

**M**

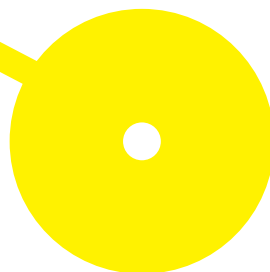
**MESTRADO**

Bioquímica em Saúde  
Ramo Bioquímica Clínica e Metabólica

# SMASK- Smart Mask with colorimetric biosensor for SARS-CoV-2 contamination and humidity

Ana Margarida Duarte Nascimento

07/2022





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**

**SMASK- Smart Mask with colorimetric biosensor for SARS-CoV-2  
contamination and humidity**

**Autor**

Ana Margarida Duarte Nascimento

**Orientador**

Prof. Doutora Mónica Vieira/ Escola Superior de Saúde

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde – Ramo Bioquímica Clínica e Metabólica** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## Menção de apoio financeiro

Este projeto surgiu no âmbito da pandemia da COVID-19, foi financiado e promovido pelo Instituto Politécnico do Porto, através da Escola Superior de Saúde, juntamente com a CLOTHIUS, Tecelagem, Lda, e co-financiado pela COMPETE 2020 no âmbito do Sistema de Incentivos a Empresas e Infra-estruturas de I&D (COVID-19). O presente trabalho foi financiado através da bolsa de investigação com a referência SMASK/BI/2021/01.

Research  
Design  
Development

RDD

CLOTHIUS

COMPETE  
2020

PORTUGAL  
2020



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

## **Agradecimentos**

Agradecemos ao COMPETE2020 pelo apoio financeiro ao projeto SMASK: Máscara inteligente com biossensor colorimétrico (POCI-01-02B7-FEDER-070241).

Agradeço a bolsa de estudo SMASK/BI/2021/01 que me foi atribuída, bem como a todos os envolvidos neste projeto para que fosse possível o seu desenvolvimento.

Agradeço, especialmente, à Professora Doutora Mónica Vieira, pelo apoio prestado ao longo do decorrer deste projeto.

## **Resumo**

O vírus SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, tem sido uma grande preocupação nos dias de hoje. Muitas investigações surgiram para compreender o seu mecanismo de ação, desenvolver estratégias para minimizar o seu contágio e os seus potenciais efeitos. A doença em causa provocou enormes danos a nível humano, a nível económico e ainda desafios significativos a nível mundial.

Este projeto surgiu durante a pandemia da COVID-19 e procurou explorar o desenvolvimento de um biossensor colorimétrico constituído por dois sensores, incorporado posteriormente numa superfície têxtil, com capacidade de indicação direta da eficácia da proteção das máscaras faciais, através de um indicador de humidade e de um indicador da presença do vírus SARS-CoV-2. Para o sensor de humidade recorreu-se a duas alternativas: a argila e a sílica; para o sensor de deteção do vírus, abordaram-se as biomoléculas ACE2 e o Ácido Siálico.

De acordo com os resultados obtidos, para o sensor que deteta os níveis de humidade a tecnologia baseada na sílica revelou ser a mais fiável. Para o biossensor que deteta a presença do vírus, a ligação das NPsAu-AS foi confirmada através do FTIR e do STEM, e por isso demonstrou ser a melhor opção quer a nível económico ou a nível de trabalho laboratorial.

**Palavras-chave:** biossensor, vírus SARS-CoV-2, COVID-19, humidade, máscara facial.

## **Abstract**

The SARS-CoV-2 virus, which causes COVID-19 disease, has been a major concern these days. Much research has emerged to understand its mechanism of action, develop strategies to minimize its contagion and its potential effects. This disease has caused enormous human and economic damage, as well as significant global challenges.

This project arose during the COVID-19 pandemic and sought to explore the development of a colorimetric biosensor consisting of two sensors, subsequently incorporated into a textile surface, with the ability to directly indicate the effectiveness of the protection of face masks, through a humidity indicator and an indicator of the presence of the SARS-CoV-2 virus. For the humidity sensor two alternatives were used: clay and silica; for the virus detection sensor the biomolecules ACE2 and Sialic Acid were used.

According to the results obtained, for the sensor that detects humidity levels the silica-based technology proved to be the most reliable. For the biosensor that detects the presence of the virus, the binding of the NPsAu-AS was confirmed through FTIR and STEM, and therefore proved to be the best option either economically or in terms of laboratory work.

**Keywords:** biosensor, SARS-CoV-2 virus, COVID-19, moisture, face mask.

## Índice

1.	Preâmbulo .....	1
2.	Introdução .....	2
2.1.	Vírus SARS-CoV-2 .....	4
2.2.	Biossensores Colimétricos .....	6
2.2.1.	Sensor para detecção dos níveis de humidade relativa .....	6
2.2.2.	Biossensor para detecção do vírus SARS-CoV-2 .....	8
2.3.	Impregnação Têxtil .....	11
3.	Materiais e Métodos .....	12
3.1.	Pré-Validação do projeto .....	12
3.2.	Sensor para detecção dos níveis de humidade - com o Sepiolite (argila) .....	12
3.2.1.	Preparação e montagem da amostra .....	13
3.2.2.	Desenvolvimento do sensor de humidade baseado e argila .....	14
3.3.	Sensor para detecção dos níveis de humidade baseado a Sílica .....	14
3.3.1.	Reagentes .....	15
3.3.2.	Síntese da Sílica Mesoporosa .....	15
3.3.3.	Funcionalização da Superfície externa da amostra 7,0 MS .....	15
3.3.4.	Incorporação do corante .....	16
3.4.	Biossensor para detecção do Vírus SARS-CoV-2 através da ACE2 .....	16
3.4.1.	Reagentes .....	16
3.4.2.	Otimização do pH e preparação da enzima .....	16
3.4.3.	Incorporação da NPsAu com a enzima .....	17
3.5.	Biossensor para detecção do Vírus SARS-CoV-2 através do AS .....	17
3.5.1.	Reagentes .....	17
3.5.2.	Incorporação das NPsAu com o AS .....	17

3.6.	Técnicas de confirmação de funcionalização das NPsAu com o AS/ACE2.....	18
3.6.1.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	18
3.6.2.	Microscopia Eletrónica de Varrimento com um Detetor de Transmissão (STEM) .....	19
3.7.	Impregnação Têxtil .....	19
4.	Resultados e Discussão .....	20
4.1.1.	Sepiolite-Argila .....	20
4.1.2.	Mesoporo de Sílica.....	22
4.2.	Biossensor para deteção do vírus SARS-CoV-2 .....	25
4.2.1.	Enzima ACE2 .....	25
4.2.2.	Ácido Siálico (AS).....	26
4.3.	Impregnação Têxtil .....	29
5.	Conclusão .....	33
6.	Referências Bibliograficas.....	35
7.	Anexos .....	37



## Índice de Abreviaturas

ACE2	Enzima conversadora da angiotensina 2
NPsAu	Nanopartículas de Ouro
NPsAu-AS	Nanopartículas funcionalizadas com o Ácido Siálico
AS	Ácido Siálico ou Ácido N-acetilneuramínico
BTB	Azul de Bromotimol
COVID-19	Doença provocada pela infeção do coronavírus SARS-CoV-2
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
MERS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente
MS	Sílica Mesoporosa
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
SARS-CoV	Coronavírus com síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2
STEM	Microscopia Eletrónica de Digitalização com um Detetor de Transmissão
TEOS	Ortosilicato de Tetraetilo
UV-Vis	Deteção ótica Ultravioleta Visível

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Variantes de Preocupação (adaptado do site oficial da OMS, (8, 9) .....	5
<b>Tabela 2-</b> Medições da humidade presente na máscara, durante 15 minutos.....	12
<b>Tabela 3-</b> Diferentes Sais utilizados, com correspondência da humidade controlada.....	14
<b>Tabela 4-</b> Quantidade de reagentes utilizados na incorporação de NPsAu com a AS.....	18
<b>Tabela 5-</b> Cálculo da TE para as diferentes amostras.....	32

## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Mecanismo de mudança de cor do sensor para a humidade para o Azul de Bromotimol. .....	7
<b>Figura 2-</b> Dissolução do corante Azul Metileno com a amostra da sílica mesoporosa com 7,0 nm. .....	7
<b>Figura 3-</b> Técnicas possíveis para a deteção colorimétrica de vírus específicos.....	8
<b>Figura 4-</b> Esquema representativa das NPsAu-AS incorporado nas máscaras.....	10
<b>Figura 5-</b> Esquema da colocação da amostra, para visualização da mudança de cor.....	13
<b>Figura 6-</b> Amostras preparadas para o desenvolvimento do sensor da humidade em que foi variado as quantidades de argila adicionadas: (A) mistura com 0,3g de argila; (B) mistura com 0,5g de argila; (C) mistura com 0,8g.....	20
<b>Figura 7-</b> Diferentes estados da mistura preparada: (A) Mistura após a sua preparação; (B) Mistura seca na estufa a 80°C durante 2 horas; (C) Mistura após ser submetida à humidade pretendida.....	21
<b>Figura 8-</b> Mesoporo de Sílica (A) Precipitado obtido na Síntese da Sílica Mesoporosa; (B) Mistura da amostra com o indicador Azul de Metileno.....	22
<b>Figura 9-</b> Incorporação com o Azul de Metileno: (A) após incorporação; (B) após colocação das amostras a 85% de humidade.....	22
<b>Figura 10-</b> Esquema da colocação da amostra, com água em ebulição.....	23
<b>Figura 11-</b> Ensaio 1, com as 3 tentativas em diferentes tempos.....	23
<b>Figura 12-</b> Ensaio 2, com as 3 tentativas em diferentes tempos.....	24
<b>Figura 13-</b> Solução de Nanopartículas (A) com a ACE2; (B) com a ACE2, após a adição de NaCl. .....	25
<b>Figura 14-</b> Análise FTIR às diferentes amostras: ACE2 com as nanopartículas. (com a ACE2 a duas concentrações diferentes 0,5x e 1x).....	26
<b>Figura 15-</b> Funcionalização das NPsAu com o AS: (A) Cor das NP sem tratamento com AS; (B) Cor das NP + AS sem aquecimento, agitadas por 20min à temperatura ambiente – Amostra 1 e 3; (C) Cor das NP + AS com aquecimento, agitadas por 20min a 80°C- Amostra 2 e 4; (D) Amostras 1,2,3 e 4 após 1 dia.....	26
<b>Figura 16-</b> Análise FTIR às diversas amostras pretendidas: nanopartículas liofilizadas com ácido siálico.....	27

<b>Figura 17-</b> Análise FTIR às diversas amostras pretendidas: nanopartículas liofilizadas (rosa), ácido siálico (preto), mistura de NP + AS 125/75 (azul-escuro) com diferentes concentrações.	28
<b>Figura 18-</b> Análise STEM: (A) Mistura NP+AS 50-50; (B) Mistura NP+AS 70-30; (C) Mistura NP+AS 80-20.....	29
<b>Figura 19-</b> Amostra1: 70-30 NPsAu-AS (verde, vermelho) + Branco (50% algodão orgânico 50% algodão reciclado) (preto).....	30
<b>Figura 20-</b> Amostra 1: 50-50 NPsAu-AS (vermelho, verde) + Branco (50% algodão orgânico 50% algodão reciclado) (preto).....	30
<b>Figura 21-</b> Amostra 2: 70-30 NPsAu-AS (vermelho, verde) + Branco (100% algodão orgânico) (preto). .....	30
<b>Figura 22-</b> Amostra 2: 50-50 NPsAu-AS (vermelho, verde) + Branco (100% algodão orgânico) (preto). .....	31
<b>Figura 23-</b> Amostra 3: 70-30 NPsAu -AS (preto, verde) + Branco (100% algodão BCI) (vermelho). .....	31
<b>Figura 24-</b> Amostra 3: 50-50 NPsAu -AS (vermelho, verde) + Branco (algodão BCI) (preto).....	31

## 1. Preâmbulo

Este relatório de estágio foi desenvolvido no âmbito do projeto “SMASK- Smart Mask with colorimetric biosensor for SARS-CoV-2 contamination and humidity” (POCI-01-02B7-FEDER-070241), financiado pelo COMPETE 2020, promovido pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO), em parceria com a CLOTHIUS, Tecelagem Lda e com a RDD Textiles – Research, Design and Development.

Beneficiei da bolsa SMASK/BI/2021/01, durante o período deste trabalho, que resultou na submissão do artigo com o título “Development of a sustainable biosensor to detect respiratory infectious diseases” submetido ao *inSTEMM Journal*, que se encontra em fase de avaliação. Resultou ainda na submissão do *abstract* (Anexo 3), no E-poster (Anexo 4) submetido para o congresso SNAIA, e na apresentação da comunicação em painel, no congresso IJUP2022, com o título “Development of biosensor for functional textile applications”, afixado na reitoria da Universidade do Porto, no dia 6 de maio de 2022 (Anexo 5).

O objetivo deste projeto é o desenvolvimento de um biossensor colorimétrico com 2 sensores diferentes, incorporados numa superfície têxtil, com capacidade de indicação direta da eficácia de proteção das máscaras faciais, que dê ao utilizador informação sobre (i) o nível de filtração do equipamento, com um sensor de humidade; e (ii) do espaço de contaminação, com um sensor de deteção da presença do vírus SARS-CoV-2.

As tarefas desenvolvidas na ESS|P.PORTO relacionaram-se com o desenvolvimento técnico e laboratorial do biossensor. A CLOTHIUS, Tecelagem Lda. dedicou-se à impregnação do biossensor desenvolvidos na matriz têxtil mais adequada, validação desta impregnação, escolha de tecidos apropriados à produção da máscara têxtil e desenvolvimento da máscara têxtil “inteligente”, com introdução do biossensor, conforme previsto no projeto SMASK.

## 2. Introdução

O SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, propagou-se rapidamente a nível mundial, afetando a sociedade em diversos níveis: na saúde pública, nas populações, nas estruturas sociais, na economia, entre outros (1).

O primeiro caso da COVID-19, surgiu em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China. Advieram uma série de casos inexplicáveis de pneumonia, e por isso, o governo chinês e vários investigadores trabalharam, e tomaram medidas rápidas, para que houvesse um controlo da epidemia. A 12 de janeiro de 2020, a OMS nomeou este novo vírus como o novo coronavírus 2019 (2019-nCoV), a 30 de janeiro de 2020, anunciou a epidemia de SARS-CoV-2 como uma emergência de saúde pública de interesse internacional. A 11 de fevereiro de 2020, nomeou formalmente a doença desencadeada pelo 2019-nCoV como doença coronavírus 2019 (COVID-19). No mesmo dia, o grupo de estudo de coronavírus do International Committee on Taxonomy of Viruses nomeou 2019-nCoV como o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) (2, 3). Os primeiros casos surgidos consideravam-se relacionados com um mercado de frutos do mar de Huanan e um relatório da OMS declarou que o SARS-CoV-2 poderia ser detetado em amostras ambientais recolhidas no mercado de Huanan. Outro estudo, mostra que o SARS-CoV-2 é um vírus quimérico entre um coronavírus de um morcego e um coronavírus de origem desconhecida, e por isso este coronavírus pode estar relacionado com uma origem zoonótica (3).

Segundo a OMS a nível mundial ocorrerem ,aproximadamente, 6,4 milhões de mortes e contabilizaram-se , aproximadamente, 559 milhões pessoas infetadas até ao dia 18 de julho de 2022 provocando assim grandes danos a toda a população, sendo que nos dias de hoje podemos considerar esta pandemia ligeiramente controlada.

Os sintomas mais comuns desta doença são a tosse, a fadiga, a febre, a falta de paladar e/ou cheiro e dificuldade em respirar, ainda que estes não sejam sintomas exclusivos desta doença. Os sintomas indicados podem ser agravados tendo em conta o historial do paciente, o seu estado de saúde, a sua idade, etc. Assim, pacientes que, incluídos nos grupos determinados de risco, por serem já diagnosticados com outras doenças, estão mais suscetíveis a sofrerem sintomas e sequelas mais agravadas. Contrariamente a estes, existem casos em que os pacientes se verificam como assintomáticos, não tendo qualquer tipo de sintomas podendo, no entanto, transmitir a doença de igual forma (4).

Os métodos de diagnóstico da COVID-19 são essenciais para a monitorização e controlo da propagação da doença. Atualmente, o diagnóstico pode ser realizado de diferentes formas recorrendo: a testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN), a testes rápidos de antígeno (TRAg), a autotestes e a testes sorológicos. (5) Para ambos os testes, a colheita da amostra consiste numa amostra clínica da infeção, recolhida através de um esfregaço no nariz e/ou garganta, com exceção dos testes sorológicos em que a análise é feita através da recolha amostras de sangue.

Os testes TAAN são baseados em PCR, trata-se de um teste molecular da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), que consiste na deteção do RNA viral na amostra. Este teste fornece um método sensível e específico para detetar o SARS-CoV-2. Os testes sorológicos baseiam-se na deteção de IgM e IgG em resposta à infeção viral, podem ser usados para aumentar a precisão e sensibilidade do teste molecular ou para avaliar perfis de anticorpos numa grande população.(4)

Os testes de deteção rápida, como os testes rápidos de antígeno, autotestes e os testes sorológicos são testes mais simples, mais rápidos e menos sensíveis.

Dado que a COVID-19 apresenta um alto nível de contágio, verificou-se como uma grande ameaça epidemiológica, sendo importante e urgente aplicar medidas eficientes para reduzir a propagação do vírus. Os governos e autoridades ativaram estados de emergência, com movimentos da população restritos e até confinamentos obrigatórios. Mundialmente, e de forma a reduzir os riscos causados por esta doença, foi aconselhada a toda a população, e em algumas situações tornar até obrigatória, a utilização de equipamentos de proteção individual, entre os quais se encontram as máscaras faciais.

Foram, também, desenvolvidas novas vacinas, numa corrida contra o tempo, desde o seu desenvolvimento até ao seu fabrico e distribuição. As vacinas surgiram com o propósito de minimizar os efeitos que este vírus tem no ser humano e prevenir eficazmente as formas mais graves esta doença. Dependendo de vários fatores como o fornecimento adequado, a acessibilidade, o preço, a disponibilidade de armazenamento em locais com refrigeração adequada para preservar a vacina, a receptividade e confiança da população na eficácia e segurança da vacina (6). Segundo a OMS, até ao dia 12 de julho de 2022 foram administradas, aproximadamente, 12 biliões e 130 milhões de vacinas.

A utilização de máscaras faciais mantém-se, mesmo na atual situação mais controlada, e é um equipamento de proteção individual que nos salvaguarda de um maior número de contágios

desde, praticamente, o início da pandemia. É sobre as máscaras de proteção facial e a sua utilização que o presente projeto se enquadra. Assim, procuramos reduzir o risco de contágio desta doença, aumentando a eficácia da proteção das máscaras, através do recurso a dois sensores: o primeiro que nos atenta relativamente à presença de humidade no tecido, o que provoca a redução da eficiência da máscara facial; e o segundo, que deteta a presença do vírus. Esta indicação direta é dada através de uma reação colorimétrica (mudança de cor), pela qual cada utilizador é informado da necessidade de substituição da máscara.

Esta máscara servirá para qualquer tipo de ambiente e para um público-alvo geral, procurando prevenir a disseminação da COVID-19, através da informação dada pelos sensores que evitam o uso excessivo da máscara, tornando-a mais eficaz; e da possível presença de um vírus, garantindo-nos uma maior segurança.

## 2.1. Vírus SARS-CoV-2

Os coronavírus são vírus com uma fita simples de RNA que afetam humanos a nível respiratório e gastrointestinal, mas também infetam uma grande variedade de animais. São assim chamados uma vez que a sua morfologia apresentar virões esféricos com um núcleo e projeções de superfície em forma de pétala que consiste numa proteína Spike (S). Esta proteína medeia a fixação do vírus e a fusão da membrana durante a infeção. Além destas proteínas, os genomas do coronavírus normalmente codificam mais três proteínas adicionais: a proteína da membrana (M), a proteína do envelope (E) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (2, 7).

Existem vários grupos principais dos coronavírus:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , em que os grupos  $\alpha$  e  $\beta$  derivam de mamíferos, nomeadamente de morcegos e os grupos  $\gamma$  e  $\delta$  derivam de porcos e pássaros. Entre estes subtipos de coronavírus, os  $\beta$  e  $\alpha$  coronavírus podem infetar humanos, sendo que os  $\beta$ -coronavírus podem causar doenças graves e até pode levar à morte, enquanto os  $\alpha$ -coronavírus causam infeções leves ou até assintomáticas (7). No grupo  $\alpha$  existem 6 membros, incluindo os patógenos humanos Cov-229E e CoV-HKU1. O grupo  $\beta$  inclui os patógenos humanos CoV OC43, SARS-CoV e MERS-CoV, é neste grupo que se inclui também o SARS-Cov-2 (2).

Neste sentido, o SARS-CoV-2 pertence ao género  $\beta$ -coronavírus caracterizado por ser de vírus de tipo coroa, envelopado, e de RNA (+ssRNA) de uma só fita. (9) É de salientar que o SARS-CoV-2 não foi o primeiro a aparecer no mundo. O coronavírus com síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) apareceu em 2003, e o coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente



(MERS-CoV) apareceu em 2012. Embora a taxa de letalidade seja menor na COVID-19, do que na de SARS e na MERS, a pandemia associada à COVID-19 foi muito mais grave, tomando outras proporções a todos os níveis (2). Com o evoluir da doença COVID-19, verificou-se o surgimento de diferentes variantes do SARS-CoV-2 em todo o mundo. Estas variantes foram classificadas em diferentes nomenclaturas: Variantes de Interesses (VOI) , Variantes de Preocupação (VOC) e Variantes sob monitoramento (VUM) (8).

As VOIs são variantes com alterações genéticas que são previstas ou conhecidas por afetarem as características do vírus, tais como transmissibilidade, gravidade da doença, escape imunológico, escape diagnóstico ou terapêutico; e são identificadas como causadoras de transmissão comunitária significativa ou múltiplos aglomerados de pessoas infectadas.

As VOCs têm na sua definição o conceito das VOIs e revelaram-se estar associadas a diferentes alterações com um grau de significância para a saúde pública, tais como: o aumento na transmissibilidade ou alteração prejudicial na epidemiologia da doença COVID-19, o aumento da virulência ou alteração na apresentação clínica da doença ou a diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou dos diagnósticos, vacinas e terapêuticas disponíveis. A 30 agosto de 2021, a OMS designou quatro VOCs (Alfa, Beta, Gama e Delta) (Tabela 1), que, com o passar do tempo, se disseminaram a inúmeros países. A 26 de novembro de 2021, foi designada pela OMS uma nova variante a Ómicron, sendo mais infecciosa que as variantes Beta e Delta. (9)

**Tabela 1-** Variantes de Preocupação (adaptado do site oficial da OMS, (8, 9)

Denominação (OMS)	Linhagem + mutações adicionais	Mutações de interesse	Detetados pela primeira vez		Número de países onde as variantes foram detetadas
			País	Mês-ano	
Alpha	B.1.1.7	N501Y, D614G, P681H	Reino Unido	Set-20	193
	B.1.1.7+E484K	E484K, N501Y, D614G, P681H	Reino Unido	Dez-20	
Beta	B.1.351	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	África de Sul	Set-20	141
Gamma	P.1	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	Brasil	Dez-20	91
Delta	B.1.617.2	L452R, T478K, D614G, P681R	Índia	Dez-20	170
Omicron	B.1.1.529	K856R, L2084I, A2710T, T3255I, P3395H e I3758V	África do Sul	Nov-20	34

As VUMs são variantes com alterações genéticas suspeitas de afetar as características do vírus que poderão de alguma forma representar um risco no futuro, no entanto, a evidência de impacto fenotípico ou epidemiológico não é clara, exigindo monitorização aprimorada e avaliação repetida até novas evidências. (8)

## 2.2. Biossensores Colimétricos

Os biossensores colorimétricos são utilizados para detetar a presença de um analito específico, neste caso o vírus SARS-CoV-2 e a humidade relativa, através da mudança de cor detetável a olho nu, conseguindo-se uma resposta rápida e clara ao utilizador (10).

### 2.2.1. Sensor para deteção dos níveis de humidade relativa

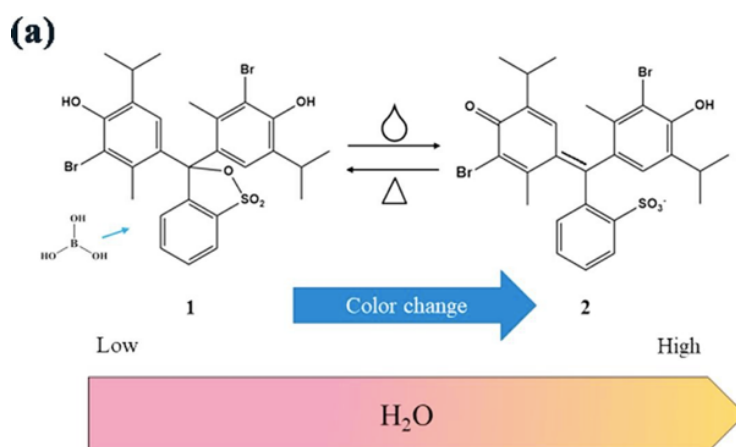
As máscaras faciais estão desenhadas para serem utilizadas durante 8 horas, no entanto, na prática é aconselhado um tempo máximo entre 4 a 6 horas. Para seguir uma boa utilização deve-se estar atento a vários fatores: evitar tocar na máscara aquando da sua utilização, pois esta pode estar contaminada, se tal acontecer higienizar imediatamente as mãos e substituir a máscara se esta estiver danificada ou húmida (11). É necessário ter em conta que até às 4 horas de utilização da máscara podemos atingir uma humidade relativa máxima de  $[85 \pm 5]$  %, segundo a norma portuguesa (12).

Um sensor de humidade relativa serve para monitorizar ambientes com humidade atmosférica e, neste caso, tem a funcionalidade de controlar o ambiente da máscara facial. Para o desenvolvimento de um sensor de humidade a ser integrado numa máscara facial de proteção, e de acordo com a pesquisa bibliográfica efetuada, existem algumas alternativas, nomeadamente argila (13) ou a sílica mesoporosa (14).

A argila é um *sepiolite* e pode ser utilizada como uma matriz para o controlo de humidade (13). A sílica mesoporosa, com diferentes poros: 2,5 nm, 3,0 nm, 3,5 nm, 7,0 nm e 10–20nm. O mesoporo com 7,0 nm apresenta-se como um material ideal para a indicação da humidade relativa devido ao fenómeno da condensação capilar, e pode ser uma alternativa à argila (14).

O autor Zhihao Wang, no desenvolvimento de sensores de humidade, teve em consideração a utilização do corante azul de bromotimol (BTB). Este corante é um indicador com comportamento ácido-básico e de adsorção. A cor deste é rosa-claro, quando possui menor quantidade de água; em solução aquosa com um ácido fraco o BTB exhibe a cor amarela. Assim, quando o BTB é

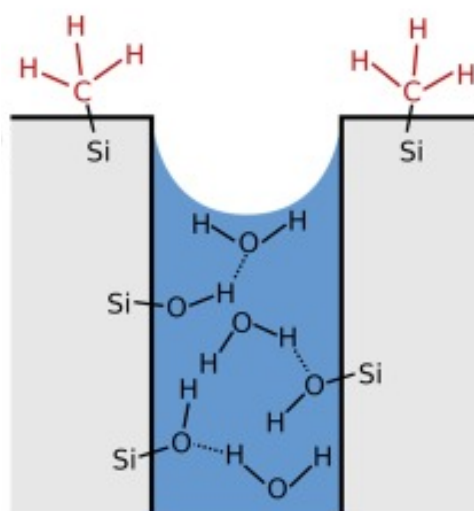
misturado com o ácido bórico, a cor e a estrutura do BTB são alteradas com a humidade relativa, como está descrito na Figura 1, e a mudança de cor registada é de amarelo para rosa, e vice-versa (15).



**Figura 1-** Mecanismo de mudança de cor do sensor para a humidade para o Azul de Bromotimol.

Fonte: Zhihao Wang, Yihe Zhang, Wenjiang Wang, Qi An, Wangshu Tong, High performance of colorimetric humidity sensors based on minerals, *Chemical Physics Letters*, Vol.727 (2019): 90-94, ISSN 0009-2614.

Outros autores, nas suas experiências com a sílica, referiram que o azul de metileno também é um corante eleito, uma vez que apresenta toxicidade em baixa concentração. A absorção de água nas superfícies seletivamente funcionalizadas da sílica mesoporosa com 7,0 nm ocorre principalmente pela ligação H com grupos Si-OH nos poros e pela condensação capilar que ocorreu após a etapa de adsorção. Devido aos grupos hidrofóbicos -CH<sub>3</sub> na superfície, a dissolução do corante é observada apenas na gama de humidade relativa elevada que provocou a condensação capilar nos poros hidrofílicos independentemente da superfície externa da partícula mesoporosa hidrofóbica (Figura 2)(14).



**Figura 2-** Dissolução do corante Azul Metileno com a amostra da sílica mesoporosa com 7,0 nm.

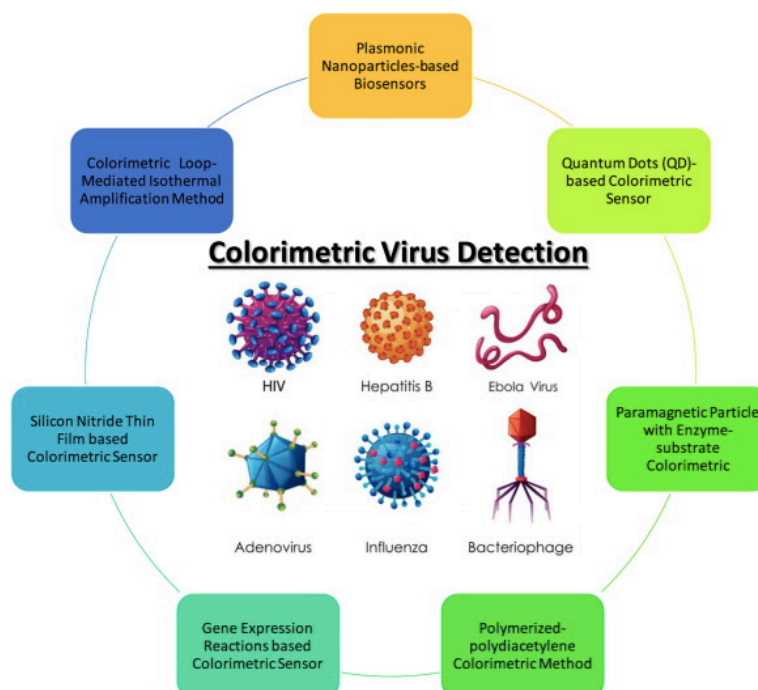
Fonte: Švara Fabjan E, Nadrah P, Ajdovec A, Tomšič M, Dražić G, Mazaj M, et al. Colorimetric cutoff indication of relative humidity based on selectively functionalized mesoporous silica. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020;316:128138.

Ambas as alternativas usam o mesmo princípio, uma vez que é utilizado um corante na mistura com o propósito de visualizar a mudança de cor nos diferentes níveis de humidade a serem testados. Face a estes fatores o desenvolvimento do sensor de humidade relativa é essencial, para garantir proteção e eficácia.

## 2.2.2. Biossensor para deteção do vírus SARS-CoV-2

O biossensor para deteção do vírus tem a capacidade de detetar a presença do mesmo de uma forma mais simples e eficaz, de modo a impedir a sua propagação. À medida que os vírus se transformam em variantes mais fortes, é de extrema necessidade que os investigadores desenvolvam sistemas de deteção mais sofisticados, mas ao mesmo tempo rápidos e de fácil utilização.

Para a realização destes biossensores podemos ter por base várias técnicas e procedimentos como a amplificação isotérmica medida por loop (LAMP), a utilização de nanopartículas, polidiacetileno polimerizado, reações de expressão génica, películas finas de nitreto de silício, pontos quânticos, partículas paramagnéticas com enzima-substrato, etc. (Figura 3)(10).



**Figura 3-** Técnicas possíveis para a deteção colorimétrica de vírus específicos.

Fonte: Victoria Xin Ting Zhao, Ten It Wong, Xin Ting Zheng, Yen Nee Tan, Xiaodong Zhou, Colorimetric biosensors for point-of-care virus detections, Materials Science for Energy Technologies, Volume 3, 2020, Pages 237-249, ISSN 2589-2991.

Várias investigações notaram que as nanopartículas podem ser usadas como sondas colorimétricas para desenvolver biossensores versáteis, tendo em consideração as propriedades óticas exclusivas das nanopartículas que podem causar mudanças de cor detetáveis diretamente a olho nu. O fundamento principal para que as nanopartículas mudem de cor é baseado na ressonância de plasmon de superfície, em que as nanopartículas absorvem e dispersam a radiação com grande eficiência quando interagem com a luz. Esta forte interação entre as nanopartículas e a luz ocorre porque o campo eletromagnético oscilante da luz inicia a oscilação coerente dos elétrons livres das nanopartículas (10).

As nanopartículas de ouro (NPsAu) foram já bastante estudadas ao longo dos anos e têm várias aplicações biomédicas, como por exemplo: NPsAu como agentes terapêuticos, NPsAu na administração de medicamentos, NPsAu na detecção (aplicações de biossensores), NPsAu como agentes microbianos, entre outras (16). As NPsAu proporcionam excelentes plataformas para o desenvolvimento de biossensores colorimétricos, uma vez que as suas propriedades químicas, óticas e eletrônicas são únicas: possuem uma grande facilidade de funcionalização, usufruem de uma síntese fácil e, podem exibir cores diferentes dependendo do seu tamanho, da sua forma e da sua agregação (17, 18).

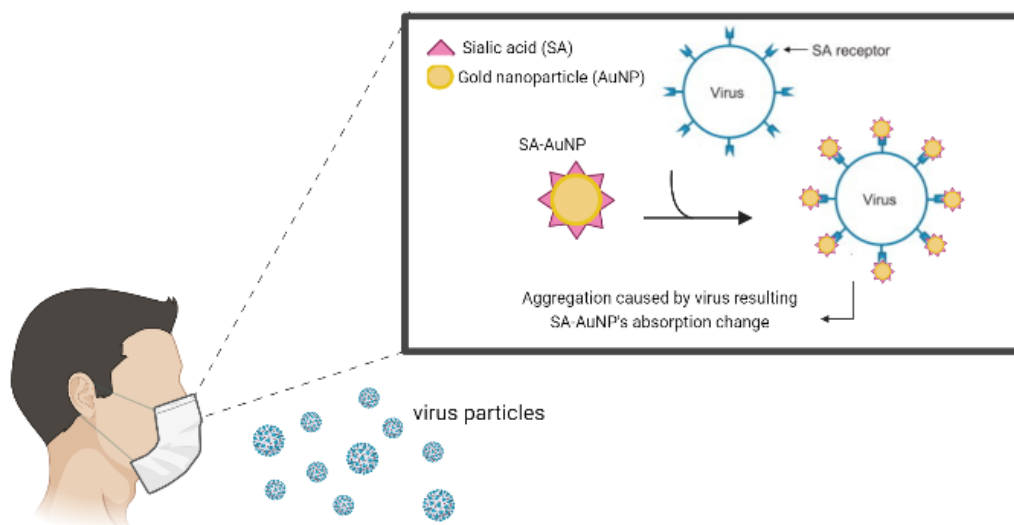
Hoffmann et al. fundaram que o SARS-CoV-2 utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para a entrada em células hospedeiras (19). É conhecida como uma peptidase expressa na superfície das células epiteliais do pulmão e outros tecidos. Esta enzima regula o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), e é produzida pelos vasos pulmonares controlando a pressão arterial. O vírus tem a capacidade de se ligar aos pneumócitos alveolares que expressam ACE2 na sua superfície e sabe-se que podem ser encontrados mRNAs de ACE2 em praticamente todos os órgãos, incluindo o coração, vasos sanguíneos, rins e testículos. Face a esta descoberta há uma grande possibilidade deste vírus infetar outros tecidos para além dos pulmões (20, 21) e, por isso, o reconhecimento do recetor é um fator importante uma vez que determina a variedade de hospedeiros e a infeção de vírus entre espécies (22).

Uma via alternativa à entrada do vírus em células humanas pela ACE2 é o ácido siálico que está presente na superfície das células epiteliais pulmonares e que, portanto, está envolvido na ligação primária do vírus. A hemaglutinina é uma proteína de superfície que está presente em várias espécies virais, tais como o vírus influenza. Com base na capacidade do ácido siálico de se ligar a certos vírus e nas semelhanças que o vírus influenza tem com o vírus SARS-CoV-2, é possível o desenvolvimento de um sensor colorimétrico para detetar o vírus SARS-CoV-2 utilizando NPsAu

funcionalizadas. Este método de deteção é rápido e fácil de usar e baseia-se na ligação entre a proteína do envelope, a hemaglutinina e o ácido siálico, podendo assim detetar a presença do SARS-CoV-2, e por sua vez reduzir a propagação da infeção (23).

Face aos sintomas mencionados acima e à metodologia de diagnóstico utilizada podemos afirmar que o vírus SARS-CoV-2 é semelhante ao vírus influenza e, por isso este biossensor colorimétrico deteta o SARS-CoV-2, mas também pode detetar outro tipo de vírus, o que é uma grande vantagem pois transmite-nos a informação de um ambiente seguro ou de um ambiente contaminado (23).

O biossensor desenvolvido para o vírus SARS-CoV-2 baseia-se na incorporação de NPs Au funcionalizadas com uma enzima, ACE2 ou uma biomolécula que reconhece o vírus, ácido siálico (Figura 4) (24). Posteriormente este biossensor será impregnado numa superfície têxtil e incorporado na máscara.



**Figura 4**– Esquema representativa das NPs Au-AS incorporado nas máscaras.

Baseado em: Lee C, Gaston MA, Weiss AA, Zhang P. Colorimetric viral detection based on sialic acid stabilized gold nanoparticles. Biosens Bioelectron. 2013 Apr 15;42:236-41. doi:10.1016/j.bios.2012.10.067. Epub 2012 Nov 6. PMID: 23208092; PMCID: PMC3964789

### 2.3. Impregnação Têxtil

A impregnação na máscara têxtil, inclui a testagem de diferentes amostras, com o intuito de perceber qual a que possui mais aderência e será mais favorável na incorporação, de acordo com a nossa amostra.

A impregnação do biossensor pode ser feita através de dois processos: esgotamento e contínuo. O processo de esgotamento consiste em colocar o substrato dentro da solução durante um determinado período de tempo de modo que a amostra impregnada se desloque para as fibras. O processo em contínuo necessita sempre de mais volume de banho, comparativamente com o anterior, para que haja uma boa uniformidade. Neste processo o substrato é colocado na solução por um determinado tempo e depois é espremida mecanicamente, a uma pressão pré-definida, por meio de um foulard de modo a “obrigar” que as nanopartículas adiram às fibras, não necessita de um volume de banho grande, tratando-se de uma vantagem. (25)

O substrato têxtil a ser incorporado na máscara foi escolhido com base na eficácia da impregnação, a qual depende da composição da malha. Esta eficácia foi avaliada através da empresa Clothius, Lda - RDD-textiles, efetuando testes químicos e físicos e, de acordo com os resultados obtidos, selecionou-se o substrato mais adequado para alcançar o objetivo pretendido.

A estrutura têxtil utilizada foi um jersey uma vez que não é uma estrutura muito fechada e que permite que as nanopartículas adiram às fibras e fixem. Como um dos objetivos deste trabalho passa por promover fibras mais sustentáveis e amigas do ambiente e por adotar processos que visem promover a sustentabilidade, foram escolhidas as seguintes amostras:

- Amostra 1: 50% Algodão Orgânico 50% Algodão reciclado
- Amostra 2: 100% Algodão Orgânico
- Amostra 3: 100% Algodão Better Cotton Initiative (BCI)

A escolha das composições anteriormente identificadas depreendeu-se pelo facto de apresentarem um contributo menos negativo para o meio ambiente, tratando-se, portanto, de opções de substratos têxteis para máscaras com composições mais sustentáveis.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Pré-Validação do projeto

Efetuuou-se uma pré-validação no início deste projeto para verificar o teor de humidade a que as máscaras faciais estão sujeitas aquando da sua utilização. Para isso, recorreu-se a uma máscara que foi colocada na face, bem como um medidor de humidade (Xiaomi – Mi Temperature and Humidity Monitor 2, model: LYWSD03MMC) e registou-se a humidade medida (indicada na Tabela 2), tratando-se de um ajuste para que depois pudessemos colocar o sensor de acordo com o teor de humidade medida.

**Tabela 2-** Medições da humidade presente na máscara, durante 15 minutos.

Tempo (min)	Humidade (%)	Temperatura (°C)
Inicial (0 min)	72%	25,3°C
5 min	99%	31,2°C
10 min	99%	31,5°C
15 min	99%	31,8°C

Após os 15 minutos o medidor apresentava 99% de humidade, e por isso decidiu-se utilizar a *guideline* inicial de  $[85\pm 5]$  % de humidade relativa (12).

#### 3.2. Sensor para deteção dos níveis de humidade - com o Sepiolite (argila)

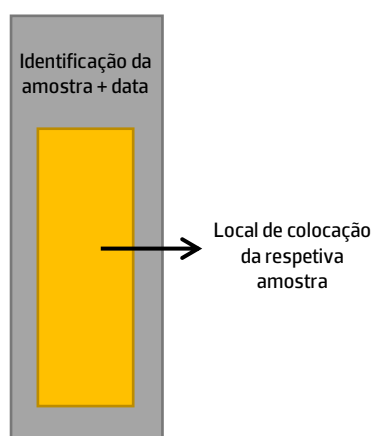
Para o desenvolvimento do sensor baseado em argila seguiu-se a metodologia desenvolvida por Zhihao Wang (13) e utilizaram-se os seguintes reagentes: Sepiolite – argila (Sigma Aldrich); Azul de Bromotimol (Sigma Aldrich); Etanol Absoluto (Honeywell), ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) (Merck); Azul de metileno (Carlo Erba Reagents). Utilizou-se diferentes sais nas diferentes experiências: Cloreto de sódio (NaCl), Cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), Hidróxido de Potássio (KOH), Cloreto de Potássio (KCl), Cloreto de Bário ( $BaCl_2$ ) e Nitrato de Magnésio ( $Mg(NO_3)_2$ ), adquirido à empresa Merck.



### 3.2.1. Preparação e montagem da amostra

Com o intuito de obtermos a amostra pretendida, preparou-se uma mistura de água destilada com etanol (17 mL e 7 mL, respetivamente). De seguida adicionaram-se 0,010 g de BTB à mistura e esta foi agitada durante 15 minutos. A mistura obtida tinha uma cor amarela alaranjada. Posteriormente adicionou-se 1,0 g de  $H_3BO_3$  e 1,0 g de argila à mistura, e agitou-se durante 30 minutos. Antes de ser agitada, a solução tinha uma cor esverdeada. Após a agitação, a cor mudou lentamente para uma cor amarela-alaranjada. Após esta etapa, as amostras anteriormente preparadas, foram colocadas em lâminas, como está exemplificado no esquema da Figura 5, e secas durante 2 horas na estufa a 80°C.

Para efetuar a visualização de mudança de cor, simulando o sensor colorimétrico, utilizou-se uma lâmina adaptada de forma, a existir espaço para colocação da amostra a ser analisada.



**Figura 5-** Esquema da colocação da amostra, para visualização da mudança de cor.

Após a secagem na estufa, as amostras apresentavam uma cor rosa/púrpura. No entanto, depois de retiradas da estufa, quando expostas à temperatura ambiente a cor mudou de rosa para amarelo muito rapidamente, cerca de 5 a 10 minutos.

Utilizou-se um humidificador para regular e obter os níveis de humidade pretendida, num ambiente totalmente isolado. Pretende-se com isto, verificar a reação da amostra quando submetida a diferentes níveis de humidade.

### 3.2.2. Desenvolvimento do sensor de humidade baseado e argila

Durante o desenvolvimento do sensor para deteção dos níveis de humidade, efetuaram-se diversas abordagens.

Inicialmente utilizou-se um caixa, em que foi colocado um determinado sal para simular percentagens de humidade controladas. Testou-se diferentes sais: KOH, MgCl<sub>2</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KCl e BaCl<sub>2</sub>, a estes sais correspondem diferentes percentagens de humidade, 9%, 33%, 53%, 85%, e 90%, respetivamente (Tabela 3). Esta caixa foi fechada, após colocação da amostra observou-se a mudança de cor, e ainda, no interior foi colocado um medidor de humidade para se perceber a percentagem de humidade no interior da caixa.

**Tabela 3-** Diferentes Sais utilizados, com correspondência da humidade controlada.

Sal	Humidade Controlada (%)
KOH	9%
MgCl <sub>2</sub>	33%
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	53%
KCl	85%
BaCl <sub>2</sub>	90%

Após a tentativa com a utilização dos sais, decidiu-se alterar as quantidades dos reagentes da amostra preparada em 3.2.1., com o intuito de perceber se estas alterações interferiam com a retenção da cor. Estas amostras foram submetidas a um humidificador, que se encontrava numa zona selada, com uma humidade controlada através do medidor utilizado ao longo das experiências.

### 3.3. Sensor para deteção dos níveis de humidade baseado a Sílica

Para o desenvolvimento deste sensor, o protocolo seguido foi baseado no trabalho de Erika Švara Fabjan et al (14), dividindo-se em duas fases. Numa primeira fase, efetuou-se a síntese da sílica mesoporosa (indicado em 3.3.2.) e, numa segunda fase, efetuou-se a funcionalização da superfície externa da amostra (indicado em 3.3.3.).

### 3.3.1. Reagentes

Ácido Clorídrico (HCl)(Honeywell), Ortosilicato de tetraetilo (TEOS) (Sigma Aldrich); poly (ethylene glycol) –poly (propylene glycol) –poly (ethylene glycol) – copolímero (Sigma Aldrich); Tolueno (Chem-Lab); Água destilada; Metiltrimetoxisilano,97%, AcroSeal (Acros Organics); Etanol absoluto anidro (Carlo Erba Reagents); Azul de metileno (Carlo Erba Reagents). Todos estes reagentes foram utilizados para o desenvolvimento do sensor para deteção dos níveis de humidade para a utilização da Sílica.

### 3.3.2. Síntese da Sílica Mesoporosa

O mesoporo escolhido para ser sintetizado foi a sílica mesoporosa de 7,0 MS, pois é o único poro em que a mudança de cor da amostra ocorre aos 85% de humidade relativa. Este processo é designado por condensação capilar. (14) Para simular o ambiente de 85% de humidade recorreu-se a um humidificador colocado numa hotte, devidamente selada.

Nesta primeira etapa, utilizou-se 4g de copolímero dissolvido em 7 mL de HCl, durante 2 horas a uma temperatura de 35°C. De seguida adicionou-se, gota a gota, 9 mL de TEOS e colocou-se o preparado em agitação durante 20 horas a 35°C. Após este passo, colocou-se novamente em agitação por mais 48 horas a 80°C, de forma a obtermos o precipitado desejado. Por último, filtrou-se e lavou-se o precipitado com água destilada.

### 3.3.3. Funcionalização da Superfície externa da amostra 7,0 MS

Nesta segunda fase, colocou-se o preparado filtrado e lavado na estufa, durante 3 horas a 100°C, para que a água fosse removida na totalidade. De seguida pesou-se 1g da mistura, que foi colocada em frascos de shot de 100 mL. Adicionaram-se 30 mL de tolueno seco e colocaram-se os frascos num banho de ultrassons durante 15 minutos. Seguidamente, adicionou-se 1,43 mL de metiltrimetoxisilano, sob agitação. Esta mistura permaneceu em agitação *over night* para que ocorra o refluxo. A mistura foi filtrada e lavada com tolueno e foi seca à temperatura ambiente durante a noite. Colocou-se a amostra num gobelé, adicionou-se 7 mL de HCl e 10 mL EtOH, respetivamente, de forma que ocorresse a remoção do polímero. A amostra ficou em incubação durante a noite. As amostras foram secas à temperatura ambiente durante a noite e depois colocadas na estufa durante 3 horas a 100°C. Armazenou-se a 4°C, até à sua utilização. (14)

### **3.3.4. Incorporação do corante**

Adicionou-se 0,001g de azul de metileno às amostras, através de mistura física, utilizando um almofariz para que a amostra ficasse com a textura de um pó. Após a realização da incorporação, submeteu-se as amostras ao nível de humidade pretendido através do humidificador.

As percentagens de humidade testadas foram de 85%, como o pretendido.

## **3.4. Biossensor para deteção do Vírus SARS-CoV-2 através da ACE2**

No desenvolvimento do biossensor para deteção do vírus, tentou-se a funcionalização das NPsAu com a ACE2. Este protocolo foi dividido em duas fases, numa primeira fase efetuou-se a otimização do pH e preparação da enzima (indicado em 3.4.2) e numa segunda fase efetuou-se a incorporação das NPsAu com a enzima (indicado em 3.4.3).

### **3.4.1. Reagentes**

Usou-se Nanopartículas de Ouro (mais informações no Anexo 1) e a Enzima conversadora da angiotensina 2 - 100 MG (Lyophilized poder, Human Recombinant,  $\geq 1000000$  U/mg, expressed in HEK 293 cells), ambas adquiridas do Sigma Aldrich, 10% (w/v) NaCl. Usou-se, ainda, diferentes reagentes para acertar o pH desejado: tampão fosfato-salino (PBS) (0,5x e 1x), tampão fosfato de sódio, e Ácido Acético.

### **3.4.2. Otimização do pH e preparação da enzima**

Nesta fase, colocou-se 500 $\mu$ L da solução das NPsAu num eppendorf, e procedeu-se ao ajuste do pH isoelétrico basal da enzima (pH=5,36). Utilizou-se ácido acético e fosfato de sódio consoante aquilo que se necessitou. De seguida, preparou-se a enzima, esta estava liofilizada e para dar início à sua utilização hidratou-se utilizando PBS (0,5x e 1x). Adicionou-se 10 $\mu$ L da solução da enzima, e durante 10 minutos as amostras ficaram em incubação à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 500 $\mu$ L de NaCl e deixou-se novamente em incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente.

As amostras com o pH e quantidades de proteína abaixo do ideal agregar-se-ão mais rapidamente após a adição de NaCl, este fenómeno pode ter sido observado através de uma

mudança de cor da solução, de vermelho para roxo/azul. Portanto, se nenhuma mudança de cor ocorrerá, as amostras apresentam condições de conjugação ideais. (26)

### **3.4.3. Incorporação da NPsAu com a enzima**

Para efetuar incorporação das NPsAu com a ACE2 adicionou-se 11  $\mu$ L de enzima à amostra preparada anteriormente, e colocou-se na centrífuga a uma velocidade de 14,6 x 1000rpm durante 45 minutos. Por fim ressuspendeu-se o *pellet* em PBS. Após a preparação das amostras conforme indicado, procedeu-se à técnica de confirmação de funcionalização das NPsAu com a ACE2 (indicado em 3.6.1)

## **3.5. Biossensor para detecção do Vírus SARS-CoV-2 através do AS**

No desenvolvimento do biossensor para detecção do vírus, tentou-se a outra alternativa para a funcionalização das NPsAu, o AS. Este protocolo foi dividido em duas fases, numa primeira fase efetuou-se a preparação da solução stock do AS e numa segunda fase efetuou-se a incorporação das NPsAu com o AS (indicado em 3.5.2).

### **3.5.1. Reagentes**

Utilizou-se Nanopartículas de Ouro (mais informações no Anexo 1), que foram compradas à Sigma Aldrich; Ácido N-acetilneuramínico, 99%, uma forma predominante de ácido siálico (SA, CAS: 131-48-6, 100MG), que foi adquirido a Acros-Organics (Thermo Scientific) e preparou-se uma solução stock com 10 mL, e uma concentração de  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L; e água destilada.

### **3.5.2. Incorporação das NPsAu com o AS**

Na fase de incorporação das NPsAu com o AS, teve-se em conta as quantidades de cada reagente apresentado na Tabela 4 e seguiu-se a sua preparação. Após a preparação destas amostras, teve-se presente duas variáveis, que permitem verificar a influência da temperatura na cor das soluções das NPsAu e o seu posterior impacto na funcionalização:

- (1) agitar as amostras durante a 20 minutos a 7200 rpm, sem aquecimento (20°C);
- (2) agitar as amostras durante a 20 minutos a 7200 rpm com aquecimento (80°C).

Após a realização da agitação, procedeu-se à centrifugação da amostra durante 20 minutos a 6300 rpm, recolheu-se o *pellet* e armazenou-se em água desionizada, para posterior utilização.(27)

**Tabela 4**–Quantidade de reagentes utilizados na incorporação de NPsAu com a AS.

$V_{\text{NPsAu}}$ (0,1 mmol/L) ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{AS}}$ (1 mmol/L) ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ ( $\mu\text{L}$ )
200	5	95
	10	90
	20	80
	60	40
	40	60
	80	20
	100	0

Após a preparação das amostras conforme indicado, procedeu-se às técnicas de confirmação de funcionalização das NPsAu com o AS (indicado em 3.6).

### 3.6. Técnicas de confirmação de funcionalização das NPsAu com o AS/ACE2

#### 3.6.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi utilizada para perceber se as NPsAu estavam funcionalizadas, através da presença ou ausência de determinadas ligações químicas características. Esta técnica trata-se de um método não destrutivo e rápido comparativamente a outras técnicas, é uma técnica com maior sensibilidade e precisão. Esta analisa as vibrações moleculares, e os grupos funcionais podem ser associados a bandas de absorção de infravermelhos característicos, que correspondem a vibrações fundamentais desses grupos funcionais presentes (28). Os grupos funcionais da mistura de NPsAu-AS foram caracterizados através do FTIR numa célula ATR (23). Para realizar esta técnica foi necessário a liofilização da amostra para uma análise mais cuidada, e garantir que não tem a presença de excesso de água e/ou ruído.

A análise FTIR foi realizada no laboratório da FCUP|DQB - Lab&Services, precisamente no equipamento PerkinElmer, modelo Spectrum Two (módulo ATR). Foram realizadas quatro digitalizações por espectro num comprimento de onda entre 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . (29)

### 3.6.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento com um Detetor de Transmissão (STEM)

A análise STEM baseia-se na técnica TEM com um detetor de transmissão, é um microscópio eletrónico de varrimento de ultra alta resolução com emissão de campo, com um sistema integrado para microanálise de raios X (EDS – espectrómetro dispersivo de energia) e análise de padrões de difusão de retro difração de eletrões (EBSD – Electron Backscatter Diffraction), esta técnica foi utilizada para avaliar a morfologia da mistura de NPsAu-AS. (24)

O equipamento utilizado foi o NanoSEM – FEI Nova 200 (FEG/SEM); EDAX – Pegasus X4M (EDS/EBSD), este tem vários detetores e análise possível, a resolução de funcionamento na transmissão de análise STEM é de 0,8 nm a 30 kV, em relação à imagem obtida a resolução do processador é de até 3584 x 3094 pixels. (30) Esta análise foi efetuada pelas empresas parceiras – Clothius e RDD, textiles.

### 3.7. Impregnação Têxtil

Este processo foi desenvolvido pelas empresas intervenientes neste projeto – Clothius e RDD-Têxtil, em que se selecionou 3 amostras (todas em jersey) com composições e gramagens (g/m<sup>2</sup>) diferentes.

- Amostra 1 – 1 corte: 50% Algodão Orgânico 50% Algodão Reciclado
- Amostra 2 – 2 cortes: 100% Algodão Orgânico
- Amostra 3 – 3 cortes: 100% Algodão BCI

Inicialmente foi necessário realizar a preparação das amostras, e por isso, efetuou-se uma fervura alcalina em todas as amostras para retirar qualquer tipo de impureza, resinas, gorduras, acabamento que estas já tivessem ou outras substâncias que pudessem ainda existir no substrato têxtil e, que interferissem na boa uniformidade e impregnação das amostras.

Para que fosse possível perceber qual a taxa de expressão (TE) (%) ou *pick-up*, para cada tipo de amostra cortou-se um quadrado (10 x 10 cm) e procedeu-se à pesagem do material antes e após colocado na solução pretendida. Para impregnar o biossensor de reconhecimento do vírus, utilizaram-se as NPsAu funcionalizadas com o AS. Cortaram-se 7 amostras de cada: uma funcionou como branco (apenas fervura alcalina), 2 amostras foram impregnadas com a concentração de 70-30 NPsAu-AS e 2 amostras foram impregnadas com a concentração de 50-50 NPsAu-AS.

Calculou-se a taxa de expressão (TE) através da equação abaixo mencionada, utilizando uma pequena porção da solução preparada, e colocou-se no Foulard.

$$TE(\%) = \frac{\text{Massa do substrato molhado (g)} - \text{Massa do substrato seco (g)}}{\text{Massa do substrato seco}} \times 100$$

Após a impregnação, as amostras foram colocadas na estufa durante 3 min a 95°C e, posteriormente, efetuou-se análise FTIR a todas as amostras.

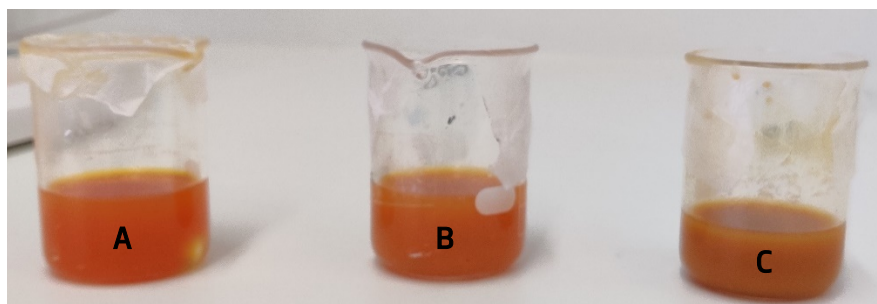
#### 4. Resultados e Discussão

Neste trabalho desenvolveu-se um biossensor com dois sensores para serem incorporados numa máscara têxtil: o sensor que deteta os níveis de humidade, em que se testou duas possibilidades, a argila e a sílica mesoporosa; e o biossensor para deteção do vírus SARS-CoV-2, que se testou duas possibilidades, a ACE2 e o ácido siálico.

##### 4.1. Sensor para deteção dos níveis de Humidade

###### 4.1.1. Sepiolite-Argila

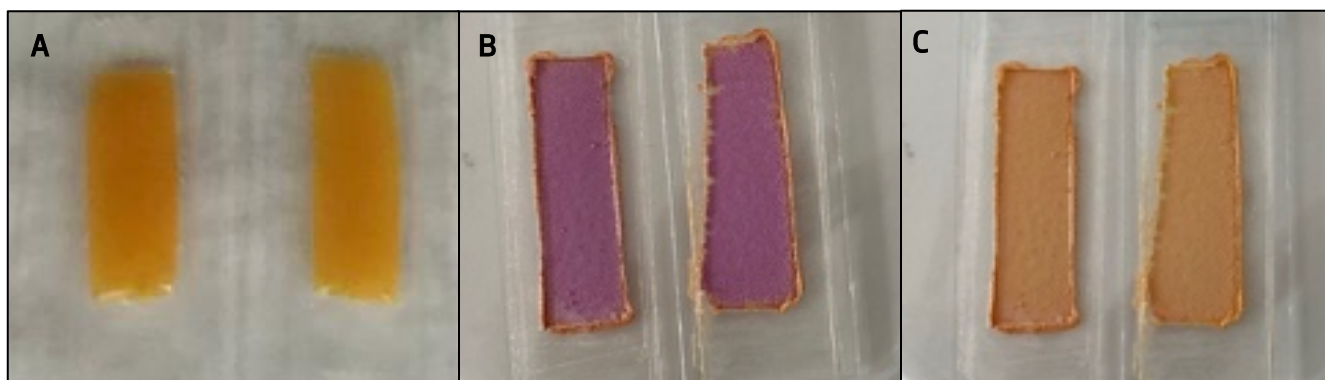
A utilização da argila para o desenvolvimento do sensor, teve por base a preparação de várias amostras indicadas na Figura 6, com as diferentes concentrações de argila: 0,3g (Figura 6A), 0,5g (Figura 6B) e 0,8g (Figura 6C).



**Figura 6**– Amostras preparadas para o desenvolvimento do sensor da humidade em que foi variado as quantidades de argila adicionadas: (A) mistura com 0,3g de argila; (B) mistura com 0,5g de argila; (C) mistura com 0,8g.



A alteração de cor conseguiu-se através da utilização do indicador BTB, que na sua forma aquosa permaneceu laranja (Figura 7A). Após secagem na estufa e remoção da água apresentou uma cor rosa (Figura 7B). Quando as amostras foram submetidas a diferentes níveis de humidade mudavam de cor para amarelo (Figura 7C).



**Figura 7**– Diferentes estados da mistura preparada: (A) Mistura após a sua preparação; (B) Mistura seca na estufa a 80°C durante 2 horas; (C) Mistura após ser submetida à humidade pretendida.

Após a preparação da amostra, de acordo com as tentativas mencionadas em 3.2.2. ao usar os diferentes sais acima identificados, conseguiu-se perceber que os sais não estavam a atingir a humidade tabelada, uma vez que as amostras mudavam de cor muito rapidamente, ou seja, não se conseguiu que as amostras apenas mudasse de cor aos 85% de humidade, pois tratava-se de uma mudança de cor imediata. Ainda assim, alterou-se as quantidades dos diversos reagentes: etanol, ácido bórico e indicador BTB, para perceber se havia alguma retenção da cor mas também não se conseguiu, pois obteve-se sempre a mudança imediata da cor.

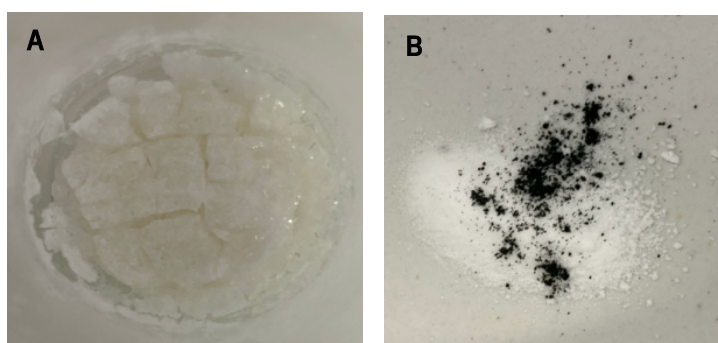
Uma vez que, a utilização dos diferentes sais não estava a ser bem sucedida, começou-se a utilizar o humidificador numa zona selada, como um controlo de humidade e conseguiu-se garantir que a humidade indicada era aquela que se desejava, seguiu-se novamente todas as tentativas anteriores, no entanto os resultados foram os mesmos.

Depois de várias tentativas, verificou-se que o indicador desenvolvido era muito sensível a percentagens de humidade baixas, alterando a cor rapidamente, mesmo em condições controladas.

#### 4.1.2. Mesoporo de Sílica

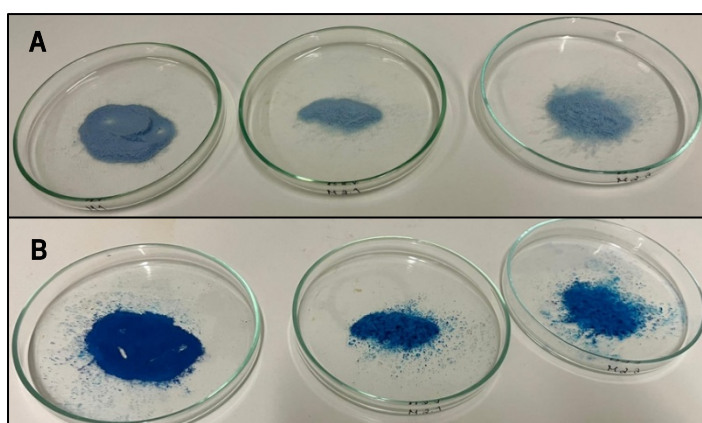
Em alternativa à argila, procedeu-se a uma nova tentativa com as partículas de sílica, este protocolo foi mais moroso nas suas etapas.

Na primeira fase, na síntese da sílica mesoporosa, o objetivo era a obtenção de um precipitado como indicado na Figura 8A. Na segunda fase, a sua funcionalização segue várias filtrações e tempos de agitação, em que obtém um pó. Por último, e como término de protocolo, procedeu-se à incorporação do corante Azul de Metileno na amostra com (Figura 8B) através de mistura física.



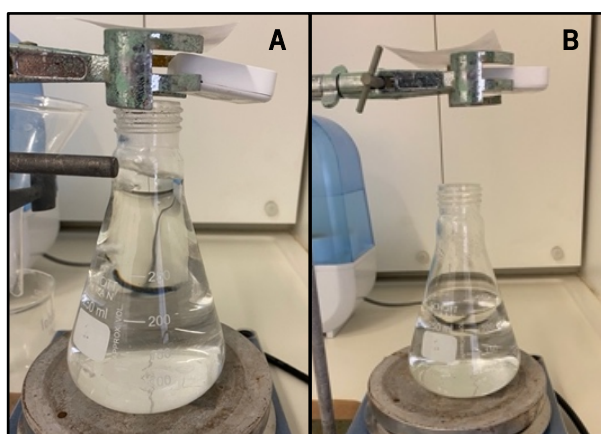
**Figura 8-** Mesoporo de Sílica (A) Precipitado obtido na Síntese da Sílica Mesoporosa; (B) Mistura da amostra com o indicador Azul de Metileno.

Depois da incorporação com o indicador, a amostra apresentou uma cor azul-clara (Figura 9A). De seguida, colocou-se o pó num ambiente controlado de 85% de humidade, através da utilização do humidificador. Conseguiu-se a visualização da mudança de cor para azul-escuro (Figura 9B).



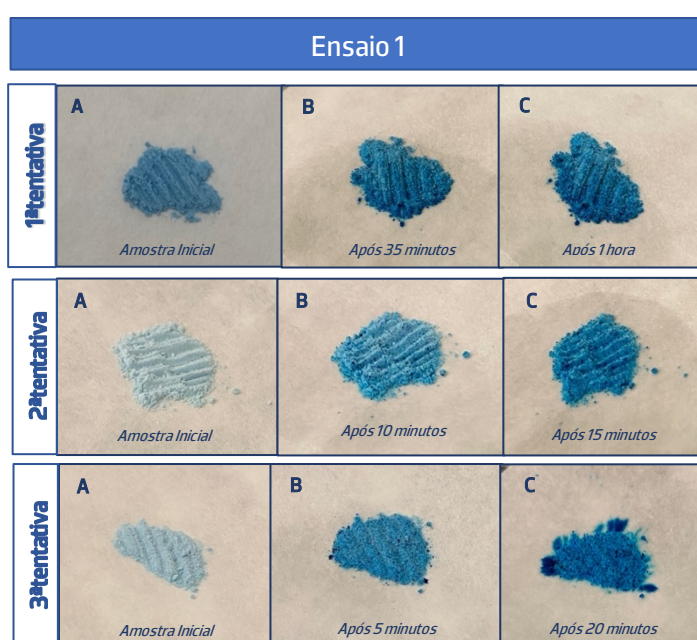
**Figura 9-** Incorporação com o Azul de Metileno: (A) após incorporação; (B) após colocação das amostras a 85% de humidade.

Após o resultado indicado na Figura 9, efetuaram-se inúmeras tentativas para perceber se as amostras mudavam de cor quando submetidas a 85% de humidade, mas os resultados não foram os mais promissores, uma vez que não conseguimos novamente essa mudança de cor. Por isso resolveu-se fazer outra abordagem, que consistiu na utilização de um matraz que continha apenas água. Este foi submetido à ebulição a uma temperatura de 200°C. Realizaram-se 2 ensaios: o Ensaio 1 seguiu o esquema indicado na Figura 10A e o Ensaio 2 seguiu o esquema indicado na Figura 10B, ambos os ensaios foram realizados em triplicado.



**Figura 10**– Esquema da colocação da amostra, com água em ebulição. (A) Ensaio 1: amostra a 2cm do matraz; (B) Ensaio 2: amostra a 5 cm do matraz.

No ensaio 1 representado na Figura 11, a amostra foi colocada a 2 cm do matraz com água em ebulição, de forma que esta fosse submetida ao ambiente criado.



**Figura 11**– Ensaio 1, com as 3 tentativas em diferentes tempos.

Em todas as tentativas do ensaio 1 foi observado a mudança de cor, na terceira tentativa notou-se uma mudança muito mais rápida em comparação com as restantes tentativas, provavelmente por a água já estar a ferver no momento da colocação da amostra.

No ensaio 2 representado na Figura 12, decidiu-se aumentar a altura de colocação da amostra para cerca de 5 cm, de forma a perceber se a amostra mudaria de cor com o vapor a uma altura superior.

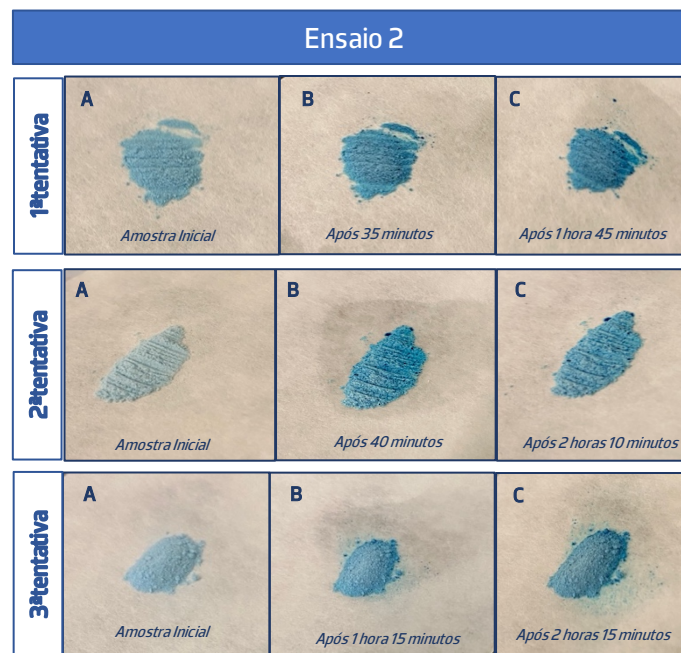


Figura 12- Ensaio 2, com as 3 tentativas em diferentes tempos.

Como a altura da amostra perante o matraz foi aumentada, verificou-se no ensaio 2 que a mudança de cor ocorre de forma gradual com o tempo e não é uma mudança imediata. Quando as amostras foram retiradas no final do ensaio, a amostra não estava totalmente azul-escura, no entanto o que era desejável seria a mudança de cor que ocorreu, de forma a dar-nos indicação no sensor, e de uma possível troca de máscara.

Relativamente à medição das percentagens de humidade, foi difícil, mas ao recriar os esquemas apresentados anteriormente, foi uma forma de simular um ambiente húmido tal e qual como acontece na utilização das máscaras.

## 4.2. Biossensor para deteção do vírus SARS-CoV-2

De forma a desenvolver um biossensor colorimétrico para o SARS-CoV-2, procurou-se funcionalizar as NPsAu através de duas alternativas possíveis – com o Ácido Siálico e com a Enzima ACE2, e posteriormente averiguou-se qual dos ligandos seria mais fiável e menos sensível a eventuais oscilações.

### 4.2.1. Enzima ACE2

Na utilização da enzima ACE2 surgiu algumas dificuldades no que toca ao desenvolvimento do protocolo por não haver suporte bibliográfico. No entanto, procedeu-se à preparação da amostra segundo a nossa pesquisa. Na primeira fase do procedimento na otimização do pH e preparação da enzima, inicialmente tínhamos uma mistura rosa (Figura 13A). Após a adição do NaCl obteve-se uma cor mais aroxeadada (Figura 13B), segundo fonte bibliográfica após a adição do NaCl a cor não devia mudar se estivéssemos em condições ideais de conjugação, apesar de se ter seguido todos os passos, ocorreu mudança de cor.

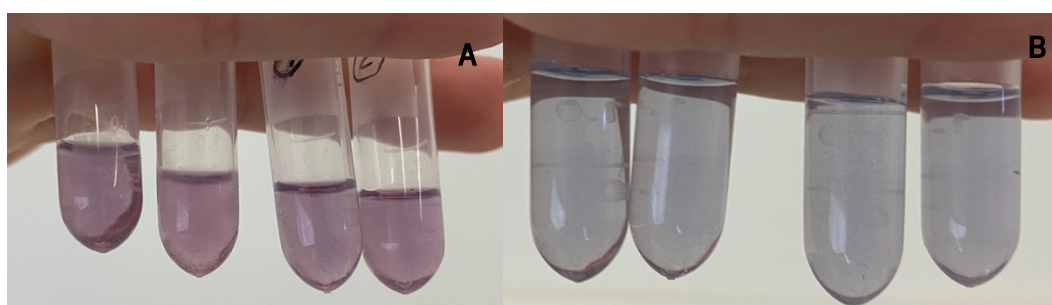
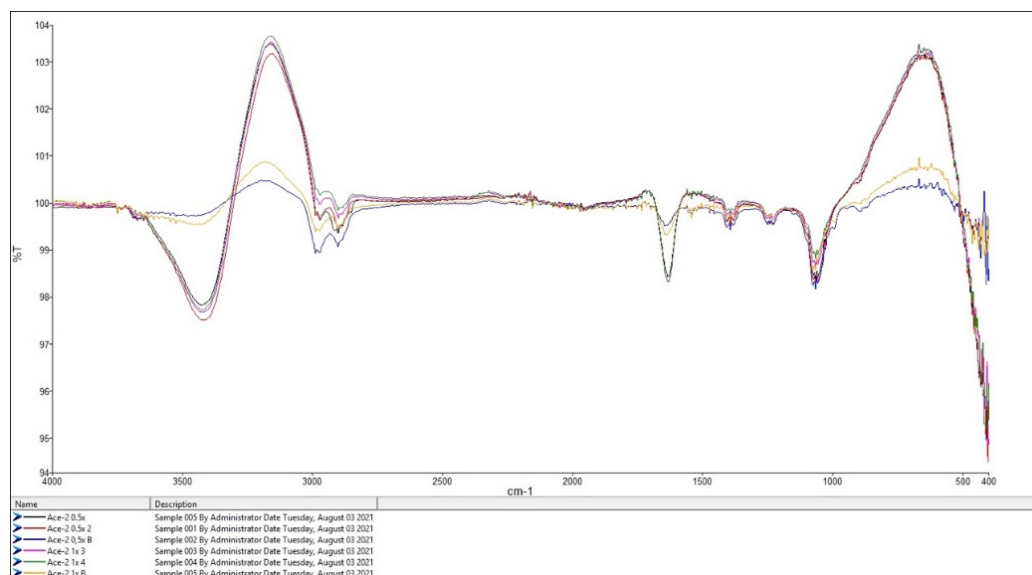


Figura 13- Solução de Nanopartículas (A) com a ACE2; (B) com a ACE2, após a adição de NaCl.

Na fase da incorporação das NPsAu com a enzima efetuou-se a centrifugação enunciada, no entanto não se conseguiu obter nenhum pellet e as amostras mantiveram-se da mesma cor, e também não se verificou nenhuma alteração nas diferentes concentrações preparadas (PBS 0,5x e 1x). Apesar destes resultados, decidiu-se analisar a amostra através do FTIR.

A análise FTIR (Figura 14), indicou que os valores de transmitância obtidas foram muito baixos, detetando na sua maioria ruído. Um dos motivos podia ter sido devido ao facto de as amostras estarem muito diluídas, pois apresentavam-se em solução. Desta forma a funcionalização das NPsAu com a ACE2 não aconteceu. Realizou-se uma análise FTIR a uma amostra de água (Anexo 2) e percebeu-se que esta tinha bastantes semelhanças ao gráfico da ACE2.

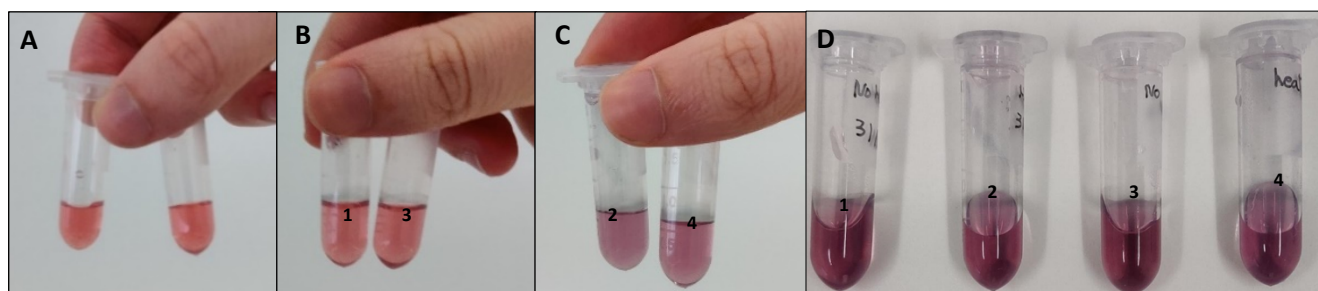
Além disso, a bibliografia comparativa existente para a proteína ACE2, nomeadamente análises FTIR, é ainda escassa.



**Figura 14-** Análise FTIR às diferentes amostras: ACE2 com as nanopartículas. (com a ACE2 a duas concentrações diferentes 0,5x e 1x)

#### 4.2.2. Ácido Siálico (AS)

Na utilização do ácido siálico, como primeiro passo efetuou-se a preparação de uma solução stock, e de seguida iniciou-se a incorporação das NPsAu-AS, tendo em conta as diferentes quantidades de reagentes indicadas na Tabela 4. Inicialmente efetuou-se o protocolo como referido em 3.5.2, com os passos de centrifugação e o aquecimento, em que a cor inicial das nanopartículas era vermelho (Figura 15A). Após a adição do AS com 20 minutos de agitação à temperatura ambiente a mistura continuou da mesma cor (Figura 15B) e na mistura de NPsAu com AS a uma agitação de 80°C durante 20 minutos a mistura mudou de cor para rosa (Figura 15C). Após 1 dia da sua preparação as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e mudaram de cor para rosa mais forte (Figura 15D).



**Figura 15-** Funcionalização das NPsAu com o AS: (A) Cor das NP sem tratamento com AS; (B) Cor das NP + AS sem aquecimento, agitadas por 20min à temperatura ambiente – Amostra 1 e 3; (C) Cor das NP + AS com aquecimento, agitadas por 20min a 80°C- Amostra 2 e 4; (D) Amostras 1,2,3 e 4 após 1 dia.

Após estes resultados, a mudança de cor ocorreu quer a amostra tenha sido aquecida ou não, isto poderá dar-nos indicações que ocorreu a funcionalização, relativamente à centrifugação não se conseguiu a obtenção do *pellet* mesmo em concentrações duplicadas.

No decorrer da experiência concluiu-se que não havia necessidade de preparar todas as concentrações indicadas na Tabela 4, e por isso escolheram-se algumas para prosseguir com o trabalho.

Para a **primeira análise FTIR** (Figura 16) escolheram-se as concentrações em solução de 10,40 e 80 de AS, e de acordo com o gráfico notou-se o mesmo identificado com a análise FTIR da enzima ACE2, o gráfico apenas apresenta ruído e algumas semelhanças ao gráfico da amostra da água (Anexo 2).

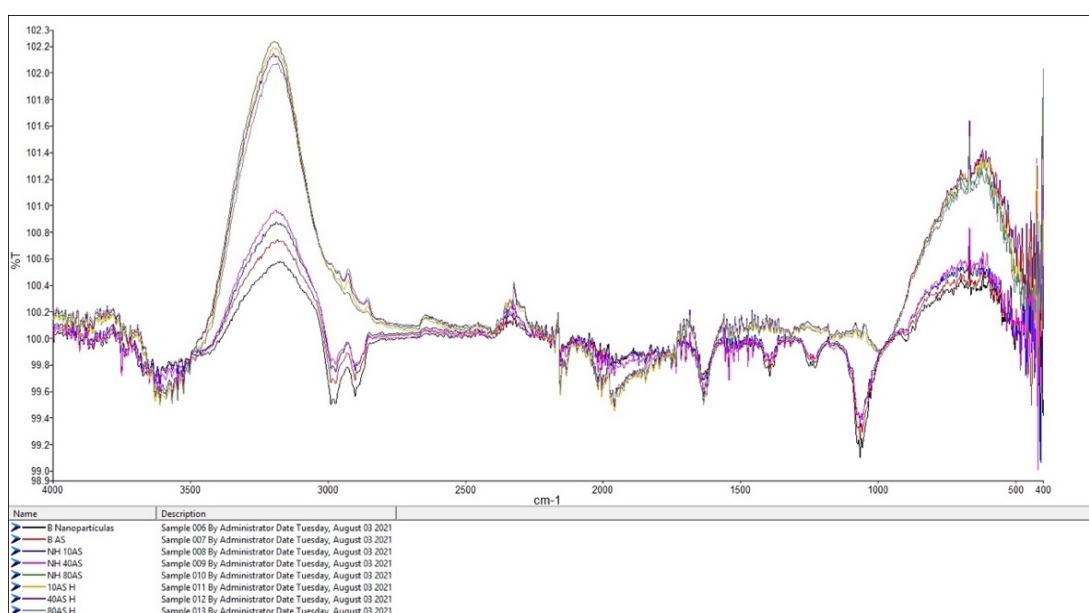
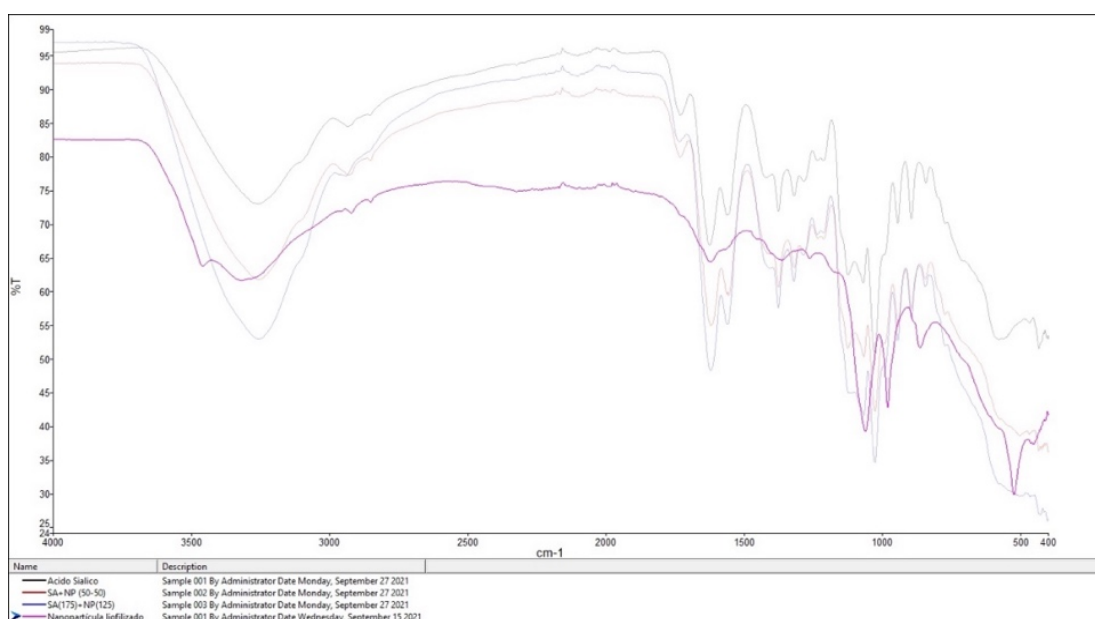


Figura 16- Análise FTIR às diversas amostras pretendidas: nanopartículas liofilizadas com ácido siálico.

Na **segunda análise FTIR**, seguiu-se uma preparação diferente das amostras, em que não se usou nem agitação nem centrifugação apenas houve a mistura das NPsAu com o AS, e ainda se procedeu à liofilização das amostras para que as amostras não se encontrassem tão diluídas. Neste sentido, as NPsAu foram funcionalizadas com o AS (NPsAu-AS), em três concentrações diferentes (50-50, 70-30 e 80-20, respetivamente) para selecionar a concentração ideal para deteção do vírus.

De acordo com os resultados, a Figura 17 mostra uma ligação bem estabelecida, por meio de combinações de picos de NPsAu-AS. As ligações entre os compostos foram mais evidentes na

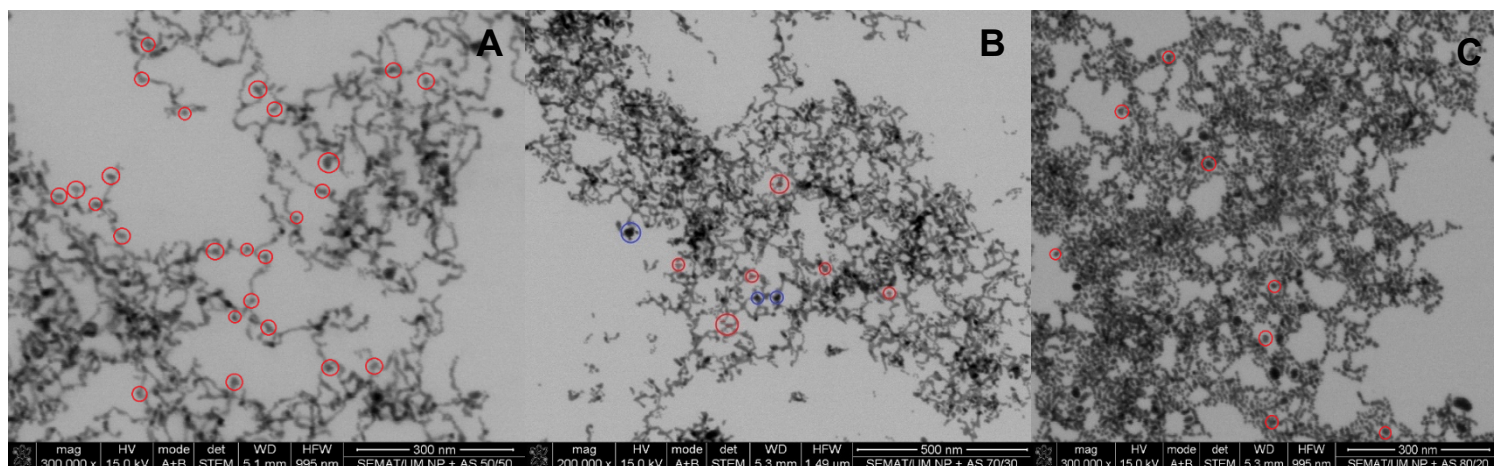
concentração de 50-50 de NPsAu-AS. E por isso, selecionaram-se as concentrações de 50-50 e 70-30 de NPsAu-AS como sendo a concentração ótima para as atividades seguintes. Através da análise FTIR das NPsAu-AS, foi possível observar pelo espectro de picos que são característicos da ligação entre as NPsAu e o AS, como por exemplo as ligações observadas no pico 1643  $\text{cm}^{-1}$  referente à amida I (ligação C=O), pico 1515  $\text{cm}^{-1}$  referente à amida II (ligação C-N e vibrações N-H), e pico 1260  $\text{cm}^{-1}$  referente à amida III (ligação C-N e N-H) (31).



**Figura 17**– Análise FTIR às diversas amostras pretendidas: nanopartículas liofilizadas (rosa), ácido siálico (preto), mistura de NP + AS 125/75 (azul-escuro) com diferentes concentrações.

A funcionalização foi, ainda, validada através de uma **análise STEM** (Figura 18), a título exemplificativo em cada concentração, tem-se na figura 5 pontos assinalados a vermelho que comprovam a ligação estabelecida entre o ácido siálico e as nanopartículas. Os pontos mais escuros assinalados a azuis correspondem a sobreposição de nanopartículas. Nas concentrações 70-30 NPsAu-AS e 80-20 NPsAu-AS, as imagens da análise STEM mostram alguma sobreposição das nanopartículas e ligação não tão evidente, sendo esta sobreposição aceitável para a concentração 70-30 NPsAu-AS.





**Figura 18-** Análise STEM: (A) Mistura NP+AS 50-50; (B) Mistura NP+AS 70-30; (C) Mistura NP+AS 80-20.

Por fim, as concentrações de NPsAu-AS escolhidas para se obter uma impregnação de sucesso, foram as 70-30 e 50-50 NPsAu-AS, sendo observado a funcionalização das NPsAu com o AS através do FTIR e do STEM.

### 4.3. Impregnação Têxtil

No âmbito deste projeto a impregnação das amostras nos tecidos foram realizadas nas empresas Clothius e RDD Textiles – **Research, Design and Development**, e obtiveram-se os resultados descritos de seguida.

As soluções de nanopartículas funcionalizadas com concentrações 70-30 e 50-50 de NPsAu-AS foram impregnadas (Têxtil Foulard) em substratos de composições diferentes. Para este fim, selecionaram-se 3 amostras com composições e gramagens diferentes: 50% algodão orgânico 50% algodão reciclado, 100% algodão orgânico e algodão BCI.

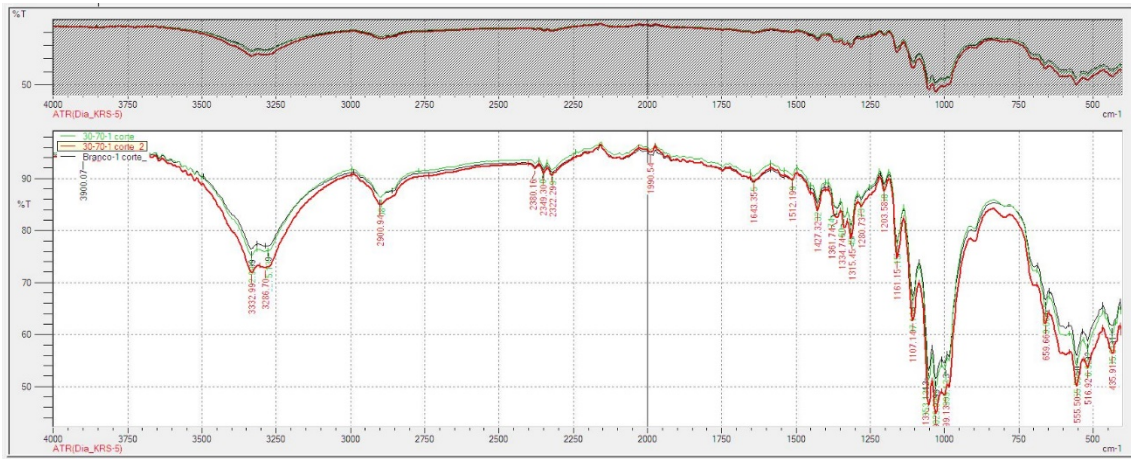


Figura 19- Amostra1: 70-30 NPsAu-AS (verde, vermelho) + Branco (50% algodão orgânico 50% algodão reciclado) (preto).

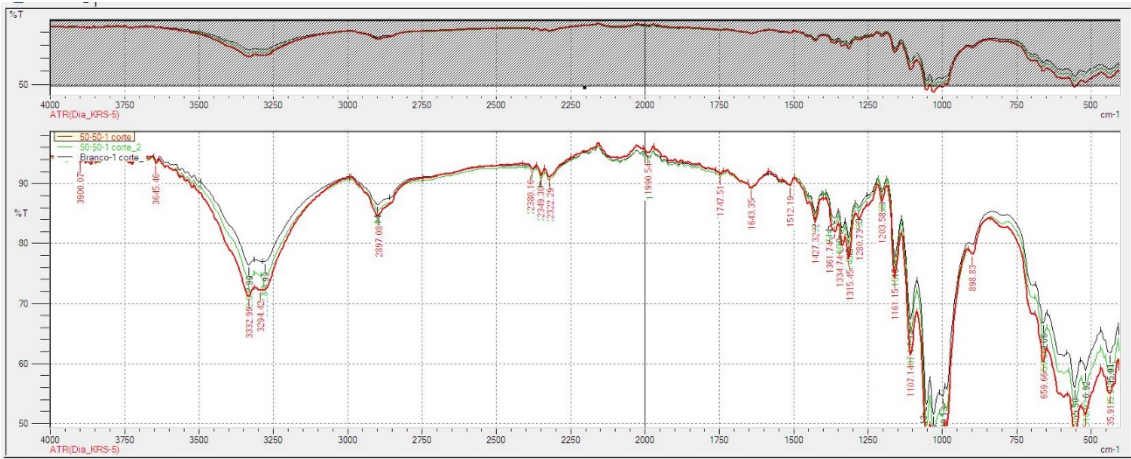


Figura 20- Amostra 1: 50-50 NPsAu-AS (vermelho, verde) + Branco (50% algodão orgânico 50% algodão reciclado) (preto).

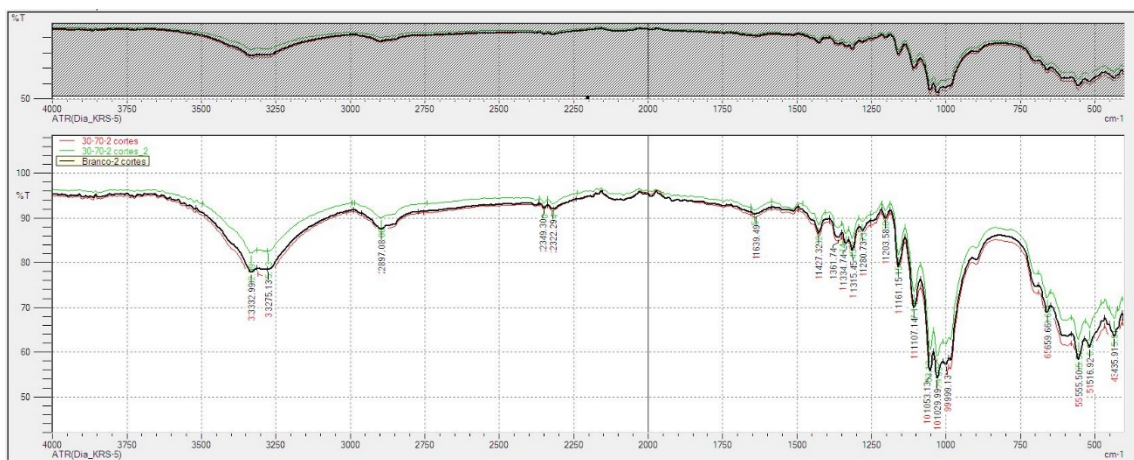
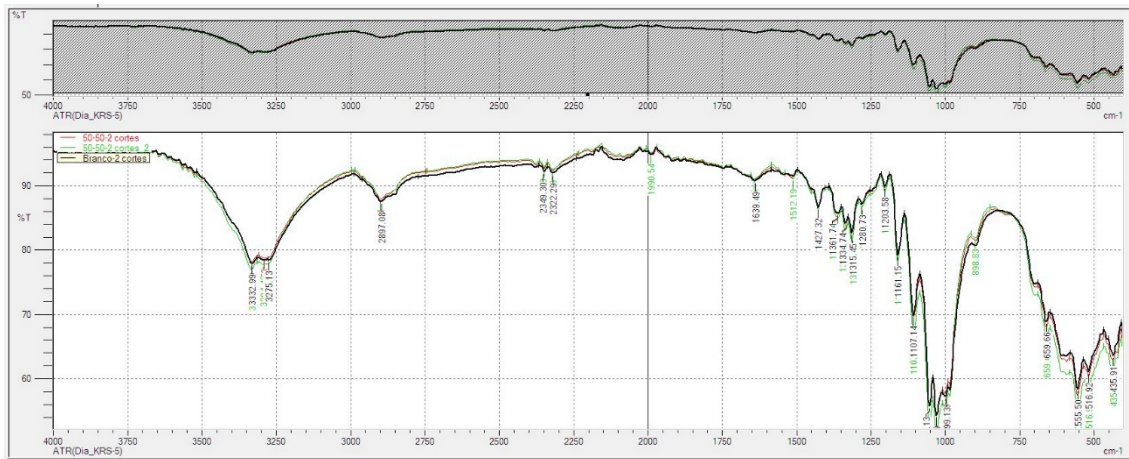
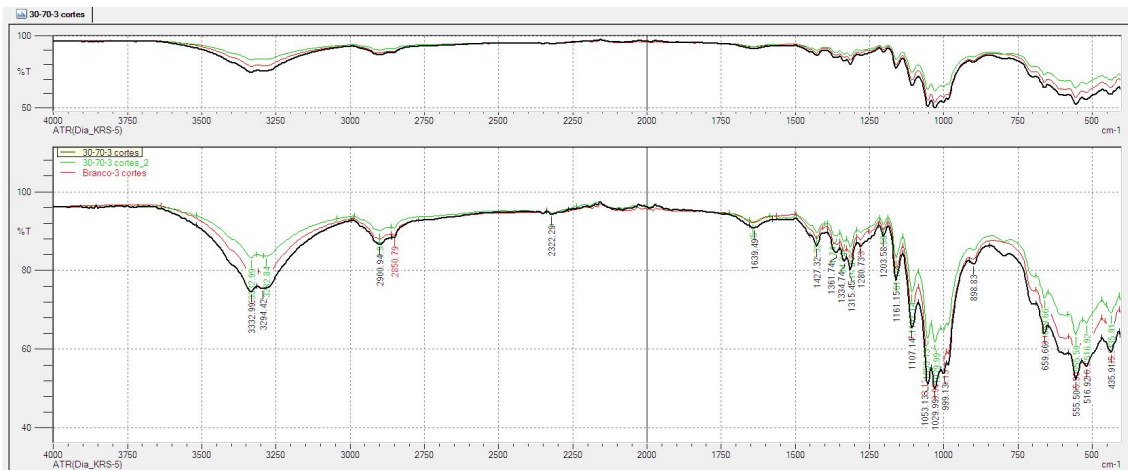


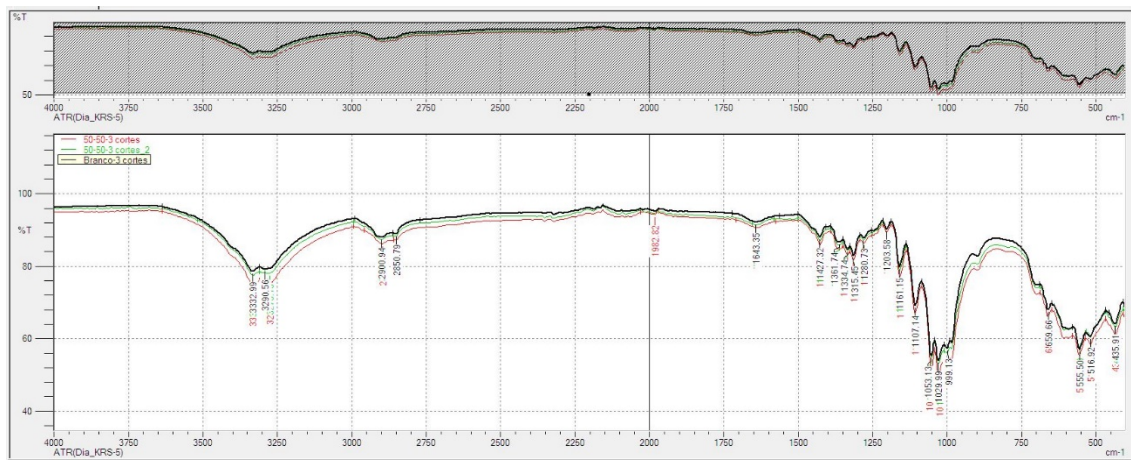
Figura 21- Amostra 2: 70-30 NPsAu-AS (vermelho, verde) + Branco (100% algodão orgânico) (preto).



**Figura 22-** Amostra 2: 50-50 NPsAu-AS (vermelho, verde) + Branco (100% algodão orgânico) (preto).



**Figura 23-** Amostra 3: 70-30 NPsAu -AS (preto, verde) + Branco (100% algodão BCI) (vermelho).



**Figura 24-** Amostra 3: 50-50 NPsAu-AS (vermelho, verde) + Branco (algodão BCI) (preto).

Relativamente ao cálculo da TE (indicado na Tabela 5), os resultados não foram muito favoráveis, uma vez que a empresa utilizou a TE de 70%, e neste caso obtiveram-se valores acima desta percentagem. Por isso, prosseguiu-se com os 70% até porque o Foulard existente na empresa está formatado para esta percentagem.

**Tabela 5-** Cálculo da TE para as diferentes amostras.

Amostra	Peso da amostra (g)		TE (%)
	Seca	Molhada	
1	0,304	0,521	71
2	0,407	0,728	78
3	0,415	0,739	78

Tendo em conta os resultados obtidos, observou-se que os picos ficam mais intensificados após a impregnação demonstrando assim que realmente houve ligação da mistura de NPsAu-AS com os diferentes tipos de algodão.

## 5. Conclusão

Os biossensores podem ser uma resposta para combater doenças infecciosas, neste contexto, quando colocados sobre máscaras faciais. Este projeto foi desenvolvido no contexto da pandemia COVID-19, com financiamento para desenvolver um biossensor com dois sensores: um indicador do nível da humidade presente nas máscaras e outro com um indicador para a presença do vírus. A utilização destes biossensores pode ter um grande impacto na propagação de certas doenças infecciosas, não aplicado apenas ao SARS-CoV-2, mas também a outros vírus respiratórios.

Para o desenvolvimento do sensor para deteção dos níveis de humidade, testaram-se duas abordagens: a argila e a sílica. Face aos nossos resultados, relativamente à argila, aquando da utilização dos diferentes sais, concluiu-se que não foi possível estabelecer a percentagem de humidade pretendida e, por isso, utilizou-se o humidificador de forma a garantir a percentagem de humidade de 85%, que corresponde ao valor indicado na norma portuguesa e pelos fabricantes como valor limite de eficácia das máscaras. Após várias tentativas, verificou-se que o indicador desenvolvido era muito sensível a percentagens de humidade baixas, alterando a cor rapidamente, mesmo em condições controladas.

Face a todos os ensaios realizados e aos resultados obtidos notou-se que a argila não foi a escolha ideal para o desenvolvimento do sensor de humidade, uma vez que é muito mais sensível e não permite uma verificação fiável do limite de utilização da máscara.

Relativamente à outra alternativa, a sílica, depois da incorporação do corante e da colocação da amostra num ambiente com 85% de humidade, conseguiu-se a mudança de cor de azul-claro para azul-escuro, no entanto após várias tentativas não se conseguiu novamente essa mudança de cor. E, por isso, tentou-se outra abordagem, de forma a simular um ambiente húmido parecido com o da máscara, utilizando um matraz com água a ferver submetido à amostra, neste caso conseguiu-se a mudança de cor demorando entre 2 a 3 horas, não obtivemos uma mudança imediata, pois o desejável é que seja uma mudança gradual no tempo, uma vez que o tempo recomendável de utilização das máscaras é de até 4 horas de utilização.

O sensor para detetar os níveis de humidade parece ser mais fiável através da tecnologia baseada na sílica, estando alinhado com o padrão português para máscaras faciais têxteis que indicam até 4 horas de utilização e  $[85 \pm 5]$  % de humidade relativa máxima, como níveis máximos esperados para a inutilização das máscaras.

Para o desenvolvimento do biossensor para deteção do vírus, testamos duas abordagens: proteína (ACE2) e ácido siálico (AS). De acordo com os nossos resultados, realizaram-se testes para confirmar a funcionalização das NPsAu às duas alternativas, através das análises FTIR e STEM.

Em relação à análise FTIR, as amostras com NPsAu-ACE2 deram-nos a indicação de que esta abordagem não era a melhor, uma vez que no gráfico apresentado não era evidente a ligação das NPsAu à ACE2, apenas o ruído era evidente, concluiu-se que se trata de uma proteína mais sensível e o facto de ter 7 dias de viabilidade após a hidratação pode interferir com o processo.

Tendo em conta as análises FTIR realizadas para as amostras de NPsAu-AS, as concentrações escolhidas para uma impregnação ótima foram 70-30 e 50-50 NPsAu-AS, uma vez que a funcionalização das NPsAu com o AS foi evidentemente observada. Foi ainda realizada a análise STEM, que confirmou a funcionalização das NPsAu com o AS.

É importante mencionar que para a ACE2 a liofilização de amostras não foi realizada, uma vez que este processo é demorado e ineficiente em termos de custo para certas proteínas, e por isso só foi realizada nas amostras com o AS. Sendo os resultados promissores evidentes, a análise STEM não foi considerada necessária para a ACE2, uma vez que demos continuidade ao processo utilizando o AS, uma abordagem mais barata e mais fácil de trabalhar.

Relativamente à impregnação têxtil, de acordo com os dados que nos foram fornecidos pelas empresas, na análise FTIR concluiu-se que os picos ficam mais intensificados após a impregnação demonstrando, por isso, que ocorreu a ligação da mistura NPsAu-AS com as diferentes amostras de algodão. A impregnação foi validada, recorrendo a resultados preliminares, no entanto a validação em utilizadores ainda não foi realizada por falta de tempo.

Este biossensor foi desenvolvido com sucesso, o sensor que deteta os níveis de humidade fornecerá informação sobre o estado da máscara, tendo em consideração a percentagem de humidade detetada, e ainda nos dará informação sobre quando devemos fazer a substituição da máscara. Relativamente ao biossensor para deteção do vírus, dará informação sobre a contaminação do SARS-CoV-2 e outros vírus que possam causar problemas respiratórios, dão-nos indicação de um ambiente seguro e sem contaminação momentânea.

O desenvolvimento destes sensores demonstrou ser uma forma sensível, rápida e simples de assegurar uma maior proteção individual contra vírus que atacam as vias respiratórias, e reduzir o seu contágio, e impedindo assim a sua propagação.

## 6. Referências Bibliográficas

1. Sreepadmanabh M, Sahu AK, Chande A. COVID-19: Advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development. *J Biosci.* 2020;45.
2. Shi Y, Wang G, Cai X-P, Deng J-W, Zheng L, Zhu H-H, et al. An overview of COVID-19. *Journal of Zhejiang University Science B.* 2020;21(5):343-60.
3. Sun P, Lu X, Xu C, Sun W, Pan B. Understanding of COVID-19 based on current evidence. *J Med Virol.* 2020;92(6):548-51.
4. Böger B, Fachi MM, Vilhena RO, Cobre AF, Tonin FS, Pontarolo R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am J Infect Control.* 2021;49(1):21-9.
5. Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(2):441-55.
6. Aslam S, Goldstein DR, Vos R, Gelman AE, Kittleson MM, Wolfe C, et al. COVID-19 vaccination in our transplant recipients: The time is now. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2021;40(3):169-71.
7. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Health.* 2020;25(3):278-80.
8. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei medical journal.* 2021;62(11):961-8.
9. He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm (2020).* 2021;2(4):838-45.
10. Zhao VXT, Wong TI, Zheng XT, Tan YN, Zhou X. Colorimetric biosensors for point-of-care virus detections. *Mater Sci Energy Technol.* 2020;3:237-49.
11. Peres D, Boléo-Tomé JP, Santos G. [Respiratory and Facial Protection: Current Perspectives in the Context of the COVID-19 Pandemic]. *Acta Med Port.* 2020;33(9):583-92.
12. Norma Portuguesa- Máscaras de uso clínico, Requisitos e métodos de ensaio, (2020).
13. Wang X, Lei Y, Chen Z, Lei W. Sepiolite-zeolite powder doped with capric acid phase change microcapsules for temperature-humidity control. *J Colloid Interface Sci.* 2021;595:25-34.
14. Švara Fabjan E, Nadrah P, Ajdovec A, Tomšič M, Dražić G, Mazaj M, et al. Colorimetric cutoff indication of relative humidity based on selectively functionalized mesoporous silica. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2020;316:128138.
15. Wang Z, Zhang Y, Wang W, An Q, Tong W. High performance of colorimetric humidity sensors based on minerals. *Chemical Physics Letters.* 2019;727:90-4.
16. Lee KX, Shameli K, Yew YP, Teow SY, Jahangirian H, Rafiee-Moghaddam R, et al. Recent Developments in the Facile Bio-Synthesis of Gold Nanoparticles (AuNPs) and Their Biomedical Applications. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:275-300.
17. Egorova EA, van Rijjt MMJ, Sommerdijk N, Gooris GS, Bouwstra JA, Boyle AL, et al. One Peptide for Them All: Gold Nanoparticles of Different Sizes Are Stabilized by a Common Peptide Amphiphile. *ACS Nano.* 2020;14(5):5874-86.
18. Aldewachi H, Chalati T, Woodrooffe MN, Bricklebank N, Sharrack B, Gardiner P. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale.* 2017;10(1):18-33.
19. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-80.e8.
20. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* 2020;367(6485):1444-8.

21. Devaux CA, Rolain JM, Raoult D. ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;53(3):425-35.
22. Qiu Y, Zhao YB, Wang Q, Li JY, Zhou ZJ, Liao CH, et al. Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2. *Microbes Infect.* 2020;22(4-5):221-5.
23. Lee C, Gaston MA, Weiss AA, Zhang P. Colorimetric viral detection based on sialic acid stabilized gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2013;42:236-41.
24. Alfassam HA, Nassar MS, Almusaynid MM, Khalifah BA, Alshahrani AS, Almughem FA, et al. Development of a Colorimetric Tool for SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses Detection Using Sialic Acid Fabricated Gold Nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2021;13(4):502.
25. Salem V. *Tingimento Têxtil: Fibras, Conceitos e Tecnologias.* 1ª ed 2010.
26. Thobhani S, Attree S, Boyd R, Kumarswami N, Noble J, Szymanski M, et al. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J Immunol Methods.* 2010;356(1-2):60-9.
27. Lee C, Wang P, Gaston MA, Weiss AA, Zhang P. Plasmonics-Based Detection of Virus Using Sialic Acid Functionalized Gold Nanoparticles. *Methods Mol Biol.* 2017;1571:109-16.
28. Berthomieu C, Hienerwadel R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res.* 2009;101(2-3):157-70.
29. FCUP | DQB - Lab & Services [DQB - Departamento de Química e Bioquímica]. Available from: <https://dqb.fc.up.pt/index.php/servicos/>.
30. NanoSEM - FEI Nova 200 (FEG/SEM); EDAX - Pegasus X4M (EDS/EBSD) [Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT/UM)]. Available from: [http://www.semat.lab.uminho.pt/Equipamento\\_1.htm](http://www.semat.lab.uminho.pt/Equipamento_1.htm).
31. Bronze-Uhle ES, Costa BC, Ximenes VF, Lisboa-Filho PN. Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid. *Nanotechnology, science and applications.* 2016;10:11-21.

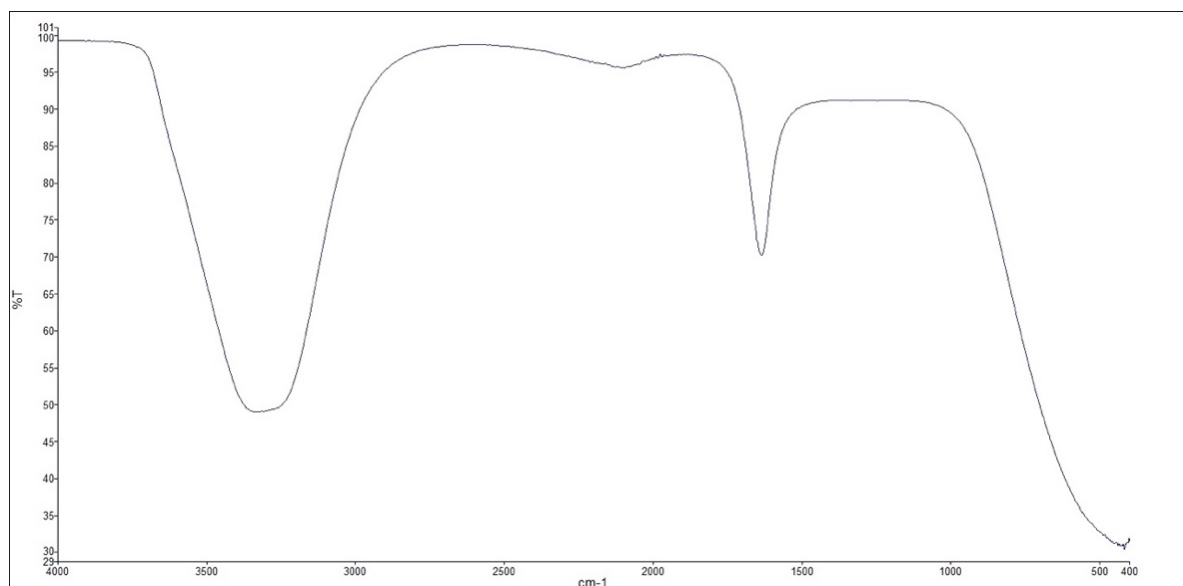


## 7. Anexos

### Anexo 1: Tabela com as características das NPsAu utilizadas.

Características das NPs Au	
Forma	Suspensão de nanopartículas em estabilizadas em solução 0,1 M de PBS
Concentração	$6.0 \times 10^{12}$ partículas/mL
Tamanho	10 nm
$\lambda_{\text{máx}}$	510-525 nm
Condições de Armazenamento	2 – 8°C
Cor	Vermelho

### Anexo 2: Figura com análise FTIR à amostra de água



## **Development of a sustainable biosensor to detect respiratory infections diseases**

**A. Nascimento<sup>1</sup>, C. Abreu<sup>1</sup>, M. Silva<sup>2</sup>, B. Leite<sup>2</sup>, S. Rouly<sup>4</sup>, R. Ferraz<sup>1,5</sup>, M. Costa<sup>2,3</sup>, C. Prudêncio<sup>1,7</sup>, E. Parente<sup>2</sup> and M. Vieira<sup>1,6,8</sup>**

<sup>1</sup>School of Health, Politechnic Institute of Porto, Rua António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal

<sup>2</sup>CLOTHIUS – Tecelagem, LDA, RDD Textiles, Rua do Arranjinho 381 Fração Q Pavilhão 17, 4750-803 Barcelos, Portugal

<sup>3</sup>Department of Textile Engineering, University of Minho, Campus de Azurém, 4800-058 Guimarães, Portugal

<sup>4</sup>Pharmaceutical and biological laboratory technology at Odisee, Gebroeders de Smetstraat 1, 9000, Ghent

<sup>5</sup>LAQV-REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre 687, P-4169-007 Porto, Portugal.

<sup>6</sup>Chemical and Biomolecular Sciences, Rua António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal

<sup>7</sup>i3S- Institute for Health Research and Innovation, University of Porto, Rua Alfredo Allen 208, P-4200-135 Porto, Portugal

<sup>8</sup>CISA- Center for Health and Environmental Research, Rua António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal

[mav@ess.ipp.pt](mailto:mav@ess.ipp.pt)

The Covid-19 pandemic brought the need to use social masks to prevent the spread of the virus. However, no reliable and fast method were yet established to detect viral particles and to improve the protective ability of social masks. The new SARS-CoV-2 has a second pathway of entry into the cells of the human body – the sialic acid (SA) receptor. Gold nanoparticles (AuNPs) are known to have excellent optical properties and huge research potential. Through color changes, colorimetric biosensors can be used as a rapid and easily approach to detect virus. Here, we develop a colorimetric biosensor based on the functionalization of AuNP by SA (SA-AuNPs), as a new and effective textile coating layer, to provide a direct indication of the protective capacity of social masks. This biosensor will provide information about the state of contamination by SARS-CoV-2 and other viruses that cause breathing problems. To do that, AuNPs (10 nm) were functionalized with SA (SA-AuNPs), in three different concentrations (50-50, 30-70 and 20-80, respectively) to select the optimal concentration for respiratory virus detection. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscope with a Transmission Detector (STEM) analyses confirmed SA-AuNPs binding. FTIR results showed a well-established bond, through matches of peaks of SA-AuNPs. Bindings between the compounds were more evident in 50-50 concentration of SA-AuNPs. In the 30-70 SA-AuNPs the STEM images show some superposition of the nanoparticles and not so evident binding, as in the 20-80 concentration. Still, between these last two concentrations, the 30-70 is the one that shows the

best results since it is visible some circular points larger than the others. In order to achieve the goal, the concentrations 30-70 and 50-50 of SA-AuNP were impregnated (Textile Foulard) in two substrates of different compositions, a cellulosic and a synthetic one. However, in this technique there are many parameters, such as drying time and temperature, which were varied in order to understand which was the best procedure to obtain the biosensor. The development of these smart mask demonstrated as a sensitive, rapid, and simple way to ensure a greater individual protection against viruses that attack the respiratory tract, and further reduce their contagion and preventing their spread.

#### References

- [1] Lee C, Gaston MA, Weiss AA, Zhang P. Colorimetric viral detection based on sialic acid stabilized gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2013;42:236–241.
- [2] Alfassam HA, Nassar MS, Almusaynid MM, et al. Development of a Colorimetric Tool for SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses Detection Using Sialic Acid Fabricated Gold Nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2021;13(4):502.

## Development of a sustainable biosensor to detect respiratory infections diseases

**Abbreviated abstract:** We develop a colorimetric biosensor based on the functionalization of AuNP by SA (SA-AuNP), as a new and effective textile coating layer, to provide a direct indication of the protective capacity of social masks. Three concentrations of SA-AuNP (50-50, 30-70 and 20-80) were tested to select the optimal concentration for respiratory virus detection. Two of these were impregnated (by textile Foulard) in different textile substrates compositions. FTIR and STEM results showed a well-established bonds in 50-50 and 30-70 concentrations of SA-AuNP. The development of these smart mask will be a sensitive, rapid, and simple way to ensure a greater individual protection against viruses that attack the respiratory tract, and further reduce their contagion and preventing their spread.

\*Gold Nanoparticles (AuNP), Sialic Acid (SA), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscope with a Transmission Detector (STEM).



## Development of a sustainable biosensor to detect respiratory infections diseases

*Ana Nascimento<sup>1</sup>, Cristina Abreu<sup>1</sup>, Mariana Silva<sup>2</sup>, Bárbara Leite<sup>2</sup>, Simon Rouly<sup>4</sup>, Ricardo Ferraz<sup>1,5</sup>, Miguel Costa<sup>2,3</sup>, Cristina Prudêncio<sup>1,6</sup>, Elsa Parente<sup>2</sup> and Mónica Vieira<sup>1,7</sup>*

<sup>1</sup> Chemical and Biomolecular Sciences, School of Health, Polytechnic Institute of Porto, Rua António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal

<sup>2</sup> CLOTHIUS – Tecelagem, LDA, RDD Textiles, Rua do Arranjinho 381 Fração Q Pavilhão 17, 4750-803 Barcelos, Portugal

<sup>3</sup> Department of Textile Engineering, University of Minho, Campus de Azurém, 4800-058 Guimarães, Portugal

<sup>4</sup> Pharmaceutical and biological laboratory technology at Odisee, Gebroeders de Smetstraat 1, 9000, Ghent

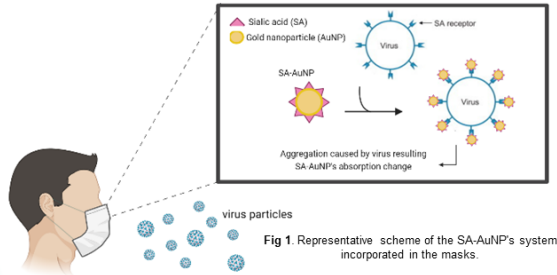
<sup>5</sup> LAQV-REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre 687, P-4169-007 Porto, Portugal.

<sup>6</sup> i3S - Institute for Health Research and Innovation, University of Porto, Rua Alfredo Allen 208, P-4200-135 Porto, Portugal

<sup>7</sup> CISA- Center for Health and Environmental Research, Rua António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal



## Background



- The Covid-19 pandemic brought the need to use social masks to prevent the spread of the virus.
- No reliable and fast method were yet established to detect viral particles and to improve the properly use of masks.
- The new Sars-Cov-2 has a second pathway of entry into the human body cells – SA receptor.
- AuNP have excellent optical properties and research potential.
- Through color changes, colorimetric biosensors can be used as a rapid and easily approach to detect virus.

## Experimental Design

### Preparation of AuNPs with SA solution

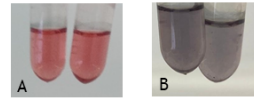


Fig 2. A) AuNPs solution; B) SA-AuNPs solution.

50-50 | 30-70 | 20-80 → selection of the optimal concentration for virus detection

Confirmation of SA-AuNP functionalization:

- FTIR analysis
- STEM analysis

Textile Foulard impregnation

## Results and conclusion

### FTIR:

Mixtures of SA-AuNPs and SA graph seems very similar to each other. However, AuNP peaks were not identified verifying the functionalization of AuNPs with SA.

### STEM:

Bindings between the compounds were more evident in 50-50 SA-AuNP concentration. 30-70 and 20-80 SA-AuNP showed some superposition of the NPs, however the first one showed more bindings.

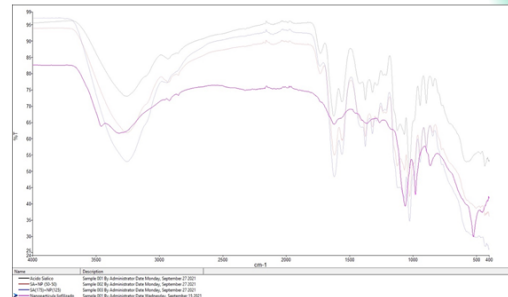


Fig.3 – FTIR analysis of specific samples: lyophilized nanoparticles, sialic acid, NP+AS mixture with different concentrations.

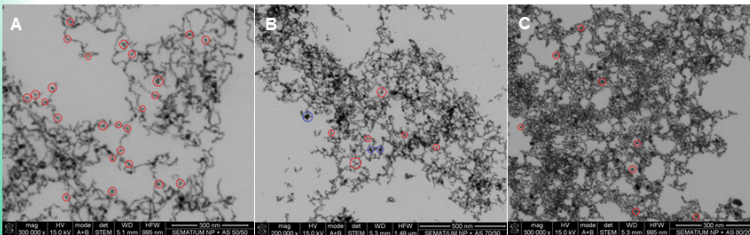





Fig.4 - STEM analysis: NP+AS 50/50 mixture (A), NP+AS 70/30 mixture (B), NP+AS 80/20 mixture (C).




30-70 and 50-50 concentrations of SA-AuNP will be impregnated (by textile Foulard) in two substrates of different compositions. This biosensor will provide information about the state of contamination by Sars-Cov-2 and other viruses that cause breathing problems.

Anexo 5: Poster submetido para o congresso IJUP22



ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

## Development of Biosensors for functional textile applications

Ana Nascimento<sup>1</sup>, Cristina Abreu<sup>1</sup>, Mariana Silva<sup>2</sup>, Bárbara Leite<sup>2</sup>, Simon Rouly<sup>4</sup>, Ricardo Ferraz<sup>1,5</sup>, Miguel Costa<sup>2,3</sup>, Cristina Prudêncio<sup>1,6,7</sup>, Elsa Parente<sup>2</sup> and Mónica Vieira<sup>1,6,7</sup>

<sup>1</sup>Chemical and Biomolecular Sciences, School of Health, A, Polytechnic Institute of Porto, Rua António Bernardino de Almeida 406, 4300-072 Porto, Portugal  
<sup>2</sup>CLOTHIUS – Tecelagem, Lda, R&D Textiles, Rua do Anaxástor 383 Fração Q Pavilhão 17, 4750-003 Barcelos, Portugal  
<sup>3</sup>Department of Textile Engineering, University of Minho, Campus de Azurém, 4800-058 Guimarães, Portugal  
<sup>4</sup>Pharmaceutical and biological laboratory technology at Odiseo, Gebroeders de Smetstraat 1, 9000, Ghent  
<sup>5</sup>IAAQ-REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre 687, P-4169-007 Porto, Portugal  
<sup>6</sup>IS- Institute for Health Research and Innovation, University of Porto, Rua Alfredo Allen 208, P-4200-325 Porto, Portugal  
<sup>7</sup>ISA- Center for Health and Environmental Research, Rua António Bernardino de Almeida 408, 4300-072 Porto, Portugal

### Introduction

SARS-CoV-2, the cause of the disease COVID-19, has a high level of contagiousness, verified as a major epidemiological threat, and it is important and urgent to develop efficient tools to reduce its spread <sup>1</sup>.

In order to reduce the spread of the virus, the entire population was advised to use personal protective equipment, among which are the face masks. The efficacy of masks depend on the time of use, amount of moisture and contact with infectious agents.

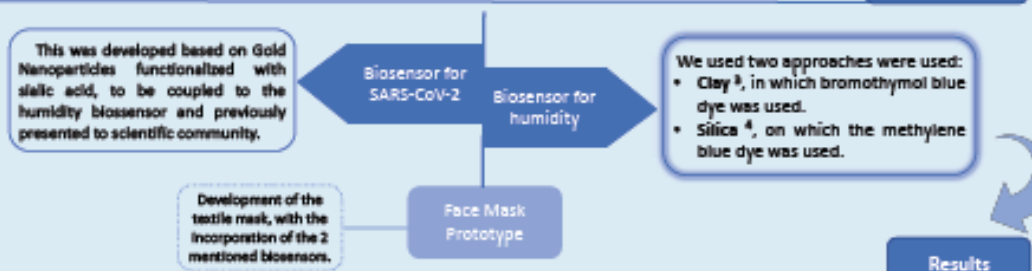
One way to monitor the quality and risk of use of masks is through biosensors <sup>2</sup>. In this study, we selected the colorimetric biosensors, which give us a direct indication through color change, by which each user is informed of the need for replacement of the mask.

### Aim

Development of a colorimetric biosensor, based on the detection of a specific analyte. This biosensor will be incorporated in a textile surface, with the capacity of direct indication of the protection effectiveness of the face masks, giving the user information about the filtration level of the equipment, with a humidity sensor; and of the contamination space, with a sensor to detect the presence of the virus.

This project was funded under the COVID-19 pandemic and promoted by the Polytechnic Institute of Porto, together with Clothius, Tecelagem, Lda, and co-financed by COMPETE 2020 under the R&D Enterprise and Infrastructure Testing and Optimization Incentive System (COVID-19), involved an amount of 169 thousand euros, resulting in a FEDER incentive of about 133 thousand euros.

### Methodology



The samples with Clay, after several trials, were found to indicator developed was very sensitive to low percentages of humidity, changing color rapidly, even under controlled conditions (Figure 1).




Figure 1- Samples with the Clay and bromothymol blue: A - before placing in the oven; B - After 2 hours in the oven; C- Sample exposed to different humidities.

In the samples with Silica, after incorporating the dye and then placing the sample in an 85% humidity environment by using a humidifier, a color change from light blue (Figure 2A) to dark blue (Figure 2B) was obtained.

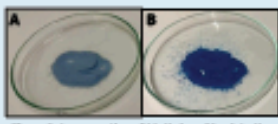


Figure 2- Incorporation of Methylene blue into the Silica mixture: A - after incorporation; B - after placing the samples at 85% humidity.

### Conclusion

The developed biosensor appears to be more reliable through silica-based technology and is aligned with the Portuguese standard for textile face masks <sup>3</sup> that indicate up to 4 hours of use and [83±3]% of maximum relative humidity, as maximum levels expected for the initialization of the masks.


**Acknowledgments**



This is due to COMPETE 2020 for financial support to the project SMART - SmartMask with colorimetric biosensor (POCI-01-020-FEDER-016261).

Ass. Residência Médica da Universidade Federal de Minas Gerais.

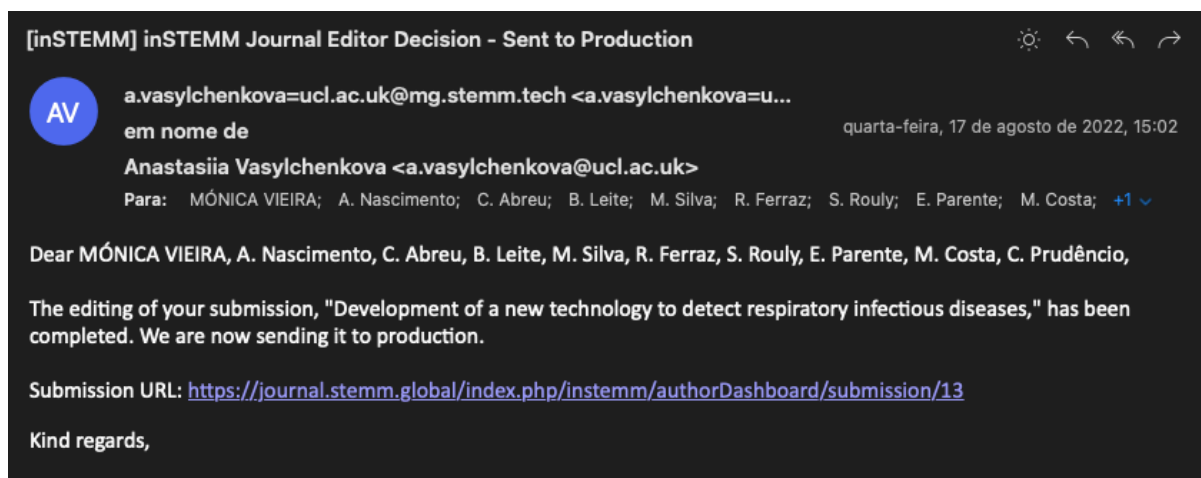
**References**

1. Irajpoor-Nasab M, Lake AC, Chanda A. COVID-19: Advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development. J Biol. 2020;95.
2. Shalloo H, Jolly P, Ponnuswamy M, Fátima P. Innovations in biosensors. Biosens Bioelectron. 2020;152:112538.
3. Wang X, Liu Y, Chen Z. Self-healing hydrogel powder doped with capric acid phase change microcapsules for temperature-humidity control. J Colloid Interface Sci. 2021;596:25-34.
4. Sana Faján L, Madah F, Abdou A, Younis M, Drahbi S, Masaj M, et al. Colorimetric color indication of relative humidity based on selectively functionalized mesoporous silica. Sensors and Actuators B: Chemical. 2020;309:128018.
5. Norma Portuguesa- Métodos de ensaio, Requisitos e métodos de ensaio. (2020).



## Anexo 6: Artigo submetido ao Jornal inSTEMM



Artigo aceite para publicação ao jornal inSTEMM conforme o e-mail recebido, não estando ainda disponível na plataforma para consulta.