processamento simples dos testes laboratoriais (BALL *et al.,* 2016; YIN *et al.,* 2019).

Em 2016, após o surto de infecção ocasionado pelo ZIKV na América do Sul e Central, Song *et al.* (2016) foram os primeiros a propor um sistema POC para detecção rápida do ZIKV via RT-LAMP. A detecção do RNA viral ocorreu em 40 minutos, detectando o ZIKV em amostras de saliva via detecção colorimétrica (adição do corante violeta de cristal leuco). Posteriormente, diversos estudos relataram à amplificação específica do RNA *in vitro* via RT-LAMP como uma técnica molecular extremamente sensível e especifica para detecção do ZIKV (TIAN *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016; GANGULI, *et al.*, 2017; KAARJ *et al.*, 2018;).

Na literatura, testes baseados em LAMP vem sendo relatados para discriminação qualitativa de dengue, zika e chikungunya (PRIYE *et al.*, 2017). Esses testes discriminatórios de arboviroses vêm sendo realizados comumente em plataformas convencionais, os microtubos de polipropileno (PRIYE *et al.*, 2017). Com o intuito de contornar problemas existentes em escala convencional, como: i) o requerimento de manipulação manuais de diferentes etapas para realização de procedimentos analíticos completos e ii) 100

a possibilidade de perdas de reagentes e contaminação durante a manipulação; os dispositivos microfluídicos vêm se destacando, sendo excelentes ferramentas para evitar o erro manual. Ademais, a possibilidade de integração e automatização de duas ou mais etapas, vêm permitindo a realização de diagnósticos moleculares completos, partindo desde o pré-tratamento da amostra até sua detecção (GANGULI *et al.,* 2017).

Na literatura, alguns trabalhos já têm descrito à amplificação molecular RT-LAMP para detecção de arboviroses em dispositivos microfluídicos com diferentes substratos como: polimetilmetacrilato (PMMA) (SONG *et al.*, 2016), polidimetilsiloxano (PDMS) (KUTSUNA *et al.*, 2020; GANGULI *et al.*, 2017), vidro (SABALZA *et al.*, 2018) e papel (CALVERT *et al.*, 2017; KAARJ *et al.*, 2018).

Recentemente, dispositivos de poliéster-toner (PeT), foram utilizados para diagnóstico molecular baseado em LAMP (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017;; MENDES *et al.*, 2019). Mendes *et al.*, (2019) descrevem o diagnóstico em dispositivos de PeT para detecção da dengue, no entanto os dispositivos não dispunham de uma ferramenta para o controle de fluxo dos fluidos, e desta forma, a detecção visual envolvia a adição de um intercalador de DNA através de uma etapa de pipetagem após o final do tempo de incubação. O maior problema de se realizar a detecção visual no *chip* desta forma é a grande probabilidade de contaminação gerada por aerossóis após a liberação do reservatório de entrada para adição do intercalador de DNA, SG(LAU *et al.*, 2010).

Sendo assim, buscou-se neste trabalho resolver esta falha através da automatização da mistura das soluções para a detecção visual, dispensando etapas de pipetagem após o início da reação, utilizando *layout* similar ao dispositivo de PS-T descrito anteriormente por De Oliveira e colaboradores (2021) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). Inicialmente o objetivo do nosso trabalho era desenvolver metodologias RT-LAMP *on-chip* para detecção e diferenciação individual de três arboviroses (dengue, zika e chikungunya). No entanto, para simplificar e diminuir o tempo para o diagnóstico diferencial das

arboviroses, foi desenvolvido aqui um dispositivo de PS-T para multi-análises. Este dispositivo incluiu 9 câmaras reacionais para realização de três testes em um único dispositivo. O dispositivo foi capaz de integrar e automatizar três testes RT-LAMP simultâneos através do uso de válvulas passivas de toner e um sistema centrífugo livre de energia, o *hand-spinner*

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Desenvolver metodologias RT-LAMP *on-chip* com detecção visual *endpoint* utilizando SYBR Green, para aplicação no diagnóstico diferencial entre três arboviroses com sintomas clínicos muito semelhantes e com altos riscos epidemiológicos, a dengue, zika e chikungunya.

3.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais para amplificação e detecção de DENV, ZIKV e CHIKV via RT-LAMP *on-chip* em amostras de RNA e diretamente em amostras clínicas de soro.
- ii) Desenvolver testes RT-LAMP *on-chip* integrando e automatizando a etapa de amplificação e detecção.
- iii) Otimizar as condições experimentais para amplificação e detecção do CHIKV, ZIKV e DENV via RT-LAMP em amostras de RNA e amostras clínicas de soro de pacientes infectados por arbovírus. Toda essa etapa de otimização será realizada em dispositivos de análise única.
- iv) Desenvolver um ensaio RT-LAMP on-chip para multi-análises em um único dispositivo de PS-T, para diagnóstico diferencial simultâneo de três vírus intimamente relacionados: dengue (DENV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV). Esse ensaio deverá realizar a detecção do arbovírus específico em amostras livres de extração, ou seja, diretamente em amostras clínicas de pacientes infectados

 v) Demonstrar a funcionalidade dos dispositivos de PS-T operados por bombeamento centrífugo para detecção multi-análises de ácidos nucleicos, incluindo etapas como: mobilização de reagentes, mistura, amplificação por RT-LAMP e detecção visual *on-chip*.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. Amostras clínicas de pacientes infectados por arbovírus

As amostras clínicas de pacientes infectados com ZIKV, DENV-1 e CHIKV foram estocadas a -80 °C no Laboratório de Biomicrofluídica da Universidade Federal de Goiás. Os vírus provenientes de amostras de soro foram obtidos entre os anos de 2015 e 2021 de pacientes residentes no estado de São Paulo e Goiás catalogados pelo Hospital São Paulo UNIFESP-HSP e Hospital do Policial Militar de Goiânia - Brasil.

Todas as experiências foram realizadas em conformidade com as diretrizes exigidas nacionalmente, seguindo as resoluções CNS 466/12 e CNS 441/11, e em conformidade com as diretrizes institucionais.

3.3.2. Extração e purificação de RNA

O RNA viral foi extraído de amostras clínicas de soro utilizando o Kit de Preparação de RNA Viral + DNA (Cellco, São Carlos, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi armazenado a -80 °C.

3.3.3. RT-qPCR

Para quantificar o RNA extraído,a PCR quantitativa (RT-qPCR) foi realizada. A RT-qPCR foi realizada utilizando o kit GoTaq Probe 1-Step RTqPCR (Promega, Charbonnières-les-Bains, França). A mistura reacional foi preparada para um volume de 10 μ L contendo as seguintes concentrações de reagentes: 5 μ L da GoTaq Promega, 10 μ M de Syto 82 (Invitrogen, Eugene, EUA), 400 nmol L⁻¹ de iniciador direto (F) e 400 nmol L⁻¹ de iniciador reverso (R). As sequências dos pares de iniciadores encontram-se apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos pares de iniciadores utilizados na qPCR para detecção de arboviroses e suas temperaturas de anelamento.

Iniciadores	Sequência 5' a 3'	Referência	_
F – ZIKV	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	LANCIOTTI	et
R – ZIKV	CCGCTGCCCAACACAAG	<i>al.,</i> 2008	
F – DENV 1	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	SANTIAGO	et
R – DENV 1	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	<i>al.,</i> 2013	
F – CHIKV	ACGCAATTGAGCGAAGCAC	Parida et a	al.,
R- CHIKV	CTGAAGACATTGGCCCCAC	2007	

As misturas de RT-qPCR foram incubadas a 45 °C por 15 min (incubação de RT), 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60 °C por 30 s, usando o equipamento termociclador de PCR em tempo real AriaMx adquirido junto a Agilent (Santa Clara, CA).

3.3.4 Preparo da mistura reacional RT-LAMP

As sequências de iniciadores usadas para amplificação por RT-LAMP estão mostradas na Tabela 3.

Iniciadores	Sequência dos iniciadores 5'	Referência
	→ 3'	
F3 – ZIKV	CGGATGGGATAGGCTCAAAC	
B3 – ZIKV	ATGGACCTCCCGTCCTTG	
FIP- ZIKV	CCTGAGGGCATGTGCAAACCTAG	TIAN <i>et al.,</i> 2016
	AATGGCAGTCAGTGGAGAT	
BIP – ZIKV	ACCCTCAACTGGATGGGACAACTG	
	GAGCTTGTTGAAGTGGTG	
LF – ZIKV	CATCAATTGGCTTCACAACGC	
LB – ZIKV	GGGAAGAAGTTCCGTTTTGCTC	
F3 – CHIKV	ACGCAATTGAGCGAAGCAC	
B3 – CHIKV	CTGAAGACATTGGCCCCAC	PARIDA <i>et al.,</i> 2005
FIP- CHIKV	CGGATGCGGTATGAGCCCTGTATT	
	TTTGGAGAAGTCCGAATCATGC	
BIP – CHIKV	TCCGCGTCCTTTACCAAGGAAATT	
	TTTTTGGCGTCCTTAACTGTGAC	
LF – CHIKV	GCTGATGCAAATTCTGT	
LB – CHIKV	CCTATGCAAACGGCGAC	
F3-DENV- 1	GAGGCTGCAAACCATGGAA	
B3-DENV- 1	CAGCAGGATCTCTGGTCTCT	
FIP-DENV- 1	GCTGCGTTGTGTCTTGGGAGGTTT	PARIDA et al.,
	TCTGTACGCATGGGGTAGC	2007
BIP-DENV- 1	CCCAACACCAGGGGAAGCTGTTTT	
	TTTGTTGTTGTGCGGGGG	
LF-DENV- 1	CTCCTCTAACCACTAGTC	
LB-DENV- 1	GGTGGTAAGGACTAGAGG	

Tabela 3. Sequência dos iniciadores usados para detecção de arboviroses porRT-LAMP

Primeiro, uma mistura de iniciadores foi preparada a uma concentração de 10X, com as seguintes concentrações finais: 2 μ M de cada iniciador externo F3 e B3, 16 μ M de cada iniciador interno FIP e BIP, 8 μ M de cada iniciador *loop* LF e LB. Posteriormente, uma mistura reacional RT-LAMP foi preparada a uma concentração de 2X contendo a seguinte concentração de reagentes: 4 mM dNTP, 0,22 mg mL⁻¹ de BSA, 0,32 U μ L⁻¹ de *Bst* polimerase Ecra, 0,3 U μ L⁻¹ RT-Ecra, 2X tampão de amplificação isotérmico (50 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ 10 mM, 0,1% Triton X-100, 10% glicerol, 30% DMSO).

Finalizada a etapa de preparado das duas misturas, uma mistura final foi realizada adicionando: 2,5 μ L da mistura RT-LAMP a 2X, 1 μ L da mistura de iniciadores a 10X, 1 μ L de água nuclease-free e 0,5 μ L da amostra alvo, totalizando 5 μ L de volume final.

3.3.5 Fabricação dos dispositivos PS-T

Todos os microdispositivos utilizados neste trabalho foram fabricados através do processo de fabricação de impressão, corte e laminação (PCL, *Print-Cut-Lamination*) anteriormente descrito por Duarte e colaboradores (DUARTE *et al.,* 2011; THOMPSON *et al.,* 2015) Ademais, todas as microcâmaras das plataformas foram passivadas previamente com albumina de soro bovino (BSA) a 5 mg mL^{- 1}, antes da adição das soluções no microchip, conforme descrito anteriormente por De Oliveira *et al.,* 2017.

O processo de fabricação dos microdispositivos centrífugos de PS-T com análise única e multi-análises foi descrita anteriormente no Capítulo 1 (tópico 1.3.2, Figura 3 p. 20 e tópico 1.3.3, Figura 5 p. 22, respectivamente) e encontra-se apresentado na Figura 34.



Figura 34. Representação das etapas de fabricação de dois diferentes microdispositivos rotativos de PS-T. A e B) dispositivo para análise única. A e C) *layout* e alinhamento das partes que compõem os microdispositivos incluindo: reservatórios, parte intermediária e válvula de PS-T. C e D) Representação das 9 câmaras que compõe o microdispositivo para multi-análise em formato de CD.

3.3.6 Amplificação RT-LAMP on-chip e detecção visual

De modo geral, o processo de amplificação RT-LAMP on-chip multianálises do CD microfluídico foi similar ao dispositivo para análise única.

Quatro microlitros e meio (4,5 µL) da mistura RT-LAMP foram adicionados na câmara 1 e 3 µL do intercalador de DNA SybrGreen I (1:70 ou 143X) foram adicionados na câmara 2. Para as reações positivas, 0,5 µL de RNA ou soro de paciente contaminado por arbovírus foram adicionados a câmara reacional. Para realização do controle negativo (ausência de infecção por arbovírus), 0,5 µL de RNA ou soro de paciente saudável foi inserido na

câmara reacional do dispositivo, totalizando 5 μL de volume de reação. Para impedir a evaporação das soluções durante o aquecimento, um papel adesivo (*contact*) foi usado como cobertura, cobrindo todos os reservatórios. Finalizada essa etapa, os dispositivos de PS-T foram incubados a 68 °C de 5-20 minutos.

Para microdispositivos de multi-análises a mistura RT-LAMP contendo iniciadores específicos para diferentes patógenos foram inseridas em diferentes câmaras do dispositivo, câmaras: 1-3 iniciadores para detecção do DENV-1, 4-6 iniciadores para detecção do ZIKV e 7-9 iniciadores para detecção do CHIKV, conforme observado na Figura 35A. Após inserir a mistura RT-LAMP em cada câmara específica, 3 µL de SG foram inseridos em todas as nove câmaras do dispositivo a destinadas a ele (câmara 2).

Finalizada a adição dos reagentes e dispositivo foi selado com um adesivo (papel *contact*) para evitar a evaporação dos reagentes durante a incubação. Ao final do tempo de incubação da reação (15 min a 68 °C), o microdispositivo foi submetido a quatro etapas: i) retirada do termobloco e fixação em um *hand-spinner* com auxílio de uma fita adesiva; ii) rotação do *hand-spinner* aplicando a força manual na asa livre; iii) remoção do CD microfluídico do *hand-spinner* e iv) inserção do dispositivo a uma iluminação UV, como demonstrado na Figura 35.



Figura 35. Representação da amplificação e detecção **RT-LAMP** em microdispositivos rotativos de PS-T em quatro etapas. Etapa: A) adição do intercalador de DNA e da mistura reacional contendo os primers DENV-1, ZIKV e CHIKV e incubação da mistura RT-LAMP; sendo DN - controle negativo do iniciador DENV: DP- controle positivo do iniciadores DENV: DA - Amostra em iniciadores DENV; 3-6) Iniciadores ZIKV, sendo DN - controle negativo do iniciador ZIKV; ZPcontrole positivo do iniciadores ZIKV; ZA - Amostra em iniciadores ZIKV; 7-9) Iniciadores CHIKV; sendo CN - controle negativo do iniciador CHIKV; CP- controle positivo do iniciador CHIKV: CA - Amostra em iniciadores CHIKV. B) Encaixe e fixação do microdispositivo ao hand-spinner com auxílio de fita adesiva e posterior centrifugação via hand-spinner aplicando uma forca manual em uma das asas livre para rotação; 4) detecção visual on-chip mediante iluminação UV e captura da imagem por smartphone. Fonte: autoria própria.

A detecção visual dos produtos RT-LAMP foi realizada *on-chip*. As reações positivas e negativas puderam ser confirmadas diretamente na câmara de detecção do dispositivo, avaliando a resposta de excitação do intercalador de DNA SG ao ser exposto a iluminação UV (320 nm). Reações

positivas foram confirmadas pela fluorescência verde gerada por interação do intercalador fluorescente de DNA com as bases nitrogenadas das moléculas de DNA, enquanto as reações negativas não exibiram fluorescência, devido à ausência de moléculas de DNA amplificadas (Figura 36).

Realizou-se a captura da imagem utilizando uma câmera de smartphone (Redmi Note 8, Xiaomi) inserida na parte superior da câmara escura de acrílico (130 x 100 x 100 mm³), que bloqueia a luz externa.



Figura 36. Representação das etapas necessárias para realização da leitura visual RT-LAMP *on-chip* em CD microfluidico de PS-T. I) Soluções pré-rotação, pósincubação a 68 °C por 10 min. II) Movimentação das soluções por bombeamento centrífugo utilizando um girador de mão; C) Leitura e interpretação dos resultados on-chip mediante uma iluminação UV. Fonte: autoria própria.

3.3.7 Detecção *off-chip* por separação eletroforética em gel de agarose 3%

Para demonstrar que a cor verde fluorescente obtida através da detecção visual era de fato proveniente dos fragmentos de DNA amplificados a partir do RNA alvo, foi realizada a detecção através da eletroforese em gel. Para isto a solução foi recolhida da câmara de detecção do dispositivo e os produtos de amplificação (4 µL) foram sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE). A corrida eletroforética foi realizada em 160 min em tampão TBE a 90 V. Em seguida, os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador UV (KASVI, São José do Pinhais, PR).

3.3.8 Sensibilidade e especificidade

Os testes de sensibilidade e especificidade foram realizados empregando-se a RT-LAMP em dispositivos de análise única.

Para determinar o limite de detecção dos testes LAMP, diluições seriadas das amostras foram realizadas e posteriormente quantificadas por RT-qPCR. As diluições partiram tanto do RNA extraído de amostras clínicas (diluições seriadas em água) quanto diretamente em amostra de soro humano (diluições seriadas em amostra negativa de soro humano). Os números de cópias inseridos na câmara reacional do dispositivo variaram de 10⁴ - 50 cópias µL⁻¹, sendo o limite de detecção determinado em função dos resultados positivos obtidos referentes às diluições testadas. Para avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste em amostras clínicas, RNAs foram extraídos e sujeitos a técnica molecular RT-LAMP *on-chip* e a técnica padrão outro RT-qPCR. Os valores de *cycle threshold* (*Ct*) das amostras foram determinados por RT-qPCR

Posteriormente, realizou-se o cálculo estatístico do teste, utilizando o software gratuito MedCalc, disponível em <u>https://www.medcalc.org.calc/</u>, comparando o resultado do diagnóstico molecular por RT-LAMP *on-chip* com o resultado do método padrão-ouro RT-qPCR.

Um total de 33 amostras clínicas foram testadas, sendo 18 positivas e 15 negativas para arboviroses. Dentre as amostras positivas, 7 eram de pacientes infectados por DENV, 10 de pacientes infectados por ZIKV e 1 de paciente infectado por CHIKV (para esse alvo específico, diluições seriadas (1:10 em soro humano) foram realizadas, totalizando 6 amostras positivas (*spike*). Em decorrência de haver apenas uma amostra clínica de paciente infectado por chikungunya, com alta carga viral confirmada por RT-qPCR (3,5 x 10⁵ cópias μ L⁻¹), outras amostras clínicas com cargas virais inferiores foram simuladas. As amostras foram simuladas utilizando soro humano contaminado com RNA do CHIKV. Através de diferentes diluições seriadas foi possível obter diferentes concentrações do alvo: 1 x 10⁴; 2,05 x10³; 2,5 x 10²; 72,5; 15,8 e 10 cópias μ L⁻¹.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 RT-LAMP em microdispositivos com amplificação e detecção integrada

Para a obtenção de um teste RT-LAMP rápido, simples, integrado e automatizado por uma força centrífuga, exploramos o projeto arquitetônico (*layout*), as dimensões e a funcionalidade do microdispositivo de PS-T com detecção *endpoint* descritos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Neste Capítulo, dois formatos de dispositivos intitulados: i) dispositivos de análise única, e ii) dispositivo multi-análise, foram abordados para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV. O funcionamento dos dois dispositivos foi o mesmo descrito por De Oliveira (2021) e consistiu basicamente no transporte de duas diferentes soluções: i) os produtos de amplificação RT-LAMP e ii) o intercalador de DNA. O direcionamento desses fluidos foi determinado por ruptura da válvula de toner, através da adição de uma força centrífuga gerada por um *hand-spinner*. A mistura homogênea das duas diferentes soluções pôde ser obtida em ~40 s utilizando 4 rotações por 5 s no sentido horário e 4 rotações por 5 s no sentido anti-horário (alternadas entre sentido horário e anti-horário), como descrito no Capítulo 1.

Toda otimização das condições reacionais RT-LAMP *on-chip* para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV foram realizadas no formato de dispositivo de análise única (que contém apenas uma câmara reacional).

O funcionamento do microdispositivo centrífugo para multi-análises foi avaliado, comprovando que é possível distinguir com sucesso três infecções
transmitidas pelo mesmo vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, simultaneamente em um dispositivo único. O teste rápido para detecção simultânea do DENV-1/ZIKV/CHIKV foi obtido após 10 minutos de incubação do dispositivo a 68 °C e ~2 min de leitura (~1 min de rotação e ~1 min para análise dos resultados). O teste era considerado inválido se as reações controles falhasse, e considerado válido se as reações controles apresentassem os seguintes resultados: controle negativo ausência de fluorescência e controle positivo presença de fluorescência. O resultado era lido visualmente *on-chip*. Se a câmara que continha a amostra apresentasse fluorescência, significava que o resultado era positivo e o paciente está infectado com o vírus. Em contrapartida, se a câmara que continha a amostra não apresentasse fluorescência, o resultado era negativo e o paciente não estava infectado com o vírus. A leitura do resultado era realizada diretamente na câmara de detecção do microdispositivo (*on-chip*) logo após o microdispositivo ser submetido a uma iluminação UV.

3.4.1.2 Otimização da temperatura de incubação

Um fator importante do teste LAMP está atribuído a necessidade de desenvolver condições e otimizações reacionais que proporcionem uma especificidade analítica suficientemente alta para eliminar produtos não específicos (CRAW e BALACHANDRAN, 2012).

Experimentos utilizando gradientes de temperatura, 65, 68, 70, 72 °C foram realizados (dados não apresentados). Os resultados demonstraram que as reações conduzidas a temperaturas iguais a 68 °C possibilitaram a minimização da obtenção de produtos inespecíficos em reações que não continham o alvo, desse modo a temperatura ótima da reação foi definida a 68 °C e foi utilizada em todos experimentos aqui apresentados. Ademais, esse resultado corrobora com Wang *et al.*, (2015) que afirmam em seus estudos que os desenhos e a temperatura de hibridização dos iniciadores representam um fator essencial para a especificidade da amplificação (WANG *et al.*, 2015).

3.4.1.3 Tempo de incubação da reação RT-LAMP

Para avaliar o tempo mínimo necessário para amplificação e detecção dos RNAs virais por RT-LAMP *on-chip*, os microdispositivos de PS-T foram submetidos a diferentes tempos de incubação, no período de 5 a 15 minutos. Os fragmentos de DNA obtidos por amplificação RT-LAMP *on-chip* foram avaliados por detecção visual e confirmados por separação eletroforética em gel de agarose (*off-chip*).

Com base nos resultados apresentados na Figura 35, o período de 5 minutos foi insuficiente para a geração de *amplicons* LAMP. O acréscimo de mais 5 minutos, totalizando 10 min de incubação, foi considerado suficiente para amplificação por RT-LAMP dos 3 alvos avaliados. No tempo de 15 minutos foram observados os resultados falso-positivo em controles negativos, como pode ser observado na Figura 37.

Os dados corroboram com os estudos conduzidos por Wang *et al.*, (2015) e Tang *et al.*, (2011) que frisam a avaliação de um período mínimo de incubação para a redução de amplificações não-específicas em controles negativos nas reações LAMP. De acordo com as informações verificadas na Figura 37, com 10 minutos de incubação foi observado a ausência de fluorescência na reação negativa e a presença de fluorescência *on-chip* na reação positiva. A fluorescência corresponde aos fragmentos LAMP, verificadas pelos padrões de bandas em escadas dos fragmentos de DNA. Desse modo, todos os experimentos com RT-LAMP *on-chip* passaram a ser incubados por 10 minutos.



Figura 37. RT-LAMP em diferentes tempos de incubação, 5, 10 e 15 min. Avaliação das reações negativas (água) e positivas (RNA 10⁴ cópias por reação) a diferentes tempos de incubação. Detecção realizada visualmente *on-chip* e via separação eletroforética em gel de agarose a 3 % *off-chip*. A) Iniciadores para detecção do DENV-1; Z) Iniciadores para detecção do ZIKV; C) Iniciadores para detecção do CHIKV. M) Marcador de DNA, 100 pb.

Na literatura o tempo médio para amplificação e detecção das arboviroses em escala convencional (microtubos de polipropileno) utilizando os mesmos iniciadores descritos nesse trabalho, ocorreram em 30 minutos (Parida *et al.*, 2005), 27 minutos (Tian *et al.*, 2016) e 60 minutos (Parida *et al.*, 2007) para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV, respectivamente. A implantação do sistema automatizado RT-LAMP *on-chip* desenvolvido em plataformas de PS-T, proporcionou uma diminuição de 2 a 5 vezes no tempo de amplificação e detecção, promovendo o diagnóstico final em ~ 11 min (10 min de amplificação e 40 s para etapa de automatização da detecção e leitura).

3.4.1.4 Sensibilidade e especificidade

Para determinar a sensibilidade do ensaio RT-LAMP *on-chip* em diferentes matrizes, realizamos à amplificação diretamente em amostras clínicas de soro e amostras de RNA purificado. O desempenho da amplificação foi avaliado para os três diferentes conjuntos de *iniciadores* utilizados neste trabalho (DENV-1, ZIKV e CHIKV). Por ser menos sensível a inibidores, a LAMP permite a realização direta em amostras complexas. Afim de comparar a sensibilidade da técnica diretamente em amostras de soro humano com a sensibilidade em amostras de RNA purificado, realizou-se as reações RT-LAMP para as 3 arboviroses utilizando amostras de soro e RNA com cargas virais variáveis, a partir de diluições seriadas, afim de obter um número de cópias mais baixo das amostras, conforme está apresentado na Figura 38.

A Figura 38 mostra a quantidade mínima detectável para DENV I (Figura 38 A-C), ZIKV (Figura 38 D-F) e CHIKV (Figura 38 G-I) por RT-LAMP *on-chip* (detecção visual) e *off-chip* (gel de agarose).





F)





Figura 38. Limite de detecção do ensaio RT-LAMP *on-chip* por detecção visual *e off-chio*. Amplificação RT-LAMP utilizando diferentes conjuntos de *iniciadores*. A-C) *iniciadores* DENV I. D-F) *iniciadores* ZIKV. G-I) *iniciadores* CHIKV. A, D, G) amplificação *on-chip* de amostra de RNA . B, E, H) amplificação *on-chip* de amostra de soro. C, F, I Reação *off-chip* avaliados por separação eletroforética em gel de agarose 3%.

Para fins comparativos, o método RT-LAMP *on-chip* realizado diretamente em amostras clínicas de soro, mostrou-se prático por não necessitar de equipamentos, reagentes ou *kits* para extração do RNA viral, sendo necessária apenas a adição direta de 0,5 µL da amostra na câmara reacional. Os valores de limite de detecção para RT-LAMP *on-chip*

encontrados em amostras clínicas foram respectivamente 660, 30 e 48 cópias do RNA μL⁻¹ para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV respectivamente. Em amostras de RNA purificado, esse número foi inferior, sendo respectivamente, 380, 10 e 15,8 cópias do RNA viral por microlitro para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV. A redução do limite de detecção em amostras complexas de soro, pode estar relacionada a quantidade de interferentes não eliminados por purificação, sendo estes: proteínas, antígenos, anticorpos, hormônios, eletrólitos, microorganismos, dentre outros, que podem minimizar o acesso dos *iniciadores* e da enzima ao substrato (DA SILVA *et al.,* 2021; MOREIRA e AGOSTINHO, 2021). Portanto, uma alternativa para análises mais sensíveis seria a adição de uma etapa na análise: a extração do material genético (KLEIN *et al.,* 2020).

O limite de detecção encontrado neste estudo para detecção viral, a depender do tipo de amostra inserida (RNA purificado ou soro) está em uma faixa de respectivamente, 10-30 cópias μ L⁻¹ e 15,8 - 48 cópias do RNA μ L⁻¹ para detecção do ZIKV e CHIKV. Considerando que a carga viral estimada de pacientes infectados descrita na literatura varia de 10 a 6 x10⁴ cópias de RNA μ L⁻¹ do vírus ZIKV (MATHEUS, et al., 2017; BESNARD, et al., 2014) e 1, 7 x 10³ a 9,9 × 10⁶ cópias de RNA μ L⁻¹ do CHIKV (PATEL *et al.,* 2019), o método RT-LAMP *on-chip* poderia ser utilizado com sucesso para detecção de pacientes infectados pelo vírus zika ou chikungunya.

Em contrapartida, o teste RT-LAMP *on-chip* para detecção do DENV-1, por apresentar um limite de detecção superior, 380-660 cópias de RNA μ L⁻¹, não possui sensibilidade suficiente para detectar o vírus em pacientes com carga viral muito baixa (característico em pacientes em início ou final de infecção), mas em pacientes na fase aguda da infecção essa carga viral é mais alta, estando em uma carga entre 3,4 x 10³ a 5 x 10⁵ cópias de RNA μ L⁻¹ (ROMEIRO *et al.,* 2016; CORMAN et al., 2016). No teste de avaliação de sensibilidade, encontramos valores inferiores na literatura como 100 cópias (NEERAJA *et al.,* 2015; TEOH *et al.,* 2013) e 200 cópias de RNA μ L⁻¹ (MENDES *et al,* 2019), o que corresponde que nosso teste está de 3 a 6 vezes menos sensível. No entanto, é importante destacar, que nenhum

desses testes citados podem detectar pacientes com níveis de carga viral mínima próximo a 10 cópias de RNA µL⁻¹ (ROMEIRO *et al.,* 2016; CORMAN et al., 2016). De forma geral, o teste apresentado seria capaz de diagnosticar pacientes na fase aguda da infecção.

Com intuito de avaliar a especificidade do teste, os três conjuntos de iniciadores foram submetidos as mesmas condições de amplificação anteriores (Figura 38), inserindo amostras de soro não-alvos. O sucesso da especificidade dos iniciadores foi verificado com base na diferenciação dos patógenos, que foi suficiente neste caso para discriminar e confirmar os agentes causadores das arboviroses. Conforme observado na Figura 38 (B, E e H), o conjunto de iniciadores para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV amplificaram apenas o RNA alvo. Na presença de outros RNAs não-alvos, a inobservância de fluorescência foi verificada, sendo confirmada a ausência de produtos de amplificação por separação eletroforética em gel de agarose (Figura 38 C, F, I). Analisando os dados de especificidade dos iniciadores verificou-se o sucesso na diferenciação entre o DENV-1, ZIKV e CHIKV por RT-LAMP *on-chip*.

De acordo com a literatura o diagnóstico clínico diferencial entre as arboviroses DENV e ZIKV é um desafio, uma vez que ambas pertencem à mesma família e gênero (Flaviviridae, Flavivirus). Desse modo, testes por sorologia rápida (entre os anticorpos dos flavivírus) devem ser evitados por apresentarem forte reatividade cruzada e acarretar a resultados falsopositivos em testes específicos (GOURINAT *et al.*, 2015). Em contrapartida, a reatividade cruzada por sorologia é minimizada para distinção da infecção ocasionada por vírus que pertencem a outras famílias e gêneros, como a infecção ocasionada pelo vírus da Chikungunya (família Togaviridae e gênero Alphavirus). Muito embora a reatividade cruzada dos testes sorológicos entre os anticorpos do gênero alfavírus também são identificadas, como é o caso do CHIKV e o Mayaro vírus (alfavírus MAYV) (FUMAGALLI, M. J., 2018).

3.4.1.5 Teste de desempenho do ensaio RT-LAMP *on-chip* em amostras clínicas

Como prova de conceito da aplicação do teste em amostras reais para detecção do DENV-1, utilizou-se nesse estudo 12 amostras testadas previamente por RT-qPCR. Dessas amostras, 7 eram positivas e 5 negativas. Os dados estatísticos do teste neste universo amostral demonstram sensibilidade de 84,62 %, especificidade de 85,71 %, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) elevados: VPP 90% e VPN 75%. Comparando **RT-LAMP** on-chip com dois testes rápidos imunocromatográficos como Bioeasy® e Bio-Rad® disponíveis para detecção do DENV-1, que apresentam respectivamente sensibilidade de 44,2% e 16,6%, especificidade de 97,1% e 99,0%, VPP 92,2% e 92,6% e VPN de 69,9% e 60,1% (MATA et al., 2014), o teste RT-LAMP on-chip apresentou desempenho superior, podendo ser evidenciado a elevada especificidade e sensibilidade.

Em relação ao teste de desempenho para detecção do ZIKV, foram avaliadas 12 amostras testadas previamente por RT-qPCR sendo 7 amostras positivas e 5 negativas. Neste universo amostral, o teste RT-LAMP *on-chip* demonstrou valores de 100% de especificidade, precisão, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. O teste *on-chip* apresenta desempenho superiores aos valores de sensibilidade e especificidade dos kits de sorologia disponíveis nos SUS (Sistema Único de Saúde) como o kit BahiaFarma com especificidade de 90%, sensibilidade de 78%, VPP 86,49% e VPN 83,34% (PERSONA, 2018).

Em relação ao teste de desempenho para detecção do CHIKV, foram avaliadas, 11 amostras, 6 amostras positivas e 5 amostras negativas. Nesse universo amostral, o teste RT-LAMP *on-chip* para detecção do CHIKV apresentou 100% de sensibilidade, especificidade, precisão, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Os valores encontrados encontram-se similares a testes imunoenzimáticos como o teste de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), que permite a detecção de antígenos e anticorpos, com 89,66 % de sensibilidade e 100% de especificidade (FUMAGALLI, 2018).

Os testes RT-LAMP *on-chip* para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV apresentaram desempenho satisfatório, podendo ser evidenciado a elevada especificidade e sensibilidade, além do baixo custo por reação. O custo do teste levando em conta os materiais para confecção do dispositivo e os reagentes ficam em torno de R\$ 5,00.

3.4.1.6 Detecção discriminatória e simultânea de arboviroses em um único dispositivo multi-análise

O CD para diagnóstico completo RT-LAMP (*lab-on-a-disc*), utilizando uma plataforma PS-T com detecção *endpoint* visou o desenvolvimento de um ensaio molecular RT-LAMP para detecção discriminatória de três arboviroses intimamente relacionadas com quadros clínicos semelhantes. O dispositivo para a tecnologia LAMP *on-chip* utilizado neste estudo é composto por 9 reações que ocorrem simultaneamente, sendo 3 reações para cada alvo (DENV-1, ZIKV e CHIKV), que compreende: 1 reação de controle positivo, 1 reação de controle negativo e 1 reação contendo a amostra a ser analisada.

Para o diagnóstico discriminatório das arboviroses o ensaio envolveu a inserção de iniciadores específicos em três câmaras, câmaras 1-3 (iniciadores para detecção do DENV), 4-6 (iniciadores para detecção do ZIKV) e 7-9 (iniciadores para detecção do CHIKV). Conforme observado na Figura 39, o dispositivo foi utilizado como prova de conceito para caracterizar e discriminar uma amostra, inserida em três câmaras distintas do disco. A amostra de soro do paciente foi adicionada nas câmaras 3, 6 e 9, que contém os *iniciadores* específicos para detecção material genético de cada arbovirose, sendo eles respectivamente *iniciadores* de dengue, zika e chikungunya. No restante das câmaras, controles internos foram adicionados e permitiram confirmar a eficiência da reação RT-LAMP *on-chip*, o que implica na segurança para esse tipo de diagnóstico.

Como prova de conceito que o dispositivo para multi-análises pode distinguir três infecções transmitidas pelo mesmo vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, uma amostra foi utilizada por vez, para realização de 3 testes simultâneos. Os resultados estão apresentados na Figura 39, como segue: na Figura 39A utilizou-se uma amostra positiva para DENV-1, a amostra foi inserida em 3 câmaras reacionais (3,6 e 9). Como pode ser observado na Figura 39A, apenas o teste que utilizou os iniciadores para DENV-1 apresentou fluorescência.

Da mesma forma, na Figura 39B utilizou-se uma amostra positiva para infecção por ZIKV, essa amostra foi inserida nas 3 câmaras reacionais (3,6 e 9) do dispositivo. O resultado foi lido visualmente *on-chip*. Como pode ser observado na Figura 39B, apenas o teste que utilizou os iniciadores para ZIKV apresentou fluorescência, o que significa que o paciente estava contaminado por ZIKV e saudável para os vírus DENV-1 e CHIKV.

Por fim, na Figura 39C utilizou-se uma amostra positiva para CHIKV, a amostra foi inserida nas câmaras reacionais 3,6 e 9. Como pode ser observado na Figura 39C, apenas o teste que utilizou os iniciadores para detecção do CHIKV apresentou fluorescência. O que significava que o paciente estava positivo para infecção transmitida por CHIKV e negativo para infecção viral transmitida por DENV-1 e ZIKV.



Figura 39. CD de diagnóstico multi-análise RT-LAMP *on-chip* com detecção *endpoint* para discriminação do tipo de arbovirose presente na amostra clínica. A) detecção do

DENV-1 em amostra de clínica de DENV-1; B) detecção do ZIKV amostra de clínica de ZIKV; C) detecção do CHIKV amostra de clínica de CHIKV; 1-3) Iniciadores DENV-1, sendo 1) DN – controle negativo do iniciador DENV; 2) DP- controle positivo dos iniciadores DENV; 3) DA – Amostra em iniciadores DENV; 4-6) Iniciadores ZIKV, sendo 4) DN – controle negativo do iniciador ZIKV; 5) ZP- controle positivo do iniciadores ZIKV; 6) ZA – Amostra em iniciadores ZIKV; 7-9) Iniciadores CHIKV; sendo 7) CN – controle negativo do iniciador CHIKV; 8) CP- controle positivo do iniciador CHIKV; 9) CA – Amostra em iniciadores CHIKV.

O diagnóstico multi-análises RT-LAMP on-chip no CD microfluídico com detecção específica de um único alvo, levou em média de 12 minutos, contados após adição das amostras e reagentes no dispositivo. Comparado a outros tipos de detecção endpoint dos amplicons LAMP como: i) eletroforese em gel em média 1-3 h (MENDES et al, 2019); ii) visualização do precipitado de pirofosfato de magnésio seguido de centrifugação, em média 30 s, no entanto requer aparelho para separar o sobrenadante do precipitado e a utilização de amostras que não alterem a turbidez do meio (IZADI et al., 2012); e iii) detecção por cromatografia por fluxo lateral utilizando lateral flow dipstick que apresentam elevados custos (LFD), e preparo de sondas (YONGKIETTRAKUL et al., 2014), o teste RT-LAMP on-chip, através da aquisição de imagens, apresentou fácil leitura, os resultados foram lidos e interpretados visualmente on-chip, por meio da incidência de uma luz UV. Na presença de RNA alvo, a fluorescência era observada, na ausência de RNAs alvos, a inobservância da fluorescência era observada (Figura 39).

De modo geral, a técnica aqui proposta, com adição automatizada de intercaladores de DNA fluorescentes, propiciou: i) fácil leitura, ii) detecção visual finalizada em menos de 2 minutos, iii) não requereu aparelhos ou profissionais altamente qualificados para operação e iv) eliminou a etapa de pipetagem manual do intercalador de DNA o que reduziu a probabilidade de contaminações pós-amplificação.

3.5 CONCLUSÃO

O diagnóstico das arboviroses, utilizando metodologias baseadas na amplificação isotérmica de ácido nucleico e detecção visual em um único dispositivo portátil, de baixo custo, acessível e de fácil manipulação possui um caráter inovador em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico das arboviroses, como isolamento viral, testes sorológicos para a detecção de imunoglobinas (IgM e IgG), identificação da proteína viral através da captura específica dos anticorpos ou métodos moleculares como o RT-PCR, que demandam longo tempo de reação e necessitam obter amostras com alto grau de pureza, além de apresentam custos elevados de instrumentação.

O desenvolvimento do dispositivo de poliestireno-toner (PS-T), fabricado por PCL (*print, cut and laminate*) com válvulas hidrofóbicas controladas por rotação através de um *hand-spinner* (girador de mão) um sistema centrífugo comercial, livre de eletricidade, de fácil acessibilidade e de baixo custo, permitiu desenvolver um método rápido (12 minutos) para a diagnóstico de arboviroses, partindo de RNA purificado ou diretamente em amostras complexas de soro de pacientes.

O teste confirmatório e discriminatório da infecção por DENV, ZIKV e CHIKV foi realizado *on-chip* em menos de 12 minutos de forma integrada e automatizada e com baixo consumo de amostras e reagentes. A detecção visual, *on-chip* dos produtos de amplificação obtidas através da aquisição de imagens via smartphone simplificou ainda mais o método de detecção, dispensando etapas convencionais de detecção como, separação eletroforética.

Os valores dos limites de detecção para o ensaio RT-LAMP *on-chip* foram de 380, 10 e 15,8 cópias do RNA µL⁻¹ para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV respectivamente em amostras de RNA purificado, indicando uma

sensibilidade superior ao ensaio RT-LAMP *on-chip* utilizando amostras de soro humano livres de extração que apresentou limite de detecção de 660, 30 e 48 cópias µL⁻¹. Muito embora, seja possível obter melhores valores de sensibilidade em ensaios RT-LAMP partindo de RNA purificado, ensaios RT-LAMP realizados diretamente em amostras clínicas de soro (amostras livres de extração do RNA) representam uma metodologia simples, de fácil aplicabilidade, de baixo custo e rápida para o diagnóstico molecular das arboviroses, ideal para sistemas de teste no ponto de atendimento (POCT) ou para triagem de grandes grupos por dispensar etapas convencionais de extração de RNA e não requerer muita infraestrutura para aplicação dos testes. Otimizações nos desenhos dos iniciadores podem ser realizadas para aumento da sensibilidade dos testes, especialmente no teste de detecção de DENV.

Os dispositivos para multi-análises RT-LAMP *on-chip* demostraram ser eficientes e rápidos para distinguir com sucesso três infecções transmitidas pelo mesmo vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Os três testes rápidos foram realizados simultaneamente em um único dispositivo e foram finalizados em um curto período de tempo, 12 minutos, sendo 10 minutos para incubação do dispositivo a 68 °C e ~2 minutos de leitura (~1 min de rotação e ~1 min para análise dos resultados). O resultado foi facilmente visualizado, submetendo o dispositivo a uma iluminação UV, e detectando a ausência ou presença de fluorescência diretamente na câmara reacional do dispositivo. Devido a simplicidade do método de detecção (*on-chip* através da aquisição de imagens via *smartphone*), baixo custo e eficiência do teste, os dispositivos multi-análises poderiam dar o suporte as atividades de vigilância epidemiológica ou até mesmo agilizar o diagnóstico diferencial de arboviroses.

3.6 REFERÊNCIAS

ABE, A. H. M., Marques, S. M., & Costa, P. S. S. Dengue in children: from notification to death. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 30, p. 263-271, 2012.

ACOSTA, P. O., GRANJA, F., MENESES, C. A., NASCIMENTO, I. A., SOUSA, D. D., LIMA JÚNIOR, W. P., NAVECA, F. G. False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by NS1 Ag kits. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 447-450, 2014.

BALL, C. S., RENZI, R. F., PRIYE, A. & MEAGHER, R. J. A simple check valve for microfluidic point of care diagnostics. **Lab Chip**, v.16, n.22, p. 4436-4444, 2016.

BARZON, L., PACENTI, M., BERTO, A., SINIGAGLIA, A., FRANCHIN, E., LAVEZZO, E., ... & PALÙ, G. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016, **Eurosurveillance**, v. 21, n. 10, p. 2-6. 2016.

BRADY, O. J., & HAY, S. I. The global expansion of dengue: how Aedes aegypti mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. **Annual review of entomology**, v. 65, p. 191-208, 2020.

BENCHIMOL, Jaime Larry. Febre amarela e epidemias: configurações do problema ao longo do tempo. **Revista NUPEM**, v. 13, n. 29, p. 36-71, 2021.

BESNARD, M., LASTERE, S., TEISSIER, A., CAO-LORMEAU, V. M., & MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 2014.

CALVERT, A. E., BIGGERSTAFF, B. J., TANNER, N. A., LAUTERBACH, M., & LANCIOTTI, R. S. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **PIoS one**, v. 12, n. 9, p. e0185340, 2017.

CAMPOS, R. D. et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. **J. Clin. Virol.**, v. 77, p. 69-70, 2016.

CASALI, C. G., PEREIRA, M. R. R., SANTOS, L. M. J. G., PASSOS, M. N. P., FORTES, B. D. P. M. D., ORTIZ VALENCIA, L. I., MEDRONHO, R. D. A. A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. Revista da sociedade Brasileira de medicina tropical, v. 37, p. 296-299, 2004.

CASSEB, A. D. R., CASSEB, L. M. N., SILVA, S. P. D., VASCONCELOS, P. F. D. C. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

CONWAY, M. J., COLPITTS, T. M., & FIKRIG, E. Role of the vector in arbovirus transmission. **Annual Review of Virology**, v. 1, p. 71-88, 2014.

CORMAN V. M., RASCHE, A., BARONTI, C., ALDABBAGH, S., CADAR, D., REUSKEN, C. B., DREXLER, J. F. Bulletin of the World Health Organization, v. 94, n. 12, p. 880, 2016.

DA SILVA, S. J. R.; Pardee, K.; Balasuriya, U. B.; Pena, L. Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

DE OLIVEIRA, K. G., BORBA, J. C., BAILAO, A. M., DE ALMEIDA SOARES, C. M., CARRILHO, E., DUARTE, G. R. M. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. **Analytical biochemistry**, v. 534, p. 70-77, 2017.

DE OLIVEIRA, K. G., ESTRELA, P. F. N., DE MELO MENDES, G., DOS SANTOS, C. A., DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, E., & DUARTE, G. R. M. Rapid molecular diagnostics of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with end-point visual detection. **Analyst**, v. 146, n. 4, p. 1178-1187, 2021.

DONALISIO, M. R., & FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 283-285, 2015.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de saúde pública**, v. 51, 2017.

DOS SANTOS B., LIMA P. J., DA SILVA MACEDO, M. C. S., JÚNIOR, L. J., J. L. P.; GARCÊS, T. C. D. C. S. Alterações neurológicas associadas a infecções por arbovírus no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 2, p. e6065-e6065, 2021.

ESTRELA, P. F. N., DE MELO MENDES, G., DE OLIVEIRA, K. G., BAILÃO, A. M., DE ALMEIDA SOARES, C. M., ASSUNÇÃO, N. A., DUARTE, G. R. M.

Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. **Journal of virological methods**, v. 271, p. 113675, 2019.

FUMAGALLI, M. J. **Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro**. Dissertação de Mestrado em Imunologia básica e aplicada da faculdade de Medicina, 66 p, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

GANGULI, A., ORNOB, A., YU, H., DAMHORST, G. L., CHEN, W., SUN, F., ... & BASHIR, R. Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomedical microdevices**, v. 19, n. 4, p. 1-13, 2017.

GAURI, LA.; RANWA B.L.; NAGAR, K.; VYAS A., FATIMA, Q. Post chikungunya brain stem encephalitis. **J Assoc Physicians India**, v. 60, n. 4, p. 68-9, 2012.

GOURINAT, A. C.; O'CONNOR; O., CALVEZ; E., GOARANT, C.; DUPONT-ROUZEYROL, M. Detection of Zika virus in urine. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 84, 2015.

HERRADA, C. A., KABIR, M. A., ALTAMIRANO, R. & ASGHAR, W. Advanves in diagnostic methods for zika virus infection. **J. Med. Devices**, v. 12, n.4, p. 1-11. 2018.

HONÓRIO, N. A., CÂMARA, D. C. P., CALVET, G. A., BRASIL P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.

IZADI, A., MOSLEMI, E., & SHAHHOSSEINY, M. H. Comparison of SYBR Green and turbidimetry methods for loop mediated isothermal amplification (LAMP) product detection in diagnosis of hepatitis B virus (HBV). African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 42, p. 7003-7007, 2012.

KAARJ, K., AKARAPIPAD, P., & YOON, J. Y. Simpler, faster, and sensitive Zika virus assay using smartphone detection of loop-mediated isothermal amplification on paper microfluidic chips. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

KLEIN, S., MÜLLER, T. G., KHALID, D., SONNTAG-BUCK, V., HEUSER, A. M., GLASS, B.; CHLANDA, P. SARS-CoV-2 RNA extraction using magnetic beads for rapid large-scale testing by RT-qPCR and RT-LAMP. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 863, 2020.

KRAEMER, M. U., SINKA, M. E., DUDA, K. A., MYLNE, A. Q., SHEARER, F. M., BARKER, C. M., ... & HAY, S. I. The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus. **elife**, v. 4, p. e08347, 2015.

KUTSUNA, S., SAITO, S., OHMAGARI, N. Simultaneous diagnosis of dengue virus, Chikungunya virus, and Zika virus infection using a new point-of-care testing (POCT) system based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 12, p. 1249-1253, 2020.

LEE, D. et al.,. Simple and highly sensitive molecular diagnosis of zika virus by lateral flow assays. **Anal. Chem.,** v. 88, n. 24, p. 12272-12278, 2016.

LEITÃO, M. C. DE A., ARRAIS, N. M. R., FILGUEIRA, F. A., BEZERRA, M. T., GRANJEIRO, A. C. D. N., & BARRETO, J. M. Casos de Chikungunya por transmissão vertical em um hospital universitário no 1º semestre de 2016. **Residência Pediatrica**, 2019.

LOPES, N., NOZAWA, C., & LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 10-10, 2014.

MATHEUS, S., DE LAVAL, F., MOUA, D., N'GUYEN, C., MARTINEZ, E., ROUSSET, D., BRIOLANT, S. Zika Virus Persistence and Higher Viral Loads in Cutaneous Capillaries Than in Venous Blood. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 11, p. 1910, 2017.

MATA, V. E., BUONORA, S. N., RODRIGUES, D., VIERA, C. M., QUINTELA, F. M., DE ANDRADE, C. A. F., NOGUEIRA, R. M.; PASSOS, S. R. L. Avaliação de dois testes rápidos imunocromatográficos em dengue 4.

MENDES, G. M., OLIVEIRA, K. G., BORBA, J. C., OLIVEIRA, T. S., FIACCADORI, F. S., NOGUEIRA, M. L., BAILÃO, A. M.; SOARES, C.M.A; CARRILHO, E.; DUARTE, G. R. Molecular diagnostics of dengue by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) in disposable polyester-toner microdevices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1841-1849, 2019

NEERAJA, M., LAKSHMI, V., LAVANYA, V., PRIYANKA, E. N., PARIDA, M.M., DASH, P. K.; REDDY, G. Detecção rápida e diferenciação de sorotipos do vírus da dengue pelo NS1 ensaio específico de amplificação isotemal mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP) em pacientes que se apresentam a um hospital de cuidados terciários em Hyderabad, Índia. **Diário dos métodos virológicos**, v. 211, p. 22-31, 2015.

PARIDA, M., HORIOKE, K., ISHIDA, H., DASH, P. K., SAXENA, P., JANA, A. M., MORITA, K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2895-2903, 2005.

PARIDA, M. M., SANTHOSH, S. R., DASH, P. K., TRIPATHI, N. K., LAKSHMI, V., MAMIDI, N., MORITA, K. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 351-357, 2007.

PATEL, A. K., KABRA, S. K., LODHA, R., RATAGERI, V. H., RAY, P. Virus load and clinical features during the acute phase of Chikungunya infection in children. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0211036, 2019.

PATTERSON, J., SAMMON, M, GARG, M.; Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671, 2016.

PERSONA, Michelli Romanoli. Estudo comparativo entre testes sorológico para diagnóstico específico da infecção pelo vírus zika. Dissertação de mestrado para obtenção do título de Mestre em Ciência Médicas apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo. 44 p, 2018.

PRIYE, A., BIRD, S. W., LIGHT, Y. K., BALL, C. S., NEGRETE, O. A., & MEAGHER, R. J. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

ROMEIRO, M. F., SOUZA, W. M. D., TOLARDO, A. L., VIEIRA, L. C., COLOMBO, T. E., AQUINO, V. H., FIGUEIREDO, L. T. M. Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 279-285, 2016.

RODRIGUES, E. M. S., DAL-FABBRO, A. L., SALOMÃO, R., FERREIRA, I. B., ROCCO, I. M., & FONSECA, B. A. L. D. Epidemiologia da infecção pela dengue em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 36 n. 2, p. 160-165. 2002.

ROSA, A. P. DA história da Arbovirologia no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil, de 1954 a 1998. **Revista Pan-Amazonica de Saude**, v. 7, n. ESP, p. 61-70, 2016.

SABALZA, M. et al., Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. **PLoS One**, v. 13, n.2, 2018.

SANTIAGO, G. A., VERGNE, E., QUILES, Y., COSME, J., VAZQUEZ, J., MEDINA, J. F., MUÑOZ-JORDÁN, J. L. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2311, 2013.

SCHATZMAYR, Hermann G. Viroses emergentes e reemergentes. **Cadernos** de Saúde Pública, v. 17, p. S209-S213, 2001.

SILVA, J. S.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao Aedes aegypti: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 4, n. 6, 2008.

SINGER, V. L., LAWLOR, T. E., & YUE, S. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 439, n. 1, p. 37-47, 1999.

SEOK, Y., BATULE, B. S., & KIM, M. G.. Lab-on-paper for all-in-one molecular diagnostics (LAMDA) of zika, dengue, and chikungunya virus from human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112400, 2020.

SONG, J., MAUK, M. G., HACKETT, B. A., CHERRY, S., BAU, H. H., LIU, C. Instrument-free point-of-care molecular detection of Zika virus. **Analytical chemistry**, v. 88, n.14, p. 7289-7294, 2016.

SOUZA-NETO, J. A., POWELL, J. R. & BONIZZONI, M. Aedes aegypti vector competence studies: A review. **Infection, genetics and evolution**, v. 67, p.191-209. 2019.

SUESDEK, L., Microevolution of medically important mosquitoes - A review. **ACTA TROPICA,** Volume 191, p. 162-171, 2019.

TABACHNICK, WALTER J. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. **American Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14-26, 1991.

TAUIL, Pedro Luiz. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 867-871, 2002.

TAUIL, Pedro Luiz. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 773-774, 2014.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, 2017.

TEOH, B.T., SAM, S.S., TAN, K.K., JOHARI, J., DANLAMI, M.B., HOOI, P. S., ABUBAKAR, S. Detecção de vírus da dengue usando amplificação isotemal mediada por circuito de transcrição reversa. **BMC doenças infecciosas**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2013.

TIAN, B. et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loopmediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 86, p. 420-425, 2016.

VASCONCELOS, Z. F. M. d. et al., Challengs for molecular and serological ZIKV infection confirmation. **Childs Nervous System**, v.34, n. 1, p. 79-84, 2018.

WANG, D. G., BREWSTER, J. D., PAUL, M.; TOMASULA, P. M. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6048-6059, 2015.

YAREN, O., ALTO, B. W., GANGODKAR, P. V., RANADE, S. R., PATIL, K. N., BRADLEY, K. M., ... & BENNER, S. A. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2017.

YIN, J. et al., Integrated microfluidic systems with sample preparation and nucleic acid amplification. v. 19, n. 17, p. 2769-2785, 2019.

YONGKIETTRAKUL, S., JAROENRAM, W., ARUNRUT, N., CHAREANCHIM, W., PANNENGPETCH, S., SUEBSING, R., KONGKASURIYACHAI, D. Application of loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick for detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **Parasitology international**, v. 63, n. 6, p. 777-784, 2014.

CAPÍTULO 4

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVIROSES COM DETECÇÃO VISUAL *ON-CHIP* UTILIZANDO O INDICADOR DE pH VERMELHO DE CRESOL

4.1 INTRODUÇÃO

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) revolucionou a forma de realizar a leitura do resultado final nos testes baseados em reações de amplificação do ácido nucleico. Ao contrário da PCR convencional que requer métodos de detecção mais complexos ou laboriosos, como a eletroforese em gel, a LAMP utiliza um grande número de métodos de detecção simples, definidos como detecção visual (SCOTT *et al.,* 2020). Estes métodos vão desde a detecção das cópias de DNA através do uso de intercaladores de DNA (ensaios fluorescentes) até a avaliação de subprodutos liberados durante a síntese de DNA, o precipitado de pirofosfato de magnésio e o íon hidrogênio (TANNER *et al.,* 2015; SCOTT *et al.,* 2020).

Para transpor a necessidade de ensaios fluorescentes que requerem fonte de luz de excitação específica, filtros ópticos e câmara escura, algumas metodologias de detecção LAMP têm sido simplificadas. Nessas estratégias, o processo de amplificação é conferido por meio da avaliação de um dos dois subprodutos gerados no decorrer da reação de amplificação: i) o íon pirofosfato e o ii) íon hidrogênio. A inspeção dos resultados por meio da avaliação desses subprodutos é muito simples e rápida, além de atender aos quesitos de sensibilidade e especificidade (TANNER *et al.,* 2015; KAARJ *et al.,* 2018; FU *et al.,* 2021).

Os métodos de detecção visual avaliando o subproduto pirofosfato de magnésio compreendem a interação dos íons pirofosfato com o íon magnésio. A grande quantidade de íons pirofosfato [P₂O₄]⁴⁻ gerados se deve ao processo de extensão da fita de DNA (região gene-alvo), no qual a enzima com ação 140

no sentido 5' \rightarrow 3' incorpora um trifosfato deoxiconucleosídeo na região alvo e libera o ânion [P₂O₄]⁴⁻. Para adquirir estabilidade, esse ânion reage com os cátions Mg²⁺ presentes na mistura, e formam o produto insolúvel de cor branca, o pirofosfato de magnésio.

Um estudo mais detalhado descrito por Tomita *et al.*, (2008) e Goto *et al.*, (2009) descrevem que concentração de íons Mg²⁺ diminuem à medida que cópias de DNA são geradas, sendo assim, a adição de indicadores metálicos colorimétricos como HNB (*Hydroxy naphthol blue*) e calceína foram uma das estratégias proposta por esses autores. (TOMITA et al., 2008; GOTO *et al.*, 2009).

Ademais, o subproduto insolúvel pirofosfato de magnésio, pode ser quantificado por turbidez. O método de detecção por turbidez da solução, apresenta distinção visual entre a reação negativa e positiva. Na reação positiva é verificada a presença de turbidez branca, na reação negativa, uma ausência de turbidez é identificada. No entanto de acordo Fischbach *et al.,* (2015) e Izadi *et al.,* (2012) a turbidez é difícil de ser observada a olho nu, e pode requerer um passo adicional, a utilização de equipamentos como centrífuga ou turbidímetro (FISCHBACH *et al.,* 2015; IZADI *et al.,* 2012).

Para facilitar a interpretação a olho nu dos produtos amplificados, os corantes indicadores de pH vêm sendo aplicados com sucesso para detecção nas metodologias LAMP. Estudos conduzidos por Alhassan *et al.* (2016) comparam indicadores de pH e indicadores metálicos, e concluem que os indicadores de pH apresentam melhor visualização e maior sensibilidade para detecção dos produtos LAMP (ALHASSAN *et al.*, 2016). Atualmente, o kit de ensaio colorimétrico comercializado pela New England Biolabs, WarmStart® colorimetrix RT-LAMP utiliza o indicador de pH vermelho fenol, em que a amplificação e detecção do cDNA ocorrem em uma única etapa, com fácil leitura do resultado: cor amarela (reação positiva), cor rosa (reação negativa). A popularidade desses kits de amplificação LAMP, comercializados pela New England BioLabs, WarmStart® colorimetric RT-LAMP (Ipswich, Estados Unidos), vêm crescendo e seu uso tem sido amplamente descrito na literatura

(CRAW e BALACHANDRAN, 2012; THI *et al.,* 2020, SANTOS *et al.,* 2021 e SILVA *et al.,* 2021).

O método de detecção por indicador de pH utilizando o vermelho de fenol tem como objetivo identificar no decorrer da reação uma pequena variação do pH em um intervalo de transição de 7,3 (rosa) a 6,8 (amarelo). A alteração do pH é oriunda na etapa de polimerização através da enzima *Bst* DNA polimerase, no qual a enzima com ação no sentido 5'→3' incorpora um trifosfato deoxiconucleosídeo na região alvo e acarreta a liberação de dois subprodutos: i) o íon pirofosfato juntamente com o ii) íon hidrogênio. A interação entre os íons de hidrogênio (H +) e o indicador de pH acarreta a mudança de cor da molécula indicadora presente na mistura LAMP (Figura 40). Consequentemente, a identificação dos produtos de amplificação apresenta uma relação diretamente proporcional entre, o pH e a progressão da extensão da fita de DNA alvo. Logo, quanto maior a carga viral da amostra, maior a quantidade de cópias geradas no decorrer da amplificação e mais rapidamente o pH da solução diminuirá (SANTOS *et al.,* 2021 e SILVA *et al.,* 2021).



Figura 40. Representação da LAMP utilizando indicador de pH vermelho de fenol. A) representação formação de produtos e subprodutos presente no mecanismo LAMP. B) Representação da detecção visual em reação que o DNA-alvo é detectado ou nao, através halocromismo do indicador de pH. Fonte: autoria própria.

Neste Capítulo será demonstrado o uso de dispositivos descartáveis de PS-T para amplificação e detecção de DENV, ZIKV e CHIKV utilizando a técnica molecular de amplificação isotérmica (LAMP). O ensaio com detecção visual *on-chip* será baseado na adição do indicador de pH vermelho de cresol, com visualização a olho nu para discriminação das reações positivas (amarela) e negativas (rosa-violeta).

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

Desenvolver metodologias RT-LAMP em dispositivos de PS-T com detecção colorimétrica *on-chip* utilizando o indicador de pH vermelho de cresol. As metodologias serão utilizadas para detecção dos vírus da dengue (DENV-1), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV).

4.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais para amplificação e detecção de DENV-I, ZIKV e CHIKV via RT-LAMP *on-chip* em amostras de RNA.
- Avaliar o design de um microdispositivo de PS-T envolvendo a adição sequencial de reagentes, automatizadas por rotação.
- Desenvolver um ensaio com multi-análise em um único dispositivo de PS-T controlado por rotação manual, para diagnóstico diferencial e simultâneo de três vírus intimamente relacionados: dengue (DENV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV).
- iv) Demonstrar a funcionalidade dos dispositivos de PS-T operados por bombeamento centrífugo para detecção multi-análise de ácidos nucleicos, incluindo etapas como: mobilização, mistura, amplificação por RT-LAMP e detecção visual on-chip.
- v) Promover um estudo comparativo entre a detecção visual utilizando intercalador de DNA e indicador de pH.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. Amostras clínicas de pacientes infectados por arbovírus

As amostras clínicas de pacientes infectados com ZIKV, DENV-1 e CHIKV foram estocadas a -80 °C no Laboratório de Biomicrofluídica da Universidade Federal de Goiás. As amostras de soro foram obtidas entre os anos de 2015 e 2021 de pacientes residentes no estado de São Paulo e Goiás catalogados pelo Hospital São Paulo UNIFESP-HSP e Hospital do Policial Militar de Goiânia - Brasil.

Todas as experiências foram realizadas em conformidade com as diretrizes exigidas nacionalmente, seguindo as resoluções CNS 466/12 e CNS 441/11, e em conformidade com as diretrizes institucionais.

4.3.2. Extração e purificação de RNA

O RNA viral foi extraído de todas as amostras clínicas de soro utilizando o Kit de Preparação de RNA Viral + DNA (Cellco, São Carlos, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.3. RT-qPCR

Para quantificar o RNA e a carga viral de cada amostra, foi realizada uma PCR quantitativa (RT-qPCR). A RT-qPCR foi executada utilizando o kit GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR (Promega, Charbonnières-les-Bains, França). A mistura reacional foi preparada para um volume de 10 μ L contendo as seguintes concentrações de reagentes: 5 μ L da GoT Promega, 10 μ M de Syto 82 (Invitrogen, Eugene, EUA), 400 nmol L⁻¹ de iniciador direto (F) e 400 nmol L⁻¹ de iniciador reverso (R). As sequências dos pares de iniciadores encontram-se apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Sequência dos pares de iniciadores utilizados na qPCR e suas temperaturas de anelamento.

Iniciadores	Sequência 5' a 3'	Referência
F – ZIKV	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	LANCIOTTI et
R – ZIKV	CCGCTGCCCAACACAAG	<i>al.,</i> 2008
F – DENV 1	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	SANTIAGO <i>et</i> <i>al.,</i> 2013
R – DENV 1	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	
F – CHIKV	ACGCAATTGAGCGAAGCAC	Parida et al.,
R- CHIKV	CTGAAGACATTGGCCCCAC	2007

As misturas de RT-qPCR foram incubadas a 45 °C por 15 min (incubação de RT), 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60 °C por 30 s, usando o equipamento termociclador de PCR em tempo real AriaMx adquirido junto a Agilent (Santa Clara, CA).

4.3.4 Amplificação por RT-LAMP

As sequências de iniciadores usadas para amplificação por RT-LAMP estão mostradas na Tabela 5.

Iniciadores	Sequência dos iniciadores 5'	Referência
	→ 3'	
F3 – ZIKV	CGGATGGGATAGGCTCAAAC	
B3 – ZIKV	ATGGACCTCCCGTCCTTG	
FIP- ZIKV	CCTGAGGGCATGTGCAAACCTAG	TIAN <i>et al.,</i> 2016
	AATGGCAGTCAGTGGAGAT	
BIP – ZIKV	ACCCTCAACTGGATGGGACAACTG	
	GAGCTTGTTGAAGTGGTG	
LF – ZIKV	CATCAATTGGCTTCACAACGC	
LB – ZIKV	GGGAAGAAGTTCCGTTTTGCTC	
F3 – CHIKV	ACGCAATTGAGCGAAGCAC	
B3 – CHIKV	CTGAAGACATTGGCCCCAC	PARIDA <i>et al.,</i> 2007
FIP- CHIKV	CGGATGCGGTATGAGCCCTGTATT	
	TTTGGAGAAGTCCGAATCATGC	
BIP – CHIKV	TCCGCGTCCTTTACCAAGGAAATT	
	TTTTTGGCGTCCTTAACTGTGAC	
LF – CHIKV	GCTGATGCAAATTCTGT	
LB – CHIKV	CCTATGCAAACGGCGAC	
F3-DENV- 1	GAGGCTGCAAACCATGGAA	
B3-DENV- 1	CAGCAGGATCTCTGGTCTCT	
FIP-DENV- 1	GCTGCGTTGTGTCTTGGGAGGTTT	PARIDA et al.,
	TCTGTACGCATGGGGTAGC	2005
BIP-DENV- 1	CCCAACACCAGGGGAAGCTGTTTT	
	TTTGTTGTTGTGCGGGGG	
LF-DENV- 1	CTCCTCTAACCACTAGTC	
LB-DENV- 1	GGTGGTAAGGACTAGAGG	

Tabela 5. Sequência dos iniciadores usados para RT-LAMP

Inicialmente, uma mistura de iniciadores foi preparada a uma concentração de 10X, com as seguintes concentrações finais: 2 μ M de cada iniciador externo F3 e B3, 16 μ M de cada iniciador interno FIP e BIP, 8 μ M de

cada iniciador *loop* LF e LB. Posteriormente, uma mistura reacional RT-LAMP foi preparada a uma concentração de 2X contendo a seguinte concentração de reagentes: 4 mM dNTP, 0,22 mg mL⁻¹ de BSA, 0,64 U μ L⁻¹ de LF *Bst* polimerase Ecra, 0,6 U μ L⁻¹ RT-Ecra, 2000 μ M do vermelho de cresol, 2X tampão de amplificação isotérmico (50 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ 10 mM, 0,1% Triton X-100, 10% glicerol, 30% DMSO).

Finalizada a etapa de preparado das duas misturas, uma mistura final foi preparada adicionando: 5 μ L da mistura RT-LAMP a 2X, 2 μ L da mistura de iniciadores a 10X, 2 μ L de água nuclease-free e 1 μ L da amostra alvo, totalizando 10 μ L de volume final.

4.3.4.1 RT-LAMP com leitura visual *on-chip* utilizando indicador de pH

4.3.4.1.1 Fabricação dos microdispositivos

Para o desenvolvimento da RT-LAMP nos microdispositivos de PS-T envolvendo a detecção por indicador de pH, três designs de dispositivos foram confeccionados. No primeiro momento, para a otimização da reação RT-LAMP, um design mais simples foi fabricado, sendo composto apenas por câmaras reacionais em formato de uma placa 4x3 de câmaras com capacidade para 10 µL de reação (Figura 41B). O segundo design de mais funcionalidades dispositivo inseriu ao dispositivo integrado, automatizado por rotação utilizando diversas válvulas para a liberação dos fluidos e controle de evaporação das soluções (Figura 41D). Este dispositivo foi descrito no Capítulo 1 foi utilizado aqui para detecção dos arbovírus individualmente.



Figura 41. Representação das partes que compõem os dispositivos de PS-T. A) Fabricação de placas de PS-T contendo topo, base e 3 camadas intermediárias. B) Dispositivos de PS-T em formatos de placas contendo 12 câmaras reacionais distribuídas ao longo de 4 colunas e 3 linhas. C) Disposição das câmaras, canais, e válvulas que compõe o dispositivo integrado de PS-T para realização da amplificação e detecção indireta envolvendo a adição do indicador de pH. D) Representação esquemática das câmaras do dispositivo integrado de PS-T após laminação do dispositivo.

Em ambos *os layouts*, os dispositivos foram compostos por 3 camadas intermediárias, base e topo, totalizando 5 camadas de filmes de poliestireno. O dispositivo não-integrado apresentou uma única câmara reacional enquanto o dispositivo integrado apresentou 4 câmaras totais, sendo 2 câmaras independentes (M e N) conectadas por dois canais as outras duas câmaras centrais E e R (Figura 41D).

Para a automatização da etapa de adição dos reagentes na câmara reacional foram inseridas 5 válvulas dispositivo, V1-V5, contendo as seguintes dimensões: V1 (1,93 x1,48 mm), V2 (2,8 x 5,65 mm), V3 (1,93 x 3,3 mm), V4 (1,93 mm x 1,48), V5 (2,8 x 13,7 mm). O mecanismo de abertura das válvulas encontra-se apresentado na Figura 42 C-D.



Figura 42. Representação das câmaras e válvulas do dispositivo integrado para realização do protocolo de liberação controlada das soluções. A) Representação de todas as câmaras que compõe o dispositivo rotativo. B) Representação de todas as válvulas que compõe o dispositivo. C) Representação esquemática do protocolo e etapas de liberação das soluções utilizando válvulas hidrofóbicas que automatizam o processo de entrega dos fluidos por movimento rotacional. D) Representação das válvulas (V4 e V5) que minimizam a evaporação das soluções.

A Figura 42 C descreve a ordem em que as soluções são inseridas no dispositivo e as etapas de liberação das soluções utilizando válvulas hidrofóbicas que automatizam o processo de entrega dos fluidos por movimento rotacional. Etapa 1A: solução de iniciadores e amostra adicionada a Câmara N sem a rotação do dispositivo. Etapa 1B: acionamento da mobilidade da solução presente na Câmara N, pós-rotação do dispositivo, nessa etapa a válvula V1 representa a primeira válvula a ser rompida, seguida pelo rompimento da válvula 2 e acesso a câmara reacional R. Etapa 2A: Adição da solução RT-LAMP na Câmara M sem rotação do dispositivo. Etapa 2B: Liberação da solução presente na Câmara M para a Câmara R através do rompimento da terceira válvula V3 em decorrência do movimento rotacional aplicado no sistema.

O terceiro *design* foi desenvolvido em formato de CD microfluídico *labon-a-disc* para análises simultâneas dos três vírus. O *design das câmaras* foi similar ao dispositivo que continha uma câmara única de reação (Figura 41), sendo composto por 5 camadas de poliestireno (Figura 43). No dispositivo em forma de CD nove câmaras foram distribuídas ao longo de uma semicircunferência de 118 mm de diâmetro, como foi descrito no Capítulo 1 e pode ser observado na Figura 43.



Figura 43. Esquema representativo do CD microfluídico. A) Arquitetura microfluídica para fabricação do CD rotativo. B) Dispositivo integrado contendo 9 câmaras interconectadas no centro do dispositivo.
4.3.4.1.2 Amplificação e detecção visual on-chip

Os testes moleculares colorimétricos para análise única e multianálises foram realizados utilizando a mesma mistura reacional descrita no tópico 4.3.4 descrita neste Capítulo, modificando apenas o volume final da reação.

Para microdispositivos contendo câmaras não-integradas (Figura 44), a mistura reacional foi preparada com seguinte composição 1X: 5 μ L da mistura RT-LAMP a 2X, 2 μ L da mistura de iniciadores específicos a 10X, 2 μ L de água nuclease-free e 1 μ L de alvo totalizando 10 μ L de volume final. Com intuito de impedir a evaporação das soluções durante o aquecimento, 1 μ L de óleo mineral (Needs, Pernambuco, Brasil) foi adicionado, cobrindo todos os reservatórios de acesso as câmaras reacionais. As reações de RT-LAMP foram incubadas a 68 °C por 15 minutos em bloco de aquecimento (Kasvi, Paraná, BR). Ao final do tempo de incubação o dispositivo foi retirado do bloco de aquecimento para detecção visual através da coloração das soluções.



Figura 44. Representação da etapa de amplificação a detecção RT-LAMP em microdispositivos não-integrados de PS-T em três etapas. Etapa: I) adição dos reagentes; II) incubação; III) detecção visual a olho nu.

Para análises únicas em dispositivos com entrega automatizada de soluções, duas misturas foram preparadas separadamente, sendo elas, uma mistura de iniciadores a 10X e uma mistura principal de 1,42X contendo todos os reagentes exceto iniciadores e o alvo (Mistura M). A Mistura reacional (M) foi preparada inicialmente em um microtubo, contendo os seguintes reagentes: 5 μ L da mistura RT-LAMP a 2X, 2 μ L de água nuclease-free, totalizando 7 μ L de volume final.

A adição das misturas seguiu uma ordem de inserção. Primeiramente adicionou-se na câmara N: 2 μ L da mistura de iniciadores a 10X e 1 μ L do alvo. Finalizada a adição, a mistura contendo 3 μ L foi mobilizada por rotação por 5 s no sentido horário utilizando um *hand-spinner* e direcionada a Câmara reacional (Câmara R). Posteriormente, adicionou-se 7 μ L da Mistura Principal LAMP 1,42X (Mistura M) a Câmara M. Finalizada a adição da Mistura M, o dispositivo foi rotacionado por 5 s no sentido horário e a mistura (7 μ L) foi mobilizada e direcionada a Câmara R, o dispositivo foi rotacionado por 40 s (contendo ao total 4 rotações de 5 s no sentido horário e 4 rotações de 5 s no sentido anti-horário).

Para impedir a evaporação adicionou-se um papel adesivo (*contact*) como cobertura, cobrindo todos os reservatórios e válvulas, exceto o reservatório que continha a válvula V5. A representação de todas essas etapas encontra-se ilustrada na Figura 45.



Figura 45. Representação da etapa de automatização dos reagentes RT-LAMP em microdispositivos integrados de PS-T. A automatização por rotação ocorre em duas etapas. Etapa: I) adição dos iniciadores e amostra II) adição da mistura reacional.

O processo de amplificação RT-LAMP *on-chip* para analise única teve como objetivo testar a funcionalidade de duas câmaras distintas (M e N) que controlavam a inserção de duas misturas diferentes: mistura 1) iniciadores e amostra (câmara N); e mistura 2) mistura reacional RT-LAMP (câmara M). Desse modo, testes preliminares e de desenvolvimento foram realizados em dispositivos de analise única.

Após otimização do carregamento das misturas no dispositivo, protocolo de homogeneização e manipulação das câmaras em dispositivos de análise única. O *layout* da câmara M desse dispositivo pôde ser facilmente alterado para acomodar e interconectar 9 câmaras M (M1-M9) em dispositivos multi-análises (Figura 46). O processo de amplificação RT-LAMP *on-chip* em dispositivos de multi-análises foi similar ao dispositivo integrado para análise única. Inicialmente 3 μ L foram adicionados em cada Câmara N (N1-N9), sendo 2 μ L da mistura de iniciadores a 10X e 1 μ L do alvo. Para cada controle positivo, 1 μ L de RNA alvo foi adicionado à Câmara N. Para realização do controle negativo, 1 μ L de RNA de um paciente saudável foi inserido na Câmara N do dispositivo. A mistura contendo 3 μ L foi movimentada por rotação a 5s no sentido horário e direcionada a Câmara R (Figura 46 A, C).

Posteriormente, adicionou-se 105 µL da mistura principal LAMP 1,42X (mistura M) a câmara de distribuição que interconecta 9 câmaras individuais (M) no centro do dispositivo (Figura 46 A, D). A mistura M foi preparada com seguinte composição: 74,55 µL da mistura RT-LAMP a 2X, 30,45 µL de água nuclease-free.

Finalizada a adição, o dispositivo foi rotacionado por 5 s no sentido horário e a mistura foi direcionada para outras 9 câmaras individuais R (R1-R9) que já continham os iniciadores e amostras. Após direcionamento o dispositivo foi novamente rotacionado por 40 s (4 rotações de 5 s no sentido horário e 4 rotações de 5 s no sentido anti-horário) para obter uma mistura homogênea. Para impedir a evaporação adicionou-se um papel adesivo (*contact*) como cobertura, cobrindo todos os reservatórios e válvulas, exceto os reservatórios que continham o orifício de ventilação (Figura 46 B).



Figura 46. *Layout* do dispositivo de PS-T rotacionalmente controlado por *hand-spinner* para detecção simultânea do: DENV, ZIKV e CHIKV. A) Intitulação das câmaras N e M que contém no dispositivo de multi-análise. C) Vedação das câmaras

reacionais R1-R9 e D e E) adição dos reagentes em duas etapas. D) adição dos iniciadores e amostra e E) adição da mistura reacional RT-LAMP.

Após a adição dos reagentes os dispositivos contendo as reações de RT-LAMP foram incubadas a 68 °C por 15 minutos em bloco de aquecimento (Kasvi, Paraná, BR). Ao final do tempo de amplificação, dispositivos foram retirados do termobloco e colocados sobre folhas de papel branco para aquisição de imagens usando uma câmera de smartphone (Redmi Note 8, Xiaomi). A leitura dos resultados foi realizada a olho nu observando a mudança na cor de rosa (amostra negativa) para amarelo (amostra positiva).

4.3.5 Separação eletroforética off-chip em gel de agarose 3%

Para demonstrar que a cor amarela obtida através da detecção visual era de fato proveniente dos fragmentos de DNA amplificados a partir do RNA alvo, foi realizada a detecção através da eletroforese em gel. Para isto a solução foi recolhida da câmara de detecção do dispositivo e os produtos de amplificação (4 µL) foram sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE). A corrida eletroforética foi realizada em 160 min em tampão TBE a 90 V. Em seguida, os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador UV (KASVI, São José do Pinhais, PR).

4.3.6 Sensibilidade e especificidade

Para determinar o limite de detecção dos testes, várias concentrações de RNA previamente quantificados por RT-PCR, foram testados variando de 10⁵-50 cópias por reação.

Para avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste em amostras clínicas, RNAs das amostras foram extraídos e sujeitos a técnica molecular RT-LAMP *on-chip* e a técnica padrão outro RT-qPCR. Os valores de cycle threshold (*Ct*) das amostras foram 157

determinados por RT-qPCR. Posteriormente, realizou-se o cálculo estatístico do teste, utilizando o software gratuito MedCalc, disponível em <u>https://www.medcalc.org.calc/</u>. Desse modo, o teste de desempenho do diagnóstico molecular por RT-LAMP *on-chip* foi comparado ao método padrão-ouro RT-qPCR.

Um total de 33 amostras clínicas foram testadas nos dispositivos, sendo 18 positivas e 15 negativas para arboviroses. Dentre as amostras positivas, 7 eram provenientes de pacientes infectados por DENV-1, 10 amostras de pacientes infectados por ZIKV e 1 amostra de paciente infectado por CHIKV. Em decorrência de possuirmos apenas uma amostra clínica de CHIKV (com carga viral de 3,5 10^4 cópias μ L⁻¹), cargas virais menores foram simuladas através de diluições seriadas do RNA, totalizando a simulação de 5 amostras positivas.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste Capítulo podem ser divididos em dois tipos de análises com detecção por indicador de pH: i) análise de um único alvo, usando um microdispositivo que contém apenas 1 câmara reacional e ii) multianálises, utilizando um dispositivo que contém 9 câmaras reacionais para 3 testes simultâneos.

A utilização do dispositivo para análise de um único alvo, teve como objetivo: i) avaliar o projeto de funcionamento e a seleção de *layouts* para fabricação de um dispositivo descartável para um único teste e ii) otimizar as condições reacionais RT-LAMP para detectar cada vírus (DENV-1, ZIKV ou CHIKV).

A detecção visual *on-chip* dos produtos RT-LAMP descrita nesse Capítulo utilizou a molécula indicadora de pH, vermelho de cresol ($C_{21}H_{17}NaO_5S$). Em decorrência do halocromismo do vermelho de cresol, ou seja, da propriedade de mudar de cor em função de alterações de pH do meio reacional (mistura RT-LAMP), foi possível realizar a detecção e diferenciação visual *on-chip* entre reações positivas e negativas. A detecção colorimétrica das cópias de DNA amplificadas obteve o enfoque qualitativo, em que reações negativas apresentavam cor rosa-violeta enquanto as reações positivas apresentavam a coloração amarela.

Essa detecção colorimétrica se deve a alteração do pH na reação LAMP oriunda na etapa de síntese de novas cadeias de DNA com a incorporação dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP) na região alvo. Essa incorporação libera o íon hidrogênio como subproduto, sendo, a identificação dos produtos de amplificação uma relação diretamente proporcional entre, o pH e a progressão da extensão da fita de DNA alvo (TANNER et al., 2015; JI et al., 2020; FU et al., 2021). A interação entre os íons de hidrogênio (H⁺) e o vermelho de cresol, acarreta a mudança de cor da molécula indicadora de rosa-violeta para amarelo. Resumidamente, o indicador de pH identifica em um curto período de tempo (neste trabalho em 15 minutos), uma pequena variação do pH reacional abrangendo o intervalo de transição de 8,1 (rosa-violeta) a 7,0 (amarelo). Comportamentos reacionais análogos ao relatado neste trabalho são descritos na literatura em plataformas convencionais (TANNER *et al.,* 2015; KAARJ *et al.,* 2018; FU *et al.,* 2021).

4.4.2 Otimizações da RT-LAMP com detecção visual colorimétrica

As otimizações das condições reacionais como, tempo de incubação, bem como a avaliação da sensibilidade e especificidade foram realizadas para cada alvo individualmente em dispositivos com *design* de placa (Figura 44).

4.4.2.1 Otimização do tempo de amplificação

A amplificação e detecção combinadas em uma única etapa permite o monitoramento visual do resultado em tempo real e acelera do tempo de resultado. O uso de indicadores de pH como método de detecção colorimétrica em reações LAMP são bastantes vantajosos por não apresentarem efeitos inibidores durante o processo de amplificação, característica que permite o monitoramento visual da reação no decorrer do tempo de incubação (JI *et al.,* 2020).

Para verificar o tempo mínimo de amplificação LAMP utilizando o kit desenvolvido nessa tese (com insumos 100% nacionais), o microdispositivo de PS-T não-integrado, foi incubado sob um período de 10, 15 e 20 min. O 160 ensaio colorimétrico apresentou interpretação qualitativa a olho nu (presença ou ausência do alvo). A reação positiva foi interpretada pela coloração amarela (mudança de pH, para 7,3) e a reação negativa pela coloração rosavioleta (pH 8,3). O tempo de amplificação foi realizado por leitura visual *onchip* e confirmado por análise de separação eletroforética em gel de agarose 3%, certificando que os produtos de amplificações obtidos eram provenientes de fragmentos de DNA amplificados (Figura 47).





Figura 47. Avaliação do tempo de incubação para amplificação por RT-LAMP *on-chip*. Diferentes tempos de incubação foram avaliados, 5, 10,15 e 20 min. Alvos:

reações negativas (RNA de um paciente saudável) e positivas (RNA do alvo 10⁴ cópias por reação). Os produtos amplificados foram confirmados por separação eletroforética em gel de agarose a 3 % *off-chip*. D) Iniciadores para detecção do DENV-1; Z) Iniciadores para detecção do ZIKV; C) Iniciadores para detecção do CHIKV. M) Marcador de DNA, 100 pb.

O surgimento de falso-positivo é uma ocorrência comum para LAMP, no entanto, a avaliação do tempo mínimo de incubação vem sendo uma das estratégias cruciais para realização de um diagnóstico seguro (WANG et al., 2015; TANG *et* al., 2011). Conforme observado na Figura 47, concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos com 15 minutos de incubação, apresentando nítida diferenciação colorimétrica entre a reação positiva e negativa. Verificou-se- tanto por detecção colorimétrica quanto por separação eletroforética, que o acréscimo de mais 5 minutos, totalizando 20 minutos de incubação interferia na leitura dos resultados, proporcionado resultados falsopositivos, em decorrência da amplificação de fragmentos inespecíficos.

Como se pode constatar por separação eletroforética, 10 minutos de incubação não foi um tempo suficiente para amplificação, obtendo uma menor sensibilidade identificada pela diferença de coloração entre a reação positiva (laranja) e negativa (rosa-violeta), que compreende o intervalo de viragem do indicador de pH. Desse modo 15 minutos foi considerado o tempo ideal para amplificação. Este tempo foi utilizado em todos os experimentos apresentados neste Capítulo.

É importante destacar que a utilização de ensaios colorimétricos LAMP disponíveis no mercado internacional e comercializados pela Eiken Chemical Company (Tóquio, Japão) e New England BioLabs, WarmStart® colorimetric RT-LAMP (Ipswich, Estados Unidos), também requerem avaliação do tempo de incubação para cada conjunto de iniciador utilizado, visando eliminar resultados não-específicos (CRAW e BALACHANDRAN, 2012; SANTOS *et al.*, 2021 e SILVA *et al.*, 2021).

4.4.2.2 Sensibilidade e especificidade

Para determinar o limite de detecção do ensaio RT-LAMP *on-chip,* realizamos à amplificação em dispositivos integrados e não-integrados.

Primeiramente, as reações de amplificação RT-LAMP para detecção do RNA viral de três arboviroses foram realizadas de acordo com as condições experimentais descritas no tópico 4.3.6, inserindo diferentes quantidades de microdispositivos não-integrados. cópias de RNA-alvo, em Cada concentração de RNA foi relacionada com um valor de Ct encontrado através da quantificação por RT-qPCR. O sucesso na amplificação e detecção do RNA para cada arbovírus pode ser visualizado na Figura 48. Os valores encontrados para o limite de detecção RT-LAMP on-chip com detecção colorimétrica foram respectivamente 1050, 15 e 72,5 cópias µL⁻¹ para detecção do DENV, ZIKV e CHIKV. A detecção das cópias sintetizadas de DNA, visualizadas através da alteração de cor da molécula indicadora de pH, simplificaram o procedimento do ensaio LAMP e foram confirmadas por separação eletroforética via gel de agarose (Figura 48).



Figura 48. Limite de detecção do teste RT-LAMP em dispositivo placa 4x3. A) detecção do vírus DENV-1; B) detecção do vírus ZIKV e C) detecção do vírus CHIKV.

Para certificar a eficiência do método de amplificação LAMP *on-chip* em um dispositivo integrado, com adição sequencial de dois reagentes (iniciadores+amostra e mistura reacional), as mesmas amostras quantificadas de RNA foram inseridas no microdispositivo PS-T integrado. Resumidamente o microdispositivo era composto por 3 câmaras, sendo 2 utilizadas para a adição sequencial de reagentes (M e N), e outra para a realização da amplificação RT-LAMP (R). Para direcionar os iniciadores e amostras, inicialmente 2 µL de iniciador e 1 µL do alvo foram inseridos na câmara N. Ambos os fluidos foram direcionados para a câmara (câmara reacional, R) por rotação obtida em 5 s no horário utilizando um *hand-spinner*. Posteriormente, o segundo reagente, a mistura RT-LAMP (7 µL) foi inserida em outra câmara (câmara M) e direcionada por rotação ~5 s no sentido horário e 5 s no sentido anti-horário, para a câmara reacional (R). Os valores encontrados para o limite de detecção utilizando o método de adição sequencial de reagentes foram os mesmos encontrados no dispositivos não-integrados (Figura 48) sendo respectivamente *Ct* 26, 33 e 28 ou 1050, 15 e 72,5 cópias μ L⁻¹ para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV, legitimando a eficiência do controle dos fluidos do dispositivo (Figura 49).



Figura 49. Detecção de arboviroses em dispositivos que integram a adição de dois reagentes. Detecção colorimétrica on-chip e separação Eletroforética dos produtos LAMP obtidos a partir de diferentes valores de *Ct* do RNA viral. D) detecção do DENV-1; Z) detecção do ZIKV; C) detecção do CHIKV.

Como foi demonstrado neste estudo, o limite de detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV pelo RT-LAMP *on-chip* é superior, se comparado ao método padrão-ouro RT-qPCR. Enquanto o limite de detecção para o RT-qPCR é de 1 cópia μ L⁻¹ para DENV-1 (CHEN *et al.*, 2015), 1,26 cópias μ L⁻¹ para ZIKV (LANCIOTTI *et al.*, 2008) e 0,76 cópias μ L⁻¹ para CHIKV (EDWARDS *et al.*, 2017) o limite de detecção do RT-LAMP nos dispositivos de PS-T foi de 1050, 15 e 72,5 cópias μ L⁻¹ para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV, respectivamente No entanto o método de diagnóstico RT-LAMP *on-chip* fornece uma resposta rápida e confiável para a doença na fase aguda da infecção. Na literatura, elevados níveis de carga viral são encontrados entre o 2° e 3° dia de sintomas da infecção por arboviroses (fase aguda), dentro desses dias a confiabilidade diagnóstica dos testes moleculares e de antígeno NS1 são significativamente aumentadas (ACOSTA *et al.,* 2014).

Em relação ao diagnóstico para infecção por dengue, elevados números de resultados falsos-negativos podem ser alcançados em testes de antígenos (ACOSTA *et al.,* 2014). No estudo conduzido por Acosta e colaboradores (2014), 33 amostras positivadas por RT-qPCR foram avaliadas por teste de antígeno pela detecção do NS1-Ag, nenhuma das 33 amostras foram positivadas, visto que 72% dessas amostras foram coletadas no segundo dia de infecção (ACOSTA *et al.,* 2014).

Em nosso trabalho de 6 amostras clínicas positivas para DENV-1, 5 foram positivadas apresentando carga viral média de $1,02 \times 10^5$ (*Ct* 22) e uma negativada por apresentar uma carga inferior ao limite de detecção de $1,05 \times 10^2$ (*Ct* 31) cópias μ L⁻¹(carga viral da amostra equivalente a 70 cópias μ L⁻¹). Não existe uma relação direta entre carga viral do paciente e gravidade da doença (SILVA, 2008). Apesar disso, segundo Silva (2008) elevados níveis de carga viral são relatados em pacientes que desenvolveram a forma mais grave da dengue (SILVA, 2008).

Desse modo, é importante destacar que o método RT-LAMP em microdispositivos de PS-T poderia proporcionar um suporte de triagem molecular, para o diagnóstico da dengue. O diagnóstico precoce poderia proporcionar um melhor gerenciamento dos pacientes bem como, tratamentos mais adequados, evitando que pacientes progredissem para casos graves, já que o número de óbitos por dengue hemorrágica é 34,75 vezes maior o número de óbitos que no dengue clássico (CASALI *et al.*, 2004).

Em relação ao teste para detecção do ZIKV, o limite de detecção encontrado para o teste RT-LAMP colorimétrico *on-chip* PS-T para detecção do ZIKV, foi de 15 cópias µL⁻¹, sendo similares aos ensaios realizados em microtubos de polipropileno e microdispositivo de PDMS, que obtiveram

limites iguais a 20 cópias μ L⁻¹ (WANG *et al.*, 2016) e 10 cópias/ μ L⁻¹ (GANGULI *et al.*, 2017) respectivamente. Em microdispositivos de papel, Calvert e colaboradores encontraram um limite de detecção inferior ao microdispositivo de PS-T, detectando 1,2 cópias de RNA μ L⁻¹ (CALVERT *et al.*, 2017).

Em relação ao ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV, o limite de detecção do ensaio em microdispositivos de PS-T encontrado em nosso estudo é superior aos trabalhos publicados na literatura, 72,5 cópias de RNA μ L⁻¹, no entanto o predomínio de casos com alta carga viral em CHIKV (1, 7 x $10^3 \text{ a} 9.9 \times 10^6$ copies de RNA μ L⁻¹) sugere que o teste aqui apresentado tem potencial para o diagnóstico molecular da chikungunya para a maioria dos casos de infecção (PATEL et al., 2019). Outros substratos de dispositivos microfluídicos utilizando RT-LAMP para detecção do CHIKV têm sido demonstrados na literatura. Um estudo publicado recentemente por Seok et al., (2020) descreveu um ensaio de RT-LAMP em microdispositivos de papel (*Lab-on-paper*) com limite de detecção de 5 cópias µL⁻¹ do RNA viral em um tempo final de análise de 60 minutos de incubação (SEOK et al., 2020). Kutsuna e colaboradores descreveram um ensaio LAMP em um dispositivo microfluídico de PDMS para a detecção de amostras de RNA do CHIKV apresentando um limite de detecção de 20 cópias de RNA µL⁻¹ em 45 minutos de reação (KUTSUNA et al., 2020). Em nosso dispositivo, o tempo ideal para detecção do CHIKV foi de 15 minutos.

Com o objetivo de avaliar o teste de desempenho do ensaio RT-LAMP *on-chip* com detecção colorimétrica, amostras clínicas, positivas e negativas (não-alvo) foram avaliadas. O teste para detecção do DENV I, ZIKV e CHIKV apresentaram os respectivos valores do teste de desempenho: sensibilidade de 80, 100, 85,71%, especificidade de 94,12; 92,24; 100%, valores preditivos positivos, VPP de 80%, 80% e 100%, VPN 94%; 94,12; 88,89%; e acurácia de 90,91; 95,24 e 93,33%. De acordo com os valores estatísticos obtidos, os testes para detecção do DENV, ZIKV e CHIKV em dispositivos microfluídicos de PS-T apresentam grande potencial para testes de triagem para arboviroses.

4.4.2.3 RT-LAMP com detecção visual discriminatória de três arboviroses em microdispositivos de PS-T em formato de CD

Neste estudo, descrevemos a detecção de três arbovírus em um único dispositivo com detecção colorimétrica utilizando indicadores de pH. O dispositivo PS-T para multi-análises foi projetado com 9 câmaras, apresentando *layouts* idênticos entre elas, capaz de realizar análises simultâneas de 3 diferentes alvos. O dispositivo apresentou simplicidade, portabilidade e baixo custo. O funcionamento do dispositivo foi similar ao descrito no tópico 4.4.2.2 (Figura 49) com uma única alteração: a adição de uma câmara de distribuição da mistura principal que interconecta 9 câmaras individuais no centro do dispositivo.

O microdispositivo para multi-análises, conteve 9 câmaras reacionais sendo 3 câmaras destinadas para detecção de cada arbovírus específico (alvo). Câmaras 1-3, destinadas para detecção do DENV-1; câmaras 4-6 destinadas para detecção do ZIKV e câmaras 7-9 destinadas para detecção do CHIKV. Cada teste utilizou 3 câmaras: uma para o controle negativo, 1 para o controle positivo e 1 para amostra.

O teste rápido DENV-1/ZIKV/CHIKV em dispositivos multi-análises permitiu agilidade no processo de detectar e discriminar simultaneamente 3 arboviroses. Os testes foram realizados a partir de amostra de RNA extraído de soro de pacientes saudáveis ou infectados por arbovírus. A leitura do resultado do teste foi baseada no comportamento das reações controles. Em caso positivo, era possível visualizar a cor amarela tanto na câmara reacional que continha a amostra quanto na câmara que continha o controle positivo do teste específico. Em caso negativo, era possível visualizar a cor rosa tanto na câmara que continha o controle negativo quanto na câmara que continha a amostra.

O ensaio para diagnóstico diferencial da infecção ocasionada pelo vírus da dengue, zika ou chikungunya obteve o enfoque qualitativo, baseado

na presença ou não do produto amplificado (positivo ou negativo). Para não obter resultados inconclusivos em decorrência de falhas da reação, controles negativos e positivos, foram realizadas para cada conjunto de *iniciador*, totalizando 6 reações controles. Os controles negativos encontraram-se nas câmaras 1,4 e 7, os controles positivos contendo a sequência-alvo nas câmaras 2,5 e 8 e a amostra (RNA extraído de uma amostra clínica de soro) nas câmaras 3, 6 e 9 (Figura 50).

Os resultados de três testes RT-LAMP foram obtidos em aproximadamente 16 minutos e foi capaz de identificar na amostra do paciente qual das arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* o paciente encontrava-se infectado. O resultado foi dado em função do comportamento da amostra em relação aos controles, as colorações rosa-violeta, indicavam as reações negativas, regiões não-alvo. Já as colorações amarelas indicavam as reações positivas, ou seja, regiões em que os *iniciadores* amplificaram a sua região alvo-complementar (Figura 50).



Figura 50. Dispositivo utilizado para caracterizar e discriminar uma única amostra, inserida em três câmaras distintas do disco. Câmaras 1-3 (iniciadores para detecção do DENV), 4-6 (iniciadores para detecção do ZIKV) e 7-9 (iniciadores para detecção do CHIKV). Câmaras 1,4,7 controles internos negativos, câmaras 2,5 e 8 (controle positivo contendo a sequência-alvo), câmaras 3, 6 e 9 (analito, RNA extraído de uma amostra clínica de soro). 1-3) Iniciadores DENV-1, sendo 1) DN – controle negativo do iniciador DENV; 2) DP- controle positivo dos iniciadores DENV; 3) DA – Amostra de RNA em iniciadores DENV; 3-6) Iniciadores ZIKV, sendo 3) DN – controle negativo do iniciador ZIKV; 4) ZP- controle positivo dos iniciadores ZIKV; 5) ZA – Amostra de RNA em iniciadores ZIKV; 7-9) Iniciadores CHIKV; sendo 7) CN – controle negativo do iniciador CHIKV; 8) CP- controle positivo do iniciador CHIKV; 9) CA – Amostra de RNA em iniciadores CHIKV.

Atualmente, o ensaio RT-qPCR é o teste padrão ouro para o diagnostico molecular diferencial de arboviroses. Esse sistema necessita de sondas fluorescentes de DNA, um equipamento de alto custo (~ R\$ 200 mil) e requer no mínimo 1 h para a reação do diagnóstico final (ARAI *et al.*, 2019).

A fim de alcançar uma ferramenta de diagnóstico de baixo custo e eficiente, o ensaio LAMP *on-chip* se destinou a discriminar de forma simultânea e rápida (15 minutos de reação) as doenças causadas por 3 diferentes arbovírus. Algumas características como, simplicidade, portabilidade, baixo custo da instrumentação e dos microdispositivos, oferecem grandes expectativas para promover diagnóstico diferencial com aplicação no POC.

4.4.3. Comparação entre os ensaios RT-LAMP *on-chip* utilizando o intercalador de DNA SG e o indicador de pH vermelho de cresol

Neste trabalho dois sistemas de detecção dos produtos de amplificação LAMP foram realizados em microdispositivos descartáveis de PS-T, sendo eles, o i) sistema de detecção utilizando o intercalador fluorescente de DNA SYBR Green I (RT-LAMP-SG); e ii) um sistema com detecção colorimétrica, utilizando indicador de pH vermelho de cresol (RT-LAMP-VC). Em ambos os tipos de detecção, o objetivo principal foi desenvolver um sistema *point-of-care*, visando possível aplicação do teste em lugares remotos que não necessitem de estruturas laboratoriais complexas.

Informações importantes relacionadas ao desempenho do teste com dois diferentes métodos de detecção, foram avaliadas. Ao utilizar métodos distintos para detecção, observou-se que o método *endpoint*, com inserção do SG, apresentou limite de detecção mais baixo para detecção dos três vírus. Segundo Zhang e colaboradores (2014), o baixo limite de detecção se deve ao uso do intercalador de DNA SYBR Green I que leva ao aumento da sensibilidade RT-LAMP quando comparado a outros métodos de detecção LAMP (ZHANG *et al.*, 2014). De acordo com Singer *et al.*, (1999) esse corante ao se ligar as cópias de DNA, aumenta a fluorescência do meio em média de 100 vezes se comparados a outros intercaladores de DNA, como o brometo de etídio (SINGER et al., 1999).

Adotando como referência o limiar de detecção (*Ct*) das amostras de RNA obtidas por RT-qPCR, observou-se que o método RT-LAMP-SG apresentou limite de detecção baixos, detectando amostras de RNA de DENV, ZIKV e CHIKV com respectivamente 380, 10 e 15,8 cópias μ L⁻¹ o que corresponde a um *Ct* de 29, 35 e 32 respectivamente. As mesmas amostras de RNA foram analisadas pelo método RT-LAMP-VC, no entanto o limite mínimo de detecção encontrado foi de 1050, 15 e 72,5 cópias μ L⁻¹ com *Ct* de 26,33 e 28 para detecção do DENV, ZIKV e CHIKV, respectivamente (Figura 51A). Como pode ser observado na Figura 48A os resultados falso-negativos foram obtidos em amostras com elevados valores de *Ct*. Para o teste de DENV valores falso-positivos foram observados com *Ct* acima de 28 para o indicador de pH e *Ct* acima de 29 para os testes que utilizaram intercalador de DNA. Enquanto que para os testes de ZIKV e CHIKV os falsos-positivos ocorreram para amostras com *Ct* acima de 35 e 38 para indicador de pH e SYBR Green respectivamente.





Valor de Ct



Figura 51. Comparação do teste de desempenho de dois ensaios RT-LAMP *on-chip*. A) Limite de detecção verificados pelo valor de *Ct.* B) Gráfico contendo os valores estatísticos em % dos ensaios RT-LAMP *on-chip* realizados pelo software MedCalc. Dados do gráfico: SG) detecção visual utilizando o intercalador de DNA SYBR Green; VC) detecção visual colorimétrica utilizando O indicador de pH, vermelho de cresol. Universo amostral: 12 amostras de RNA para detecção do DENV-1 (7 positivas e 5 negativas); 13 amostras para detecção do ZIKV (8 Positivas e 5 negativas); 10 amostras para detecção do CHIKV (5 positivas e 5 negativas).

A sensibilidade e a especificidade de ambos os métodos de detecção foram avaliadas para amostras com $Ct \le 30$ conforme também foi descrito em trabalhos de outros autores, Thi *et al.*, (2020), Santos *et al.*, (2021) e Silva *et al.*, (2021). Em suma, para amostras com $Ct \le 30$, o método RT-LAMP-SG apresentou especificidade de ~ 85, 100, 100% e sensibilidade de ~ 84, 100, 100% para detecção do DENV, ZIKV e CHIKV respectivamente, enquanto para o método RT-LAMP-VC, o teste apresentou resultados de desempenho de especificidade de 94,12; 92,24; 100%, e sensibilidade de 80, 100, 85,71% para o diagnóstico da dengue, zika e chikungunya respectivamente (Figura 51 B). Embora o teste utilizando SYBR Green seja mais sensível que a detecção utilizando indicador de pH, o primeiro apresenta algumas desvantagens. A principal delas é o efeito inibidor na reação RT-LAMP, sendo assim necessária sua adição apenas ao final da reação de amplificação do DNA. Isso requer mais funcionalidades no dispositivo para promover a mistura entre SYBR Green e *amplicons* ao final da reação. Em decorrência desse efeito inibidor é necessário que a detecção seja *endpoint*, ou seja, apenas ao final da reação, e desta forma não permite o acompanhamento visual do resultado durante a reação. E por fim, o intercalador de DNA é um reagente consideravelmente mais caro que o indicador de pH. Desta forma, embora o teste utilizando indicador de pH seja ligeiramente menos sensível quando comparado ao uso de intercalador de DNA, ele apresenta vantagens importantes que facilitam na prática a realização do teste.

4.5 CONCLUSÃO

Neste estudo descrevemos testes RT-LAMP com detecção visual baseada em indicador de pH em dispositivos centrífugos de PS-T para detecção de dengue, zika e chikungunya. A utilização do indicador de pH, vermelho de cresol, como forma de detecção dos produtos de amplificação proporcionou uma fácil manipulação (inserção no início da reação) apresentando assim grande potencial para a realização de testes moleculares rápidos. A fácil leitura dos resultados *on-chip*, com detecção colorimétrica realizada a olho nu, poderá contribuir para a descentralização do teste uma vez que a detecção visual baseada em mudança cor não requer um profissional altamente treinado para interpretação dos resultados.

Os valores de limite de detecção RT-LAMP *on-chip* com detecção colorimétrica foram respectivamente 1050, 15 e 72,5 cópias µL⁻¹ para detecção do DENV, ZIKV e CHIKV, demonstrando assim ser um teste sensível e capaz de realizar o diagnóstico confiável para maioria dos pacientes com suspeita de contaminação por arboviroses, os quais em geral apresentam carga superior a estes valores na fase aguda da infeção.

De acordo com os testes estatísticos realizados nas amostras reais, os testes para detecção do DENV, ZIKV e CHIKV por RT-LAMP em dispositivos descartáveis de PS-T apresentaram respectivamente sensibilidade de 80, 100, 85,71%; especificidade de 94,12; 92,24; 100%; acurácia de 90,91; 95,24 e 93,33. Esses valores sugerem uma boa confiabilidade e precisão do teste molecular rápido aqui proposto.

Ademais, o teste rápido DENV/ZIKV/CHIKV em dispositivos multianálises proporcionou agilidade no processo de detectar e discriminar simultaneamente 3 arboviroses. Foi possível a realização dos 3 testes simultaneamente em apenas 16 minutos após o início da reação.

Vantagens como: i) utilizar microdispositivo e equipamentos com baixo custo; ii) realizar a detecção visual a olho nu, sem necessidade de um equipamento para visualização; iii) realizar os testes em 16 minutos; iv) utilizar insumos 100% nacionais e v) promover a automatização e miniaturização do teste, reduzindo o volume dos reagentes e consequentemente o valor do teste, são pontos que contribuem para a realização de testes em massa, já que o teste não requer muita infraestrutura.

Como resultado, os dispositivos de PS-T com diferentes tipos de detecção (intercalador de DNA, SYBR Green ou indicador de pH, vermelho de cresol) apresentaram testes de desempenho semelhantes, com boa especificidade e sensibilidade para detecção do DENV, ZIKV e CHIKV. Entretanto, ainda são necessários esforços para aumentar a sensibilidade do teste, especialmente para aqueles que utilizam indicadores de pH como método de detecção visual.

4.6 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo descreveu o desenvolvimento de dispositivos descartáveis de poliestireno-toner baseados em um sistema *lab-on-a-disc* (LOD). Todos os dispositivos apresentados neste trabalho foram dispositivos rotativos que envolveram a integração e automatização de etapas analíticas com agilidade na obtenção dos resultados através da aplicação do sistema LOD. Para a obtenção de um teste RT-LAMP rápido, simples, integrado e automatizado por uma força centrífuga, exploramos o projeto arquitetônico (*layout*), as dimensões e a funcionalidade do microdispositivo de PS-T.

No Capítulo 1, foi apresentada toda a fundamentação teórica e o processo de microfabricação para produção dos microdispositivos rotativos. Para controle de fluidos nesses dispositivos, demonstramos o uso de válvulas hidrofóbicas de toner, a 100% de escala de cinza governadas por força centrífuga utilizando o *hand-spinner* como sistema centrifugo, um dispositivo de baixo custo, livre de eletricidade e com alta eficiência de rotação para o rompimento e abertura de válvulas hidrofóbicas. As integrações e automatizações foram realizadas para diminuir etapas de pipetagens, o que minimiza problemas com contaminação, que são muito comuns em reações LAMP.

Como prova de conceito, os Capítulos 2 ao 4, demonstraram a utilização da técnica molecular isotérmica RT-LAMP no dispositivo microfluídico de PS-T com diferentes metodologias de detecção visual para diagnóstico de doenças virais infecciosas como dengue, zika e chikungunya e a COVID-19 (cada capítulo forneceu o mecanismo detalhado para cada tipo de detecção). No geral, dois diferentes métodos de detecção visual RT-LAMP foram avaliados *on-chip*, sendo esses, o método de detecção por fluorescência, através da inserção do intercalador de DNA, SYBR Green (RT-LAMP-SG), e o método de detecção via halocromismo do meio reacional, através da inserção do indicador de pH, vermelho de cresol (RT-LAMP-VC). O funcionamento dos dois dispositivos para os diferentes métodos de

detecção foi similar, em que o direcionamento dos fluidos foi determinado por ruptura da válvula de toner, através da adição de uma força centrífuga gerada por um *hand-spinner*. A mistura homogênea das duas diferentes soluções pôde ser obtida em ~40 s utilizando 4 rotações por 5 s no sentido horário e 4 rotações por 5 s no sentido anti-horário (alternadas entre sentido horário e anti-horário).

Basicamente os *layouts* dos dispositivos foram desenvolvidos baseados no tipo de detecção visual de interesse. O primeiro *layout* do dispositivo para amplificação RT-LAMP-SG, foi desenvolvido para integração e automatização da adição do intercalador de DNA ao final da reação de amplificação de DNA. O segundo *layout* para amplificação RT-LAMP-VC foi desenvolvido para detecção visual utilizando indicador de pH e neste, a automatização da entrega da mistura reacional e dos iniciadores e amostra foi realizada pré-incubação. Nos dois layouts as válvulas foram controladas com sucesso através do uso do *hand-spinner* e não apresentaram evaporação das soluções durante etapas de aquecimento, que são necessárias para as reações de amplificação de DNA.

Ademais, a parte experimental de ambos os ensaios, RT-LAMP-SG e RT-LAMP-VC, foram realizadas em dois formatos de dispositivos intitulados: i) dispositivos de análise única (uma câmara reacional), e ii) dispositivo multianálise (nove câmaras reacionais), abordados para detecção do DENV-1, ZIKV e CHIKV. Os microdispositivos centrífugos de PS-T apresentaram um caráter inovador, uma vez que os materiais utilizados no processo de fabricação e manuseio foram de baixo custo e operados a um modo simples, rotacionando o dispositivo por 40 s, com rotações manuais, fixando a força em uma das asas do *hand-spinner*. O funcionamento do microdispositivo centrífugo para multi-análises foi avaliado, demonstrando que foi possível detectar e discriminar com sucesso três doenças infecciosas intimamente relacionadas, transmitidas pelo mesmo vetor, o mosquito Aedes aegypti, simultaneamente em um dispositivo único. A operação desse dispositivo dispensa profissionais altamente qualificados, o que mostra um enorme potencial dos dispositivos de PS-T para aplicações no POC.

O teste para detecção simultânea do DENV-1/ZIKV/CHIKV em um dispositivo único foi obtido após 10-15 minutos de incubação do dispositivo a 68 °C e ~2 min de leitura para análise dos resultados, totalizando um tempo de diagnóstico de 12 a 16 min para detecção *on-chip* por RT-LAMP-SG e RT-LAMP-VC respectivamente. O teste era considerado inválido se as reações controles falhasse, e considerado válido se as reações controles falhasse, e considerado válido se as reações controles apresentassem os seguintes resultados: controle negativo (ausência de fluorescência para o ensaio RT-LAMP-SG e cor ROSA para o ensaio RT-LAMP-VC) e controle positivo (presença de fluorescência para o ensaio RT-LAMP-SG e cor AMARELA para o ensaio RT-LAMP-VC). O resultado era lido visualmente *on-chip*. A leitura do resultado era realizada diretamente na câmara de detecção do microdispositivo (*on-chip*) logo após o microdispositivo ser submetido a uma iluminação específica (UV ou branca).

Os Ensaios *on-chip* RT-LAMP-SG e RT-LAMP-VC provaram ser uma alternativa rápida e simples para a detecção de doenças virais infecciosas. Os valores limites de detecção para o ensaio RT-LAMP-SG foram 380, 10 e 15,8 e 10^{-3} cópias μ L⁻¹ para detecção de DENV-1, ZIKV, CHIKV, COVID-19 respectivamente, indicando uma sensibilidade ligeiramente maior ao ensaio RT-LAMP-VC *on-chip* que mostrou um limite de detecção de 1050, 15 e 72,5 cópias μ L⁻¹ para detecção de DENV-1, ZIKV e CHIKV respectivamente acurácia de ~90%. Assim, em decorrência do elevado desempenho do teste RT-LAMP *on-chip*, essa metodologia poderia dar suporte as atividades de vigilância epidemiológica ou até mesmo agilizar o diagnóstico diferencial de arboviroses e outras doenças infecciosas, provando ser uma ferramenta valiosa para o diagnóstico molecular de doenças emergentes.

Em relação a perspectiva futura do uso dos dispositivos rotativos à base de poliestireno, este dispositivo tem grande potencial para ser usado no diagnóstico molecular no POC. O uso destes dispositivos poderá permitir a realização de um diagnóstico molecular de doenças infecciosas de forma

acessível, sem grande necessidade de infraestrutura. A substituição dos testes de análise única para testes de multi-análise poderia beneficiar o diagnóstico em laboratório clínico devido à sua capacidade de detectar e discriminar três ou mais doenças infecciosas intimamente relacionas em um único dispositivo. Além disso, os dispositivos multi-análise permitiriam a realização de vários testes de diagnóstico simultaneamente, o que levaria a uma economia de tempo significativa.

Todo o sistema tem excelente potencial para se tornar um produto útil na avaliação de infecções em testes no ponto de atendimento, uma vez que todos os componentes do sistema podem ser miniaturizados, sendo eles, ópticos (Luz UV/branca), elétricos (placa de aquecimento) e interfaces como câmera (smartphone). Ademais, a obtenção de uma plataforma portátil, livre de energia, auxiliaria no tempo de diagnóstico pois poderia ser levada diretamente ao local de atendimento ou a locais com recursos limitados.

4.8 REFERÊNCIAS

ACOSTA, P. O., GRANJA, F., MENESES, C. A., NASCIMENTO, I. A., SOUSA, D. D., LIMA JÚNIOR, W. P., NAVECA, F. G. False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by NS1 Ag kits. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 447-450, 2014.

ALHASSAN, A., OSEI-ATWENEBOANA, M. Y., KYEREMEH, K. F., POOLE, C. B., LI, Z., TETTEVI, E., ... & CARLOW, C. K. Comparison of a new visual isothermal nucleic acid amplification test with PCR and skin snip analysis for diagnosis of onchocerciasis in humans. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 10-12, 2016.

CALVERT, A. E., BIGGERSTAFF, B. J., TANNER, N. A., LAUTERBACH, M., & LANCIOTTI, R. S. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **PIoS one**, v. 12, n. 9, p. e0185340, 2017.

CASALI, C. G., PEREIRA, M. R. R., SANTOS, L. M. J. G., PASSOS, M. N. P., FORTES, B. D. P. M. D., ORTIZ VALENCIA, L. I., MEDRONHO, R. D. A. A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. **Revista da sociedade Brasileira de medicina tropical**, v. 37, p. 296-299, 2004.

Chen, H., Parimelalagan, M., Lai, Y. L., Lee, K. S., Koay, E. S. C., Hapuarachchi, H. C., ... & Chu, J. J. H. Development and evaluation of a SYBR green–based real-time multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection and serotyping of dengue and chikungunya viruses. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 6, p. 722-728, 2015.

CRAW, Pascal; BALACHANDRAN, Wamadeva. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. **Lab** on a Chip, v. 12, n. 14, p. 2469-2486, 2012.

DOS SANTOS, C. A. D., OLIVEIRA, K. G. D., MENDES, G. M., SILVA, L. C., SOUZA JR, M. N. D., ESTRELA, P. F. N., GUIMARÃES, R. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; DUARTE, G. R. M. D. Detection of SARS-CoV-2 in Saliva by RT-LAMP During a Screening of Workers in Brazil, Including Pre-Symptomatic Carriers. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 32, p. 2071-2077, 2021. GANGULI, A., ORNOB, A., YU, H., DAMHORST, G. L., CHEN, W., SUN, F., ... & BASHIR, R. Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomedical microdevices**, v. 19, n. 4, p. 1-13, 2017.

GOTO, M., HONDA, E., OGURA, A., NOMOTO, A., & HANAKI, K. I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **Biotechniques**, v. 46, n. 3, p. 167-172, 2009.

IZADI, A., MOSLEMI, E., & SHAHHOSSEINY, M. H. Comparison of SYBR Green and turbidimetry methods for loop mediated isothermal amplification (LAMP) product detection in diagnosis of hepatitis B virus (HBV). African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 42, p. 7003-7007, 2012.

EDWARDS, T., SIGNOR, L. D. C. C., WILLIAMS, C., LARCHER, C., ESPINEL, M., THEAKER, J., ... & ADAMS, E. R. Analytical and clinical performance of a Chikungunya qRT-PCR for Central and South America. Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 89, n. 1, p. 35-39, 2017.

FISCHBACH, J., XANDER, N. C., FROHME, M., & GLÖKLER, J. F. Shining a light on LAMP assays' A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. **Biotechniques**, v. 58, n. 4, p. 189-194, 2015.

FU, J., CHIANG, E. L. C., MEDRIANO, C. A. D., LI, L., & BAE, S. Rapid quantification of fecal indicator bacteria in water using the most probable number-loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) approach on a polymethyl methacrylate (PMMA) microchip. **Water Research**, v. 199, p. 117172, 2021.

JI, J., XU, X., WU, Q., WANG, X., LI, W., YAO, L., KAN, Y., LU, Y.; BI, Y. XIE, Q. Simple and visible detection of duck hepatitis B virus in ducks and geese using loop-mediated isothermal amplification. **Poultry science**, v. 99, n. 2, p. 791-796, 2020.

KAARJ, K., AKARAPIPAD, P., & YOON, J. Y. Simpler, faster, and sensitive Zika virus assay using smartphone detection of loop-mediated isothermal amplification on paper microfluidic chips. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

KUTSUNA, S., SAITO, S., OHMAGARI, N. Simultaneous diagnosis of dengue virus, Chikungunya virus, and Zika virus infection using a new point-of-care testing (POCT) system based on the loop-mediated isothermal amplification

(LAMP) method. Journal of Infection and Chemotherapy, v. 26, n. 12, p. 1249-1253, 2020

LANCIOTTI, R. S., KOSOY, O. L., LAVEN, J. J., VELEZ, J. O., LAMBERT, A. J., JOHNSON, A. J., ... & DUFFY, M. R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerging infectious diseases, v. 14, n. 8, p. 1232, 2008.

PARIDA, M., HORIOKE, K., ISHIDA, H., DASH, P. K., SAXENA, P., JANA, A. M., MORITA, K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2895-2903, 2005.

PARIDA, M. M., SANTHOSH, S. R., DASH, P. K., TRIPATHI, N. K., LAKSHMI, V., MAMIDI, N., MORITA, K. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 351-357, 2007.

PATEL, A. K., KABRA, S. K., LODHA, R., RATAGERI, V. H., RAY, P. Virus load and clinical features during the acute phase of Chikungunya infection in children. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0211036, 2019.

SANTIAGO, G. A., VERGNE, E., QUILES, Y., COSME, J., VAZQUEZ, J., MEDINA, J. F., MUÑOZ-JORDÁN, J. L. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2311, 2013.

SINGER, V. L., LAWLOR, T. E., & YUE, S. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 439, n. 1, p. 37-47, 1999

SCOTT, A. T., LAYNE, T. R., O'CONNELL, K. C., TANNER, N. A., & LANDERS, J. P. Comparative evaluation and quantitative analysis of loopmediated isothermal amplification indicators. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 19, p. 13343-13353, 2020.

SILVA, Ana Maria da. Estudo de cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 em formas clínicas da dengue com diferentes níveis de gravidade. Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife. 156 p, 2008.

SILVA, L. D. C., DOS SANTOS, C. A., MENDES, G. D. M., OLIVEIRA, K. G. D., DE SOUZA JÚNIOR, M. N., ESTRELA, P. F. N., ... & DUARTE, G. R. M. Can a field molecular diagnosis be accurate? A performance evaluation of

colorimetric RT-LAMP for the detection of SARS-CoV-2 in a hospital setting. **Analytical Methods: Advancing Methods and Applications**, 2021.

SEOK, Y., BATULE, B. S., & KIM, M. G.. Lab-on-paper for all-in-one molecular diagnostics (LAMDA) of zika, dengue, and chikungunya virus from human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112400, 2020.

TANG, M. J., ZHOU, S., ZHANG, X. Y., PU, J. H., GE, Q. L., TANG, X. J., & GAO, Y. S. Rapid and sensitive detection of Listeria monocytogenes by loopmediated isothermal amplification. **Current microbiology**, v. 63, n. 6, p. 511-516, 2011.

TANNER, N. A., ZHANG, Y., EVANS JR, T. C.. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. **Biotechniques**, v. 58, n. 2, p. 59-68, 2015.

TIAN, B. et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loopmediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 86, p. 420-425, 2016.

TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H., & NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nature protocols, v. 3, n.5, p. 877-882, 2008.

WANG, D. G., BREWSTER, J. D., PAUL, M.; TOMASULA, P. M. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6048-6059, 2015.

Wang, X., Yin, F., Bi, Y., Cheng, G., Li, J., Hou, L., ... & Yang, L. (2016). Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **Journal of virological methods**, v. 238, p. 86-93, 2016.

Zhang, X., Lowe, S. B., & Gooding, J. J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 491-499, 2014.

CURRICULUM VITAE

1. Informações pessoais

Nome completo: Kézia Gomes de Oliveira ID Lattes: 7958404744770361

2. Formação Acadêmica

Mestre em Química Universidade Federal de Goiás Goiânia-GO 2014 – 2016

Licenciada em Química Universidade Estadual de Goiás Anápolis-GO 2009 – 2013

3. Produção científica e tecnológica

3.1 Artigos publicados

1-OLIVEIRA, K. G; ESTRELA, P.F. N; MENDES, G. M; SANTOS, C. A; SILVEIRA-LACERDA, E. P; DUARTE, G. R. M. (2021). Rapid molecular diagnostics of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with end-point visual detection. **Analyst**, v. 146, p. 1178–1187 https://doi.org/10.1039/D0AN02066D

2-SILVA, L. C; DOS SANTOS, C. A; MENDES, G. M; DE OLIVEIRA, K. G; SOUZA JÚNIOR, M. N; ESTRELA, P. F. N; COSTA, S; SILVEIRA-LACERDA, E. P; DUARTE, G. R.M. (2021). Can a field molecular diagnosis be accurate? A performance evaluation of colorimetric RT-LAMP for the detection of SARS-CoV-2 in a hospital setting. **Analytical Methods**, v. 13, p. 2898 – 2907. https://doi.org/10.1039/D1AY00481F

3-DOS SANTOS, C. A; OLIVEIRA, K. G; MENDES, G. M; SILVA, L. C; SOUZA JÚNIOR, M. N; ESTRELA, P. F. N; GUIMARÃES, R. A; SILVEIRA-LACERDA, E. P; DUARTE, G. R. M. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in saliva by RT-LAMP during a screening of workers in Brazil, including of pre-symptomatic carriers. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** <u>https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210098</u>

4-MENDES, GEOVANA; OLIVEIRA, KÉZIA; BORBA, JULIANE; OLIVEIRA, THAIS; FIACCADORI, FABÍOLA; NOGUEIRA, MAURÍCIO; BAILÃO, ALEXANDRE; SOARES, CÉLIA MARIA; CARRILHO, EMANUEL; DUARTE, GABRIELA. Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop
Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 30, p. 1841-1849, 2019.

5-ESTRELA, P. F. N; MENDES, G. M; OLIVEIRA, K. G; BAILÃO, A. M; SOARES, C. M. M; ASSUNÇÃO, N. A; DUARTE, G. R. M (2019). Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. **Journal of Virological Methods**, v. 271, 113675. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113675

6-DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES; BORBA, JULIANE CRISTINA; BAILÃO, ALEXANDRE MELO; DE ALMEIDA SOARES, CÉLIA MARIA; CARRILHO, EMANUEL; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. **Analytical biochemistry**, v. 534, p. 70-77, 2017.

7-DOS SANTOS, C. A; SILVA, L. C; SOUZA JÚNIOR, M. N; MENDES, G. M; ESTRELA, P. F. N; OLIVEIRA, K. G; de CURCIO, J. S; PAUVOLID-CORRÊA, A; SILVA, P. C. R; SIQUEIRA, M. M; DUARTE, G. R. M; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Detecting lineage-defining mutations in SARS-CoV-2 using colorimetric RT-LAMP without probes or additional primers. **Scientific Reports**.

3.3 Trabalhos apresentados em reuniões científicas

DOS SANTOS, C. A. D., OLIVEIRA, K. G. D., MENDES, G. M., SILVA, L. C., SOUZA JR, M. N. D., ESTRELA, P. F. N., GUIMARÃES, R. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; DUARTE, G. R. M. D. Detection of SARS-CoV-2 in Saliva by RT-LAMP. Detecção de mutações definidoras de linhagem nas variantes alfa e gama de SARS-CoV-2 utilizando a técnica RT-LAMP 2021. XX Congresso Brasileiro de Infectologia, 2021.

DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES; DUARTE, G. R. M. Detecção rápida do vírus da chikungunya (CHIKV) baseada em amplificação isotérmica de DNA em microdispositivos descartáveis de poliestireno-toner. Reunião Anual da SBQ Regional, 2021.

MENDES, G. M.; OLIVEIRA, K. G.; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Ton er Microdevices In: III Workshop da Pós Graduaçao em Química, 2019, Goiânia. III Workshop da Pós Graduaçao em Química. 2019. DE OLIVEIRA, KÉZIA; MENDES, G. M.; ASSUNÇÃO, NILSON ANTÔNIO; BAILAO, A. M.; DUARTE¹, G. R. M. Detecção do vírus Zika em tempo real, 19° ENQA, 2018, Caldas Novas. 19º ENQA. 2018.

ESTRELA, P. F. N.; MENDES, G. M.; OLIVEIRA, K. G.; BATISTA, R. P.; BAILAO, A. M.; BORBA, J. C.; CARRILHO, E.; DUARTE, G. R. M. Detecção de zika vírus em 10 minutos por Amplificação Isotérmica de DNA em microchip de poliéster-toner. 19° Encontro Nacional de Química Analítica e 7° Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018.

MENDES, G. M.; OLIVEIRA, K. G.; BORBA, JULIANE; CARRILHO, EMANUEL; FIACCADORI, F. S.; BAILAO, A. M.; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES. Diagnóstico Molecular da dengue por RT-LAMP em microdispositivos descartáveis de PeT. 19° ENQA, 2018, Caldas Novas. 190 ENQA.

OLIVEIRA, K. G.; BORBA, J. C.; BAILAO, A. M. ; CARRILHO, E. ; DUARTE, G. R. M. . Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in disposable polyester toner (PeT) microdevices. In: 22nd Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, 2016, Santiago. 22nd Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, 2016.

MENDES, G. M. ; OLIVEIRA, K. G. ; BAILAO, A. M. ; FIACCADORI, F. S. ; DUARTE, G. R. M. . Detecção do Vírus Dengue por RT-LAMP em Dispositivos Descartáveis de Poliéster-Toner (PeT). In: Reunião anual da SBQ, Goiânia. 39a. Reunião Anual da SBQ, 2016. v. 39. 2016.

OLIVEIRA, K. G.; BORBA, J. C. ; BAILAO, A. M. ; CARRILHO, E. ; DUARTE, G. R. M. . Detecção de Escherichia coli através da amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) em microchip de poliéster-toner (PeT). In: 55° Congresso Brasileiro de Química, 2015, Goiânia. 55° Congresso Brasileiro de Química, 2015.

OLIVEIRA, K. G.; BORBA, J. C. ; BAILAO, A. M. ; CARRILHO, E. ; DUARTE, G. R. M. . Detecção da bactéria E.coli pela amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (lamp) em microchip de poliéster-toner. In: I Workshop da Pós-Graduação em Química, 2015, Goiânia. I Workshop da Pós-Graduação em Química, 2015.

3.4 Produção de processos ou técnicas

DUARTE, G. R. M; ESTRELA, P. F. N; OLIVEIRA, K. G; MENDES, G. M; SILVA, L. C; SOUZA JÚNIOR, M. N; DOS SANTOS, C. A; SILVEIRA-LACERDA, E. P. (2021). Transferência tecnológica do protocolo UFG RT-LAMP para diagnóstico molecular da COVID-19.

3.5 Prêmios

1° lugar - Melhor apresentação Oral, XXII Congresso Brasileiro de Infectologia.

Certificado de Reconhecimento Consuni UFG pelo trabalho desenvolvido na pandemia da covid-19 e desenvolvimento de teste RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2. Conselho Universitário da Universidade Federal de Goiás.

Prêmio de Melhor Trabalho na 39a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- Área: Química Analítica, Sociedade Brasileira de Química, 2016.

Prêmio de melhor poster, premiação SBQ regional centro-oeste no 19° Encontro Nacional de Química Analítica, Secretaria Regional de Goiás da Sociedade Brasileira de Química. 2018.

Artigo na Capa do Periódico Analyst, v. 146, n. 4, p.1178-1187, 2021.

Artigo na Capa do Periódico **Analytical Methods**, v. 13, n. 26, p. 2891-3004, 2021.

Artigo na Capa do Periódico **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 11, 2071, 2021.

3.6 Textos em jornais de notícias/revistas

1.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, G. M. ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisa apoiada pelo Governo de Goiás desenvolve teste molecular rápido para Covid-19 em microchip. FAPEG.

2.DUARTE, G. R. M.; MENDES, GEOVANA DE MELO ; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve teste para Covid-19 usando chip de baixo custo. Adufg.

3.DUARTE, GABRIELA R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve teste molecular rápido para COVID-19 em microchips. Jornal UFG.

4.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Cientistas de Goiás desenvolvem teste de Covid-19 mais eficiente que PCR. GALILEU.

5.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Conheça o teste molecular rápido para Covid-19 desenvolvido pela UFG. PROIFES.

6.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve teste para coronavírus usando chip de baixo custo e brinquedo. G1.

7.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisa da UFG desenvolve chip que pode detectar a Covid-19 mais rápido. Bom Dia GO.

8.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG cria teste mais rápido e barato para detectar vírus da Covid-19. JA 1° Edição.

9.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve chip que detecta se pessoa tem coronavírus. JA 2° Edição.

10.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . COVID-19: UFG DESENVOLVE TESTE SIMPLES E BARATO. Record TV Goiás.

11. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisadores da UFG desenvolvem chip de baixo custo para detectar coronavírus. TV Serra Dourada.

12. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Equipe de químicos e biólogos desenvolve teste rápido para COVID-19. CFQ.

13.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Hospital das Clínicas adota teste bom e barato da UFG para Covid-19. O popular.

14.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Hospital das Clínicas adota teste de Covid-19 desenvolvido pela UFG. Adufg. 15.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . HC-UFG aplica teste molecular rápido para Covid-19 desenvolvido na universidade. Jornal UFG.

16.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, PAULO FELIPE NEVES . Hospital da Rede Ebserh/MEC de Goiânia testa exame que detecta coronavírus em apenas uma hora. Ministério da Educação.

17. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG assina contratos de transferência tecnológica do teste RT-LAMP. Governo de Goiás.

18.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG lança edital de transferência tecnológica do teste RT-LAMP. Jornal UFG.

19.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Fundação Tiradentes Assina Contrato para Transferência de Tecnologia com UFG. Fundação Tiradentes.

20.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisa da UFG mostra alta concentração de coronavírus em esgoto de Goiânia. O popular.

21.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisadoras da UFG monitoram covid-19 no esgoto de Goiânia. FAPEG.

22.DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisadoras da UFG monitoram covid-19 no esgoto de Goiânia. Jornal UFG.

23. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG usa esgoto como ferramenta para monitorar avanço da Covid em Goiânia. Bom Dia GO.

24. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES; MENDES, GEOVANA DE MELO; ESTRELA, P. F. N. . UFG realiza testagem para Covid-19 em saliva com teste desenvolvido na universidade. UFG.

25. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG inicia testagem para Covid-19 com método mais barato. O popular.

26. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Multas trabalhistas são revertidas para pesquisa da UFG sobre teste de Covid-19. O popular.

27. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve teste que detecta vírus da covid-19 pela saliva. Mais Goiás.

28. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve teste que detecta covid-19 pela saliva. Diário do Estado.

29. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisadoras da UFG criam teste para a covid-19 mais barato e rápido. Diário de Goiás.

30. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve teste rápido que detecta a Covid-19 pela saliva. O Hoje.

31.DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Novo teste para o Covid-19 é feito na equipe CMTC. CMTC.

32.DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG desenvolve teste rápido que detecta coronavírus pela saliva. G1.

33. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG vai fazer testes de covid-19 em servidores e estudantes. UFG.

34. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . Pesquisa apoiada pelo CNPq e MCTI desenvolve teste rápido, barato e eficiente para detectar a Covid-19. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovações.

35. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, PAULO FELIPE NEVES . UFG testa servidores e estudantes contra a covid-19 na próxima semana. Mais Goiás.

36. DUARTE, GABRIELA R M; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG testa Covid em alunos, professores e servidores; método é próprio. Metrópolis.

37. DUARTE, G. R. M.; DE OLIVEIRA, KEZIA GOMES ; MENDES, GEOVANA DE MELO ; ESTRELA, P. F. N. . UFG lança edital de transferência tecnológica do teste RT-LAMP. FAPEG