

## ELETROQUÍMICA

## Um imunossensor multiplexado flexível para monitoramento de feridas in situ em pontos de atendimento

Yuji Gao<sup>1\*</sup>, Dat T. Nguyen<sup>2,3</sup>, Trifanny Ye<sup>4</sup>, Su Bin Lim<sup>4</sup>, Wei Xian Tans, Leigh Edward Madden<sup>6</sup>, Lin Jin<sup>4</sup>, Ji Yong Kenan Long<sup>3</sup>, Fazila Abu Bakar Alowenis, Yi Jia Angela Liews, Mandy Li Ling Tan<sup>6</sup>, Shin Yuh Ang<sup>5</sup>, Sivagame D / O Maniyas, Ibrahim Abdelwahab<sup>7</sup>, Kian Ping Loh<sup>7</sup>, Chia-Hung Chens, David Laurence Becker<sup>6,9</sup>, David Leavesley<sup>9</sup>, John S. Ho<sup>1,2,3</sup>, Chwee Teck Lim<sup>1,4,10\*</sup>

As feridas crônicas surgem da interrupção da cicatrização normal devido a muitos fatores fisiopatológicos potenciais. O monitoramento desses fatores multivariados pode fornecer informações diagnósticas personalizadas para o gerenciamento de feridas, mas as tecnologias de detecção atuais usam testes laboratoriais complexos ou rastreiam um número limitado de parâmetros de feridas. Nós relatamos uma plataforma de biossensor flexível para perfis multiplexados do microambiente da ferida, inflamação e estado de infecção no local de atendimento. Esta plataforma integra uma matriz de sensores para medir mediadores inflamatórios (fator de necrose tumoral -, interleucina-6 (IL-6), IL-8 e fator de crescimento transformador - 1), carga microbiana (*Staphylococcus aureus*), e parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) com um coletor de exsudato de ferida microfluidica e eletrônicos flexíveis para leitura de dados sem fio baseada em smartphone. Demonstramos monitoramento multiplexado in situ em um modelo de ferida de camundongo e também perfilamos exsudatos de feridas de pacientes com úlceras venosas na perna. Esta tecnologia pode facilitar o gerenciamento de feridas mais oportuno e personalizado para melhorar os resultados de cicatrização de feridas crônicas.

## INTRODUÇÃO

As feridas crônicas são doenças debilitantes que podem causar grande sofrimento aos pacientes afetados. Globalmente, eles representam uma carga social e financeira cada vez maior para os sistemas de saúde devido ao crescente envelhecimento da população (1, 2) Por exemplo, úlceras venosas requerem terapêutica de longo prazo para cicatrizar, com prevalência de até 15% de pessoas com mais de 70 anos e taxas de recorrência variando de 54 a 78% (3, 4) As feridas crônicas resultam da falha em se submeter ao processo natural de cicatrização devido a vários fatores ambientais e fisiológicos. Esses fatores são refletidos na composição do fluido de exsudado da ferida (5), que exibe uma mistura dinâmica de citocinas, fatores de crescimento e microorganismos durante a progressão da cicatrização de feridas.

A avaliação clínica de feridas atualmente depende da planimetria para pontuar qualitativamente recursos, como redução da camada, formação de tecido de granulação e reepitelização (6) No momento, o perfil quantitativo dos parâmetros bioquímicos é geralmente limitado a testes de laboratório a jusante, como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs) (2) Um dispositivo de tratamento de feridas não invasivo e de ponto de atendimento que é capaz de vigilância in situ dos biomarcadores da ferida pode fornecer uma análise oportuna para um diagnóstico e tratamento mais eficazes (7-9) Sensores flexíveis atuais projetados para tratamento de feridas são capazes

de monitorar um conjunto limitado de parâmetros, como pH (10, 11), temperatura (11), oxigênio (12), ácido úrico (13), e impedância (14) Além desses marcadores limitados, os indicadores de mediadores inflamatórios e biocarga também têm valor clínico substancial. Por exemplo, citocinas e fatores de crescimento são indicadores bem estabelecidos de inflamação durante a formação da úlcera (1) A composição microbiana da ferida também é uma característica essencial de feridas crônicas, tendo sido implicada na inibição da cicatrização por meio de inflamação sustentada, proteólise e disfunção endotelial (1, 2) Com base nesses indicadores, painéis de biomarcadores foram propostos para classificar o estado de cicatrização de feridas (15) Esses painéis que fornecem informações sobre o estado de cicatrização da ferida podem guiar melhor o manejo clínico da ferida em comparação com apenas a inspeção visual ou medição com um único marcador.

Aqui, relatamos uma plataforma de imunossensibilidade multifluídica multifluídica flexível para a avaliação quantitativa de ponto de atendimento de um painel de biomarcadores que pode permitir o perfilamento in situ do microambiente da ferida, inflamação e estado de infecção. Esta plataforma incorpora uma série de avanços em relação aos sensores de marcador único anteriores: (i) técnica de funcionalização de microgotas; (ii) layouts microfluidicos e materiais para detecção e coleta de fluidos; (iii) sequências de aptâmero previamente não identificadas; e (iv) integração com eletrônica flexível sem fio. Usando esta plataforma, demonstramos um dispositivo de tratamento de úlcera venosa, denominado VeCare, que faz interface diretamente com feridas na forma de um curativo bioanalítico e quantifica um amplo painel de biomarcadores de cura, incluindo mediadores inflamatórios, carga bacteriana e parâmetros físico-químicos (Fig. 1D) Os biomarcadores selecionados para o painel incluem fator de necrose tumoral - (TNF-), interleucina-6 (IL-6) e IL-8, que são elevados em fluidos de feridas obtidos de úlceras que não cicatrizam em comparação com úlceras em cicatrização (16-18) Para avaliar o estado de cicatrização dérmica em lesões cutâneas crônicas, o painel também inclui fator de crescimento transformador -- 1 (TGF-1), que desempenha um papel fundamental na regulação do fenótipo e função do fibroblasto dérmico e foi clinicamente observado em concentrações elevadas em exsudatos de úlceras venosas (19) O físico-químico

<sup>1</sup>Instituto de Inovação e Tecnologia em Saúde (iHealthtech), Universidade Nacional de Cingapura, Cingapura 117599, Cingapura. <sup>2</sup>Programa Integrativo de Ciências e Engenharia, Escola de Pós-Graduação NUS, Universidade Nacional de Cingapura, Cingapura 119077, Cingapura. <sup>3</sup>Departamento de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Nacional de Cingapura, Cingapura 117583, Cingapura. <sup>4</sup>Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Nacional de Cingapura, Cingapura 117583, Cingapura. <sup>5</sup>Enfermagem, Hospital Geral de Cingapura, Cingapura 168753, Cingapura. <sup>6</sup>Escola de Medicina Lee Kong Chian, Universidade Nacional de Nanyang, Cingapura 308232, Cingapura. <sup>7</sup>Departamento de Química, Universidade Nacional de Cingapura, Cingapura 117543, Cingapura. <sup>8</sup>Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade da Cidade de Hong Kong, 83 Tat Chee Avenue, Kowloon, Hong Kong, China. <sup>9</sup>Instituto de Pesquisa da Pele de Cingapura, Agência de Ciência, Tecnologia e Pesquisa (A \* STAR), Cingapura 138648, Cingapura. <sup>10</sup>Instituto de Mecanobiologia, Universidade Nacional de Cingapura, Cingapura 117411, Cingapura.

\* Autor correspondente. Email: yujigao2021@gmail.com (YG); ctim@nus.edu.sg (CTL)



**Fig. 1. Esquema de um sistema de imunossensor multiplexado para monitoramento de feridas crônicas. (UMA)** Ilustração de um curativo analítico com biomarcador aplicado em uma ferida aberta de pacientes com úlcera venosa para vigilância in situ da ferida. **(B)** Ilustração de um curativo analítico com biomarcador fino e macio que permite o funcionamento normal da pele, permitindo a entrada de oxigênio e a saída de vapor de umidade. Os dados de medição foram transmitidos sem fio para um sistema móvel emparelhado por Bluetooth Low Energy. **(C)** Curativo analítico com biomarcador previsto que constitui uma camada de contato com a ferida perfurada, um coletor de exsudato microfluídico da ferida, um imunossensor e uma barreira respirável. O coletor microfluídico foi inspirado na pele do lagarto com chifres do Texas, permitindo uma direção de fluxo predeterminada em direção ao focinho do lagarto, desafiando a gravidade. **(D)** Esquema do imunossensor para detecção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1, *S. aureus*, pH e temperatura. PANI, polianilina; MB, azul de metileno; RE, eletrodo de referência; CE, contra-eletródo. **(E)** Protótipo VeCare para monitoramento de feridas crônicas previstas. O protótipo foi aplicado a um manequim de perna como demonstração. A interface do imunossensor com um analisador portátil sem fio fabricado em um FPCB. É mostrado um aplicativo móvel que fornece uma GUI como perfis completos de pacientes, registros médicos, registro de dados, análise de dados e sistema de visualização de resultados. **(F)** Diagrama de blocos de hardware para a plataforma VeCare. WE1, eletrodo de trabalho 1; MUX, multiplexador.

marcadores em nosso painel incluem pH, temperatura e carga bacteriana (20, 21) O pH do exsudato da ferida é um indicador bioquímico importante do estado de cicatrização: feridas difíceis de curar geralmente apresentam pH alcalino, variando de 7,15 a 8,93 (22-24) A temperatura da ferida fornece informações sobre inflamação e infecção: feridas com temperatura elevada tendem a cicatrizar mais lentamente (7) *Staphylococcus aureus*, uma espécie predominante em todos os tipos de doenças crônicas

amostras de feridas, pode ser um biomarcador útil para a carga biológica em feridas (25)

Para facilitar o feedback clínico em tempo real, também projetamos um analisador sem fio portátil para fazer interface com o imunossensor, junto com um aplicativo que o acompanha contendo uma interface gráfica do usuário (GUI) para auxiliar no gerenciamento do perfil do paciente e registros médicos, facilitando a coleta de dados, análise e visualização.

O VeCare proposto foi projetado para ser facilmente usado por médicos para análise de fluido de ferida in situ e prognóstico, permitindo que decisões de gerenciamento clínico sejam fornecidas com sensibilidade de tempo, reduzindo atrasos de diagnóstico e consultas clínicas e proporcionando economia de custo substancial para todas as partes interessadas. Para demonstrar a capacidade de monitoramento de feridas in situ, colocamos a plataforma VeCare em contato direto com uma ferida excisional de espessura total em um modelo de camundongo, seguido por avaliação multibiomarcadora in situ sobre o processo de cicatrização da ferida. Demonstramos ainda a biocompatibilidade da plataforma, realizando avaliações comportamentais e histológicas. Como um exemplo de aplicação clínica potencial, o dispositivo VeCare foi aplicado para testar TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF-1, *S. aureus* pH em fluidos de feridas coletados de cinco pacientes com úlceras venosas ativas, uma vez por semana durante cinco semanas consecutivas.

## RESULTADOS

### Projeto da plataforma de imunossensibilidade multiplexada

A Figura 1A mostra um curativo analítico com biomarcador contendo um imunossensor aplicado em uma ferida aberta de pacientes com úlcera venosa para vigilância de feridas in situ. O curativo é composto por uma camada de contato com a ferida perfurada, um coletor de exsudato microfluídico da ferida, um imunossensor e uma barreira respirável (Fig. 1C). A função da camada de contato com a ferida perfurada é proteger o imunossensor do contato direto com o leito da ferida, minimizando a ruptura do tecido de granulação. A barreira permite o funcionamento normal da pele, permitindo a entrada de oxigênio e a saída de vapor de umidade (Fig. 1B). A transparência dos substratos do curativo permite a observação e avaliação conveniente da ferida in situ durante a aplicação: área de superfície e cor do exsudato. A Figura 1E apresenta um protótipo VeCare para monitoramento de úlcera venosa. Um analisador sem fio portátil foi fabricado e montado em uma placa de circuito impresso flexível (FPCB) para fazer a interface com o imunossensor (Materiais e Métodos). A Figura 1F ilustra o diagrama de blocos do circuito que descreve o projeto do hardware. O analisador eletroquímico portátil é projetado para gerenciar a transdução de sinal e realizar medições eletroquímicas. Os dados de medição são transmitidos sem fio para um dispositivo móvel emparelhado usando Bluetooth Low Energy (BLE). Desenvolvemos um aplicativo de acompanhamento contendo uma GUI para auxiliar no gerenciamento do perfil do paciente e do prontuário, facilitando a coleta, análise e visualização dos dados (Materiais e Métodos; fig. S13 e filmes S9 a 11). A Figura 1F ilustra o diagrama de blocos do circuito que descreve o projeto do hardware. O analisador eletroquímico portátil é projetado para gerenciar a transdução de sinal e realizar medições eletroquímicas. Os dados de medição são transmitidos sem fio para um dispositivo móvel emparelhado usando Bluetooth Low Energy (BLE). Desenvolvemos um aplicativo de acompanhamento contendo uma GUI para auxiliar no gerenciamento do perfil do paciente e do prontuário, facilitando a coleta, análise e visualização dos dados (Materiais e Métodos; fig. S13 e filmes S9 a 11).

### Projeto do coletor de exsudato de ferida microfluídica

A captura e distribuição eficientes do fluido da ferida são essenciais para a detecção precisa do biomarcador in situ. Para garantir a coleta eficiente do fluido da ferida, incorporamos uma camada microfluídica capaz de guiar os fluidos da ferida para a área de detecção. Nós pesquisamos uma variedade de estruturas naturais onde o sistema de transporte de líquido direcional passivo é formado por meio de gradiente de molhabilidade (por exemplo, parte de trás de besouros do deserto), gradiente de curvatura (por exemplo, bicos de pássaros limícolas, seda de aranha e espinhos de cactos) e estruturas assimétricas (por exemplo, pele de lagartos do deserto e peristome de plantas de jarro) (26) Notavelmente, fomos inspirados pela pele do lagarto com chifres do Texas (*Phrynosoma cornutum*) que permite o fluxo de fluido direcional predeterminado em direção ao focinho do lagarto que desafia a gravidade (Fig. 1C), para nosso projeto de referência de um coletor de exsudato de ferida microfluídica passiva biomimética. A transportabilidade direcional de líquido de *P. cornutum* pele de é atribuída a uma rede de microestruturas que formam um sistema capilar especial entre as escamas (27) Na base

de um modelo teórico derivado desta rede capilar, o coletor de exsudato de ferida microfluídica passiva foi projetado com um padrão anular (Fig. 2A). O padrão é composto de uma matriz polar de canais capilares em forma de dente de serra, semiabertos, interconectados, com largura decrescente de 200 a 160  $\mu\text{m}$  (externo para interno). A interconexão de canais capilares em forma de dente de serra adjacentes facilita o fluxo contínuo na direção direta (isto é, em direção à área de detecção), mas inibe o transporte de líquido na direção reversa. Especificamente, na direção direta, o líquido para no capilar i por causa do alargamento abrupto com raio do menisco infinito, enquanto flui continuamente para o capilar ii, onde se funde com o fluido interrompido no capilar i e flui para frente para o capilar iv. De forma similar, o líquido mesclado se aglutinará com o líquido interrompido no capilar iii e continuará fluindo para os capilares subsequentes. Por outro lado, o fluxo de líquido para nas seções de alargamento v e vi na direção reversa (Fig. 2B). Portanto, um sistema de transporte de líquido direcional é formado.

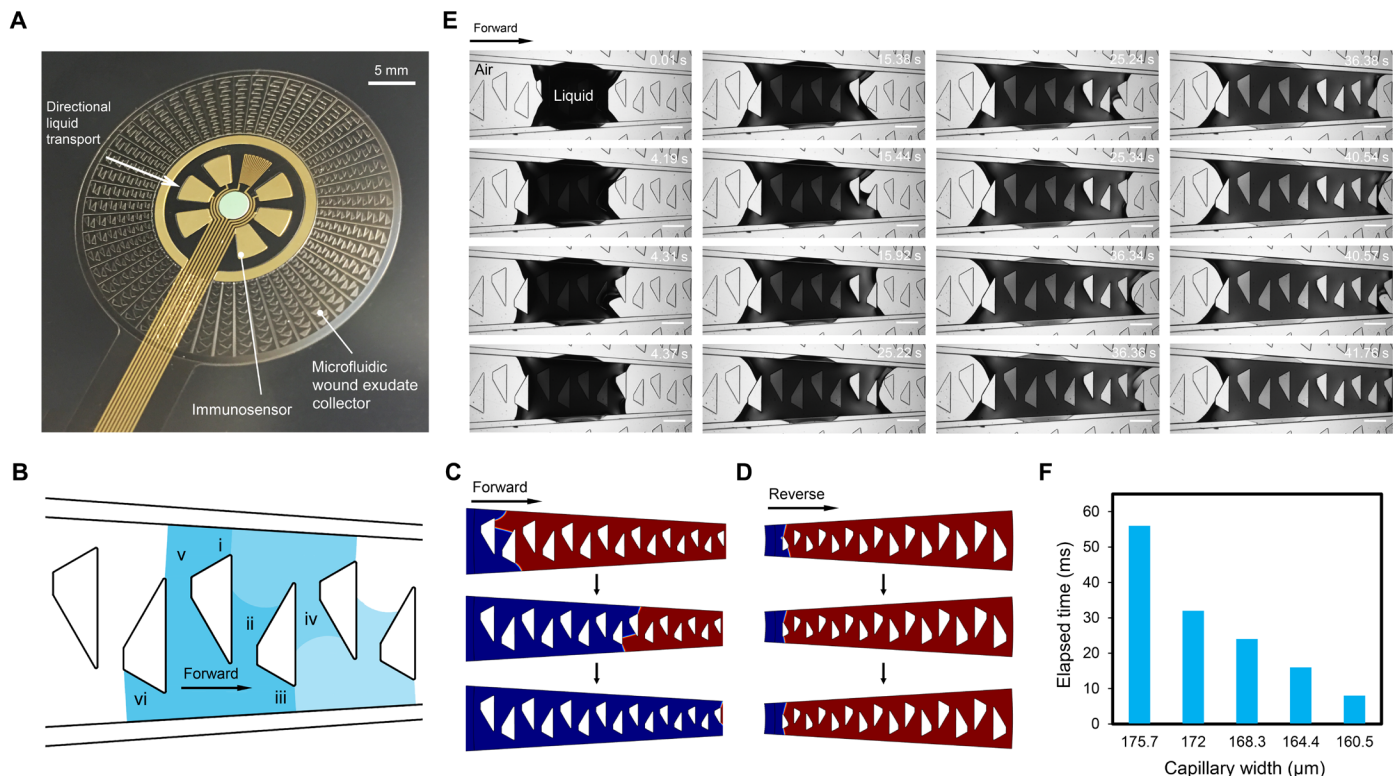
Para demonstrar este princípio de funcionamento, construímos os modelos de sistemas de transporte direcional de líquidos (Materiais e Métodos). A simulação do transporte de líquido nos canais capilares interligados com largura decrescente foi realizada tanto no sentido direto quanto no reverso, conforme mostrado na Fig. 2 (C e D). O líquido passou na direção para a frente; ele parou completamente no ponto inicial na direção reversa. Além disso, o desempenho do transporte de líquido em relação ao canal capilar de 160 e 200  $\mu\text{m}$  de largura também foi simulado. Observou-se que na largura de 200  $\mu\text{m}$ , o líquido deixou de fluir na direção direta (fig. S1A), enquanto um fluxo contínuo foi observado na largura de 160  $\mu\text{m}$  (fig. S1C). Por outro lado, o líquido não conseguiu superar o ponto inicial na direção reversa em ambas as larguras do canal capilar (fig. S1, B e D). Os processos dinâmicos são mostrados nos filmes S1 a S6. Com base nesses resultados de simulação, o canal capilar com largura decrescente pode garantir o transporte direcional de líquido eficiente e contínuo em direção à área de detecção.

Resultados experimentais obtidos usando um protótipo biomimético verificaram os resultados da simulação. Especificamente, uma gota (2  $\mu\text{l}$ ) de água com sabão, que tem um ângulo de contato semelhante ao do soro humano, foi aplicada na parte média do sistema de transporte direcional de líquido. A Figura 2E ilustra o processo de transporte de líquido passivo dinâmico (Materiais e Métodos; filme S7) em momentos diferentes. Ao usar consecutivamente os canais capilares interconectados, o líquido foi transportado para a área de detecção, enquanto o movimento na direção reversa foi inibido. Também observamos que a diminuição da largura do canal capilar exigiu menor tempo de transporte de líquido nos canais capilares (Fig. 2F). A taxa de fluxo média na direção direta foi de  $\sim 0,43 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1}$ . O projeto do sistema de transporte direcional de líquido forneceu  $\sim 180\%$  de captura adicional de fluido da ferida e entrega ao sensor em 130 s, garantindo um desempenho de detecção confiável, independentemente da forma ou tamanho da úlcera.

### Projeto e caracterização do imunossensor

O imunossensor foi projetado para medir vários parâmetros biofísico-químicos da amostra de fluido da ferida com base em um sistema eletroquímico. Ele continha uma matriz polar de eletrodos de trabalho em forma de pétala compartilhando um eletrodo de referência Ag / AgCl no centro e um eletrodo contador de Au na periferia (Materiais e Métodos; Fig. 1D), formando um layout circular compacto ideal para análise de microvolume. Os elementos sensores do TNF - (28), IL-6 (29), IL-8 (30), e TGF-1 (31) eletrodos foram baseados na afinidade aptâmero-analito, enquanto a afinidade de ligação do *S. aureus* eletrodo era





**Fig. 2. Coletor de exsudato de ferida microfluidica que permite o transporte direcional de liquido.** (UMA) Um coletor microfluidico passivo biomimético formado por uma matriz polar de canais capilares em forma de dente de serra semiabertos interconectados com uma largura decrescente de 200 a 160 μm foi fabricado no topo dos eletrodos de base. (B) Mecanismo de um sistema de transporte direcional de líquidos que explora a interconexão de canais capilares em forma de dente de serra adjacentes. (C e D) Simulação COMSOL do transporte de líquido nos canais capilares interligados com largura decrescente nas direções direta e reversa com o tempo, respectivamente (azul, líquido; vermelho, ar). (E) Dinâmica do processo de transporte de líquido de um protótipo biomimético em diferentes pontos de tempo (barras de escala, 500-μm). (F) Tempo decorrido de transporte de líquido em canais capilares com largura decrescente.

entre o aptâmero e epítomos específicos na superfície da parede celular da bactéria (32)

Métodos anteriores de funcionalização de biossensor com base em aptâmero flexível baseavam-se em técnicas de fabricação relacionadas a um único biomarcador (tabela S1) (33-37) Para superar o desafio de integrar múltiplas modalidades de aptasensing em uma área de detecção compacta, usamos um procedimento de microgota com o auxílio de micropoços para funcionalizar cada eletrodo de trabalho com diferentes elementos de detecção. Uma altura otimizada do micropoço (20 μm) permitiu lançamento de gota independente, imobilização de aptâmero e passivação, enquanto também protegia os aptâmeros imobilizados e alvos capturados de serem riscados (Materiais e Métodos).

Para otimizar o desempenho dos microeletrodos, modificamos cada eletrodo baseado em aptâmero com uma fina camada de nanocompósitos de grafeno-ouro esfoliado eletroquimicamente (AuNPs-GP) (Materiais e Métodos). O grafeno esfoliado eletroquimicamente, conhecido como "grafeno", tem excelentes propriedades, como alta cristalinidade, alta condutividade e grau de baixa oxidação. Além disso, as nanopartículas de ouro fornecem alta densidade de corrente, mobilidade de elétrons aprimorada e transporte de massa rápido (38) A morfologia do AuNPs-GP foi caracterizada a partir de imagens de microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FESEM) (fig. S2B). Os espectros Raman de grafeno e nanocompósito AuNPs-GP são mostrados na fig. S2C (Materiais e Métodos). A relação de intensidade de pico da banda D para G ( $I_{D}/I_{G}$ ) reflete o grau de desordem no material grafítico (39)

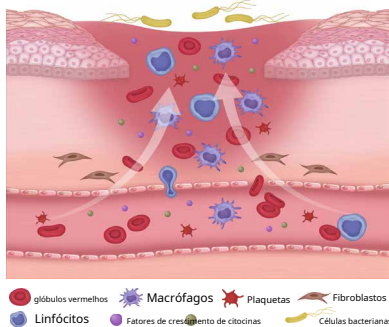
o  $I_{D}/I_{G}$  o valor do AuNPs-GP (0,93) foi ligeiramente maior do que o do grafeno (0,91), indicando defeitos adicionais introduzidos pelos AuNPs no nanocompósito.

A análise qualitativa dos eletrodos modificados por AuNPs-GP foi conduzida usando voltametria cíclica (CV) em diferentes taxas de varredura, conforme ilustrado na fig. S3A. As razões de corrente de pico anódico-catódico ( $I_{pa}/I_{pc}$ ) estava na faixa de 0,92 a 1,15, indicando a quase reversibilidade do sistema (39, 40) Teoricamente, a corrente de pico é proporcional à raiz quadrada da taxa de varredura (39) A Figura S3B mostra a variação da corrente de pico anódica e catódica em relação à raiz quadrada da taxa de varredura, com coeficientes de regressão de 0,9867 e 0,9903, respectivamente. Boa linearidade indicou processos controlados por difusão no eletrodo.

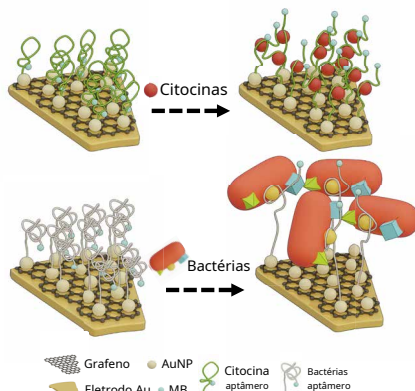
Nós projetamos novas seqüências de aptâmero (Materiais e Métodos) modificadas com azul de metileno (MB), uma sonda redox, em uma extremidade e um grupo tiol na outra extremidade para ligação covalente a AuNPs. Conforme ilustrado na Fig. 3B, na ausência de um analito, MB está próximo aos eletrodos modificados por AuNPs-GP, permitindo a transferência de elétrons. Uma corrente Faradaica pode ser detectada eletroquimicamente. Após a ligação ao alvo, a estrutura em grampo do aptâmero sofre uma mudança conformacional durante a qual MB se move para longe dos eletrodos, causando uma diminuição da corrente redox. Devido ao mecanismo de detecção (28, 41), os aptasensores modificados por sonda redox não requerem nenhum reagente adicional para realizar a medição eletroquímica em uma única etapa, o que o torna apropriado para a determinação in situ e



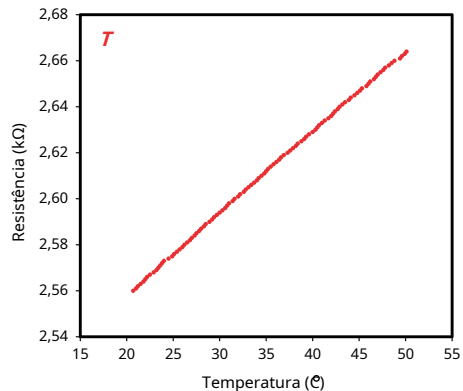
UMA



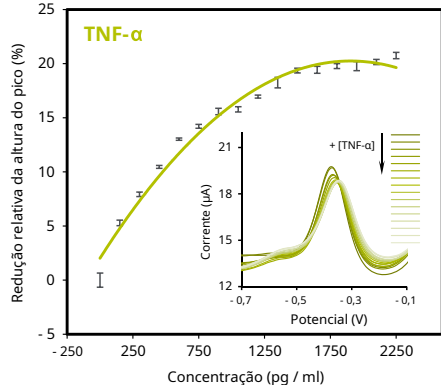
B



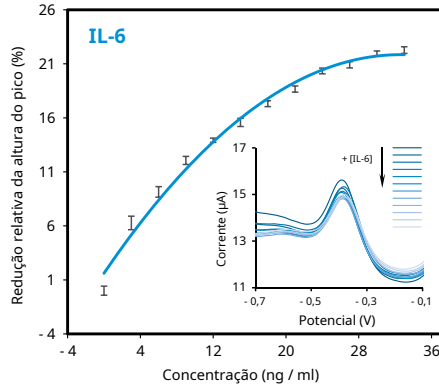
C



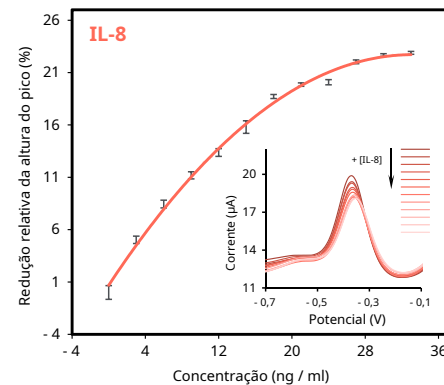
D



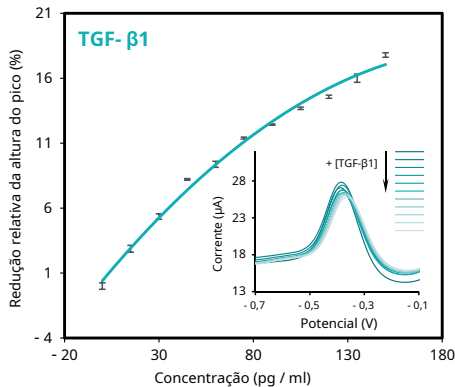
E



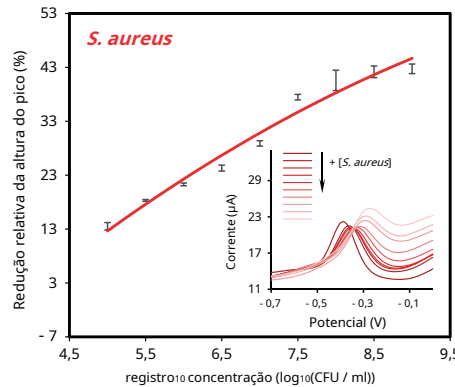
F



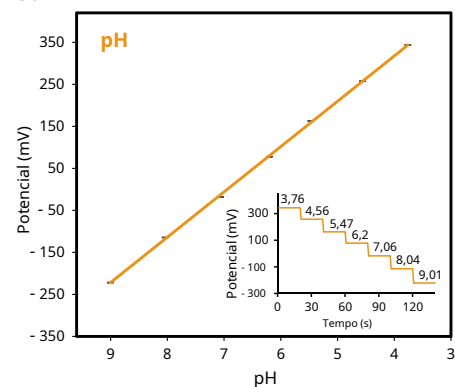
G



H



eu



**Fig. 3. Caracterização do TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1, *S. aureus* sensores de pH.** (UMA) Ilustração de um microambiente de úlceras venosas. (B) Esquema do mecanismo de detecção dos aptasensores para detecção de citocinas e bactérias, respectivamente. (C) Calibração da resistência do sensor de temperatura versus temperatura. (D para H) Variações na redução relativa da altura do pico do TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1 e *S. aureus* sensores versus a concentração de alvos correspondentes no soro, respectivamente. Barras de erro denotam o SD da média derivada de três varreduras nas mesmas condições. As inserções de (D a H) mostram varreduras de SWV do TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1 e *S. aureus* sensores quando desafiados com diferentes concentrações de analito, respectivamente. (eu) Calibração do OCP do sensor de pH versus valores de pH no soro. Barras de erro denotam o DP da média em um intervalo de 20 s sob as mesmas condições. A inserção de (I) mostra o OCP em tempo real do sensor de pH para diferentes valores de pH.

independente da análise downstream. Tendo vantagens de boa estabilidade química e térmica, alta afinidade, boa seletividade e não imunogenicidade (40-43), o aptâmero tem um papel vital no estabelecimento de um curativo analítico molecular biocompatível. Após a imobilização do aptâmero, passamos a superfície do eletrodo com 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) para inibir a adsorção não específica.

A montagem passo a passo de diferentes camadas no eletrodo de trabalho foi validada por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

(Materiais e Métodos; fig. S3C). O eletrodo modificado com AuNPs-GP tinha uma resistência de transferência de carga mais baixa ( $R_{ct}$ ) (3,17 kilohm) do que o eletrodo de ouro puro (5,29 kilohm), indicando maior cinética de transferência de elétrons na interface do eletrodo com maior área de superfície eletroativa (39) A imobilização do aptâmero e MCH levou a um aumento de  $R_{ct}$  a 14,4 e 17 kilohm, respectivamente. A mobilidade do elétron foi prejudicada pela substância imobilizada (44) A presença de um analito bloqueou ainda mais a transferência de elétrons indicada por

um elevado  $R_{ct}$  de 18 quilohm. A Figura S3D relata a análise de CV de diferentes etapas em que a corrente de pico redox é o indicador de condutividade (39) Os resultados foram consistentes com os do EIS, verificando se a preparação do eletrodo foi bem-sucedida e funcional.

Os sensores baseados em aptâmero foram caracterizados usando voltametria de onda quadrada (SWV) para monitorar variações de altura de corrente de pico associada com a distância da marca redox MB ao eletrodo. Devido à sua composição molecular semelhante ao fluido da ferida, usamos soro para imitar o exsudato da ferida. A densidade de aptâmero de 10-M foi aplicada para garantir alturas de pico distinguíveis (fig. S4A) e para otimizar a relação sinal-ruído (SNR) (fig. S4B), onde o sinal denota a altura do pico e o ruído denota o SD de o sinal. Estudos sobre o processo de incubação revelaram que aproximadamente 30 min são necessários para a ligação aptâmero-alvo para estabelecer o equilíbrio (fig. S4, C a G). O desempenho de cada aptasensor contra o analito com diferentes concentrações é mostrado na inserção da Fig. 3 (D a H, respectivamente) (Materiais e Métodos). Observou-se que a altura da corrente de pico de cada aptasensor diminuiu com o aumento da concentração alvo. A redução relativa da altura do pico normalizada para a altura do pico contra nenhum analito com concentração de analito é exibida na Fig. 3 (D a H, respectivamente). As linhas de regressão quadrática exibem boa monotonicidade do TNF- ( $R_2 = 0,9798$ ), TGF-1 ( $R_2 = 0,9931$ ), IL-8 ( $R_2 = 0,9958$ ), IL-6 ( $R_2 = 0,9882$ ), e *S. aureus* ( $R_2 = 0,9712$ ) sensores. Notavelmente, os intervalos de concentração de TNF- (0 a 2 ng mL<sup>-1</sup>), TGF-1 (0 a 150 pg mL<sup>-1</sup>), IL-8 (0 a 30 ng mL<sup>-1</sup>), e IL-6 (0 a 30 ng mL<sup>-1</sup>) foram baseados nos níveis relatados em fluidos de feridas de pacientes com úlcera venosa (16, 17, 19, 45), combinado com resultados de ELISA de amostras clínicas usadas para este estudo. Da mesma forma, o intervalo de *S. aureus* [0 a  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (CFU) mL<sup>-1</sup>] foi selecionado com base nas cargas microbianas relatadas em feridas (46, 47), juntamente com as enumerações de CFU deste estudo. Nossos sensores de citocinas demonstraram ter boa seletividade, interferência mínima (fig. S5, A a D) e boa reprodutibilidade (fig. S4H).

O eletrodo de trabalho para detecção de pH é baseado em polímero de polianilina (PANI) (Materiais e Métodos) (10, 48) A alteração do potencial de circuito aberto (OCP) foi usada para monitorar as variações de pH. Conforme mostrado na inserção da Fig. 3I, o potencial do sensor de pH permanece estável até que o nível de pH mude. Uma diminuição do potencial foi encontrada com amostras de fluido mudando de ácido para alcalino. A caracterização do sensor de pH no soro é ilustrada na Fig. 3I. A sensibilidade, definida como a mudança relativa em OCP por unidade de valores de pH normalizados para o OCP em pH 3,76, é  $-31,402\% [pH]^{-1}$ . Tendo demonstrado boa linearidade ( $R_2 = 0,9997$ , derivado da linha de regressão linear), o sensor de pH também é caracterizado por boa repetibilidade (fig. S6A) e reprodutibilidade (fig. S6B). O desempenho do sensor de pH também foi validado com plasma produzindo resultados semelhantes (fig. S6, C a F). O sensor de temperatura embutido é baseado em um resistor termicamente responsivo (Materiais e Métodos) (49) Os aptasensores e o sensor de pH mostraram boa estabilidade a longo prazo ao longo de 4 semanas com desvios inferiores a 5% (Materiais e Métodos; fig. S7), oferecendo a vantagem sobre os biossensores baseados em anticorpos, que são facilmente inativados por causa da desnaturação do anticorpo (35, 41, 42) A

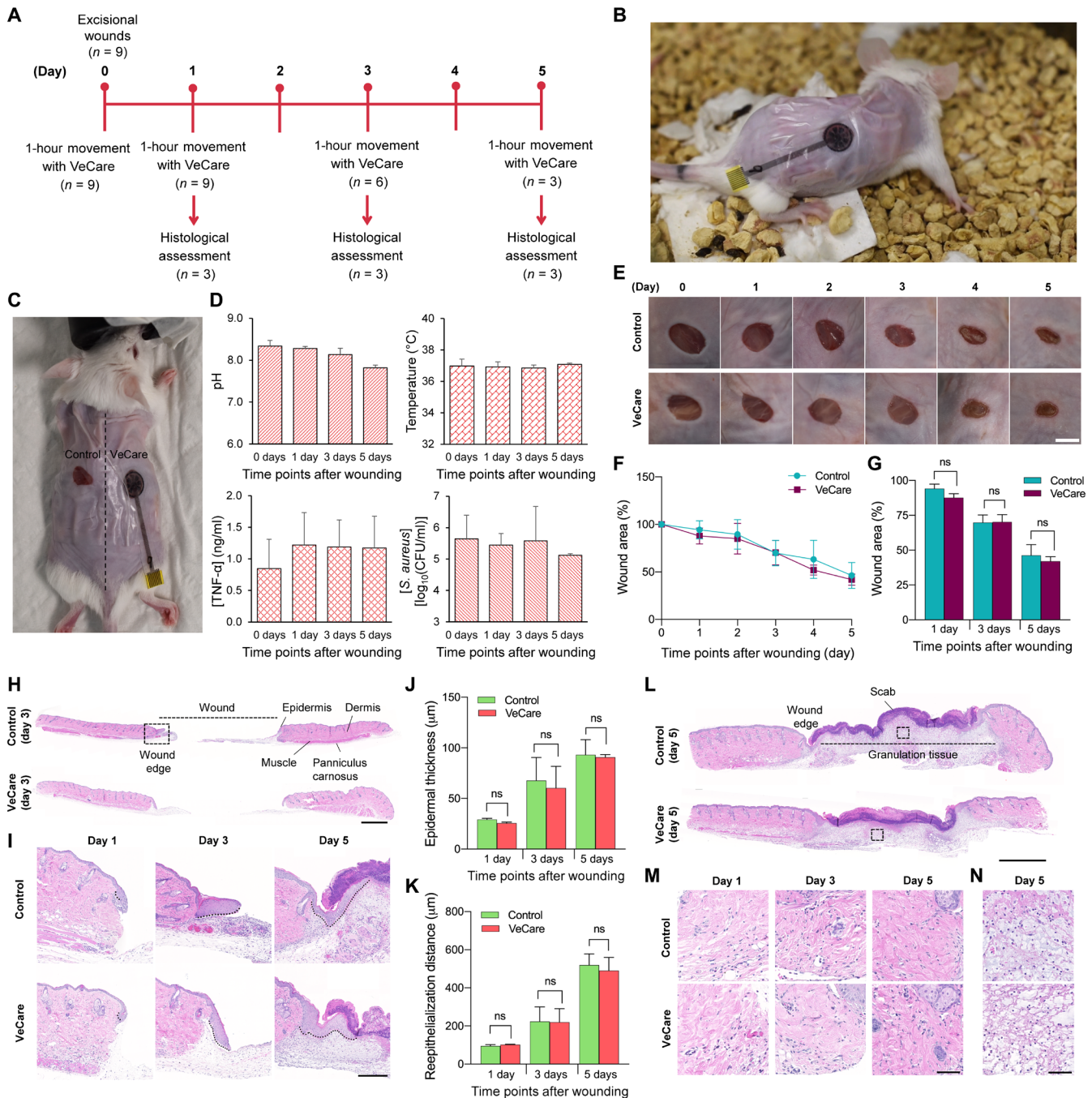
caracterização do sensor de temperatura é apresentada na Fig. 3C. A sensibilidade, definida como a mudança relativa na resistência por unidade de temperatura normalizada para a resistência a 20 °C, é 0,1384% °C<sup>-1</sup> com uma boa linearidade de  $R_2 = 0,9998$ . Observe que as faixas de trabalho do sensor de pH (pH 4 a 9) e do sensor de temperatura (20 ° a 50 °C) foram consideradas para garantir a cobertura das variações de pH e temperatura em um ambiente de fluido de ferida (10)

O imunossensor embutido no curativo analítico do biomarcador é projetado com uma área de detecção (diâmetro de 16 mm) apropriada para uso com a maioria das úlceras venosas. No entanto, o tamanho do imunossensor pode ser ajustado proporcionalmente (fig. S8) para cumprir uma variedade de outras aplicações potenciais (por exemplo, trauma agudo, feridas cirúrgicas, psoríase e eczema). O limite de redimensionamento foi explorado em 8 mm de diâmetro da área de detecção devido à limitação de volume que um microproco pode conter para imobilização de aptâmero independente no sistema de aptasensing multiplexado. A Figura S8A mostra o volume mínimo necessário para o imunossensor em diferentes tamanhos. A perda de SNR quando o sensor foi redimensionado para um menor (diâmetro de 8 mm) foi observada em menos de 5% (fig. S8C).

#### Monitoramento de feridas in situ e estudo de biocompatibilidade em modelos de camundongos

Para demonstrar a utilidade da plataforma para monitoramento de feridas in situ, realizamos monitoramento longitudinal de feridas em modelos de camundongos (Materiais e Métodos). Resumidamente, duas feridas excisionais bilaterais de espessura total foram feitas no dia 0, equidistantes da linha média e espaçadas em cada lado do dorso (Fig. 4A). Um imunossensor estava em contato direto com a ferida direita (Fig. 4C), enquanto a ferida esquerda era usada como controle. Os indivíduos puderam se mover livremente por 1 hora com o imunossensor acoplado, seguido pelo monitoramento da ferida in situ. A presença do imunossensor pareceu ser bem tolerada, sem sinais observados de desconforto durante o comportamento de movimentação livre ou qualquer arranhão excessivo da ferida coberta pelo sensor (Fig. 4B e filme S8). Em todos os casos, o imunossensor permaneceu funcional após 1 hora de contato com a ferida. *S. aureus* no momento do ferimento [dia 0 ( $n = 9$ )], bem como no dia 1 ( $n = 9$ ), dia 3 ( $n = 6$ ), e dia 5 ( $n = 3$ ) após o ferimento. As medições longitudinais de pH mostram que o pH no local da ferida diminuiu em 6% no dia 5 em comparação com o dia 0. Esta diminuição correspondeu à reepitelização da ferida, que está associada à hipóxia e à produção de ácido láctico (24) A medição do imunossensor também revelou um aumento significativo (dar 44% de aumento) no TNF- dos dias 0 a 1 correspondendo à resposta inflamatória após o ferimento (50) Em contraste, a temperatura e o nível de *S. aureus* medidas na ferida foram constantes ao longo da duração da cicatrização, o que é consistente com a ausência de infecção, conforme avaliado por inspeção visual (7, 57) Estes resultados demonstraram que o imunossensor permite o perfil de multibiomarcador in situ do fluido da ferida ao longo da duração relevante para a cicatrização da ferida.

O exame histológico do local da ferida demonstra ainda a biocompatibilidade do imunossensor. Nenhum sinal aparente de reações adversas (por exemplo, vermelhidão, inchaço e degeneração) foi observado na superfície da pele que esteve em contato com o imunossensor por mais de 5 dias (Fig. 4E). A Figura 4 (F e G) não mostra nenhum efeito cumulativo da colocação do sensor na taxa de fechamento da ferida. A distância de reepitelização e a espessura epidérmica nascente foram medidas a partir de imagens de seções de tecido de hematoxilina e eosina (H&E) (Fig. 4, H e I) para avaliar o efeito da colocação do sensor na cicatrização de feridas (52) Não foi observada diferença significativa entre as feridas de controle e as feridas que tiveram contato com o sensor (Fig. 4, J e K). A avaliação qualitativa das células imunes na derme na borda da ferida, identificadas pela morfologia celular e presença de polimorfonucleares, sugeriu que não houve diferença na infiltração em todos os pontos de tempo de contato do sensor (Fig. 4, L e M)



**Fig. 4. Monitoramento in situ na cicatrização de feridas e biocompatibilidade em modelo de ferida em camundongo. (UMA)** Desenho do estudo de monitoramento de feridas. **(B)** Fotografia de um camundongo em movimento livre com um imunossensor montado na ferida cutânea. **(C)** Fotografia das feridas excisionais. O imunossensor está em contato direto com a ferida direita, enquanto a ferida esquerda atua como um controle. **(D)** Avaliação in situ de pH, temperatura, TNF de camundongo - e *S. aureus* pelo imunossensor. **(E e F)** Imagens das feridas (barra de escala, 5 mm) e mudanças na área da ferida dos dias 0 a 5. **(G)** Comparação da área da ferida nos dias 1, 3 e 5 (total cumulativo de 2, 3 e 4 horas de contato do sensor). **(H e eu)** Imagens de H&E (pontos de 20 ×) de feridas de espessura total no dia 3 e bordas da ferida nos dias 1, 3 e 5, respectivamente (barras de escala, 1000 e 250 -m). As linhas pontilhadas pretas mostram reepitelização. **(J e K)** Comparação da espessura epidérmica e distância de reepitelização, respectivamente. **(eu para N)** Imagens de H&E de feridas inteiras no dia 5, derme nas bordas da ferida nos dias 1, 3 e 5 e área de tecido de granulação no dia 5, respectivamente (barras de escala, 1000, 250 e 250 -m). As imagens são representações típicas em todos os ratos. As comparações estatísticas usam o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon (ns, resultado não significativo). As barras de erro mostram SD (D e F) ou SE (G, J e K) da média.

(53) A Figura 4N não revela nenhuma diferença na maturação do tecido de granulação ou nos níveis de celularidade (54) A avaliação comportamental, visual e histológica em modelos de camundongos em cicatrização de feridas demonstrou a biocompatibilidade do imunossensor para vigilância de feridas in situ.

#### Estudo clínico sobre exsudatos de feridas de pacientes com úlcera venosa

Para avaliar a aplicação clínica do imunossensor VeCare, usamos esta plataforma para analisar o exsudado da ferida de úlceras venosas para



observar objetivamente as características do leito da ferida e a carga biológica (materiais e métodos). Resumidamente, exsudatos de feridas de cinco pacientes (P1 a P5) com úlceras venosas não cicatrizadas clinicamente diagnosticadas foram coletados consecutivamente uma vez por semana durante 5 semanas. Os exsudatos da ferida foram avaliados usando a plataforma VeCare. A Figura 5A ilustra as mudanças longitudinais de TNF-, IL-6, IL-8, TGF-1, *S. aureus*, pH e tamanhos de feridas. É claro que as leituras para cada biomarcador variaram ao longo do período de estudo. Embora os fluidos da ferida de cada paciente exibissem perfis longitudinais únicos individualmente, algumas características comuns eram evidentes. Por exemplo, os fluidos da ferida em P2 e P3 tornaram-se menos alcalinos durante as semanas 1 a 3 e semanas 2 a 5, respectivamente, sugerindo que suas feridas estavam respondendo positivamente às terapias para esses períodos (22, 23) P2 (semana 3), P4 (semana 2) e P5 (semana 4) apresentaram carga elevada de *S. aureus* e exibiram mais fluidos alcalinos na ferida na semana subsequente de visita. Estas observações foram consistentes com as associações relatadas entre infecção da ferida e pH (20, 21) P2 que exibiu altos níveis de

*S. aureus* tinha níveis elevados correspondentes de IL-6 e IL-8 na semana 3. Respostas semelhantes foram observadas em P1 (semana 3), P3 (semana 3), P4 (semana 2) e P5 (semana 4) com elevação *S. aureus*, IL-6, IL-8 e níveis de TNF-, consistentes com as observações em queratinócitos (55) P1 (semana 2) e P5 (semana 4) que mostraram um aumento no tamanho da ferida foram observados como tendo níveis elevados de IL-6 e IL-8, consistentes com as observações em um estudo piloto de 10 úlceras venosas refratárias (56) Além disso, as tendências de inflamação e colonização em P1 (semana 3), P2 (semana 3), P4 (semana 2) e P5 (semana 4) foram reduzidas na semana seguinte, indicando que as intervenções clínicas (por exemplo, tópica curativos impregnados com antisséptico) parecem ser eficazes na redução da carga de microrganismos. Esses perfis multibiomarcadores podem fornecer parâmetros abrangentes específicos da ferida e informar as decisões clínicas sobre a modalidade e a duração do tratamento.

Para avaliar o efeito dos exsudatos da ferida no desempenho do sensor, usamos analitos com diferentes concentrações altas ou valores de pH para desafiar o imunossensor após o uso. A Figura S9 (A a E) mostra o desempenho de cada aptasensor, respectivamente. Observou-se que a altura da corrente de pico de cada aptasensor diminuía ainda mais com o aumento da concentração do alvo, conforme mostrado nas inserções da fig. S9 (A a E, respectivamente). A Figura S9F exibe um desempenho consistente do sensor de pH com um recém-preparado. O desempenho do imunossensor mostrou não ser comprometido após a exposição aos exsudatos da ferida.

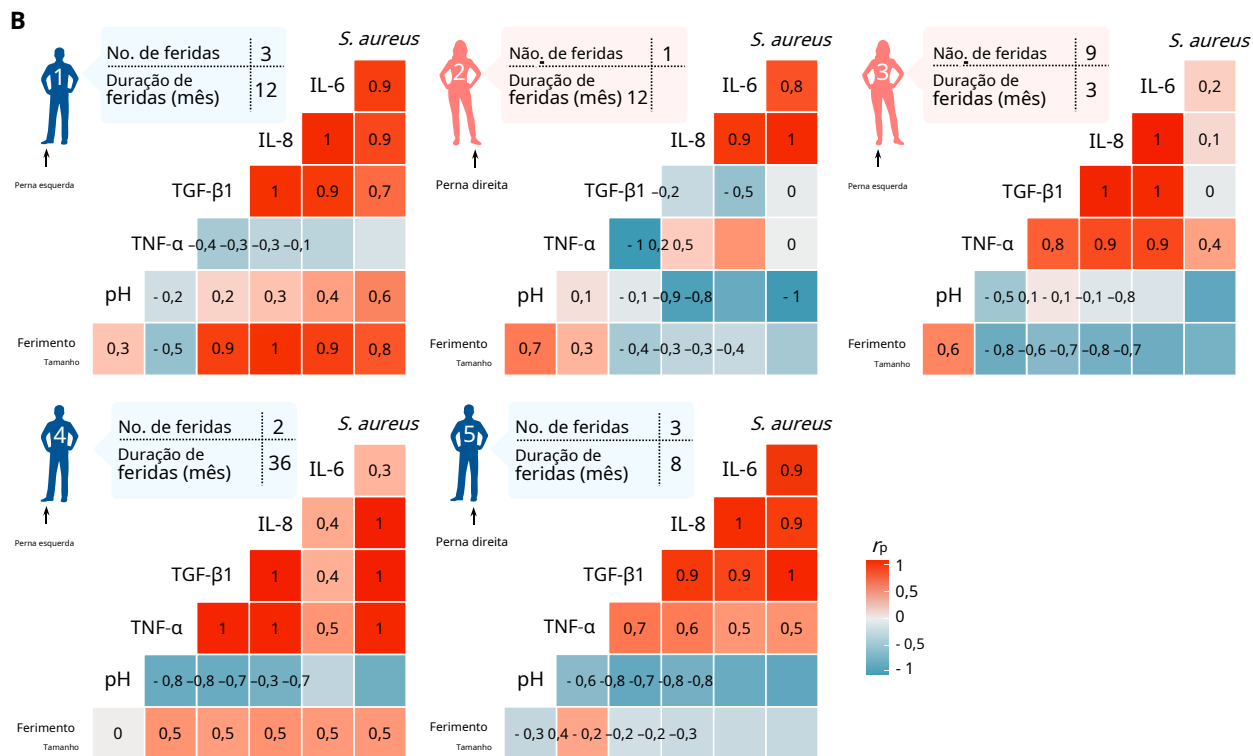
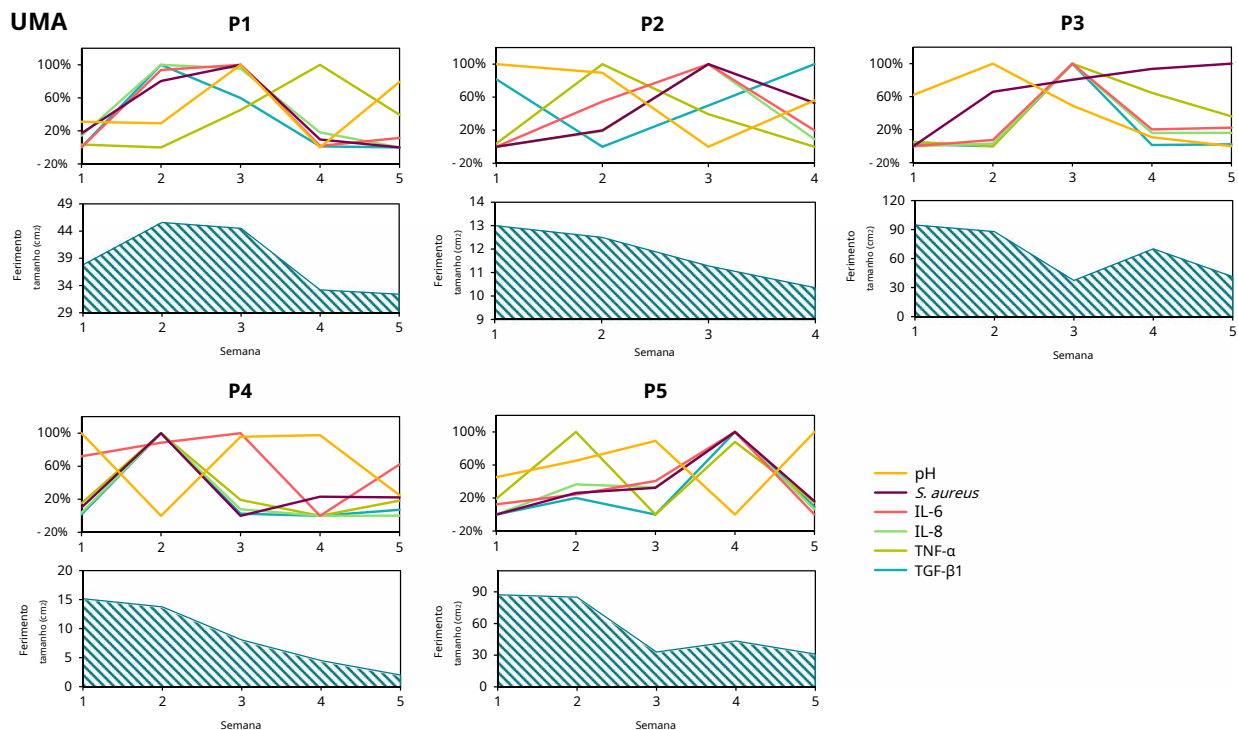
Os biomarcadores, conforme medido anteriormente pelo imunossensor, foram avaliados de forma independente usando abordagens convencionais. Os níveis de citocinas, pH e *S. aureus* foram determinados usando multiplex ELISA, medidor de pH e coagulase-positivo *Estafilococos* enumeração, respectivamente (Materiais e Métodos). A Figura S10 apresenta mudanças longitudinais no nível de cada biomarcador para cada paciente. Essas medições exibiram características semelhantes às leituras do sensor, demonstrando que o imunossensor é capaz de relatar dados quantitativos objetivos dentro de faixas clinicamente relevantes.

Os recursos de medição multimodal da plataforma VeCare também permitem que as relações entre essas características do leito da ferida e os parâmetros de biocarga sejam avaliados. A Figura 5B mostra as matrizes de correlação específicas do paciente usando coeficientes de correlação de Pearson entre os níveis de parâmetros medidos, incluindo tamanhos de feridas. Correlações positivas estatisticamente significativas entre os níveis de IL-6 e IL-8 foram observadas em todos os pacientes. Fluidos de feridas relatando a presença de maior carga de *S. aureus* foram associados a níveis elevados de IL-6 e IL-8, consistentes com as respostas dos queratinócitos a

*S. aureus* (55) O grau ou extensão da correlação dos tamanhos das feridas com os biomarcadores restantes era específico do paciente, possivelmente devido às amostras serem derivadas de pacientes de diferentes sexo, idade e duração da ferida. Um estudo prospectivo randomizado em uma coorte maior de pacientes irá confirmar ainda mais o valor prognóstico desses biomarcadores para prever o estado de cicatrização de feridas. Fornecendo medidas de inflamação e biocarga microbiana que são inacessíveis por um único ou poucos sensores de marcadores não inflamatórios atuais, o sistema de imunossensor VeCare deve servir como uma adição benéfica ao arsenal clínico existente.

## DISCUSSÃO

Relatamos o desenvolvimento de um sistema de imunossensor microfluídico multiplexado flexível que permite o monitoramento simultâneo de perfis multibiomarcadores usando layout de sensor avançado, técnicas de funcionalização e eletrônica flexível sem fio. Aqui, uma plataforma VeCare foi projetada para realizar interrogatório in situ de cicatrização de úlceras venosas em pacientes. Esta plataforma VeCare incorporou um curativo analítico de biomarcador que consiste em uma camada de contato com a ferida perfurada, um coletor de exsudato microfluídico, um imunossensor e uma barreira respirável em uma pequena unidade integrada que era adequada para aplicação direta na ferida cutânea. Um coletor microfluídico passivo biomimético foi desenvolvido para facilitar a determinação precisa e eficiente de fluidos clinicamente relevantes in situ. Um sistema de transporte de líquido direcional formado por uma matriz polar de canais capilares em forma de dente de serra semiabertos interconectados com largura decrescente facilitou o acúmulo de fluido de ferida eficiente para análise de fluido de ferida. A matriz imunossensora entregou avaliação quantitativa simultânea de vários biomarcadores clinicamente relevantes (TNF-, IL-6, IL-8, TGF-1, pH e temperatura), e também bioburden (*S. aureus*) em minutos. Os sensores de citocinas exibiram caracteristicamente seletividade, especificidade e reprodutibilidade com interferência mínima. O sensor de pH foi caracterizado para exibir linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade. O conjunto imunossensor era escalonável e prontamente ajustado para atender a uma variedade de aplicações potenciais. O imunossensor revelou a capacidade de avaliação de multibiomarcadores in situ e biocompatibilidade em modelos de camundongos feridos. Um analisador sem fio portátil também foi projetado para fazer interface com o imunossensor. Por último, um aplicativo de acompanhamento contendo uma GUI para auxiliar no gerenciamento de perfis de pacientes e registros médicos, facilitando a coleta de dados, análise, e a visualização foi desenvolvida para integrar a plataforma de imunossensor VeCare com os registros de pacientes existentes e permite que decisões clínicas rápidas no local sejam tomadas. Como prova de princípio, o VeCare foi aplicado para avaliar exsudatos de feridas coletados de pacientes com úlceras venosas não cicatrizantes, uma vez por semana durante cinco semanas consecutivas. Uma representação gráfica de indicadores clinicamente relevantes de cura e biocarga serviu como uma ferramenta diagnóstica / prognóstica combinada para um manejo clínico melhor e mais preciso do paciente e de suas feridas. Relatamos a análise de matrizes de correlação específicas do paciente, identificando relações entre os parâmetros medidos, incluindo o tamanho da ferida. A plataforma VeCare oferece entrega rápida no ponto de atendimento de várias medições clínicas quantitativas. Acreditamos que a plataforma VeCare representa a primeira de sua classe de funcionamento de dispositivos de ponto de atendimento e é capaz de fornecer informações diagnósticas clínicas personalizadas e precisas para atender às necessidades não atendidas de muitos indivíduos que sofrem de úlceras crônicas que não cicatrizam. A simplicidade no design permite que a plataforma VeCare



**Fig. 5. Análise de dados derivados do sensor de amostras de exsudato de feridas de pacientes com úlcera venosa. (UMA)** Avaliação semanal de pH, *S. aureus*, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 pelo imunossensor para cada paciente. Os eixos representam escalas independentes para cada um dos parâmetros quantificados, variando de 0% para o nível mais baixo a 100% para o nível mais alto. Mudanças semanais do tamanho da ferida são mostradas junto com a avaliação do biomarcador. **(B)** Matrizes de correlação específicas do paciente de parâmetros avaliados pelo imunossensor (pH, *S. aureus*, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1) e o tamanho da ferida ao longo de um período de 5 semanas. O número total e a duração das feridas (em meses) são mostrados na tabela para cada paciente. A cor da ilustração da pessoa em pé indica o gênero do paciente (azul, masculino; rosa, feminino). A barra de escala representa o coeficiente de correlação de Pearson ( $r_p$ )

ser robusto, adaptável e personalizável. Além disso, propomos que nossa tecnologia de sensor permite um painel alternativo de biomarcadores para uma variedade de aplicações que requerem análises multiplexadas, por exemplo, em patologia diagnóstica e triagem de alto conteúdo. A plataforma VeCare é prontamente reconfigurada para detectar outras bactérias da pele (por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Corynebacterium* spp.), permitindo que feridas infectadas com patógenos sejam estratificadas a partir de feridas colonizadas por organismos comensais. O trabalho futuro agora inclui a integração do imunossensor em um curativo inteligente que atenda às considerações de segurança, regulamentação e produção em massa, além de explorar a utilização de dados do sensor em fluxos de trabalho clínicos existentes. Os dados clínicos limitados do estudo foram devido ao tamanho da amostra e frequência de visitas de pacientes com úlcera venosa ao longo da duração do estudo. Um ensaio clínico prospectivo randomizado maior será realizado em pacientes com diferentes tipos de úlceras crônicas não cicatrizantes (por exemplo, úlceras venosas, úlceras de pé diabético e úlceras de pressão) para confirmar a utilidade e o valor clínico da plataforma de tecnologia VeCare em um ambiente de atenção primária.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

Cloreto de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ), *N,N*-dimetilformamida (DMF), tetraalquilamônio (TAA), *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), hexacianoferrato de potássio (III) [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ], hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado [ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ], cloreto de potássio (KCl), cloridrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), MCH, ácido clorídrico (HCl), anilina, fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), ácido cítrico, solução tampão pH 10,00 Certipur, soro humano e plasma humano foram adquiridos à Sigma-Aldrich. As películas de tereftalato de polietileno (PET) (ST506) foram adquiridas à MELINEX. Os cristais de grafite em massa (pureza de 99,9%) foram adquiridos na HQ Graphene. Nanopartículas esféricas de ouro orgânicas (diâmetro de 20 nm, dispersas em DMF) foram adquiridas da Nanopartz Inc. Os oligos modificados e o tampão TE (tris 10 mM e EDTA 0,1 mM) foram adquiridos da Integrated DNA Technologies. TNF humano recombinante-, IL-6, IL-8, TGF-1, IL1-, IL-2, IL-7, interferon-, TNF--recombinante de camundongo e albumina de soro bovino foram adquiridos de R&D Systems. A solução salina tamponada com fosfato (PBS) (1 ×) sem cálcio e magnésio foi adquirida da Lonza. *S. aureus* O HG001 foi fornecido pelo Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Nacional de Cingapura. UltraPure desoxirribonuclease (DNase) / ribonuclease (RNase) - água destilada gratuita, caldo BD Difco LB, Miller (Luria-Bertani) e ágar oxidif triptona soja (TSA) foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific. RÁPIDO<sup>®</sup> *Staph* ágar e gema de ovo com potássio foram adquiridos à Bio-Rad.

### Simulação e experimentos do sistema de transporte direcional de líquidos

Módulo de dinâmica de fluidos computacional (COMSOL Multiphysics 5.3a, Two-Phase Flow, interface Level Set) foi usado para simular o sistema de transporte direcional de líquidos. O processo experimental foi registrado em uma câmera de alta velocidade (FASTCAM Mini AX, Photron) montada em um sistema de microscópio invertido (IX71, Olympus) com configuração de 125 quadros por segundo, resolução de 1024 × 1024 (filme S8).

### Integração de sistema da plataforma VeCare

Os padrões de eletrodos de base foram projetados usando AutoCAD 2018. Para fabricar os eletrodos de base em um curativo, uma camada sacrificial de

Ni (25 nm) foi depositado em um wafer de Si usando um sputter (ATC-2200 UHV, AJA). Uma camada de isolamento inferior de SU-8 3025 (~ 20 -m) foi revestida por rotação na camada de Ni e padronizada por fotolitografia. Cr / Au (30 nm / 50 nm) foi depositado e padronizado na camada SU-8 usando um evaporador térmico (NANO 36, Kurt J. Lesker). Ag (200 nm) foi depositado na área do eletrodo de referência (diâmetro de 3 mm) usando um evaporador de feixe de elétrons (AJA). Uma camada de isolamento superior de SU-8 3025 foi revestida por rotação seguida de fotolitografia para expor a área de trabalho dos eletrodos eletroquímicos, fornecendo um micropoço para cada eletrodo de trabalho.  $\text{FeCl}_3$  solução (0,1 M) foi colocada em cima de Ag por 1 min para gerar o eletrodo de referência Ag / AgCl. O coletor de exsudato de ferida microfluidica foi formado por revestimento giratório de uma camada de SU-8 2150 (~ 150 -m) no topo da camada de isolamento e padronizado por fotolitografia. O eletrodo de referência Ag / AgCl foi temporariamente protegido por uma camada de 950 PMMA A4 (2 -m). A pilha inteira foi liberada do wafer de Si após a camada de Ni ter sido atacada por 30% de  $\text{FeCl}_3$  solução. Em seguida, após a remoção da camada de poli (metacrilato de metila) (PMMA), os eletrodos foram impressos por transferência em um filme de poliuretano de grau médico (Tegaderm). Alternativamente, os eletrodos de base podem ser fabricados em um filme PET (125 -m). Após a modificação AuNPs-GP e a imobilização do aptâmero, o imunossensor foi finalmente encapsulado por um filme de poliuretano perfurado de grau médico como a camada de contato com a ferida. Um analisador sem fio portátil foi fabricado para fazer a interface com as matrizes de eletrodos do imunossensor. Um aplicativo de dispositivo móvel contendo uma GUI foi desenvolvido para acompanhar o analisador sem fio.

### Preparação e caracterização do nanocompósito AuNPs-GP

Os flocos de grafeno foram inicialmente preparados por esfoliação catódica. Resumidamente, a esfoliação eletroquímica de grafite em massa foi realizada usando uma estação de trabalho eletroquímica (CHI 760E) que consiste em um sistema de dois eletrodos. Cristais de grafite em massa foram colocados como cátodo de trabalho e um fio de Pt foi usado como contra-eletrodo. Uma solução não aquosa consistindo em sal TAA 0,01 M e NMP foi usada como o eletrólito. A expansão do grafite em massa foi alcançada usando uma voltagem catódica de 8 V. Os flocos de grafeno expandido foram posteriormente esfoliados e isolados por centrifugação e secos. Os flocos de grafeno secos foram dispersos em DMF (1,4 mg ml<sup>-1</sup>) seguido de ultrassom de 3 horas usando um limpador ultrassônico (SW1, Sonoswiss AG). A dispersão excessiva de AuNPs foi adicionada à dispersão de grafeno seguida por sonicação de 1,5 horas para criar uma boa adsorção entre grafeno e AuNPs. A dispersão foi posteriormente submetida a uma centrifugação (Heraeus Pico 17, Thermo Fisher Scientific) a 13.000 rpm durante 5 min seguido de lavagem com DMF. Esta etapa foi repetida várias vezes para remover os AuNPs não adsorvidos. A dispersão foi finalmente sonicada por 5 min para obter o nanocompósito AuNPs-GP. O composto é armazenado a 4 ° C quando não está em uso e foi sonicado por 5 min antes de cada uso. As imagens morfológicas do AuNPs-GP foram adquiridas usando um FESEM (Verios 460, FEI). Os espectros Raman foram medidos usando um microscópio Raman (Alpha 300R, Witec).

### Sequências de aptâmero

A sequência do aptâmero TNF-- é 5' - / 5MeBIN / rG \* rG \* rA \* rG \* rU \* rA \* rU \* rC \* rU \* rG \* rA \* rU \* rG \* rA \* rC \* rA \* rA \* rU \* rU \* rC \* rG \* rG \* rA \* rG \* rC \* rU \* rC \* rC / 3ThioMC3-D / -3' (28) Especificamente, o oligo de RNA foi modificado com um dissulfeto (S—S) ligação no terminal 3' através de



um espaçador de três carbonos (C3) e MB no terminal 5' por meio de um modificador de amino. Ligações de fosforotioato (marcadas com \*) foram introduzidas para inibir o RNA da degradação de RNase.

A nova sequência de aptâmero de IL-6 é 5' - / 5ThioMC6-D / GGTGG-CAGGAGGACTATTTATTGCTTTCT / 3MeBIN / -3' (29) Especificamente, o oligo de DNA foi modificado com um S—Ligação S no terminal 5' através de um espaçador de seis carbonos (C6) e MB no terminal 3' através de um modificador de amino.

A nova sequência do aptâmero IL-8 é 5' - / 5ThioMC6-D / rGrGrGrGrGrGrUrUrArUrCrArUrCrArUrCrArUrUrArGrUrGrUrUrArUrArArCrC / 3MeBIN / -3' (30) Especificamente, o oligo de RNA foi modificado com um S—Ligação S no terminal 5' através de um espaçador C6, e MB no terminal 3' através de um modificador amino.

A sequência do aptâmero TGF-1 é 5' - / 5MeBIN / CG \* CTCG-G \* CTC \* ACG \* AG \* ATT \* CGTGT \* CGTTGTGT \* C \* CT - GT \* A \* C \* C \* CG \* C \* CTTG \* A \* C \* C \* AGT \* C \* ACT \* CT \* AG \* AG-C \* AT \* C \* CGG \* A \* CTG / iSpC3 // 3ThioMC3-D / -3' (31) Especificamente, o oligo de DNA foi modificado com um S—Ligação S no terminal 3' através de um espaçador C3, e MB no terminal 5' através de um modificador amino. Um espaçador interno C3 foi incorporado para alongar o braço espaçador. Ligações de fosforotioato foram introduzidas para inibir o DNA da degradação da DNase.

O romance *S. aureus* a sequência de aptâmero é 5' - / 5ThioMC6-D / TC-GGCACGTTCTCAGTAGCGCTCGTGGTCATCCACAGC-TACGTC / 3MeBIN / -3' (32) Especificamente, o oligo de DNA foi modificado com um S—Ligação S no terminal 5' através de um espaçador C6, e MB no terminal 3' através de um modificador amino.

A nova sequência de aptâmero de TNF de camundongo é 5' - / 5ThioMC6-D / GCGCCACTACAGGGGAGCTGCCATTGCAATAGGTGGGC-CGC / 3MeBIN / -3' (57) Especificamente, o oligo de DNA foi modificado com um S—Ligação S no terminal 5' através de um espaçador C6, e MB no terminal 3' através de um modificador amino.

### Preparação do sensor de pH

Os eletrodos de base foram primeiramente limpos com acetona e etanol com limpador ultrassônico, respectivamente. Para eletropolimerizar a camada PANI, solução de 0,1 M de anilina / 0,1 M de HCl foi descartada em toda a área de operação eletroquímica, seguida por CV de -0,2 a 1 V por 25 ciclos a 100 mV s<sup>-1</sup> usando um potenciostato (CompactStat.h, Ivium, doravante o mesmo).

### Preparação dos aptasensores

Após a preparação do sensor de pH, os eletrodos foram primeiramente enxaguados com água ultrapura esterilizada abundante (Milli-Q) (doravante referida como "água ultrapura") e secos sob N<sub>2</sub>. Em seguida, a dispersão de AuNPs-GP foi lançada em cada eletrodo de trabalho e seca. Os eletrodos de trabalho modificados com AuNPs-GP foram enxaguados com água ultrapura abundante, seguido por uma segunda lavagem com água destilada livre de DNase / RNase (doravante referida como "água destilada"). Oligos (100 -M) foram reduzidos por TCEP 10 mM à temperatura ambiente durante 1 hora para clivar o S—Ligação S. Consecutivamente, os oligos foram então diluídos para 10-M usando tampão TE e agitados em vórtice por 10 s para ajudar a dispersar. Dez micromolar de TNF-, IL-6, IL-8, TGF - 1 e *S. aureus* a dispersão de aptâmero foi colocada em cada eletrodo de trabalho, respectivamente, e incubada hermeticamente à temperatura ambiente por 6 horas. Os eletrodos imobilizados por aptâmero foram subsequentemente enxaguados com água ultrapura abundante, seguido por uma segunda lavagem com água destilada. Três milimolares de MCH foram colocados em cada eletrodo de trabalho e incubados hermeticamente à temperatura ambiente

durante a noite. Por último, após serem enxaguados com água ultrapura abundante, seguida por uma segunda lavagem com água destilada, os aptasensores estavam prontos para uso.

### Analizador eletroquímico sem fio

Inspirando-se no detector eletroquímico sem fio universal de código aberto (UWED) (58), projetamos e fabricamos um analisador eletroquímico sem fio para realizar um monitoramento abrangente de feridas crônicas. Ao contrário do UWED, que foi projetado para operar em um único canal com uma célula comercial de três eletrodos, nosso dispositivo é um projeto multicanal, capaz de realizar várias técnicas de análise com nosso sensor de 10 eletrodos.

#### Design de hardware

Os principais componentes incluem o conversor digital-analógico (DAC), filtro passa-baixa, potenciostato, chaves analógicas, multiplexador, circuito sensor de temperatura e, por último, o microcontrolador RFduino. O hardware foi feito para fazer interface com o imunossensor descrito nas seções anteriores. Usando o Autodesk Eagle 9.3.0, os esquemas do circuito foram projetados primeiro, conforme mostrado na fig. S11. Posteriormente, projetamos os layouts de componentes e fios para o protótipo de PCB de duas camadas e o FPCB, mostrado na fig. S12. Ambos os projetos foram fabricados e parcialmente montados usando um serviço de PCB pronto para uso (Interhorizon Corporation Pte. Ltd., Cingapura). Inspecionamos os PCBs com um microscópio e um multímetro para garantir as conexões corretas entre todos os componentes (tabela S2).

#### Microcontrolador, DAC, filtro e potenciostato

Adotamos o microcontrolador, DAC, filtro e potenciostato do UWED. No núcleo do nosso dispositivo, usamos o microcontrolador RFduino, que é um processador ARM de 32 bits de baixo custo. O pacote do chip RFduino incorpora muitas portas de entrada-saída de uso geral (GPIO) e um barramento I2C para fazer a interface com componentes periféricos, bem como um conversor analógico-digital de 10 bits integrado para a amostragem de dados de medição. Além disso, é compatível com o ambiente de desenvolvimento Arduino e possui um front-end BLE integrado para se comunicar com um dispositivo móvel habilitado para BLE, como um telefone ou tablet. O DAC recebe entrada de tensão digital do microcontrolador por meio do protocolo I2C e saídas de tensão analógica para o eletrodo de trabalho (WE) e o eletrodo de referência (RE) por meio de dois canais separados. Um filtro passa-baixa de segunda ordem usando amplificadores operacionais (op amp) foi incluído para minimizar o ruído elétrico no potencial RE. Os potenciais WE são ajustados diretamente da segunda saída do DAC. **Chaves analógicas e multiplexador**

Para realizar operações multitécnicas e multicanais, usamos interruptores analógicos e um componente de circuito integrado de multiplexador (IC) (multiplexador triplo três para um IC, Analog Devices Inc., ADG793G) para realizar a lógica de hardware necessária, controlável usando protocolo GPIO e I2C, respectivamente. Os interruptores analógicos são importantes para permitir a alternância entre diferentes técnicas. Para suportar medições amperométricas (SWV) e potenciométricas (OCP), usamos um conjunto de duas chaves (S1 e S2; Fig. 1F) para alternar o amplificador operacional OP2 entre um amplificador de transimpedância e uma configuração de seguidor de tensão. Interruptores adicionais são usados para realizar a lógica de hardware necessária para suportar a comutação entre OCP, SWV e medição de temperatura, enquanto o IC do multiplexador permite uma seleção programável de cada canal WE.

#### Circuito de detecção de temperatura

O circuito de detecção de temperatura foi projetado com base na configuração do amplificador diferencial da ponte Wheatstone, que

permite a medição precisa da resistência. A ponte de Wheatstone usa dois caminhos divisores de tensão para estabelecer um ponto de equilíbrio, no qual um pequeno desvio na resistência do sensor de temperatura produziria uma tensão diferencial na saída do amplificador operacional. O resistor de balanceamento foi escolhido para ser 2,26 kilohm, e o amplificador de instrumentação AD627ARZ configurado para um ganho de 25 foi usado.

#### Aplicativo MATLAB personalizado

Um aplicativo móvel foi desenvolvido usando o MATLAB 2018b para acompanhar o VeCare, fornecendo uma GUI, bem como processamento de dados e relatórios abrangentes. Pode ser executado em qualquer computador pessoal ou tablet móvel que suporte MATLAB 2018b, com a ajuda de um adaptador BLE-para-USB. O aplicativo foi projetado como um sistema de gerenciamento de paciente onestop, registro de dados, análise de dados e visualização de resultados, destinado ao uso do profissional de saúde. Ao ligar o VeCare, uma conexão BLE foi estabelecida para o aplicativo usando identificadores exclusivos universalmente. Depois disso, o provedor de cuidados de saúde pode usar o aplicativo para gerenciar perfis de pacientes, coletar dados do sensor, obter feedback visual da GUI em tempo real, analisar os dados e gerar resultados úteis, bem como registrá-los nos respectivos perfis para monitoramento por um período prolongado. Capturas de tela das guias relevantes na GUI são mostradas na fig. S13. Uma demonstração do aplicativo móvel foi gravada nos filmes S9 a S11.

#### Fonte de energia

O hardware VeCare pode ser alimentado por um único recarregável Bateria de polímero de íon-lítio 3,7-V com a capacidade desejada. Em nossa implementação, foi utilizada uma bateria com capacidade de 190 mAh (fig. S12H), que fornece cerca de 40 horas de operação ativa contínua. Por ser um dispositivo de diagnóstico point-of-care, a vida útil real da bateria pode ser significativamente mais longa, dependendo da frequência com que ela precisa estar ativa. CIs reguladores de baixa queda (MICREL MIC5205-3.3YM5) foram usados para produzir fontes de alimentação digitais e analógicas de 3,3 V separadas, respectivamente atendendo ao microcontrolador RFDuino e aos componentes periféricos analógicos, criando circuitos digitais e analógicos separados para evitar que o ruído digital degradasse o desempenho analógico.

### Análise qualitativa e caracterização do imunossensor

A avaliação qualitativa dos aptasensores foi realizada em K 5 mM<sub>3</sub>Fe (CN) <sub>6</sub> / K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> (1: 1) contendo KCl 0,1 M descartado em toda a área de operação eletroquímica. Para medição de CV, a faixa de potencial é de -0,6 a 0,6 V em diferentes taxas de varredura (150 a 10 mV s<sup>-1</sup>) para a análise de quase reversibilidade do eletrodo modificado por AuNPs-GP, enquanto a taxa de varredura é fixada em 50 mV s<sup>-1</sup> para a análise de montagem passo a passo. Para medição EIS, o potencial aplicado é de 0,2 V. As frequências de tensão variam de 100 kHz a 0,01 Hz com uma amplitude de 5 mV. O circuito Randles foi usado para ajustar as parcelas de Nyquist.

Os sensores de citocinas foram caracterizados em soro humano com analitos enriquecidos (reconstituídos em PBS). A cultura e a contagem de bactérias foram realizadas antes da caracterização de *S. aureus*. Resumidamente, um *S. aureus* a colônia de uma placa de raia foi inoculada em 10 ml de caldo LB esterilizado (doravante referido como "caldo LB") e deixada crescer a 37 ° C por 17 horas a 200 rpm. Um mililitro do inóculo e seu diluente em série foram respectivamente misturados com 15 ml de meio TSA esterilizado para cultura em placa de vazamento. Após a incubação, a placa com colônias isoladas visíveis mostrando entre 30 e 300 foi

usado para estimar o *S. aureus* densidade celular no inóculo original. Subseqüentemente, *S. aureus* foi sedimentado após ser centrifugado a 4000 rpm por 5 min e reconstituído em soro humano para caracterização do sensor. A medição de SWV para aptasensores foi varrida de -0,8 a 0 V com um potencial de passo de 4 mV. A frequência é de 50 Hz com amplitude de pulso de 40 mV. Além disso, as soluções com valores de pH 3,76, 4,56, 5,47, 6,2, 7,06 e 8,04 utilizadas para a caracterização do sensor de pH foram preparadas por uma mistura de soro e tampão McIlvaine, enquanto a solução com pH 9,01 foi obtida por uma mistura de soro e tampão de pH 10,00. O sensor de temperatura foi caracterizado em um béquer de vidro contendo água cuja temperatura era regulada por uma placa de aquecimento embaixo do béquer.

A estabilidade a longo prazo dos aptasensores ou sensor de pH foi estudada pela observação das variações semanais longitudinais da altura do pico contra nenhum analito ou OCP em pH 7,06 por quatro semanas consecutivas. O imunossensor foi armazenado hermeticamente e a 4 ° C entre cada medição.

#### Monitoramento de feridas in situ e estudo de biocompatibilidade em modelos de camundongos

##### Caracterização do TNF- de camundongo- sensor

A Figura S14A mostra o desempenho do aptasensor em relação ao analito com diferentes concentrações. Observou-se que a altura da corrente de pico diminui com o aumento da concentração alvo. A redução relativa da altura do pico normalizada para a altura do pico contra nenhum analito com concentração de analito é exibida na fig. S14B. Notavelmente, a faixa de concentração de TNF de camundongo - (0 a 1800 pg ml<sup>-1</sup>) foi baseado nos níveis relatados em tecidos de feridas de modelos de camundongos (50

##### Procedimentos de animais

Todos os procedimentos com animais foram realizados sob o protocolo número A0367, aprovado pelo Comitê de Uso e Cuidado Animal Institucional do Animal Research Facility da Universidade Tecnológica de Nanyang. Os camundongos foram alojados em gaiolas individuais ventiladas ao longo de um ciclo claro / escuro de 12 horas. Eles foram alimentados com uma dieta padrão de laboratório e água ad libitum. Neste estudo, camundongos machos do Instituto de Pesquisa do Câncer (ICR) (IcrTac: ICR, fornecido por InVivos, Cingapura) foram usados com 10 a 12 semanas de idade e peso de 25 a 35 g. Isoflurano inalado (5% mg kg<sup>-1</sup>) foi usado para induzir a anestesia, que foi verificada por meio do teste do reflexo do pedal. O dorso do animal foi preparado por meio de raspagem com aparador elétrico, com cuidado para não induzir nenhum trauma com a navalha. Creme depilatório foi então aplicado na pele raspada por 2 min. O cabelo e o creme foram retirados com água morna e gaze. Uma gaze limpa e seca foi usada para limpar todo o creme removedor de cabelo restante para garantir nenhum risco de irritação ou lesões na pele. Os animais foram injetados por via subcutânea com buprenorfina (1,5 mg kg<sup>-1</sup>) antes do ferimento e diariamente durante 3 dias após o ferimento e nos dias da colocação do sensor. Para produzir feridas excisionais de espessura total no dia 0, a pele posterior dos camundongos foi retirada do dorso e um punção de biópsia de 6 mm usado para incisar e realizar a ferida através do panículo carnoso. Esta técnica foi usada para produzir duas feridas bilaterais equidistantes da linha média e espaçadas de cada lado do dorso. Uma gaze limpa e seca foi usada para remover todo o sangue resultante do procedimento cirúrgico. Somente quando o sangramento parou, o que aconteceu muito rapidamente nos camundongos, a gaze foi removida. Um imunossensor (diâmetro de 8 mm) foi colocado em cada ferida, enquanto a outra ferida foi usada como controle. A ferida com contato do sensor e o controle foram atribuídos aleatoriamente.

Um grande curativo único de OPSITE (Smith e Nephew) foi então usado para cobrir as costas inteiras. O imunossensor foi deixado no local por 1 hora com os animais autorizados a se recuperar em seu alojamento normal, antes que as leituras fossem feitas sob anestesia. Um volume estimado de 5  $\mu$ l de exsudado da ferida foi acumulado em uma taxa de fluxo de até 0,43 mm<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>, que foi suficiente para as leituras do sensor (fig. S8A). Antes da medição, a estabilização dos sinais foi confirmada quando a variação da altura do pico de três varreduras contínuas estava abaixo de 1% (nível de ruído). O imunossensor foi removido após o uso e o curativo substituído.

**Corte e coloração de processamento de tecido** Os animais foram sacrificados via CO<sub>2</sub> inalação, com a luxação cervical usada como meio secundário para confirmar a morte. Os animais foram sacrificados em 1, 3 e 5 dias após o ferimento ( $n = 3$  por ponto no tempo). A pele posterior foi extirpada em um grande pedaço e colocada em um cartão liso. As feridas foram excisadas e fixadas em paraformaldeído a 4% durante pelo menos 24 horas e armazenadas a 4 ° C. Após a fixação, as amostras foram transferidas para etanol 70% (v / v) por 24 horas antes do processamento em um processador de tecidos HistoCore PEARL (Leica). Os tecidos são colocados através de um gradiente de concentração de etanol (70, 80, 95 e 100%  $\times 3$ , 45 min, 45 ° C) seguido por xileno (3  $\times$  45 min, 45 ° C) e parafina (3  $\times$  45 min, 62 ° C) e, em seguida, transferidos para um embedder de tecido de cera de parafina (HistoCore Arcadia C e H, Leica). Em seguida, cortes de tecido de 4  $\mu$ m foram produzidos em um micrótomo Leica RM2245 (Leica) e fixados em lâminas de polisina. Estes foram secos a 40 ° C durante pelo menos uma hora antes da coloração. A coloração H&E foi obtida usando um Leica Autostainer XL (Leica).

#### Microscopia de campo claro e análise de imagem

As imagens das feridas foram tiradas diariamente após a leitura do sensor ou durante as trocas de curativos com uma câmera (Nikon D5600) com escala e referência de cor. As medições da área da ferida foram obtidas usando ImageJ (National Institutes of Health). Os tecidos corados com H&E foram fotografados usando um scanner de lâmina Axio Scan.Z1 com objetiva de 20  $\times$  (Zeiss). As imagens foram examinadas qualitativamente e exportadas usando ZEN (Zeiss). Uma análise quantitativa adicional foi realizada em imagens exportadas usando ImageJ. A espessura da epiderme foi medida a 150  $\mu$ m atrás da borda de ataque em ambos os lados de cada ferida e os valores foram calculados para cada amostra. A medição da distância de reepitelização para cada amostra foi obtida medindo-se o comprimento da epiderme nascente saindo da borda da ferida em ambos os lados de cada ferida usando ImageJ e a média.

#### Estudo clínico sobre os exsudatos da ferida de pacientes com úlcera venosa

O estudo foi conduzido no Singapore General Hospital (SGH) e aprovado pelo SingHealth Centralized Institutional Review Board A (Ref: 2018/3061). Os participantes são pacientes que foram diagnosticados com úlceras venosas e tratados com bandagem de compressão de quatro camadas. Suas feridas foram tratadas pela equipe de cirurgia vascular da SGH. Pacientes com idade acima de 21 anos com índice de pressão tornozelo-braquial  $\geq 0,8$  e ulceração aberta entre tornozelo e joelho que não diminuiu de tamanho por mais de 12 semanas foram considerados elegíveis para participar. Cinco pacientes (três homens e duas mulheres; faixa etária de 57 a 77 anos) foram recrutados nos ambulatórios vasculares e deram seu consentimento para participar. Os exsudatos da ferida eram

coletados uma vez por semana em sua mudança semanal de curativo programada por cinco semanas consecutivas usando um protocolo padrão (6, 19) Resumidamente, após a retirada dos curativos de quatro camadas, a ferida foi limpa com soro fisiológico e coberta por um curativo de filme transparente. A perna correspondente foi mantida dependente da posição sentada por ~ 40 min. O exsudato acumulado de todas as feridas da perna afetada foi aspirado do curativo de filme transparente usando uma agulha hipodérmica e seringa. Em vista do vazamento vascular no desbridamento pós-conservador que pode comprometer o perfil do biomarcador, a amostragem do fluido da ferida foi realizada antes do desbridamento conservador. O tamanho da úlcera foi medido pelo método da régua. Curativos tópicos impregnados com anti-séptico (por exemplo, cadexômero de iodo e prata nanocristalina) foram usados para feridas com colonização. Eles foram colocados nas feridas após o desbridamento conservador e antes da aplicação de bandagens de quatro camadas frescas.

A avaliação rápida e simultânea das características do leito da ferida e biomarcadores de carga biológica nos exsudatos da ferida foi realizada usando o VeCare. Por outro lado, os exsudatos da ferida também foram analisados por métodos convencionais. Resumidamente, para conduzir a avaliação de citocinas, um kit multiplex ELISA foi feito sob medida pela Thermo Fisher Scientific e foi realizado de acordo com as instruções do fabricante em amostras puras. A leitura foi feita no Luminex 200 com xPONENT 3.1 e a concentração das citocinas foi determinada no MasterPlex QT 2.0.0.59. Além disso, os valores de pH das amostras de fluido da ferida foram medidos usando um medidor de pH comercial (LAQUAtwin pH-33, HORIBA). *S. aureus* foi detectado via coagulase-positiva *Estafilococos* enumeração. Resumidamente, 10  $\mu$ l de exsudato da ferida foram primeiro diluídos em 10 ml de caldo LB, seguido por diluição em série. Um mililitro do diluente original e seu diluente em série foram respectivamente misturados com 15 ml de RAPID 'esterilizado *Staph* meio ágar, uma mistura de meio base e gema de ovo com potássio, para cultura em placa de despejo. Após a incubação, *S. aureus* formaram colônias pretas no meio opaco com um halo claro ao redor das colônias atribuídas à proteólise da gema de ovo. O número de *S. aureus* colônias em um RAPID ' *Staph* placa de ágar mostrando entre 30 e 300 foi usada para estimar o *S. aureus* densidade celular na amostra de exsudado da ferida. Imagens ópticas do RAPID ' *Staph* as placas de ágar para avaliação do fluido da ferida dos pacientes 1 a 5 são mostradas nas figs. S15 a S19.

#### análise estatística

GraphPad Prism 8 e R (versão 3.6.1) foram usados para realizar testes estatísticos e visualização de dados. Na comparação de dois grupos, foi utilizado o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon.  $P < 0,05$  foi considerado significativo. Os pacotes R ggplot2 (versão 3.0.0) (59) e Ggally (versão 1.4.0) (60) foram usados para representar graficamente as matrizes de correlação.

#### MATERIAIS COMPLEMENTARES

O material suplementar para este artigo está disponível em <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/7/21/eabg9614/DC1>

#### REFERÊNCIAS E NOTAS

1. F. Mannello, D. Ligi, M. Canale, JD Raffetto, Perfis de Omics em fluido de ferida de úlcera venosa crônica: aplicações inovadoras para medicina translacional. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 737-762 (2014).
2. MS Brown, B. Ashley, A. Koh, Tecnologia vestível para monitoramento de feridas crônicas: curativos atuais, avanços e perspectivas futuras. *Frente. Bioeng. Biotechnol.* **6**, 47 (2018).



3. EA Nelson, U. Adderley, Venous leg ulcers. *BMJ Clin. Evid* **2016**, 1902 (2016).
4. LPF Abbade, S. Lastória, Úlcera venosa: Epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. *Int. J. Dermatol* **44**, 449-456 (2005).
5. SL Drinkwater, A. Smith, KG Burnand, O que os fluidos da ferida podem nos dizer sobre o microambiente da úlcera venosa? *Int. J. Low. Extrem. Ferimentos* **1**, 184-190 (2002).
6. NJ Trengove, MC Stacey, S. Macauley, N. Bennett, J. Gibson, F. Burslem, G. Murphy, G. Schultz, Análise dos ambientes de feridas agudas e crônicas: O papel das proteases e seus inibidores. *Regen de reparo de feridas*. **7**, 442-452 (1999).
7. H. Derakhshandeh, SS Kashaf, F. Aghabaglou, IO Ghanavati, A. Tamayol, Bandagens inteligentes: O futuro do cuidado de feridas. *Trends Biotechnol.* **36**, 1259-1274 (2018).
8. Y. Yang, W. Gao, Eletrônica usável e flexível para monitoramento molecular contínuo. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 1465-1491 (2019).
9. M. Ochoa, R. Rahimi, B. Ziaie, em *Bioeletrônica extensível para dispositivos e sistemas médicos*, JA Rogers, R. Ghaffari, D.-H. Kim, Eds. (Springer International Publishing, 2016), pp. 207-226.
10. T. Guinovart, G. Valdés-Ramírez, JR Windmiller, FJ Andrade, J. Wang, sensor potenciométrico wearable baseado em bandagem para monitorar o pH da ferida. *Eletrônica* **26**, 1345-1353 (2014).
11. P. Mostafalu, A. Tamayol, R. Rahimi, M. Ochoa, A. Khalilpour, G. Kiaee, IK Yazdi, S. Bagherifard, MR Dokmeci, B. Ziaie, SR Sonkusale, A. Khademhosseini, Bandagem inteligente para monitoramento e tratamento de feridas crônicas. *Pequena* **14**, 1703509 (2018).
12. P. Mostafalu, W. Lenk, MR Dokmeci, B. Ziaie, A. Khademhosseini, SR Sonkusale, Bandagem inteligente flexível sem fio para monitoramento contínuo de oxigenação de feridas. *IEEE Trans. Biomédico. Circuits Syst.* **9**, 670-677 (2015).
13. P. Kassal, J. Kim, R. Kumar, WR de Araujo, IM Steinberg, MD Steinberg, J. Wang, bandagem inteligente com conectividade sem fio para o biossensor de ácido úrico como um indicador do status da ferida. *Electrochem. Comum* **56**, 6-10 (2015).
14. SL Swisher, MC Lin, A. Liao, EJ Leeflang, Y. Khan, FJ Pavinatto, K. Mann, A. Naujokas, D. Young, S. Roy, MR Harrison, AC Arias, V. Subramanian, MM Maharbiz, dispositivo de detecção de impedância permite a detecção precoce de úlceras de pressão in vivo. *Nat. Comum* **6**, 6575 (2015).
15. MW Löffler, H. Schuster, S. Bühler, S. Beckert, Wound fluido in diabetic foot ulceration: More than just an undefined soup? *Int. J. Low. Extrem. Ferimentos* **12**, 113-129 (2013).
16. HJ Wallace, MC Stacey, Níveis de fator de necrose tumoral - (TNF -) e receptores solúveis de TNF em úlceras venosas crônicas da perna - correlações com o estado de cura. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 292-296 (1998).
17. NJ Trengove, H. Bielefeldt-Ohmann, MC Stacey, atividade mitogênica e níveis de citocina em úlceras crônicas de perna que não cicatrizam e cicatrizam. *Regen de reparo de feridas*. **8**, 13-25 (2000).
18. LE Edsberg, JT Wyffels, MS Brogan, KM Fries, Análise do perfil proteômico de úlceras de pressão crônicas. *Regen de reparo de feridas*. **20**, 378-401 (2012).
19. MS Gohel, RAJ Windhaber, JF Tarlton, MR Whyman, KR Poskitt, A relação entre as concentrações de citocinas e a cura de feridas na ulceração venosa crônica. *J. Vasc. Surg.* **48**, 1272-1277 (2008).
20. G. Power, Z. Moore, T. O'Connor, Medição de pH, composição do exsudato e temperatura na cicatrização de feridas: Uma revisão sistemática. *J. Tratamento de feridas* **26**, 381-397 (2017).
21. S. Ono, R. Imai, Y. Ida, D. Shibata, T. Komiya, H. Matsumura, Aumento do pH da ferida como um indicador de infecção local da ferida em queimaduras de segundo grau. *Queimaduras* **41**, 820-824 (2015).
22. SL Percival, S. McCarty, JA Hunt, EJ Woods, Os efeitos do pH na cicatrização de feridas, biofilmes e eficácia antimicrobiana. *Regen de reparo de feridas*. **22**, 174-186 (2014).
23. LA Schneider, A. Korber, S. Grabbe, J. Dissemont, Influência do pH na cicatrização de feridas: Uma nova perspectiva para a terapia de feridas? *Arco. Dermatol. Res* **298**, 413-420 (2007).
24. EM Jones, CA Cochrane, SL Percival, O efeito do pH na matriz extracelular e biofilmes. *Adv. Tratamento de feridas* **4**, 431-439 (2014).
25. RD Wolcott, JD Hanson, EJ Rees, LD Koenig, CD Phillips, RA Wolcott, SB Cox, JS White, Análise da microbiota de feridas crônicas de 2.963 pacientes por pirosequenciamento de 16S rDNA. *Regen de reparo de feridas*. **24**, 163-174 (2016).
26. J. Li, Y. Song, H. Zheng, S. Feng, W. Xu, Z. Wang, Designing biomimetic liquid diodes. *Matéria Macia* **15**, 1902-1915 (2019).
27. P. Comanns, G. Buchberger, A. Buchsbaum, R. Baumgartner, A. Kogler, S. Bauer, W. Baumgartner, Direcional, transporte passivo de líquidos: O lagarto com chifres do Texas como um modelo para um 'díodo líquido' biomimético. *JR Soc. Interface* **12**, 20150415 (2015).
28. Y. Liu, Q. Zhou, A. Revzin, An aptasensor for electrochemical detect of tumor necrosis factor in human blood. *Analista* **138**, 4321-4326 (2013).
29. VA Spiridonova, TM Novikova, OV Snigirev, Obtaining DNA aptamers to human interleukin-6 for biomagnetic immunoassay nanosensors. *Mosc. Univ. Phys. Touro* **71**, 135-138 (2016).
30. HJ Sung, S. Choi, JW Lee, CY Ok, YS Bae, YH Kim, W. Lee, K. Heo, IH Kim, Inibição da atividade de neutrófilos humanos por um aptâmero de RNA ligado à interleucina-8. *Biomateriais* **35**, 578-589 (2014).
31. Z. Matharu, D. Patel, Y. Gao, A. Haque, Q. Zhou, A. Revzin, Detecting transforming growth factor-- release from liver cells using an aptasensor integrado with microfluidics. *Anal. Chem.* **86**, 8865-8872 (2014).
32. S. Ranjbar, S. Shahrokhan, Projeto e fabricação de um aptasensor eletroquímico usando nanopartículas de Au / nanopartículas de carbono / nanocompósitos de nanofibras de celulose para detecção rápida e sensível de *Staphylococcus aureus*. *Bioeletrônica* **123**, 70-76 (2018).
33. OS Kwon, SJ Park, J.-Y. Hong, A.-R. Han, JS Lee, JS Lee, JH Oh, J. Jang, aptasensor VEGF tipo FET flexível baseado em grafeno dopado com nitrogênio convertido de polímero condutor. *ACS Nano* **6**, 1486-1493 (2012).
34. N. Arroyo-Currás, J. Somerson, PA Vieira, KL Ploense, TE Kippin, KW Plaxco, medição em tempo real de pequenas moléculas diretamente em animais despertos e ambulatoriais. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **114**, 645-650 (2017).
35. Z. Hao, Z. Wang, Y. Li, Y. Zhu, X. Wang, CG de Moraes, Y. Pan, X. Zhao, Q. Lin, Medição de biomarcadores de citocina usando um nanossensor de grafeno de afinidade baseado em aptâmero em um substrato flexível para aplicações vestíveis. *Nanoescala* **10**, 21681-21688 (2018).
36. Q. Liu, C. Zhao, M. Chen, Y. Liu, Z. Zhao, F. Wu, Z. Li, PS Weiss, AM Andrews, C. Zhou, Flexible multiplexed In2O3 transistores de efeito de campo de aptâmero nanoribbon para biossensorio. *isience* **23**, 101469 (2020).
37. Z. Wang, Z. Hao, X. Wang, C. Huang, Q. Lin, X. Zhao, Y. Pan, A Flexible and regenerative aptameric graphene-Nafion biossensor for cytokine storm biomarker monitoring in uniluted biofluids to wearable applications. *Adv. Funct. Mater.* **31**, 2005958 (2021).
38. O. Parlak, A. İncel, L. Uzun, APF Turner, A. Tiwari, Structuring Au nanoparticles on bidimensional MoS2 nanofolhas para biossensores eletroquímicos de glicose. *Biosens. Bioeletron.* **89**, 545-550 (2017).
39. S. Verma, A. Singh, A. Shukla, J. Kaswan, K. Arora, J. Ramirez-Vick, P. Singh, SP Singh, Anti-IL8 / AuNPs-rGO / ITO as an immunosensing platform for noninvasive detecção eletroquímica de câncer oral. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 27462-27474 (2017).
40. L. Wu, X. Lu, X. Fu, L. Wu, H. Liu, Gold nanoparticles dotted redução de óxido de grafeno nanocompósito baseado em aptasensor eletroquímico para detecção de PCB77 seletiva, rápida, sensível e específica para congêneres. *Sci. Rep.* **7**, 5191 (2017).
41. C. Cao, F. Zhang, EM Goldys, F. Gao, G. Liu, Advances in structure-switching aptasensing para a detecção em tempo real de citocinas. *TRAC Trends Anal. Chem.* **102**, 379-396 (2018).
42. L. Farzin, M. Shamsipur, L. Samandari, S. Sheibani, Advances in the design de afinidade eletroquímica baseada em nanomateriais e biossensores enzimáticos para biomarcadores metabólicos: Uma revisão. *Microchim. Acta* **185**, 276 (2018).
43. G. Liu, M. Qi, MR Hutchinson, G. Yang, EM Goldys, Recentes avanços na detecção de citocinas por imunossensor. *Biosens. Bioeletron.* **79**, 810-821 (2016).
44. S. Su, H. Sun, W. Cao, J. Chao, H. Peng, X. Zuo, L. Yuwen, C. Fan, L. Wang, Dual-target electrochemical biosensing based on DNA structure switching on gold MoS decorated com nanopartículas: nanofolhas. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 6826-6833 (2016).
45. R. Zillmer, H. Trøstrup, T. Karlsmark, P. Iversen, MS Ågren, Duração da secreção de fluido da ferida de úlceras venosas crônicas da perna é crítica para interleucina-1-, interleucina-1-, níveis de interleucina-8 e fibroblasto ativação. *Arco. Dermatol. Res* **303**, 601-606 (2011).
46. PG Bowler, BI Duerden, DG Armstrong, Microbiologia de feridas e abordagens associadas à gestão de feridas. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 244-269 (2001).
47. S. DeLeon, A. Clinton, H. Fowler, J. Everett, AR Horswill, KP Rumbaugh, Synergistic interações de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em um modelo de ferida in vitro. *Infectar. Immun.* **82**, 4718-4728 (2014).
48. HYY Nyein, W. Gao, Z. Shahpar, S. Emaminejad, S. Challa, K. Chen, HM Fahad, LC Tai, H. Ota, RW Davis, A. Javey, uma plataforma eletroquímica vestível para monitoramento simultâneo não invasivo de Ca<sup>2+</sup> e pH. *ACS Nano* **10**, 7216-7224 (2016).
49. W. Gao, S. Emaminejad, HYY Nyein, S. Challa, K. Chen, A. Peck, HM Fahad, H. Ota, H. Shiraki, D. Kiriya, DH Lien, GA Brooks, RW Davis, A. Javey, Matrizes de sensores vestíveis totalmente integrados para análise de respiração in situ multiplexada. *Natureza* **529**, 509-514 (2016).
50. M. Ritsu, K. Kawakami, E. Kanno, H. Tanno, K. Ishii, Y. Imai, R. Maruyama, M. Tachi, Critical role of tumor necrosis factor-- in the early process of ferido curing in pele. *J. Dermatol. Dermatol. Surg.* **21**, 14-19 (2017).
51. Y. Guo, RI Ramos, JS Cho, NP Donegan, AL Cheung, LS Miller, Imagem de bioluminescência in vivo para avaliar antibióticos tópicos e sistêmicos contra resistentes à metilicina adquiridos na comunidade *Staphylococcus aureus* infectadas com feridas de pele em camundongos. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 855-863 (2013).
52. JES Sutcliffe, KY Chin, C. Thrasivoulou, TE Serena, S. O'Neil, R. Hu, AM White, L. Madden, T. Richards, ARJ Phillips, DL Becker, expressão anormal da conexina em feridas crônicas humanas. *Br. J. Dermatol.* **173**, 1205-1215 (2015).
53. C. Nedeve, J. Menassa, H. Puthalakath, Sepsis: Inflammation is a needed evil. *Frete. Cell Dev. Biol.* **7**, 108 (2019).
54. HP Ehrlich, TK Hunt, função crítica da organização de colágeno na contração da ferida. *Adv. Tratamento de feridas* **1**, 3-9 (2012).

55. A. Tankersley, MB Frank, M. Bebak, R. Brennan, Early effects of *Staphylococcus aureus* produtos secretados por biofilme em respostas inflamatórias de queratinócitos epiteliais humanos. *J. Inflamm.* **11**, 17 (2014).
56. J. Escandon, AC Vivas, R. Perez, R. Kirsner, S. Davis, um estudo piloto prospectivo da eficácia da terapia de ultra-som em úlceras venosas de perna refratárias. *Int. Wound J*, 570-578 (2012).
57. W.-Y. Lai, J.-W. Wang, B.-T. Huang, EP.-Y. Lin, P.-C. Yang, A novel TNF --- targeting aptâmero para TNF --- lesão pulmonar aguda e insuficiência hepática aguda. *Teranóstica* **9**, 1741-1751 (2019).
58. A. Ainla, MPS Mousavi, MN Tsaloglou, J. Redston, JG Bell, MT Fernández-Abedul, GM Whitesides, potenciostato de código aberto para detecção eletroquímica sem fio com smartphones. *Anal. Chem.* **90**, 6240-6246 (2018).
59. H. Wickham, *Ggplot2: gráficos elegantes para análise de dados* (Springer, 2009).
60. B. Schloerke, Di Cook, J. Larmanange, F. Briatte, M. Marbach, E. Thoen, A. Elberg, J. Crowley, GGally: Extension to 'ggplot2'. Pacote R versão 1.4.0 (2018); <https://CRAN.R-project.org/package=GGally>.

**Agradecimentos:** As ilustrações científicas nas Figs. 1 (A a C) e 3A são creditados a Z. Goh no Instituto de Inovação e Tecnologia em Saúde (iHealthtech), Universidade Nacional de Cingapura. As ilustrações científicas nas Figs. 1D e 3B e a imagem do lagarto na Fig. 1C são creditados a DP de Araujo da Unidade de Comunicações Científicas do Instituto de Mecanobiologia da Universidade Nacional de Cingapura. Agradecemos a JH Chng do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Nacional de Cingapura por fornecer *S. aureus* HG001. Agradecemos também a i-DNA Biotechnology pela assistência técnica no multiplex ELISA. Finalmente, agradecemos a ajuda de S. Mona do Nano and Microfabrication Core no Mechanobiology Institute, National University of Singapore, NLB Agus no SGH, e JC Yeo, L. Yu, K. Jiang e Kenry no MechanoBioEngineering Laboratory, National

Universidade de Cingapura. **Financiamento:** Esta pesquisa foi apoiada pela iHealthtech, a Iniciativa de Sistemas Eletrônicos Flexíveis Híbridos Integrados (HiFES) e o Laboratório de Mecanismo de Engenharia da Universidade Nacional de Cingapura. **Contribuições do autor:** YG e CTL conceberam a ideia e projetaram os experimentos. DTN e YG contribuiu com as simulações do COMSOL. YG e TY conduziram os experimentos com a ajuda de DTN, LJ, JYKL, JSH, IA, C.-HC e KPLDTN, JYKL e JSH contribuíram para o analisador eletroquímico sem fio. YG e CTL contribuíram para a demonstração esquemática. YG, TY, WXT, FABA, YJAL, SYA, SD / OM, DL e CTL contribuíram para o estudo clínico. YG, TY, LEM, MLLT, DLB e CTL contribuíram para o estudo animal. YG, SBL, LEM, DL, JSH e CTL contribuíram para a análise e interpretação dos dados. A SBL contribuiu com os designs do código R. YG, DTN, SBL, LEM, IA, DL, JSH e CTL escreveram o artigo. **Interesses competitivos:** Os autores declaram não ter interesses conflitantes. Um pedido de patente referente aos resultados apresentados no artigo foi concedido a data de depósito de 28 de maio de 2020, com o número de série. 10202005000P. **Disponibilidade de dados e materiais:** Todos os dados necessários para avaliar as conclusões do artigo estão presentes no artigo e / ou nos Materiais Suplementares. Dados adicionais relacionados a este artigo podem ser solicitados aos autores.

Enviado em 6 de fevereiro de 2021

Aceito em 31 de março de 2021

Publicado em 21 de maio de 2021

10.1126 / sciadv.abg9614

**Citação:** Y. Gao, DT Nguyen, T. Yeo, SB Lim, WX Tan, LE Madden, L. Jin, JYK Long, FAB Aloweni, YJA Liew, MLL Tan, SY Ang, SD Maniya, I. Abdelwahab, KP Loh, C.-H. Chen, DL Becker, D. Leavesley, JS Ho, CT Lim, Um imunossensor multiplexado flexível para monitoramento de feridas in situ em ponto de atendimento. *Sci. Adv.* **7**, eabg9614 (2021).

## Um imunossensor multiplexado flexível para monitoramento de feridas in situ em pontos de atendimento

Yuji GaoDat T. NguyenTrifanny YeoSu Bin LimWei Xian TanLeigh Edward MaddenLin JinJi Yong Kenan LongFazila Abu Bakar AloweniYi Jia Angela LiewMandy Li Ling TanShin Yuh AngSivagame D / O ManiyaIbrahim Abdelwahab Kian PinghCavid BeckD HohCavid Sair de Hung LohCavid D HohCavid.

*Sci. Adv.*, 7 (21), eabg9614. • DOI: 10.1126 / sciadv.abg9614

### Veja o artigo online

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abg9614>

### Permissões

<http://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

O uso do artigo think está sujeito ao [Termos de serviço](#)

---

**Avanços da Ciência** (ISSN 2375-2548) é publicado pela American Association for the Advancement of Science. 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. O título **Avanços da Ciência** é uma marca registrada da AAAS.

Copyright © 2021 Os autores, alguns direitos reservados; licenciado exclusivo American Association for the Advancement of Science. Nenhuma reivindicação de obras originais do governo dos EUA. Distribuído sob uma Licença de Atribuição Creative Commons 4.0 (CC BY).