



# RELATÓRIO FINAL

---

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO  
CAPAZ DE DETECTAR ANTÍGENOS  
OU ANTICORPOS EM AMOSTRAS  
BIOLÓGICAS DIVERSAS A PARTIR  
DE VOLTAMETRIA CÍCLICA COM  
FINALIDADE DIAGNÓSTICA

MAIO/2023  
NATAL-RN



# RELATÓRIO FINAL

---

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO  
CAPAZ DE DETECTAR ANTÍGENOS  
OU ANTICORPOS EM AMOSTRAS  
BIOLÓGICAS DIVERSAS A PARTIR  
DE VOLTAMETRIA CÍCLICA COM  
FINALIDADE DIAGNÓSTICA



## **COORDENADOR DO PROJETO**

Ricardo Alexsandro de Medeiros Valentim

## **EQUIPE RESPONSÁVEL**

Agnaldo Souza Cruz  
Beatriz Soares de Souza  
Diego Ferreira de Lima  
Dionísio Dias Aires de Carvalho  
Jorge Enrique de Azevedo Tinoco  
Karilany Dantas Coutinho  
Leonardo Judson Galvão de Lima  
Luiz Guilherme Portela Oliveira de Cerqueira  
Matheus André Coutinho Ferreira  
Maurício Capra  
Milena Cristina Duarte de Almeida  
Pablo Holanda Cardoso  
Suelayne Cris Medeiros de Sousa

Catálogo da publicação na fonte  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Secretaria de Educação a Distância

Sífilis Não : Relatório final - Desenvolvimento de dispositivo capaz de detectar antígenos ou anticorpos em amostras biológicas diversas a partir de voltametria cíclica com finalidade diagnóstica [recurso eletrônico] / coordenado por Ricardo Alexandro de Medeiros Valentim. – 1. ed. – Natal: SEDIS-UFRN, 2023.  
21000 KB; 1 PDF.

ISBN 978-65-5569-361-4

1. Sífilis Não. 2. Projeto Sífilis Não - Relatório. 3. Antígenos. 4. Voltametria Cíclica. I. Valentim, Ricardo Alexandro de Medeiros.

CDU 616.07  
S573

Elaborada por Edineide da Silva Marques CRB-15/488.

# SUMÁRIO

<b>1. Resultado das missões relacionadas ao processo de cooperação técnica com a ConquerX (University of Massachusetts, Boston/EUA)</b>	<b>6</b>
<b>2. Resultado das missões relacionadas ao processo de cooperação técnica com o Retrovirus lab (Johns Hopkins University - School of Medicine, Baltimore/EUA)</b>	<b>19</b>
<b>3. Resultado das missões relacionadas ao processo de cooperação técnica com o Centro de Informática e Sistemas da Universidade de Coimbra (CI-SUC, Universidade de Coimbra, Coimbra/PT)</b>	<b>22</b>
<b>4. Considerações Finais</b>	<b>24</b>
<b>Anexos</b>	<b>25</b>

## RESULTADO DAS MISSÕES RELACIONADAS AO PROCESSO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA COM A CONQUERX (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS, BOSTON/EUA)

As cooperações internacionais constituem atualmente um importante instrumento de desenvolvimento para o Brasil, pois auxiliam na promoção de mudanças estruturais nos campos econômico e social brasileiro, possibilitando a transferência de tecnologia e conhecimento, experiências e boas-práticas por meio do desenvolvimento de capacidades humanas e institucionais de outros países, além de promoverem um salto qualitativo com perspectivas duradouras.

Pensando em cooperação internacional, foi firmada a parceria entre o Lais e a ConquerX a partir do termo de parceria UFRN-Abimo-Funpec no Projeto “Sífilis Não”. A ConquerX tem expertise na área de biologia molecular, com amplo domínio no tema. Sediada em Boston (MA), estabelecida em 2016, tem como especialidade o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico simples, robustas e de fácil utilização. Especificamente, a ConquerX possui um sistema multianalítico que tem capacidade de detecção e reconhecimento de diferentes tipos de biomarcadores tais como DNA, microRNA e proteínas. Essa tecnologia, chamada de Metachip, é a primeira capaz de detectar os três tipos de biomarcadores simultaneamente em amostras biológicas (sangue, urina, saliva e tecidos).

O desenvolvimento de atividades conjuntas com a *start-up* ConquerX foi iniciado com o levantamento bibliográfico em periódicos internacionais, dissertações e teses publicadas relacionadas ao desenvolvimento de testes para triagem ou diagnóstico de sífilis

e outras infecções sexualmente transmissíveis (IST), cujo funcionamento fosse baseado em métodos eletroquímicos, amperométricos ou de voltametria cíclica. A partir das consultas realizadas, constatamos que o desenvolvimento de um novo dispositivo utilizando princípios de voltametria cíclica seria a melhor alternativa para detectar novos casos de sífilis e IST, mesmo em ambientes ambulatoriais ou em casos de difícil diagnóstico – como a sífilis congênita. Adicionalmente, a opção por esse método também possibilitou a utilização de reagentes auxiliares (como nanocompostos de prata) para amplificação da variação da corrente elétrica detectada nos eletrodos de trabalho após a incubação com amostras infectadas em relação àquelas observadas durante a análise de amostras controle (não infectadas). Ao longo dessa fase inicial, o envio de amostras coletadas no Brasil de pacientes infectados e controles foi fundamental para a padronização inicial dos testes e a validação dos eletrodos de trabalho.

Considerando a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para controle da célula eletroquímica utilizada no teste, ao longo dessa cooperação, foi desenvolvido um novo software para operacionalização do dispositivo e a apresentação dos resultados para o usuário. Inicialmente, a operação do potenciostato dependia de um amplificador operacional para controle do nível de tensão na solução e outro para leitura da corrente da solução. No entanto, como os requisitos do projeto indicavam a utilização de uma escala de tensão variando entre 0,5V a 1,2V e a leitura da variação de correntes elétricas na ordem de nanoamperes, a opção pelos amplificadores operacionais TLC2264 e o LMC6001 teve um papel fundamental no desenvolvimento da primeira versão funcional do dispositivo.

O TLC2264 é um amplificador operacional quádruplo Rail-To-Rail LinCMOS. Ele foi projetado para aplicações de baixo consumo, baixo ruído e alta impedância de entrada. O LMC6001 é um amplificador operacional do tipo Ultra Ultra-Low Input Current Amplifier. Ele foi projetado e testado para baixas correntes de entrada (a partir de 25fA - femto ampéres) e baixo ruído (22 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ ). Ao longo da etapa de montagem inicial do circuito em ambiente de simulação *in silico*, utilizamos o Proteus (versão 8.5.3) para modelagem geral do sistema e realização de simulações no software, buscando a melhor configuração eletrônica e operacional do dispositivo.

Ao longo de sucessivas análises, o projeto passou por etapas de melhorias contínuas até alcançar a capacidade de leitura, o controle das células eletroquímicas, a comunicação a partir de protocolo de comunicação I2C e a capacidade de execução dos incrementos de tensão dentro dos limites de tempo definidos pelo projeto. Essa etapa foi seguida da aquisição dos diversos componentes elétricos e eletrônicos para a montagem do circuito em uma matriz de contatos (*proto-board*) e otimização do processo de inserção dos componentes na placa.

Em seguida, realizamos a fase de testes com eletrodos utilizando técnicas de modelagem 2D e 3D em software CAD (*SolidWorks*), buscando tornar suas respectivas fiações equidistantes para reduzir o ruído elétrico gerado e as suas interferências na leitura. Nessa etapa, a elaboração de eletrodos *in house* utilizando máquinas de corte foi fundamental para realização dos testes preliminares com aplicações *screen-printing* de tintas condutivas de prata e carbono, visando a ampliar a condutividade elétrica e reduzir as irregularidades da superfície dos eletrodos. A evolução no processo de desenvolvimento dos eletrodos

pode ser observada nas Figuras 1 e 2. Após a realização de ajustes nos níveis de tensão, obtivemos as primeiras leituras utilizando o dispositivo projetado, mas ainda precisavam de uma melhor forma de exibição gráfica a fim de facilitar a interpretação dos resultados.

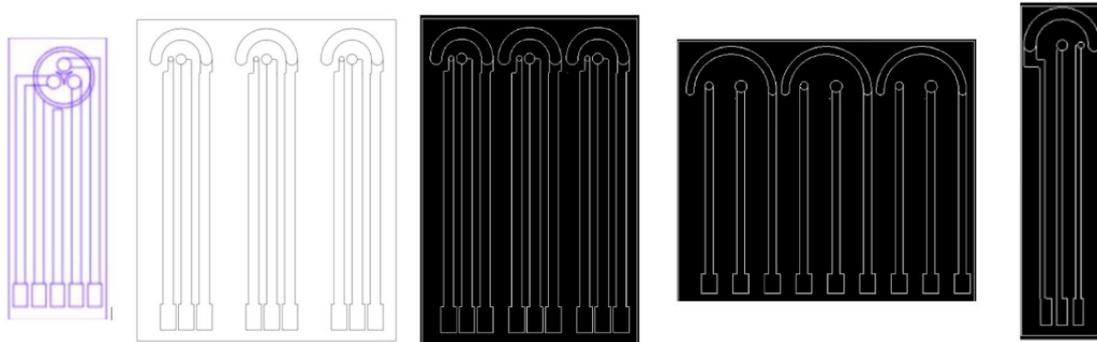


Figura 1 - Eletrodos projetados, da esquerda para direita, versões 1, 2, 3, 4 e 5.

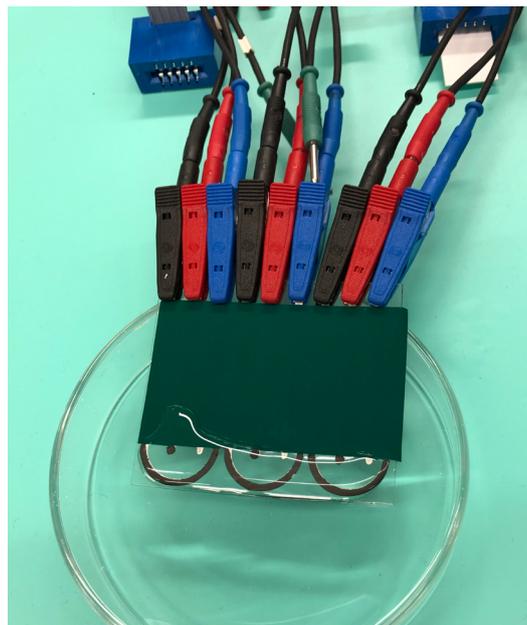


Figura 2 - Protótipo com quatro eletrodos para simulações.

Durante as etapas de desenvolvimento de interface do usuário, utilizamos o programa de janela Electron, uma vez que combina a facilidade de estruturação com a linguagem de marcação mais conhecida, o HTML; a facilidade de estilização com o CSS; e a facilidade de programação do JavaScript. As aplicações produzidas rodam sob o mesmo motor que o Google Chrome utiliza, o Chromium, e garante suporte para diferentes plataformas, no que diz respeito tanto à arquitetura do processador quanto ao sistema operacional nos quais a aplicação é executada. A interface de usuário foi baseada em componentes, uma vez que são normalmente autocontidos e reutilizáveis. Como exemplos, podemos citar

o *Vue*, o *React* e o *Angular*, que são as implementações mais difundidas atualmente e possuem uma comunidade de usuários que cresce diariamente.

A opção por essa estratégia de desenvolvimento foi adotada visando a unir o desenvolvimento baseado em componentes com a construção de sistemas de janela com o *Electron*. Por possuir um ecossistema de bibliotecas sob a mesma chancela e visão que seu módulo principal, o *Vue* foi escolhido como ferramenta para definição e estruturação dos componentes. Para auxiliar na construção dos artefatos, sejam eles documentos textuais, como especificações de casos de uso ou definição da arquitetura, seja o próprio código-fonte do sistema, decidiu-se utilizar ferramentas colaborativas para ambos os tipos de entregáveis. Na linha de programação de computadores, optou-se pelo GitHub, por ser uma ferramenta gratuita, estabelecida no segmento de versionamento de código de *software*, e por integrar funcionalidades de gerenciamento de tarefas, reduzindo a fragmentação da troca de informações. Ao final dessas etapas, o novo software desenvolvido foi instalado no dispositivo e testado com amostras-padrão, apresentando resultados semelhantes aos observados utilizando um potenciostato comum validado comercialmente.

Após a finalização dessas etapas, iniciamos o processo de desenvolvimento do circuito para impressão em placa cobreada de face simples. A impressão inicial do circuito foi realizada em impressora preto e branco e a transferência foi feita com máscara para ultravioleta. Nesse tipo de transferência, a placa é exposta à luz UV e, logo em seguida, é corroída por perclorato férrico para remoção do cobre nas áreas não marcadas. Durante essa etapa, percebemos que a disposição dos fios para comunicação da placa com os eletrodos geraria ruídos adicionais, necessitando, portanto, de um novo projeto de circuito em placa cobreada com face dupla para uso de um conector. O desenho final do circuito com as duas faces da placa pode ser visto nas Figuras 3 e 4, enquanto a visão modelada para análise de dimensões e especificidades da versão final da placa confeccionada pode ser observada na Figura 5.

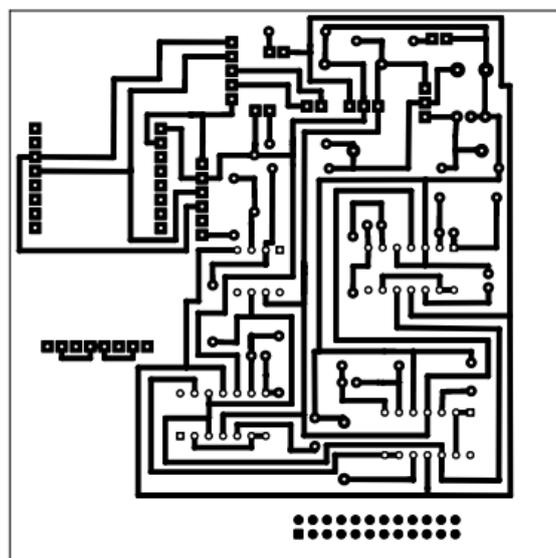


Figura 3 - Desenho das trilhas da face inferior da placa de circuito.

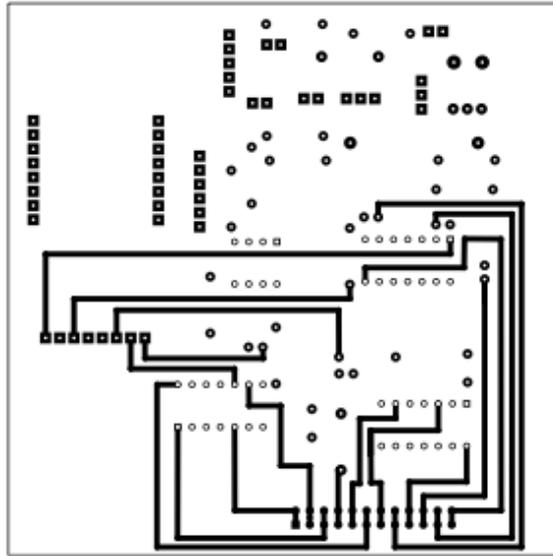


Figura 4 - Desenho das trilhas da face superior da placa de circuito

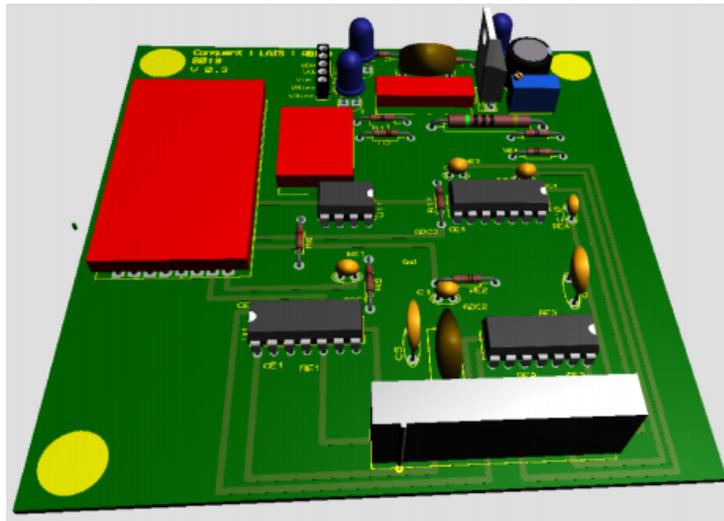


Figura 5 - Visão modelada da versão final da placa confeccionada.

Como ferramenta para o controle integrado do circuito, adotamos a linguagem de programação *Python* devido à sua natureza interativa de alto nível e seu ecossistema maduro de bibliotecas científicas que permitem a análise exploratória de dados. Essas bibliotecas são mantidas principalmente pela comunidade *SciPy*, que é um grupo composto por cientistas, engenheiros e pesquisadores que usa, amplia e promove o uso do *Python* para pesquisa científica.

Uma vez que o circuito eletrônico projetado é realizado com componentes que utilizam o protocolo de comunicação *Inter-Integrated Circuit*, o uso de computadores convencionais tornou-se inviável e passamos a adotar o *Raspberry Pi 3* como plataforma computacional para embarque do sistema de controle do dispositivo. A preferência do *Raspberry* se deu por ser um equipamento *open-hardware* com ampla documentação presente na *web* e por possuir suporte ao protocolo I2C e bibliotecas nativas e compatíveis com o *Python*. Somado a isso, o tamanho reduzido da plataforma computacional favoreceu a miniatu-

rização do equipamento final. Para melhor registro e acompanhamento das mudanças registradas no código-fonte, adotamos o *GitHub* como sistema de controle de versões a fim de permitir que os desenvolvedores pudessem registrar e acompanhar as mudanças realizadas no código fonte, facilitando a colaboração e a incorporação de mudanças de diferentes fontes em uma mesma base de código.

Entre as principais necessidades de melhorias nessa primeira versão do protótipo, observamos que era fundamental que o dispositivo pudesse ser capaz de controlar e realizar a leitura de quatro células eletroquímicas, aumentando o número de alvos biológicos detectados e reduzindo a possibilidade de resultados falsos negativos ou falsos positivos. Adicionalmente, seria desejável que o dispositivo pudesse armazenar os resultados obtidos localmente ou os enviar para um sistema de prontuário eletrônico do paciente (PEP) a fim de otimizar o processo de testagem e a interpretação dos resultados mesmo em áreas remotas.

Diante dessas considerações, as missões subsequentes resultaram no desenvolvimento de um modelo mínimo de dados para o PEP, de forma descentralizada e permitindo não só que os pacientes pudessem ser os reais proprietários dos seus dados como ainda o compartilhamento dessas informações com outros sistemas de prontuários. Para a construção dessa ferramenta, o primeiro passo dado foi a implantação de uma rede de computadores participante da rede *blockchain*. Para isso, configurou-se uma rede *ethereum* privada em três máquinas: duas Linux (Ubuntu 18) e uma terceira com Windows 10. A estratégia de consenso mais adequada para os objetivos propostos foi a *Proof of Authority*, com uma autoridade assinante pré-configurada (representando o governo), e no modo de operação de sincronização total.

Em cada máquina, instalou-se o *Go-Ethereum (geth)*, que é a implementação oficial do protocolo *ethereum*. Para testar e depurar o funcionamento da rede, o sistema conectou-se aos clientes (configurados no *geth*) e foram inspecionadas as conexões entre eles com ferramentas de rede de computadores. Em seguida, foi escrito o primeiro contrato inteligente de prontuário eletrônico. A função desse contrato inteligente é atuar como regulador do armazenamento e do acesso descentralizados dos dados. Nele, existe a possibilidade de o governo controlar quem são os médicos registrados, os quais devem possuir a autoridade para inserir novos registros médicos.

Adicionalmente, existe a possibilidade de o paciente conceder ou revogar permissão para que outras pessoas (como profissionais da saúde) possam consultar seus registros médicos e inserir novos registros. A linguagem de programação utilizada foi a *Solidity*, orientada a objetos de alto nível para implementação de contratos inteligentes. O design da *Solidity* foi influenciado por outras linguagens como *C++*, *Python* e *JavaScript*, e foi pensado para rodar, principalmente, na máquina virtual do Ethereum (*Ethereum Virtual Machine, EVM*). Nessa primeira versão, utilizou-se apenas a linguagem pura, sem fazer uso de *frameworks*. Os testes unitários foram escritos nas linguagens *JavaScript* e *Python*.

Para que os usuários possam interagir na rede *Ethereum* de forma simples, foi desenvolvida uma interface no sistema *web Python*, utilizando o *framework Django*, conforme apresentado na Figura 6. Nesse sistema, o usuário pode interagir com o médico, dando-lhe permissão de acesso aos seus dados. Todas as mudanças de status de permissão foram enviadas para a rede, através dos contratos inteligentes.

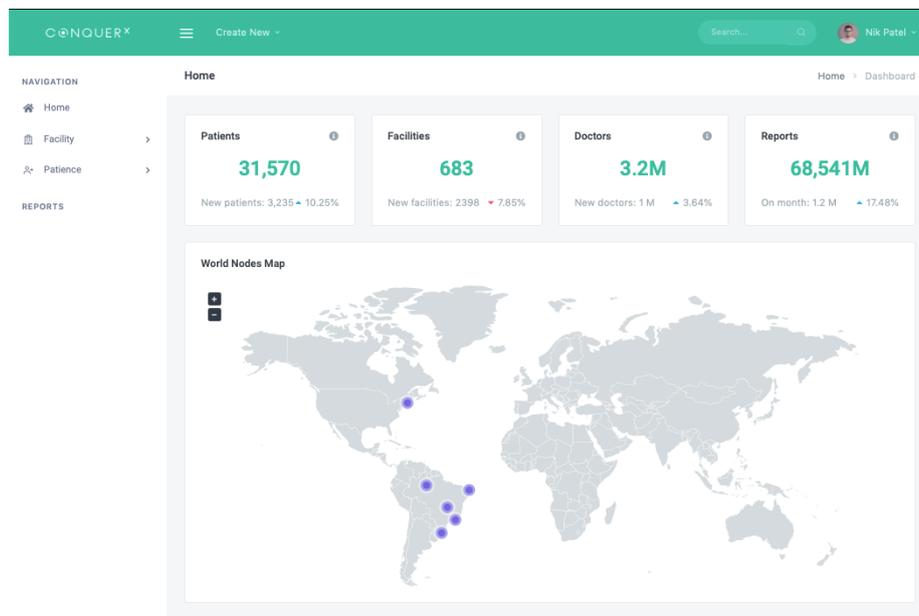


Figura 6 - Sistema web desenvolvido com rede blockchain.

Em paralelo ao desenvolvimento do PEP, realizamos uma pesquisa nos datasheets de conversores analógico-digitais presentes no mercado, a fim de selecionar um novo conversor que fosse capaz de ler quatro canais em um tempo inferior a 20 milissegundos e com resolução de 14bits. Para tanto, realizamos a aquisição de novos componentes no intuito da construção de novos protótipos com tela touch integrada ao hardware. A evolução dos protótipos desenvolvidos pode ser observada nas Figuras 7, 8 e 9. A Figura 7 exibe o primeiro protótipo funcional; a Figura 8 o segundo protótipo funcional, com placa embutida, pronto para testes; e a Figura 9 o terceiro protótipo (duo teste) aprimorado, que passou a detectar também anticorpos para todos os isotipos (IgG, IgM e IgA) específicos para HIV-1/2 e/ou *Treponema pallidum* (Tp) simultaneamente em soro humano, plasma ou sangue total.



Figura 7 - Primeiro protótipo funcional.

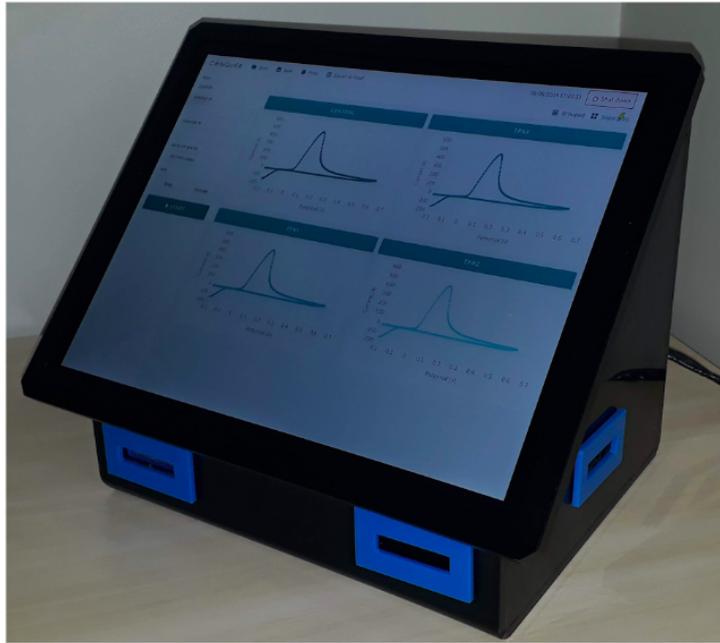


Figura 8 - Segundo protótipo funcional com placa embutida.



Figura 9 - Terceiro protótipo funcional.

Durante essa etapa, o protótipo foi conectado a quatro eletrodos e a um *Raspberry Pi* com software de controle, conforme apresentado na Figura 8. Após as simulações, as curvas de resposta apresentadas, que identificam as correntes e tensões ao longo do tempo, foram confrontadas com as curvas obtidas após o mesmo teste no potenciostato de bancada PalmSens e apresentaram comportamento similar.

Como a construção da parte física do protótipo foi realizada durante a elaboração da interface de usuário, para validar algumas funcionalidades, de maneira que as atividades fossem executadas em paralelo, a capacidade de abstração do código-fonte foi testada para facilitar a manutenção e a habilidade de escalar quando fosse necessário. A título de prova de conceito, utilizaram-se formatos próprios dos outros potenciostatos comerciais, nomeadamente o da *PalmSens*, amplamente utilizado em diversas aplicações.

Durante as etapas subsequentes de desenvolvimento, realizamos o aprimoramento dos sistemas embarcados ao observar que a linguagem de programação Python não iria atender aos requisitos de desempenho impostos pelo projeto, uma vez que, para realizar a leitura de quatro células eletroquímicas, em paralelo, estavam sendo gastos cerca de 160 milissegundos enquanto o tempo máximo que poderia ser gasto nessa operação era de 16 milissegundos.

Pensando na otimização do código, para que o sistema pudesse atender as necessidades do projeto, foi adotada a linguagem de programação de baixo nível C. Com isso, foi necessário reescrever todo o código que tinha sido elaborado durante as primeiras etapas de desenvolvimento. Adicionalmente, foram criadas bibliotecas de comunicação e configuração do hardware, tornando assim o sistema flexível e de fácil reutilização para implementação de futuras atualizações e implementações de novas funcionalidades de controle da célula eletroquímica.

Desse modo, a versão final do circuito ficou dividida nos seguintes módulos para facilitar a operacionalização das funcionalidades: módulo de alimentação, responsável pela alimentação dos diversos circuitos integrados; módulo de conversão digital-analógica, para entrada de controle via protocolo de comunicação I2C e variação dos níveis de tensão nas células eletroquímicas; módulo de leituras, com conversor analógico-digital para saída com comunicação I2C; módulo central, para regular as reações eletroquímicas; e módulo que faz a conexão aos eletrodos.

A Figura 10 apresenta uma das telas intermediárias da versão atual do protótipo. Nessa versão, podemos observar que a interface apresenta os resultados de múltiplas medições voltamétricas, de maneira isolada e em conjunto. Além disso, são exibidas em uma tabela outras informações de interesse relacionadas à leitura, como os picos máximo e mínimo das medições investigadas. O sistema é capaz de armazenar os dados localmente ou de enviá-los nas nuvens, de forma criptografada, possibilitando a recuperação de informações anteriores. A Figura 11 apresenta a tela inicial do software de testagem, exibindo novas funcionalidades para exportação dos dados no formato PDF, além de gerar outros dados estatísticos de interesse, como mediana, desvio padrão e *z-score*.

Na versão atual do dispositivo, aplicamos técnicas de sistemas de tempo real ao algoritmo, bem como o uso de técnicas avançadas para manipulação de matrizes para preservar a linearidade das reações que ocorrem na célula eletroquímica e garantir que não houvesse desperdício de tempo com cálculos matemáticos, conforme apresentado na Figura 12. Esse gráfico apresenta o resultado da análise eletroquímica de azul de metileno, que possui comportamento de onda conhecido. Durante a realização dessas simulações, foi aplicada a tensão inicial de  $-0.2V$ , que foi incrementada até  $0.5V$  com passos de  $0.001V$  e amostragem de corrente a cada  $0.005V$ .

Considerando os fundamentos da voltametria cíclica, após atingir  $0.5V$ , o sistema retorna até a tensão inicial de  $-0.2V$  e finaliza a análise da amostra. Os gráficos gerados pelo sistema foram comparados aos de outros softwares consolidados no mercado e apresentaram o mesmo comportamento de onda, evidenciando a funcionalidade do protótipo durante a análise de amostras biológicas potencialmente infectadas. A Figura 13 apresenta os dados de leitura em paralelo de quatro canais no novo modo de aquisição de dados, intitulado "Modo de Leitura Temporizado". O gráfico do quarto canal não foi exibido nessa representação, pois estava aterrado e o nível de tensão era zero no momento dessa medição.

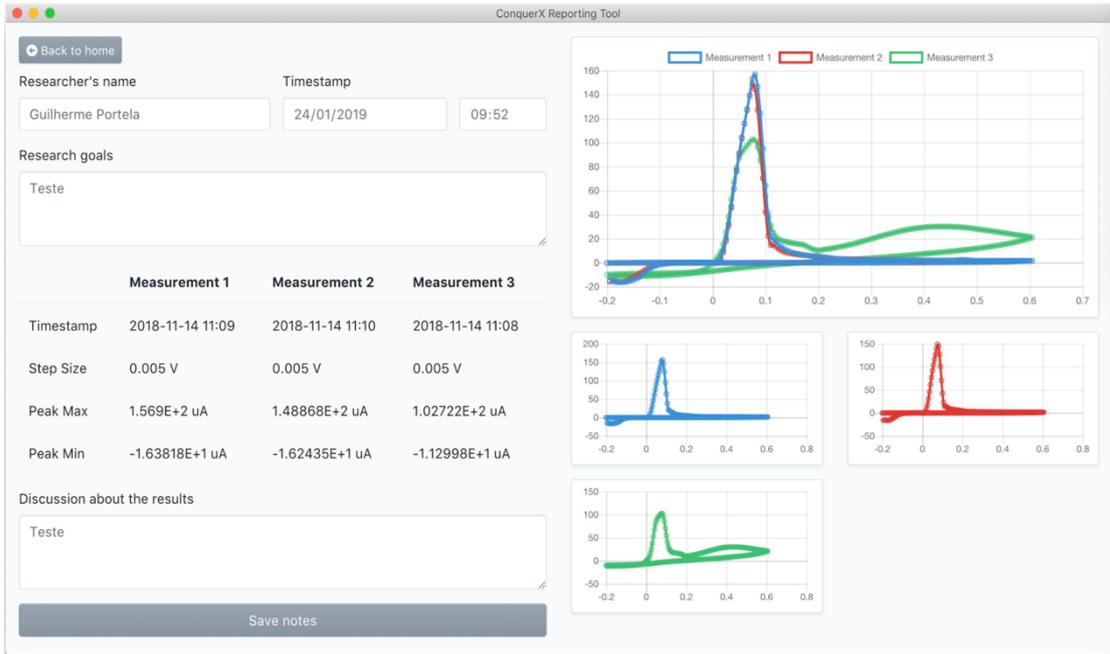


Figura 10 - Versão intermediária da tela principal

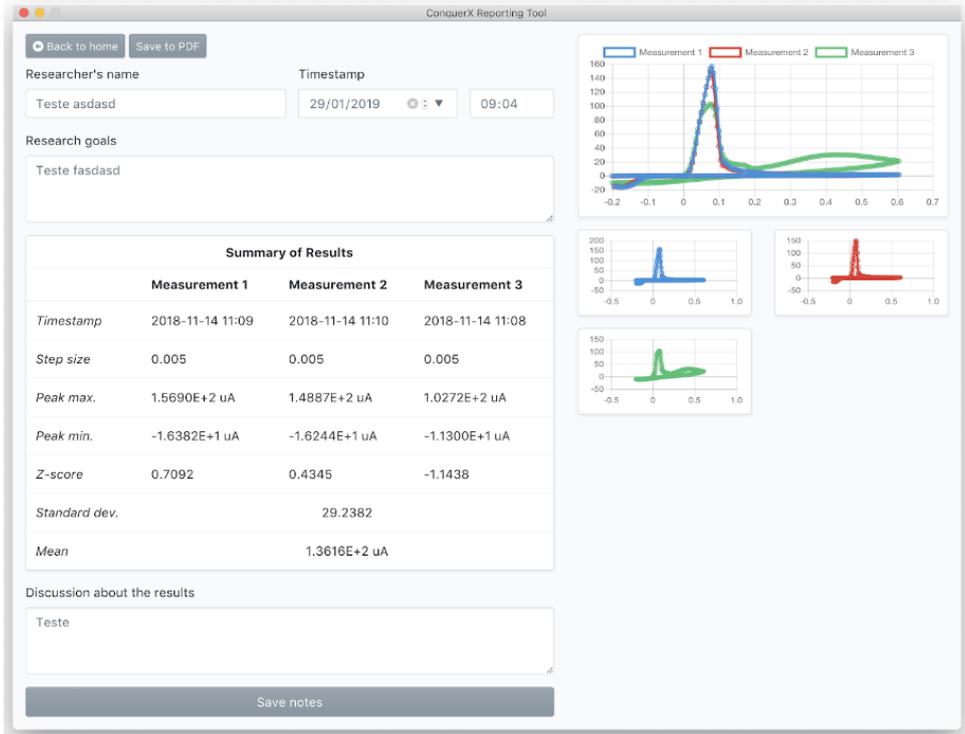


Figura 11 - Versão avançada da tela principal.

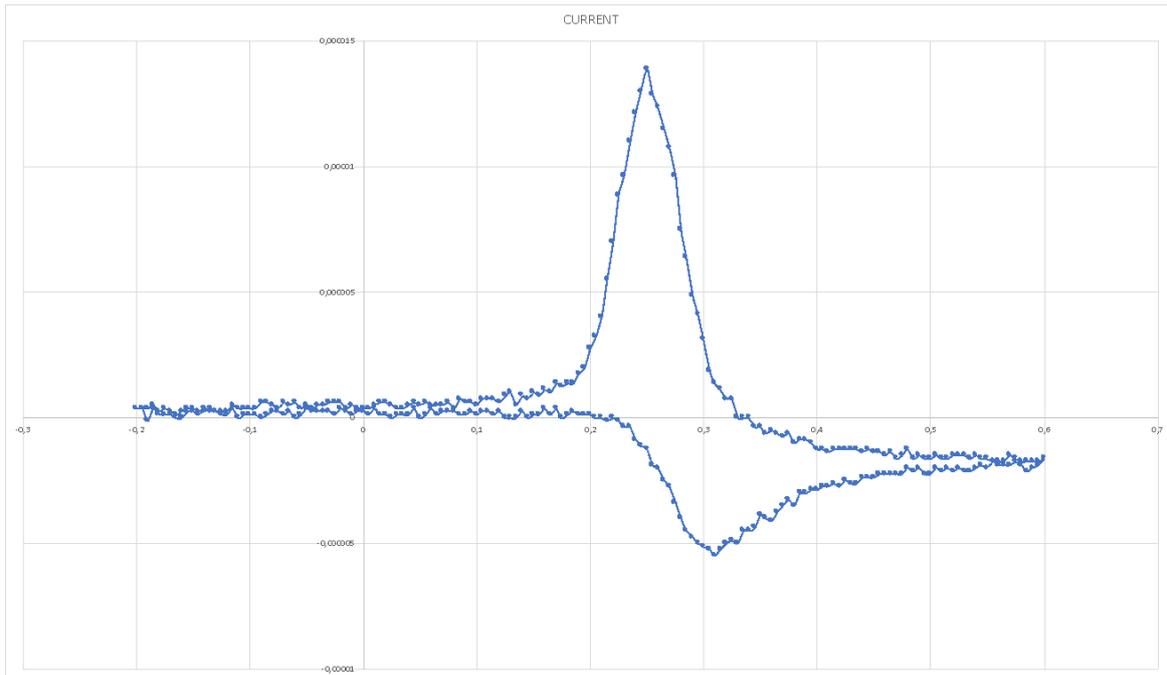


Figura 12 - Gráfico de análise eletroquímica utilizando o primeiro protótipo.

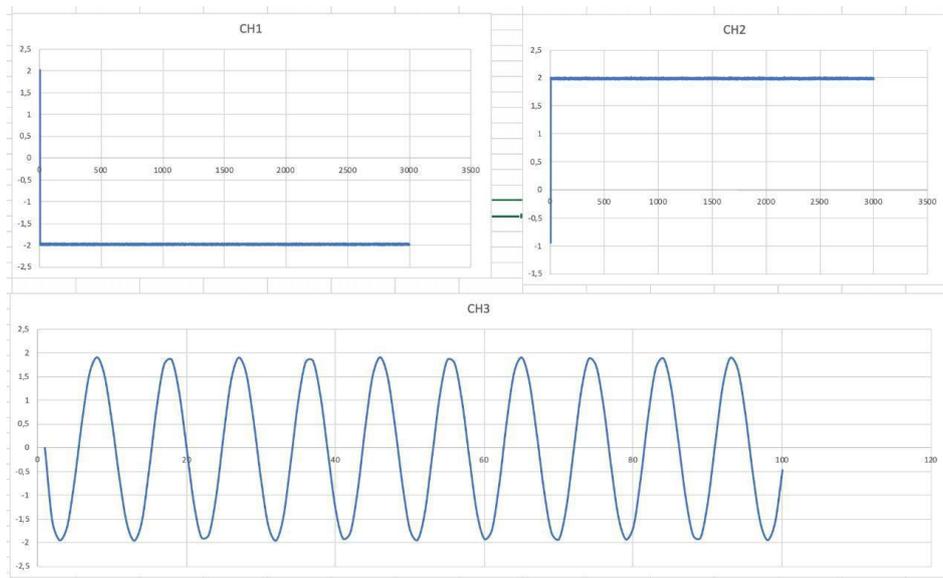


Figura 13 - Plotagem de leituras do Modo de Leitura Temporizado - reescrito em linguagem C.

Ainda no âmbito da cooperação técnica com a ConquerX, foram realizados estudos sobre a legislação brasileira e americana que envolvem inovação, com objetivo de identificar potenciais oportunidades de registros de softwares e patentes como proteção de propriedade intelectual em ambos os países, bem como apontar análises comparativas para delinear as vantagens e desvantagens de cada abordagem.

Ao longo de algumas reuniões para tratar sobre o tema, a ConquerX solicitou a consultoria do escritório local de advocacia Goodwin Law Firm e foram realizadas consultas aos marcos legais relacionados de ambos os países, como o U.S. Code, o American Inventors Protection Act of 1999 (AIPA), artigos das Universidades de Wake Forest e Harvard, decisões de cortes federais norte-americanas sobre o tema, as Leis brasileiras nº 10.973/2004 e 13.243/2016, o Decreto nº 9.283/2018 e artigos acadêmicos nacionais pertinentes. Em anexo, apresentamos os certificados de registros de softwares oriundos dessa cooperação, os artigos acadêmicos publicados até o momento e a solicitação de patente internacional do dispositivo em andamento.

## RESULTADO DAS MISSÕES RELACIONADAS AO PROCESSO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA COM O RETROVIRUS LAB (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY – SCHOOL OF MEDICINE, BALTIMORE/EUA)

Durante o processo de cooperação técnica estabelecido com o Retrovirus lab, o estabelecimento das agendas de interesse considerou a necessidade de atuar em conjunto no enfrentamento de agravos de interesse de saúde pública do Brasil e dos Estados Unidos, com ênfase no enfrentamento à sífilis e à infecção pelo HIV a partir do desenvolvimento de ações relacionadas ao diagnóstico ambulatorial de pacientes e de pesquisa e desenvolvimento (P&D). Desse modo, o estabelecimento dessa cooperação representou um marco no desenvolvimento da nova ferramenta proposta para triagem e diagnóstico laboratorial de sífilis, HIV e outras IST, possibilitando ainda o intercâmbio de pesquisadores e estudantes entre as Instituições e acelerando o desenvolvimento das pesquisas dos grupos de pesquisa.

Nesse sentido, as ações de cooperação tiveram como principal objetivo aprimorar o desenvolvimento do protótipo e iniciar o processo de validação dos eletrodos imobilizados com antígenos ou anticorpos anti-*T. pallidum* presentes em amostras de pacientes diagnosticados com sífilis adquirida ou sífilis congênita. Durante as etapas de desenvolvimento, foram realizados testes em diferentes eletrodos comerciais (carbono; platina; carbono modificado com partículas de ouro; ou ouro, prata e platina) antes e após a imobilização de antígenos ou anticorpos anti-*T. pallidum* ou anti-albumina (controle constitutivo), com posterior incubação com amostras de soro de pacientes controle (não infectados) ou diagnosticados com sífilis.

Os resultados obtidos a partir dessas análises resultaram em gráficos-padrão de voltametria cíclica gerados por cada uma das condições testadas, possibilitando a identificação do melhor conjunto de variáveis capazes de distinguir amostras de pacientes controle (não infectados) daquelas oriundas de pacientes com diferentes períodos de infecção. Adicionalmente, durante as ações da cooperação, os processos de imobilização e lavagem dos eletrodos foram otimizados, representando um importante ganho de tempo até a obtenção dos resultados e economia dos reagentes utilizados durante as análises, além da identificação de padrões específicos e variação da amplitude do sinal detectado durante a incubação de amostras infectadas em relação aos resultados obtidos com amostras controle.

A Tabela 1 sumariza as principais atividades realizadas e os resultados obtidos ao longo dessa cooperação. Em conjunto, os resultados obtidos ao longo dessa cooperação indicaram que o conjunto de alvos moleculares analisados utilizando os eletrodos de carbono ou carbono modificado com partículas de ouro apresentaram maior capacidade de diferenciação entre as amostras infectadas e aquelas do grupo controle, a partir do padrão e da amplitude do sinal detectado.

Tabela 1 - Atividades realizadas durante a cooperação entre o LAIS/UFRN e o Retrovirus lab (Johns Hopkins University - School of Medicine).

Tipo	Descrição	Percentual de Execução (%)	Atividades Realizadas	Status
<b>Produto 1</b> Testagem de diferentes eletrodos (carbono; platina; ouro com partículas modificadas; e ouro, prata e platina) antes e após a imobilização de antígenos/ anticorpos anti- <i>T. pallidum</i> e posterior incubação com amostras de soro	Padronização dos períodos de incubação e testagem dos melhores materiais presentes no eletrodo para identificação de amostras potencialmente infectadas	100%	Incubação com antígenos, anticorpos, lavagem dos eletrodos, incubação das amostras, realização das leituras após diferentes períodos de incubação e análise dos gráficos gerados após as leituras	Finalizado
<b>Produto 2</b> Testagem de diferentes eletrodos (carbono; platina; ouro com partículas modificadas; e ouro, prata e platina) antes e após a imobilização de antígenos/ anticorpos antialbumina e posterior incubação com amostras de soro	Padronização dos períodos de incubação e testagem dos melhores materiais presentes no eletrodo para identificação de amostras controle	100%	Incubação com antígenos, anticorpos, lavagem dos eletrodos, incubação das amostras, realização das leituras após diferentes períodos de incubação e análise dos gráficos gerados após as leituras	Finalizado
<b>Produto 3</b> Análise dos gráficos de impedância gerados durante cada uma das condições testadas	Avaliação do conjunto de parâmetros capazes de identificar a presença de elementos que comprovem a infecção pelo <i>T. pallidum</i> ou de anticorpos específicos na amostra analisada	100%	Análise do padrão dos gráficos gerados e dos valores obtidos ao longo de cada uma das leituras realizadas	Finalizado
<b>Produto 4</b> Publicação de artigo científico relacionado ao desenvolvimento e funcionamento do protótipo	Manuscrito submetido à revista internacional indexada na área de medicina sobre o desenvolvimento e os resultados da validação inicial do protótipo	100%	Artigo submetido e publicado (DOI: 10.3390/ijerph192316206)	Finalizado

## RESULTADO DAS MISSÕES RELACIONADAS AO PROCESSO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA COM O CENTRO DE INFORMÁTICA E SISTEMAS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (CISUC, UNIVERSIDADE DE COIMBRA, COIMBRA/PT)

Durante as missões relacionadas à cooperação técnica com o Centro de Informática e Sistemas da Universidade de Coimbra (Cisuc), foram realizados estudos sobre a utilização de novas ferramentas computacionais para análise dos resultados obtidos com o dispositivo desenvolvido para diagnóstico de sífilis, HIV e outras IST. Considerando a vasta experiência dos pesquisadores da Cisuc no desenvolvimento de métodos para o processamento e a análise digital de sinais biomédicos baseados em impedância e voltametria cíclica, o estabelecimento dessa cooperação foi fundamental para otimização dos métodos computacionais de análise dos resultados utilizados no dispositivo.

Ao longo dessa cooperação, as sucessivas versões do dispositivo foram apresentadas aos pesquisadores do Cisuc, destacando as implementações de recursos entre cada uma delas e recebendo importantes feedbacks para o aprimoramento. A partir da realização de reuniões de acompanhamento entre as equipes e a análise dos resultados obtidos em conjunto, elaboramos um novo estudo sobre potenciais biomarcadores laboratoriais

para diagnóstico de sífilis, com aplicação direta no dispositivo desenvolvido. Adicionalmente, esse estudo originou um manuscrito com a revisão dos principais achados publicados na literatura intitulado “Molecular basis of syphilis infection and their implications on the development of new diagnosis tools using machine learning methods”, o qual está em processo de revisão para submissão a periódico internacional indexado.

Além dessas ações diretamente relacionadas ao desenvolvimento e à operação do dispositivo, o estabelecimento da cooperação técnica com a Cisuc resultou ainda na aplicação de métodos de processamento natural de linguagem para análise de trilha formativa dos cursos do Projeto “Sífilis Não” e seus impactos; e novos estudos para aplicação de métodos computacionais durante a análise dos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) e Autorização de Internação Hospitalar (AIH) no contexto dos casos da sífilis congênita.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante as diversas etapas de desenvolvimento do dispositivo para triagem e diagnóstico de sífilis, HIV e outras IST, estudo conduzido sob responsabilidade do Lais/UFRN, o estabelecimento de cooperações técnicas horizontais com as três Instituições internacionais citadas (ConquerX/UMass; Retrovirus lab/Johns Hopkins University; e Cisuc) foi um elemento-chave para acelerar a velocidade de desenvolvimento e aprimorar a qualidade do dispositivo final, seja na parte inicial de prototipagem e desenvolvimento eletrônico, seja na validação dos alvos biológicos testados em amostras de pacientes infectados, seja ainda durante a análise dos resultados utilizando novas ferramentas computacionais para interpretação dos dados. Nesse sentido, embora não estivesse inicialmente previsto, a partir do desenvolvimento adequado de uma solução para diagnóstico de sífilis, especialmente para os casos de sífilis congênita, o dispositivo também pode ser utilizado como ferramenta para triagem de HIV e outras doenças infecciosas a partir da customização dos alvos moleculares detectados durante a testagem.

Compatível com as exigências mais recentes da LGPD e das demais normas relacionadas à proteção de dados sensíveis, especialmente na área da saúde, o dispositivo projetado é capaz de armazenar localmente os resultados ou de enviá-los criptografados para nuvens digitais, possibilitando seu uso em regiões remotas e sua aplicação na telemedicina. A partir da operacionalização em blocos dos diversos softwares que compõem o dispositivo, é possível manter a sua integração interna e interface de operação sempre atualizada e customizada de acordo com a necessidade do usuário final, apresentando resultados precisos e confiáveis.

A necessidade de ampliação de alvos biológicos testados simultaneamente possibilitou o aproveitamento máximo dos esforços da equipe, permitindo que o dispositivo pudesse ser utilizado para aplicações inicialmente não previstas. Por fim, a associação das *expertises* da equipe multidisciplinar dos pesquisadores do Lais/UFRN com os pesquisadores das instituições colaboradoras permitiu que alunos e pesquisadores em formação pudessem encontrar novas soluções tecnológicas para os desafios com os quais se deparam durante a execução das suas atividades, proporcionando um ambiente altamente disruptivo e inovador ao longo dos anos, satisfatoriamente representado pelos registros de softwares concedidos, artigos científicos publicados e a solicitação conjunta de uma nova patente internacional relacionada ao dispositivo.

# ANEXOS

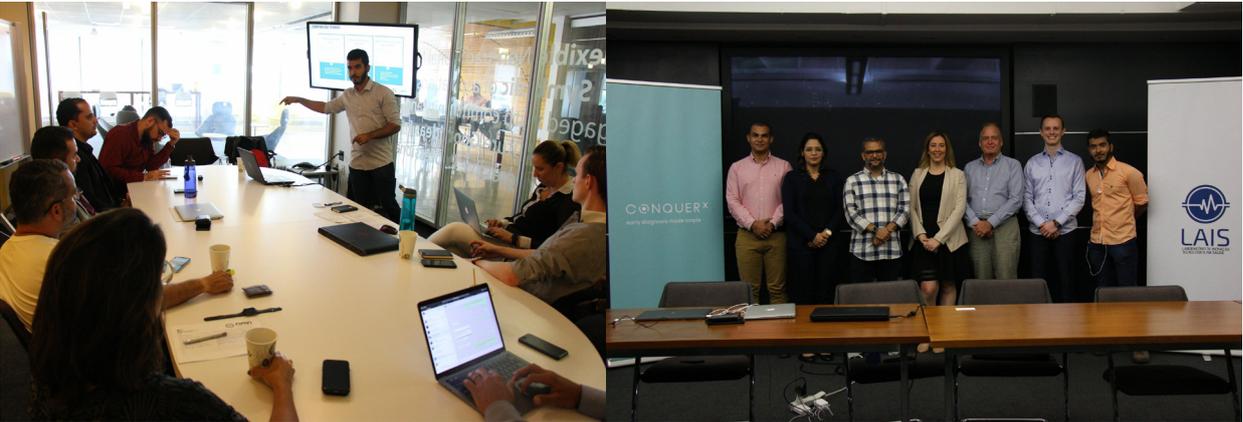


Figura 14 - Reuniões sobre a proteção das patentes advindas da cooperação com a ConquerX

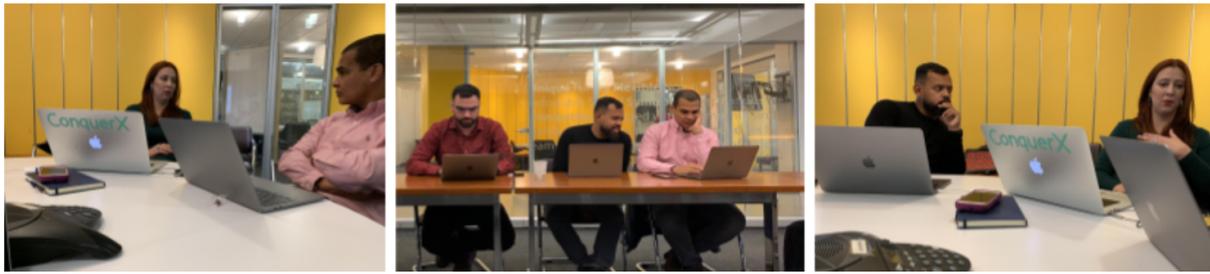


Figura 15 - Pesquisadores do LAIS e ConquerX – Elaboração do Controlador de Ações (novembro de 2018)



Figura 16 - Equipe Lais /ConquerX (Agnaldo Souza, Pablo Holanda, Leonardo Judson, Jakub Chudik, Deborah Zanforlin, Guilherme Portela, Dionísio Aires e Matheus Coutinho).



Figura 17 - Reunião técnica entre os pesquisadores do Lais/UFRN e da ConquerX para discussão dos prováveis alvos biológicos que serão detectados durante a realização do teste em desenvolvimento.

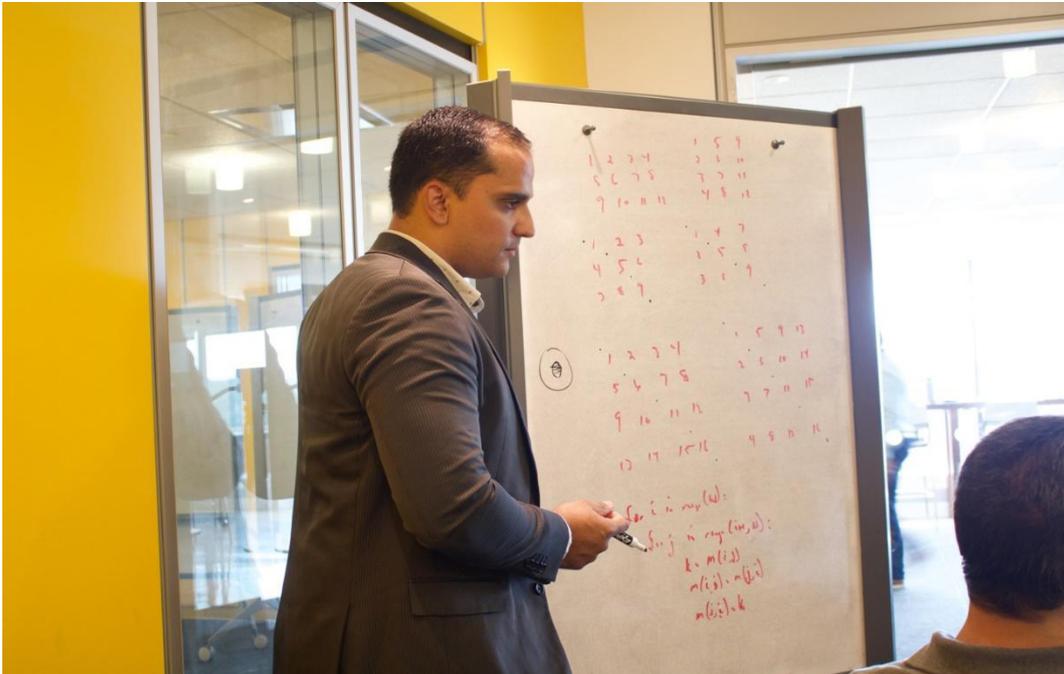


Figura 18 - Discussão sobre potenciais alvos biológicos, hibridizados em cada eletrodo e os protocolos adequados para garantir a ligação entre os componentes biológicos e o eletrodo utilizado no teste.



Figura 19 - Apresentação dos resultados obtidos em conjunto e perspectivas para realização das próximas etapas relacionadas ao desenvolvimento do produto.



Figura 20 - Reunião com a Sra. Deborah Zanforlin, pesquisadora da ConquerX, para discussão sobre a necessidade de implementação de um eletrodo para detecção de anticorpos anti-*T. pallidum* para redução dos casos falsos negativos e identificação de potenciais casos de cicatriz imunológica.



Figura 21 - Reunião com o professor Ricardo Valentim e a professora Karilany Coutinho para discussão sobre os métodos de detecção, interpretação dos resultados gerados e sua relação com o diagnóstico de sífilis adquirida ou congênita.



Figura 22 - Reunião com o diretor do VDC - *UMass*, William Brah, para apresentação das atividades desenvolvidas pelo Lais/ConquerX e prospecção de novas colaborações com a *UMass - Boston*.



Figura 23 - Coleta de sangue periférico de 14 doadores saudáveis, separação do plasma e posterior armazenamento das amostras a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ampliação do repositório de amostras da cooperação Lais/ConquerX.



Figura 24 - Reunião para apresentação dos projetos e discussão dos pontos de possível colaboração entre os pesquisadores do Lais/UFRN e o professor Lúcio Gama (JHU – SOM).



Figura 25 - Visita guiada pelo professor Lúcio Gama pela parte histórica do Hospital e *School of Medicine* da Johns Hopkins University.



Figura 26 - Foto de encerramento do primeiro dia da missão na Johns Hopkins University com os pesquisadores do Lais/UFRN e o professor Lúcio Gama, visando à prospecção de novas colaborações para o desenvolvimento do Projeto "Sífilis Não".



Figura 27 - Foto de encerramento da reunião de alinhamento para estabelecimento de cooperação entre os pesquisadores do Lais/UFRN e da Johns Hopkins University.







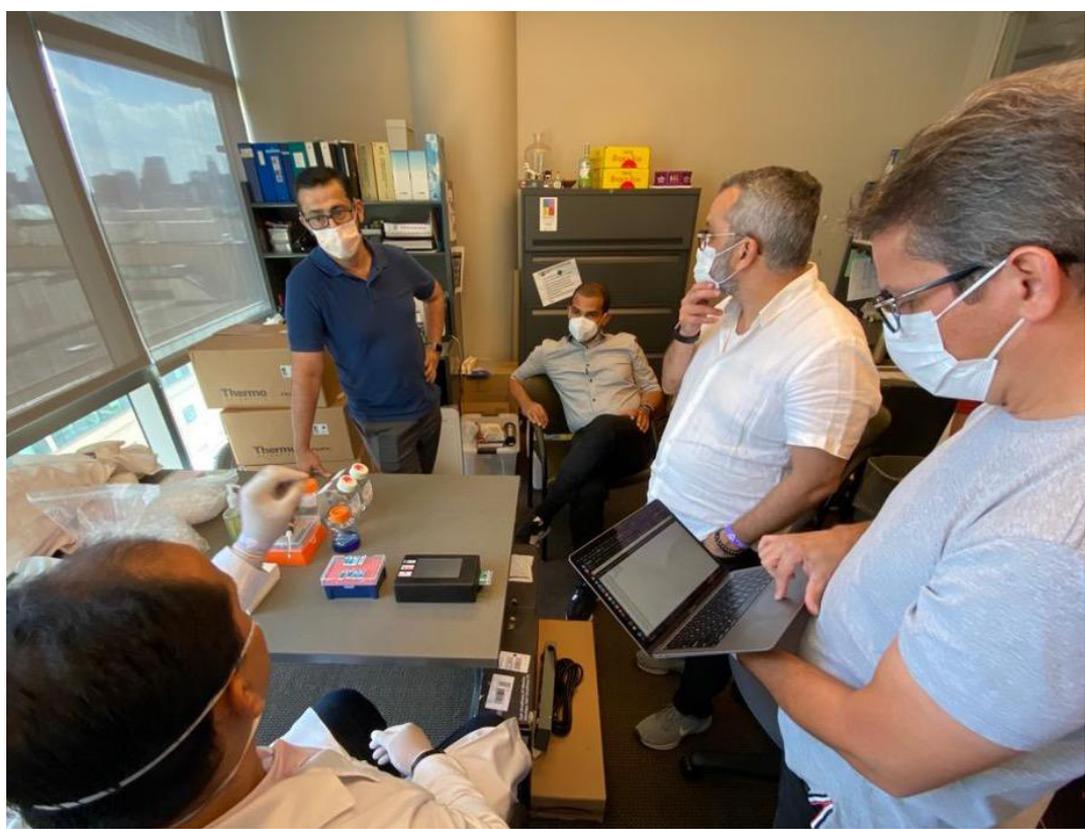




Figura 36 - Seminário de acompanhamento das atividades desenvolvidas no Cisuc.



Figura 37 - Seminário de Acompanhamento das atividades desenvolvidas no Cisuc.



Figura 38 - Rodada de debates sobre as atividades desenvolvidas no Cisuc.

## Artigo: Development of a Cyclic Voltammetry-Based Method for the Detection of Antigens and Antibodies as a Novel Strategy for Syphilis Diagnosis (PDF)



International Journal of  
*Environmental Research  
and Public Health*



Article

# Development of a Cyclic Voltammetry-Based Method for the Detection of Antigens and Antibodies as a Novel Strategy for Syphilis Diagnosis

Gabriel M. C. Barros <sup>1,†</sup>, Dionísio D. A. Carvalho <sup>1,†</sup>, Agnaldo S. Cruz <sup>1</sup>, Ellen K. L. Morais <sup>1</sup>, Ana Isabela L. Sales-Moioli <sup>1</sup>, Talita K. B. Pinto <sup>1,2</sup>, Melise C. D. Almeida <sup>1</sup>, Ignacio Sanchez-Gendriz <sup>1</sup>, Felipe Fernandes <sup>1</sup>, Ingridy M. P. Barbalho <sup>1</sup>, João P. Q. Santos <sup>1</sup>, Jorge M. O. Henriques <sup>3</sup>, César A. D. Teixeira <sup>3</sup>, Paulo Gil <sup>4</sup>, Lúcio Gama <sup>5,6</sup>, Angélica E. Miranda <sup>7</sup>, Karilany D. Coutinho <sup>1</sup>, Leonardo J. Galvão-Lima <sup>1,\*</sup> and Ricardo A. M. Valentim <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Technological Innovation in Health (LAIS), Hospital Universitário Onofre Lopes, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal 59078-970, Brazil
  - <sup>2</sup> Health Sciences Research Unit: Nursing (UICISA:E), The Nursing School of Coimbra (ESENFC), 3004-011 Coimbra, Portugal
  - <sup>3</sup> Centre for Informatics and Systems of the University of Coimbra (CISUC), Department of Informatics Engineering, University of Coimbra, 3004-531 Coimbra, Portugal
  - <sup>4</sup> Department of Electrical and Computer Engineering, School of Science and Technology, New University of Lisbon, 1099-085 Lisbon, Portugal
  - <sup>5</sup> Department of Molecular and Comparative Biology, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21218, USA
  - <sup>6</sup> Vaccine Research Center, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA
  - <sup>7</sup> Postgraduate Program in Infectious Diseases, Federal University of Espírito Santo, Vitória 29075-910, Brazil
- \* Correspondence: leonardo.lima@lais.huol.ufrn.br  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Barros, G.M.C.; Carvalho, D.D.A.; Cruz, A.S.; Morais, E.K.L.; Sales-Moioli, A.I.L.; Pinto, T.K.B.; Almeida, M.C.D.; Sanchez-Gendriz, I.; Fernandes, F.; Barbalho, I.M.P.; et al. Development of a Cyclic Voltammetry-Based Method for the Detection of Antigens and Antibodies as a Novel Strategy for Syphilis Diagnosis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 16206. <https://doi.org/10.3390/ijerph192316206>

Academic Editors: Kenji Suzuki, Sabrina Cipolletta, Andreas Triantafyllidis and Giacinto Barresi

Received: 7 November 2022  
Accepted: 1 December 2022  
Published: 3 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The improvement of laboratory diagnosis is a critical step for the reduction of syphilis cases around the world. In this paper, we present the development of an impedance-based method for detecting *T. pallidum* antigens and antibodies as an auxiliary tool for syphilis laboratory diagnosis. We evaluate the voltammetric signal obtained after incubation in carbon or gold nanoparticle-modified carbon electrodes in the presence or absence of Poly-L-lysine. Our results indicate that the signal obtained from the electrodes was sufficient to distinguish between infected and non-infected samples immediately (T<sub>0</sub>) or 15 min (T<sub>15</sub>) after incubation, indicating its potential use as a point-of-care method as a screening strategy.

**Keywords:** syphilis; *Treponema pallidum*; electrodes; point-of-care method; screening strategy

## 1. Introduction

Syphilis and other sexually transmitted infections (STIs) are silent epidemics that affect high- and low-income countries worldwide. Although it is a treatable and preventable disease, according to data from the Center for Disease Control and Prevention (CDC), primary and secondary syphilis cases among adults in the USA rose from 7.4/100,000 in 2015 to 14.5/100,000 syphilis cases in 2021, while 149 stillbirths and infant deaths associated to congenital syphilis were reported in 2020. In addition, according to WHO reports, syphilis in pregnancy is the second leading cause of stillbirth worldwide. Furthermore, it may result in prematurity, low birth weight, congenital hearing loss, and bone malformation [1–4].

The current syphilis screening and laboratory diagnosis strategies include rapid or non-treponemal methods (e.g., VDRL test) that may present false-negative or false-positive results. Additionally, they do not differentiate the exposed child during pregnancy (with detectable maternal antibodies at birth) from those indeed infected by *T. pallidum*. In

## Artigo: Development of technologies to support the diagnosis of infectious diseases and cancer to support the primary health care (PDF)

Research on Biomedical Engineering  
<https://doi.org/10.1007/s42600-022-00247-7>

ORIGINAL ARTICLE



# Development of technologies to support the diagnosis of infectious diseases and cancer to support the primary health care

Matheus A. C. Ferreira<sup>1</sup> · Dionísio D. A. Carvalho<sup>1</sup> · Agnaldo S. Cruz<sup>1</sup> · Karilany D. Coutinho<sup>1</sup> · Carlos A. P. Oliveira<sup>1</sup> · Antonio H. F. Morais<sup>1,2</sup> · João Paulo Q. Santos<sup>1,2</sup> · Nadja N. V. Mayrink<sup>1</sup> · Leonardo J. Galvão-Lima<sup>1,2</sup> · Ana Isabela L. Sales-Moioli<sup>1</sup> · Daniele M. S. Barros<sup>1</sup> · Gabriela A. Albuquerque<sup>1</sup> · Luca P. C. F. Alves<sup>1</sup> · César A. D. Teixeira<sup>3</sup> · Jorge M. O. Henriques<sup>3</sup> · Paulo Gil<sup>4</sup> · Cristine M. G. Gusmão<sup>1,5</sup> · Ricardo A. M. Valentim<sup>1</sup>

Received: 18 May 2022 / Accepted: 28 October 2022  
 © The Author(s) 2022

### Abstract

**Purpose** Primary Health Care (PHC) is the coordinator of health care in Brazil and needs to be strengthened in the diagnostic field to increase health care quality. Aiming to improve the diagnostic tools currently available in PHC, this work describes the process of development and validation of two point-of-care biomedical devices for screening patients with syphilis or different kinds of cancer.

**Methods** The development of these devices followed nine stages of action based on the requirements established by the Ministry of Health. During development, both systems followed the stages of circuit planning, software simulation to verify the components used, cost assessment for the acquisition of features, simulation in contact matrix, development of the embedded system, and planning of the printed circuit board and storage box.

**Results** Both devices underwent preliminary functionality tests to assess their quality. The performance tests applied on the device to diagnose syphilis performed 8,733,194 requests, with a flow of 2426 requests/second, reaching the desired parameters of robustness, integrity, durability, and stability. In addition, functioning tests on the cancer-screening device indicated the ability to detect standard fluorescence in a minimal (150 uL) sample volume.

**Conclusions** Together, the methodology used for developing the devices resulted in promising equipment to improve the diagnosis and meet the requirements for executing technologies for testing and triaging patients in PHC.

**Keywords** Embedded system · Primary health care · Biosensors · Syphilis · Cancer

### Background

Primary Health Care (PHC) is the coordinator of care and the main gateway to the national health system in Brazil, with more than 42 thousand Basic Health Units (UBS) existing in Brazil responsible for the daily contact with users of the system (Massuda et al. 2018, Macinko and Mendonça 2018, Pinto et al. 2014). Therefore, accurate diagnosis in PHC is considered a fundamental element in increasing the

resolution of health problems at this level of care (Kameda and Pazello 2015, Santos et al. 2017).

However, the development of new technologies aimed at diagnosis is often directed to health care of medium and high complexity, which generates an increase in the costs of health care for the population, diagnosis in more advanced stages of diseases, and the difficulty in the population's timely access to health assistance, as in the case of care lines for cancer and some sexually transmitted infections (STIs) (Facchini et al. 2018, Macinko et al. 2017).

The improvement of diagnosis in PHC is a relevant factor for the qualification of care and health regulation processes. Thus, it represents the practical qualification of PHC in promoting equity in access to health services in the specialized network. Therefore, it is essential that new health technologies aimed at testing, screening, and diagnosis of cases, which do incorporate into PHC, have the following

Matheus A. C. Ferreira and Dionísio D. A. de Carvalho have contributed equally to this work.

✉ Gabriela A. Albuquerque  
[gabriela.albuquerque@lais.huol.ufrn.br](mailto:gabriela.albuquerque@lais.huol.ufrn.br)

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 10 November 2022

Springer



Patente: [Electronic Acknowledgement Receipt \(PDF\)](#)



GLAIS

UFERN

## Assinatura de Documento Digitalizado

### Dados do Documento

**Descrição:** Relatório - Dispositivo - Projeto "Sífilis Não"

**Criado por:** ANDRÉA SANTOS PINHEIRO DE MELO (\*\*\*.346.734-\*\*) em 21 de Setembro de 2023 às 11:22

**Nome do Arquivo Original:** Relatório Final - Dispositivo.pdf

**Md5 Checksum do Arquivo Original:** bfacc7335f259a2ea91392af8b3f33f7



Documento assinado eletronicamente por **RICARDO ALEXSANDRO DE MEDEIROS VALENTIM, CPF: \*\*\*.550.214-\*\*, em 22 de Setembro de 2023, às 03:17, conforme horário oficial de Brasília.**



Documento assinado eletronicamente por **LEONARDO JUDSON GALVAO DE LIMA, CPF: \*\*\*.619.654-\*\*, em 21 de Setembro de 2023, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília.**



Documento assinado eletronicamente por **DIONISIO DIAS AIRES DE CARVALHO, CPF: \*\*\*.921.103-\*\*, em 21 de Setembro de 2023, às 20:31, conforme horário oficial de Brasília.**



Documento assinado eletronicamente por **AGNALDO SOUZA CRUZ, CPF: \*\*\*.769.294-\*\*, em 21 de Setembro de 2023, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília.**



Documento assinado eletronicamente por **KARILANY DANTAS COUTINHO, CPF: \*\*\*.572.574-\*\*, em 22 de Setembro de 2023, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília.**



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://docs.lais.ufrn.br/>, informando o código verificador **CC97E809** e o código CRC **C6154BFC**.