

Biossensores de Grafeno para detecção do SARS-CoV-2 e outros vírus, tempo de resposta em 110s e sistema portátil.

A doença intitulada COVID pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) é causada pelo vírus SARS-CoV-2, membro de uma família de vírus caracterizados pelos fortes sintomas respiratórios causou o atual cenário da pandemia que aponta os estudos na área de biotecnologia como cada vez mais cruciais.

O diagnóstico da presença do vírus SARS-CoV-2 é geralmente realizado a partir de amostras de secreção nasal e orofaríngea coletado pelo *swab* ou pela própria saliva do paciente que seguem o protocolo de extração do RNA e amplamente diagnosticada pela metodologia RT-qPCR (do inglês, *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*) mas que fazem uso de diversos reagentes, precisa de profissionais laboratoriais para a execução e possui um tempo aproximado de no mínimo 24 horas para a devolução do resultado, muitas vezes chegando a mais. Este contexto abre espaço para que técnicas mais rápidas e eficientes se desenvolvam diagnósticos com maior facilidade tais como a utilização de tecnologias de biossensoriamento.

Os biossensores podem ser definidos como dispositivos analíticos que combinam um componente biológico com um detector físico-químico a fim de promover a identificação de uma substância química [1,4]. No intuito de aumentar a eficiência dos biossensores, a nanociência se apresenta como uma ferramenta na busca de nanomateriais que potencializam a eficiência dos mesmos e sejam biocompatíveis para as mais amplas aplicações na área da saúde.

Nesse sentido, materiais a base de carbono, como o grafeno, ganham destaque. Trata-se de uma estrutura bidimensional conhecida dentro da nanotecnologia, sintetizada pela primeira vez em laboratório em 2004. O grafeno, por ser um material bidimensional, apresenta excelentes propriedades tais como alta condutividade térmica, elétrica e alta resistência mecânica [5]. Dentre os tipos de grafeno, destacam-se os óxidos de grafeno (GO) e os óxidos de grafeno reduzido (RGO), que são duas variações obtidas pela oxidação do grafite. O primeiro é obtido pelo chamado método de Hummers-Offerman [6, 7], o segundo é feito mediante um processo de redução, que é fundamentalmente a eliminação parcial dos grupos funcionais que contém oxigênio. Esses óxidos de grafeno apresentam biocompatibilidade e, no caso do RGO, propriedades elétricas interessantes, o que faz dos materiais de grafeno ferramentas promissoras para aplicações em dispositivos nanoeletrônicos [5] e de biossensoriamento [8-11].

Neste sentido, nosso Laboratório de Novos Materiais de Carbono: Grafeno coordenado pela Profa. Dra. Ana Champi encontra-se liderando pesquisas de ponta neste material, trabalhando nas aplicações eletrônicas e de bioengenharia. Na equipe estão os estudantes Larissa Akashi, mestranda em Biosistemas/UFABC, Ronaldo Challhua, mestrando em Ciência e Engenharia de Materiais/UFABC, José Zúñiga, mestrando em Ciência e Engenharia de Materiais/UFABC e o Engenheiro Francisco José Obelenis, pesquisador colaborador e ex aluno da UFABC. Particularmente, em parceria com a 2MI e VRS Pesquisa e Desenvolvimento Eireli foi desenvolvido o biossensor de Grafeno com plataforma microfluídica para a detecção de interações entre o RNA e o c-DNA do vírus SARS-CoV-2 com o tempo de detecção do teste de apenas 110 segundos. O biossensor consiste em uma mini célula eletroquímica onde o eletrodo de trabalho é baseado em Grafeno, este projeto faz parte do Edital nº 48/2020-REIT de Pesquisas de Enfrentamento à Pandemia de COVID-19-UFABC e foi registrado como patente número de Processo INPI BR 10 2021 013981 1, título “ELETRODOS BASEADOS EM ÓXIDOS DE GRAFENO REDUZIDO PARA APLICAÇÕES EM DETECÇÃO VIRAL” [12]. A princípio são utilizadas

amostras de RNA extraídos, mas o grupo também comprovou a interação com amostras diretamente da saliva, dispensando todo o incômodo dos testes por *swab*. Os testes foram realizados em parceria com o Instituto Adolfo Lutz e com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) em Curitiba, com material de RNA e saliva negativos e positivos de Sars covid 2 via PCR. Primeiramente calibramos nosso biossensor e após estes procedimentos selecionamos os pulsos eletroquímicos que separam positivos dos negativos, desta forma eletronicamente associamos um led vermelho e verde para as respectivas respostas.

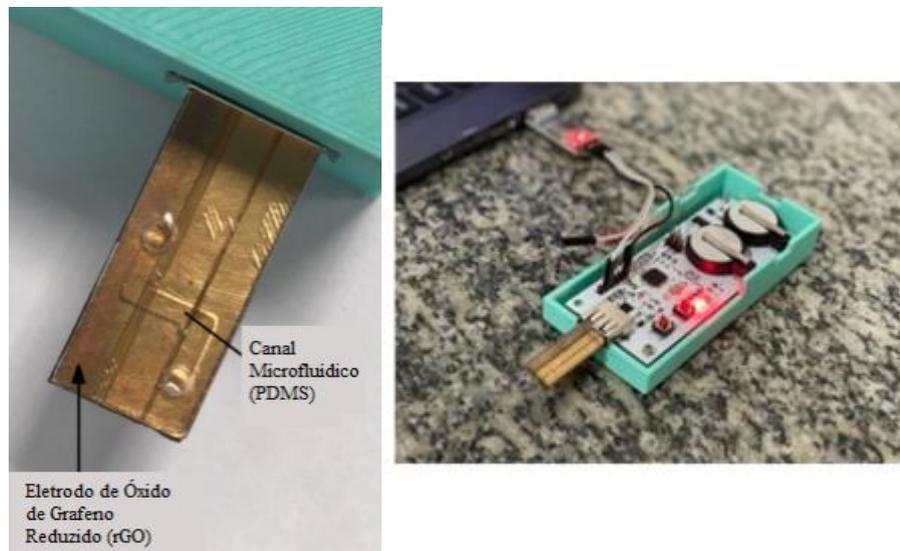


Figura 1 - Biossensor de grafeno desenvolvido no Laboratório de Novos Materiais de Carbono: Grafeno, Lab. 708- bloco L. Do lado direito a caixa de leitura aberta mostrando os circuitos, mini potenciostato e duas baterias de 3V cada, com o qual nosso sistema é portátil.

Os eletrodos são confeccionados sobre placas de fenolites cobreadas nas quais aplicamos processos de litografia óptica e depositamos Au pela técnica de sputtering, desta forma já partimos de um substrato de baixo custo. O Au permite eliminar a formação de óxidos de Cu e é biocompatível com fluido biológico que passará pelos três eletrodos: referência (ER), controle (EC) e trabalho (ET). Especificamente sobre o ET/Au uma camada fina de multicamadas de RGO estabilizado e sensibilizado com o material genético de c-DNA viral. Desta forma, o RGO que possui as vantagens de apresentar condutividade elétrica, biocompatibilidade e capacidade de adsorção de material genético [12] permite a interação do c-DNA com o RNAs virais presentes na saliva.

Os eletrodos de RGO são fabricados em nosso Lab; 708- bloco L e o canal microfluídico é fabricado utilizando PDMS e impressão 3D para os moldes. Desta forma, temos o biossensor o qual será inserido num leitor de medidas que utiliza um mini potenciostato previamente calibrado, como podemos visualizar na fig. 1. O funcionamento do protótipo pode ser observado no vídeo disponível em: https://youtu.be/cikXRALh_a0. A técnica consiste basicamente em identificar a alteração de uma variável elétrica baseada em uma resposta eletroquímica, utilizando um transdutor de sinal para a detecção de biomoléculas. Por esse sinal, é possível monitorar sinais de potencial ou corrente mensuráveis registrados durante a ligação do estímulo da interação das moléculas e gerados por reações de oxidação e redução que ocorrem devido a resposta do evento, causando alterações locais nas propriedades elétricas [13,14]. Essa alteração por sua vez é traduzida em intervalos de comportamentos característicos que diferenciam uma amostra positiva e negativa que é manifestada

pelo piscar dos LEDs no qual, ao acender LED vermelho, indica uma amostra positiva para a presença de material genético do SARS-CoV-2, e, ao acender o LED verde, indica uma amostra negativa, livre material genético do SARS-CoV-2, como mostramos nas figuras 2 e 3.



Figura 2 - Diagnóstico resultado positivo LED vermelho.



Figura 3 - Diagnóstico resultado negativo LED verde.

Link do funcionamento do nosso biossensor: https://youtu.be/cikXRALh_a0

Os biossensores de Grafeno apresentam assim diversas vantagens tais como ser um método portátil de instrumentação simples, tempo de resposta rápido, alta sensibilidade, alta relação sinal-ruído e biocompatibilidade com as amostras. Além disso, os testes no biossensor de grafeno dispensam a utilização de reagentes e a necessidade de clínicas laboratoriais, sendo uma alternativa viável para qualquer pessoa testar em lugares públicos ou até mesmo em casa. O grupo já realizou a expansão dos princípios do biossensor de grafeno para outras doenças, tais como a Raiva (RABV) e a Influenza (H1N1). Finalmente, temos desenvolvido não apenas um biossensor para detecção da covid, mas também para outros tipos de vírus, prévia calibração e estudo, seja utilizando c-DNA ou anticorpos para uma interação com o vírus. Desta forma, temos uma plataforma que pode ser aplicado a detecção de sistemas biológicos como detecção de tecidos cancerígenos em diversos estágios, detecção de bactérias e doenças. Devido ao uso do Grafeno o qual nos permite a interação com sistemas biológicos, estamos entrando numa ampla e nova área biomédica de detecção não invasiva e rápida se incorporado Inteligência Artificial (IA), como já vem sendo estudo pelo mestrando da bioengenharia Lucas Salvino, o qual nos permitirá desenvolver ferramentas de detecção em estágios iniciais ajudando notavelmente no tratamento de doenças precoces.

Agradecimentos:

À CEM-UFABC, INOVA, chamada covid2020, 2MI e VRS Pesquisa e Desenvolvimento Eireli.

Referências

- [1] TURNER, A. KARUBE, I. and WILSON, G. S. *Biosensors: Fundamentals and Application*, 1st ed. Oxford, New York: Oxford University Press, (1987).
- [2] BANICA, F. G. *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications*. John Wiley and Sons. (2012).
- [3] TARABELLA, G. D'ANGELO P. CIFARELLI, A. *A hybrid living/organic electrochemical transistor based on the Physarum polycephalum cell endowed with both sensing and memristive properties*. Chem. Sci. 6, (2015).
- [4] CHAN, C., SHI, J., FAN, Y., YANG, M. *A microfluidic flow-through chip integrated with reduced graphene oxide transistor for influenza virus gene detection*. Sensors and Actuators B: Chemical, 251, 927–933. doi:10.1016/j.snb.05.147 (2017).
- [5] NI, Z. WANG, Y. YU, T. and SHEN, Z. *Raman Spectroscopy and Imaging of Graphene*, Nano Res 1 p. 273-291. (2008).
- [6] HUMMERS, W. S. OFFEMAN, R. E. *Preparation of Graphitic Oxide* (1958).
- [7] WHITENER, K. E. SHEEHAN, Jr. P. E. *Graphene Synthesis*. Diamond e Related Materials,46, 25–34, (2014).
- [8] Mohanty, N.; Berry, V. *Graphene-Based Single-Bacterium Resolution Biodevice and DNA Transistor: Interfacing Graphene Derivatives with Nanoscale and Microscale Biocomponents*. Nano Lett. 8, 4469–4476. (2008).
- [9] Hong, W.; Bai, H.; Xu, Y.; Yao, Z.; Gu, Z.; Shi, G. *Preparation of Gold Nanoparticle/Graphene Composites with Controlled Weight Contents and Their Application In Biosensors*. J. Phys. Chem. C, 114, 1822–1826. (2010).
- [10] Geetha Bai, R., Muthoosamy, K., Manickam, S., & Hilal-Alnaqbi, A. *Graphene-based 3D scaffolds in tissue engineering: fabrication, applications, and future scope in liver tissue engineering*. International Journal of Nanomedicine, Volume 14, 5753–5783. doi:10.2147/ijn.s192779 (2019).
- [11] RENU SINGH, SEONGKYEOL HONG AND JAESUNG JANG. *Label-free Detection of Influenza Viruses using a Reduced Graphene Oxide-based Electrochemical Immunosensor Integrated with a Microfluidic Platform*. Nature , DOI: 10.1038/srep42771. (2017).
- [12] A. Champi, F. Obelenis, R. Challhua, J. Zúñiga e L. Akashi, número de Processo INPI BR 10 2021 013981 1, título “ELETRODOS BASEADOS EM ÓXIDOS DE GRAFENO REDUZIDO PARA APLICAÇÕES EM DETECÇÃO VIRAL”, 15/07/2021.
- [13] ULMAN, A. *Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers*. Chemical Reviews, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, (1996).
- [14] PERUMAL, V.; HASHIM, U. *Advances in biosensors: Principle, architecture and applications*. Journal of Applied Biomedicine, v. 12, n. 1, p. 1-15, (2014).