

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Desenvolvimento de plataforma biofotônica de larga escala para aplicação na
triagem diagnóstica da COVID-19 por meio da saliva

Léia Cardoso de Sousa

Uberlândia

2022

LÉIA CARDOSO DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA DE LARGA
ESCALA PARA APLICAÇÃO NA TRIAGEM DIAGNÓSTICA DA COVID-19
POR MEIO DA SALIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Robinson Sabino da Silva

Co-orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia

2022

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

S725 2022	Sousa, Léia Cardoso de, 1992- Desenvolvimento de plataforma biofotônica de larga escala para aplicação na triagem diagnóstica da COVID-19 por meio da saliva [recurso eletrônico] / Léia Cardoso de Sousa. - 2022. Orientador: Robinson Sabino da Silva. Coorientador: Luiz Ricardo Goulart Filho. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.114 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Ciências médicas. I. Silva, Robinson Sabino da, 1981-, (Orient.). II. Goulart Filho, Luiz Ricardo ,1962- , (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. IV. Título. CDU: 61
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 11 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8628 - www.ppcsafamed.ufu.br - ppcsafamed@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Tese de Doutorado Nº 003/PPCSA				
Data:	08.02.2022	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	12:00h
Matrícula do Discente:	11713CSD021				
Nome do Discente:	Léia Cardoso de Sousa				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de plataforma biofotônica de larga escala para aplicação na triagem diagnóstica da COVID-19 por meio da saliva				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Patofisiologia e diagnóstico salivar de doenças crônico-degenerativa				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Profs. Drs. Tales Lyra de Oliveira (USCS), Lúcio Roberto Cançado Castellano (UFPB), Douglas Carvalho Caixeta, Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo (UFU) e Robinson Sabino da Silva (UFU), orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a 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.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz 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 **Lúcio Roberto Cançado Castellano, Usuário Externo**, em



08/02/2022, às 10:48, 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 **Douglas Carvalho Caixeta, Usuário Externo**, em 08/02/2022, às 11:53, 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 **Tales Lyra de Oliveira, Usuário Externo**, em 08/02/2022, às 12:05, 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 **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 08/02/2022, às 12:09, 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 **Fernanda Van Petten Vasconcelos Azevedo, Usuário Externo**, em 08/02/2022, às 16:28, 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, informando o código verificador **3358500** e o código CRC **DC95D7E1**.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, pelo amor incondicional,
apoio e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, razão do meu existir, sem Ele eu nada seria.

À minha mãe e avô por acreditarem em mim e sempre me incentivarem a lutar por meus objetivos.

Ao meu marido por estar ao meu lado em todos os momentos, muitas vezes acreditando no meu potencial mais que eu mesma. Obrigada por não me deixar desistir.

Aos meus familiares que sempre se fizeram presentes e se orgulharam pelas minhas conquistas. Vocês me dão força para continuar. 

Aos meus amigos de luta Amandinha, Bruno, Mateus e Victor (Team 2A), vocês são incríveis! Obrigada por cada conversa, conselho e cerveja. Amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Robinson Sabino por todo apoio, ensinamento e compreensão, principalmente nessa reta final. Sou grata por todo incentivo e por acreditar em mim.

Ao Centro de Fisiologia Integrada e Nanobiotecnologia Salivar bem como ao laboratório de Nanobiotecnologia pela colaboração, em especial ao Mário Machado (chefe) e Mylla, sem vocês não seria possível. A todos que se envolveram de alguma forma nos experimentos.

Ao meu co-orientador, professor Luiz Ricardo Goulart, obrigada por tanta generosidade ao compartilhar seu conhecimento, por partilhar tantas ideias brilhantes, obrigada por tornar a ciência mais palpável e acessível. Você sempre será uma grande inspiração.

À CAPES e FAPEMIG pela bolsa de doutorado.

Ao apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho oferecido pelos órgãos de fomento: CNPq, CAPES, FINEP, FAPEMIG e Imunoscan.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que gentilmente cederam amostras para que tal projeto pudesse ser realizado.

“Porque ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; ainda que decepcione o produto da oliveira, e os campos não produzam mantimento; ainda que as ovelhas da malhada sejam arrebatadas, e nos currais não haja gado; Todavia eu me alegrarei no Senhor; exultarei no Deus da minha salvação. O Senhor Deus é a minha força, e fará os meus pés como os das cervas, e me fará andar sobre as minhas alturas. ”

Habacuque 3:17-19

RESUMO

O SARS-CoV-2, identificado em 2020, foi responsável por promover um cenário de pandemia. O vírus pertence à família *Coronaviridae* e é responsável por causar, em casos graves, a Síndrome Respiratória Aguda Grave. O diagnóstico da doença Covid-19 é realizado por amostras de swabs nasofaríngeos ou sangue usando testes de RT-PCR ou testes imunológicos, que são invasivos, de alto custo e demandam mão de obra qualificada para execução. Considerando o contexto, a combinação de espectroscopia ATR-FTIR e classificação de aprendizado de máquina em amostras de saliva conjugada à plataforma de amostra de larga escala pode fornecer uma ferramenta de triagem alternativa para Covid-19. O presente trabalho objetivou selecionar o melhor material a ser utilizado para a confecção da plataforma de amostra bem como avaliou a saliva de indivíduos Covid-19 (n: 100) e não Covid-19 (n:100) usando a técnica de ATR-FTIR acoplado a um dispositivo de alto rendimento e ferramenta de aprendizado de máquina. A análise PCA-LDA dos espectros salivares apresentou uma sensibilidade de 78%, especificidade de 76% e acurácia de 77% entre pacientes não Covid-19 e Covid-19. Resumidamente, os dados obtidos permitiram a seleção de um material adequado para a confecção de plataforma de amostra e as análises espectrais destacam o potencial das plataformas ATR-FTIR acopladas a um dispositivo de alto rendimento como uma ferramenta sustentável, livre de reagentes e não invasiva para rastrear pacientes com Covid-19.

Palavras-Chave: Covid-19, SARS-CoV-2, ATR-FTIR, diagnóstico salivar.

ABSTRACT

SARS-CoV-2, identified in 2020, was responsible to promote a pandemic scenario. The virus belongs to the Coronaviridae family and is responsible for causing, in severe cases, Severe Acute Respiratory Syndrome. The diagnosis of Covid-19 disease is performed by sampling nasopharyngeal swabs or invasive blood from RT-PCR or immunological tests, which are of personalized use and require technical work for execution. Considering the context, ATR-FTIR spectroscopy and machine learning classification on saliva platform coupled with large-scale sample may provide an alternative screening tool for Covid-19. The work aimed to select the best material to be used to make the sample platform well presented as a Covid-19 (n: 100) and not Covid-19 (n: 100) using an ATR-FTIR technique coupled to a device performance and machine learning tool. PCA-LDA analysis of salivary spectra showed a sensitivity of 78%, specificity of 76% and accuracy of 77% between non-Covid-19 and Covid-19 patients. Briefly, the data obtained allowed a selection of a suitable material for the making of a sample platform and how of the possible ATR-FTIR platforms coupled to a high-performance device as a sustainable, reagent-free and non-invasive tool for Covid patients. -19.

Keywords: Covid-19, SARS-CoV-2, ATR-FTIR, salivary diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 01. Estrutura do SARS-CoV-2

Figura 02. Formação do fluido salivar

Figura 03. Espectro de ondas eletromagnéticas

Figura 04. Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR

Figura 05. Representação esquemática a dos três principais modos de amostragem para espectroscopia FTIR.

PATENTE I

Figura 01. Plataforma convencional de amostra para um sistema de espectroscopia de infravermelho FTIR.

Figura 02. Plataforma de amostra proposta.

Figura 03. Modelos de plataforma de amostra.

Figura 04. Modelos de plataforma de amostra múltipla.

Figura 05. Sistemas de identificação.

Figura 06. Sistema de análise de dados.

Figura 07. Diferenças espectrais entre plataformas de amostra produzida com diversos materiais.

Figura 08. Assinatura espectral de amostra salivar sobre o cristal ATR-FTIR.

Figura 09. Comparação espectral entre plataforma de papel e plataforma de papel+saliva.

Figura 10. Assinatura espectral de lavado de swab de nasofaringe em 1, 2, 3 e 4 aplicações na plataforma de alumínio.

Figura 11. Assinatura espectral de saliva total 0, 6, 24, 48 e 72h após coleta armazenadas em gelo.

Figura 12. Assinatura espectral de saliva total 0, 6, 24, 48 e 72h após coleta armazenadas em temperatura ambiente.

Figura 13. Assinatura espectral de sobrenadante salivar 0, 6, 24, 48 e 72h após coleta armazenadas em gelo.

Figura 14. Assinatura espectral de sobrenadante salivar 0, 6, 24, 48 e 72h após coleta armazenadas em temperatura ambiente.

Figura 15. Comparação espectral entre saliva sobre o cristal, plataforma de alumínio 23°C, plataforma de alumínio 37°C, plataforma de alumínio 50°C e plataforma de alumínio 80°C.

Figura 16. Comparação espectral entre gargarejo sobre o cristal, plataforma de alumínio 23°C, plataforma de alumínio 37°C, plataforma de alumínio 50°C e plataforma de alumínio 80°C.

Figura 17. Comparação espectral entre lavado de swab nasal sobre o cristal, plataforma de alumínio 23°C, plataforma de alumínio 37°C, plataforma de alumínio 50°C e plataforma de alumínio 80°C.

Figura 18. Comparação espectral entre amostra pura seca em temperatura ambiente sobre a plataforma de alumínio e amostra associada à álcool 100% seca em temperatura ambiente sobre a plataforma de alumínio.

ARTIGO I

Figure 01. Representative average and standard deviation ATR-FTIR spectra (4000–650 cm^{-1}) in saliva of non-COVID-19 and COVID-19 patients.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1. Demographic characterization of non-COVID-19 and COVID-19.

Table 2. Patient symptoms.

Table 3. Discrimination of machine learning algorithms applied to classify of non-COVID-19 and COVID-19.

Table 4. Selected Variable by PCA-LDA with their respective tentative assignments.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AI	Artificial Intelligence
AMP_c	Adenosina 3', 5'-Monofosfato Cíclico
ATR	Reflexão Total Atenuada
cm	Centímetro
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
E	Proteína Envelope
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
FS	Feature Selection
FTIR Fourier	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de
GA-LDA	Genetic Algorithm-Linear Discriminant Analysis
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
HE	Hemaglutinina Esterase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IRE	Elemento de Reflexão Interna
IV	Infravermelho
Kb	Kilobase
LDA	Linear Discriminant Analysis
M	Proteína de Membrana
mL	Mililitros
ML	Machine Learning
Mm	Milímetro
mm²	Milímetro Quadrado
N	Nucleocapsídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Principal Component Analysis
PKA	Proteína Quinase A

PLS	Partial Least Square
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR em tempo real	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
S	Proteína Espícula
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TA	Temperatura Ambiente
μL	Microlitro
μm	Micrometro

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1- SARS-CoV-2	16
1.2- Covid-19.....	18
1.3- Principais testes diagnóstico da Covid-19	19
1.3.1- Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR).....	19
1.3.2- Testes imunológicos	19
1.4- Secreção Salivar.....	20
1.5- Saliva como fluido diagnóstico	22
1.6- Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	23
2- OBJETIVOS	27
2.1- Objetivo Geral	27
2.2- Objetivos específicos	27
Patente I.....	29
Artigo I.....	64
3- REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS	86

1- INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 a Organização Mundial da Saúde (OMS) recebeu notificação sobre uma doença que apresentava sintomas respiratórios relacionada a presença do vírus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) na cidade de Wuhan na China. Em 11 de março de 2020 o mundo já havia notificado 118.000 casos e 4.291 óbitos e então a OMS declarou Covid-19 como pandemia (WHO, 2020). A doença causada pelo SARS-CoV-2 foi posteriormente chamada de Covid-19. O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, possui RNA de fita positiva e pertence à família *Coronaviridae* (KAHN e McINTOSH, 2005; BOOPATHI; POMA; KOLANDAVEL, 2020).

O SARS-CoV-2 em alguns meses foi espalhado para todos os continentes, promovendo um cenário de pandemia que gerou uma força tarefa dos profissionais envolvidos na área da saúde visando mapear todas as manifestações clínicas, epidemiologia, forma de transmissão e contágio, bem como a patogênese da enfermidade, em busca de controlar e/ou minimizar o avanço desta doença infecciosa (TEODÓSIO; LEANDRO, 2020).

O sequenciamento do RNA viral permitiu a implementação de testes utilizados no diagnóstico da nova doença, porém os testes padrões apresentam diversas barreiras para o uso generalizado e entre elas destaca-se o valor aquisitivo alto de tais tecnologias, metodologias laborosas que demandam mão de obra altamente qualificada, longo tempo para execução e dificuldade para obtenção de amostra (KRÜTTGEN, 2021). Nesse cenário fez-se necessário o estudo de novas técnicas, rápidas, seguras e eficientes para o diagnóstico e que pudessem ser facilmente replicadas, tornando acessível o diagnóstico precoce dessa patologia que tomou de assalto a humanidade.

1.1-SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2, causador da doença Covid-19, é envelopado e pertence a grande família *Coronaviridae*, que inclui diversos vírus presentes em animais. O

contágio humano de um vírus dessa família foi relatado pela primeira vez em 1960, onde observou-se que vírus responsáveis pelo desenvolvimento de bronquite infecciosa, hepatite de camundongo e gastroenterite transmissível de suínos possuíam morfologia similar quando vistos sob microscopia eletrônica (KAHN e McINTOSH, 2005).

A partir de testes laboratoriais foi possível demonstrar que SARS-CoV-2 tem uma origem provável em morcegos do gênero *Rhinolophus* e é similar a outras cepas de coronavírus que também causam doenças em humanos, a SARS-CoV-1 e MERS-CoV (BENVENUTO *et al*, 2020).

O SARS-CoV-2 é composto por um genoma de RNA de fita positiva com tamanho de 29,7 kb e possui quatro proteínas estruturais (Fig. 01) denominadas de proteína espícula (S), proteína envelope (E), nucleocapsídeo (N) e proteína de membrana (M) e cada uma delas desempenha um papel definido que proporciona ao vírus as suas características (BOOPATHI; POMA; KOLANDAVEL, 2020).

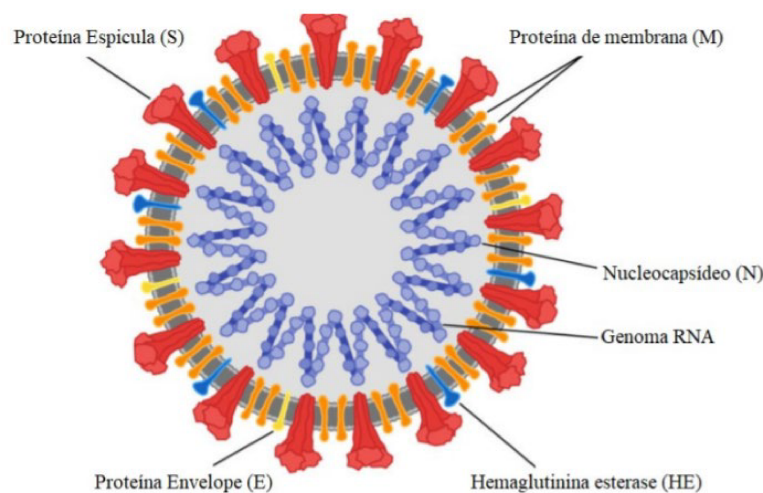


Figura 01. Estrutura do SARS-CoV-2. Adaptado de Journal of Global Resources, 2020.

As proteínas presentes em maior quantidade no capsídeo viral são as proteínas M e S, esta última se localiza próxima à proteína E e juntas desempenham um importante papel para o processo de estruturação viral (WESTERBECK & MACHAMER, 2019). Considera-se que a proteína M seja o

organizador central da estrutura do vírus ao passo que a proteína S está relacionada a ligação do vírus à sua célula hospedeira bem como fusão da mesma (GUPTA *et al.*, 2020). A proteína integral de membrana E executa um papel fundamental para estrutura viral proporcionando permeabilidade da membrana viral à célula hospedeira bem como contribuindo para interação com a célula hospedeira (GUPTA *et al.*, 2020). Por fim, o vírus apresenta localizada em sua superfície a proteína hemaglutinina-esterase (HE) que, de acordo com estudos recentes, não é necessária para o processo de replicação, porém atua na interação do vírus com o seu hospedeiro (BOOPATHI; POMA; KOLANDAVEL, 2020).

Deste modo, SARS-CoV-2 invade a célula por meio da ligação da proteína S presente em seu capsídeo com células hospedeiras que possuam o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), em seguida a proteína S sofre uma divisão que permite a endocitose do vírus por meio de fusão da membrana viral com célula hospedeira, tornando possível a liberação do material genético viral no interior da célula humana, desencadeando a produção de mediadores inflamatórios, o que causa o aumentando das secreções e a inflamação severa que dá origem às manifestações clínicas da Covid-19 (WU *et al.*, 2020).

1.2-Covid-19

De acordo com o Ministério da Saúde, a Covid-19 é a doença ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2 podendo levar tanto a infecções assintomáticas quanto a quadros graves evoluindo para óbito. A OMS indica que, em média, 80% dos indivíduos acometidos pela Covid-19 se apresentam assintomáticos ou oligossintomáticos e destes, apenas 20% necessitam de assistência médica por demonstrarem algum nível de dificuldade respiratória. Usualmente, os sintomas característicos da doença são desenvolvidos no período entre 2 e 14 dias após a exposição do indivíduo ao vírus (CDC, 2019).

Pacientes oligossintomáticos podem apresentar, além de sintomas gripais tradicionais, uma alteração quimiossensorial tanto de olfato quanto de paladar e

estas alterações se reverterem dentro de algumas semanas de forma concomitante com a melhora dos demais sintomas apresentados (WU, 2020).

Alguns pacientes apresentam uma evolução grave e abrupta do quadro clínico, desenvolvendo a denominada Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), onde a capacidade respiratória e níveis de oxigenação se tornam diminuídos, impactando na necessidade de ventilação mecânica (WU, 2020).

Até o dia 17 de janeiro de 2022 a Covid-19 se disseminou de forma indiscriminada por diversos países ocasionando 329.675.422 casos confirmados e 5.543.277 óbitos registrados à nível global de acordo com dados atualizados (JHU, 2022). No Brasil, o primeiro caso registrado ocorreu na cidade de São Paulo, em fevereiro de 2020, com um indivíduo do sexo masculino recém chegado da Itália, apresentou sintomas e foi diagnosticado com a doença. A partir deste evento o número de novos casos aumentou exponencialmente chegando a 23.015.128 casos confirmados e 621.327 óbitos registrados de acordo com dados atualizados até o dia 17 de janeiro de 2022 (JHU, 2022).

1.3-Principais testes diagnóstico da Covid-19

1.3.1- Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)

A técnica é altamente sensível e específica e permite a identificação do RNA viral e o diagnóstico por meio dela pode ser realizado utilizando amostras coletadas tanto de naso e orofaringe quanto a partir de saliva, escarro ou aspirado traqueal (CORMAN *et al.*, 2020). Quatro principais genes podem ser considerados para o processo de identificação: N, E, S e RdRP. O gene E apresenta uma sensibilidade maior sendo o marcador indicado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2020). No formato utilizado, o complexo primer/sonda do gene E reconhece especificamente betacoronavírus relacionados a morcegos permitindo a detecção tanto de SARS-CoV-1 quanto de SARS-CoV-2 (CORMAN *et al.*, 2020).

1.3.2- Testes imunológicos

A reação do sistema imunológico à presença do vírus leva a uma produção de anticorpos específicos, cuja presença determinam a existência de infecção pregressa. O tempo de produção é específica a cada classe de anticorpo sendo de 7 a 10 dias após início de sintomas para a imunoglobulina M (IgM) e acima de 10 dias para a imunoglobulina G (IgG) (VIEIRA, 2020). Tais testes se baseiam na identificação de anticorpos específicos e são realizados preferencialmente em amostras sanguíneas.

Além dos testes que avaliam a presença de anticorpos específicos, uma outra alternativa é a detecção do antígeno. O teste se baseia na determinação qualitativa de antígenos SARS-CoV-2, detectados por meio de anticorpos específicos presentes no dispositivo. O resultado é obtido rapidamente e sua interpretação não exige equipamentos específicos (MAK, 2020).

1.4-Secreção Salivar

As glândulas salivares maiores parótida, submandibular e sublingual são responsáveis por cerca de 90% da secreção salivar. Não obstante, existem também glândulas salivares menores que podem ser encontradas no lábio inferior, língua, palato, bochechas e faringe (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; DE PAULA *et al.*, 2017). A secreção das glândulas salivares menores, fluido crevicular gengival, compostos derivados do sangue e refluxo gastrointestinal contribuem com os 10% restantes da composição salivar final (DODDS *et al.*, 2005; HOLMBERG e HOFFMAN, 2014).

O fluxo salivar é controlado por meio do sistema nervoso autônomo (SNA), sob estímulo do SNA simpático e parassimpático. O estímulo advindo do SNA simpático faz com que a saliva secretada se torne mais viscosa e rica em proteínas, todavia o volume salivar é menor, ao passo que, sob estímulo do SNA parassimpático a secreção salivar é aumentada (PEDERSEN *et al.*, 2002; OBAYASHI, 2013).

O estímulo advindo do SNA parassimpático seguido da liberação de acetilcolina propicia a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos dos tipos M1 e M3, o que desencadeia uma cascata de sinalização com liberação de Ca^{2+} à nível intracelular através dos retículos endoplasmáticos presentes nas células acinosas. A elevação intracelular de Ca^{2+} induz a uma abertura de canais de Cl^- presentes na região apical da membrana celular, deste modo, o Cl^- é secretado no lúmen. A presença do Na^+ e Cl^- no lúmen acinar gera um gradiente osmótico nas células acinosas, o que faz com que a água tenha um fluxo transcelular por meio de transportadores de água tipo Aquaporina 1 na membrana basolateral e Aquaporina 5 na membrana luminal. Igualmente, o gradiente osmótico gerado possibilita o fluxo de água através da via paracelular. Dessa forma, a saliva inicialmente secretada no lúmen, rica em Na^+ , Cl^- e água, é um fluido isotônico quando comparado ao sangue (estágio 1). Esta saliva primária sofre modificações ao longo do epitélio ductal, nesta etapa a maior parte de Na^+ e Cl^- é reabsorvida ao passo que K^+ e HCO_3^- são secretados (estágio 2). Dessa maneira, em função do epitélio ductal apresentar uma baixa permeabilidade à água em situações fisiológicas, a saliva final é hipotônica quando relacionada ao sangue (Fig. 02). A saliva final contém componentes inorgânicos, sendo os principais Cl^- , HCO_3^- , K^+ e, em uma quantidade menor, Ca^{2+} , Mg^{2+} e fosfato (DODDS *et al.*, 2005; MESE e MATSUO, 2007; CATALAN *et al.*, 2009; CARPENTER, 2013; SABINO-SILVA *et al.*, 2013).

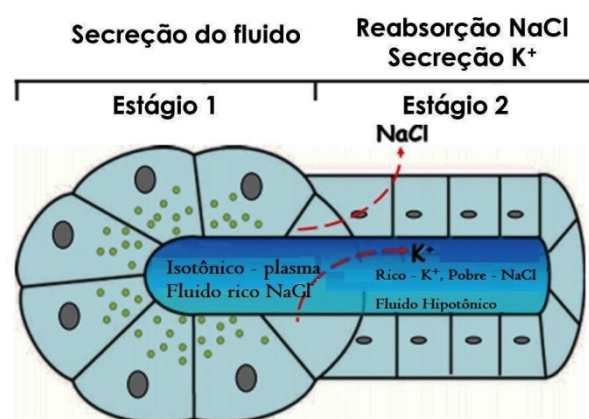


Figura 02. Formação do fluido salivar. Adaptado de CATALÁN *et al.*, 2009.

O processo de secreção salivar sob estímulo do SNA simpático ocorre pela interação da noradrenalina e/ou adrenalina via receptores beta-adrenérgicos. Esta interação promove uma ação reduzida dos transportadores Aquaporinas 5 e, desse modo, uma quantidade menor de fluido é secretado. A ativação desses receptores é responsável pelo aumento da quantidade intracelular de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc) que ativa a proteína quinase A (PKA). O conteúdo que é liberado possui uma alta concentração de proteínas que desempenham diversas funções biológicas importantes na manutenção do equilíbrio homeostático da cavidade oral (VATTA *et al.*, 2002; MELVIN *et al.*, 2005; MESE e MATSUO, 2007).

1.5-Saliva como fluido diagnóstico

A composição da saliva humana apresenta água (98%) e outros componentes tais como células descamadas, compostos orgânicos e inorgânicos e microorganismos (NAVAZESH; KUMAR, 2008). Sabe-se que a saliva apresenta grande potencial em refletir a concentração de componentes sanguíneos fisiológicos, além de uma expressiva diversidade de moléculas inseridas no organismo em decorrência de alguma dependência terapêutica, estado emocional, hormonal, imunológico e influências tanto metabólicas quanto nutricionais (BANDODKAR E WANG, 2014; SAXENA *et al.*, 2017).

Apesar da concentração proteica presente na saliva ser cerca de 10 vezes menor que no plasma, existe uma similaridade de cerca de 27% dos componentes, indicando o seu potencial uso diagnóstico em alternativa ao plasma (LOO, 2010). Proteínas possuem a capacidade de deslocarem-se a partir da circulação sanguínea de glândulas salivares por meio de transporte ativo, difusão passiva ou ultrafiltração. Um outro mecanismo de secreção proteica pode se dar de forma direta através das glândulas salivares (MELVIN *et al.*, 2005). Independente do mecanismo de secreção, estas proteínas possuem potencial utilização para o desenvolvimento de novos modelos para testes diagnósticos e para monitoramento não-invasivos de vários processos patológicos (RATHNAYAKE *et al.*, 2013).

A saliva, ao contrário de alguns outros fluidos biológicos, pode ser coletada de maneira fácil e indolor, apresentando baixo nível de desconforto, além de se demonstrar fácil manipulação e armazenamento, apresentar um risco reduzido de contaminação em comparação ao sangue, não requer equipamentos ou profissionais especializados para sua obtenção e possibilita a coleta em diversos tipos de patologias e faixas etárias (PFAFFE *et al.*, 2011). Sua coleta pode ser realizada de forma não-estimulada, onde a amostra é obtida de forma passiva em recipiente apropriado. Uma outra forma é a utilização de materiais absorventes, sendo o algodão e o polietileno os mais comuns (NAVAZESH, 1993; YOSHIZAWA *et al.*, 2013; CHOJNOWSKA *et al.*, 2017).

Até o presente momento não existe um critério padrão (padrão ouro) para coleta de saliva, por esta razão o processo de pesquisa se torna restrito pois a reprodutibilidade de resultados é complexa de ser analisada. Em decorrência disto, algumas variações são observadas nos resultados pelo método utilizado para coleta e sua influência sobre a quantidade de componentes presentes na saliva (YOSHIZAWA *et al.*, 2013; CHOJNOWSKA *et al.*, 2017). Todavia tal limitação tem pouca significância quando comparada às diversas vantagens observadas pela utilização de saliva como fluído diagnóstico para diversas doenças. O potencial de uso da saliva como meio diagnóstico para diversas patologias já foi relatado para diversos tipos de cânceres (LEE *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2010), refluxo gastroesofágico (DY *et al.*, 2016), malária (BUPPAN *et al.*, 2010), síndrome de Sjögren (BALDINI *et al.*, 2011), diabetes mellitus (REZNICK *et al.*, 2006) e outras doenças.

1.6-Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) baseia-se na análise de amostras, tanto orgânicas quanto inorgânicas, por meio da mensuração de interação entre radiação eletromagnética no infravermelho (IV) e as moléculas que se encontram nas amostras em análise (STUART, 2005).

O IV é absorvido pela matéria promovendo alterações no momento dipolo das ligações entre os átomos presentes na amostra em avaliação. Estas

alterações podem ocorrer através de vibrações ou rotações que darão origem à modos vibracionais específicos que podem determinar o espectro de frequência de cada amostra. Todavia, somente moléculas que possuem momento dipolo entre as ligações atômicas são capazes de tornarem-se ativas no IV (STUART, 2005).

A técnica de espectroscopia por FTIR se baseia na região infravermelha do espectro eletromagnético e pode ser subdividida em três faixas com relação à sua proximidade com o espectro de luz visível sendo elas: IV próximo ($13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), IV médio ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) e IV distante ($< 400 \text{ cm}^{-1}$), como pode ser observado na Figura 03 (STUART, 2005).

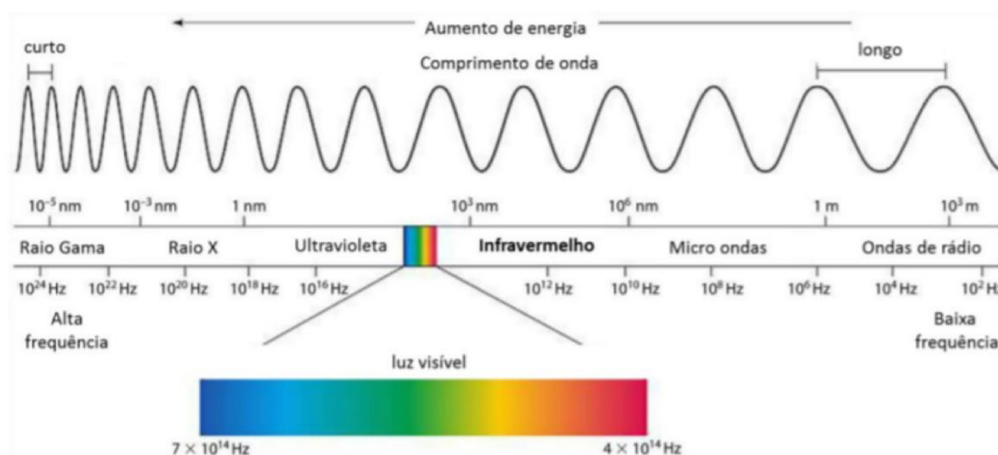


Figura 03. Espectro de ondas eletromagnéticas. Adaptado de Western Governors University.

Atualmente, os espectrofotômetros utilizados para análises biológicas promovem uma emissão de radiação IV na faixa do IV médio, e apresentam o interferômetro de Michelson como componente, elemento que substituiu a grade de difração que era utilizada nos modelos mais antigos de espectrofotômetros dispersivos. O interferômetro de Michelson é composto por um divisor de feixes (*"beamsplitter"*), um espelho fixo e um espelho móvel. Na parte referente ao divisor ocorre uma divisão do feixe IV contínuo em duas partes. A porção que é transmitida atingirá o espelho fixo ao passo que a fração refletida será direcionada ao espelho móvel e, quando estas se recombinaem, ocasionam interferências construtivas e destrutivas, conforme o posicionamento do espelho

móvel em relação ao espelho fixo. O feixe resultante será direcionado para amostra, onde ocorrerão as absorções e, posteriormente, prosseguirá até o detector (Fig. 04) (AL-SAEED; KHALIL, 2009).

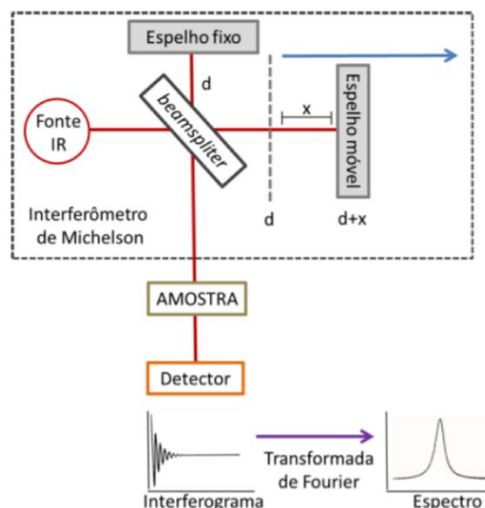


Figura 04. Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR (BENETTI, 2014).

De forma geral, a configuração do mecanismo para a obtenção dos espectros FTIR pode ser realizada de diferentes modos sendo transmissão, transflexão e reflexão total atenuada (ATR) as mais usuais (Fig. 05). As análises espectrais avaliadas no ATR não necessitam nenhum tipo especial de substrato ou preparo de amostra, utilizando apenas o material em estudo, podendo ser este sólido ou líquido. O mesmo é colocado diretamente sobre o elemento de reflexão interna, o que faz com que o processo para análise seja rápido e simples, se tornando o método mais apropriado para processos relacionados à diagnósticos de desordens patológicas (TATULIAN, 2003; DORLING E BAKER, 2013).

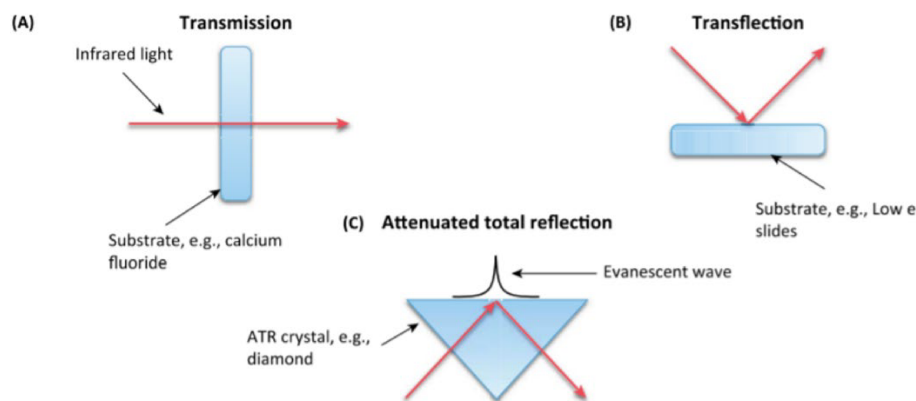


Figura 05. Representação esquemática a dos três principais modos de amostragem para espectroscopia FTIR. (A) transmissão; (B) reflexão e (C) reflexão total atenuada (DORLING; BAKER, 2013).

A utilização de espectroscopia de infravermelho como alternativa diagnóstica tem avançado na última década por se mostrar uma técnica eficaz para avaliações quantitativas e qualitativas na caracterização de diversos compostos biológicos (BELLISOLA; SORIO, 2012). Sabe-se que a determinação de uma molécula é dada através de sua estrutura que é única, assim, cada biomolécula pode apresentar um espectro ATR-FTIR original que representará o modo vibracional de sua ligação estrutural (SEVERCAN *et al.*, 2010; OJEDA; DITTRICH, 2012). Os modos vibracionais IV característicos de amostras biológicas refletem impressões bioquímicas que podem ser correlacionadas com a existência ou não de processos patológicos. Adicionalmente, estes modos vibracionais IV são ainda capazes de fornecer uma base para determinar de forma quantitativa diversos analitos presentes na amostra que possuem potencial diagnóstico (KHAUSTOVA *et al.*, 2010; CAETANO JÚNIOR *et al.*, 2015).

O potencial diagnostico totalmente livre de reagentes, rápido, utilizando baixos volumes de amostra com alta especificidade proporciona vários benefícios no que se refere ao desenvolvimento de estratégias para intervenção terapêutica que minimize morbidades e reduza mortalidade de modo concomitante à redução de recursos econômicos empregados em sistemas de saúde (BUNACIU *et al.*, 2017). Além disto, entre as diversas técnicas que podem

ser utilizadas como uma ferramenta diagnóstica na atualidade, as avaliações por meio de ATR-FTIR despertam interesse singular devido ao fato de apresentar uma alta sensibilidade na detecção de alterações moleculares ou bioquímicas em amostras biológicas (BAKER *et al.*, 2014).

A técnica ATR-FTIR já foi utilizada na detecção de diversas doenças como como artrite (STAIB *et al.*, 2001), hepatite C crônica (SCAGLIA *et al.*, 2011), câncer pulmonar (LEWIS *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014), Alzheimer (PARASKEVAIDI *et al.*, 2017), malária (ROY *et al.*, 2017), câncer de ovário (GAJJAR *et al.*, 2013), colorretal (DONG *et al.*, 2014) e cérebro (HANDS *et al.*, 2016). Até o presente momento, não há estudos utilizando espectroscopia ATR-FTIR para diagnóstico salivar de Covid-19.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Identificar um padrão espectral salivar para o diagnóstico da Covid-19 por meio da espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier.

2.2- Objetivos específicos

Patente I:

Criar uma plataforma de amostra individual, reutilizável e sustentável para uso em larga escala em um sistema de espectroscopia de infravermelho (FTIR).

Artigo I:

Comparar o padrão espectral salivar em pacientes não-Covid-19 e Covid-19 por meio de ATR-FTIR, para ser empregado como uma ferramenta alternativa de biomarcador salivar para triagem de Covid-19.

Patente I

Patente I

Relatório Descritivo da Patente de Invenção: “PLATAFORMA DE AMOSTRA REUTILIZÁVEL PARA USO EM ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO, SISTEMA, KIT, MÉTODO E USO DA MESMA”.

Campo da Invenção

[01] O presente pedido de patente refere-se à uma plataforma de amostra individual reutilizável e sustentável para uso em um sistema de espectroscopia de infravermelho. A referida plataforma pode ser usada com amostras biológicas para diagnóstico de doenças ou em técnicas forenses, detecção de compostos orgânicos e inorgânicos com aplicações industriais, na agropecuária e em áreas de toxicologia.

[02] Ainda o presente pedido de patente se refere a um sistema de plataformas de amostra que compreende mais de uma da referida plataforma de amostra individual e ainda pode compreender uma estrutura de suporte para as plataformas de amostra.

[03] Ainda o presente pedido de patente refere-se a um método para reduzir o tempo de preparo e aumentar a escala na análise de amostras em um sistema de espectroscopia de infravermelho, bem como o uso da referida plataforma de amostra, ou sistema compreendendo as referidas plataformas de amostra, em um sistema de espectroscopia de infravermelho, mais particularmente espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

[04] O presente pedido ainda se refere a um Kit para personalização e otimização das referidas plataformas de amostra para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho.

Fundamentos da Invenção

[05] A espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção em que a energia absorvida se encontra na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Ela é largamente usada tanto na indústria quanto na academia por ser uma técnica rápida e confiável para medidas, controle de qualidade, análises dinâmicas e até para o diagnóstico de doenças.

[06] A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma plataforma analítica que avalia a interação da radiação eletromagnética no espectro infravermelho com a matéria com intuito de obter informações moleculares de determinado material ou amostra biológica (BARTH, 2007). Desta forma, a absorção de luz específica de cada amostra na região infravermelho do espectro infravermelho proporciona um espectro com modos vibracionais únicos de cada estrutura molecular avaliada, considerando que cada grupo funcional apresenta uma assinatura específica no espectro (BUNACIU *et al.*, 2017).

[07] A configuração do aparelho para aquisição dos espectros FTIR pode ser feita de diferentes maneiras, dentre estas as mais utilizadas são a de transmissão, transflexão e reflexão total atenuada (ATR). As análises espectrais por reflexão geralmente são mais utilizadas em relação às de transmissão, uma vez que os espectros obtidos por transmissão devem ser corrigidos computacionalmente devido a ocorrência de interferências físicas (CHAN *et al.*, 2013). Ao contrário da transmissão e transflexão, medidas no ATR não requerem substratos especiais e nenhuma preparação da amostra, necessitando apenas que a amostra esteja em contato direto com o elemento de reflexão interna, tornando o processo de análise mais rápido e simples, sendo mais indicado para processos de diagnósticos de doenças (TATULIAN, 2003; DORLING *et al.*, 2013).

[08] A região do infravermelho médio obtida com a espectroscopia FTIR (400-4000 cm^{-1}) compreende os modos vibracionais associados a importantes componentes bioquímicos. Isto indica que em uma mesma análise, diversos grupos funcionais de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos são analisados de forma integrada, e cada um deles pode ser utilizado como um biomarcador único ou por meio de uma análise integrada por meio de painel de biomarcadores ou por inteligência artificial decorrentes de diversas doenças.

[09] Nosso grupo e outros já demonstraram a capacidade de utilização do ATR-FTIR como plataforma para diagnóstico de doenças sistêmicas baseados em análises de fluidos biológicos com saliva, urina e sangue. A saliva foi utilizada para discriminar doença renal crônica (RODRIGUES *et al.*, 2019) e câncer de mama (FERREIRA *et al.*, 2020) em humanos e diabetes (CAIXETA *et al.*, 2020)

em modelos animais. A urina foi utilizada como fluido diagnóstico de cisteinúria (OLIVER *et al.*, 2016) e câncer de endométrio (PARASKEVAIDI *et al.*, 2018) em humanos. O sangue foi utilizado para diagnóstico de malária (ROYS *et al.*, 2017), doença renal (KHANMOHAMMADI *et al.*, 2015); câncer de mama (SITNIKOVA *et al.*, 2020); câncer de cérebro (BUTLER *et al.*, 2019) em humanos e para linfomas e melanomas (GHIMIRE *et al.*, 2017) em modelos animais. Tecidos humanos foram utilizados para discriminar câncer de ovário (THEOPHILOU *et al.*, 2016).

[10] A patente US 7255835 demonstrou um sistema com um elemento de reflexão interna (IRE) com uma face de reflexão localizada no IRE e também na amostra, seguida de uma onda evanescente direcionada do exterior do IRE para o interior do mesmo, de modo a provocar a incidência de radiação infravermelha na amostra. O sistema é associado a uma ponta funcionalizada compreendendo uma sonda imobilizada na superfície que preenche o volume exposto à onda evanescente, o que é detectado por um detector.

[11] Nos últimos anos foram descritos dois métodos de diagnóstico de câncer de cérebro por análises sanguíneas de ATR-FTIR. No primeiro deles, o pedido de patente WO 2014/076480, demonstrou a capacidade de um método de diagnóstico inserindo a amostra diretamente no cristal de ATR do sistema de espectrometria FTIR por meio de um teste que não promove danos moleculares na amostra. A desvantagem deste método é o tempo de secagem e limpeza da amostra no cristal ATR, devido ao tempo necessário para formação de um biofilme antes da obtenção do espectro da amostra. O tempo necessário para secagem da amostra depende do volume específico para cada biofluido. Desta forma, este sistema não pode ser considerado em um volume de alta escala. O segundo sistema relacionado a patente WO 2018/178669 é um sistema de alta-escala que substituiu o IRE do espectrofotômetro, para a secagem da amostra diretamente sobre o IRE inserido no dispositivo desenvolvido. Este dispositivo é inserido em um aparato automatizado que permite a movimentação das amostras inseridas no IRE do dispositivo após a interação da fonte de luz infravermelha. As análises demonstram que o padrão de espectro por este sistema é equivalente com o IRE de diamante considerado como padrão-ouro.

Adicionalmente, é demonstrado um protocolo de secagem com temperatura entre 25°C e 35°C.

[12] Outro documento do estado da técnica demonstra o potencial uso do alumínio como substrato para análises de sangue para diagnóstico de câncer endometrial, para isto a parte brilhante de uma folha de alumínio encobre uma lâmina de vidro em uma preparação que leva de 30 a 45 segundos. Para realização deste procedimento de forma manual é fundamental que a folha de alumínio fique perfeitamente em contato com vidro (PARASKEVAIDI *et al.*, 2018), pois eventuais rugosidades ou dobramentos na folha de alumínio poderão alterar o perfil do espectro da amostra e consequentemente seu resultado. Devido a fina espessura da folha de alumínio, a sua reutilização parece ser inadequada após procedimento de lavagem, limpeza e/ou assepsia.

[13] As formulações à base de álcool são amplamente conhecidas pela sua capacidade de inativação de diferentes vírus envelopados. Um forte efeito virucida contra patógenos emergentes, incluindo ZIKV, EBOV, SARS-CoV e MERS-CoV, pode ser demonstrado, implicando a utilidade destas formulações baseadas em álcool e metanol associados a surtos com microrganismos (SIDDHARTA *et al.*, 2017; SALVAGE *et al.*, 2014).

[14] Apesar de capacidade de aplicação do sistema de alta-escala com substituição de IRE no dispositivo em processo automatizado e de reduzida instrumentação (WO 2018/178669), ainda existe uma carência em processos de baixíssimo custo e que permitam um processo de secagem rápida da amostra e uma drástica inativação de microrganismos (vírus, fungos, bactérias) para uma análise no IRE do espectrofotômetro sem a presença de microrganismos viáveis. A presença do aquecimento e da associação de compostos de rápida volatilidade pode ter papel central para análises de alta escala em testes diagnósticos de doenças infecto- contagiosas e de doenças sistêmicas nas quais o paciente pode estar infectado com patógenos não relacionados (exemplo: HIV, Hepatite, etc). Adicionalmente, substratos que permitam a utilização de materiais recicláveis que possam ser reutilizados após limpeza e assepsia poderão ser de grande valia para aplicações de tecnologias verdes com protocolos sustentáveis. A presente invenção tem intenção de superar as limitações atuais no estado da técnica, proporcionando uma plataforma de amostra sustentável e reutilizável,

que permita ser utilizada em um método de secagem rápida para formação de biofilme e permita o armazenamento de amostras diretamente na referida plataforma para mensuração em sistemas análise fotônicas, mais particularmente sistemas de espectroscopia de infravermelho, ainda mais particularmente espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), sem que apresente ruído relevante ou que interfira no espectro criado, e, que reduza o tempo de preparo das amostras e aumente a escala na análise das mesmas com custo reduzido.

Breve descrição da invenção

[15] O presente pedido de patente refere-se à uma plataforma de amostra individual sustentável para ser usada em um sistema de espectroscopia de infravermelho, mais particularmente espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), ainda mais particularmente ATR-FTIR. A referida plataforma pode ser usada com amostras biológicas para diagnóstico de doenças ou em técnicas forenses, detecção de compostos orgânicos e inorgânicos com aplicações industriais, na agropecuária e em áreas de toxicologia.

[16] Ainda o presente pedido de patente refere-se a um sistema de plataformas de amostra que compreende mais de uma da referida plataforma de amostra individual e ainda pode compreender uma estrutura de suporte para as plataformas de amostra.

[17] Ainda o presente pedido de patente refere-se a um método de uso da referida plataforma de amostra, ou sistema de plataformas de amostra, para reduzir o tempo de preparo e aumentar a escala na análise de amostras em um sistema de espectroscopia de infravermelho, bem como o uso da referida plataforma de amostra, ou sistema de plataformas de amostra, em um sistema de espectroscopia de infravermelho.

[18] Mais particularmente a referida plataforma de amostra possibilita o uso de diferentes métodos de secagem rápida da amostra para formação de biofilme, além de possibilitar o armazenamento de amostras diretamente na referida plataforma para posterior mensuração em um sistema de espectroscopia de

infravermelho, sem que apresente ruído relevante ou que interfira no espectro criado.

[19] O presente pedido ainda se refere a um Kit para personalização e otimização das referidas plataformas de amostra para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho.

Breve descrição das figuras

[20] A presente invenção será melhor compreendida com base na descrição, a seguir, tomada em conjunto com as figuras anexas, nas quais:

[21] A FIGURA 1 ilustra os princípios básicos do FTIR no contexto de uma plataforma convencional.

[22] A FIGURA 2 ilustra os princípios básicos do FTIR no contexto da criação de uma plataforma de amostra de alumínio.

[23] A FIGURA 3 ilustra exemplos de modalidades de uma plataforma de amostra individual ou um sistema de plataformas de amostra organizada em conjunto de duas ou mais plataformas de amostra individuais.

[24] A FIGURA 4 ilustra uma das modalidades da plataforma de amostra em forma de um sistema de plataformas de amostra com quatro plataformas de amostra em formato de pastilhas individuais sendo aquecida para secagem da amostra.

[25] A FIGURA 5 ilustra uma das modalidades da plataforma de amostra na forma de pastilhas de alumínio, podendo compreender ou não diferentes sistemas de identificação das amostras.

[26] A FIGURA 6 mostra um workflow de um sistema de análise FTIR usando uma modalidade da plataforma de amostra de alumínio da presente invenção.

[27] A FIGURA 7 mostra um comparativo da interferência no espectro de ATR-FTIR de uma modalidade da plataforma de amostra de alumínio, de uma plataforma de amostra de papel e de uma plataforma de amostra de plástico.

[28] A FIGURA 8 mostra a comparação do espectro de ATR-FTIR da amostra de saliva diretamente no diamante do ATR-FTIR, da amostra de saliva na

plataforma de amostra de alumínio e da plataforma de amostra de alumínio sem amostra.

[29] A FIGURA 9 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de uma amostra de saliva na plataforma de amostra de papel e da plataforma de amostra de papel sem amostra.

[30] A FIGURA 10 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de diferentes aplicações de amostra de lavabo de swab de nasofaringe na plataforma de amostra de alumínio.

[31] A FIGURA 11 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostra de saliva mensurada imediatamente após a coleta e após o armazenamento da amostra em baixa temperatura durante 6h, 24h, 48h e 72h.

[32] A FIGURA 12 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostra de saliva mensurada imediatamente após a coleta e após o armazenamento da amostra em temperatura ambiente durante 6h, 24h, 48h e 72h.

[33] A FIGURA 13 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostra de sobrenadante de saliva mensurada imediatamente após a coleta e após o armazenamento da amostra em baixa temperatura durante 6h, 24h, 48h e 72h

[34] A FIGURA 14 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostra de sobrenadante de saliva mensurada imediatamente após a coleta e após o armazenamento da amostra em temperatura ambiente durante 6h, 24h, 48h e 72h.

[35] A FIGURA 15 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostra de saliva diretamente no diamante do ART- FTIR, de amostras de saliva na plataforma de amostra de alumínio aquecidas a diferentes temperaturas.

[36] A FIGURA 16 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostra de gargarejo na plataforma de amostra de alumínio aquecidas a diferentes temperaturas.

[37] A FIGURA 17 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostra de lavado de swab nasal aplicado diretamente no diamante do ATR- FTIR, de lavado de swab nasal aplicado na plataforma de amostra de alumínio aquecidas a diferentes temperaturas.

[38] A FIGURA 18 mostra a comparação do espectro de ATR- FTIR de amostras com adição de volume 1:1 de saliva e álcool 100% para sobrenadante de saliva pura, de sobrenadante de saliva com álcool 100%, de saliva total pura e saliva total com álcool 100%.

Objetivo da invenção

[39] O objetivo do presente pedido de patente é fornecer uma plataforma de amostra individual sustentável e reutilizável para uso em um sistema de espectroscopia de infravermelho, particularmente FTIR, mais particularmente ATR-FTIR que permita ser utilizada em um método de secagem rápida para formação de biofilme e permita a identificação e armazenamento de amostras diretamente na referida plataforma, sem que apresente ruído relevante ou que interfira no espectro criado, e, que reduza o tempo de preparo das amostras e aumente a escala na análise das mesmas.

[40] Em outra modalidade o presente pedido fornece um sistema de plataformas de amostra que compreende duas ou mais das referidas plataformas de amostra individual.

[41] Em uma outra modalidade o presente pedido fornece um método para uso da referida plataforma de amostra, ou do sistema de plataformas de amostra, em um sistema de espectroscopia de infravermelho. Mais particularmente um método que compreende uma etapa de secagem rápida da amostra para formação de um biofilme, que ainda pode compreender uma etapa de identificação da amostra e armazenamento da mesma diretamente na referida plataforma, sem que apresente ruído relevante ou que interfira no espectro criado, e, que reduza o tempo de preparo das amostras e aumente a escala na análise das mesmas

[42] Em ainda outra modalidade a presente invenção fornece o uso da referida plataforma de amostra, ou sistema de plataformas de amostra, em um sistema

de espectroscopia de infravermelho. Mas particularmente o uso da referida plataforma de amostra com amostras biológicas para diagnóstico de doenças usando espectros de infravermelho de.

Descrição detalhada da invenção

[43] A invenção se refere a uma plataforma de amostra individual para ser usada em um sistema de análise fotônico, particularmente FTIR, mais particularmente ATR-FTIR, mas também pode ser usada em outras técnicas analíticas, análises univariadas de modos vibracionais, análises de segunda derivada, análises multivariadas como PCA (Principal Component Analysis) e HCA (Hierarchical Cluster Analysis) e análises de aprendizado de máquina e Inteligência Artificial.

[44] A referida plataforma pode ser usada com amostras biológicas, particularmente fluidos biológicos como saliva, gargarejo, lavado de swab de nasofaringe ou nasal, urina, sangue, dentre outros, para detecção de biomarcadores ou perfis espectrais decorrentes de várias doenças.

[45] Em uma modalidade da invenção a referida plataforma sendo de alumínio para secagem e armazenamento das amostras, em substituição aos slices de vidro, tendo em vista as propriedades vantajosas do alumínio com relação ao vidro, como por exemplo a sua boa condutividade térmica, sua facilidade e custo de produção, bem como baixa interferência de ruído no espectro formado.

[46] Em outra modalidade a referida plataforma pode ser de outro material revestido de alumínio, ou seja, ter o núcleo constituído de outro material, sendo esse outro material de boa condutividade térmica e baixo custo de produção.

[47] Além do alumínio, outros materiais que apresentem características físico-químicas similares ao do alumínio podem ser utilizados em substituição ao alumínio ou em conjunto com o alumínio para fabricação da plataforma de amostra, como, por exemplo, aço-inox, compósitos ou ligas metálicas de alumínio. Mais particularmente, materiais que se mostrem inertes, não interferindo na leitura da amostra, ou que apresentem um nível de ruído aceitável quando da leitura da amostra podem ser utilizados.

[48] Em outra modalidade a referida plataforma de amostra pode ser de formas distintas e tamanhos variados, desde que seja adequada para uso em um sistema de FTIR. Mais particularmente a referida plataforma de amostra está no formato de pastilhas de alumínio ou revestidas de alumínio.

[49] Em uma das modalidades da invenção, a plataforma de amostra pode ter em seu lado inferior meios para a identificação da amostra. Tais meios para a identificação da amostra incluem, sem limitação a somente estes aqui citados, marcações, números impressos na pastilha, códigos alfanuméricos, códigos de barras, códigos QR, etiquetas, dentre outros.

[50] A Figura 1 ilustra os princípios básicos no contexto de uma plataforma convencional de amostra para um sistema de espectroscopia de infravermelho FTIR. Neste caso a amostra, por exemplo um fluido biológico, composições/compostos orgânicos e/ou inorgânicos, necessita esperar o tempo necessário, dependendo do volume e composição da amostra, até que se forme uma película, um biofilme, para que seja possível iniciar a análise por infravermelho. A amostra também pode ser um tecido biológico ou outro tipo de material.

[51] A Figura 2 ilustra os princípios básicos do FTIR no contexto da criação da plataforma de amostra do presente pedido de patente, que pode ser por exemplo individual ou um conjunto de plataformas individuais, e pode ser em formato de pastilha circular, ovalado, quadrado, retangular ou outro adequado a ser usado em um sistema de espectroscopia de infravermelho, feita ou revestida de alumínio ou por material com propriedades e características físico-químicas similares ao do alumínio. A referida plataforma de amostra proporciona a possibilidade de preparo, secagem, identificação e armazenamento prévio de amostras para posteriormente serem analisadas em um sistema FTIR. Neste caso, as plataformas de amostra podem receber amostras, por exemplo, fluidos biológicos, composições/compostos orgânicos e/ou inorgânicos, para secagem em diferentes circunstâncias com temperatura e fluxo de vento controlados, ou em temperatura ambiente, permitindo inserção e preparo das amostras em plataformas individuais ou em um sistema compreendendo um conjunto de duas ou mais das referidas plataformas individuais. O uso do conjunto de plataformas de amostra individuais ou do sistema compreendendo um conjunto das referidas

plataformas individuais, proporciona o preparo de várias amostras de interesse ao mesmo tempo, bem como a sua identificação e armazenamento em lotes. Estando, portanto, as diversas amostras prontas para análise no sistema ATR-FTIR em sequência, o que pode ser definido como um sistema otimizado de alta-escala, reutilizável, sustentável e que proporciona velocidade e baixo custo na análise.

[52] A Figura 3 mostra exemplos de algumas das modalidades preferenciais da presente invenção. A primeira ilustração mostra uma plataforma de amostra individual sustentável e reutilizável (modelo isolado), com sistema de identificação numeral, para fácil identificação da amostra. Nessa modalidade as plataformas individuais podem ser configuradas para receber um sistema de identificação adequado a necessidade e, embora possam ser usadas em conjunto com outras plataformas individuais ou em um sistema que compreenda duas ou mais das referidas plataformas individuais, ou seja, o preparo de várias plataformas individuais com amostras de interesse diferentes ou duplicadas. As referidas plataformas individuais são sustentáveis uma vez que após a análise, elas podem ser devidamente lavadas, esterilizados e secas, e estariam prontas para serem reutilizadas.

[53] Na segunda e terceira ilustrações da Figura 2 são mostrados exemplos de modalidades da plataforma de amostra em que as mesmas se encontram em um modelo individual, unitário, (com uma única plataforma de amostra) ou em um sistema de modelo múltiplo compreendendo mais de uma plataforma de amostra individual. No exemplo da Figura 2, demonstramos o sistema compreendendo duas ou três plataformas unitárias de amostra (modelo composto duplo ou modelo composto triplo). Nesses exemplos de modalidades pode-se proporcionar um único sistema, suporte, estrutura ou plataforma que compreenda múltiplas plataformas unitárias/individuais de amostra. Esse sistema compreendendo então uma estrutura capaz de abrigar a múltiplas plataformas de amostra individuais, mais particularmente, proporcionando um sistema de plataformas de amostra múltiplo que permita o preparo, identificação e armazenamento de várias amostras diferentes ao mesmo tempo, ganhando assim em tempo e escala de análise. O número de plataformas individuais de amostra no referido sistema, por exemplo 4, 5, 6...10, 20 ou mais, pode variar

dependendo da necessidade, custo benefício, eficiência e velocidade proporcionando na análise das amostras por espectroscopia de infravermelho. O referido sistema de plataformas de amostra múltiplo sendo também sustentável, uma vez que após a análise das amostras, todo o sistema pode ser devidamente lavado, esterilizado e seco, e estaria pronto para ser reutilizado.

[54] A Figura 4 mostra uma ilustração das plataformas de amostra múltipla, compreendendo plataformas individuais no formato de pastilhas, mais particularmente pastilhas de alumínio, sendo submetidas a um método de secagem em uma chapa quente com temperatura variando de entre 37°C a 80°C, podendo, ou não, serem colocadas sobre um material condutor de calor para formação rápida de biofilme.

[55] A Figura 5 mostra exemplos de algumas das modalidades preferenciais da presente invenção em que a plataforma de amostra pode ainda possuir diferentes sistemas de identificação na face posterior ao que receberá a amostra, como por exemplo: sequências numéricas, código de barras ou QR code.

[56] A Figura 6 mostra um workflow de um sistema de análise de dados em que compreende, basicamente, o preparo da amostra usando a plataforma de amostra da presente invenção, bem como posterior análise dos espectros formados e trabalho dos dados obtidos.

[57] A Figura 7 demonstra a diferença de espectro entre plataformas de amostra produzidas com diferentes materiais. Sendo a plataforma de amostra do presente pedido de patente no formato de pastilhas de alumínio (preto), plataformas de papel (vermelho) e plataformas de plástico (em azul). Percebe-se de forma evidente a presença de modos vibracionais em 3000-2750 cm^{-1} , 1500-1250 cm^{-1} e 700-750 cm^{-1} para a plataforma de plástico e diversas regiões de modos vibracionais para a plataforma de papel (3700-2500 cm^{-1} e 1750-750 cm^{-1}), o que pode modificar o sinal de análise de diversos componentes biológicos. Por outro lado, o espectro de infravermelho produzido pela plataforma de alumínio praticamente não apresenta variações no espectro, o que indica uma excelente matriz de suporte e secagem para análise de amostras biológicas de forma sustentável.

[58] A Figura 8 demonstra que a assinatura espectral de uma amostra biológica de saliva inserida diretamente no cristal de ATR-FTIR (preto) é equivalente a assinatura espectral de saliva inserida na plataforma de amostra de alumínio (azul). Em conjunto esses dados comprovam a possibilidade de utilização da plataforma de amostra do presente pedido de patente para medidas de ATR-FTIR sem comprometer a qualidade da amostra analisada. O perfil espectral da plataforma de amostra na configuração de pastilhas de alumínio (vermelho) demonstra que o sinal espectral do alumínio não se sobrepõe ao espectro de saliva.

[59] A Figura 9 mostra a comparação do espectro de infravermelho entre uma amostra biológica, mais particularmente saliva, inserida em uma plataforma de papel e apenas a plataforma de papel sem amostra. Considerando que em diversos modos vibracionais o componente do papel (preto) se sobrepõe ao perfil com saliva na plataforma de papel (vermelho), a Figura 9 demonstra que o papel não é uma matriz boa para ser usada como uma plataforma para amostras biológicas para análise do perfil espectral. Sua utilização pode ocorrer em análises de amostras focadas na região de amida I e amida II na região espectral entre 1750-1500 cm^{-1} .

[60] A Figura 10 demonstra a comparação do espectro de FTIR de lavado de swab de nasofaringe com uma aplicação da amostra na plataforma em forma de pastilha de alumínio da presente invenção, ou com duas, três ou quatro aplicações intercaladas com secagem de 5 min em chapa quente 80°C.

[61] A imagem demonstra o potencial das plataformas de pastilhas de alumínio do presente invento para procedimentos em que é necessário um conjunto maior de pipetagens para concentração da amostra de lavado de swab de nasofaringe. Percebe-se que é possível fazer uma sequência diversas pipetagens com secagem intermitente e ocorre uma preservação do sinal espectral para uma aplicação (preto), duas aplicações (vermelho), três aplicações (azul) ou quatro aplicações (verde) intercaladas com períodos de secagem de 5 min em chapa quente 80°C.

[62] Figura 11 demonstra o espectro de ATR-FTIR para amostras de saliva total mensuradas imediatamente após a coleta (preto), após 6 horas (vermelho),

24 horas (azul), 48 horas (verde) e 72 horas (violeta) armazenadas em gelo. De forma geral percebe-se uma manutenção do espectro em infravermelho nos diferentes modos vibracionais. No entanto, percebe-se uma tendência de instabilidade no modo vibracional entre $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, indicando necessidade de parâmetros de armazenamento similares quando este modo vibracional for foco do estudo.

[63] A Figura 12 demonstra o espectro de ATR-FTIR para amostras de saliva total mensuradas imediatamente após a coleta (preto) e após 6 horas (vermelho), 24 horas (azul), 48 horas (verde) e 72 horas (violeta) armazenadas em temperatura ambiente. De forma geral percebe-se uma manutenção do espectro em infravermelho nos diferentes modos vibracionais. No entanto, percebe-se uma tendência de instabilidade em alguns modos vibracionais, destacando: $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, $1250\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, $1420\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ e $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ indicando necessidade de parâmetros de armazenamento similares quando este modo vibracional for foco do estudo. Adicionalmente, percebe-se uma maior variação das amostras em comparação as amostras armazenadas em gelo.

[64] A Figura 13 demonstra a comparação do espectro entre o sobrenadante da saliva 0h e o efeito de armazenamento em gelo durante 6h, 24h, 48h e 72h. Considerando que na saliva total pode conter restos alimentares e debris celulares, a análise foi repetida com o sobrenadante salivar após centrifugação em 2600 G, 4°C durante 15 minutos. O espectro de ATR-FTIR para amostras de sobrenadante da saliva mensurado imediatamente após a coleta (preto) e após 6 horas (vermelho), 24 horas (azul), 48 horas (verde) e 72 horas (violeta) armazenadas em gelo. De forma geral percebe-se uma manutenção do espectro em infravermelho nos diferentes modos vibracionais. No entanto, percebe-se uma tendência de instabilidade no modo vibracional entre $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, indicando necessidade de parâmetros de armazenamento similares quando este modo vibracional for foco do estudo. Os dados foram similares a manutenção de saliva total em gelo nos mesmos períodos.

[65] A Figura 14 demonstra a comparação do espectro entre o sobrenadante da saliva 0h e o efeito de armazenamento de temperatura ambiente durante 6h, 24h, 48h e 72h. Considerando que na saliva total pode conter restos alimentares e debris celulares, a análise foi repetida com o sobrenadante salivar após

centrifugação em 2600 G, 4°C durante 15 minutos. O espectro de ATR-FTIR para amostras de sobrenadante da saliva mensurado imediatamente após a coleta (preto) e após 6 horas (vermelho), 24 horas (azul), 48 horas (verde) e 72 horas (violeta) armazenadas em temperatura ambiente. De forma geral percebe-se uma manutenção do espectro em infravermelho nos diferentes modos vibracionais. No entanto, percebe-se uma tendência de instabilidade em alguns modos vibracionais, destacando: 1000-1100 cm^{-1} , 1250- 1300 cm^{-1} , 1420-1460 cm^{-1} e 3100-3000 cm^{-1} indicando necessidade de parâmetros de armazenamento similares quando este modo vibracional for foco do estudo. Adicionalmente, percebe-se uma maior variação das amostras em comparação as mesmas amostras armazenadas em gelo.

[66] A Figura 15 demonstra a comparação do espectro entre a saliva aplicada diretamente no cristal (preto), ou inserida na plataforma de amostra no formato de pastilha de alumínio a 23°C (vermelho), inserida na plataforma de amostra no formato de pastilha de alumínio a 37°C (azul), inserida na plataforma de amostra no formato de pastilha de alumínio a 50°C (verde) ou inserida na plataforma de amostra no formato de pastilha de alumínio a 80°C (violeta). Considerando que o processo de secagem com temperaturas aumentadas permite uma aceleração do procedimento de secagem da amostra, fato que tem uma grande aplicabilidade industrial devido a possibilidade de utilização do sistema em alta escala, foi realizada análise das amostras que foram preparadas utilizando diferentes temperaturas de secagem da amostra na plataforma de alumínio. Apesar de diferenças no perfil espectral percebe-se que a saliva inserida diretamente no cristal ATR (preto), saliva em 23°C (vermelho), saliva em 37°C (azul), saliva em 50°C (verde) e saliva em 80°C (violeta) mantém a presença de todos os modos vibracionais, o que indica que podem ser utilizadas como método de alta-escala desde que todas as amostras do estudo sejam secadas na mesma temperatura. Em caso de alteração no padrão de temperatura percebe-se uma tendência de instabilidade em alguns modos vibracionais, destacando: 900- 1200 cm^{-1} , 1250-1200 cm^{-1} e 3300-2800 cm^{-1} . O tempo de secagem foi respectivamente de 37 minutos, 47 minutos, 19 minutos, 12 minutos e 5.35 minutos, desta forma podendo o processo de secagem acelerar em até 7

vezes o preparo da amostra usando a plataforma de amostra da presente invenção, sem afetar na qualidade do espectro de infravermelho produzido.

[67] A Figura 16 demonstra a comparação do espectro entre uma amostra de gargarejo inserido na plataforma de amostra no formato de pastilha de alumínio a 23°C (preto), a 37°C (vermelho), a 50°C (azul) ou a 80°C (verde). Considerando que o processo de secagem com temperaturas elevadas permite uma aceleração do procedimento de secagem da amostra, fato que tem uma grande aplicabilidade industrial devido a possibilidade de utilização do sistema em alta escala, foi realizada análise de outra amostra biológica em diferentes temperaturas da chapa quente. Apesar de diferenças no perfil espectral percebe-se que o gargarejo de 3 mL de solução salina e água por 10 segundos, gargarejo em 23°C (preto), em 37°C (vermelho), em 50°C (azul) e saliva em 80°C (verde) mantém a presença de todos os modos vibracionais, o que indica que podem ser utilizadas como método de alta-escala desde que todas as amostras do estudo sejam secadas na mesma temperatura. O tempo de secagem foi respectivamente de 48 minutos, 19 minutos, 12 minutos, e 4.4 minutos até a formação do filme, desta forma podendo o processo de secagem acelerar em até 11 vezes utilizando a plataforma de amostra da presente invenção, sem afetar na qualidade do espectro de infravermelho produzido.

[68] A Figura 17 demonstra a comparação do espectro entre lavado de swab nasal aplicado diretamente no cristal (preto), ou inserida na plataforma de amostra no formato de pastilha de alumínio a 23°C (vermelho), a 37 °C (azul), 50 °C (verde) ou a 80 °C (violeta). Como mencionado previamente, devido a interferência do processo de secagem com temperaturas aumentadas para grande aplicabilidade industrial devido a possibilidade de utilização do sistema em alta escala, foi realizada uma análise das amostras em diferentes temperaturas de secagem para lavado de swab nasal. Apesar de diferenças no perfil espectral percebe-se que o lavado de swab nasal inserido diretamente no cristal ATR (preto), em 23°C (vermelho), em 37°C (azul), em 50°C (verde) e em 80°C (violeta) mantém a presença de todos os modos vibracionais, o que indica que podem ser utilizadas como método de alta-escala desde que todas as amostras do estudo sejam secadas na mesma temperatura. O tempo de secagem foi respectivamente de 204 minutos, 88 minutos, 73 minutos, 48

minutos e 20 minutos para 4 aplicações por amostra, desta forma podendo o processo de secagem da amostra acelerar em até 10 vezes o processo usando a plataforma de amostra da presente invenção, sem afetar na qualidade do espectro de infravermelho produzido.

[69] A Figura 18 demonstra a comparação do espectro entre amostras que tiveram um processo de secagem a temperatura ambiente, diretamente na plataforma de amostra em formato de pastilha de alumínio, ou com secagem associada a adição de álcool 100% na proporção 1:1 com a amostra na plataforma de amostra em formato de pastilha de alumínio. O perfil espectral infravermelho com a adição de volume 1:1 de amostras de saliva e álcool 100% para sobrenadante de saliva pura (preto), sobrenadante de saliva com álcool 100% (vermelho), saliva total pura (azul) e saliva total com álcool 100% (verde). Percebe-se a manutenção da expressão de todos os modos vibracionais e também a ausência de mudança de perfil com o álcool 100%, o que pode ser utilizado como estratégia microbicida para amostras contaminados com fungos, vírus e bactérias.

[70] O aspecto central da presente invenção é proporcionar uma plataforma de amostra de baixíssimo custo, reciclável, e reutilizável para recebimento de amostras com respectiva secagem com intuito de formação de biofilme de forma rápida e permitindo armazenamento de amostras diretamente na pastilha para mensuração em plataformas fotônicas (convencionalmente FTIR), sem interferir na qualidade do espectro formado e com nível baixíssimo de ruído

[71] Na plataforma de amostra aqui descrita o sistema não funciona como elemento reflexivo interno (IRE) mas permite a secagem e armazenamento do biofilme da amostra que se adere a pastilha.

[72] Para o protocolo de secagem até a formação de biofilme foram testados os seguintes protocolos em temperatura ambiente e usando uma fonte de calor para aquecer a plataforma de amostra, em que a fonte de calor pode ser por exemplo uma chapa quente com temperatura entre 37°C a 80°C: (1) secagem de biofluido puro (1µl ≈ 4 minutos); (2) secagem de biofluido misturado (1:1) em etanol para rápida evaporação e redução de viabilidade de microrganismos; (3) secagem de biofluido misturado (1:1) em metanol para rápida evaporação e

redução de viabilidade de microrganismos; (4) secagem de biofluido misturado (1:1) em acetonitrila para rápida evaporação e redução de viabilidade de microrganismos.

[73] A plataforma de amostra individual no formato de pastilha de alumínio é utilizada em substituição aos slices de vidro pois o alumínio é um bom condutor de calor e as lâminas de vidro tem características mais similares com isolante de calor. Adicionalmente uma vantagem do uso de uma plataforma de amostra que é uma pastilha de alumínio ou com cobertura de alumínio é uma redução de custos da produção das pastilhas e da flexibilidade de poder usá-las individualmente, com pequenos volumes de amostra e possibilidade de armazenamento das amostras sem utilização de suporte. A plataforma de amostra de alumínio pode ter um tamanho mínimo da dimensão do elemento reflexivo interno do próprio aparelho (geralmente 2,5 a 3 mm²) e podem ter tamanhos maiores até 8 mm². Considerando que o alumínio é um bom condutor de calor as pastilhas podem ter de 0,1 mm até 2 mm de espessura. As plataformas de amostra podem ainda compreender um sistema de identificação por números impressos diretamente na pastilha de alumínio, código de barras, código QR, etiquetas ou qualquer outro sistema de identificação.

[74] Este sistema pode ser adaptado em um sistema de ATR-FTIR de bancada ou portátil, em que o acessório de ATR (costumeiramente de diamante) tenha tamanho inferior ao da plataforma de amostra de alumínio, sem necessidade de qualquer alteração na configuração de espelhos ou ângulo do feixe infravermelho da plataforma de ATR-FTIR.

[75] A análise por técnicas fotônicas, frequentemente o ATR-FTIR mas também podem ser expandida para outras técnicas analíticas, com as amostras sob as plataformas de amostra de alumínio da presente invenção permitem análises univariadas de modos vibracionais, análises de segunda derivada, análises multivariadas como PCA (Principal Component Analysis) e HCA (Hierarquical Cluster Analysis) e análises de aprendizado de máquina e Inteligência Artificial.

[76] O presente pedido de patente refere-se a uma plataforma de amostra individual para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho (FTIR), ainda

mais particularmente ATR-FTIR, em que a plataforma de amostra individual é fabricada com material que compreenda boa condutividade térmica e baixa interferência de ruído no espectro formado, mais particularmente feito ou revestido de alumínio, ou por material com propriedades e características físico-químicas similares ao do alumínio. O referido material sendo selecionado do grupo que consiste de: alumínio; ligas-metálicas de alumínio; e combinação de um outro material que possua boa condutividade térmica com o alumínio, mais particularmente em que o referido outro material compreende o núcleo e este é revestido por alumínio.

[77] A referida plataforma de amostra compreende um formato de pastilha circular, ovalado, quadrado, retangular ou outro adequado para uso em um sistema de espectroscopia de infravermelho. A plataforma de amostra compreende ainda um tamanho mínimo equivalente ao tamanho mínimo da dimensão do elemento reflexivo interno do aparelho de espectroscopia de infravermelho, mais particularmente um tamanho que pode variar entre cerca de 2,5 mm² até 8 mm², com uma espessura de pastilha que pode variar de cerca de 0,1 mm até 2 mm.

[78] A referida plataforma de amostra pode compreender ainda meios para identificação da amostra a ser analisada, em que os referidos meios de identificação podem ser impressos diretamente na plataforma ou fixadas na plataforma no lado oposto ao que recebe a amostra ou nas laterais da plataforma; em que os meios de identificação são selecionados do grupo que consiste de: números, códigos alfanuméricos, códigos de barras, códigos QR, marcações outras de identificação ou etiquetas.

[79] O presente pedido de patente refere-se também a um sistema de plataformas de amostra para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho em que o referido sistema compreende duas ou mais das referidas plataformas de amostra individuais e ainda pode compreender uma estrutura de suporte para as plataformas. A estrutura de suporte pode compreender regiões específicas para abrigar ou fixar cada uma das plataformas de amostra individuais, de modo que possa ser configurada de acordo com a necessidade; ou em que a estrutura de suporte pode compreender uma pluralidade de plataformas individuais pré-definida e já integradas a sua estrutura.

[80] O presente pedido de patente refere-se ainda a um método para reduzir o tempo e aumentar a escala de análise de amostras em um sistema de espectroscopia de infravermelho em que o método compreende as etapas de preparar as plataformas de amostra individuais, ou o sistema de plataformas de amostra, com as amostras de interesse a serem analisadas e analisar as amostras nas plataformas de amostra em um sistema de espectroscopia de infravermelho.

[81] A etapa de preparar as plataformas ou sistema com as referidas amostras compreendendo as etapas de:

- aplicação da amostra na plataforma de amostra; e
- secagem da amostra para formação de biofilme.

[82] A etapa de aplicação da amostra podendo ser repetida, mais preferencialmente de 2 a 4 vezes, cada aplicação adicional intercalada com uma etapa de secagem.

[83] A etapa de secagem da amostra podendo compreender diferentes métodos de secagem ou combinação destes, como a exposição à temperatura ambiente; ou aquecimento dentro de uma faixa de temperatura controlada e/ou fluxo de ar controlado e/ou adição de substância volátil na amostra.

[84] A etapa de secagem da amostra com temperatura controlada compreende o aquecimento da plataforma de amostra através de uma fonte controlada de calor a uma temperatura que pode variar de 37°C a 80°C, sendo o tempo de secagem reduzido quanto maior for a temperatura utilizada.

[85] A adição de substância volátil compreende a adição de álcool 100% na proporção em volume de 1:1 com a amostra, preferencialmente em que o álcool é selecionado do grupo que consiste de: etanol, metanol e acetonitrila.

[86] O referido método ainda pode compreender as etapas de:

- identificação da amostra em que os referidos meios de identificação podem ser impressos diretamente ou fixadas na plataforma de amostra no lado oposto ao que recebe a amostra ou nas laterais da plataforma; em que os meios de identificação são selecionados do grupo que consiste de: números, códigos

alfanuméricos, códigos de barras, códigos QR, marcações outras de identificação ou etiquetas; e

- armazenamento da plataforma de amostra ou sistema de plataformas de amostra já com as amostras secas, em que o referido armazenamento ocorre em ambiente refrigerado com gelo ou de baixa temperatura.

[87] O presente pedido refere-se ainda ao uso da plataforma de amostra individual ou do sistema de plataformas de amostra, em que é em um método de análise de amostras em um sistema de espectroscopia de infravermelho.

[88] O presente pedido de patente refere-se também a um Kit para personalização e otimização de plataformas de amostra para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho em que compreende:

- uma pluralidade das referidas plataformas de amostra individuais; e
- ao menos uma estrutura de suporte compreendendo uma pluralidade de regiões específicas para abrigar ou fixar cada uma das plataformas de amostra individuais, de modo que possa ser configurada de acordo com a necessidade de uso.

[89] A referida plataforma de amostra, sistema ou kit aqui descritos, podem ser usados com amostras biológicas para diagnóstico de doenças ou em técnicas forenses, detecção de compostos orgânicos e inorgânicos com aplicações industriais, na agropecuária e em áreas de toxicologia.

[90] Embora o presente pedido de patente tenha descrito a matéria objeto da presente invenção com um certo grau de detalhamento a título de ilustração e exemplificação para fins de clareza e compreensão, será evidente que certas alterações e modificações podem ser praticadas no escopo das reivindicações em anexo.

[91] Os exemplos descritos neste relatório não são limitativos, permitindo que um técnico no assunto altere alguns aspectos ou componentes da presente invenção, equivalentes aos peptídeos sintéticos, composições ou usos aqui descritos, sem se distanciar do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Plataforma de amostra individual para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho caracterizada a plataforma de amostra individual é fabricada com material que compreenda boa condutividade térmica e baixa interferência de ruído no espectro formado.
2. Plataforma de amostra de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido material é selecionado do grupo que consiste de: alumínio; ligas-metálicas de alumínio; e combinação de um outro material que possua boa condutividade térmica com o alumínio, mais particularmente em que o referido outro material compreende o núcleo e este é revestido por alumínio.
3. Plataforma de amostra de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a referida plataforma de amostra compreende um formato de pastilha circular, ovalado, quadrado, retangular ou outro adequado para uso em um sistema de espectroscopia de infravermelho.
4. Plataforma de amostra de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a plataforma de amostra compreende um tamanho mínimo equivalente ao tamanho mínimo da dimensão do elemento reflexivo interno do aparelho de espectroscopia de infravermelho.
5. Plataforma de amostra de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a plataforma individual de amostra compreende um tamanho que pode variar entre cerca de 2,5 mm² até 8 mm², com uma espessura de pastilha que pode variar de cerca de 0,1 mm até 2 mm.
6. Plataforma de amostra de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de a plataforma compreender ainda meios para identificação da amostra a ser analisada, em que os referidos meios de identificação podem ser impressos diretamente na plataforma ou fixadas na plataforma no lado oposto ao que recebe a amostra ou nas laterais da plataforma; em que os meios de identificação são selecionados do grupo que consiste de: números, códigos alfanuméricos, códigos de barras, códigos QR, marcações outras de identificação ou etiquetas.

7. Sistema de plataformas de amostra para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho caracterizado pelo fato de que compreende duas ou mais plataformas de amostra individuais tal como descritas nas reivindicações 1 a 6, e ainda pode compreender uma estrutura de suporte para as plataformas.

8. Sistema de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a estrutura de suporte pode compreender regiões específicas para abrigar ou fixar cada uma das plataformas de amostra individuais, de modo que possa ser configurada de acordo com a necessidade; ou em que a estrutura de suporte pode compreender uma pluralidade de plataformas individuais pré-definida e já integradas a sua estrutura.

9. Método para reduzir o tempo e aumentar a escala de análise de amostras em um sistema de espectroscopia de infravermelho caracterizado pelo fato de que compreende as etapa de preparar as plataformas de amostra individuais tal como descrita em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou o sistema de plataformas de amostra tal como descrito em qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, com as amostras de interesse a serem analisadas e analisar as amostras nas plataformas de amostra em um sistema de espectroscopia de infravermelho.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a etapa de preparar as plataformas ou sistema com as referidas amostras compreende as etapas de:

- aplicação da amostra na plataforma de amostra; e
- secagem da amostra para formação de biofilme.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a etapa de aplicação da amostra pode ser repetida, mais preferencialmente de 2 a 4 vezes, cada aplicação adicional intercalada com uma etapa de secagem.

12. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que a etapa de secagem da amostra pode compreender diferentes métodos de secagem ou combinação destes, como a exposição à temperatura ambiente; ou aquecimento dentro de uma faixa de temperatura controlada e/ou fluxo de ar controlado e/ou adição de substância volátil na amostra.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a etapa de secagem da amostra com temperatura controlada compreende o aquecimento da plataforma de amostra através de uma fonte controlada de calor a uma temperatura que pode variar de 37°C a 80°C, sendo o tempo de secagem reduzido quanto maior for a temperatura utilizada.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a adição de substância volátil compreende a adição de álcool 100% na proporção em volume de 1:1 com a amostra, preferencialmente em que o álcool é selecionado do grupo que consiste de: etanol, metanol e acetonitrila.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 14, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende as etapas de:

- identificação da amostra em que os referidos meios de identificação podem ser impressos diretamente ou fixadas na plataforma de amostra no lado oposto ao que recebe a amostra ou nas laterais da plataforma; em que os meios de identificação são selecionados do grupo que consiste de: números, códigos alfanuméricos, códigos de barras, códigos QR, marcações outras de identificação ou etiquetas; e
- armazenamento da plataforma de amostra ou sistema de plataformas de amostra já com as amostras secas, em que o referido armazenamento ocorre em ambiente refrigerado com gelo ou de baixa temperatura.

16. Uso da plataforma de amostra individual tal como descrita em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou do sistema de plataformas de amostra tal como descrito em qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que é em um método de análise de amostras em um sistema de espectroscopia de infravermelho.

17. Kit para personalização de plataformas de amostra para uso em sistema de espectroscopia de infravermelho caracterizado pelo fato de que compreende:

- uma pluralidade de plataformas de amostra individuais tal como descrita em qualquer uma das reivindicações 1 a 6; e
- ao menos uma estrutura de suporte compreendendo uma pluralidade de regiões específicas para abrigar ou fixar cada uma das plataformas de amostra

individuais, de modo que possa ser configurada de acordo com a necessidade de uso.

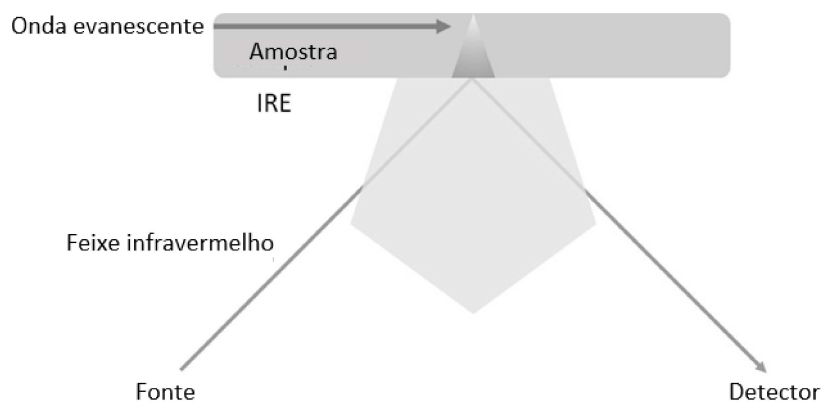


FIGURA 1

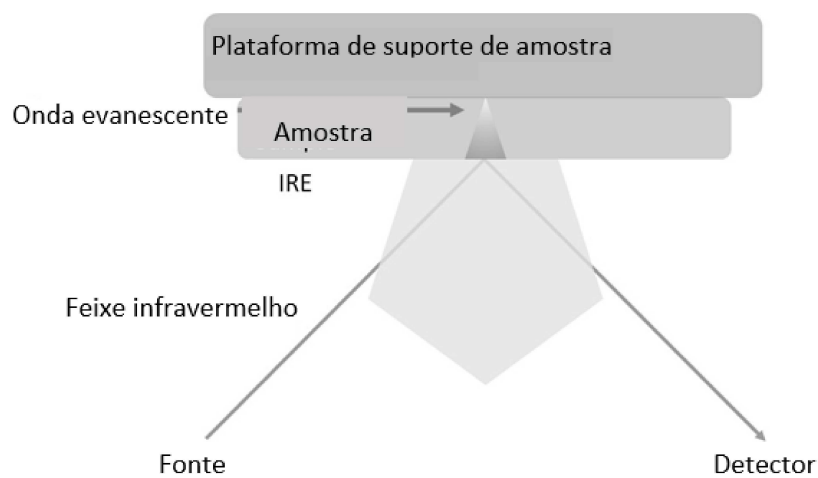


FIGURA 2

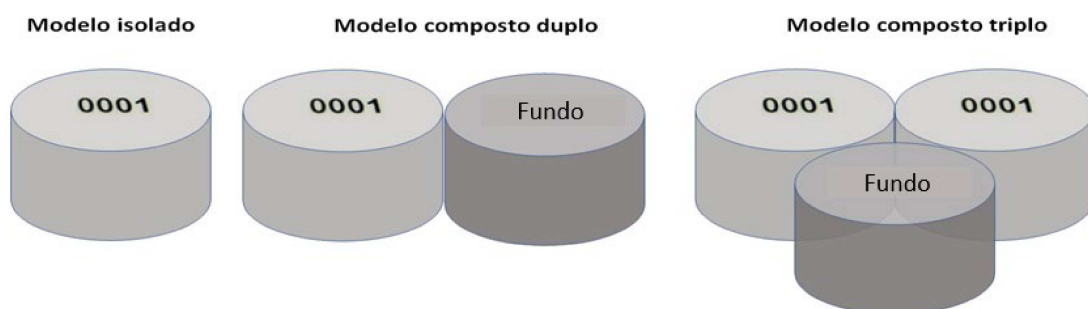


FIGURA 3

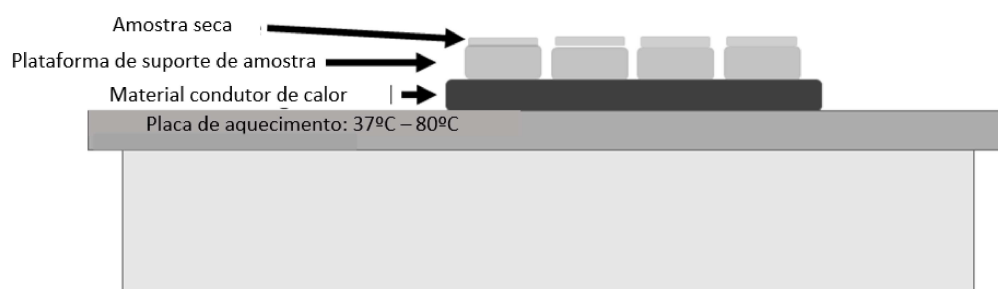


FIGURA 4

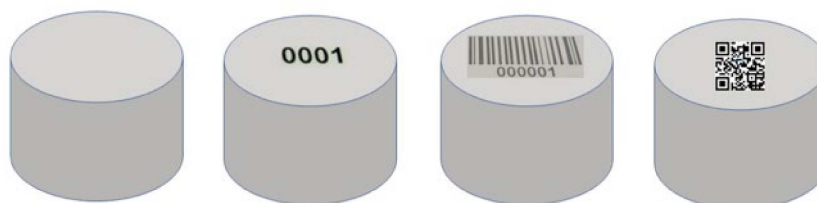


FIGURA 5

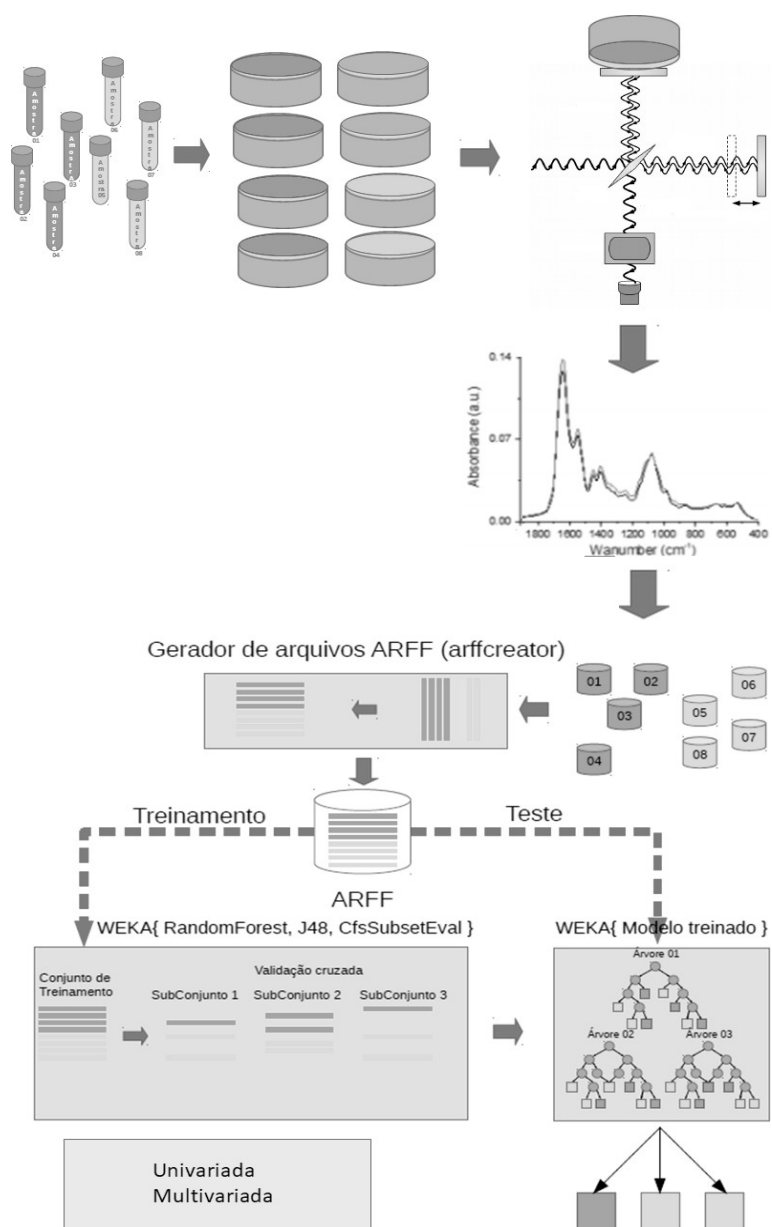


FIGURA 6

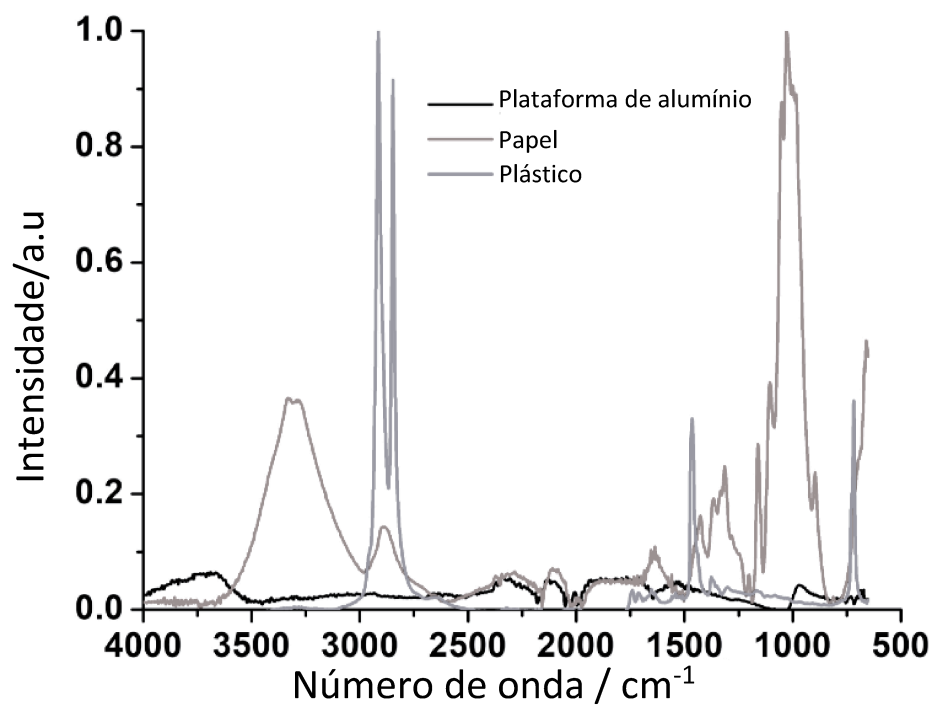


FIGURA 7

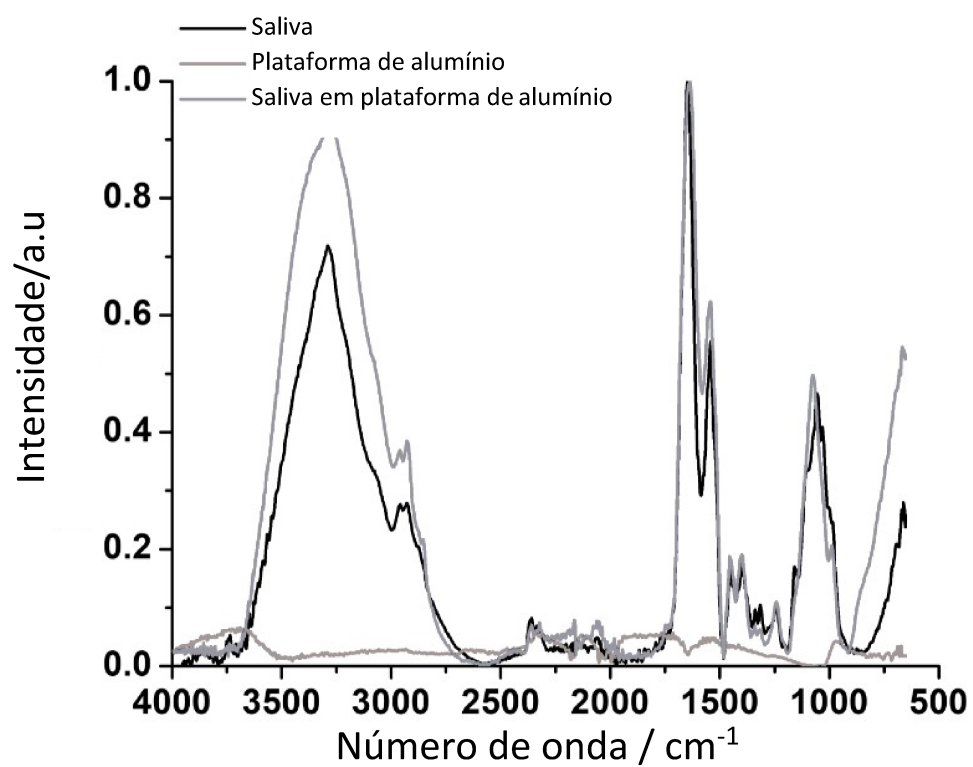


FIGURA 8

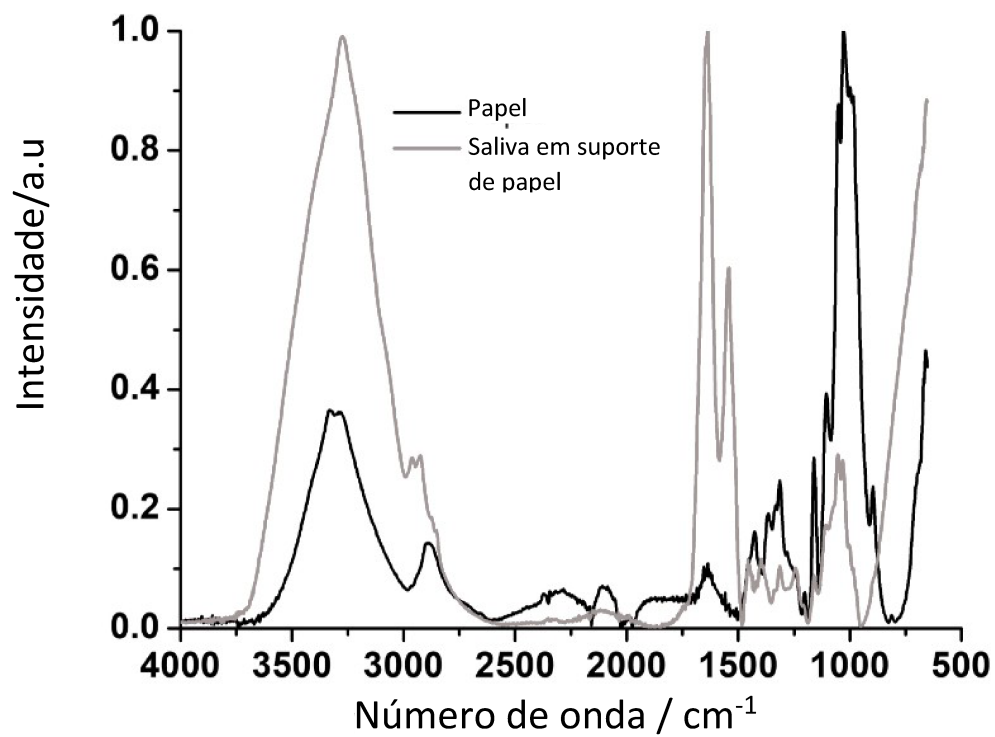


FIGURA 9

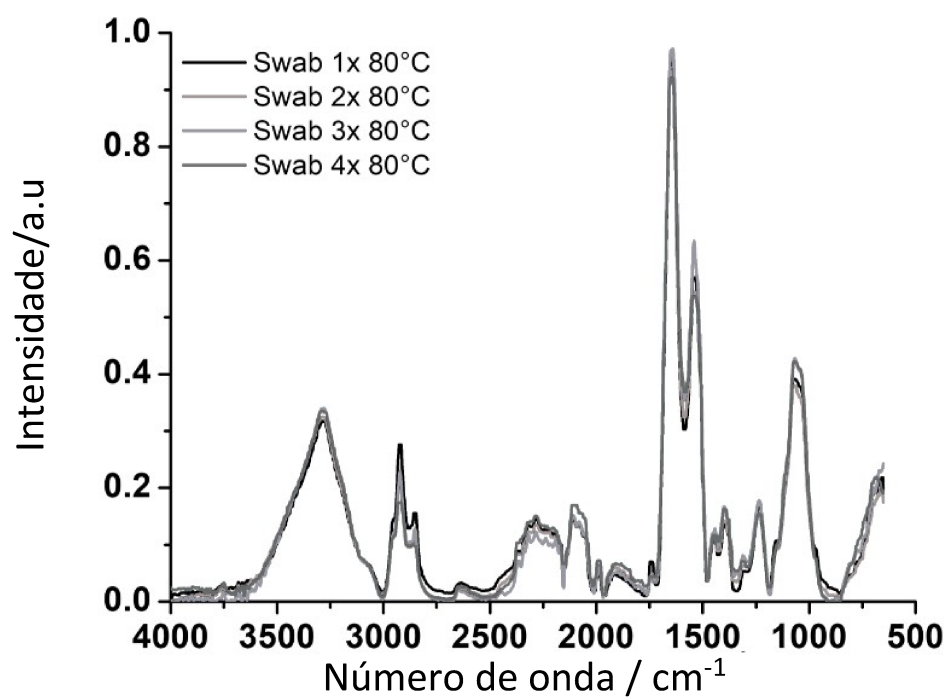


FIGURA 10

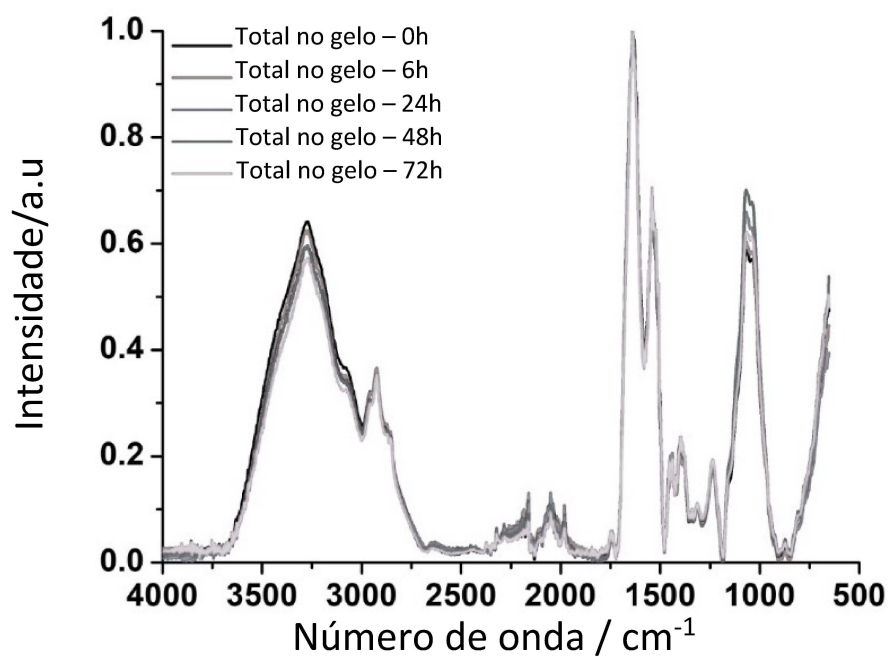


FIGURA 11

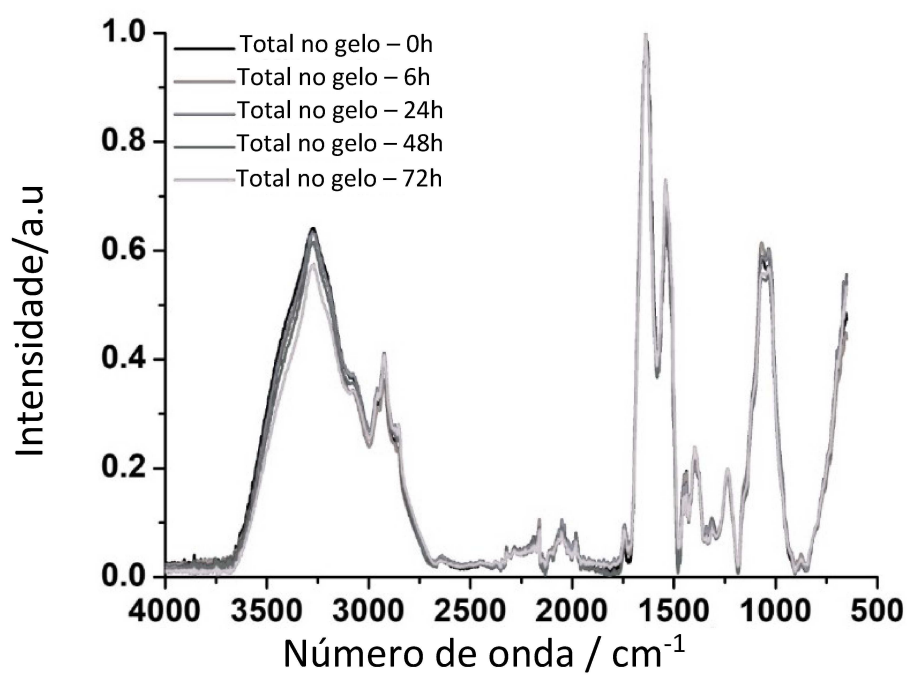


FIGURA 12

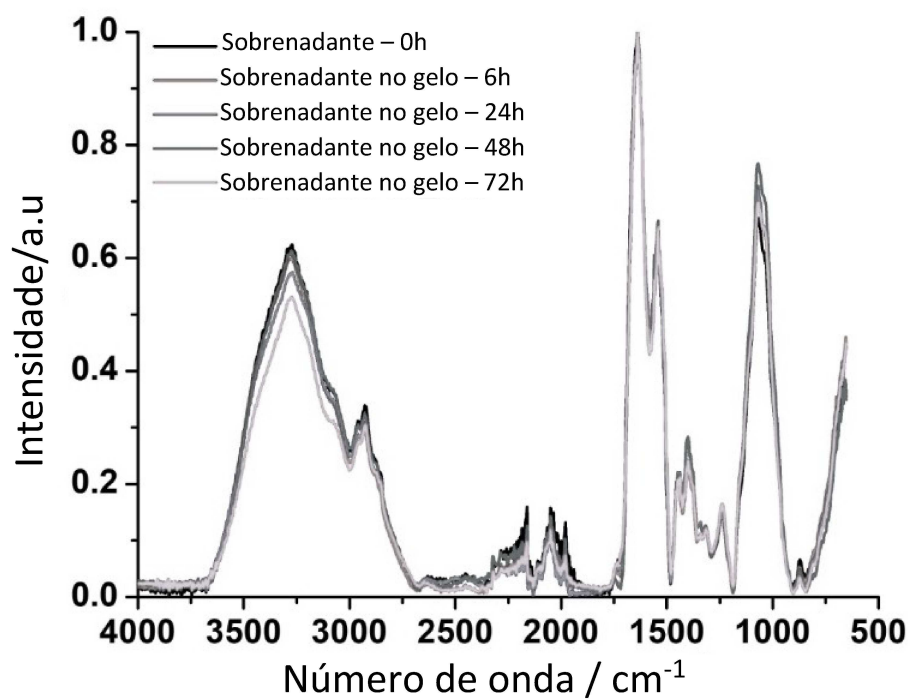


FIGURA 13

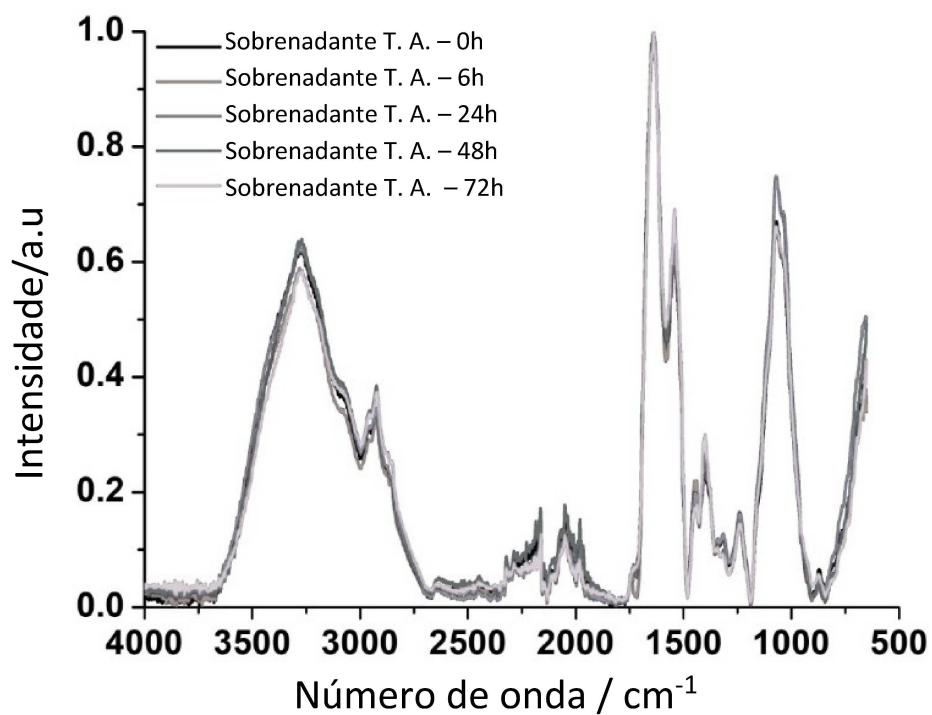


FIGURA 14

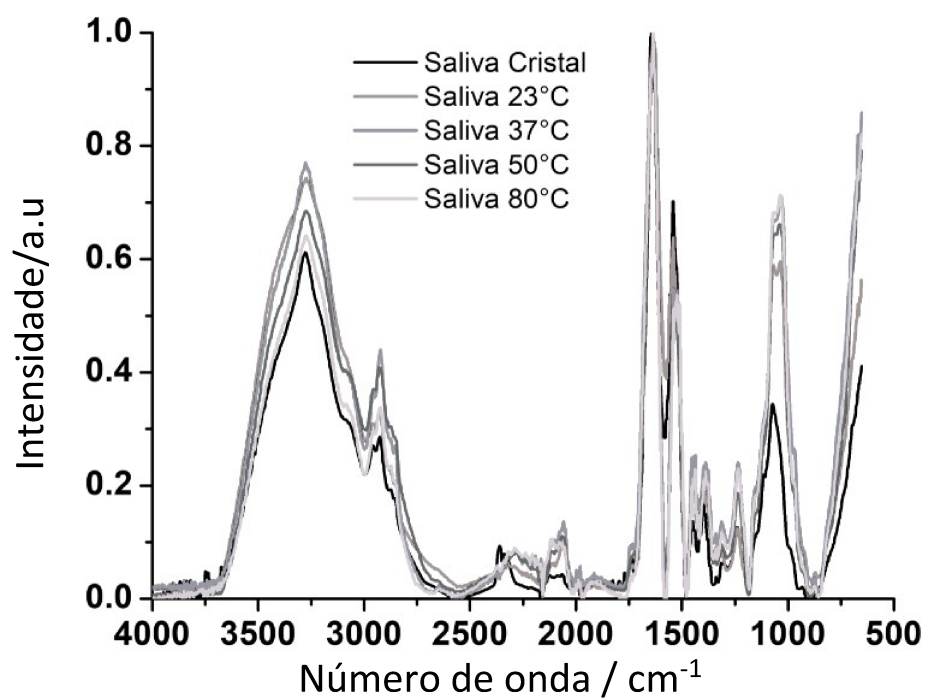


FIGURA 15

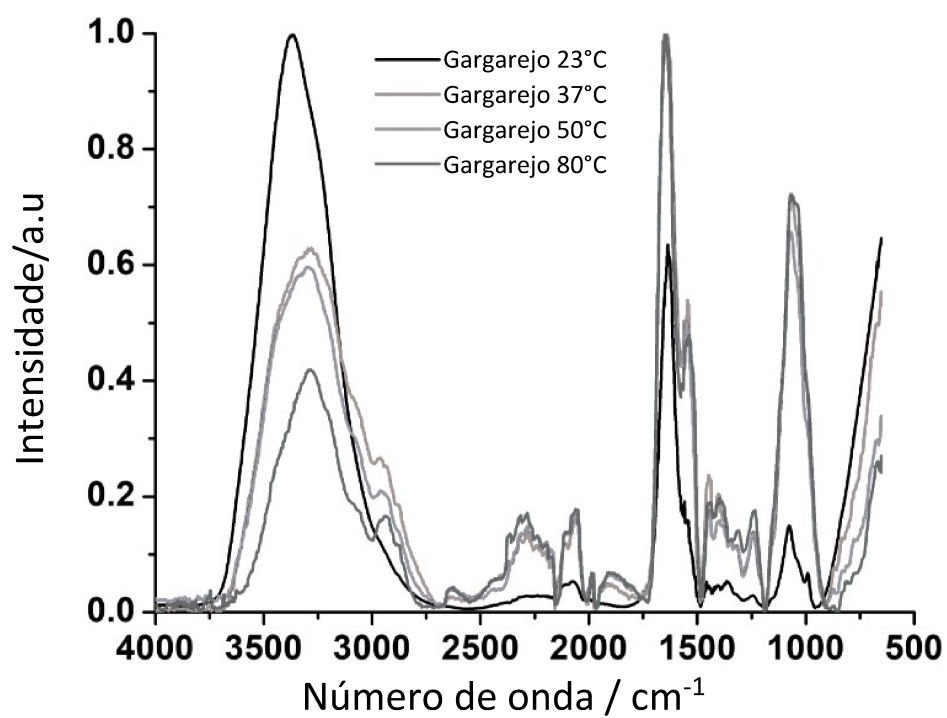


FIGURA 16

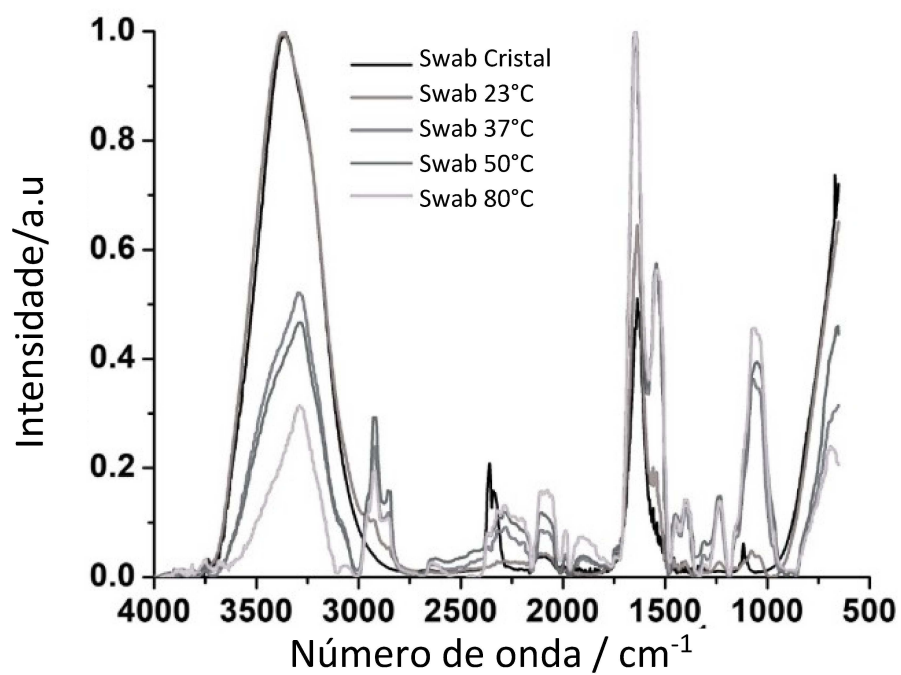


FIGURA 17

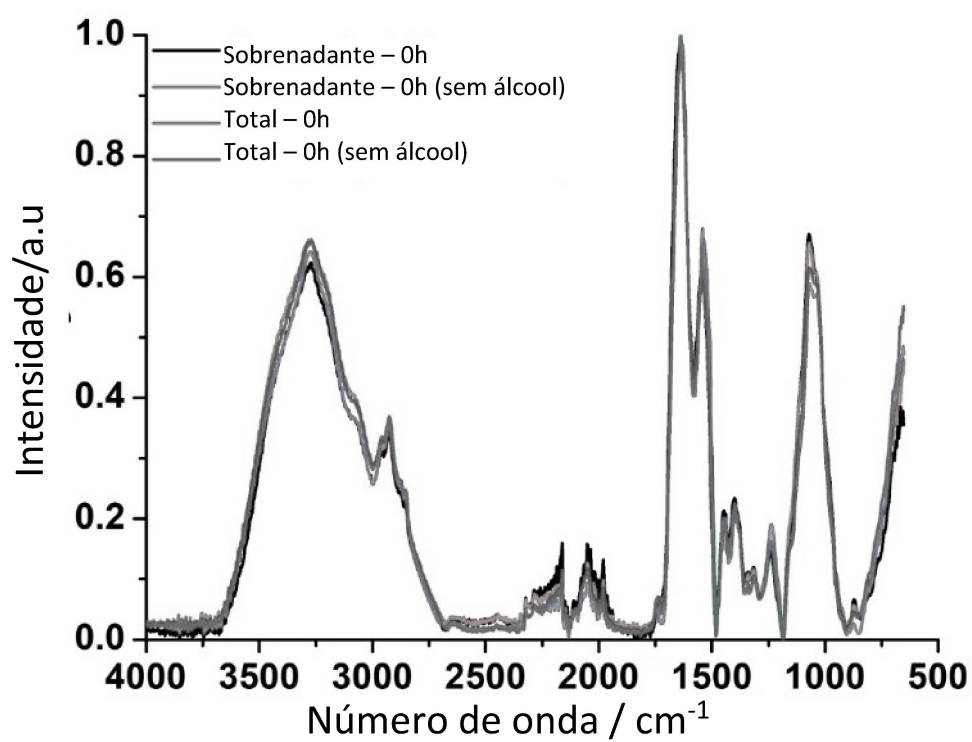


FIGURA 18

Resumo da Patente de Invenção: **"PLATAFORMA DE AMOSTRA REUTILIZÁVEL PARA USO EM ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO, SISTEMA, KIT, MÉTODO E USO DA MESMA"**.

O presente pedido de patente refere-se à uma plataforma de amostra individual reutilizável e sustentável para uso em um sistema de espectroscopia de infravermelho. A referida plataforma pode ser usada com amostras biológicas para diagnóstico de doenças ou em técnicas forenses, detecção de compostos orgânicos e inorgânicos com aplicações industriais, na agropecuária e em áreas de toxicologia. Ainda o presente pedido de patente refere-se à sistema de plataformas de amostra compreendendo mais de uma plataforma de amostra individual, um método para reduzir o tempo de preparo e aumentar a escala na análise de amostras em um sistema de espectroscopia de infravermelho, bem como um Kit para personalização e otimização da plataforma de amostra e o uso da referida plataforma de amostra em um sistema de espectroscopia de infravermelho, mais particularmente espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Artigo I

Artigo I

Salivary infrared spectroscopy coupled to a high-throughput device and machine learning discrimination: A novel sustainable and rapid platform for COVID-19 triage

Léia Cardoso-Sousa¹, Mario Machado. Martins², Mylla Spirandelli da Costa², Paula Souza Santos², Thays Crosara Abrahao Cunha², Murillo Carneiro³, Thulio Marquez Cunha⁴, Robinson Sabino-Silva¹, Luiz Ricardo Goulart².

¹ Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

² Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

³ Faculty of Computing, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴ School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author:

Robinson Sabino-Silva; Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

ABSTRACT

The diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) frequently is performed by nasopharyngeal swabs samples using RT-PCR tests, which are invasive, high cost and uncomfortable. In this context, the combination of ATR-FTIR spectroscopy and machine learning classification in saliva samples could provide an alternative triage tool for COVID-19 using this non-invasive, label-free and sustainable method. In a cross-sectional study to discriminate spectral salivary components we evaluated saliva of COVID-19 (n : 100) and non-COVID-19 (n : 100) subjects using ATR-FTIR coupled to a high-throughput device and machine learning tool to assess the saliva of non-COVID-19 and COVID-19 patients. The principal component analysis linear discriminant (PCA-LDA) analysis of salivary infrared spectra showed sensitivity of 78%, specificity of 76% and accuracy of 77% between non-COVID-19 and COVID-19 patients. In summary, these data highlight the potential of ATR-FTIR platforms coupled to a high-throughput device as a sustainable, reagent free, and non-invasive tool to screening COVID-19 patients using machine learning classification.

Keywords: COVID-19, ATR-FTIR, machine learning, salivary biomarkers, diagnosis, triage, SARS-CoV-2.

1. Introduction

COVID-19 is a viral infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ¹. This disease is a critical health issue, which pose an unprecedented burden on public and private health-care systems worldwide. COVID-19 diagnostics is still primarily based of viral RNA detection through molecular techniques, such as RT-PCR and antigen tests. However, these molecular tests have presented problems of sensitivity, including significant false negative samples, especially when patients are asymptomatic or are in the pre-symptomatic phase ^{2,3}. The traditional COVID-19 diagnostic test using invasive nasopharyngeal swab sample require trained frontline healthcare workers to obtain appropriate sample in an uncomfortable collection for subjects with suspected or confirmed COVID-19. Besides, the close contact of healthcare workers and infected patients increase the infection risk to COVID-19. For that matter, novel strategies for COVID-19 diagnosis are pivotal in the response to the COVID-19 pandemic ⁴.

Attenuated total reflection (ATR) Fourier-transform infrared (FTIR) platforms can analyze the interaction of infrared light with matter, when the wavelengths absorbed by the sample are dependent on molecular vibrations of molecular components ⁵. The ATR-FTIR spectroscopy is a label-free and non-destructive analytical technique ⁶ extensively used to study molecules in different condition. Some reports have demonstrated its usefulness for disease detection, such as Alzheimer's disease ⁷, malaria ⁸, ovarian ⁹, colorectal ¹⁰, lung ¹¹, and brain ¹² cancers. Complex samples have also been evaluated in systemic diseases using principal component analyses (PCA) and partial least square (PLS) as methodologies for unsupervised and supervised dimension reduction, respectively, which are especially critical for multiple regression analyses ¹³. However, artificial intelligence (AI) has enabled the reconfiguration of photonic analyses through data management, overcoming constraints of hardware, optimizing and stabilizing the equipment's performance, especially when the environment, including variations of temperature, light, humidity sample distribution within the slit width and the user are considered. When photonics

differentiation of samples are complex for the hardware to handle, the AI can offer a better solution by incorporating variable data as part of the biological profile ¹⁴.

Some studies demonstrated COVID-19 biological fingerprint in saliva with adequate accuracy to discriminate healthy subjects and COVID-19 patients ^{15,16,17}. It was suggested that distinguishing features of salivary spectra are associated with RNA assignments ¹⁸. A limitation for clinical application of traditional ATR-FTIR technology is the water interference in infrared analysis and its reduced capability to analyze large number of samples due to the need to dry biological fluids in the internal reflection element (IRE). The samples were dried during 5 min ¹⁸, 10 min ¹⁵; or 15 min ¹⁶ in studies related to salivary diagnosis of COVID-19 using saliva, which allows only 96, 48 or 32 salivary analyzes per spectrophotometer during 8-hour work day. In this context, the development of sustainable and low-cost device to dry samples in a hot plate may allow high-throughput analysis. This sustainable and low-cost could be applicable to mass screening in airports, schools, gate controls, or public events. Here, we hypothesized that ATR-FTIR is capable to identify changes in salivary components to be used as screening tool for COVID-19. The present study aimed to compare infrared salivary components in non-COVID-19 and COVID-19 patients to be employed as an alternative salivary biomarker tool for COVID-19 screening.

2. Materials and methods

2.1- Ethical Aspects and Study design

All experimental procedures were carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and were approved by the Institutional Review Board of the UNA (protocol number 4.602.081). Written informed consent was obtained from the participants of the present study before samples collection. Patients were recruited from Brazilian decentralized health care centers created to expand testing capacity in asymptomatic subjects or subjects with early symptoms of flu-like syndrome or COVID-19. To perform this clinical trial, the nasopharyngeal fluid and saliva

samples of individuals with suspected COVID-19 were simultaneously collected from March to September 2021. The study included 200 subjects: 100 non-COVID-19 subjects and 100 COVID-19 patients with confirmed SARS-CoV-2 detection.

2.2- Saliva and Nasopharyngeal Swab Sample Collection and Preparation

Unstimulated saliva was collected during 3 minutes in sterile conical polypropylene tubes for ATR-FTIR analysis. Subjects were asked to refrain from eating, drinking (except water), or smoking for at least 1 hour previous to the saliva collection. The standard nasopharyngeal swab procedure was obtained by a gently insert of swab along the nasal septum, close to the floor of the nasal passage, to the nasopharynx, until resistance is felt ¹⁹. The nasopharyngeal sample was used for SARS-CoV-2 detection in RT-PCR analysis. Salivary samples were kept frozen at -20°C in the recruited centers and during transport to the Nanobiotechnology Laboratory at UFU. The sample in nasopharyngeal swab was inserted in 3mL of transport media (physiological saline 0.9%). The nasopharyngeal swab samples with adequate volume (≥ 2.0 mL) were maintained at 4°C for less than or equal to 2 days, or frozen at -20°C when the RT-PCR analysis were performed after 3 days. The data of RT-PCR were obtained by medical records. The nasopharyngeal swab procedures were performed paired with saliva collection.

2.3- Aluminium discs for high-throughput analysis

The high-throughput analysis has pivotal relevance in the laboratory settings to translation of infrared biospectroscopy platforms for clinical screening or diagnosis. The very low background infrared spectral interference of was used to develop an aluminium sustainable and low-cost device to high-throughput analysis ²⁰. Saliva (10 μ L) were dried in a hot plate at 80°C under aluminium devices for 5 minutes. This high-throughput devices permits 60 analysis per hour.

2.4- Salivary ATR-FTIR Spectroscopy

The salivary spectra were performed in 4000-650 cm^{-1} in ATR-FTR spectrophotometer Cary 630 (Agilent Technologies) and using the MicroLab software (Agilent Technologies) coupled to attenuated total reflectance (ATR) component. The crystal material in ATR unit was a diamond disc as an internal reflection element. The salivary pellicle penetration depth ranges between 0.1 and 2 μm and depends on the wavelength, incidence angle of the beam and the refractive index of ATR-crystal material. Salivary biofilm was recorded on aluminium devices. Before each sample analysis, the air spectrum was used as a background. Each spectrum was obtained in a room with a temperature around 22–23°C, 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans were performed.

2.5- Discrimination Analysis Method

The salivary infrared spectral data analysis was divided into two stages: pre-processing and classification. Pre-processing consisted of aggregation, attribute selection and data transformation. The spectral data were truncated with Amide A and lipidic region (3050-2800 cm^{-1}) associated with the biofingerprint region (1800-900 cm^{-1}). Then, the baseline correction, normalization and/or Savitzky-Golay smoothing filter was applied to each spectrum followed by a first and second order derivative and pre-processed by vector normalization.

The classification models were tested with state-of-the-art machine learning algorithms from first cohort using 70% for training and 30% for testing of feature extraction coupled to discriminant analysis tools. The machine learning algorithm was performed using several machine learning (ML) algorithms combined during model training to select the better results. To measure the results obtained, three performance measures consolidated in the literature were used: sensitivity, specificity, and accuracy. The sensitivity or true positive rate is the proportion of positives (COVID-19) that were correctly classified, and the specificity or true negative rate is the proportion of negatives (non-COVID-19) that were correctly classified. The accuracy is defined as the total number of samples correctly classified considering true and false negatives ^{21,22}.

3. Results

Demographic and metabolic laboratorial data of non-COVID-19 and COVID-19 patients are described in table 1. As expected, the gender proportion and age range were similar in both non-COVID-19 and COVID-19.

Table 1. Demographic characterization of non-COVID-19 and COVID-19

Parameters	Non-COVID-19	COVID-19
Gender (M/F)	45/55	51/49
Age (median)	34	38

The analysis of the protocol using saliva plus under aluminium devices inserted in a hot plate at 80°C as a rapid, low-cost and sustainable method to high-throughput analysis showed similar spectra with saliva inserted direct in internal reflection element (data not shown). This high-throughput devices permits at least 60 analysis per hour.

Table 2. Patient symptoms

Symptom	Cough	Dyspnea	Fever	Coryza	Myalgia	Headache	Sore throat	Diarrhea	Loss of smell	Loss of taste
Non-COVID-19	45	12	47	39	19	45	41	21	21	22
COVID-19	30	9	27	16	11	25	18	11	36	40

The mean infrared raw spectra of saliva in the 4000 – 650 cm⁻¹ was analyzed in saliva non-COVID-19 and COVID-19 patients indicating a detection of saliva components as proteins, lipids, DNA/RNA and carbohydrates (Figure 1).

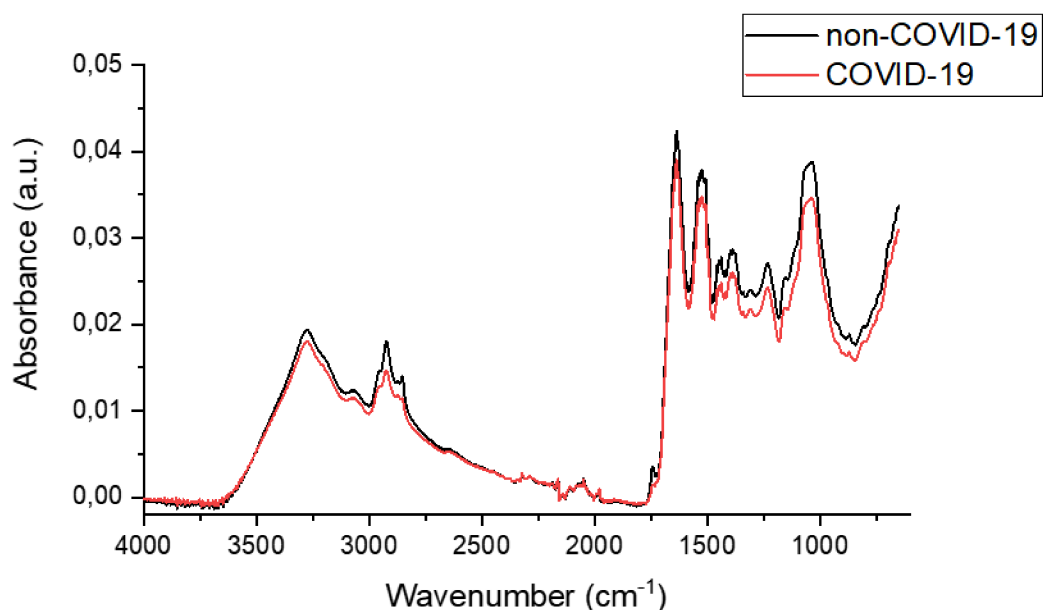


Figure 1. Representative average and standard deviation ATR-FTIR spectra (4000–650 cm^{-1}) in saliva of non-COVID-19 and COVID-19 patients.

The classification of machine learning algorithms showed the better discrimination of the salivary spectra of non-COVID-19 and COVID-19 by principal component analysis (PCA) - linear discriminant analysis (LDA). The PCA-LDA analysis was performed in the spectra performed after feature selection (FS) in the raw data (1800-900 cm^{-1} and 3050-2800 cm^{-1}) showed the higher discrimination. In this context, LDA analysis indicates 78% of sensitivity, 76% of specificity and 77% accuracy between non-COVID-19 and COVID-19 (Table 3). The others evaluated discrimination of machine learning algorithms tested were described in table 3.

Table 3. Discrimination of machine learning algorithms applied to classify of non-COVID-19 and COVID-19.

Method	Pre-processing (band)	Sensibility	Specificity	Mean	Accuracy
LDA	Raw data (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,64	0,59	0,62	0,62
	Rubberband+amida1 (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,59	0,56	0,58	0,57
	1st deriv, Savgolay (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,56	0,53	0,55	0,54
PCA-LDA	Raw data (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,55	0,57	0,56	0,56
	Rubberband+amida1 (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,55	0,55	0,55	0,55
	1st deriv, Savgolay (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,59	0,64	0,62	0,61
GA-LDA	Raw data (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,78	0,76	0,77	0,77
	Rubberband+amida1 (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,70	0,75	0,73	0,73
	1st deriv, Savgolay (1800-900cm ⁻¹ ; 3050-2800cm ⁻¹)	0,71	0,70	0,71	0,71

The vibrational modes at 954; 1026; 1041;1118; 1196; 1369; 1373; 1457; 1476; 1520; 1524; 1526; 1632; 2862; 2890; 2927 cm⁻¹ were used to applied in PCA-LDA analysis was performed in the spectra performed after feature selection (FS) in the raw data (1800-900cm⁻¹ and 3050-2800cm⁻¹) to discriminate both samples (Table 4).

Table 4. Selected Variable by PCA-LDA with their respective tentative assignments.

Variable (cm ⁻¹)	Tentative Assignment	Reference
954	Symmetric stretching vibration of $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (phosphate of HA)	23
1026	Carbohydrates peak for solutions	24
1041	Symmetric PO_2^- stretching in RNA and DNA	25
1118	Symmetric stretching P-O-C	26
1196	Phosphate (P=O) band	27
1369	Stretching C-N cytosine, guanine	26
1373	Stretching C-N cytosine, guanine	26
1457	Asymmetric CH_3 bending modes of the methyl groups of proteins	28
1476	Polyethylene methylene deformation modes	29
1520	Amide II (Proteins)	30
1524	Stretching C=N, C=C	26
1526	C=N guanine	26
1632	Ring C-C stretch of phenyl	23
2862	Stretching C-H (Lipids)	26
2890	Stretching C-H (Lipids)	23
2927	Stretching C-H (Lipids)	26

4. Discussion

The ATR-FTIR salivary platform coupled to a high-throughput device to detect COVID-19 using machine learning classification proposed here could provide a novel strategy for a sustainable, reagent free, and non-invasive tool to analyze salivary changes promoted by COVID-19. This photonic platform coupled to a sustainable and low-cost device to dry samples in a hot plate may allow high-throughput analysis which can be attractive to the diagnostic companies.

Although the ATR-FTIR spectrophotometer can be expensive, the cost can be diluted in photonic diagnostic platforms application because the infrared spectrum of each sample can be obtained without any reagent, which significantly

reduces the cost of processing each sample. However, if the analysis on this platform is performed with drying directly on the ATR-FTIR crystal, a small number of samples could be analyzed daily, which could reduce its clinical application to the population. The sustainable and low-cost device to high-throughput analysis develop here permits at least 60 analysis per hour (or 480 during 8-hour work day).

It was showed that the limit of detection of inactivated γ -irradiated SARS-CoV-2 was 1582 copies/mL. It consistently indicates the capability of infrared spectroscopy to detect unique SARS-CoV-2 fingerprint ¹⁸. Previously, we and others research groups showed that saliva has potential to be used in infrared biophotonic platform with adequate accuracy to discriminate healthy subjects and COVID-19 patients ^{4, 15, 16, 17}. The distinguishing features described here were related to carbohydrates, RNA, proteins and lipids. The changes in RNA of salivary spectra were previously related with RNA assignments ¹⁸.

It is important highlight that the present study compared asymptomatic or mild symptomatic subjects at an outpatient level divided into non-COVID-19 or COVID-19 according to RT-PCR in samples collected with nasopharyngeal swab. On the other hand, the higher sensibility (99.2%) and specificity (100%) described in another work ¹⁶, could be related with changes in samples collection. For the non-COVID-19 group the samples were obtained from February 2019 to February 2020 in healthy subjects without COVID-19-related symptoms and COVID-19 samples were recruited from hospitalized patients potentially receiving medication and in a different collection period from the control samples (May 2020 to March 2021) ¹⁶.

In summary, we develop an ATR-FTIR salivary platform coupled to a high-throughput device to detect COVID-19 using machine learning classification. This platform could provide a novel strategy for a sustainable, reagent free, and non-invasive tool to screening COVID-19 and non-COVID-19 salivary samples. This high-throughput device provides a more cost-effective analysis for frequent monitoring of COVID-19 using saliva. Further improvements of sensitivity and specificity in this screening platform could be achieved by inclusion of additional samples in the machine learning algorithms.

Disclosure

The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results. The results presented in this manuscript are part of one patent application: Goulart, L.R.; CUNHA, T.M.; MARTINS, M.M.; CARDOSO-SOUSA, L.; SANTOS, P.S.; CUNHA, T.C.A.; VAZ, E.R.; BASTOS, T.M.L.C.; NOSSOL, A.B.S.; SANTOS, A.R.; BASTOS, L.M.; SABINO-SILVA, R. “Plataforma de amostra reutilizável para uso em espectroscopia de infravermelho, sistema, kit, método e uso da mesma”, 2020. Registration number: BR1020200156004. Date of deposit: 30/07/2020.”

Conflicts of Interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgments

This research was funded by Imunoscan.

5. References

- 1 - Oliveira TL, Melo IS, Cardoso-Sousa L, Santos IA, El Zoghbi MB, Shimoura CG, Georjutti RP, Castro OW, Goulart LR, Jardim ACG, Cunha TM, Sabino-Silva R. Pathophysiology of SARS-CoV-2 in Lung of Diabetic Patients. *Front Physiol.* 2020 Dec 10;11:587013. doi: 10.3389/fphys.2020.587013. PMID: 33362575; PMCID: PMC7758507.
- 2 - Woloshin S, Patel N, Kesselheim AS. False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection - Challenges and Implications. *N Engl J Med.* 2020 Aug 6;383(6):e38. doi: 10.1056/NEJMp2015897. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32502334.
- 3 - Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann Intern Med.* 2020 Aug 18;173(4):262-267. doi: 10.7326/M20-1495. Epub 2020 May 13. PMID: 32422057; PMCID: PMC7240870.

- 4 - Caixeta DC, Oliveira SW, Cardoso-Sousa L, Cunha TM, Goulart LR, Martins MM, Marin LM, Jardim ACG, Siqueira WL, Sabino-Silva R. One-Year Update on Salivary Diagnostic of COVID-19. *Front Public Health*. 2021 May 21;9:589564. doi: 10.3389/fpubh.2021.589564. PMID: 34150692; PMCID: PMC8210583.
- 5 - Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res*. 2012;2(1):1-21. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22206042; PMCID: PMC3236568.
- 6 - Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 Apr 15;212(2):167-78. doi: 10.1016/j.taap.2006.01.003. Epub 2006 Feb 20. PMID: 16490224.
- 7 - Tuomi T, Santoro N, Caprio S, Cai M, Weng J, Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*. 2014 Mar 22;383(9922):1084-94. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62219-9. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24315621.
- 8 - Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):137-88. doi: 10.1152/physrev.00045.2011. PMID: 23303908.
- 9 - Azhar A, Gillani SW, Mohiuddin G, Majeed RA. A systematic review on clinical implication of continuous glucose monitoring in diabetes management. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020 Apr-Jun;12(2):102-111. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_7_20. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32742108; PMCID: PMC7373113.
- 10 – International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>
- 11 - American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes-2020*. *Diabetes Care*. 2020 Jan;43(Suppl 1):S14-S31. doi: 10.2337/dc20-S002. PMID: 31862745.
- 12 - Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, Lernmark A, Metzger BE, Nathan DM. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*. 2011 Jun;57(6):e1-e47. doi: 10.1373/clinchem.2010.161596. Epub 2011 May 26. PMID: 21617152.
- 13 - Goormaghtigh E, Raussens V, Ruysschaert JM. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim*

Biophys Acta. 1999 Jul 6;1422(2):105-85. doi: 10.1016/s0304-4157(99)00004-0. PMID: 10393271.

14 - Scott, D.A., Renaud, D.E., Krishnasamy, S. *et al.* Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. *Diabetol Metab Syndr* **2**, 48 (2010). <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-48>.

15 - Wood BR, Kochan K, Bedolla DE, Salazar-Quiroz N, Grimley SL, Perez-Guaita D, Baker MJ, Vongsvivut J, Tobin MJ, Bambery KR, Christensen D, Pasricha S, Eden AK, Mclean A, Roy S, Roberts JA, Druce J, Williamson DA, McAuley J, Catton M, Purcell DFJ, Godfrey DI, Heraud P. Infrared Based Saliva Screening Test for COVID-19. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2021 Jul 26;60(31):17102-17107. doi: 10.1002/anie.202104453. Epub 2021 Jun 29. PMID: 34043272; PMCID: PMC8222893.

16 - Martinez-Cuazitl A, Vazquez-Zapian GJ, Sanchez-Brito M, Limon-Pacheco JH, Guerrero-Ruiz M, Garibay-Gonzalez F, Delgado-Macuil RJ, de Jesus MGG, Corona-Perezgrovas MA, Pereyra-Talamantes A, Mata-Miranda MM. ATR-FTIR spectrum analysis of saliva samples from COVID-19 positive patients. *Sci Rep*. 2021 Oct 7;11(1):19980. doi: 10.1038/s41598-021-99529-w. PMID: 34620977; PMCID: PMC8497525.

17 - Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, Palmer DS, Smith BR, Baker MJ. Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nat Commun*. 2019 Oct 8;10(1):4501. doi: 10.1038/s41467-019-12527-5. PMID: 31594931; PMCID: PMC6783469.

18 - Barauna VG, Singh MN, Barbosa LL, Marcarini WD, Vassallo PF, Mill JG, Ribeiro-Rodrigues R, Campos LCG, Warnke PH, Martin FL. Ultrarapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Infection Using Simple ATR-FTIR Spectroscopy and an Analysis Algorithm: High Sensitivity and Specificity. *Anal Chem*. 2021 Feb 9;93(5):2950-2958. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04608. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33481583; PMCID: PMC7857139.

19 - Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. *N Engl J Med*. 2020 May 28;382(22):e76. doi: 10.1056/NEJMvcm2010260. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32302471.

20 - Paraskevaidi M, Morais CLM, Raglan O, Lima KMG, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PL, Kyrgiou M, Martin FL. Aluminium foil as an alternative substrate for

the spectroscopic interrogation of endometrial cancer. *J Biophotonics*. 2018 Jul;11(7):e201700372. doi: 10.1002/jbio.201700372. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29512302.

21 - Passos JOS, Dos Santos Alves MV, Morais CLM, Martin FL, Cavalcante AF, Lemos TMAM, Moura S, Freitas DLD, Mariz JVM, Carvalho JL, Lima KMG, Pegado R. Spectrochemical analysis in blood plasma combined with subsequent chemometrics for fibromyalgia detection. *Sci Rep*. 2020 Jul 16;10(1):11769. doi: 10.1038/s41598-020-68781-x. PMID: 32678231; PMCID: PMC7366631.

22 - Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS, Raniero L, Crosara KTB, Baker MJ, Siqueira WL, Sabino-Silva R. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One*. 2020 Mar 17;15(3):e0223461. doi: 10.1371/journal.pone.0223461. PMID: 32182246; PMCID: PMC7077825.

23 - Schulz, H. and Baranska, M. (2007) Identification and qualification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43: 13–25.

24 - Dukor, R.K. (2002) Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. *Biomedical Applications*, 5: 3335–3359.

25 - Fabian, H., Jackson, M., Murphy, L., Watson, P.H., Fichtner, I., and Mantsch, H.H. (1995) A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumors and breast tumor cell xenografts. *Biospectroscopy*, 1 (1): 37–45.

26 - Dovbeshko, G.I., Gridina, N.Y., Kruglova, E.B., and Pashchuk, O.P. (1997) FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta*, 53: 233–246.

27 - Yoshida, S., Miyazaki, M., Sakai, K., Takeshita, M., Yuasa, S., Sato, A., Kobayashi, T., Watanabe, S., and Okuyama, H. (1997) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of rat brain microsomal membranes modified by dietary fatty acids: possible correlation with altered learning behavior. *Biospectroscopy*, 3 (4): 281–290.

- 28 - Fujioka, N., Morimoto, Y., Arai, T., and Kikuchi, M. (2004) Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer Detection & Prevention*, 28: 32–36.
- 29 - Chiriboga, L., Xie, P., Yee, H., Vigorita, V., Zarou, D., Zakim, D., and Diem, M. (1998) Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix. *Biospectroscopy*, 4: 47–53.
- 30 - Paluszkiwicz, C. and Kwiatek, W.M. (2001) Analysis of human cancer prostate tissues using FTIR microscopy and SXIXE techniques. *Journal of Molecular Structure*, : 565–566, 329–334.

Referências

- AL-SAEED, T. A.; KHALIL, D. A. Dispersion compensation in moving optical-wedge Fourier transform spectrometer. **Applied Optics**, Washington, v. 48, n. 20, p. 3979, 10 jul. 2009. <https://doi.org/10.1364/AO.48.003979>.
- BAKER, M. J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc**, v. 9, n. 8, p. 1771-91, Aug 2014. ISSN 1750-2799. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>.
- BALDINI, C. et al. Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjogren's syndrome from secondary Sjogren's syndrome and other sicca syndromes. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 6, p. R194, 2011. ISSN 1478-6354. <https://doi.org/10.1186/ar3523>.
- BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. **Trends Biotechnol**, v. 32, n. 7, p. 363-71, Jul 2014. ISSN 0167-7799. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.04.005>.
- BELLISOLA, G.; SORIO, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. **Am J Cancer Res**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2012. ISSN 2156- 6976.

BENVENUTO, D.; GIOVANETTI, M.; CICCOCCHI, A.; SPOTO, S.; ANGELETTI, S.; CICCOCCHI, M. The 2019 new Coronavirus Epidemic: Evidence for Virus Evolution. **Journal of Medical Virology**, v.92, n.2, p.1-12, 2020.

<https://doi.org/10.1101/2020.01.24.915157>.

BUNACIU, A. A.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Vibrational MicroSpectroscopy of Human Tissues Analysis: Review. **Crit Rev Anal Chem**, v. 47, n. 3, p. 194-203, May 4 2017. ISSN 1040-8347.

<https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1253454>.

BUPPAN, P. et al. Comparative detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. **Malar J**, v. 9, p. 72, Mar 9 2010. ISSN 1475-2875. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-72>.

CAETANO JÚNIOR, P. C.; STRIXINO, J. F.; RANIERO, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, p. 116-124, 2015. ISSN 2446-4740. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0664>.

CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 4, p. 267-76, 2013. ISSN 1941-1413 (Print) 1941-1421. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>.

CATALAN, M. A.; NAKAMOTO, T.; MELVIN, J. E. The salivary gland fluid secretion mechanism. **J Med Invest**, v. 56 Suppl, p. 192-6, 2009. ISSN 1343-1420. <https://doi.org/10.2152/jmi.56.192>.

Centers of Disease Control Prevention (CDC). **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)**. Symptoms of Coronavirus. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Acesso em: 08 de junho de 2021.

CHOJNOWSKA, S. et al. Human saliva as a diagnostic material. **Adv Med Sci**, v. 63, n. 1, p. 185-191, Nov 14 2017. ISSN 1896-1126. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.11.002>.

CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Euro**

Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

DE PAULA, F. et al. Overview of Human Salivary Glands: Highlights of Morphology and Developing Processes. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 300, n. 7, p. 1180-1188, Jul 2017. ISSN 1932-8486. <https://doi.org/10.1002/ar.23569>.

DODDS, M. W.; JOHNSON, D. A.; YEH, C. K. Health benefits of saliva: a review. **J Dent**, v. 33, n. 3, p. 223-33, Mar 2005. ISSN 0300-5712 (Print) 0300-5712. <https://doi.org/10.1016/j.ident.2004.10.009>.

DONG, L. et al. Evaluation of FTIR spectroscopy as diagnostic tool for colorectal cancer using spectral analysis. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.** 122, 288–294. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.11.031>.

DORLING, K. M.; BAKER, M. J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 6, p. 327-8, Jun 2013. ISSN 0167-7799. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.010>.

DY, F. et al. Salivary Pepsin Lacks Sensitivity as a Diagnostic Tool to Evaluate Extraesophageal Reflux Disease. **J Pediatr**, v. 177, p. 53-58, Oct 2016. ISSN 0022-3476. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.06.033>.

GAJJAR, K. et al. Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer. **Analyst**. 138, 3917–3926. 2013. <https://doi.org/10.1039/c3an36654e>.

GUPTA, M. K. et al. In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2020. doi:10.1080/07391102.2020.1751300

HANDS, J. R. et al. Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. **J. Neurooncol.** 127, 463–472. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2060-x>.

HOLMBERG, K. V.; HOFFMAN, M. P. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. **Monogr Oral Sci**, v. 24, p. 1-13, 2014. ISSN 0077-0892 (Print) 0077-0892. <https://doi.org/10.1159/000358776>.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**, v. 85, n. 2, p. 162-9, Feb 2001. ISSN 0022-3913 (Print) 0022-3913. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>.

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. COVID-19 Map. **Johns Hopkins Coronavirus Resource Center**. 2022. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2022.

JOURNAL OF GLOBAL RESOURCES, **coronavirus**: the beginning of a new end?, 2020. Disponível em: <<https://www.isdesr.org/coronavirus-the-beginning-of-a-new-end/>>. Acesso em: 08 de junho de 2021.

KAHN, J.S.; MCINTOSH, K. História e avanços recentes na descoberta do coronavírus. **Pediatr. Infectar. Dis. J.** 2005; 24 (11 Suplemento) p. S223–7, discussão S226. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000188166.17324.60>.

KHAUSTOVA, S. et al. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3183-92, Dec 2010. ISSN 0003-2654. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>.

KRÜTTGEN, A.; CORNELISSEN, C.G.; DREHER, M.; HORNEF, M.W.; IMÖHL, M.; KLEINES, M. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. **J Virol Methods**. 2021 Feb;288:114024. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114024.

LEE, Y. H. et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. **J Mol Med (Berl)**, v. 90, n. 4, p. 427-34, Apr 2012. ISSN 0946-2716. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0829-0>.

LEWIS, P. D. et al. Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. **BMC cancer**, London, v. 10, p. 640, 23 nov. 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-640>.

LOO, J. A. et al. Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 89, n. 10, p. 1016–1023, out. 2010.

<https://doi.org/10.1177/0022034510380414>.

MAK, G.C.; CHENG, P.K.; LAU, S.S.; WONG, K.K.; LAU, C.S.; LAM, E.T.; CHAN, R.C.; TSANG, D.N. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. **J Clin Virol**. 2020 Aug;129:104500. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500.

MELVIN, J. E. et al. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annu Rev Physiol**, v. 67, p. 445-69, 2005. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745>.

MESE, H.; MATSUO, R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. **J Oral Rehabil**, v. 34, n. 10, p. 711-23, Oct 2007. ISSN 0305-182X (Print) 0305-182x. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2007.01794.x>.

Ministério da Saúde. Boletim COE COVID-19. **Centro de Operações de Emergência em Saúde Pública/Doença pelo coronavírus 2019**, Boletim Epidemiológico 12 –COE COVID-19 –19 de abril de 2020.

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Ann N Y Acad Sci**, v. 694, p. 72-7, Sep 20 1993. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x>.

NAVAZESH, M.; KUMAR, S. K. S.; Measuring salivary flow: challenges and opportunities. **Journal of the American Dental Association (1939)**, Chicago, v. 139 Suppl, p. 35S-40S, maio 2008. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0353>.

OBAYASHI, K. Salivary mental stress proteins. **Clin Chim Acta**, v. 425, p. 196-201, Oct 21 2013. ISSN 0009-8981. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.028>.

OJEDA, J. J.; DITTRICH, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. **Methods Mol Biol**, v. 881, p. 187-211, 2012. ISSN 1064-3745. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8.

PARASKEVAIDI, M. et al. Differential diagnosis of Alzheimer's disease using spectrochemical analysis of blood. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 114, E7929–E7938, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701517114>.

PEDERSEN, A. M. et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Dis**, v. 8, n. 3, p. 117-29, May 2002. ISSN 1354-523X (Print) 1354-523x. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x>.

PFAFFE, T. et al. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. **Clin Chem**, v. 57, n. 5, p. 675-87, May 2011. ISSN 0009-9147. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>.

RATHNAYAKE, N. et al. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61356, 2013. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061356>.

REZNICK, A. Z. et al. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 8, p. 640-8, Aug 2006. ISSN 0003-9969 (Print). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.02.004>.

ROY, S. et al. Simultaneous ATR-FTIR based determination of malaria parasitemia, glucose and urea in whole blood dried onto a glass slide. **Anal. Chem.** 89, 5238–5245. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04578>.

SABINO-SILVA, R. et al. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 5, n. 1, p. 64, Oct 24 2013. ISSN 1758-5996 (Print) 1758-5996. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-64>.

SARMA, P. et al. In-silico homology assisted identification of inhibitor of RNA binding against 2019-nCoV N-protein (N terminal domain). **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2020. doi:10.1080/07391102.2020.1753580.

SAXENA, S. et al. A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis. **Adv Biomed Res**, v. 6, p. 90, 2017. ISSN 2277-9175 (Print) 2277-9175. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.211801>.

SEVERCAN, F. et al. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. **J Biophotonics**, v. 3, n. 8-9, p. 621-31, Aug 2010. ISSN 1864-063x. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>.

SCAGLIA, E. et al. Noninvasive assessment of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C using serum Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 401, n. 9, p. 2919–2925, nov. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5402-8>.

STAIB, A. et al. Disease pattern recognition testing for rheumatoid arthritis using infrared spectra of human serum. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 308, n. 1–2, p. 79–89, jun. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00475-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00475-2).

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd., 2005. <https://doi.org/10.1002/0470011149>.

SUN, X. et al. Detection of lung cancer tissue by attenuated total reflection–Fourier transform infrared spectroscopy—a pilot study of 60 samples. **Journal of Surgical Research**, New York, v. 179, n. 1, p. 33–38, jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.08.057>.

TATULIAN, S. A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids. **Biochemistry**, v. 42, n. 41, p. 11898-907, Oct 21 2003. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960. <https://doi.org/10.1021/bi034235+>.

TEODÓSIO, Sheila Saint-Slair da Silva; LEANDRO, Suderlan Sabino. **Enfermagem na atenção básica no contexto da COVID-19**. Brasília, DF: ABen/DEAB, 2020. 87p.

VATTA, M. S. et al. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. **Auton Autacoid Pharmacol**, v. 22, n. 2, p. 65-71, Apr 2002. ISSN 1474-8665 (Print) 1474-8665. <https://doi.org/10.1046/j.1474-8673.2002.00243.x>.

VIEIRA, Luisane Maria Falci. COVID-19- Laboratory Diagnosis for Clinicians. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v,3, n.3, p. 1-19, 2020.

WANG, X. et al. FTIR spectroscopic comparison of serum from lung cancer patients and healthy persons. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kidlington, v. 122, p. 193–197, mar. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.11.049>.

WESTERBECK, J. W., & MACHAMER, C. E. The infectious bronchitis coronavirus envelope protein alters Golgi pH to protect the spike protein and promote the release of infectious virus. **Journal of Virology**, 93(11), e00015-19. doi:10.1128/JVI.00015-19.

Western Governors University. **StudyBlue Inc.** at
<http://www.studyblue.com/notes/note/n/module-3-waves-and-the-eletromagnetic-spectrum/deck/8054719>.

WHO. **World Health Organization**. 2020. In: WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on Covid-19.

WU, Z.; MCGOOGAN, J.; SHANG, L.; ZHOUN, W. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **Jama**, v. 323, n. 13, p. 1239-1242, 2020.
<https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>.

XIAO, H. et al. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 2, p. M111.012112, Feb 2012. ISSN 1535-9476.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012112>.

YOSHIZAWA, J. M. et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 781-91, Oct 2013. ISSN 0893-8512. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>.

ZHANG, L. et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15573, Dec 31 2010. ISSN 1932-6203.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015573>.

Anexos

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Plataformas tecnológicas para o diagnóstico e controle do COVID-19.

Pesquisador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 30848620.1.0000.5704

Instituição Proponente: IMUNOSCAN ENGENHARIA MOLECULAR LTDA

Patrocinador Principal: IMUNOSCAN ENGENHARIA MOLECULAR LTDA
FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP
Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.602.081

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Plataformas tecnológicas para o diagnóstico e controle do COVID-19.

Objetivo da Pesquisa:

atualização do status do centro

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

dentro da expectativa do estudo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP UNA dá ciência das atualizações

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

toda documentação está correta

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Alameda Paulina Margonari, 59

Bairro: JARDIM KARAIBA

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3233-1505

CEP: 28.411-206

E-mail: cep@una.br

FACULDADE UNA DE UBERLÂNDIA



Continuação do Parecer: 4.602.081

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1705527_E5.pdf	20/02/2021 12:45:12		Aceito
Cronograma	AtualCronog.pdf	20/02/2021 12:29:40	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Outros	CEPendenciaFev21.pdf	20/02/2021 12:17:31	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Outros	AdFINEP.pdf	20/02/2021 12:16:52	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Outros	TOFapemig.pdf	20/02/2021 12:09:24	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Assinaturas_11_IFES_Pesquisadores.pdf	16/11/2020 09:46:34	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Assinaturas_11_IFES_Diretores.pdf	16/11/2020 09:46:12	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_11_IFES.pdf	16/11/2020 09:45:19	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Outros	Declaracoes_Prevent_UFPR_USP_UFS DR_UFU.pdf	05/06/2020 17:27:22	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termos_concordancia_UFTM_DANTE_BALSAS.pdf	05/06/2020 17:25:05	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_COVID_19_UFU_gases.docx	05/06/2020 17:22:50	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Outros	COVID19_Metodos_Adicionais_GCMS.pdf	05/06/2020 17:20:33	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_COVID_19_UFU_gases.pdf	05/06/2020 17:19:37	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Lucas_Moreira.pdf	26/05/2020 17:49:49	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Declaração de concordância	Concordancia_IAL_2020_Cadastro_provisorio.pdf	02/05/2020 16:14:17	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_CEP_UNA_20_04_2020.pdf	20/04/2020 12:32:19	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_COVID_19.docx	20/04/2020 09:48:42	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito

Endereço: Alameda Paulina Margonari, 59

Bairro: JARDIM KARAIBA

CEP: 28.411-206

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3233-1505

E-mail: cep@una.br

FACULDADE UNA DE
UBERLÂNDIA



Continuação do Parecer: 4.602.081

Declaração de Pesquisadores	Declaracoes_CEP_2020.pdf	19/04/2020 15:07:53	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO_COVID19.pdf	16/04/2020 21:03:35	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_Imunoscan_2020.pdf	16/04/2020 20:32:12	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_PPP_sensores_nCov_2020.pdf	15/04/2020 23:11:30	Luiz Ricardo Goulart Filho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 19 de Março de 2021

Assinado por:
Denis Fabiano de Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Alameda Paulina Margonari, 59

Bairro: JARDIM KARAIBA

UF: MG

Município: UBERLANDIA

Telefone: (34)3233-1505

CEP: 28.411-206

E-mail: cep@una.br