



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Desenvolvimento de Genossensores para Detecção do vírus da Hepatite Delta**

**Aluno: Dayane Dotto de Moraes**

**Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Graci Brito-Madurro**

**Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro**

**UBERLÂNDIA - MG  
2024**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Desenvolvimento de Genossensores para Detecção do vírus da Hepatite Delta**

**Aluno: Dayane Dotto de Moraes**

**Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Graci Brito-Madurro**

**Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de  
Doutor em Genética e Bioquímica**

**UBERLÂNDIA - MG  
2024**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M827  
2024  
Moraes, Dayane Dotto de, 1989-  
Desenvolvimento de Genossensores para Detecção do  
virus da Hepatite Delta. [recurso eletrônico] / Dayane  
Dotto de Moraes. - 2024.

Orientador: Ana Graci Brito Madurro.

Coorientador: João Marcos Madurro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.14>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Madurro, Ana Graci Brito, 1967-,  
(Orient.). II. Madurro, João Marcos, 1961-, (Coorient.).  
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação  
em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Desenvolvimento de Genossensores para Detecção do vírus da Hepatite Delta**

**ALUNO: Dayane Dotto de Moraes**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Graci Brito-Madurro

**Examinadores:**

**Dr. Andrés Verck** \_\_\_\_\_

**Dr. Carlos Ueira** \_\_\_\_\_

**Dr.<sup>a</sup> Juliana Daguamo** \_\_\_\_\_

**Dr.<sup>a</sup> Lizandra Borges** \_\_\_\_\_

**Data da Defesa:** \_\_\_\_23\_\_\_\_ / \_\_\_\_01\_\_\_\_ / \_\_\_\_2024\_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da tese foram contempladas

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Graci Brito Madurro



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Bioquímica  
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

|                                    |                                                                                                                                                     |                 |        |                       |       |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Genética e Bioquímica                                                                                                                               |                 |        |                       |       |
| Defesa de:                         | Doutorado Acadêmico - PPGGB                                                                                                                         |                 |        |                       |       |
| Data:                              | Vinte e três de janeiro de 2023                                                                                                                     | Hora de início: | 15:18h | Hora de encerramento: | 19:07 |
| Matrícula do Discente:             | 11923GBI002                                                                                                                                         |                 |        |                       |       |
| Nome do Discente:                  | Dayane Dotto de Moraes                                                                                                                              |                 |        |                       |       |
| Título do Trabalho:                | Desenvolvimento de Genossensores para Detecção do vírus da Hepatite Delta                                                                           |                 |        |                       |       |
| Área de concentração:              | Bioquímica                                                                                                                                          |                 |        |                       |       |
| Linha de pesquisa:                 | Nabiotecnologia                                                                                                                                     |                 |        |                       |       |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas para o diagnóstico molecular e imunológico de Doenças infecciosas e parasitárias humanas e animais. |                 |        |                       |       |

Aos vinte e três dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às 15:18 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Resolução de nº 06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr. Andrés Vercik, Dr<sup>a</sup>. Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano, Dr. Carlos Ueira Vieira, Dr<sup>a</sup>. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges e Dr<sup>a</sup>. Ana Graci Brito Madurro, como presidente da mesa e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dr<sup>a</sup>. Ana Graci Brito Madurro apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidata:

APROVADA.

v



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/01/2024, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lizandra Ferreira de Almeida e Borges, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/01/2024, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Graci Brito Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/01/2024, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrés Vercik, Usuário Externo**, em 23/01/2024, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano, Usuário Externo**, em 24/01/2024, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5073738** e o código CRC **83018FA7**.

**Referência:** Processo nº 23117.091183/2023-57

SEI nº 5073738



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Agradecimentos**

A conclusão desta jornada acadêmica marca um capítulo significativo em minha vida, e gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Primeiramente, expresso minha profunda gratidão a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Graci Brito Madurro cuja orientação, conhecimento e apoio foram fundamentais para a realização deste projeto. Sua dedicação e paciência foram inspiradoras, e sua orientação moldou não apenas o desenvolvimento desta tese, mas também meu crescimento acadêmico e profissional.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela avaliação cuidadosa e valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho. Suas sugestões e insights foram essenciais para aprimorar a qualidade desta pesquisa.

À minha família e amigos, agradeço o constante encorajamento, compreensão e amor. Sua presença ao longo deste percurso foi a luz que iluminou os momentos desafiadores.

Aos colegas de laboratório e colaboradores, agradeço a colaboração e troca de ideias. Suas contribuições foram valiosas para o enriquecimento desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e para o meu desenvolvimento como pesquisadora. Este é um marco significativo que compartilho com todos vocês, lembrando sempre que *"Karma's a relaxing thought"*.

Gostaria de agradecer a todos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pela oportunidade e pelo suporte a este trabalho. E agradeço aos órgãos financiadores deste projeto, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Obrigado.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**RESUMO**

Os biossensores são instrumentos analíticos que permitem identificar interações moleculares ao converterem-nas em sinais elétricos detectáveis. Estes dispositivos combinam componentes biológicos, tais como enzimas, DNA, RNA, células e oligonucleotídeos, com transdutores como eletroquímicos, ópticos, piezelétricos e calorimétricos.

Sua principal característica reside na habilidade de traduzir interações bioquímicas em sinais elétricos mensuráveis, sendo projetados para monitorar minuciosamente pequenas variações durante processos biológicos, como interações entre diversas biomoléculas. Na área da saúde, são empregados na detecção precisa de patógenos, tumores, toxinas e biomarcadores, contribuindo para diagnósticos precoces de diferentes condições.

Os biossensores se destacam devido ao baixo custo de produção, rápida resposta, portabilidade, capacidade de quantificação em escalas reduzidas, alta especificidade e sensibilidade. Nesse contexto, a tese de doutorado em questão objetivou desenvolver genossensores eletroquímicos e óptico/colorimétricos para detectar o vírus da hepatite delta.

O reconhecimento de RNA genômico específico através de detecção indireta foi avaliado utilizando Voltametria Diferencial de Pulso (DPV), Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e docking molecular. O genossensor demonstrou eficácia na detecção de RNA genômico, com uma faixa linear de 9 cópias mL<sup>-1</sup> a 3 x 10<sup>6</sup> cópias mL<sup>-1</sup>, e um limite de detecção de 9 cópias mL<sup>-1</sup>, superior ao método padrão de detecção, que apresenta um limite de 10 cópias mL<sup>-1</sup>, conforme o método de referência (PCR em tempo real). A análise EIS revelou que a corrente de resistência do genossensor aumentou exponencialmente com a concentração do alvo de RNA genômico.

**Palavras chaves:** hepatite delta, diagnóstico, genossensor, alaranjado de metila, biossensor óptico e colorimétrico.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ABSTRACT**

Biosensors are analytical instruments that allow identifying molecular interactions by converting them into detectable electrical signals. These devices contain biological components, such as enzymes, DNA, RNA, cells and oligonucleotides, with transducers such as electrochemical, optical, piezoelectric and calorimetric.

Its main characteristic lies in its ability to translate biochemical interactions into measurable electrical signals, being designed to meticulously monitor small variations during biological processes, such as interactions between different biomolecules. In the health sector, they are used in the precise detection of pathogens, tumors, toxins and biomarkers, contributing to early diagnosis of different conditions.

Biosensors stand out due to their low production cost, speed of response, portability, ability to quantify on small scales, high specificity and sensitivity. In this context, the doctoral thesis in question aimed to develop electrochemical and optical/colorimetric genosensors to detect the hepatitis delta virus.

The recognition of specific genomic RNA through indirect detection was evaluated using Differential Pulse Voltammetry (DPV), Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), Scanning Electron Microscopy (SEM) and molecular docking. The genosensor demonstrated effectiveness in detecting genomic RNA, with a linear range from 9 cylindrical mL<sup>-1</sup> to 3 x 10<sup>6</sup> cylindrical mL<sup>-1</sup>, and a detection limit of 9 cylindrical mL<sup>-1</sup>, superior to the standard detection method, which presents a limit of 10 copies mL<sup>-1</sup>, according to the reference method (real-time PCR). EIS analysis revealed that the resistance current of the genosensor increased exponentially with the concentration of the genomic RNA target.

**Key words:** delta hepatitis, diagnosis, genosensor, methyl orange, optical and colorimetric biosensor.

## Sumário

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Apresentação.....</b>                                         | <b>1</b>  |
| <b>Capítulo I - <i>Fundamentação Teórica</i>.....</b>            | <b>2</b>  |
| 1. Hepatite Delta.....                                           | 3         |
| 2. Estrutura viral e virologia.....                              | 4         |
| 3. Epidemiologia do HDV no Brasil.....                           | 6         |
| 4. Infecção por HDV.....                                         | 7         |
| 5. Tratamento e Diagnóstico .....                                | 9         |
| 6. Biossensores .....                                            | 10        |
| 7. Etilenodiamina, Brometo de etídio e Alaranjado de metila..... | 22        |
| 8.Referências .....                                              | 25        |
| <b>Capítulo II- <i>Artigo científico</i>.....</b>                | <b>34</b> |
| <b>Highlights.....</b>                                           | <b>35</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                             | <b>36</b> |
| 1. Introduction .....                                            | 36        |
| 2. Material and method.....                                      | 38        |
| 3. Results and discussion .....                                  | 42        |
| 4. Conclusion.....                                               | 51        |
| 5. References .....                                              | 51        |
| <b>Capítulo III – Patente BR 10 2021 007300 4 .....</b>          | <b>59</b> |
| <b>Campo da Invenção.....</b>                                    | <b>60</b> |
| <b>Descrição e detalhamento dos componentes da invenção.....</b> | <b>63</b> |
| <b>Exemplos de preparo .....</b>                                 | <b>66</b> |
| <b>Descrição das figuras .....</b>                               | <b>72</b> |
| <b>REIVINDICAÇÕES .....</b>                                      | <b>76</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                               | <b>86</b> |

## **Apresentação**

Os biossensores são dispositivos analíticos que possibilitam a detecção de interações moleculares, convertendo-as em sinais elétricos detectáveis. Esses dispositivos envolvem a combinação de elementos biológicos, como enzimas, DNA, RNA, células e oligonucleotídeos, com transdutores, como eletroquímicos, ópticos, piezelétricos e calorimétricos.

A principal característica dos biossensores é sua capacidade de converter interações bioquímicas em sinais elétricos detectáveis e quantificáveis. Esses dispositivos são desenvolvidos para analisar eficientemente pequenas mudanças que ocorrem durante processos biológicos, como as interações entre diversas biomoléculas. Na área da saúde, os biossensores são utilizados para a detecção precisa de patógenos, tumores, toxinas e biomarcadores, visando identificar precocemente diversos distúrbios.

Os biossensores ganharam destaque devido ao baixo custo de fabricação, rápida resposta, portabilidade, capacidade de quantificação em escalas diminutas, alta especificidade e sensibilidade. Nesse contexto, a presente tese de doutorado teve como objetivo o desenvolvimento de genossensores eletroquímicos e óptico/colorimétricos para a detecção do vírus da hepatite delta.

A tese é composta por Capítulo I referente a um referencial teórico e dois capítulos principais. O Capítulo II apresenta um genossensor para a detecção eletroquímica específica para o vírus da hepatite delta, enquanto o Capítulo III aborda um genossensor colorimétrico/óptico para a detecção do RNA do vírus da hepatite delta.

## **Capítulo I - *Fundamentação Teórica***

## 1. Hepatite Delta

A hepatite viral, representa um desafio significativo à saúde pública global. Em 2016, a Organização Mundial da Saúde introduziu uma estratégia com o objetivo de erradicar a hepatite viral até 2030, com foco principal nas infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) e pelo vírus da hepatite C (HCV) (THOMAS, 2019). É importante notar que, embora aproximadamente 240 a 350 milhões de pessoas vivam com infecção crônica pelo HBV (BASNAYAKE; EASTERBROOK, 2016; RAZAVI-SHEARER et al., 2018; SORIANO et al., 2023), a coinfeção do vírus da hepatite delta (HDV) com o HBV leva a formas mais graves de hepatites virais agudas e crônicas (MIAO et al., 2020). Esta coinfeção contribui significativamente para condições como cirrose associada à hepatite viral, carcinoma hepatocelular e aumento das taxas de mortalidade (ALFAIATE et al., 2020; SORIANO et al., 2023). Portanto, é crucial aumentar a conscientização e realizar pesquisas para desenvolver estratégias específicas a fim de prevenir e controlar a infecção pelo HDV.

Na década de 1970, o HDV foi inicialmente identificado tanto em biópsias hepáticas quanto no soro de pacientes crônicos, os quais estavam infectados pelo HBV e sofriam de hepatite grave (HUGHES; WEDEMEYER; HARRISON, 2011; MARTINI et al., 2022). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus categorizou o HDV como o membro protótipo da família Deltaviridae, representando o gênero Delta vírus. Mais recentemente, os vírus adicionais do tipo HDV, conhecidos como vírus delta, foram encontrados em uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo pássaros, cobras, roedores, veados de cauda branca, marmotas orientais, peixes, anfíbios e até invertebrados. Esta descoberta sugere fortemente que o HDV tem uma história evolutiva muito mais longa do que se pensava anteriormente, embora a origem exata do HDV permaneça incerta (SPAAN et al., 2020).

Para a propagação do HDV, o HBV foi considerado como auxiliar exclusivo. No entanto, uma série de experimentos *in vitro* demonstraram que as ribonucleoproteínas do HDV poderiam ser artificialmente empacotadas em envelopes de vários vírus não relacionados ao HBV, como por exemplo o

hepacivírus, flavivírus e vesiculovírus, permitindo a saída das ribonucleoproteínas de HDV das células infectadas e subsequente entrando outras em linhagens celulares, expressando seus respectivos receptores (CHEMIN et al., 2021; LEMPP; NI; URBAN, 2016; LUCIFORA; DELPHIN, 2020; PARASKEVOPOULOU et al., 2020; PEREZ-VARGAS et al., 2019; ZHANG; URBAN, 2021). De fato, em camundongos humanizados, a monoinfecção por HDV pode persistir intra-hepaticamente por pelo menos 6 semanas na ausência de HBV, e partículas infecciosas do HDV podem ser liberadas após superinfecção com o HBV (GIERSCH et al., 2017). Desse modo, o avanço na compreensão da virologia do HDV teria um grande impacto no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Atualmente estima-se que o HDV infecte entre 10 e 20 milhões de indivíduos em todo o mundo (STOCKDALE et al., 2020). A hepatite Delta crônica resultante da infecção por HDV apresenta-se como a forma mais grave de hepatite virais e é caracterizada por um risco aumentado de cirrose, descompensação hepática e carcinoma hepatocelular. A infecção por VHD ocorre por exposição parenteral e é considerada coinfeção quando ocorre na fase primária ou aguda da infecção por VHB e superinfecção quando ocorre nos quadros de hepatite B crônica (KOFFAS; MAK; KENNEDY, 2023).

Os casos de hepatites causadas por HDV associado ao VHB representam um grave problema de saúde pública em todo o mundo, gerando demandas contínuas aos serviços de saúde, além de perdas consideráveis na qualidade de vida dos pacientes infectados, apresentando também elevados indicadores de mortalidade (CRISPIM et al., 2014; KOFFAS; MAK; KENNEDY, 2023).

## **2. Estrutura viral e virologia**

A estrutura genômica do HDV consiste em uma partícula esférica com aproximadamente 36 nm de diâmetro. Sua porção mais externa é composta por um envelope bilipídico, constituído por três proteínas (pequena, média e longa). O nucleocapsídeo é composto por uma molécula de RNA circular de fita simples, em formato de "bastonete", contendo cerca de 1.679 pares de bases (pb). Além

disso, o RNA viral é uma ribozima, ou seja, uma molécula de ácido nucleico com capacidade catalítica (HUGHES; WEDEMEYER; HARRISON, 2011).

O VHD apresenta um único *open reading frame* (ORF) que codifica a proteína do antígeno delta HDAg. Essa proteína é formada por duas variantes, uma curta (short) chamada de HDAg -S e outra longa (long) denominada HDAg -L, com pesos moleculares de 24 e 27 kilodaltons (KDa), respectivamente, como demonstra na Fig. 01. A forma curta é utilizada durante o processo de replicação, enquanto a forma longa atua inibindo a replicação e facilitando o envelopamento do RNA (HUGHES; WEDEMEYER; HARRISON, 2011)).

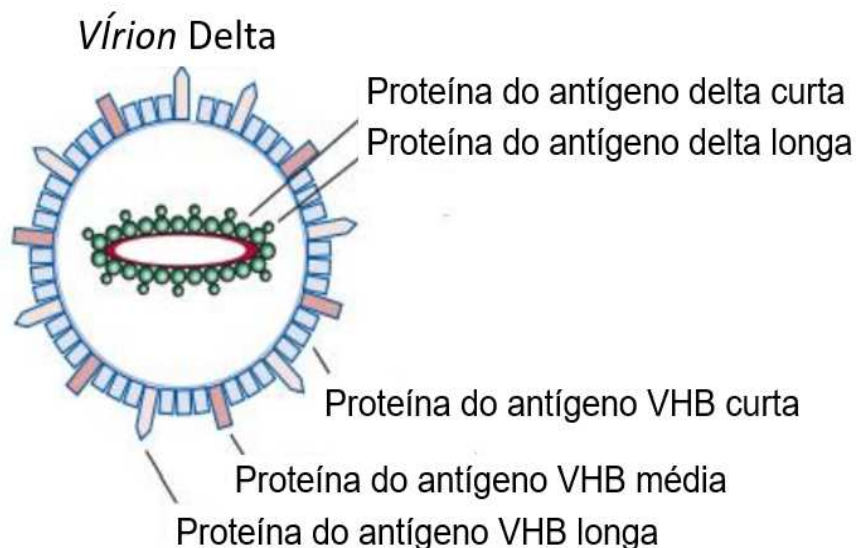


Fig. 01 - Esquema que demonstra a estrutura da partícula do vírus da hepatite D (VHD). Observa-se as seguintes proteínas: proteína do antígeno delta curta; proteína do antígeno delta longa; proteína do antígeno VHB curta; proteína do antígeno VHB média e proteína do antígeno VHB longa. Fonte (HUGHES; WEDEMEYER; HARRISON, 2011).

O HDV é um vírus RNA “satélite” o qual não possui uma camada protéica externa e se replica apenas nos hepatócitos. Um *vírion* HDV funcional contém um complexo de ribonucleoproteína, RNA de HDV complexado com o antígeno da hepatite D (HDAg), que existe em duas formas, os antígenos pequenos (S-

HDVAg) e grande (L-HDAG), encapsulados por um envelope de proteína do antígeno do VHB (HBsAg), como observado na Fig. 01. O HDV não codifica sua própria polimerase, contudo usa a RNA polimerase II do hepatócito hospedeiro (LAI, 2005). O HDV também contém um RNA antigênico, que é uma cópia complementar do RNA genômico (TAYLOR, 2012).

Os *víriões* do HDV ligam-se e entram nos hepatócitos da mesma maneira que o HBV. Uma vez dentro do hepatócito, o genoma do HDV é replicado. Dois antígenos HDV são produzidos e um complexo ribonucleoproteico é formado. A replicação pode prosseguir completamente sem o HBV, embora o mesmo deva fornecer um envelope glicoproteico, consistindo de HBsAg, para montagem, liberação e transmissão completas do HDV (LUCIFORA; DELPHIN, 2020; TAYLOR, 2012).

### 3. Epidemiologia do HDV no Brasil

Entre 1999 e 2020, foram registrados no Brasil 4.150 casos confirmados de hepatite D. A predominância desses casos ocorreu na região Norte, representando 74,8% do total de notificações, seguida pelas regiões Sudeste (10,4%), Sul (6,3%), Nordeste (5,3%) e Centro-Oeste (3,2%). Em 2020, foram notificados 70 casos em todo o país, sendo que 36 desses casos (51,4%) foram registrados na região Norte, como observado na Fig. 02 (BRASIL, 2021).

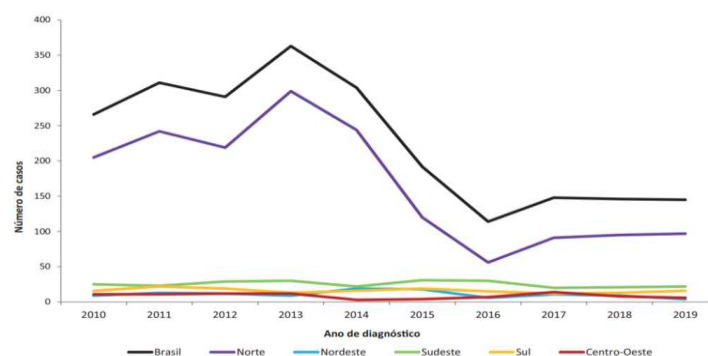


Fig. 02 - Gráfico sobre a incidência de casos reportados de HDV no Brasil, no período de 2010 até 2020. Fonte BRASIL, 2021.

A análise da série histórica revela que a maioria dos casos de hepatite Delta ocorreu em homens (58,3%). Nos últimos dez anos, houve um aumento na razão de sexos, passando de 13 homens para cada dez mulheres em 2010 para 17 homens por dez mulheres em 2020. A distribuição etária indicou uma prevalência mais significativa entre a população mais jovem, com mais da metade dos casos (50,8%) concentrada entre os 20 e 39 anos. Em contraste, a incidência caiu para 17,0% na faixa etária acima de 50 anos. Ao longo da série histórica, 61,9% dos indivíduos autodeclararam-se pretos ou pardos, sendo 57,0% pardos e 4,9% pretos, seguidos de 16,8% brancos, 7,0% indígenas e 1,4% amarelos. Essa distribuição se manteve consistente na estratificação por sexos (BRASIL, 2021).

No que diz respeito à classificação clínica, a forma crônica representou a maioria dos casos notificados de hepatite D (76,7%), refletindo padrões semelhantes observados nas hepatites B e C. A forma aguda abrangeu 18,1% dos casos, enquanto a forma fulminante foi registrada em 0,5% dos casos (BRASIL, 2021). Apesar da baixa prevalência do VHD em regiões não endêmicas, a infecção permanece como uma preocupação significativa no norte do país, destacando a importância da implementação de um programa de vigilância epidemiológica contínua em nível nacional, abrangendo todas as regiões do Brasil (LAGO et al., 2018).

#### **4. Infecção por HDV**

A infecção pelo Vírus da Hepatite Delta (VHD) é condicionada pela presença prévia da infecção pelo Vírus da Hepatite B (VHB). Quando a infecção pelo VHD ocorre simultaneamente com a infecção pelo VHB, é chamada de coinfeção. Se uma pessoa já cronicamente infectada com o VHB é posteriormente infectada pelo VHD, ocorre o fenômeno conhecido como superinfecção (ALVARADO-MORA et al., 2013).

A consequência da coinfeção é um estado agudo de hepatite B e D. O tempo de incubação depende da quantidade inicial de vírus inoculada, sendo que geralmente a coinfeção é autolimitada. Menos de 5% das pessoas coinfectadas desenvolvem a forma crônica da doença. Os sintomas surgem

entre três e sete dias após a infecção e incluem fadiga, anorexia, náuseas, icterícia e inchaço (Fig. 03). Durante esse período, os níveis de transaminases sofrem alterações. Para os pacientes que não desenvolvem a forma crônica, os sintomas clínicos desaparecem após esse intervalo de tempo. Já a superinfecção provoca uma hepatite aguda grave, com um curto período de incubação, resultando na cronificação da hepatite D em 80% dos casos (ALVARADO-MORA, 2013).



Fig. 03 - Fotografias representativas dos sintomas da infecção por HDV.  
Fonte: ALVARADO-MORA, 2013

A superinfecção é associada a casos de hepatite fulminante e a hepatite crônica severa, frequentemente evoluindo para cirrose hepática. A hepatite D crônica, normalmente, inicia-se com um quadro clínico semelhante ao da infecção aguda. Os sintomas clínicos são mais leves que na doença aguda, enquanto os níveis de transaminases sofrem elevação. Na hepatite D crônica, os marcadores do VHB podem ser inibidos. A evolução para cirrose costuma ocorrer em um período de dois anos após a infecção e, aproximadamente, 70% dos pacientes crônicos desenvolvem essa condição.

As complicações da hepatite D são mais graves que uma pessoa infectada somente com hepatite B. De fato, a hepatite D acelera o surgimento dos sintomas da hepatite B, o que provoca o desenvolvimento rapidamente as doenças prejudiciais ao fígado, como a cirrose e a insuficiência hepática (LAZARUS et al., 2023).

## 5. Tratamento e Diagnóstico

O tratamento da hepatite delta crônica não apresentou avanços significativos desde a década de 1980 até recentemente. Pacientes com essa condição foram submetidos a tratamentos com interferon-alfa (IFN $\alpha$ ) ou interferon-alfa peguilado (PEG-IFN $\alpha$ ) sem aprovação regulatória. Os objetivos ideais do tratamento antiviral para a hepatite delta crônica incluem a erradicação tanto o HDV quanto do HBV, visando prevenir as sequelas a longo prazo da infecção. O objetivo ideal seria atingir a depuração ou seroconversão do antígeno de superfície do HBV (HBsAg), algo raramente alcançado com os tratamentos atuais.

Atualmente, o objetivo realizável da terapia para hepatite delta é suprimir a replicação do HDV. Quando isso é bem-sucedido, os níveis de alanina aminotransferase (ALT) tendem a normalizar, e a inflamação e necrose hepáticas diminuem (FARCI et al., 1994). No entanto, a indetectabilidade do RNA do HDV é alcançada em apenas 23% a 57% dos pacientes tratados com IFN- $\alpha$  (ABBAS et al., 2011; CASTELNAU et al., 2006; WEDEMEYER; MANNIS, 2010), e esse benefício muitas vezes não é sustentado, mesmo quando o RNA do HDV permanece indetectável 24 semanas após a conclusão do tratamento (FARCI et al., 1994; CASTELNAU et al., 2006; WEDEMEYER et al., 2011).

A replicação do HDV é monitorada regularmente através da avaliação do RNA sérico do HDV. Se o DNA do VHB também estiver detectável, é aconselhável considerar a terapia antiviral com um análogo de nucleosídeo, embora o interferon também apresente uma eficácia modesta contra o VHB. Por outro lado, os análogos de nucleosídeo não demonstram eficácia contra a infecção por HDV. A orientação da Associação Americana para Estudo das Doenças do Fígado (AASLD) recomenda o uso de entecavir, tenofovir disoproxil fumarato ou tenofovir alafenamida para suprimir a replicação simultânea do VHB, sendo uma abordagem para tratar pacientes com hepatite D crônica que apresentam elevados níveis de DNA do VHB (TERRAULT et al., 2018). Recomenda-se o tratamento de todos os pacientes com DNA do VHB positivo, independentemente do nível.

Dada a seriedade da hepatite delta (HDV) e a potencial influência nos resultados, os autores sugerem que todos os pacientes que testam positivo para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) sejam submetidos a exames para detectar anticorpos IgG anti-HDV. Da mesma forma, é recomendado que todos os pacientes recentemente diagnosticados com resultado positivo para o HBsAg sejam submetidos a triagem reflexiva para anti-HDV total por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) e RT-PCT.

É crucial destacar que os ensaios sorológicos tradicionais (ELISA) e os ensaios moleculares (RT-PCR) apresentam desafios significativos, como a necessidade de grandes quantidades de reagentes, mão de obra altamente qualificada, equipamentos dispendiosos e manutenção de alto custo. Além disso, esses testes são demorados, inviabilizando sua aplicação eficiente. Como também, eles podem ser invasivos e desconfortáveis para os pacientes. Portanto, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos alternativos que sejam rápidos, compreensíveis, acessíveis, sensíveis, seletivos e de baixo custo para possibilitar a detecção precoce e o monitoramento em tempo real da doença. Vale ressaltar que a detecção do Vírus da Hepatite Delta (VHD) no plasma pode ser crucial para o sucesso do tratamento médico.

Os sensores biológicos, também conhecidos como biossensores, têm despertado grande atenção devido às suas características distintivas, como sensibilidade, tempo de resposta reduzido e custo acessível. Esses biossensores têm sido aplicados em diversas áreas, incluindo a indústria farmacêutica (CICHA et al., 2022), monitoramento ambiental (VOON; YUSOP; KHOR, 2022), indústria de alimentos (FLAUZINO et al., 2022) e detecção de doenças (LOMAE et al., 2023). Essa abordagem oferece uma alternativa promissora e inovadora para superar as limitações dos métodos convencionais, tornando possível uma detecção eficiente e acessível da hepatite delta e outros patógenos.

## **6. Biossensores**

Os biossensores, também conhecidos como sensores biológicos, são dispositivos analíticos que incorporam um componente biológico capaz de

identificar seletivamente alvos específicos e gerar um sinal mensurável associado à concentração do analito de interesse (KIMMEL et al., 2012). Segundo a IUPAC, os sensores químicos cujo sistema de reconhecimento inclui moléculas com reações bioquímicas são categorizados como biossensores (THÉVENOT et al., 2001). Estes dispositivos consistem essencialmente em um elemento de reconhecimento (sonda) que identifica o alvo no meio de detecção, um transdutor físico-químico que determina a presença, atividade e concentração do analito de interesse, convertendo esse estímulo em um sinal mensurável (PERUMAL; HASHIM, 2014). Um esquema ilustrativo do funcionamento dos biossensores é mostrado na Fig. 04

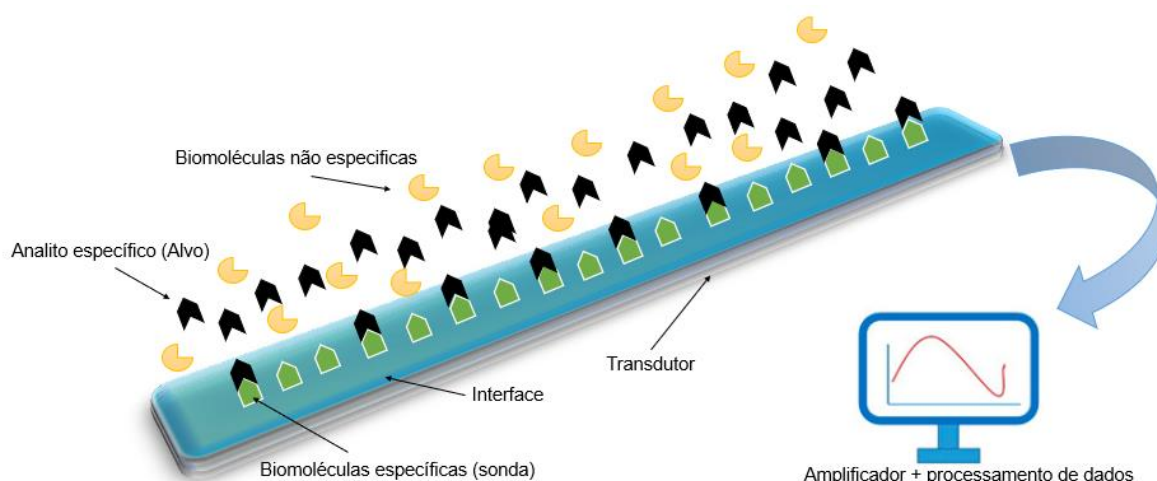


Fig. 04 - Imagem ilustrativa de um sensor biológico (autoria própria)

No século passado, foi desenvolvido o primeiro sensor que monitorava a reação enzimática da oxidação da glicose. Para construir esse sensor, utilizou-se a enzima glicose oxidase em um eletrodo que media a pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ). Na reação, ocorria um consumo de oxigênio proporcional à concentração do substrato. Assim, a variação do  $pO_2$  permitiu determinar a quantidade de glicose nas amostras (CLARK; LYONS, 1962).

Os biossensores têm se mostrado altamente promissores como alternativas às tecnologias analíticas tradicionais, apresentando vantagens em diversas áreas. Na clínica, por exemplo, são capazes de detectar biomarcadores específicos para doenças (CECEN et al., 2023). Na indústria alimentícia, identificam patógenos em alimentos (POPESCU; UNGUREANU, 2023), e no

controle ambiental, monitoram detritos e poluentes (ZAHRA et al., 2023). Essas aplicações visam melhorar a qualidade de vida da população e reduzir custos, graças à metodologia seletiva e precisa dos biossensores.

Ao construir e validar biossensores, busca-se alcançar características analíticas específicas, como tempo de análise em "tempo real", sensibilidade para responder a pequenas concentrações do analito, seletividade para discriminar alvos específicos em uma amostra, reprodutibilidade para fornecer análises confiáveis, precisão para minimizar falsos positivos ou negativos, robustez para resistir a variações ambientais, custos unitários e operacionais baixos para maior aplicabilidade no mercado, tamanho e peso reduzidos para possibilitar a aplicação in-house, e uma interface com o usuário que seja fácil de manusear, não exigindo mão de obra qualificada e permitindo o uso por qualquer pessoa (CRISTINA et al., 2018). Sua capacidade de detecção em tempo real é particularmente desejável na análise clínica e biomédica, permitindo a realização de testes próximos aos pacientes. Além disso, esses biossensores utilizam pequenos volumes de amostra e proporcionam respostas rápidas (ZHANG et al., 2023).

Uma etapa crucial no desenvolvimento de um biossensor é o processo de imobilização das biomoléculas na superfície do eletrodo de trabalho. As técnicas mais frequentemente empregadas incluem adsorção física, aprisionamento, ligação cruzada e ligação covalente. A seleção do método de imobilização é de grande importância, pois pode impactar a estabilidade, tempo de resposta, reprodutibilidade e sensibilidade do biossensor (PUNDIR; DEVI, 2014). Um esquema representativo desse processo é ilustrado na Fig.05.

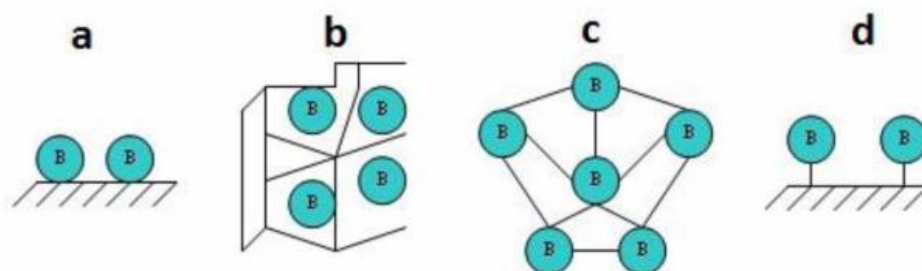


Fig. 05 - Esquema representativo dos tipos mais comuns de imobilização de biomoléculas (B), sendo (A) adsorção física, (B) Aprisionamento, (C) ligação cruzada e (D) ligação covalente (PUNDIR; DEVI, 2014).

Os biossensores são frequentemente classificados com base em diferentes critérios, sendo os mais comuns aqueles relacionados aos métodos de transdução do sinal, que influenciam a sensibilidade do dispositivo, e ao elemento biológico de reconhecimento, que determina a seletividade ou especificidade (MEHTA et al., 2016).

### 6.1 Classificação dos biossensores de acordo com os transdutores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com os métodos de detecção utilizados. Alguns destes são citados nas próximas subseções. Como demonstra a Fig.06.



Fig. 06 - Esquema de diferentes categorias de biossensores: o elemento de reconhecimento biológico e de transdutores (fonte: autoria própria).

### 6.1.1 Biossensores eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos fundamentam-se na produção ou consumo de espécies eletroativas durante interações químicas e biológicas. O transdutor, neste processo, detecta e quantifica o sinal eletroquímico gerado por essa interação (LIU-NA WEI et al., 2023). Por meio de técnicas eletroquímicas, é possível analisar relações diretas entre a concentração do analito e propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga, sendo amplamente aplicadas na quantificação de espécies de interesse em diversas áreas de estudo (ZHANG, X. et al., 2023).

Os biossensores eletroquímicos são dispositivos que exploram propriedades elétricas (resistência, corrente, potencial, capacitância, impedância), sendo detectadas e medidas por métodos como potenciometria, condutometria, amperometria ou voltametria (LIU-NA WEI et al., 2023). A técnica de voltametria foi pioneiramente desenvolvida por Jaroslav Heyrovsky em 1922, resultando no Prêmio Nobel de Química em 1959 (NOBEL PRIZE, 2023). No contexto da voltametria, a corrente é medida enquanto o potencial é variado em uma faixa definida. O voltamograma, representando a corrente versus potencial, fornece informações sobre a reação química, com a posição da corrente de pico vinculada à substância específica, sendo os valores de corrente de pico proporcionais à concentração da espécie correspondente (LIU-NA WEI et al., 2023).

Na voltametria, um potencial é aplicado a um eletrodo de trabalho, alterando seu potencial em relação a um eletrodo de referência. A corrente resultante flui entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar, sendo medida em função do potencial (CHENG, T., ZHANG, W., YANG. 2022). Na Figura 07, o eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação de interesse (redução ou oxidação), e os principais tipos de eletrodos de trabalho incluem ouro, carbono vítreo, pasta de carbono, grafite, platina, prata, etc. O eletrodo de referência tem um potencial conhecido, usado para estabelecer o potencial constante em uma célula eletroquímica, enquanto o eletrodo auxiliar completa o circuito elétrico, sendo composto por materiais inertes como platina, ouro, grafite ou carbono vítreo (WHITTINGHAM et al., 2021).

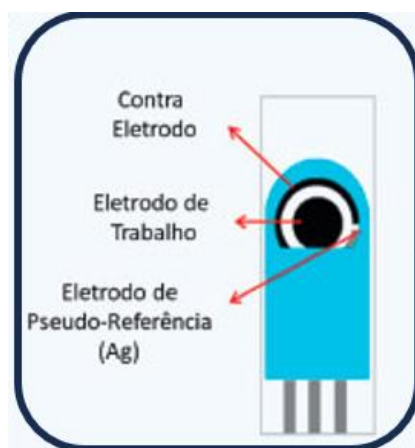


Figura 07 - A célula eletroquímica de três compartimentos é representada com eletrodos posicionados estrategicamente, destacando entradas e saídas de gás nitrogênio e o capilar de Luggin para aproximação dos eletrodos. Métodos voltamétricos, como voltametria de varredura linear e cíclica, pulso diferencial, entre outros, são mencionados. A escolha do método depende da informação desejada sobre o analito ou processo. Isso permite uma análise precisa das características eletroquímicas do sistema (Fonte: autoria própria; LIU et al., 2022). (ZHU et al., 2022).

Neste estudo, foi utilizado as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial como mostrada na Fig. 08.

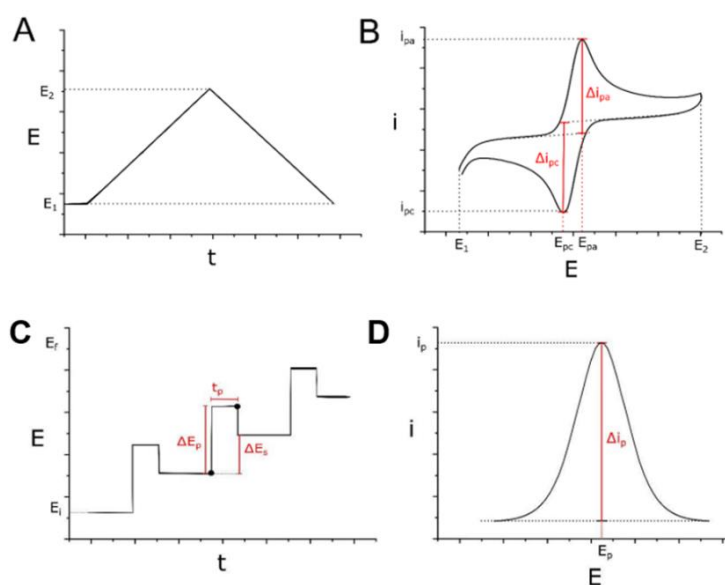


Fig. 08 - As representações gráficas da voltametria cíclica são essenciais para entender o comportamento eletroquímico de um sistema. Em (A), temos um

gráfico de potencial em função do tempo, onde cada ciclo varia o potencial de E1 a E2 e retorna a E1. Em (B), apresenta-se o voltamograma cíclico, mostrando a corrente elétrica em função do potencial. Nesse contexto, é possível identificar picos de oxidação e redução, sendo E o potencial elétrico, i a corrente elétrica, Epc o potencial de pico catódico, Epa o potencial de pico anódico, ipc a corrente de pico catódico e ipa a corrente de pico anódico. O delta ( $\Delta$ ) representa a variação de corrente de pico, obtida pela subtração da corrente de pico pela corrente na base do pico. Nos gráficos C e D, temos representações gráficas da voltametria de pulso diferencial. Em (C), observa-se um gráfico de potencial em função do tempo, onde pulsos periódicos de potencial são aplicados, e os pontos destacados representam a amostragem de corrente para um pulso. Em (D), o voltamograma de pulso diferencial mostra a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar um pico de oxidação. E representa o potencial elétrico, i é a corrente elétrica,  $\Delta E_p$  é a variação de potencial de pulso,  $\Delta E_s$  é a variação de potencial de amostragem,  $t_p$  é o período de pulso, e  $\Delta i_p$  é a variação de corrente de pico. Essas representações gráficas fornecem informações cruciais sobre as características eletroquímicas do sistema em estudo. (Adaptado de LIU *et al.*, 2022).

Na Figura 8A, o potencial inicial (E1) aplicado varia linearmente em uma direção até atingir o potencial final (E2); em seguida, a direção da varredura é invertida, e o potencial retorna ao valor inicial (E1), resultando em um voltamograma que forma uma curva fechada. Nesse contexto, na presença de compostos eletroativos, podem ser identificados picos de oxidação, caracterizados por um potencial de pico anódico (Epa) e uma corrente de pico anódico (ipa) específicos; e/ou picos de redução, identificados por um potencial de pico catódico (Epc) e uma corrente de pico catódico (ipc) específicos, conforme mostrado na Figura 8B. Em relação às correntes de pico, é possível realizar a subtração da corrente na base do pico, resultando na variação de corrente de picos anódico e catódico ( $\Delta i_{pa}$  e  $\Delta i_{pc}$ ) (LIU *et al.*, 2022).

A voltametria de pulso diferencial (Figura 8C e 8D) é um método no qual pulsos de amplitude fixa, sobrepostos a uma rampa de potencial crescente, são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes: uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso. A primeira corrente é subtraída

instrumentalmente da segunda, e a diferença das correntes é plotada em função do potencial aplicado. Dessa forma, o voltamograma resultante exibe picos de corrente com formato gaussiano, e a área sob esses picos é diretamente proporcional à concentração do analito (LIU et al., 2022; MANRING et al., 2022).

### **6.1.2 Biossensores ópticos**

Em sensores ópticos, a luz desempenha um papel crucial na determinação da reação bioquímica que ocorre na superfície do eletrodo. O sensor pode analisar a luz que é absorvida ou emitida, assim como sua refração devido à reação biológica entre a sonda e o analito alvo (PAHURKAR et al., 2015). Uma técnica amplamente utilizada é a ressonância plasmônica de superfície (SPR), que envolve a interação entre fótons incidentes e plásmons de superfície. A proposta de Kretschmann-Raether e Otto é a mais empregada até hoje, utilizando um prisma óptico para acoplar os feixes luminosos de entrada à interface metal-dielétrico (CHOI et al., 2015).

Quando um feixe luminoso incide no substrato óptico com um ângulo  $\theta$ , ocorre o fenômeno de reflexão interna total. Em uma situação ideal, toda a energia luminosa incidente deveria ser totalmente refletida. Contudo, como demonstrado por Kretschmann-Raether e Otto, parte ou toda a energia luminosa é absorvida pela interface metal-dielétrico. Nesse cenário, surge o campo elétrico evanescente, e a energia luminosa transmitida interage com as ondas de plásmons de superfície, caracterizando o fenômeno SPR. A refletividade (parâmetro que indica a quantidade de luz refletida) do feixe luminoso de entrada é reduzida, resultando em um mínimo de refletividade observado no detector óptico. Nesse estado, ocorre a ressonância dos plásmons de superfície. A penetração das ondas de plásmons de superfície excitadas é limitada a centenas de nanômetros, dependendo do comprimento da onda luminosa incidente. Portanto, alterações nas propriedades físico-químicas do dielétrico afetam a quantidade de energia luminosa incidente absorvida ou transmitida. Essa alta sensibilidade superficial é um dos atrativos significativos do fenômeno SPR, especialmente em aplicações biológicas (CHOI et al., 2015; SHRIVASTAV; USHA; GUPTA, 2016; TABASSUM; KAUR; GUPTA, 2016).

### **6.1.3 Biossensores piezoelétrico e Biossensores calorimétricos**

Os biossensores piezoelétricos são um tipo específico de biossensor que utiliza materiais piezoelétricos para detecção. A piezeletricidade refere-se à propriedade de certos materiais de gerar uma carga elétrica em resposta a uma deformação mecânica. Nos biossensores piezoelétricos, essa propriedade é explorada para detectar interações biomoleculares.

O princípio de funcionamento desses biossensores envolve a fixação de biomoléculas, como antígenos ou anticorpos, na superfície de um cristal piezoelétrico, geralmente quartzo. Quando ocorre uma ligação entre as biomoléculas na superfície e os analitos no meio de detecção, há uma mudança na massa ou na camada viscoelástica próxima à superfície do cristal. Essa mudança na massa ou nas propriedades viscoelásticas resulta em uma deformação mecânica do cristal piezoelétrico (HUANG et al., 2023).

Enquanto os biossensores calorimétricos são sensores biológicos partem do princípio de que toda reação biológica envolve uma diferença de entalpia e, a partir deste fato é possível determinar alterações em um meio por meio da dosagem de temperatura (ZHAO; FENG; GO, 2004).

### **6.1.4 Biossensores colorimétricos**

Os biossensores colorimétricos são dispositivos que utilizam mudanças na cor para indicar a presença ou quantidade de uma substância-alvo. Essa categoria de biossensores é comumente empregada em diversas aplicações, desde diagnósticos clínicos até monitoramento ambiental. O princípio de funcionamento desses biossensores envolve a interação entre um elemento biológico de reconhecimento, como anticorpos ou enzimas, e o analito alvo, o que desencadeia uma resposta colorimétrica mensurável (GENG et al., 2023).

Os principais componentes e características dos biossensores colorimétricos são vários, como por exemplo o elemento Biológico de Reconhecimento, podendo ser um anticorpo, enzima, DNA ou outra biomolécula específica que interage seletivamente com o analito de interesse; como também a transdução de sinal colorimétrica, em que a interação entre o elemento biológico e o analito leva a uma mudança na cor do sistema. Isso pode ocorrer

de várias maneiras, como a produção ou alteração de pigmentos, nanopartículas ou reações químicas que resultam em uma mudança visual; a detecção e quantificação, de modo que na mudança de cor é detectada e quantificada por meio de métodos simples, como observação visual ou técnicas mais avançadas, incluindo o uso de espectrofotometria para análise quantitativa, entre outras. A principal vantagem dos biossensores colorimétricos é devido a sua simplicidade, facilidade de uso, e a capacidade de fornecer resultados visuais, dispensando a necessidade de instrumentação

#### **6.1.5 Biossensores impedimétricos**

Os biossensores impedimétricos fazem uso da impedância eletroquímica como um transdutor eficiente, acessível e não destrutivo para a detecção de eventos bioquímicos na superfície do eletrodo. As alterações na resistência elétrica são refletidas nos valores de impedância, proporcionando uma forma sensível de monitorar tais eventos. Esses eventos podem ser identificados na superfície do eletrodo por meio das propriedades interfaciais eletrodo-solução ou na solução do eletrólito ao monitorar os metabólitos gerados nos processos biológicos (CHENG et al., 2015).

Os biossensores impedimétricos são sistemas que operam sem a necessidade de marcadores, permitindo a detecção direta das reações. Além disso, oferecem benefícios como automação, medidas elétricas simplificadas e redução de interferências provenientes da matriz, tornando-os alvo de considerável interesse por parte dos pesquisadores (CHENG et al., 2015; HUSHEGYI et al., 2016; JOHARI-AHAR et al., 2015). A Figura 09 ilustra a representação dos dados impedimétricos pelo diagrama de Nyquist e um modelo de circuito equivalente.

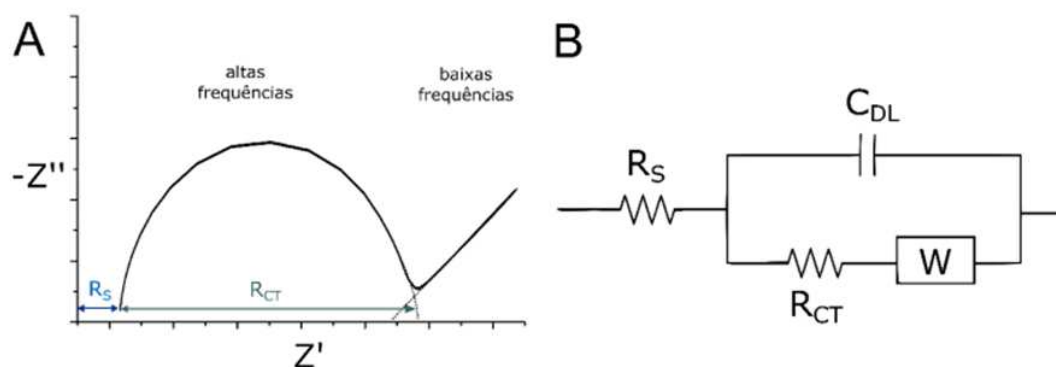


Fig. 09 - Análise eletroquímica através da espectroscopia de impedância. (A) Ilustração do Diagrama de Nyquist, enfatizando as áreas de frequências elevadas e baixas, juntamente com os cálculos dos elementos da impedância. (B) Representação do circuito equivalente utilizado como modelo para interpretar os resultados experimentais.  $R_S$ : Resistência da solução;  $R_{CT}$ : Resistência à transferência de carga; W: Impedância de Warburg;  $C_{DL}$ : Capacitância. (Adaptado de BRETT, C. M. A., 2022).

## 6.2 Biossensores de acordo com o elemento biológico de reconhecimento

### 6.2.1 Genossensores

O ácido desoxirribonucleico, ou DNA, é um polímero orgânico composto por múltiplas unidades de nucleotídeos, desempenhando a função de armazenar e transmitir informações biológicas. Os biossensores que se baseiam nessas biomoléculas, como fragmentos de DNA, produtos de PCR, oligonucleotídeos ou DNA genômico, são denominados genossensores. Esses genossensores têm a capacidade de detectar a presença de genes específicos associados a doenças humanas, como diversos tipos de câncer, analisar sequências genéticas e identificar mutações. São métodos analíticos considerados rápidos, sensíveis e simples, sendo capazes de detectar sequências específicas de genes em volumes reduzidos de amostras, o que tem despertado grande interesse para aplicações em diagnóstico de doenças genéticas, infecciosas e detecção de microrganismos patogênicos (HELI et al., 2016).

Os métodos convencionais para a análise de sequências gênicas específicas baseiam-se no sequenciamento direto e na hibridização do DNA. A hibridização, devido à sua simplicidade, é a técnica mais amplamente utilizada em diagnósticos laboratoriais em comparação com o sequenciamento direto. Neste método, a sequência gênica alvo é identificada por meio de uma sonda de DNA complementar. A hibridização do DNA é altamente eficiente e específica no reconhecimento da fita complementar, mesmo na presença de uma mistura de diferentes ácidos nucleicos não complementares (HUANG et al., 2014).

Os sensores eletroquímicos de DNA são promissores para a análise de ácidos nucleicos devido à sua rápida resposta, alta sensibilidade e baixo custo. A detecção pode ocorrer de forma direta, convertendo a hibridização em um sinal elétrico, ou indireta, utilizando compostos eletroativos que interagem com o DNA, permitindo a detecção de sequências específicas ou o monitoramento da integridade do DNA (BENVIDI et al., 2015). Como exemplo de indicadores eletroativos de hibridização de DNA é a ninidrina, recém-descoberta por GUEDES et al., 2021 (GUEDES et al., 2021).

### **6.2.2 Imunossensores e Sensores enzimáticos**

Um imunossensor é um tipo específico de biossensor que utiliza componentes do sistema imunológico para detecção. Ele é projetado para reconhecer e medir a presença de antígenos ou anticorpos, geralmente por meio de uma reação imunológica específica.

Os imunossensores são frequentemente empregados em aplicações de diagnóstico, detecção de patógenos, análise clínica e monitoramento ambiental. Eles operam com base na interação altamente seletiva entre antígenos e anticorpos, proporcionando uma detecção específica e sensível de substâncias-alvo. Esses dispositivos geralmente envolvem a imobilização de anticorpos em uma superfície, como um eletrodo, que reage seletivamente com o antígeno de interesse. A detecção é frequentemente realizada por meio de técnicas eletroquímicas, ópticas ou impedimétricas, dependendo do design do imunossensor (AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2021).

Os sensores enzimáticos se baseiam nas propriedades catalíticas, seletivas e específicas das enzimas, que desempenham um papel crucial como catalisadores eficazes em diversas reações específicas nos organismos vivos (HASSAN et al., 2021).

A maioria dos sensores enzimáticos utiliza sistemas eletroquímicos amperométricos. Esses biossensores enzimáticos podem ser categorizados em três gerações com base no método de reconhecimento do analito e no processamento do sinal gerado. Dessa forma, os biossensores de Primeira Geração, baseiam-se no monitoramento do produto da reação enzimática ou na eletroatividade do substrato. No entanto, podem ser suscetíveis a interferências devido à necessidade de potenciais mais elevados (HASSAN et al., 2021).

Enquanto os biossensores de Segunda Geração são os desenvolvidos para reduzir os potenciais necessários, esses biossensores utilizam mediadores de elétrons que atuam como transportadores de elétrons entre a enzima e o eletrodo (PUNDIR; DEVI, 2014). E os biossensores de Terceira Geração, concentram-se na transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo, dispensando o uso de mediadores. Essa abordagem promove maior seletividade, uma vez que opera em potenciais mais próximos aos da própria enzima, reduzindo reações interferentes. Além disso, não requerem o uso de outros reagentes na sequência das reações enzimáticas (Figura 8). Um desafio significativo dos biossensores de terceira geração é garantir o transporte eficiente de elétrons entre o centro ativo das enzimas e os eletrodos (ZENG et al., 2009).

## **7. Etilenodiamina, Brometo de etídio e Alaranjado de metila**

A etilenodiamina é uma diamina alifática, o que significa que é uma molécula que contém duas aminas (grupos  $\text{NH}_2$ ) e não apresenta cadeias ramificadas. A sua fórmula química é ( $\text{C}_2\text{N}_8\text{H}_2$ ). Ela é composta por uma cadeia de dois átomos de carbono, cada um ligado a dois átomos de hidrogênio e a uma amina. A presença dessas aminas confere à etilenodiamina propriedades químicas particulares, especialmente em relação à formação de complexos com íons metálicos.

A etilenodiamina é frequentemente utilizada em sínteses químicas, especialmente na produção de polímeros, resinas e adesivos. Ela pode formar ligações cruzadas em polímeros, melhorando suas propriedades mecânicas. Além disso, é um agente complexante eficaz, o que significa que pode se ligar a íons metálicos, influenciando em reações químicas específicas.

A utilização do etilenodiamina na superfície no eletrodo de carbono visa a interação entre a etilenodiamina e o RNA, em que envolve a formação de ligações eletrostáticas entre os grupos amino presentes na etilenodiamina e os grupos fosfato carregados negativamente no esqueleto do DNA.

A etilenodiamina é uma molécula bifuncional, o que significa que possui dois grupos amino adjacentes. Esses grupos amino podem interagir com os grupos fosfato ao longo da fita de DNA por meio de interações eletrostáticas, formando complexos estáveis. Essa interação pode ter implicações práticas em diversas áreas, incluindo biologia molecular e química analítica.

O brometo de etídio (BE) é, de fato, um corante comumente utilizado em biologia molecular para a visualização de ácidos nucleicos, como o DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico). Ele é uma molécula aromática que possui afinidade pela dupla hélice do DNA. A sua aplicação mais comum é em gel de agarose ou poliacrilamida, onde ele se intercala entre as bases do DNA e emite fluorescência quando exposto a luz ultravioleta (OLIVEIRA et al., 2018).

Ao utilizar a técnica de eletroforese em gel, as moléculas de DNA são separadas de acordo com seu tamanho, e o brometo de etídio permite a visualização das bandas de DNA sob a luz ultravioleta. Essa técnica é frequentemente utilizada em análises genéticas, como a determinação de tamanhos de fragmentos de DNA, a identificação de produtos de reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) e a purificação de fragmentos específicos de DNA. A razão pela qual o brometo de etídio é amplamente utilizado reside em sua acessibilidade financeira, na capacidade de intensificar a fluorescência ao se inserir entre os pares de bases da estrutura da dupla hélice do DNA e em sua atividade eletroquímica. Investigações eletroquímicas revelam que o brometo de etídio gera um pico anódico em +0,67 V em relação a Ag /

AgCl, ao empregar eletrodos de grafite (OLIVEIRA et al., 2018; ZHANG et al., 2013).

O alaranjado de metila ( $C_{14}H_{14}N_3O_3SNa$ ) é um corante amplamente utilizado em laboratórios, principalmente em procedimentos de coloração e indicador ácido-base. O alaranjado de metila é um indicador ácido-base. Sua cor varia dependendo do pH do meio. Em soluções ácidas, ele assume uma cor vermelha, enquanto em soluções alcalinas, a cor muda para amarelo. Além de seu uso como indicador, o alaranjado de metila é frequentemente usado em microbiologia para corar células vivas e mortas de maneira distinta (IWUOZOR et al., 2021). Ele também é empregado em técnicas de coloração em biologia celular. O alaranjado de metila não foi explorado como indicador de eletroativo, como também como indicador de hibridização de DNA. As estruturas químicas dos compostos citados são observadas na Fig.10.

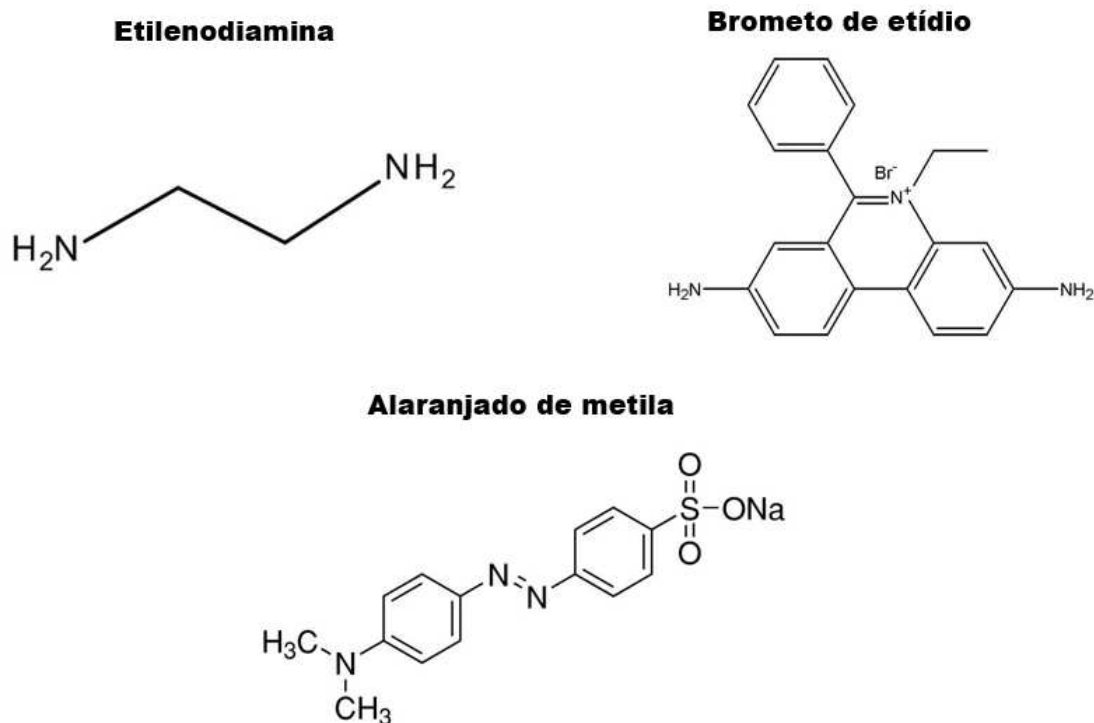


Fig. 10 - Estrutura química do etilenodiamina, brometo de etídio e do alaranjado de metila, ambos utilizados neste trabalho como, respectivamente, monômero na superfície do eletrodo de carbono e como indicador de hibridização de material genético.

Portanto, nesse estudo foi desenvolvido dois genossensores, um óptico/colorimétrico e eletroquímico para a detecção dos ácidos nucleicos do vírus da hepatite delta por meio da imobilização dos oligonucleotídeos em superfície de acetato de celulose e no eletrodo de carbono (*screen-printed*), ambos com a superfície modificados com etilenodiamina, utilizando a detecção indireta como indicadores de hibridização de DNA o brometo de etídio e o novo indicador alaranjado de metila. De modo que tanto o brometo de etídio quanto o alaranjado de metila apresentam em sua estrutura grupamento aminos, os quais possuem alta afinidade pelo material genético (CASTRO et al., 2014; GUEDES, P. H. G. et al., 2021)

## 8. Referências

- ABBAS, Z. et al. Interferon alpha for chronic hepatitis D. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 7 dez. 2011. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006002.pub2>
- ALFAIATE, D. et al. Chronic hepatitis D and hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of Hepatology**, v. 73, n. 3, p. 533–539, set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.02.030>
- ALVARADO-MORA, M. V et al. An Update on Hdv: Virology, Pathogenesis and Treatment. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 3\_part\_2, p. 541–548, 1 abr. 2013. <https://doi.org/10.3851/IMP2598>
- ARDUINI, F. et al. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114–126, maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.032>
- AYDIN, M.; AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Advances in immunosensor technology. In: [s.l: s.n.]. p. 1–62. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.08.001>
- BASNAYAKE, S. K.; EASTERBROOK, P. J. Wide variation in estimates of global prevalence and burden of chronic hepatitis B and C infection cited in published literature. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 23, n. 7, p. 545–559, 30 jul. 2016. <https://doi.org/10.1111/jvh.12519>

BENSABATH, G. Hepatitis Delta Virus Infection and Labrea Hepatitis. **JAMA**, v. 258, n. 4, p. 479, 24 jul. 1987. <https://doi.org/10.1001/jama.1987.03400040077025>

BENVIDI, A. et al. A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 750, p. 57–64, ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.05.002>

BERGNER, L. M. et al. Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 3, 19 jan. 2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019907118>

BRASIL. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais.Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. [s.l: s.n.]. Acessado em:10/01/2024. Acessado em :10/01/2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-deconteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2022-numero-especial/view>.

CASTELNAU, C. et al. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: Relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. **Hepatology**, v. 44, n. 3, p. 728–735, set. 2006. <https://doi.org/10.1002/hep.21325>

CECEN, B. et al. Biosensor integrated brain-on-a-chip platforms: Progress and prospects in clinical translation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 225, p. 115100, abr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115100>

CHEMIN, I. et al. Preliminary Evidence for Hepatitis Delta Virus Exposure in Patients Who Are Apparently Not Infected With Hepatitis B Virus. **Hepatology**, v. 73, n. 2, p. 861–864, 27 fev. 2021. <https://doi.org/10.1002/hep.31453>

CHENG, M. S. et al. Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 74–80, ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.018>

CHOI, S. Y. et al. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation in human adipose-derived mesenchymal stem cells through the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 4383–4392, 2015. <https://doi.org/10.2147/IJN.S78775>

CICERO, M. F. et al. Is Hepatitis Delta infections important in Brazil? **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 525, 29 dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1856-9>

CICHA, I. et al. Biosensor-Integrated Drug Delivery Systems as New Materials for Biomedical Applications. **Biomolecules**, v. 12, n. 9, p. 1198, 29 ago. 2022. <https://doi.org/10.3390/biom12091198>

CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 15 out. 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

CRISPIM, M. A. E. et al. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 94, 21 dez. 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-94>

CRISTINA, A. et al. A new genosensor for meningococcal meningitis diagnosis using biological samples. p. 0–7, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10008-018-3940-0>

DI FILIPPO VILLA, D. et al. Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 172, 24 dez. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0402-5>

FARCI, P. et al. Treatment of Chronic Hepatitis D with Interferon Alfa-2a. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 2, p. 88–94, 13 jan. 1994. <https://doi.org/10.1056/NEJM199401133300202>

FLAUZINO, J. M. R. et al. Application of biosensors for detection of meat species: A short review. **Food Control**, v. 142, p. 109214, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109214>

FONSECA, J. C. F. DA et al. Hepatite fulminante e febre negra de Lábrea: estudo de 5 casos procedentes de Codajás, Amazonas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 16, n. 3, p. 144–147, set. 1983. DOI: 10.1590/S0037-86821983000300004

FONSECA, J. C. F. DA. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade**

**Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322–330, jun. 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S0037-86821983000300004>

GENG, Z. et al. Colorimetric biosensor based on smartphone: State-of-art. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 349, p. 114056, jan. 2023.  
<https://doi.org/10.1016/j.sna.2022.114056>

GIERSCH, K. et al. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 2, p. 460–462, fev. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.034>

GUEDES, P. H. G. et al. Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for *Candida auris*. **Talanta**, v. 235, p. 122694, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>

HASSAN, M. H. et al. Recent Advances in Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Sensing. **Sensors**, v. 21, n. 14, p. 4672, 8 jul. 2021.  
<https://doi.org/10.3390/s21144672>

HELI, H. et al. An electrochemical genosensor for *Leishmania major* detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots. **Talanta**, v. 156–157, p. 172–179, ago. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.065>

HUANG, K.-J. et al. Sub-femtomolar DNA detection based on layered molybdenum disulfide/multi-walled carbon nanotube composites, Au nanoparticle and enzyme multiple signal amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 195–202, maio 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.061>

HUANG, S. et al. Recent development of piezoelectric biosensors for physiological signal detection and machine learning assisted cardiovascular disease diagnosis. **RSC Advances**, v. 13, n. 42, p. 29174–29194, 2023.  
<https://doi.org/10.1039/D3RA05932D>

HUGHES, S. A.; WEDEMEYER, H.; HARRISON, P. M. Hepatitis delta virus. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 73–85, jul. 2011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61931-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61931-9)

HUSHEGYI, A. et al. Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 644–649, maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.102>

IWUOZOR, K. O. et al. Adsorption of methyl orange: A review on adsorbent performance. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, p. 100179, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100179>

JOHARI-AHAR, M. et al. An ultra-sensitive impedimetric immunosensor for detection of the serum oncomarker CA-125 in ovarian cancer patients. **Nanoscale**, v. 7, n. 8, p. 3768–3779, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4NR06687A>

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 17 jan. 2012. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>

KOFFAS, A.; MAK, L.; KENNEDY, P. T. F. Hepatitis delta virus: Disease assessment and stratification. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 30, n. S1, p. 12–21, 4 abr. 2023. <https://doi.org/10.1111/jvh.13777>

LAGO, B. V. et al. Hepatitis D infection in Brazil: Prevalence and geographical distribution of anti-Delta antibody. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 8, p. 1358–1363, ago. 2018. <https://doi.org/10.1002/jmv.25196>

LAI, M. M. C. RNA Replication without RNA-Dependent RNA Polymerase: Surprises from Hepatitis Delta Virus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 7951–7958, jul. 2005. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.7951-7958.2005>

LAZARUS, J. V. et al. Hepatitis delta virus infection prevalence, diagnosis and treatment in the Middle East: A scoping review. **Liver International**, v. 43, n. S1, p. 116–123, 29 ago. 2023. <https://doi.org/10.1111/liv.15338>

LEMPP, F. A.; NI, Y.; URBAN, S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 10, p. 580–589, 18 out. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.126>

LOMAE, A. et al. Label free electrochemical DNA biosensor for COVID-19 diagnosis. **Talanta**, v. 253, p. 123992, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123992>

LUCIFORA, J.; DELPHIN, M. Current knowledge on Hepatitis Delta Virus replication. **Antiviral Research**, v. 179, p. 104812, jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104812>

MARTINI, S. et al. Liver Transplantation in Hepatitis B/Hepatitis D (Delta) Virus Coinfected Recipients. **Transplantation**, v. 106, n. 10, p. 1935-1939, 11 out. 2022.

<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004138>

MATOS;, DE M.; FLÁVIA;, A. M. S. A. DA C. Z. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DA HEPATITE D NO BRASIL NO PERÍODO DE 2010 A 2020. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102-108, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.102108>

MEHTA, J. et al. Graphene modified screen printed immunosensor for highly sensitive detection of parathion. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 83, p. 339-346, set. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.058>

MIAO, Z. et al. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 10, p. 1677-1687, 27 abr. 2020.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz633>

OLIVEIRA, D. A. . et al. Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus. **Analytical Biochemistry**, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>

OLIVEIRA, M. S. DE et al. Chronic hepatitis B and D: prognosis according to Child-Pugh score. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 70, n. 5, p. 1048-1053, out. 2017. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2016-0205>

PAN, C. et al. Diagnosis and Management of Hepatitis Delta Virus Infection. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 68, n. 8, p. 3237-3248, 20 ago. 2023.

<https://doi.org/10.1007/s10620-023-07960-y>

PARASKEVOPOULOU, S. et al. Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 30, p. 17977-17983, 28 jul. 2020.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2006750117>

PEREZ-VARGAS, J. et al. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2098, 8 maio 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10117-z>

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 1 jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>

POPESCU, M.; UNGUREANU, C. Biosensors in Food and Healthcare Industries: Bio-Coatings Based on Biogenic Nanoparticles and Biopolymers. **Coatings**, v. 13, n. 3, p. 486, 22 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/coatings13030486>

PUNDIR, C. S.; DEVI, R. Biosensing methods for xanthine determination: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 55-62, abr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.12.006>

RAZAVI-SHEARER, D. et al. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 6, p. 383-403, jun. 2018. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30056-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30056-6)

RIZZETTO, M. et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. **Gut**, v. 18, n. 12, p. 997-1003, 1 dez. 1977. <https://doi.org/10.1136/gut.18.12.997>

SHRIVASTAV, A. M.; USHA, S. P.; GUPTA, B. D. A localized and propagating SPR, and molecular imprinting based fiber-optic ascorbic acid sensor using an in situ polymerized polyaniline-Ag nanocomposite. **Nanotechnology**, v. 27, n. 34, p. 345501, 26 ago. 2016. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/34/345501>

SOLDATKIN, O. et al. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. **Talanta**, v. 135, p. 67-74, abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.031>

SORIANO, V. et al. Treatment of hepatitis delta and <scp>HIV</scp> infection. **Liver International**, v. 43, n. S1, p. 108-115, 30 ago. 2023. <https://doi.org/10.1111/liv.15345>

SPAAN, M. et al. Hepatitis delta genotype 5 is associated with favourable disease outcome and better response to treatment compared to genotype 1. **Journal of Hepatology**, v. 72, n. 6, p. 1097-1104, jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.12.028>

STOCKDALE, A. J. et al. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 73, n. 3, p. 523-532, set. 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.008>

TABASSUM, R.; KAUR, P.; GUPTA, B. D. Tuning the field distribution and fabrication of an Al@ZnO core-shell nanostructure for a SPR-based fiber optic phenyl hydrazine sensor. **Nanotechnology**, v. 27, n. 21, p. 215501, 27 maio 2016.  
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/21/215501>

TARASOV, A. et al. A potentiometric biosensor for rapid on-site disease diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 669-678, maio 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.086>

TAYLOR, J. Virology of Hepatitis D Virus. **Seminars in Liver Disease**, v. 32, n. 03, p. 195-200, 29 ago. 2012. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323623>

TERRAULT, N. A. et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. **Hepatology**, v. 67, n. 4, p. 1560-1599, 25 abr. 2018. <https://doi.org/10.1002/hep.29800>

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)

THOMAS, D. L. Global Elimination of Chronic Hepatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 21, p. 2041-2050, 23 maio 2019.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1810477>

VOON, C. H.; YUSOP, N. M.; KHOR, S. M. The state-of-the-art in bioluminescent whole-cell biosensor technology for detecting various organic compounds in oil and grease content in wastewater: From the lab to the field. **Talanta**, v. 241, p. 123271, maio 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123271>

WEDEMEYER, H.; MANNS, M. P. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 1, p. 31-40, jan. 2010.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.205>

ZAHRA, Q. UL A. et al. Graphene Based Nanohybrid Aptasensors in Environmental Monitoring: Concepts, Design and Future Outlook. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 1433-1454, 3 out. 2023. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2025758>

ZENG, X. et al. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on DNA functionalized carbon nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 896-900, dez. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.09.003>

ZHANG, G. et al. Spectroscopic studies of cyanazine binding to calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a probe. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 182, p. 453-460, jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.038>

ZHANG, Y. et al. Wearable artificial intelligence biosensor networks. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 219, p. 114825, jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114825>

ZHANG, Z.; URBAN, S. New insights into HDV persistence: The role of interferon response and implications for upcoming novel therapies. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 3, p. 686-699, mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.032>

ZUO, W. et al. A fluorescent and ratiometric colorimetric biosensor for detection of different hazard contaminants in dairy products. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 374, p. 132816, jan. 2023. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4102887>

## **Capitulo II- *Artigo científico***

A point-of-care diagnosis for Hepatitis Delta: indirect detection using methyl orange as novel DNA hybridization indicator.

Dayane D. Moraes<sup>a</sup>, Pedro H.G. Guedes<sup>a</sup>, Jéssica G. Brussasco<sup>a</sup>, José M.R. Flauzino <sup>a</sup>, Luiz F.G. Luz <sup>a</sup>, Márcia M.C.N. Soares <sup>b</sup>, Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua<sup>c</sup>, Ronaldo J. Oliveira <sup>d</sup>, João M. Madurro <sup>e</sup>, Ana G. Brito-Madurro <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

<sup>b</sup> Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory in São José do Rio Preto, Brazil

<sup>c</sup> Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia - Brazil

<sup>d</sup> Department of Physics, Institute of Exact, Natural Sciences and Education, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

## Highlights

- The first electrochemical genosensor for *HDV* gRNA detection using methyl orange as a novel DNA hybridization indicator is described.
- Specific 25-base DNA capture probe is able to detect *HDV* gRNA in serum sample.
- The device exhibits high reproducibility over 6 cycles of regeneration.
- The biosensor LOD is 9 copies mL<sup>-1</sup>.

## ABSTRACT

Hepatitis delta is a viral infection caused by the hepatitis delta virus (HDV), which relies on the hepatitis B virus to replicate. Coinfection with both viruses can lead to more severe complications, including chronic liver damage. In this work we report the development of a novel electrochemical device for molecular diagnosis of hepatitis Delta virus in the blood serum of infected patients, using graphite electrodes functionalized with ethylenediamine and sensitized with a specific DNA probe. The recognition of specific genomic RNA, by indirect detection, was evaluated by Differential Pulse Voltammetry (DPV), Electrochemical Spectroscopy Impedance (EIS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) and molecular docking. The genosensor was efficient in detecting genomic RNA with a linear range from 9 copies mL<sup>-1</sup> to 3 x 10<sup>6</sup> copies mL<sup>-1</sup> and presented a limit of detection of 9 copies mL<sup>-1</sup> which is more superior than the standard method of detection better than the 10 copies mL<sup>-1</sup> limit of reference method (real-time PCR). EIS analysis showed that the genosensor resistance current increased exponentially with the concentration of the genomic RNA target. This novel platform has advantages to its applicability in real samples, such as good sensitivity, selectivity and low sample volume, thus interesting for application in the diagnosis of hepatitis delta virus in blood serum. Also, the ease of synthesis of the low-cost modification by drop-cast directly on the electrode surface allows the translation of the platform to portable devices which can be used at the point of care.

**Keywords:** hepatitis delta; diagnosis; genosensor; point-of-care; bioelectrode.

## 1. Introduction

Hepatitis Delta virus (HDV) is the third leading cause of viral liver disease after hepatitis B (HBV) and hepatitis C virus (HCV) [1]. Three of his recent meta-analyses estimated the number of her HBsAg carriers co-infected with this virus worldwide to be between 12 million for women and 72 million for men [2-4]. Therefore, hepatitis Delta only occurs in people who have hepatitis B surface

antigen (HBsAg) in their blood [2,5]. Transmission of HDV, like that of HBV, is by skin trauma (from injections, tattoos) or contact with infected blood or blood products [6].

The clinical course of HDV disease is more dangerous than HBV and HCV disease [7]. According to the World Health Organization (WHO), hepatitis delta virus is the leading cause of chronic infection with hepatitis B virus worldwide, it was estimated to affect nearly 5% of population. HDV co-infection may explain one in five cases of liver disease and liver cancer in HBV-infected individuals. WHO identified several geographic hotspots with high prevalence of HDV infection, including Mongolia, Moldova, and countries in West and Central Africa [8].

Hepatitis Delta virus infection, a chronic viral disease of the liver, is still considered incurable due to the lack of effective treatment options. Peginterferon alfa is the commonly recommended treatment for HDV infection. Treatment should be continued for at least 48 weeks regardless of patient response [8,9]. Viruses tend to have low response rates to treatment. Without treatment, the risk of developing advanced liver disease, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma is very high [10].

HDV infection is diagnosed by high levels of anti-HDV immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) and confirmed by detection of HDV RNA in serum. However, HDV diagnostics are not widely available and there is no standardization for HDV RNA assays, which are used for monitoring response to antiviral therapy [11].

One of the latest methods to detect pathogens is the development of biosensors [12]. Among biosensors, electrochemical genosensors stand out as sequence-specific of genetic materials (DNA and RNA) detection devices that enable accurate identification of pathogens [13]. They offer superior advantages compared to most analytical techniques due to their low cost, rapid results, selectivity, ability to be miniaturized, simplicity of instrumentation and operation, as it can also be used as a diagnostic point-of-care [14,15].

Electrochemical genosensors monitor RNA hybridization indirectly or labeled through different electrochemical reactions of redox indicators that interact specifically with single-stranded (ss) or double-stranded (ds) [16,17]. In this study, a screen-printed carbon electrode modified with Ethylenediamine

(EDA) was used so that it has coordination agent that possesses two amine ligands [18], groups that have high affinity for the RNA strand [19].

Methyl orange (4-dimethylaminoazobenzene- 4'-sulfonic acid salt,  $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$ ) is a well-known molecule that is widely used as one of the most used dyes in the textile industry [20, 21]. It is also used as a pH indicator for titration [22]. However, the potential of methyl orange as an electroactive hybridization indicator and the bioinformatics related to its interaction with ssDNA and dsDNA as applied to genosensor technology remain to be explored.

Therefore, in the current study, we report a novel and reusable electrochemical genosensor capable of sensitive and selective detection of Hepatitis D virus by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The genosensor showed remarkable regeneration capacity, with 100% of its signal response maintained up to 80 days of storage and high sensitivity. This innovative approach, which uses methyl orange as a hybridization indicator, is an easy alternative to monitoring Hepatitis D virus RNA compared to conventional techniques currently used.

## **2. Material and method**

### **2.1 Chemicals and biomolecules**

All chemicals were used without prior purification and presented analytical grade. High purity water (18.2 MΩ cm, Master System, Gehaka, Brazil) was used to prepare solutions which were deoxygenated by bubbling ultra-pure nitrogen before electrochemical measurements. Potassium chloride (99%, KCl) was purchased from Neon. Sulfuric acid (98%,  $H_2SO_4$ ),  $K_4[Fe(CN)_6]$  and  $K_3[Fe(CN)_6]$  were obtained from SigmaAldrich Chemical, USA (ACS purity). Dibasic sodium phosphate (99%,  $Na_2HPO_4$ ) and monobasic sodium phosphate (99%,  $NaH_2PO_4$ ) were acquired from Synth. Ethylenediamine (EDA) (ACS reagent) was purchased from Sigma Aldrich. Methyl orange was obtained from Merck. The Hepatitis C virus (5'-CCCCTGTGAGGACTTCTGTCTTC-3') and Hepatitis B virus (5'-GAGGAGTTGGGGAGCACATT -3') sequences was carefully designed using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) data bank. The HDV probe sequence used was HDV1 (5'- GAGATGCCATGCCGACCCGAAGAG -3')

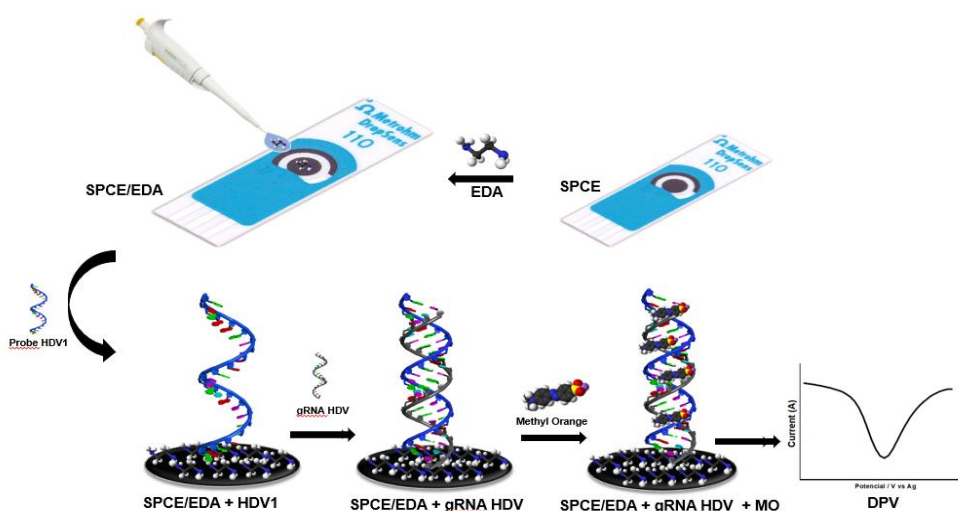
was purchased from Alpha DNA (Canada) and a stock solution (20 mmol L<sup>-1</sup>) was prepared using deionized water. For selectivity tests, were used nucleic acids from different organisms such Hepatitis C virus and Hepatitis B. 10 healthy patients and 10 sick patients were obtained of the FIOCRUZ – RO and confirmed by Real Time – PCR test (RT-PCR).

## **2.2 Molecular modeling and computational protocol**

The initial conformation of the double-stranded DNA was created by submitting the sequence to the proto-Nucleic-Acid Builder (pNAB) package [23]. Another initial structure was built with the Web 3DNA (w3DNA) server [24], resulting in a similar initial helical conformation. The initial dsRNA structure was used as input to the CHARMM-GUI web server [25] in order to create the necessary files for the molecular dynamics step. Default parameters were used over the biomolecule building steps: reading, solvating and setting up periodic boundary conditions. Molecular dynamics was performed by running energy minimization, equilibration and 10 ns production run in the GROMACS suite 5.1.4 [26]. The last conformation of the production run was conducted for the docking studies. The FTMap web server [27] identified the druggable hot spots with DG33 nucleotide as the most probable ligand-binding center cavity. The docking simulations of compound methyl orange against the dsRNA were executed with the Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD) suit version 2022 [28] following the previous published protocols from Kaiser da Silva, A. et al., 2022 and Souza, W. A. et al., 2022 [29]. Protein structures were visualized and illustrated with PyMOL (<https://pymol.org>) and ProteinImager [30]. ProteinsPlus [31] web server identified the dsRNA-compound interactions.

### 2.3 Production of genosensor and Hepatitis Delta gRNA detection

Construction of the electrochemical genosensor was carried out using the steps following: Carbon screen-printed (SPCE), EDA deposition by drop casting, HDV probe immobilization, gRNA target detection and electrochemical transduction, as represented in scheme 1.



**Scheme 1** - Representative scheme of biosensor development

### 2.4 Development of electrochemical genosensor and HDV detection

Electrochemical preconditioning of the SPCE was performed using cyclic voltammetry in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ), 20 cycles with potential ranging from 0.0 V to 0.8 V,  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . The work area has been modified by the drop casting method, thus  $10 \text{ }\mu\text{L}$  of EDA ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) dilution in ultrapure water was added to the SPCE work area and transferred to an oven at  $55^\circ\text{C}$  for 30 minutes to dry.

Probe immobilization was carried out by dripping  $5.0 \text{ }\mu\text{L}$  of HDV1 ( $200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ , pH 7.4) and after 30 min, SPCE/HDV1 was immersed in phosphate buffer saline (PBS) solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4), that non-adsorbed capture probes are washed out. Hybridization procedure was performed by dripping  $5 \text{ }\mu\text{L}$  of serum (1:10, V/V) enriched with HDV gRNA onto SPCE-Et/HDV1 surface and conditioned in  $68^\circ\text{C}$  for 20 min. Subsequently, SPCE/HDV1: gRNA

was immersed in PBS solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4) to wash unbound RNA from the SPCE/HDV1 surface.

Indirect detection was carried out by adding 5  $\mu\text{L}$  of methyl orange ( $0.125 \text{ mol L}^{-1}$ ) onto SCPE /HDV1: gRNA surface. After 10 min at room temperature, the unbounding methyl orange was removed using deionized water by immersion of SCPE /HDV1: gRNA. Differential pulse voltammetry (DPV) was recorded with potential ranging from 0.0 V to +0.8 V, modulation amplitude 30 mV, interval time 0.2 s, scan rate  $30 \text{ mV s}^{-1}$ ; interval time 0.2 s using an electrolyte PBS solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4).

The same technique was applied using potassium ferrocyanide/ferricyanide solution ( $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) with  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl, potential range from  $-0.2$  to  $+0.5 \text{ V}$ , scan rate of  $40 \text{ mV s}^{-1}$ , modulation amplitude 0.05 V, step potential 0.008 V, modulation time 0.06 s and interval time 0.2 s, using undiluted serum. Electrochemical impedance spectroscopy was conducted using potassium ferrocyanide/ferricyanide solution ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) with  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl, open circuit potential, frequencies ranging from 100 kHz to 10 mHz, amplitude 10 mV.

## **2.5 Selectivity, regeneration, and stability assays**

In order to evaluate the selectivity of the genosensor, human serum sample (1:10, V/V) was enriched with nucleic acids from Hepatitis B and Hepatitis C at the same concentration of the positive sample ( $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pH = 7.4) and added into SPCE/HDV1 surface. Regeneration studies was cared out, SPCE /HDV1 of hepatitis D was washed in PBS solution, pH 7.4, by immersion for 7 s. Subsequently, in order to de-hybridize hepatitis D gRNA from SPCE/HDV1, the surface was immersed in water at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min. This procedure was repeated 5 times. After, DPV analysis was conducted using methyl orange as an indicator. The stability of the genosensor was evaluated by maintaining SPCE /HDV1 bioelectrodes at  $8^\circ\text{C}$  for 80 days. Then, electrochemical response was evaluated up to 80 days of storage. For selectivity, regeneration and stability assays, DPV was performed in a PBS solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4) and the reduction peak of methyl orange was monitored.

## 2.6 Morphological characterization

Surface analysis of the biosensor was acquired with a Shimadzu SPM-9600 atomic force microscope, using silicon cantilevers with constant force 10-130  $\text{Nm}^{-1}$  and resonant frequency of 204-497 kHz. Measurements were performed in non-contact mode, using undiluted sera and by scanning electron microscopy (SEM) on an EVO MA10 Zeiss microscope.

## 2.7 Data presentation

Arithmetic means  $\pm$  standard deviations are shown for numbers performed in triplicate measurements. Histogram plots and voltammograms were drawn with Origin 8 after baseline subtraction.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Morphological and electrochemical characterization of the SPCE/EDA

SPCE with an amino functional group becomes covalently bound to the electrode surface via EDA. We have chosen EDA because it is a small planar key compound with two  $-\text{NH}_2$  groups symmetrically distributed on each plane. The formation of the amine functional group relies on the strong electrostatic attraction ( $\pi$ - $\pi$  interaction) between the nitrogen atoms of the amine and the carbon atoms of the SPCE [32].

As demonstrated in **Fig. 1**, SEM and AFM images of the working electrode without EDA drop-casting and the working electrode with EDA drop-casting. Printed carbon electrodes usually have rough texture due to ink constituents, as can be observed in the morphology in SEM images (**Fig. 1A** and **1C**). The roughness coefficient of the bare SPCE ( $R_q = 24,3 \pm 6,9 \text{ nm}$ ) as shown in **Fig. 1A**. The addition of EDA promotes an increase in roughness ( $R_q = 31,4 \pm 7,8 \text{ nm}$ ), **Fig. 1C**, this morphology also was observed by MEV as indicated in **Fig 1D**. The

increase in the surface area is corroborated by obtained electrochemical results, which showed an increase in the current value and a decrease in the charge transfer resistance after EDA drop cast. Also, the surface area increase contributing to the electrochemical reaction onto SPCE modified.

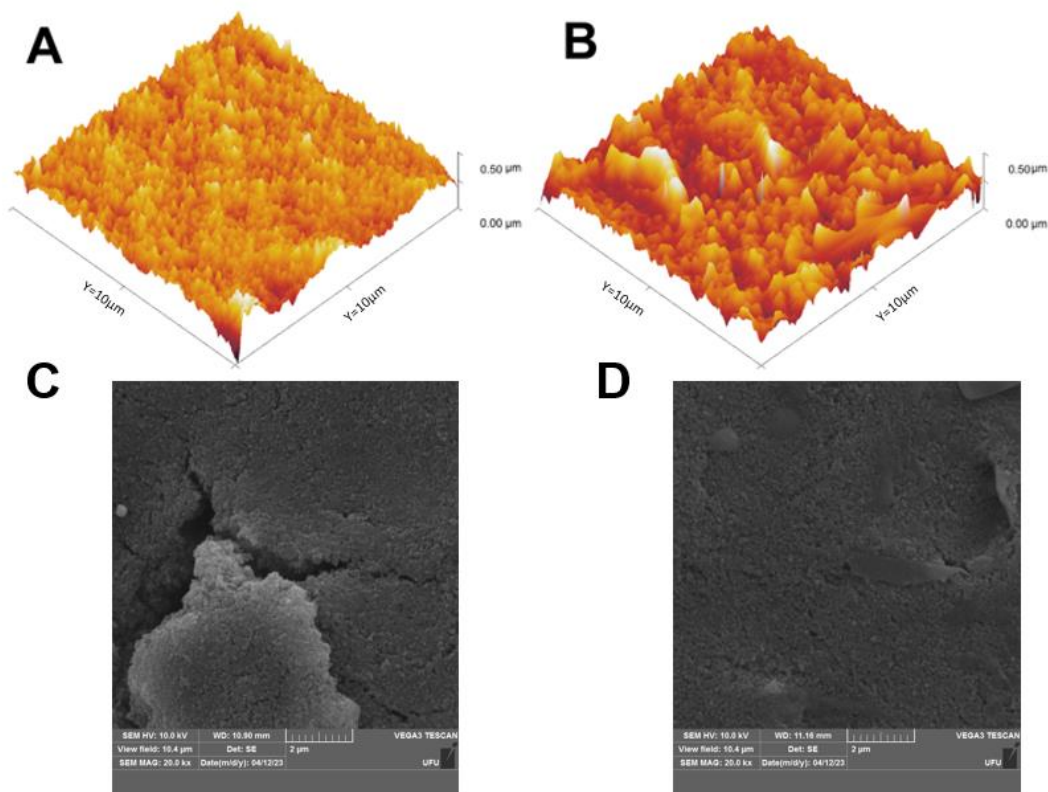


**Fig. 1** - Atomic Force and Scanning Electron Microscopies (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) of the working area of the bare SPCE electrode (A, C) and modified with EDA (B,D).

### 3.1.2 Electrochemical characterization of the SPCE/EDA platform

The electrochemical properties of the ethylenediamine coated SPCE were evaluated by electrochemical approach using cyclic voltammetry and EIS in ferro/ferricyanide solution according to **Fig. 2**.

**Fig. 2A** showed that for bare SPCE, the oxidation potential of ferrocyanide was the highest measured ( $0.258 \pm 0.026$  V), while the anodic peak current was the lowest ( $82 \pm 3.62$  μA). After the modification of SPCE with ethylenediamine, a decrease in the oxidation potential ( $0.187 \pm 0.019$  V) and an increase in anodic peak current ( $159.12 \pm 12.28$  μA) were recorded, indicating a

more facile oxidation of ferrocyanide, and improved charge-transport properties. These data support the capability of ethylenediamine to promote the electrocatalytic redox reactions on the electrode, due to its higher conductivity. Charge transfer resistance was 20 times higher when compared to bare SPCE ( $45.15 \pm 4.07 \text{ k}\Omega$  and  $928.23 \pm 10.19 \text{ }\Omega$ ) respectively, **Fig. 2B**.

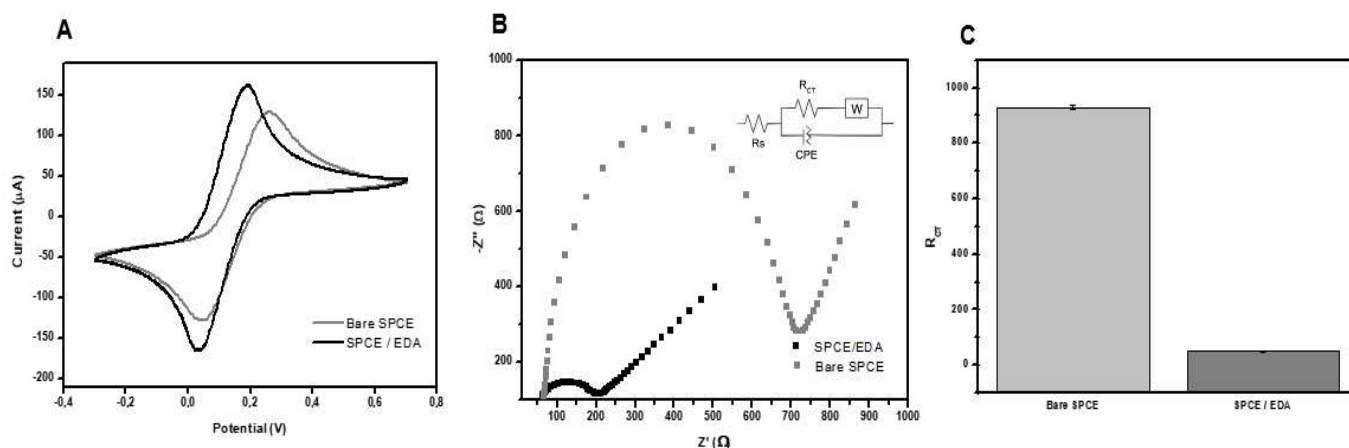


**Fig. 2** - Electrochemical characterization of the modified platform construction steps: **(A)** cyclic voltammograms of the bare screen-printed carbon electrode (bare SPCE) and SPCE modified with ethylenediamine (SPCE/EDA). **(B)** Nyquist plots obtained by EIS analysis; inset 1: equivalent Randles circuit, where  $R_s$ ,  $R_{CT}$ ,  $W$ , and  $CPE$  represent the solution resistance, the charge-transfer resistance, the Warburg diffusion resistance. Nyquist plots obtained by EIS; inset: Randles circuit. Electrolyte: PBS ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ), containing  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  and  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). CV parameters: potential range from  $-0.5$  to  $+0.8 \text{ V}$ ,  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . EIS parameters: frequency range from  $10000 \text{ Hz}$  to  $0.1 \text{ Hz}$ , potential applied  $0.12 \text{ V}$ , amplitude  $10 \text{ mV}$ . SWV parameters: potential range from  $0 \text{ V}$  to  $+0.4 \text{ V}$ , amplitude  $25 \text{ mV}$ , increment  $4 \text{ mV}$ , frequency  $15 \text{ Hz}$ . **(C)** Charge transfer resistance of bare SPCE and SPCE modified with ethylenediamine (SPCE/EDA).

### 3.2 Analytical performance of genosensor

Efficient DNA probe immobilization on the electrode surface plays an important role in the overall performance of genosensors [33]. The probe orientation onto platform and its optimal concentration are relevant parameters for achieving high-quality biosensors [12]. **Fig. 3** shows the comparison between

the HDV 1 probe and gRNA of HDV target (HDV gRNA), using the differential pulse voltammetry technique.

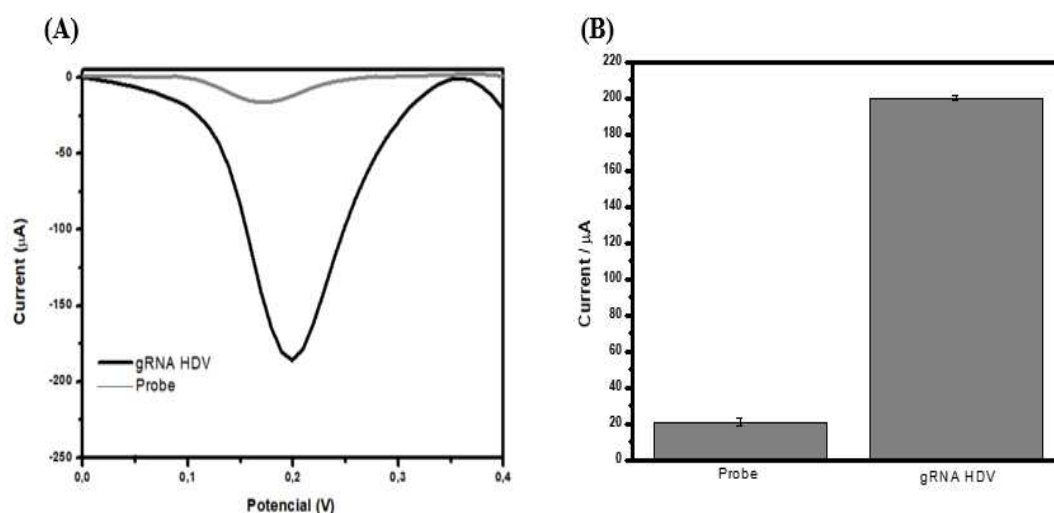


**Fig. 3** - Differential Pulse Voltammetry (A) and bar chart obtained from DPV of  $\Delta ip$  versus HDV probe and gRNA HDV target (B). DPV was recorded in PBS solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4); potential sweep from 0 V to +0.8 V; scan rate  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; current modulation amplitude 30 mV; interval time 0.2 s. The reduction peak of the methyl orange was monitored in all experiments.

In **Fig. 3A** and **3B** demonstrates through the DPV technique that the detection of the HDV target, using the MO reduction peak as indicator is greater than the probe being the HDV target was detected at  $\Delta ip = 199.43 \mu\text{A} \pm 5.20 \mu\text{A}$  while the probe at  $\Delta ip = 21.17 \mu\text{A} \pm 0.26 \mu\text{A}$ , about 80%, in + 0.2 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> (KCl  $3 \text{ mol L}^{-1}$ ) was considered, which can be attributed to the reduction process of MO. This difference, we can consider that MO was retained on the surface due to the presence of the hybridized product.

### 3.3 Calibration curve with real samples

Hepatitis Delta is often identified in serum samples from contaminated patients [34,35]. In this study, a human serum sample (1:10, V/V) was enriched with different concentrations of HDV gRNA and a calibration curve was constructed to evaluate the sensitivity of the genosensor. Indirect detection was carried out by DPV, monitoring methyl orange reduction peak as presented in **Fig. 4**.

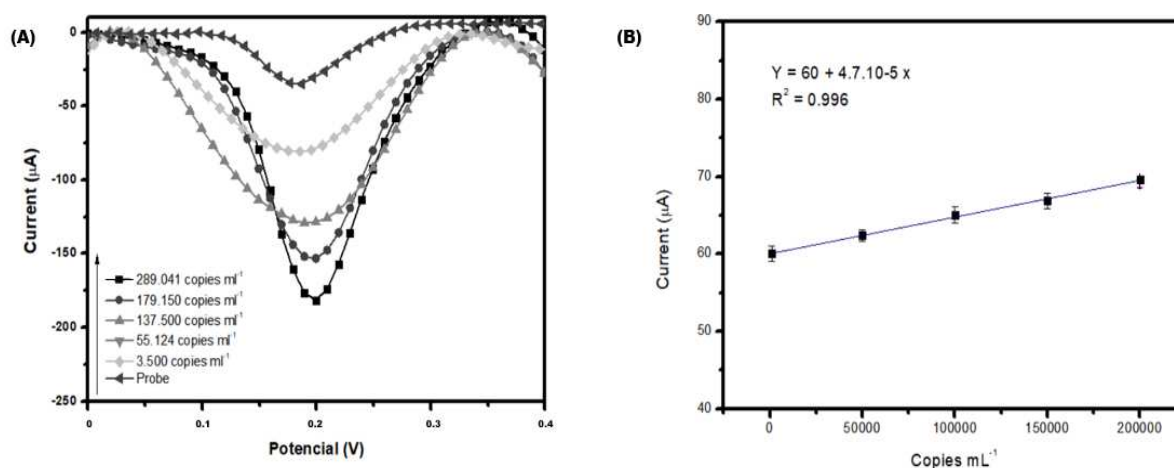


**Fig. 4** – Electrochemical response for indirect detection of HDV gRNA added to the serum (1:10, V/V) at different concentrations monitoring MO reduction peak **(A)** and the calibration curve construction **(B)**. Differential pulse voltammograms recorded in PBS solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4), in absence or presence of target analyte, varying its concentration (289.041 copies  $\text{mL}^{-1}$  to 3.500 copies  $\text{mL}^{-1}$ ). Conditions: potential scan from 0 to +0.8 V; scan rate  $30 \text{ mV s}^{-1}$ ; modulation amplitude  $30 \text{ mV}$ ; interval time  $0.2 \text{ s}$ .

The methyl orange indicator was used in order to monitor the duplex formation (HDV1 probe: HDV gRNA) presented an increase in the reduction peak  $E_p = +0.2 \text{ V vs (Ag/AgCl in KCl } 3.0 \text{ mol L}^{-1})$  with the amount of HDV gRNA (SPCE/EDA/HDV1: HDV gRNA) in serum sample, according to **Fig. 4A** and **4B**. This indicator has greater affinity with HDV1 probe: HDV gRNA when compared with HDV1 probe. This behavior is also observed in other hybridization indicators, such as ethidium bromide (36Castro et al., 2014), Anthraquinone-2-sulfonic acid monohydrate sodium salt (AQMS) (Ali et al., 2023) and ruthenium(III) hexammine (Simon & Gyurcsányi, 2019) which present high costs and toxicity (Rashid and Yusof, 2017). The genosensor presented a range linear from 9 copies  $\text{mL}^{-1}$  to 303.469 copies  $\text{mL}^{-1}$  and  $\Delta i_p (\mu\text{A}) = 60 + 4.7 \cdot 10^{-5} x$  with  $R^2 = 0.996$ . The limit of detection was 9 copies  $\text{mL}^{-1}$ , which is better than the value of reference method, RT-PCR de 142 copies  $\text{mL}^{-1}$  (da Silva Queiroz, J. A et al., 2023.)

### 3.4 Specificity Assay in Real Biological

To demonstrate the practical application of the genosensor, serum samples of 10 healthy patients and 10 sick patients were tested (**Fig. 5**).

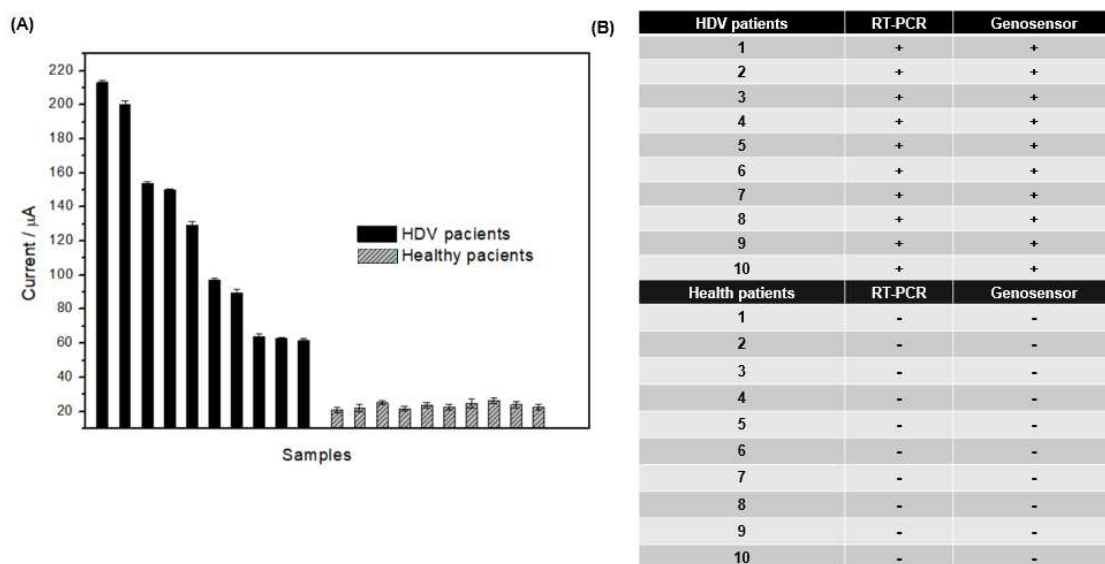


**Fig. 5** - Bar chart of current values of the orange methyl reduction for the healthy patient and patients with HDV (**A**). Response for HDV detection by RT-PCR and genosensor of healthy patients and HDV patients (**B**). Conditions: 0.10 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s.

Patients with HDV were detected with a current range of 235 µA to 60.015 µA, referring to a viral load of 3.373,670 copies mL<sup>-1</sup> and 340 copies mL<sup>-1</sup>, respectively, while all healthy patients obtained a detected current range of 24.58 µA to 21.02 µA (**Fig. 5 A**). As seen in Fig. 5, when comparing the results with different techniques (RT-PCR and Genosensor), they obtained the same results, so both diagnostic techniques detected all HDV-positive patients and all healthy patients (HDV-negative).

Considering all the results described above, it certainly supports the conclusion that the genosensor developed demonstrates potential applicability for qualitative screening of HDV detection and advantages including (i) a small sample volume (5 µL), (ii) no requirements of a PCR kit, which substantially

reduced the overall number of steps and cost, (iii) no qualified professionals are needed for the test, so that handling is very easy to understand and practice, (iv) a compact device that enables it to be used remotely outside the realm of a laboratory, (v) technique is faster, taking around 30 minutes for the result, while RT-PCR can take up to 2 hours and (vi) a configuration that allows it to be safely disposed and prevents exposure to the environment.

### 3.5 Selectivity, regeneration, and stability assays

Parameters such as selectivity, regeneration and stability were evaluated by indirect detection, monitoring the current response of methyl orange reduction peak (**Fig. 6**).

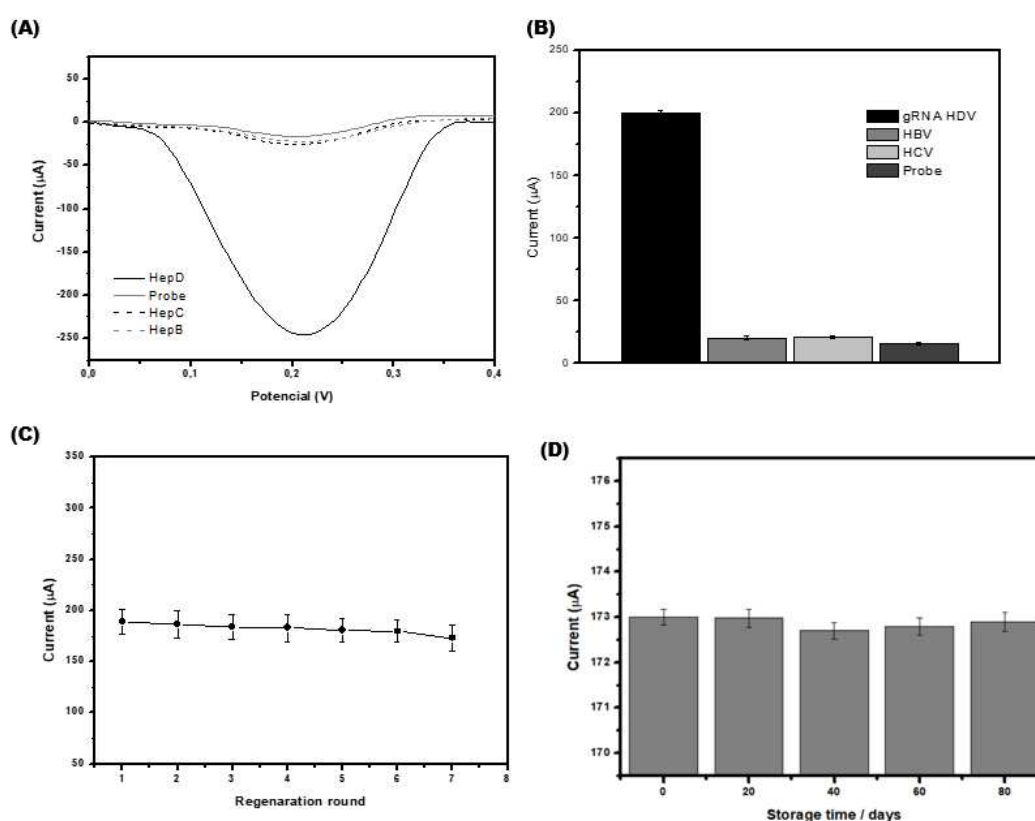


**Fig 6.** Differential pulse voltammograms **(A)** and histogram **(B)** of current value for the detection of HDV gRNA and non-specific targets: Hepatitis B and Hepatitis C. Relation between ip and regeneration rounds **(C)**. Relation between ip and storage time of the genosensor **(D)**. DPV was recorded in PBS solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4); potential scan from 0 V to +0.4 V; scan rate  $30 \text{ mV s}^{-1}$ ; modulation amplitude 30 mV; interval time 0.2 s. Methyl orange reduction peak was monitored in all experiments.

The genosensor was used with genes from non-target pathogens which are also found in serum such as hepatitis B DNA [36], hepatitis C RNA [37-39] at the same concentration of HDV gRNA ( $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). The genosensor was able to distinguish all non-specific pathogens, being HDV gRNA, HBV gDNA, HCV gRNA with  $i_p = 246 \pm 2.6 \mu\text{A}$ ,  $21.1 \pm 1.5 \mu\text{A}$  and  $25 \pm 2.1 \mu\text{A}$ , respectively (**Fig. 6A**).

HDV is detected by quantitative real-time PCR [40,41]. However, RT-PCR is a laborious operational procedure which presents some challenges towards a point-of-care diagnosis, including high cost and unstable results [42]. This a first genosensor for the detection of HDV gRNA, in serum samples, using methyl orange as hybridization indicator. In this work. The developed genosensor showed superior features such as linear range, rapid response and small amount of sample required.

### 3.6 Computational analysis of methyl orange in complex with RNA

Theoretical analyzes were conducted in order to evaluate the interactions between methyl orange and HDV dsRNA with the results presented in **Fig 7**. The first step was to model the dsDNA with the pNAB software4, producing the left structure in **Fig. 7A**. This structure was simulated by the molecular dynamic technique during the time of 10 ns. **Fig. 7A** shows the total energy and the radius of gyration ( $R_g$ ) of the dsRNA monitored along time. The RNA extended conformation showed to be reasonably stable over the 10 ns-run with average  $R_g \approx 2.4 \text{ nm}$  and energy of  $1.55 \times 10^6 \text{ kJ/mol}$ . These average values are consistent with the theoretical results of the dsDNA genosensor previously simulated.

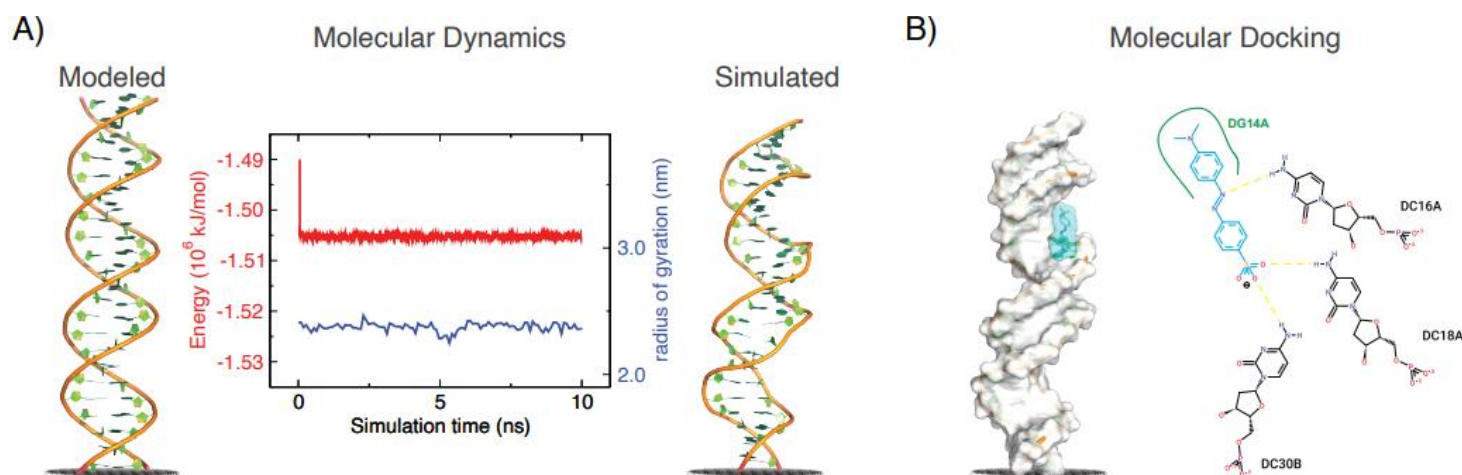


**Fig. 7** - Molecular modeling and computational analyses of the interaction between methyl orange and RNA. **(A)** The modeled and simulated dsDNA structures. It is also shown in **(A)** the total energy and the radius of gyration (Rg) as a function of the simulated time evaluated by the molecular dynamics protocol. **(B)** Molecular docking of the methyl orange (cyan) bound with the simulated final DNA conformation produced by the simulations in **(A)**. It is shown in **(B)** the DNA-compound interactions in surface representation (left) and in two-dimensional projection (right). Hydrophobic interactions with DNA are shown in green and hydrogen bonds in yellow.

The next step was to perform molecular docking simulations between the final RNA conformation produced by molecular dynamics with the hybridization agent methyl orange. **Fig. 7B** displays the best ranked conformation of the dsRNA-methyl orange complex in surface representation (left) and in two-dimensional projection (right). ProteinsPlus13 web server identified 5 empty cavities over the dsRNA surface; however, the cavity around the DG33 nucleotide was identified by FTMap8 as the most probable druggable hot spot and, thus, it resulted in the ligand-binding center cavity. **Fig. 7B** shows that methyl orange is probable located in a RNA minor groove rich in C-G nucleotides. The hybridization indicator was bound via hydrogen interactions with nucleotides DC16, DC18 and DC30 and hydrophobic interactions with DG14. The binding energy of the best ranked complex was -18.4 kcal/mol, estimated by the ChemScore function of GOLD9. This binding energy is consistent with previous estimates of druggable compounds interactions between enzymes, obtained by

GOLD fitness functions<sup>14</sup>, and DNA, calculated in a semiempirical quantum level<sup>15</sup>.

The theoretical study suggests that the hybridization agent is favorably bound in a cavity over the DNA surface with a reasonable binding energy. This is in agreement with the experimental electrochemical detection of HDV by methyl orange monitoring, which presents this compound as a new hybridization indicator. The results obtained are compatible with other previously published works [43-45].

#### **4. Conclusion**

The genosensor was efficient in detecting genomic RNA with high sensitivity, good reproducibility, detection limit better than a reference method used without the need for prior purification of the sample real. The analytical features of biosensor were evaluated and presented a linear response from 9 copies mL<sup>-1</sup> to 3.373,670 copies mL<sup>-1</sup> of gRNA in serum (1:10, V/V) capable of detecting up to 9 copies mL<sup>-1</sup>. This novel platform also has a short assay time, and the ease of synthesis of the low-cost. The electrode surface allows the translation of the platform to portable devices. The agreement of the results obtained with the different techniques utilized indicates a promising application of the genosensor developed for the HVD point-of-care diagnosis.

#### **5. References**

- [1] Rizzetto M. Hepatitis D virus. Wong RJ, Gish EG, eds. In: Clinical Epidemiology of Chronic Liver Disease. Springer. 2019:135–148. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-94355-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-94355-8_11)

- [2] Chen HY, Shen DT, Ji DZ, Han PC, Zhang WM, Ma JF, Chen WS, Goyal H, Pan S, Xu HG. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2019 Mar;68(3):512-521. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316601>
- [3] Stockdale AJ, Kreuels B, Henrion MYR, Giorgi E, Kyomuhangi I, de Martel C, Hutin Y, Geretti AM. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2020 Sep;73(3):523-532. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.008>
- [4] Miao Z, Zhang S, Ou X, Li S, Ma Z, Wang W, Peppelenbosch MP, Liu J, Pan Q. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. *J Infect Dis*. 2020 Apr 27;221(10):1677-1687. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz633>
- [5] Taylor JM. Infection by Hepatitis Delta Virus. *Viruses*. 2020 Jun 16;12(6):648. <https://doi.org/10.3390/v12060648>
- [6] Blaney H, Khalid M, Heller T, Koh C. Epidemiology, presentation, and therapeutic approaches for hepatitis D infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2023 Feb;21(2):127-142. <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2159379>.
- [7] Rizzo, G. E. M., D. Ferraro, G. Rancatore, P. Graceffa, G. Falco, C. La Mantia, V. Calvaruso, and V. Di Marco. "The burden of HDV infection: A ten-years' experience of a sicilian tertiary centre of liver disease." *Digestive and Liver Disease* 55 (2023): S59. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2023.01.115>
- [8] the World Health Organization (WHO), World Hepatitis Summit 2022 urges action to eliminate viral hepatitis as unexplained hepatitis cases in children rise globally. Available: <https://www.who.int/news/item/07-06-2022-world-hepatitis-summit-2022-urges-action-to-eliminate-viral-hepatitis-as-unexplained-hepatitis-cases-in-children-rise-globally>

- [9] Ito T, Nguyen MH. Bulevirtide and tenofovir combination therapy for hepatitis D virus infection: longer treatment and more diverse trial populations are needed. *Lancet Infect Dis.* 2023 Jan;23(1):14-16. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00412-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00412-1)
- [10] Yardeni D, Heller T, Koh C. Chronic hepatitis D-What is changing? *J Viral Hepat.* 2022 Apr;29(4):240-251. <https://doi.org/10.1111/jvh.13651>
- [11] Pan C, Gish R, Jacobson IM, Hu KQ, Wedemeyer H, Martin P. Diagnosis and Management of Hepatitis Delta Virus Infection. *Dig Dis Sci.* 2023 Aug;68(8):3237-3248. <https://doi.org/10.1007/s10620-023-07960-y>
- [12] A. Mobed, B. Baradaran, M. Guardia, M. Agazadeh, M. Hasanzadeh, M.A. Rezaee, J. Mosafer, A. Mokhtarzadeh, M.R. Hamblin. Advances in detection of fastidious bacteria: from microscopic observation to molecular biosensors *TrAC Trends Anal. Chem.* (Reference Ed.), 113 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.012>
- [13] Tamiya, Eiichi. "Portable electrochemical RNA sensors based on gene amplification reactions to screen and identify pathogen and SNPs." *Sensors* 22, no. 5 (2022): 1865. <https://doi.org/10.3390/s22051865>
- [14] I.R. Suhito, K.M. Koo, T.H. Kim. Recent advances in electrochemical sensors for the detection of biomolecules and whole cells *Biomedicines*, 9 (2021), pp. 1-20. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010015>
- [15] Hua Y, Ma J, Li D, Wang R. DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. *Biosensors* (Basel). 2022 Mar 20;12(3):183. <https://doi.org/10.3390/bios12030183>
- [16] A. Erdem, E. Eksin, G. Kadikoylu, E. Yildiz. Voltammetric detection of miRNA hybridization based on electroactive indicator-cobalt phenanthroline. *Int. J. Biol. Macromol.*, 158 (2020), pp. 819-825. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.168>

- [17] Azimi Sanavi M, Mahdavian F, Dorosti N, Karami N, Karami S, Khatami SH, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Karima S, Movahedpour A. A review of highly sensitive electrochemical genosensors for microRNA detection: A novel diagnostic platform for neurodegenerative diseases diagnostics. *Biotechnol Appl Biochem*. 2023 Jun;70(3):1044-1056. <https://doi.org/10.1002/bab.2419>.
- [18] Ahmadijokani F, Tajahmadi S, Bahi A, Molavi H, Rezakazemi M, Ko F, Aminabhavi TM, Arjmand M. Ethylenediamine-functionalized Zr-based MOF for efficient removal of heavy metal ions from water. *Chemosphere*. 2021 Feb;264(Pt 2):128466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128466>
- [19] Hossain KA, Kogut M, Słabońska J, Sappati S, Wieczór M, Czub J. How acidic amino acid residues facilitate DNA target site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023 Jan 17;120(3):e2212501120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212501120>
- [20] Alfei S, Grasso F, Orlandi V, Russo E, Boggia R, Zuccari G. Cationic Polystyrene-Based Hydrogels as Efficient Adsorbents to Remove Methyl Orange and Fluorescein Dye Pollutants from Industrial Wastewater. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 2;24(3):2948. <https://doi.org/10.3390/ijms24032948>
- [21] Mandal, Peetam, Jhuma Debbarma, and Mitali Saha. "Critical Review on the Photodegradation Ability of Graphene and its derivatives against Malachite Green, Methylene Blue, and Methyl Orange." *Appl. NanoBioScience* 12 (2023): 6. <https://doi.org/10.33263/LIANBS121.006>
- [22] Al-Odayni, Abdel-Basit, Faisal S. Alsubaie, and Waseem Sharaf Saeed. "Nitrogen-Rich Polyaniline-Based Activated Carbon for Water Treatment: Adsorption Kinetics of Anionic Dye Methyl Orange." *Polymers* 15, no. 4 (2023): 806. <https://doi.org/10.3390/polym15040806>

- [23] A. Alenaizan, J.L. Barnett, N. V. Hud, C.D. Sherrill, A.S. Petrov, The proto-Nucleic Acid Builder: a software tool for constructing nucleic acid analogs, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) 79–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1159>
- [24] Li, S.; Olson, W. K.; Lu, X.-J. Web 3RNA 2.0 for the Analysis, Visualization, and Modeling of 3D Nucleic Acid Structures. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47 (W1), W26–W34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz394>
- [25] Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* 2016, 12 (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- [26] M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* 2015, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- [27] Kozakov, D.; Grove, L. E.; Hall, D. R.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Luo, L.; Xia, B.; Beglov, D.; Vajda, S. The FTMap Family of Web Servers for Determining and Characterizing Ligand-Binding Hot Spots of Proteins. *Nat. Protoc.* 2015, 10 (5), 733–755. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>
- [28] Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins* 2003, 52 (4), 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>
- [29] Kaiser da Silva, A.; Mateus Santos, M.; Aparecida Candido, P.; de Oliveira Lopes, É.; Rogério Pavan, F.; Aparecida Carneiro, Z.; Vinícius da Silva, M.; José Freire de Oliveira, C.; Azevedo Batista, A.; Junio de Oliveira, R.; Marcelo Deflon, V.; Ivo da Silva Maia, P. Gold(III) Heteroleptic Complexes with SNS-Thiosemicarbazone Ligands as Cytotoxic Agents: Experimental and Computational Insights into the Mechanism of Action. *Polyhedron* 2022, 115767. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115767>

- [30] Tomasello, G.; Armenia, I.; Molla, G. The Protein Imager: A Full-Featured Online Molecular Viewer Interface with Server-Side HQ-Rendering Capabilities. *Bioinformatics* 2020, 36 (9), 2909–2911. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa009>
- [31] Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Fährrolfes, R.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Steinegger, R.; Rarey, M. ProteinsPlus: Interactive Analysis of Protein–Ligand Binding Interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2020, 48 (W1), W48–W53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa235>
- [32] Filik, A., Asiye Aslıhan Avan, Nilay Altaş Puntar, Mustafa Özyürek, Zeynep Banu Güngör, Mine Kucur, Handan Kamış, Diclehan Ali Dicle. Ethylenediamine grafted carbon nanotube aerogels modified screen-printed electrode for simultaneous electrochemical immunoassay of multiple tumor markers, *JouRNAI of Electroanalytical Chemistry*, v. 900, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115700>
- [33] J. Watterson, P.A.E. Piunno, U.J. Krull, Practical physical aspects of interfacial nucleic acid oligomer hybridisation for biosensor design, *Anal Chim Acta.* 469 (2002) 115– 127. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00125-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00125-3)
- [34] Ricco G, Popa DC, Cavallone D, Iacob S, Salvati A, Tabacelia D, Oliveri F, Mascolo G, Bonino F, Yuan Q, Xia NS, Gheorghe L, Brunetto MR. Quantification of serum markers of hepatitis B (HBV) and Delta virus (HDV) infections in patients with chronic HDV infection. *J Viral Hepat.* 2018 Aug;25(8):911-919. <https://doi.org/10.1111/jvh.12895>
- [35] Caviglia, Gian Paolo, Alessia Ciano, and Mario Rizzetto. "A Review of HDV Infection." *Viruses* 14, no. 8 (2022): 1749. <https://doi.org/10.3390/v14081749>
- [36] de Castro, A.C.H., Kochi, L.T., Flauzino, J.M.R. *et al.* Electrochemical Biosensor for Sensitive Detection of Hepatitis B in Human Plasma. *Appl Biochem Biotechnol* **194**, 2604–2619 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03829-4>

- [37] OLIVEIRA, DANIELLE A. ; SILVA, JUSSARA V. ; FLAUZINO, JOSÉ M.R. ; SOUSA, HELIANE S. ; CASTRO, ANA C.H. ; MOÇO, ANNA C.R. ; SOARES, MÁRCIA M.C.N. ; Madurro, João M. ; **Brito-Madurro, Ana G.** Carbon nanomaterial as platform for electrochemical genosensor: A system for the diagnosis of the hepatitis C in real sample. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, v. 844, p. 6-13, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.045>
- [38] Oliveira DA, Silva JV, Flauzino JMR, Castro ACH, Moço ACR, Soares MMCN, Madurro JM, Brito-Madurro AG. Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus. Anal Biochem. 2018 May 15;549:157-163. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>
- [39] Štukovnik Z, Bren U. Recent Developments in Electrochemical-Impedimetric Biosensors for Virus Detection. Int J Mol Sci. 2022 Dec 14;23(24):15922. <https://doi.org/10.3390/ijms232415922>
- [40] Georgacopoulos O, Nunnally NS, Le N, Lysen C, Welsh RM, Kordalewska M, Perlin DS, Berkow EL, Sexton DJ. Performance Evaluation of Culture-Independent SYBR Green *Candida auris* Quantitative PCR Diagnostics on Anterior Nares Surveillance Swabs. J Clin Microbiol. 2020 Aug 24;58(9):e00690-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00690-20>
- [41] Malczynski M, Dowllow N, Rezaeian S, Rios J, Dirnberger L, Zembower JA, Zhu A, Qi C. Optimizing a real-time PCR assay for rapid detection of *Candida auris* in nasal and axillary/groin samples. J Med Microbiol. 2020 Jun;69(6):824-829. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001207>
- [42] Z. Shabaninejad, F. Yousefi, A. Movahedpour, Y. Ghasemi, S. Dokanehiifard, S. Rezaei, R. Aryan, A. Savardashtaki, H. Mirzaei, Electrochemical-based biosensors for microRNA detection: Nanotechnology comes into view, Anal Biochem. 581 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113349>

- [43] Guedes, P. H. G.; Brussasco, J. G.; Moço, A. C. R.; Moraes, D. D.; Flauzino, J. M. R.; Luz, L. F. G.; Almeida, M. T. G.; Soares, M. N.; Oliveira, R. J.; Madurro, J. M.; Brito-Madurro, A. G. Ninhydrin as a Novel RNA Hybridization Indicator Applied to a Highly Reusable Electrochemical Genosensor for *Candida Auris*. *Talanta* 2021, 122694. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>
- [44] Antunes, V. U.; Llontop, E. E.; Vasconcelos, F. N. da C.; López de los Santos, Y.; Oliveira, R. J.; Lincopan, N.; Farah, C. S.; Doucet, N.; Mittermaier, A.; Favaro, D. C. Importance of the B5– $\beta$ 6 Loop for the Structure, Catalytic Efficiency, and Stability of Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamase Subfamily OXA-143. *Biochemistry* 2019, 58 (34), 3604–3616. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00365>
- [45] Alves, L. M.; Barros, H. L. S.; Flauzino, J. M. R.; Guedes, P. H. G.; Pereira, J. M.; Fujiwara, R. T.; Mineo, T. W. P.; Mineo, J. R.; de Oliveira, R. J.; Madurro, J. M.; Brito-Madurro, A. A Novel Peptide-Based Sensor Platform for Detection of Anti-Toxoplasma Gondii Immunoglobulins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, 175, 112778. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112778>.



## **Dispositivo com plataforma transparente para detecção colorimétrica e óptica de hepatite D**

### **Campo da Invenção**

A hepatite delta, ou hepatite D (HD) é causada pelo vírus da hepatite delta (HDV), um vírus de RNA que requer uma função auxiliar obrigatória do vírus da hepatite B (HBV) para sua transmissão *in vivo*. O HDV pode ser transmitido apenas na presença da infecção por HBV, resultando em dois tipos de infecção: coinfeção (infecção simultânea de um indivíduo com HBV e HDV) ou superinfecção (indivíduo cronicamente infectado com HBV) (Farci, P. J. *Hepatol.* v. 39, p. S212–S219, 2003). Com um genoma de RNA circular contendo 1700 bases, o HDV é o menor agente infeccioso conhecido (Rizzetto, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 77, p. 6124–6128, 1980).

O vírion HDV é uma partícula de aproximadamente 36 nm, que apresenta RNA HDV e o antígeno da hepatite delta (AgHD), seu RNA é uma fita simples, circular e pequeno (1700 nucleotídeos) (Taylor, J. M. *Virology.* v. 344, p. 71–76, 2006). A replicação do RNA do HDV é através de um “modelo de círculo duplo” em que a fita genômica é replicada por uma polimerase de um hospedeiro, no caso o HBV, para produzir uma estrutura linear multimérica que se autocatalítica em monômeros lineares que está ligado à progênie viral circular do RNA do HDV (Wedemeyer, H. and Manns, M. P. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* v. 7, p. 31–40, 2010).

Ao ocorrer uma coinfeção viral entre o HBV e HDV está associada a diversos modos de inibição da replicação viral (Raimondo, G. *et al.*, *Hepatology.* v. 43, p. 100–107, 2006). Nesta coinfeção, o HDV é capaz de suprimir a replicação do HBV (Raimondo, G. *et al.*, *Hepatology.* v. 43, p. 100–107, 2006; Jardi, R. *et al.*, *Hepatology.* v. 34, p. 404–410, 2001; Sagnelli, E. *et al.*, *Hepatology.* v. 32, p. 1106–1110, 2000; Colombo, P. *et al.*, *J. Hepatol.* v. 12, p. 64–69, 1991). De maneira que entre 70-90% dos pacientes com hepatite delta apresentam AgHB negativos ou com baixos níveis séricos do DNA do HBV.

No Brasil a hepatite delta apresenta índices de prevalência altos sobretudo na Bacia Amazônica, de maneira que cerca de 41% e 27% dos casos

notificados no país são centrados nos estados do Amazonas e Acre, respectivamente. No último censo, verificou-se que entre 1999 e 2019, foram notificados 4156 casos confirmados de hepatite delta no Brasil, sendo que a grande ocorrência ocorreu na região Norte, com 74,9% dos casos notificados. As regiões Sudeste, Sul, Nordeste e Centro-Oeste abrangeram 10,3%, 5,9%, 5,5% e 3,4% dos casos, respectivamente. Em 2019, foram notificados 175 casos no país, sendo 104 (71,7%) na região Norte (*Boletim hepatites virais*, Ministério da Saúde, 2020)

As formas de transmissão podem ser por meio de relações sexuais sem preservativo com uma pessoa infectada, da mãe infectada durante a gestação e parto; compartilhamento de material para uso de drogas (seringas, agulhas, cachimbos), compartilhamento de materiais de higiene pessoal (lâminas de barbear e depilar, escovas de dente, alicates de unha ou outros objetos que furam ou cortam), na confecção de tatuagem e colocação de piercings, procedimentos odontológicos ou cirúrgicos que não atendam às normas de biossegurança, por contato próximo de pessoa a pessoa (cortes, feridas e soluções de continuidade) e através de transfusões de sangue (*Boletim hepatites virais*, Ministério da Saúde, 2020).

Os sintomas da infecção pelo HDV são brandos, como náusea, dor abdominal, pele e olhos amarelos e fadiga, isto posto muitos pacientes ignoram esses sintomas o que agrava a infecção pelo seu corpo, gerando complicações de saúde severas. Considerando que a hepatite delta crônica é a forma mais grave de hepatite viral crônica, com evolução rápida para cirrose e um risco alto para carcinoma hepatocelular (CHC), descompensação, e morte (Fattovich, G. *et al.*, *Infect. Dis.* v. 155, p. 931–935, 1987).

A hepatite delta é a única da família das hepatites que não possui tratamento estabelecido, contudo, vários procedimentos terapêuticos podem ser empregados. O monitoramento regular da infecção por HDV é importante pois existem diferentes padrões de vírus que estão associados com resultados clínicos diferentes e requerem estratégias de tratamento diferentes, logo precisam ser adaptados durante o acompanhamento do paciente.

Portanto, o monitoramento, o diagnóstico rápido, acurado e *point-of-care* para HDV é imprescindível para evitar o agravamento dessa infecção, assim

como promover uma melhora na prevenção e no controle nas áreas endêmicas, sobretudo na região norte do Brasil.

Atualmente, os métodos para os diagnósticos de HDV consistem, principalmente, na em técnicas moleculares que utilizam a amplificação de DNA, como por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR) e entre outros, os quais estão presentes nas invenções: CN1515689A, US20160032411A1, ES2282823T3, EP3055426B1. Além disso, imunoensaios são utilizados, como por exemplo ELISA e entre outros, os quais são apresentados nas seguintes invenções: JPH0848694A, US10416161B2, AT100857T US20150111767A1, US5445932A, WO2019219840A1, US20150111767A1, WO2019219840A1 e US20150111767A1. As metodologias apresentadas possuem inúmeras desvantagens, como: manuseio laborioso, equipamentos essenciais de alto custo e necessidade de profissionais altamente especializados para realizar técnicas complexas. Nesse sentido, como alternativa temos os biossensores.

Os biossensores consistem em um dispositivo que por meio de reações bioquímicas podendo ser mediadas por enzimas, anticorpos, células e DNA para identificar compostos químicos geralmente por sinais elétricos, térmicos, colorimétricos ou ópticos (IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*). Os genossensores colorimétricos e ópticos se destacam pois promovem uma detecção acurada por ensaios colorimétricos, resultado a olho nu, e ópticos, resposta por meio da absorbância. Esses genossensores focam na sequência específica do DNA de diversos organismos, neste caso, HDV (Nejati, K., *et al.*, *Journal of Cluster Science*, 2021). Eles apresentam inúmeras vantagens, tais como: baixo custo, resultados rápidos, seletividade, capacidade de miniaturização, simplicidade instrumental e operacional em relação à maioria das técnicas analíticas, possibilitando o diagnóstico *point-of-care* (Suhito, I. R., *et al.*, *Biomedicines*, v. 9(1), p. 15, 2021).

O dispositivo dessa invenção é composto por uma plataforma transparente e uma molécula de fita simples de DNA (HDV1) correspondente a uma região altamente específica do HDV. A detecção será colorimétrica, ou seja, capaz de ver o resultado a olho nu, e também óptica, o qual analisa as amostras e a absorbância promovida entre indicador e a dupla fita de DNA. Detecção do material genético em concentrações baixas, mostrando-se como uma ótima opção em relação aos métodos tradicionais. Portanto, o dispositivo desenvolvido

se apresenta com um genossensor de baixo custo, específico para hepatite delta, sensível com uma faixa linear e baixo limite de detecção, específico para hepatite delta.

### **Descrição e detalhamento dos componentes da invenção**

Nesta invenção, todos os reagentes utilizados apresentavam grau analítico. Para desenvolver este dispositivo, colorimétrico e óptico foram utilizados como materiais: impressora a laser, folha de acetato de celulose (AC), DMSO, Et (1M), água deionizada, tampão fosfato (TF) (0,1 M, pH 7,4), álcool isopropanol, álcool etanol 70%, brometo de etídio (BE) (10 mg / mL) e os oligonucleotídeos:

HDV1: 5'-GAGATGCCATGCCGACCCGAAGAG-3'

HDV2: 5'-CTCTTCGGGTCTGGCATGGCATCTC-3'

HCV2: 5'-CCCCTGTGAGGACTTCTGTCTTC-3'

HBV2: 5'-GAGGAGTTGGGGAGCACATT-3'

Norte brasil, norte do brasil hdv come o viado, onde come o viado, viado transmite o vírus? Como é a via de transmissão -comida caç, sangue, monitoramento ambiental

Assim como soro humano, estufa seca, câmara escura com luz ultravioleta acoplada, câmera fotográfica, programa para quantificar a emissão absorvância (Abs) de onda do BE. Para verificar a morfologia e as mudanças na superfície da plataforma foi utilizado o Microscópio de Varredura por Sonda no modo DFM (*dynamic force microscopy*).

Primeiramente, foi desenvolvido o design da plataforma, pelo *software* Adobe Photoshop, esse design foi produzido com o fim de auxiliar e guiar a pessoa que manuseia o dispositivo. De modo que esse desenho contém 6 áreas de trabalho circulares, onde serão realizadas às reações de imobilização e hibridização da sonda HDV1 e do alvo HDV2. Esse software pode ser substituído

por CorelDraw, Adobe Illustrator, Microsoft Powerpoint, Microsoft Word, Microsoft Paint, Pixlr, GIMP, Procreate, Krita, Clip studio paint, Autocad e Paint Tool SAI.

A descontaminação da folha AC foi feita com álcool 70%, seguida pela impressão a laser do desenho da plataforma na folha A4 de AC, na qual foi possível recortar cada plataforma da folha A4 AC usando uma tesoura, separando cada plataforma delimitada pelo design. Sendo que a folha de AC pode ser substituída por polimetilmetacrilato (PMMA), policloreto de vinila (PVC), policarbonato e polipropileno. A folha de AC foi escolhida como base do dispositivo, por ser de baixo custo, folha de AC do tamanho A4, de modo que cada A4 resulta em 30 plataformas, assim cada base de AC do dispositivo terá um baixo custo. Além disso, a folha de AC é facilmente encontrada, apresenta uma grande transparência, a qual permite observar se a plataforma está contaminada, suja ou marcada com algo, e a transparência do AC não interfere na observação do resultado a olho nu e nem na leitura da Abs.

Para a modificação da plataforma, foram utilizados DMSO e Et. De maneira que o Et 1 M, foi homogeneizado em DMSO (99,9%), seguida a folha de AC recortada foi transferida para essa solução durante 15 minutos, logo após a mesma folha de AC foi mergulhada em álcool isopropílico para ativar os grupos aminos adicionados pelo Et na plataforma. Após a modificação da folha de acetato de celulose (ACM), ela foi mantida em repouso *overnight* em temperatura ambiente para secagem. A reação do Et com DMSO na superfície, promovida pelo grupo  $SN_2$ , resulta em uma pequena molécula, uma amida ( $-CO - NH - CH_2 - CH_2 - NH_2$ ) ligada ao grupo, sendo este complexo depositado na superfície da plataforma. Essa modificação pode ser substituída por polímeros e monômeros orgânicos e inorgânicos, polímeros e monômeros condutores e não condutores e nanocompósitos.

Para continuar o desenvolvimento do dispositivo ou biossensor, foi adicionado  $10^{-4}$  M da sonda de HDV1, nas áreas de trabalho circulares delimitadas pelo design. A sonda foi mantida durante 2 horas em temperatura ambiente para imobilização via adsorção física. Há outros tipos de imobilizações

de sonda que podem ser utilizados, como: aprisionamento ou oclusão, ligação cruzada e ligação covalente.

Com a finalidade de certificar que a plataforma com a sonda imobilizada (ACM/ HDV1) reconhecerá o oligonucleotídeos do alvo (HDV2) e para simular o máximo possível de sistemas reais, foi gotejado  $10^{-4}$  M do alvo complementar HDV2 em cada área de trabalho em amostra o soro (diluído 10x Volume / Volume em TF) de um paciente saudável enriquecido com HDV2, logo a plataforma foi acondicionada em um recipiente úmido hermeticamente fechado por 1 hora à 68°C. Seguidamente, a plataforma foi lavada com TF para remover os oligonucleotídeos não hibridizados e, realizada a detecção visual, ou seja, qualitativa do resultado, de modo que foi adicionado 10 µL BE em cada área de trabalho sobre proteção da luz durante 15 minutos.

Após 2 lavagens em imersão por 5 segundos cada da plataforma com água deionizada, gotejou 20 µL de água deionizada em cada área de trabalho e transferiu a plataforma para uma câmara escura com luz ultravioleta. De maneira que quando o alvo (HDV2) hibridiza com a sonda (HDV1), o BE se intercala entre as bases nitrogenadas desse complexo, levando a emissão de fluorescência, visualizada como uma cor rosa forte em luz ultravioleta, sendo possível observar ao olho nu. Considerando que o BE pode ser substituído por: SYBR Green I, 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI), Iodeto de Propídeo, azul de metileno e Hoechst. Além disso, foi realizado o ensaio de interferência para observar o resultado com o soro humano saudável enriquecido com amostra HDV2 apresentando ou não alterações significativas ao se comparar com as detecções das amostras purificadas.

Para os testes de especificidade do dispositivo, onde avalia se ele é capaz de discriminar o HDV2 de outras moléculas presentes em uma amostra complexa. Dessa forma, foi adicionado em soro humano (diluído 10x em TF), os oligonucleotídeos do HCV e HBV. Assim, em cada área de trabalho foi gotejado 10 µL de HCV ( $10^{-4}$  M) em uma plataforma e HBV ( $10^{-4}$  M) em outra, na sequência foi seguido o mesmo protocolo do HDV2, em que as plataformas foram acondicionadas em um recipiente úmido hermeticamente fechado por 1 hora à 68°C, seguida pela lavagem da plataforma e adição do BE para a

revelação do resultado com a emissão de fluorescência sob a luz ultravioleta e com a leitura da Abs emitida do mesmo em 560 nm, onde foi verificado a formação do *duplex* HDV1:HDV2.

A concentração de sonda HDV1 foi otimizada, utilizando como alvo complementar os oligonucleotídeos HDV2 em solução TF para diferentes concentrações de sonda HDV1 ( $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  M). Findada a otimização da sonda, foi construído uma curva de calibração utilizando-se como amostra o soro de um paciente saudável enriquecido com diferentes concentrações do HDV2, por meio do valor da Abs do emitido pelo indicador BE. O soro pode ser substituído por outros tipos de amostras biológicas como plasma e sangue. Posto que foi adicionado BE para se obter a revelação do resultado quantitativo e qualitativo, o qual tem como característica principal, sua capacidade de intercalar entre os pares de base do DNA, tornando possível a sua visualização através da emissão de fluorescência.

Com esse dispositivo desenvolvido nesta invenção é possível visualizar a olho nú o resultado qualitativo, ou seja, se a amostra é positiva (fluorescência rosa forte) ou negativa (sem coloração). Considerando que em amostras negativas não há hibridização do DNA, logo não haverá pares de bases nitrogenadas para o BE intercalar.

## **Exemplos de preparo**

### **Exemplo de preparo 1: Desenho e impressão da plataforma**

Com a intenção de guiar o responsável por realizar o diagnóstico de HDV, foi desenvolvido um design da plataforma do dispositivo, onde é delimitada as áreas de trabalho, local este onde será depositado o soro do paciente para o teste. Para isso, criou-se o desenho no programa Adobe Photoshop, sendo que o design da plataforma contém as seguintes dimensões: 5 cm altura x 3 cm largura, e as 6 áreas de trabalho circulares nomeadas de A, B, C, D, E, F, com diâmetro de 0,5 cm, como ilustrado na FIGURA 2. Em cada área de trabalho possui dimensão suficiente para uma gota de até 20  $\mu$ L. Após concretizado o

design, é realizada a sua impressão na folha de AC. Antes dessa etapa, a folha de AC é higienizada com álcool 70% para remover qualquer contaminação que possa existir em sua superfície. Posteriormente, a impressão da plataforma é realizada em impressora a laser. Seguida pelo corte, utilizando uma tesoura, de cada plataforma delimitada pelo desenho impresso. Visto isso, com apenas uma impressão em uma folha A4 de acetato de celulose, é possível se obter até 30 plataformas para a produção do dispositivo.

### **Exemplo de preparo 2: Modificação da superfície da plataforma de acetato de celulose**

Antes da modificação química, é necessário realizar uma segunda limpeza com álcool 70% por 5 minutos, em temperatura ambiente no ultrasonicador a fim de retirar qualquer contaminação que esteja em sua superfície. Logo em seguida, ela é seca em nitrogênio N<sub>2</sub>. Como a plataforma é constituída de AC, implementa-se uma mudança química em sua superfície para que os oligonucleotídeos sonda e alvo do HDV, tenha grupos químicos que auxiliam a sua imobilização e estabilidade. Assim sendo, foi utilizado o Et (1 M) para adicionar terminal amina na superfície da plataforma, para isso elas foram imersas em uma solução de Et (1 M) em DMSO durante 15 minutos em temperatura ambiente, sob agitação leve e constante. Seguidamente, a plataforma modificada com amina foi lavada com isopropanol e seco com N<sub>2</sub>, como ilustrado na FIGURA 1.

### **Exemplo de preparo 3: Imobilização da sonda HDV1 na superfície da plataforma de acetato de celulose modificada (ACM)**

A imobilização da sonda HDV1 sobre as áreas de trabalho da plataforma modificada, gotejou 10 µL desta sonda na concentração de 10<sup>-4</sup> M (diluída em TF). Acondicionou-se a plataforma em um recipiente hermeticamente fechado durante 2 horas, em temperatura ambiente, a fim de manter solução com a sonda de DNA em volume constante na superfície. A imobilização da sonda acontece

por meio de adsorção física, devido aos grupamentos aminos disponíveis para a sonda, a qual possibilita uma interação efetiva entre a superfície da plataforma ACM com a sonda de DNA. Em seguida, as áreas de trabalho foram lavadas por imersão em solução TF por 5 segundos com o objetivo de eliminar os oligonucleotídeos não imobilizados na superfície.

#### **Exemplo de preparo 4: Hibridização da sonda HDV1 e alvo complementar HDV2**

Para certificar que o biossensor está apto a reconhecer a sonda, foi adicionado 10 µL de oligonucleotídeo do alvo HDV2 na concentração de  $10^{-4}$  M (diluído em TF) nas áreas de trabalho plataforma ACM já imobilizada com a sonda (ACM/ HDV1). Logo, acondicionou-se a plataforma em uma câmara úmida hermeticamente fechada durante 1 hora a 68°C, temperatura ótima de hibridização do HDV2.

#### **Exemplo de preparo 5: Detecção colorimétrica e óptica do HDV utilizando o brometo de etídio**

Posteriormente à hibridação de HDV1:HDV2, é realizada a revelação do resultado qualitativo, ou seja, se a amostra é positiva ou negativa para hepatite delta. Para tanto, ao retirar a plataforma da câmara úmida, cada área de trabalho é lavada por meio de imersão em TF por 5 segundos e em seguida é gotejado 10 µL de BE, logo depois a plataforma é reservada sobre a proteção da luz durante 15 minutos. Em seguida, cada área de trabalho da plataforma é lavada por meio de imersão em água deionizada por 5 segundos, a fim de retirar qualquer material genético e BE não ligado à superfície. Dessa forma, é observado que em cada área de trabalho se encontra com a coloração do BE, vermelho. Considerando que o BE tem afinidade pelas duplas fitas de DNA, se intercalando entre elas, logo quando o alvo se hibridiza com a sonda imobilizada, o BE irá se intercalar entre as bases nitrogenadas do HDV1/HDV2.

Para visualização do resultado, é gotejado 20 µL de água deionizada em cada área de trabalho, em seguida a plataforma é movida para uma câmara de luz ultravioleta, onde é possível observar a emissão da fluorescência do BE intercalado no *duplex* HDV1:HDV2, à qual se apresenta numa coloração rosa forte, revelando um resultado positivo para hepatite delta, como observado na FIGURA 3A. Isto posto, é possível obter um diagnóstico colorimétrico e óptico, por meio da observação da emissão de fluorescência do BE, de forma que ao entrar em contato com o DNA do HDV hibridizado emitirá uma coloração distinta. Ao contrário, ou seja, quando não haverá material genético reconhecido pela sonda imobilizada na plataforma, logo não existem bases nitrogenadas para o BE se intercalar, de maneira que será descartado quando a plataforma é lavada com a água deionizada, e assim não havendo emissão de fluorescência alguma.

A análise óptica, foi através da leitura da Abs do BE em 560 nm, em que com uma câmera fotográfica de alta resolução, acoplada em um filtro que isola o comprimento de onda específico do BE. Posteriormente, foi realizada a quantificação do material genético, através de um código de programação homebuilt em Matlab para determinar o valor do coeficiente de absorção óptica. Através desta avaliação, é possível obter um valor que quantifica a concentração do DNA do HDV presente na amostra.

### **Exemplo de preparo 6: Estudo de interferência em amostras biológicas**

No estudo de interferência foi utilizado soro humano saudável diluído (10x em TF) como amostra biológica, sendo que neste ensaio verifica-se se o resultado com o soro enriquecido com amostra alvo HDV2 na concentração  $10^{-4}$  M, apresenta ou não alterações significativas ao se comparar com as detecções feitas em amostras purificadas. Dessa forma, foi adicionado 10 µL do alvo em soro na plataforma ACM/ HDV1 em todas as seis áreas de trabalho. Imediatamente, acondicionou-se a plataforma em uma câmara úmida hermeticamente fechada durante 1 hora a 68°C. Assim, foi realizada a visualização do resultado qualitativo, por meio da observação a olho nu da

plataforma sobre a luz ultravioleta, a avaliação quantitativa foi através da leitura da Abs do BE em 560 nm, como observado na FIGURA 5.

### **Exemplo de preparo 7: Estudo da especificidade do dispositivo**

A avaliação da especificidade desta invenção tem como objetivo confirmar que o sistema neste dispositivo de diagnóstico é específico. A FIGURA 6 demonstra o ensaio de especificidade. Foi utilizado como controle positivo o soro (diluído 10x em TF), enriquecido com HDV2 na concentração de  $10^{-4}$  M. Enquanto para os alvos negativos, foram utilizados os oligonucleotídeos do HCV e HBV, ambos na mesma concentração que o controle positivo.

Assim, após a imobilização da sonda do HDV1 (exemplo de preparo 3), é gotejado 10 µL de solução contendo HCV2 nas áreas de trabalho, em outra plataforma ACM/HDV1, foi gotejado o mesmo volume de solução, mas contendo o HBV2, do mesmo modo foi feito na amostra de HDV2. Posteriormente à hibridação do DNA (exemplo de preparo 4), é realizada a revelação do diagnóstico qualitativo e quantitativo do vírus (exemplo de preparo 5), ou seja, se a amostra é positiva ou negativa para vírus da hepatite delta. Ao retirar a plataforma da câmara úmida, cada área de trabalho é lavada em imersão no TF e em seguida é gotejado 10 µL de BE em cada uma, logo depois a plataforma é reservada sobre a proteção da luz durante 15 minutos.

Em seguida, cada área de trabalho das plataformas é lavada em imersão em água deionizada, por 2 vezes por 5 segundos cada imersão, a fim de retirar qualquer material genético e BE não ligado à plataforma.

Para a visualização do resultado, é gotejado 20 µL de água deionizada em cada área de trabalho, logo a plataforma é transferida para uma câmara de luz ultravioleta, para verificar a emissão da fluorescência do BE. Visto que, para obter um diagnóstico colorimétrico para o vírus, por meio do indicador o BE, o indicador ao entrar em contato com o *duplex* HDV1:HDV2 emitirá uma coloração rosa forte. Contudo, em frente ao DNA não complementar, tal qual do HDV1:HCV2 e do HDV1:HBV2, não haverá material genético reconhecido pela sonda imobilizada na plataforma, e logo não existirá bases nitrogenadas para o

BE se intercalar e será descartado quando a plataforma for lavada com a água deionizada. Para quantificar o resultado, com uma câmera fotográfica de alta resolução, acoplada em um filtro que isola o comprimento de onda específico do BE, foi feita a quantificação através de um código de programação homebuilt em Matlab para determinar o valor do coeficiente de absorção óptica.

### **Exemplo de preparo 8: Construção da curva de calibração do biossensor**

Para a construção da curva de calibração ( $n = 3$ ) do dispositivo com a plataforma ACM com a sonda HDV1 devidamente imobilizada nas áreas de trabalho (exemplo de preparo 3), foi gotejado 10  $\mu\text{L}$  de cinco concentrações diferentes alvo HDV2 diluído em soro ( $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M e  $10^{-9}$  M) (exemplo de preparo 4), o limite de detecção (LOD) foi observado a menor concentração detectada, assim como a sensibilidade foi analisada, como observado na FIGURA 7. Posteriormente, reservou a plataforma em uma câmara úmida hermeticamente fechada durante 1 hora na temperatura de 68°C. Em seguida foi realizada a lavagem em imersão em TF por 5 segundos e gotejado 10  $\mu\text{L}$  de BE em cada uma das áreas de trabalho, logo depois a plataforma é reservada sobre a proteção da luz durante 15 minutos. O BE é lavado em imersão em água deionizada por 2 vezes, durante 5 segundo cada imersão.

A construção da curva de calibração do dispositivo, é uma etapa de extrema importância, pois demonstra a característica quantitativo da invenção. Posto que foi utilizado o valor da Abs do BE, 560 nm, como indicador de quantificação de *duplex* HDV1:HDV2 presente na plataforma, de modo que a concentração do BE é diretamente proporcional à concentração de *duplex* da hepatite delta. Assim sendo, foi utilizado uma câmera fotográfica de alta resolução, acoplada em um filtro que isola o comprimento de onda específico do BE. Através de um programa usamos um código de programação homebuilt em Matlab para determinar o valor do coeficiente de absorção óptica, executado pelo MatLab, o qual é responsável em detectar o valor absoluto da Abs do BE em cada concentração de alvo, em que se encontra intercalado entre as bases nitrogenadas do HDV1:HDV2 (exemplo de preparo 5). As amostras de soro

utilizadas apresentam possibilidade de substituição por outros fluídos biológicos como sangue e plasma.

#### **Exemplo de preparo 9: Detecção das amostras biológicas por microscopia de varredura por sonda na superfície do biossensor.**

A superfície do acetato de celulose foi analisada em um Microscópio de Varredura por Sonda no modo DFM (*dynamic force microscopy*) em múltiplas etapas do processo de fabricação do biossensor: sem modificação, modificado com DMSO e Et, após a incorporação da sonda e detecção de alvos positivos e negativos purificados e na presença de soro humano, presente na FIGURA 8 e na FIGURA 9.

#### **Descrição das figuras**

As FIGURAS em anexo têm como objetivo mostrar os procedimentos realizados para a produção, os resultados obtidos do dispositivo e sua caracterização.

Na FIGURA 1 demonstra um diagrama didático, o qual representa as principais fases do desenvolvimento do dispositivo.

A FIGURA 2 apresenta o design do dispositivo de diagnóstico de hepatite delta, sendo que o desenho da plataforma foi desenvolvido considerando a praticidade de manuseio. Desse modo, é possível observar que a plataforma apresenta seis áreas de trabalhos circulares, sendo possível utilizar as seis áreas ao mesmo tempo para realizar seis diagnósticos de pacientes diferentes, como também fazer teste negativo e teste em duplicata na mesma plataforma.

A FIGURA 3 apresenta um conjunto de figuras do dispositivo onde cada plataforma contém resultados de diagnósticos diferentes ( $n = 3$ ). Assim, na FIGURA 3A se refere ao diagnóstico positivo para o vírus da hepatite delta, utilizando amostras de soro humano (10x em TF) enriquecido com o alvo HDV2. Logo, é possível observar que todas as áreas de trabalho apresentam coloração

rosa forte, pois o BE se intercalou entre as bases nitrogenadas do *duplex* HDV1:HDV2, portanto o diagnóstico qualitativo para hepatite delta nesta plataforma (FIGURA 3A) é positivo. Entretanto, na FIGURA 3B e 3C, é observado que em todas as áreas de trabalho não apresentam cor rósea, de modo que ambos dispositivos na FIGURA 3B e 3C foram testados para hepatite C e hepatite B, respectivamente, assim não houve a hibridização dos alvos (HCV2 e HBV2) com a sonda imobilizada (HDV1), portanto no BE não interage com o material genético, resultando em um diagnóstico negativo verdadeiro, validando o ensaio de especificidade do dispositivo desta invenção, sendo que apenas o alvo positivo (HDV2) é reconhecido pelo presente dispositivo desta invenção. Da mesma forma, ocorre na FIGURA 3D onde o dispositivo reage com o soro de um paciente saudável, em que não há presença dos alvos HDV2, HCV2 e HBV2, logo não apresenta hibridização com a sonda imobilizada, desse modo o BE não conseguiu interagir com o material genético presente nas áreas de trabalho, resultando em um diagnóstico verdadeiramente negativo.

Na FIGURA 4 apresenta os valores da Abs do dispositivo com imobilização da sonda (ACM/ HDV1) e sem imobilização da sonda (ACM) em TF (n= 3), onde o valor da Abs em ACM foi de 0,00137 u.a e o valor de Abs de ACM/ HDV1 foi de 0,00215 u.a, ou seja, houve um aumento do valor da Abs em  $1,56x \pm 1,8$  em ACM/ HDV1 comparando na ausência da sonda, indicando que a sonda HDV1 está de fato imobilizada na superfície do dispositivo.

Na FIGURA 5, a qual apresenta um histograma da detecção do alvo (HDV2) da Abs do BE (n = 3) com seus respectivos desvios padrão, referente ao ensaio de interferência do soro em amostras de pacientes. Com o objetivo de verificar se os constituintes do soro interferem significativamente no valor da Abs. O alvo HDV2 presente em soro humano (10x em TF) (ACM/ HDV1/ HDV2 soro) e presente em TF (ACM/ HDV1/ HDV2), comparando-os com os dispositivos contendo apenas a imobilização da sonda (ACM/ HDV1) e na presença soro humano saudável sem o alvo (ACM/ HDV1 soro). Logo, é possível observar que os maiores valores de Abs do indicador BE, foram nas amostras na presença de soro humano, ACM/ HDV1 soro e na amostra positiva para hepatite delta, ACM/ HDV1/ HDV2 soro, com 0,06853 u.a e 1,218 u.a, respectivamente. Considerando

que, nas amostras que estavam na presença de soro, houve aumento do valor da Abs, em ACM/ HDV1 / HDV2 soro é  $2,8x \pm 1,3$  maior ao comparar com o ACM/ HDV1/ HDV2 o qual estava em TF com valor de Abs de 0,422 u.a. Isto posto, no mesmo segmento na amostra ACM/ HDV1 soro obteve um valor de Abs 30x maior comparando com a amostra em ACM/ HDV1 em TF.

Dessa forma, este teste demonstrou que os componentes presentes no soro humano aumentam os valores da ABs do BE, contudo não modifica o diagnóstico considerando que o valor da Abs da amostra positiva em soro foi  $17x \pm 2,5$  mais significativo que a amostra com soro de paciente saudável, a ACM/ HDV1 soro.

Na FIGURA 6 apresenta o teste de especificidade ( $n = 3$ ), em forma de histograma, com os valores das médias e desvios-padrões dos controles negativos, em que verifica o comportamento do dispositivo na presença de alvos negativos com concentrações de  $10^{-4}$  M (HCV2 e HBV2), e como controle positivo foi utilizado HDV2 ( $10^{-4}$  M) enriquecido no soro (diluído 10x em TF). Os valores de Abs do BE dos alvos HCV2 e HBV2 foram 0,064 u.a e 0,058 u.a, respectivamente, e o controle positivo ACM/ HDV1 / HDV2 soro obteve um valor de Abs de 1,2 u.a. É possível observar que todos os controles negativos apresentaram valor de Abs menor que o controle positivo, o ACM/ HDV1/ HCV2 soro foi  $18x \pm 4$  menor e da amostra ACM/ HDV1/ HBV2 soro foi de  $20x \pm 0,9$  menor que o controle positivo. De maneira que o indicador de hibridação, o BE, se intercalou entre as bases nitrogenadas da amostra positiva, por meio da hibridização dos oligonucleotídeos da sonda HDV1 do alvo HDV2, pois não houve reconhecimento dos alvos negativos, impedindo que o BE interage com essas amostras, comprovando a especificidade do dispositivo apresentada nesta invenção.

A FIGURA 7 demonstra o gráfico da curva de calibração do dispositivo com diferentes concentrações de HDV2 adicionado ao soro de pacientes saudáveis. Através do gráfico da curva de calibração é possível observar a tendência da redução do valor da Abs do BE, de acordo com a redução da concentração do alvo HDV2. Portanto, o dispositivo desenvolvido nesta invenção é sensível a distintas concentrações do vírus da hepatite delta com um

coeficiente  $R = 0,999$  e equação da reta  $(Abs) = 2,092 (u.a) - 0,221(u.a) \cdot \log[HDV2] (M)$ , sendo que a concentração mínima detectada igual  $10^{-9} M$ . Portanto, a presente invenção é capaz de quantificar a concentração de HDV2 em soro.

Na FIGURA 8 representa as microscopias de varredura por sonda (MVS) da superfície do biossensor nas diferentes etapas de construção e na presença de alvos negativos e positivos purificados. A FIGURA 8A representa uma imagem de MVS da superfície do acetato de celulose sem modificação, com um coeficiente de rugosidade ( $R_q$ ) de  $3.51 \pm 0.42$  nm. Na FIGURA 8B temos uma microscopia da superfície do acetato de celulose após o procedimento de modificação com DMSO e Et, no qual observa-se uma diminuição da rugosidade ( $R_q = 2.13 \pm 0.18$  nm). A incorporação da sonda de DNA na superfície do biossensor, representado na microscopia da FIGURA 8C aumenta a rugosidade da superfície ( $R_q = 20.31 \pm 2.78$  nm). A adição do alvo positivo (sequência de DNA complementar), representado na microscopia da FIGURA 8D diminui a rugosidade ( $R_q = 11.2 \pm 0.96$  nm), devido a um melhor espalhamento e difusão da amostra na superfície do biossensor, uma vez que ela possui afinidade pela sonda incorporada. Em contrapartida, ao adicionar o alvo negativo, representado na microscopia da FIGURA 8E, temos um aumento na rugosidade ( $R_q = 33.83 \pm 2.86$  nm) e pode-se observar a formação de pequenos agregados, devido a não afinidade entre essa amostra e a superfície, que no processo de secagem tende a formar aglomerados.

A FIGURA 9 representa as microscopias de varredura por sonda (MVS) da superfície do biossensor na presença de soro humano normal e enriquecido com alvos positivo e negativo. Enquanto na FIGURA 9A temos a superfície do biossensor modificada com a sonda de DNA ao adicionar uma amostra de soro saudável, sem enriquecimento, no qual observa-se um coeficiente de rugosidade de  $22.47 \pm 3.65$  nm. Quando um soro enriquecido com alvo positivo é incorporado no biossensor, representado na microscopia da FIGURA 9B, temos uma diminuição da rugosidade ( $R_q = 15.23 \pm 1.22$  nm), devido ao supracitado fato de melhor espalhamento e difusão da amostra positiva na superfície do biossensor, processo inverso ao adicionar soro enriquecido com alvo negativo,

representado na microscopia da FIGURA 9C, no qual a rugosidade aumenta ( $R_q = 80.07 \pm 9.34$  nm) e há a formação de agregados, indicando a não afinidade entre essa amostra e a superfície. Sendo assim, é possível uma distinção de amostras positivas e negativas por microscopia de varredura por sonda na superfície do biossensor.

## REIVINDICAÇÕES

1. **Dispositivo com plataforma transparente para detecção colorimétrica e óptica de hepatite D**, caracterizado por apresentar os seguintes componentes: folha de acetato de celulose modificada com dimetilsulfóxido e Etilenodiamina e sonda de DNA para a detecção específica do DNA do vírus da hepatite delta em amostra biológica.

2. **BIOSSENSOR de acordo com a reivindicação 1**, caracterizado por utilizar o software Adobe Photoshop para design gráfico da plataforma, podendo ser substituído por CorelDraw, Adobe Illustrator, Microsoft Powerpoint, Microsoft Word, Microsoft Paint, Pixlr, GIMP, Procreate, Krita, Clip studio paint, Autocad e Paint Tool SAI.

3. **METODOLOGIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR**, caracterizada por apresentar as seguintes etapas:

- a. Modificação da superfície da folha de acetato com dimetilsulfóxido e etildimetilamina;
- b. Imobilização da sonda de DNA HDV1 5'-GAGATGCCATGCCGACCCGAAGAG-3' por adsorção física;
- c. Adição de soro enriquecido com alvo complementar e hibridização entre a sonda e o alvo;
- d. Detecção de absorbância de onda e a olho nu, utilizando brometo de etídio como indicador de hibridização do DNA.

4. **METODOLOGIA** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por utilizar folha de acetato, podendo ser substituída por

polimetilmetacrilato (PMMA), policloreto de vinila (PVC), policarbonato e polipropileno.

5. **METODOLOGIA** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por utilizar dimetilsulfóxido e etildimetilamina, podendo ser substituída por polímeros e monômeros orgânicos e inorgânicos, polímeros e monômeros condutores e não condutores e nanocompósitos.

6. **METODOLOGIA** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por imobilizar a sonda de DNA utilizando adsorção física, podendo ser substituída por aprisionamento ou oclusão, ligação cruzada e ligação covalente.

7. **METODOLOGIA** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por enriquecimento de soro com o alvo complementar HDV2, podendo ser substituído por outro tipo de amostra biológica como, urina, saliva, plasma e sangue.

8. **METODOLOGIA** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por utilizar brometo de etídio como indicador de hibridização, podendo ser substituído por SYBR Green I, 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI), Iodeto de Propídeo, azul de metileno e Hoechst.

FIGURA 1

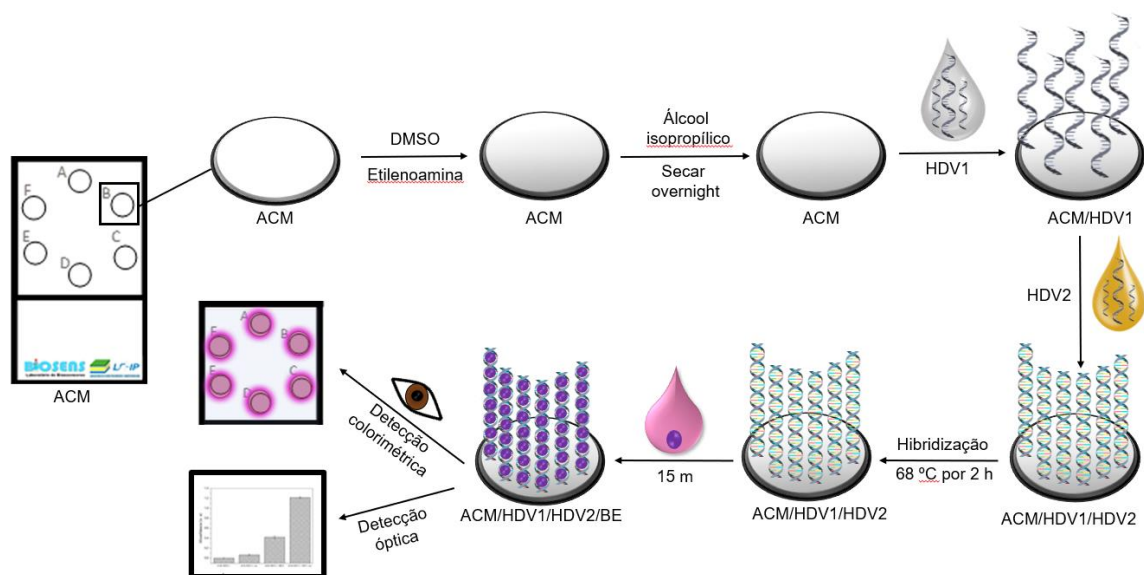


FIGURA 2

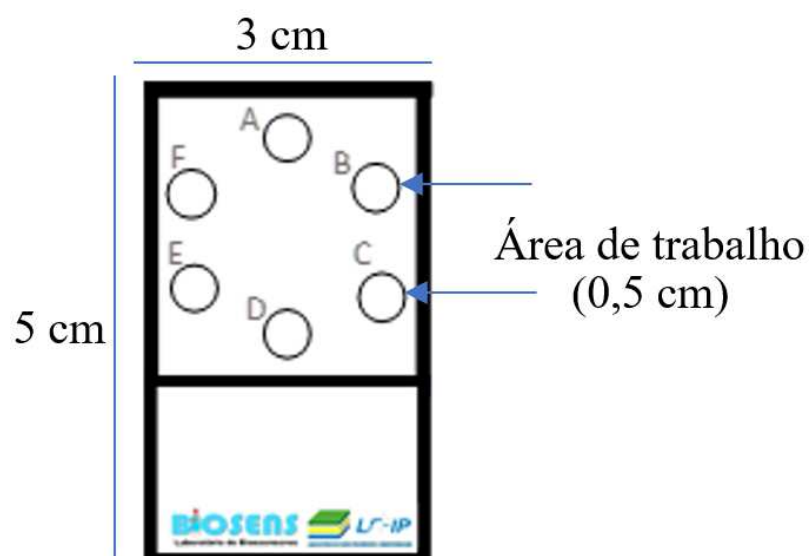


FIGURA 3

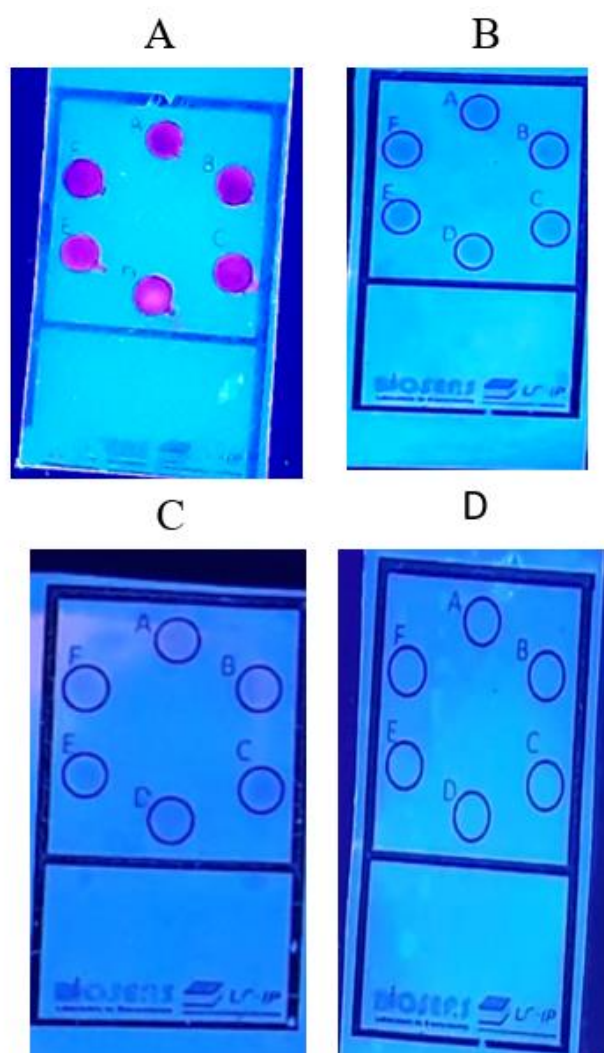
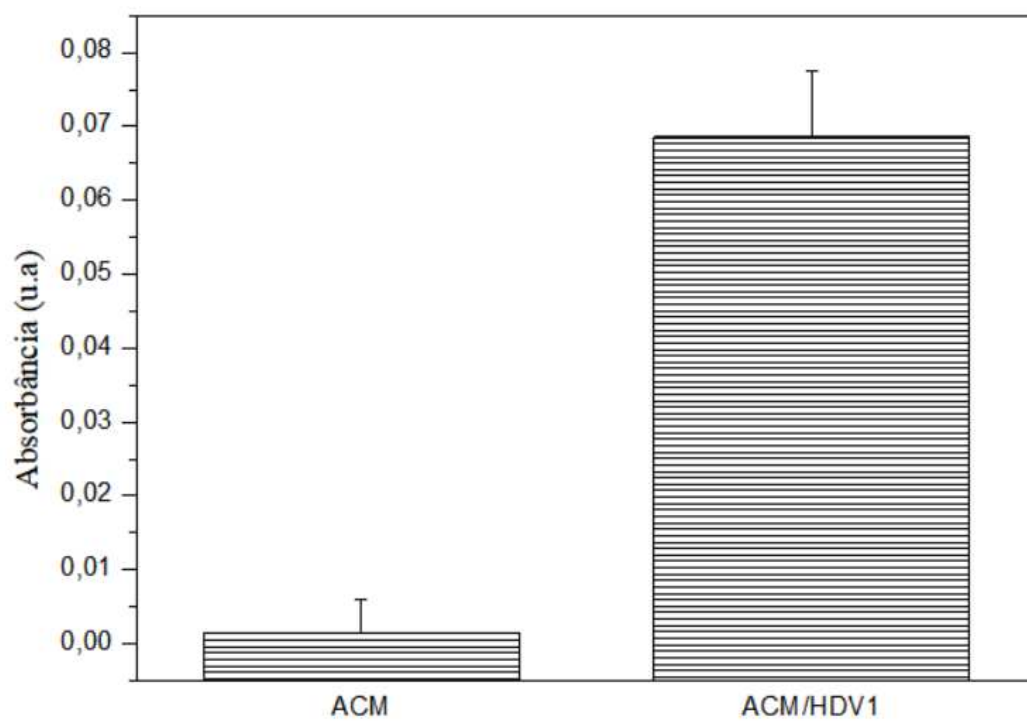


FIGURA 4



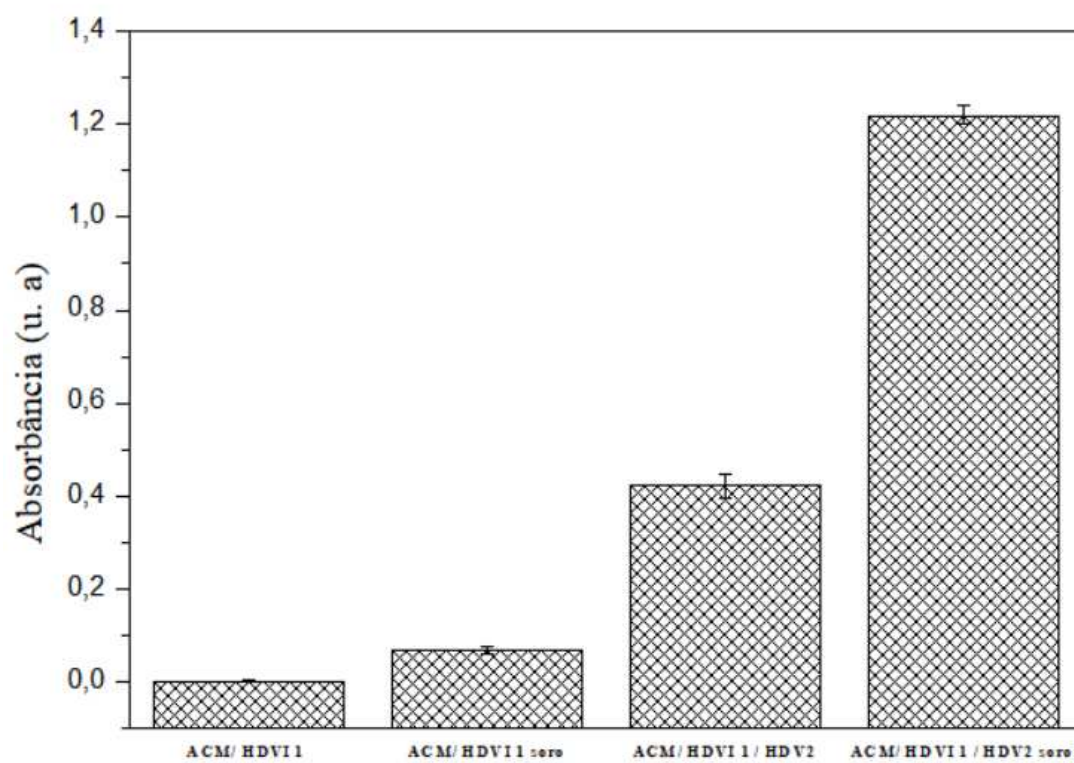


FIGURA 6

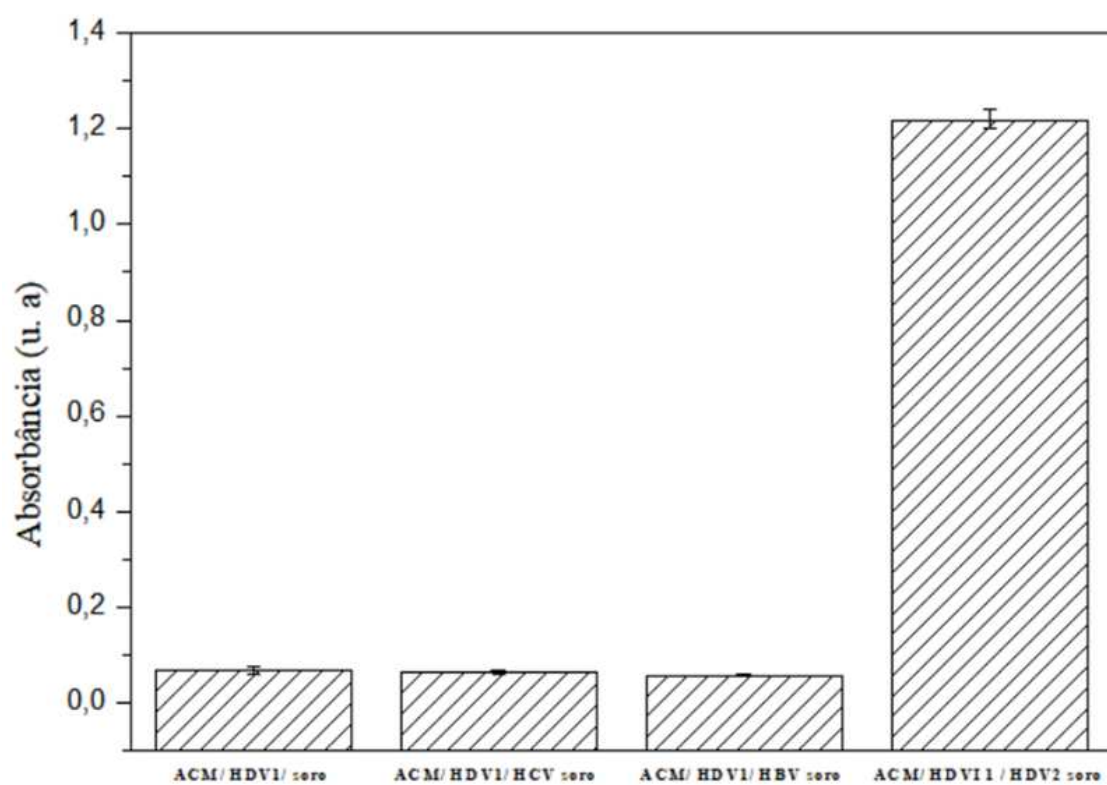


FIGURA 7

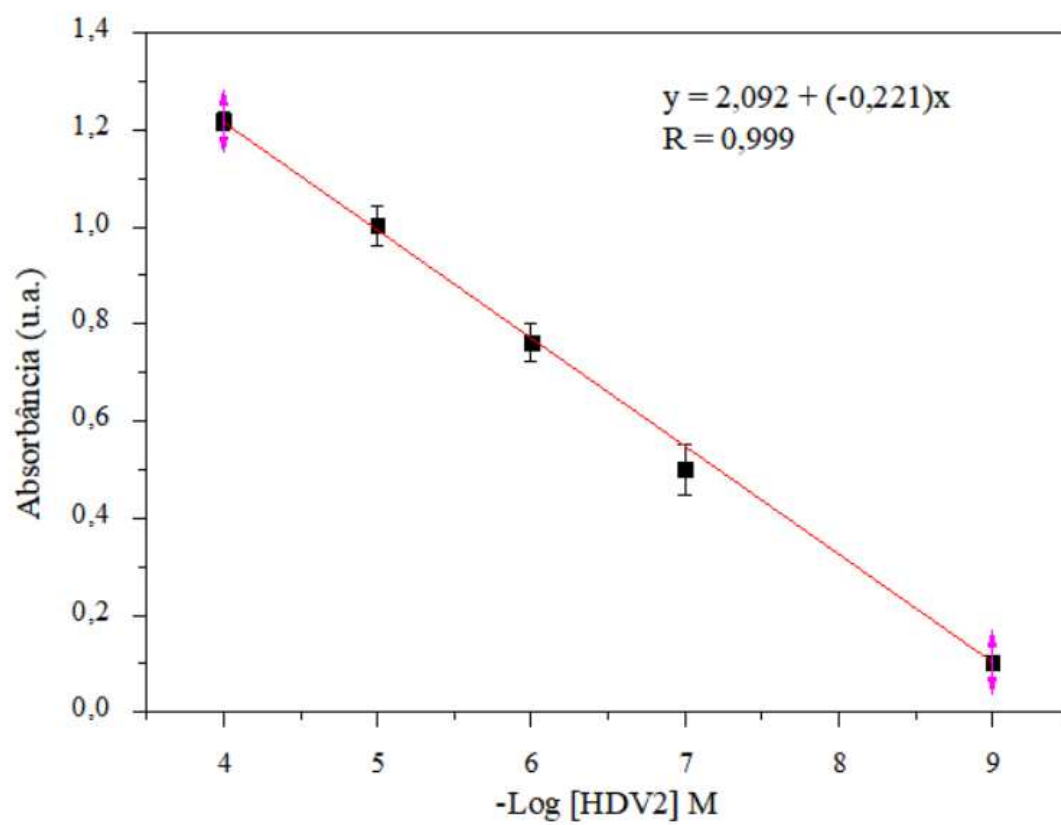


FIGURA 8

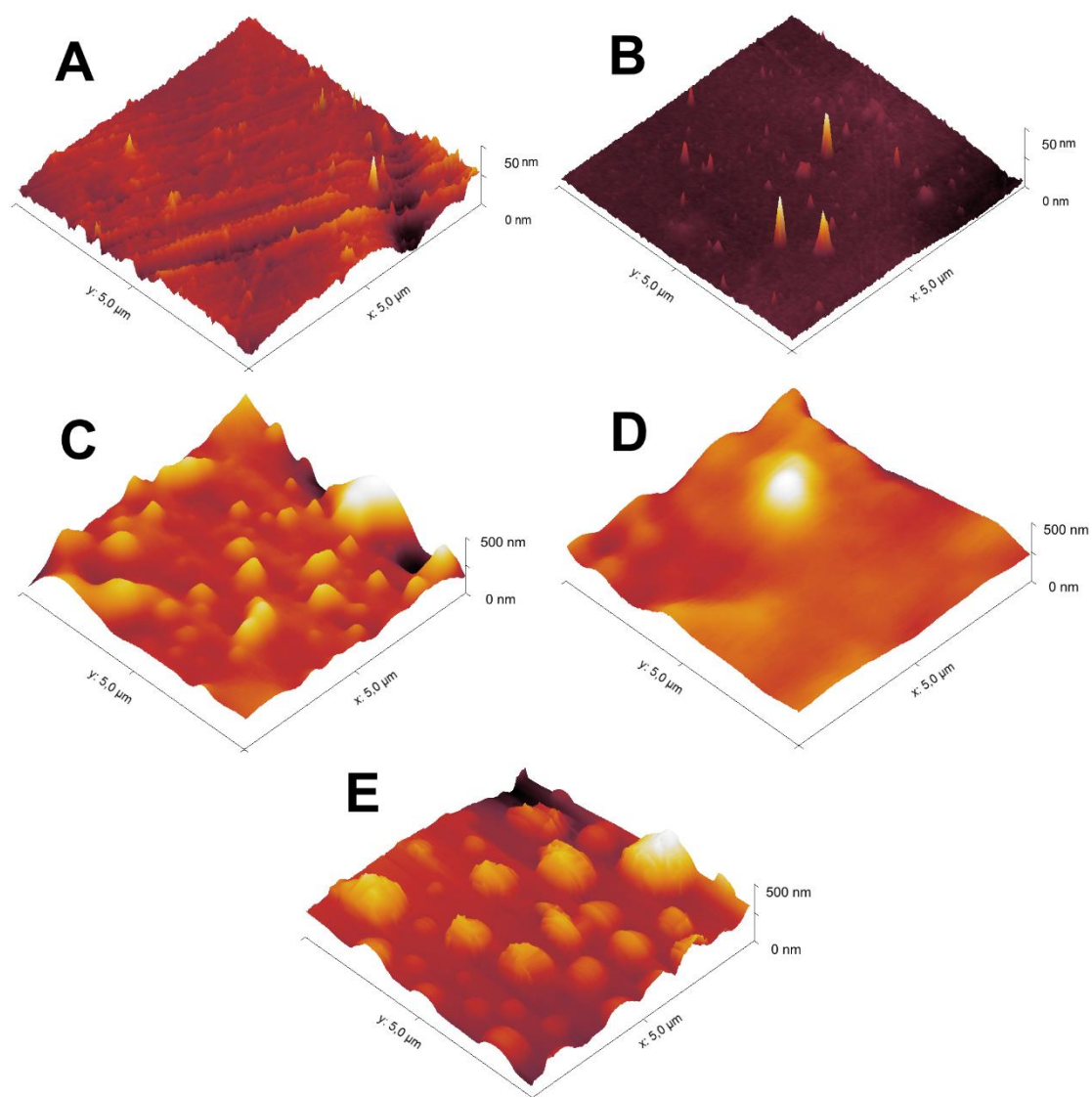
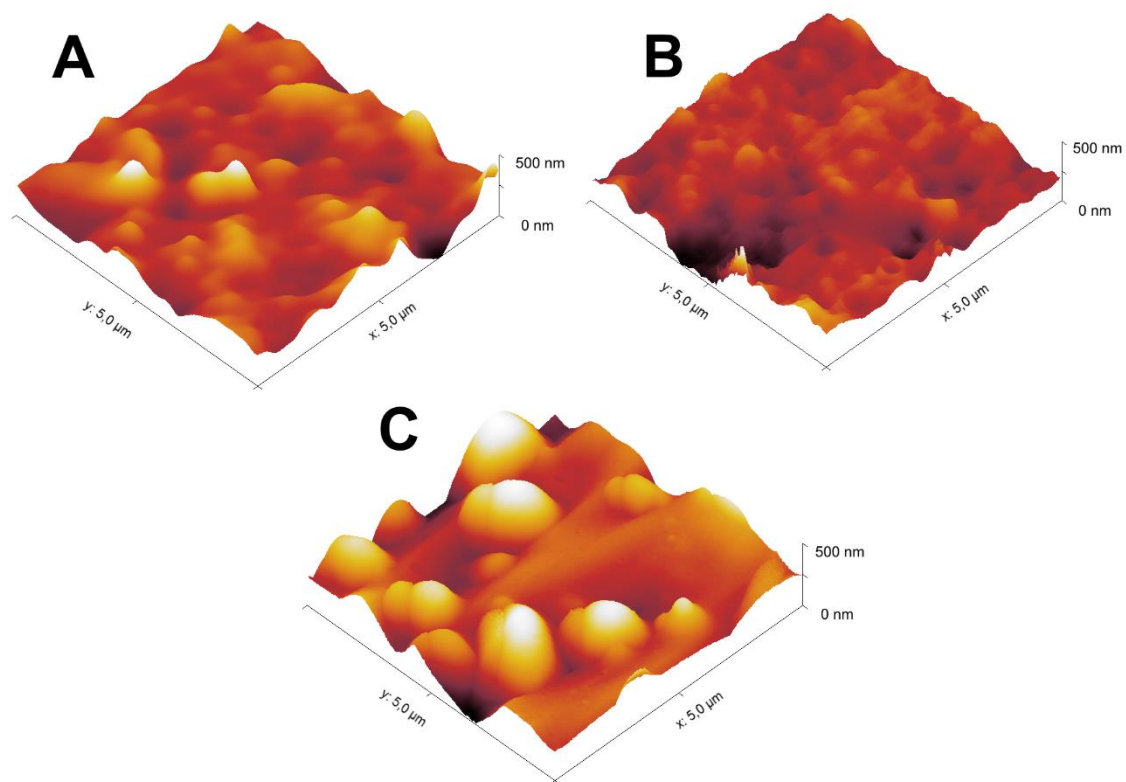


FIGURA 9



## **RESUMO**

### **“Dispositivo com plataforma transparente para detecção colorimétrica e óptica de hepatite D”**

A seguinte invenção compreende o desenvolvimento de um método colorimétrico e óptico para detecção do vírus da hepatite delta, que é uma coinfeção viral, em que o paciente apresenta duas infecções virais concomitantes (HBV e HDV), a qual acomete sobretudo a população do norte do Brasil, podendo levar a grandes danos à saúde, tais como cirrose hepática, cronicidade e carcinoma hepatocelular, além de não existir tratamento específico contra o HDV. Os biossensores ópticos e colorimétricos são dispositivos usados com o fim de detecção de material genético em baixas concentrações, apresentando-se como excelente alternativa em relação aos métodos convencionais. Deste modo, a presente invenção oferece um biossensor sensível, requerente de baixa quantidade de amostra, específico, capaz de diferenciar pacientes infectados dos saudáveis em amostras biológicas (soro) e com excelente especificidade.