

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FERNANDO CASSIMIRO BUENO GOMES

Sensores e seu uso contra COVID-19: estudos e perspectivas

São Carlos
2022

FERNANDO CASSIMIRO BUENO GOMES

Sensores e seu uso contra COVID-19: estudos e perspectivas

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto - IFSC

São Carlos
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

RESUMO

No dia 11 de março de 2020 foi declarado pela Organização Mundial da Saúde o início da pandemia do vírus SARS-CoV-2, e a corrida persistente da medicina por vacinas, métodos de controle de contágio e desenvolvimento de fármacos foi evidenciada no dia a dia. Na necessidade de identificação da contaminação pelo vírus, diversas técnicas de detecção foram aplicadas e algumas se sobressaíram, como as testagens por RT-PCR. No entanto, outras tecnologias anteriormente utilizadas em auxílios na identificação de outras doenças e de contaminantes também surgiram como alternativas de diagnóstico. Os biossensores, portáteis e baratos, são dispositivos que fazem a interface entre novas técnicas de interpretação físico-químicas com elementos biomoleculares, facilitando a análise por pessoas não-especialistas e agilizando processos que levariam tempos consideráveis, trabalhando lado a lado com processos mais robustos de diagnóstico e algumas vezes até substituindo os mesmos. É proposto neste trabalho uma revisão bibliográfica das mais recentes aplicações de biossensores para detecção do vírus de COVID-19 na pandemia, quais as técnicas e as tecnologias relacionadas, e como isso pode ser relevante na pandemia.

Palavras-chave: Biosensor. Covid. Técnicas.

1. INTRODUÇÃO

A emergência do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), também conhecido como vírus da COVID-19, originou-se em morcegos e foi transmitido de um animal intermediário desconhecido para humanos inicialmente em Wuhan, na China (Singhal, 2020). Desde então, até o dia 4 de novembro foram infectadas 628.694.934 pessoas, das quais resultaram em 6.576.088 mortes, com um total de 12.861.382.558 doses de vacina aplicadas (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*, n.d.). Na incessante corrida contra o SARS-CoV-2, além da ação preventiva das vacinas, houve grande esforço nas áreas de tratamento e diagnóstico (Pascarella et al., 2020).

Sendo o diagnóstico um dos métodos mais efetivos para controle da população infectada, o padrão ouro para a identificação do vírus é o uso da *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) e suas variações (RT-dPCR, qRT-PCR). A técnica consiste na amplificação do material genético, em tempo real, sendo um método de diagnóstico molecular (Teymouri et al., 2021). Para identificação de anticorpos/antígenos, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é o mais utilizado. Apesar de suas altas sensibilidades, ambos os métodos apresentam desvantagens consideráveis, como o uso de equipamentos sofisticados, necessidade de pessoal treinado, e tempos mais extensos, além de dependerem da localização de laboratórios (Antiochia, 2021).

As características de equipamentos *point-of-care* (POC) tentam cobrir muitos desses aspectos. A idealização dessas características é resumida no acrônimo *ASSURED*, critério estipulado pela Organização Mundial da Saúde, que numa tradução livre significa: preços acessíveis, sensibilidade, especificidade, de simples uso, robusto e rápido, independência de equipamentos, entregável (portátil e deslocável) (Pashchenko et al., 2018). Com esses objetivos em curso, décadas de estudo de dispositivos portáteis começaram a ser incorporados nesses diagnósticos.

Um biossensor é um dispositivo que faz uma combinação entre a especificidade e seletividade biológica com o potencial computacional de microprocessadores (Malhotra & Turner, 2003). Em 1962, Clark e Lyons construíram um dispositivo que detectou alterações eletroquímicas proporcionais à presença de glicose durante cirurgias cardiovasculares. Foi encontrado que o uso da enzima glicose oxidase estenderia a especificidade dos eletrodos para a determinação do analito (Clark & Lyons, 1962; Coulet & Blum, 2019). A partir de 1970, essa associação entre transdutores de sinal e diferentes materiais biológicos começou a ser o foco de estudo do que é conhecido hoje

como biosensor, um dos maiores representantes da categoria POC (Palchetti & Mascini, 2010). Um biosensor simples pode ser dividido em três partes (Coulet & Blum, 2019; Pejcic et al., 2006):

- Um **bioreceptor**, que é o elemento biologicamente sensível que confere seletividade ao sensor e interage com o analito.
- Um **transdutor**, que é responsável por traduzir o sinal biológico e transformá-lo em um sinal próprio para análise, dependendo da técnica de processamento utilizada. Os elementos de transdução dependem do tipo de mudança físico-química resultante do evento de detecção (Narang & Pundir, 2017).
- Um **amplificador/processador de sinal**, que interpreta o sinal do transdutor e permite a interpretação pelo usuário.

A versatilidade dos biosensores é um de seus pontos mais fortes: diversas modalidades de técnicas podem ser aplicadas para o estudo diagnóstico de doenças, com diferentes vantagens e desvantagens (Pashchenko et al., 2018).

Uma etapa necessária para o diagnóstico molecular, independente do método, é a escolha do analito. Para detecção de doenças virais há duas estratégias principais, onde a primeira envolve diretamente a detecção do material genético do vírus, DNA ou RNA, e a segunda trata de outros biomarcadores virais, como抗ígenos e anticorpos gerados como resposta. Para o caso do vírus SARS-CoV-2, são de importância a proteína spike S, a proteína de membrana M, a proteína de envelope E e a proteínas do nucleocapsídeo N (Abid et al., 2021; Samson et al., 2020) (Figura 1). Dos demais biomarcadores, os principais são de origem hematológica, inflamatória, coagulante e bioquímica no geral (Garg et al., 2021; Ponti et al., 2020).

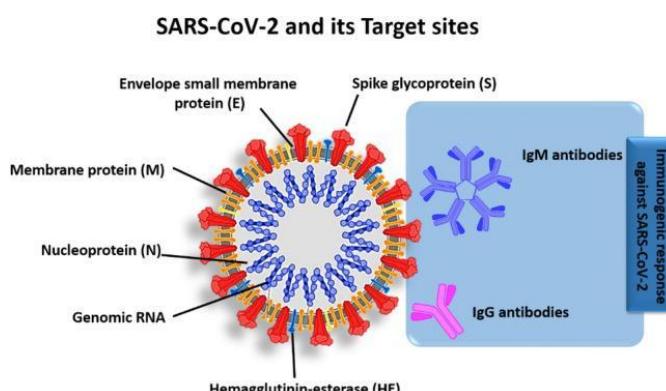


Figura 1. Estrutura esquemática do vírus SARS-CoV-2 e seus possíveis alvos para diagnóstico. Fonte: (Samson et al., 2020).

É comum agrupar os biosensores de acordo com seu tipo de funcionamento, que consequentemente depende de seu tipo de transdução (Malhotra & Turner, 2003; Ukhurebor et al., 2022). Dos grupos principais, é possível citar (Figura 2):

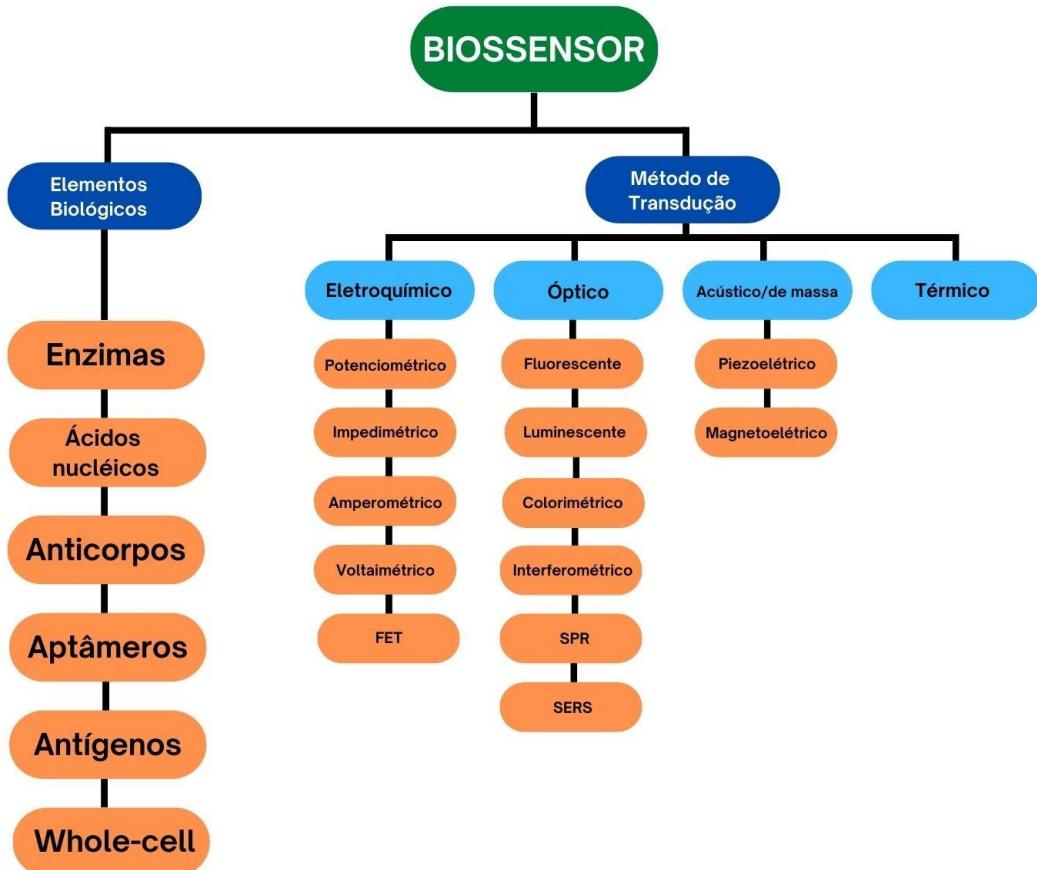


Figura 2: Resumo de algumas das categorias de biosensores, classificados por método de transdução e por tipo de elemento biológico utilizado. Fonte: Elaboração própria.

a. Biosensores eletroquímicos

Tratam da dinâmica de parâmetros elétricos em relação a certas propriedades químicas. Os subtipos fundamentais desses sensores são classificados pelo seu sinal de transdução, que pode variar entre potenciométrico (medida de potencial), impedimétrico (medida de condução ou resistência), amperométrico ou voltamétrico (medida de corrente) (Balkourani et al., 2021; Higson, 2012). O transdutor eletroquímico interpreta sinais elétricos que devem ser proporcionais à concentração do analito, produzidos pela bioreceptor que atua de acordo com sua seletividade. Na necessidade da construção de plataformas para combate ao vírus, houve grande ênfase no uso de materiais já comumente usado nessa técnica, como ouro, carbono e grafeno.

b. Biossensores ópticos

Há uma diversidade de técnicas que fazem uso de biossensores ópticos. Os métodos mais "simples" funcionam com base em características de absorbância, refletância e fluorescência, sendo o último citado o método mais aplicado. (Djaileb et al., 2020). No entanto, ainda há técnicas mais complexas que envolvem espectroscopia de Raman e SPR/LSPR. O estudo e aplicação da Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) é considerado um dos métodos mais avançado e desenvolvidos dentro da categoria de biossensores ópticos (Antiochia, 2021). Há dois tipos de biossensores ópticos: o primeiro observa mudanças nas propriedades ópticas intrínsecas da molécula alvo. O segundo tipo utiliza etiquetas e sondas com suas próprias propriedades (Borisov & Wolfbeis, 2008).

c. Biossensores de massa/acústicos

O princípio por trás desses biossensores é que os dispositivos que utilizam ondas acústicas seriam capazes de detectar diversas mudanças em parâmetros físicos, como pressão, temperatura e especialmente massa. O uso dessa técnica acústica faz uso de materiais piezoeletricos, comumente cristais. A piezoelectricidade é a capacidade da produção de polarização elétrica a partir de uma resposta à aplicação de alguma pressão mecânica (Fogel et al., 2016).

d. Biossensores térmicos/calorimétricos

Como a maioria das reações biológicas são exotérmicas, medidas que envolvem calorimetria são uma técnica que independe das propriedades eletroquímica e ótica. Os primeiros desenvolvidos tinham alto custo e suas respostas eram relativamente lentas, com uso de microcalorímetros. No entanto, no meio da década de 1970 foi introduzido o uso de termistores com enzimas, no qual foi explorada a especificidade biológica juntamente à análise da calorimetria de suas próprias reações (Coulet & Blum, 2019).

e. Classificação de acordo com o tipo de camada receptora:

Na descrição de um tipo de biosensor, o método de transdução a ser utilizado comumente é acompanhado pelo o tipo de biorreceptor utilizado, sendo também uma forma válida de classificação (Malhotra & Turner, 2003; Ozer et al., 2020). A biomolécula é escolhida de acordo com o alvo a ser analisado, sendo essencial para a seletividade do dispositivo. Algumas das principais categorias de biossensores são:

- **Sensor enzimático:** Enzimas, que representam o primeiro grupo de bioreceptor nos primeiros tipos de biossensores, utilizados na detecção de glicose. Diversas técnicas de detecção fazem o uso de enzimas, como a mais recente incorporação do sistema CRISPR em biossensores, ou nos robustos ensaios ELISA.
- **Genosensor:** Ácidos nucléicos, os quais se aproveitam da hibridização de um DNA/RNA complementar sensor ao DNA/RNA do analito. São essenciais nos variados tipos de PCR, padrão de ouro para detecção, e diversos outros tipos de amplificação.
- **Imunossensor:** Anticorpos, essenciais em métodos de detecção virais por se ligarem diretamente ao alvo com especificidade e seletividade garantidas. Imunossensores foram o segundo tipo de biossensor a existir.
- **Aptassensor:** Aptâmeros, que podem ser classificados como oligonucleotídeos ou peptídeos produzidos especificamente como encaixa para moléculas alvo via o método SELEX, o que possibilita a seleção de uma variedade de alvos, como proteínas e o próprio material genético.
- **Antígenos**, que, por possuírem o mesmo princípio da afinidade com os anticorpos, também viram opções para identificar os próprios. A procura por anticorpos é justificada pela verificação da resposta imunológica, numa época mais posterior à infecção quando a quantidade de antígeno em um indivíduo seria menor. Pode ser feito o uso do antígeno comum assim como em seu estado inativo, ou ainda de proteínas ou peptídeos sintéticos.
- **Whole-cell**, ou seja, uso de microorganismos completos para detecção. Apesar do funcionamento de um biossensor ser o mesmo, o envolvimento de células como bioreceptores pressupõe o estudo de objetivos mais amplos, como a análise de respostas em um organismo vivo (Bousse, 1996). O comportamento celular permite uma interação com uma variedade maior de substâncias, e com maior abrangência para possíveis mudanças de pH e temperatura. Suas aplicações compreendem monitoramento ambiental, análise alimentícia e triagem de fármacos (Gui et al., 2017).

2. METODOLOGIA

Para esta pesquisa bibliográfica foram realizadas buscas em diversos periódicos científicos em sites como NCBI, *Elsevier* e *ACS Publications*, com uma atenção especial para outros artigos de revisão. Foram utilizadas palavras-chave para encontrar artigos que relacionassem as tecnologias biosensoriais com o vírus da COVID-19 em comparação com outros métodos atuais, como “*covid biosensors review*”, “*covid nanomaterial novelties*”, “*covid detection state-of-art*”, e escolhidos artigos com base na técnicas (“*electrochemical*”, “*optical*”, “*Ifa*”, etc.). Foram priorizados artigos publicados desde o início da pandemia até hoje (2020-2022), com atenção para indicadores de pesquisa.

3. RESULTADOS

a. Técnicas de transdução contra COVID-19

Pouco após um mês do início da pandemia, conforme declarado pela Organização Mundial da Saúde, foi publicado um artigo por Seo et al. de um biossensor do tipo *Field-Effect Transistor* (FET), um tipo de **técnica eletroquímica** para transdução (Seo et al., 2020). O princípio dos biosensores FET depende do controle da tensão entre dois componentes do transistor, *Gate* e *Source*. A presença dessa tensão gera um campo elétrico que varia o fluxo de corrente entre os componentes *Drain* e *Source*, que pode ser lido e registrado. O sistema apresenta um limite de tensão, o qual tem que ser ultrapassado para que haja uma variação na leitura da corrente de saída. A presença desse limite é o que caracteriza o sistema como transistor, e é o que o torna atraente para seu uso como biosensor. Grafeno, uma das formas cristalinas do carbono, foi escolhido como material para detecção pelas suas características vantajosas, como alta condutividade e alta mobilidade quando carreador de elétrons. Sendo material de detecção, possui alta sensibilidade para identificação em suas superfícies e baixa detecção de ruído (Figura 3).

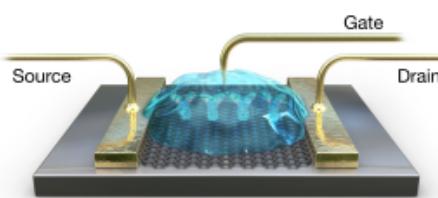


Figura 3: Diagrama esquemático do sensor FET construído por Seo et al., com todos seus componentes e amostras em solução aquosa. Fonte: (Seo et al., 2020).

Foi aplicado o anticorpo da proteína spike SARS-CoV-2 para a detecção da proteína de mesmo nome, com sua imobilização feita no grafeno com o uso de ácido 1-pirenobutírico éster N-hidroxisuccinimida (PBASE). Foram feitos testes de detecção com a proteína spike de SARS-CoV-2 juntamente com proteínas spike de MERS-CoV, as quais o sensor reagiu corretamente, demonstrando respostas apenas às primeiras citadas. Em seguida houve o mesmo teste com o vírus em cultura, que ocorreu com resposta de LOD de 1.6×10^1 pfu/mL, e depois foi feito o teste com amostras clínicas de *swabs* nasofaríngeos suspensos em meio de transporte universal (UTM) como de costume. A resposta registrada para o LOD foi de 2.42×10^2 cópias/ml, com todas as detecções feitas sem tratamento de amostras. Considerando os sinais de ruído e os diversos reagentes presentes no UTM, os autores concluíram que o LOD obtido, equiparável a resultados de testes de PCR, juntamente ao tempo curto de processamento menor que 1 minuto, fariam do dispositivo FET ser aplicável em uso prático (Figura 4).

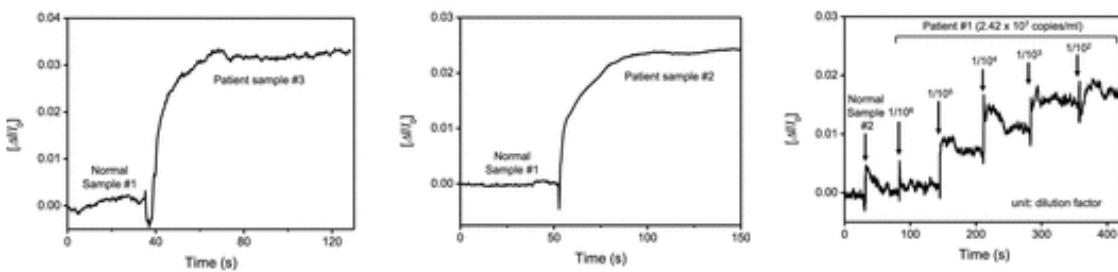


Figura 4: Comparação dos sinais detectados pelo sensor FET de Seo et al. À esquerda e ao meio, temos os sinais de resposta para amostras de diferentes pacientes. À direita, temos sinais de resposta a diferentes diluições de uma amostra. Fonte: Adaptado de (Seo et al., 2020).

No escopo de **técnicas ópticas**, Djaileb et al. publicou, na mesma época que Seo et al., um estudo sobre um biosensor para diagnóstico sorológico com uso de **Surface Plasmon Resonance (SPR)** (Djaileb et al., 2020). Exames sorológicos são utilizados para identificação de anticorpos, sendo ideais para um período de dias após a infecção após a resposta imunológica, possuindo uma janela muito maior para testagem e possibilitando um monitoramento da imunização populacional. Além disso, a tecnologia permite uma análise quantitativa, ao invés de análises qualitativas sorológicas, como testes de LFA. O método de SPR ocorre com base nas respostas de ressonância de elétrons de um material a partir da incidência de luz focalizada, em um ângulo específico. A intensidade da reflexão é medida angularmente, e o perfil dessa curva é sensível a pequenas alterações moleculares, como adsorção de diferentes partículas (Carvalho et al., 2003).

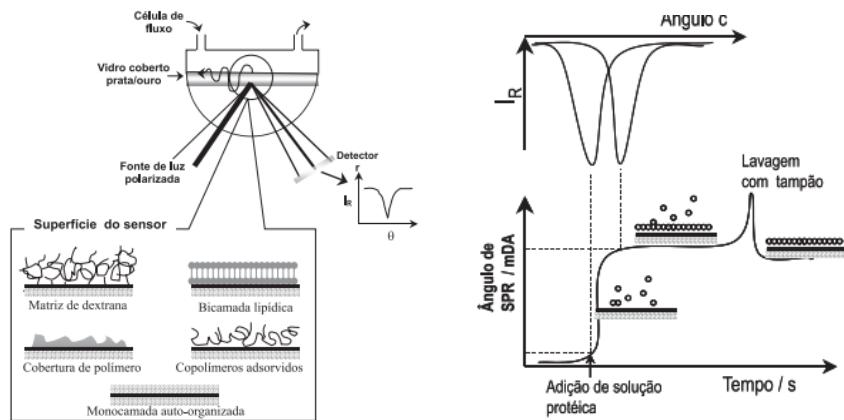


Figura 5: À esquerda, um diagrama de esquema de detecção SPR. À direita, um exemplo esquemático de um perfil de adsorção do SPR para adsorção de uma proteína a um filme polimérico. Fonte:(Carvalho et al., 2003).

Um dispositivo de SPR pela Affinité Instruments foi aplicado (S. S. Zhao et al., 2015) na construção do sensor, com a imobilização da proteína recombinante de nucleocapsídeo N pelo tampão de imobilização fornecido pela mesma empresa, sobre uma superfície de ouro do equipamento. A proteína foi escolhida devido à sua disponibilidade comercial e aos testes bem sucedidos com o método ELISA até o momento. As amostras de anticorpos anti-nucleocapsídeo foram diluídas em tampão fosfato-salino (PBS) e em soro humano não diluído, com concentrações de variando de 5 a 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi verificado primeiramente que as respostas de leitura para os anticorpos soro eram maiores do que quando diluídas no PBS, com um aumento de três vezes no *shift* observado.

Selecionando o soro como melhor meio para detecção, foi feito um segundo teste com o soro sem anticorpos como referência (Figura 6). O gráfico demonstrou a diferença nos canais de análise, confirmando a melhoria na resposta com o uso do soro, inferindo que a presença de proteínas no meio sorológico poderia se adsorvidas nos anticorpos capturados, aumentando a massa e o índice de refração do analito. Foi estimado que o LOD dos anticorpos com uso do soro fosse por volta de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, num processo de coleta de resultados após 15 minutos do contato entre sensor e amostra. Satisfeitos com os resultados, o grupo responsável disponibilizou o diagrama para reprodução do biosensor, salientando a possibilidade de alteração para outros抗ígenos de detecção, pelas características genéricas do teste.

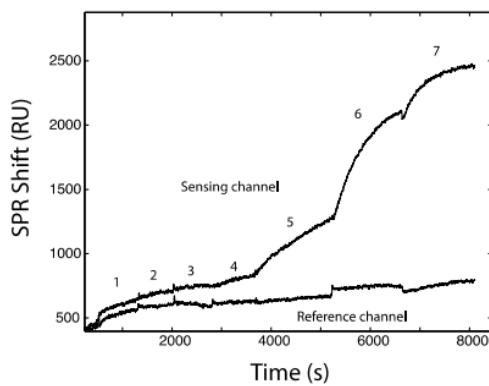


Figura 6: Sensorscans de SPR para a detecção do anticorpo, nas concentrações: (1) 100 ng/mL, (2) 500 ng/mL, (3) 1 µg/mL, (4) 5 µg/mL, (5) 10 µg/mL, (6) 25 µg/mL, and (7) 75 µg/mL. Fonte: (Djaileb et al., 2020).

Ainda dentro da aplicação de propriedades ópticas, Li et al. explorou o uso de partículas de ouro de uma outra forma (Li et al., 2020). Construiu-se um biosensor para **imunoensaio de Lateral Flow (LFA)** para detecção simultânea das imunoglobulinas G e M específicas contra o vírus SARS-CoV-2. O princípio da testagem LFA depende da hidratação e o transporte de reagentes por um meio escolhido via capilaridade devido a absorção feita pelo lado oposto da aplicação da amostra.

No design feito por Li et al., os anticorpos IgG e IgM específicos para COVID-19 são postos na base de amostra, que naturalmente fluem em direção à base de absorção. Ao passarem pela base de conjugação, encontram conjugados de nanopartículas de ouro com antígenos recombinantes da proteína spike do vírus, e também conjugados das mesmas nanopartículas com IgG de coelho, para o teste de controle. Ao se movimentarem pela membrana de nitrocelulose, encontram barreiras de anticorpos anti IgM e IgG humanos respectivamente. A detecção depende da agregação de nanopartículas de ouro nessas barreiras, mediante o acúmulo de anticorpos ligados a elas (Figura 7).

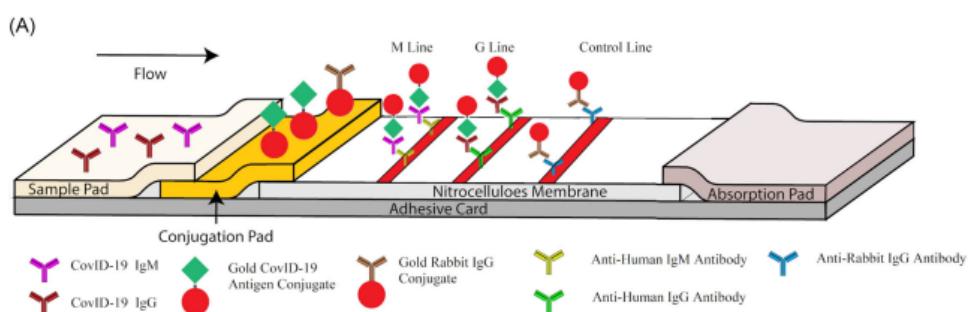


Figura 7: Ilustração esquemática do teste LFA de anticorpos. Fonte: Adaptado de (Li et al., 2020).



Figura 8: Foto representativa dos testes sanguíneos. Os resultados são: (13) IgM e IgG positivos, (14) IgM levemente positivo, (15) IgM e IgG negativos, (16) IgG levemente positivos. Fonte: (Li et al., 2020).

As amostras coletadas vieram diretamente do sangue de pacientes com possível infecção, que foram avaliados lado-a-lado com testes PCR com amostras de *swab*. Cada amostra foi diluída em 70-100 µL, 10 mM de PBS. Por ser um teste qualitativo, foi feita uma quantificação da sensibilidade e da especificidade do dispositivo em comparação com os resultados de PCR, encontrado os valores respectivos de 88.66% e 90.63%. Não foi encontrado um LOD, mas atribui-se a presença de falso negativos pela baixa concentração de anticorpos, e pela queda da concentração de anticorpos IgM presentes no sangue após duas semanas. Por fim, concluíram que, mesmo não confirmando a presença do vírus com exatidão, o teste fornece evidência imunológica para que diagnósticos seguintes possam ser feitos, em especial considerando que os testes levam 15 minutos para encontrar resultados.

Em alguns casos, a junção de diversas técnicas pode criar um sistema completo, robusto para detecções. Zhu et al. propôs um teste diagnóstico batizado de **COVID-19 MCCD**, sigla que junta as técnicas de *multiple cross displacement amplification* com *CRISPR-Cas12a-based detection* (Zhu et al., 2021). O processo completo possui 4 etapas principais (Figura 9):

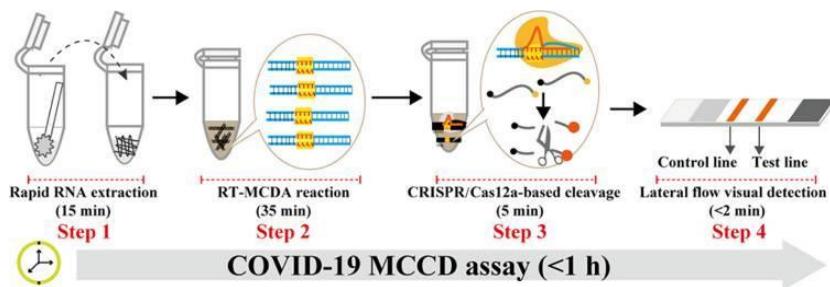


Figura 9: Esquema dos passos envolvidos no teste COVID-19 MCCD. Fonte: (Zhu et al., 2021).

- **Extração de RNA:** as amostras foram retiradas por *swab* do trato respiratório. No estudo, essa parte foi acompanhada da ação da transcriptase reversa. O processo dura 15 minutos.

- **Reação RT-MCDA (amplificação isoterma):** utiliza primers previamente projetados e o anelamento do material genético para a geração de múltiplas cópias. Assim como nas reações de RT-PCR, há o uso da transcriptase reversa para conversão do material genético de RNA para cDNA, porém suas reações de amplificação exponencial acontecem numa mesma temperatura (isoterma). Essa técnica é caracterizada pela utilização de diversos primers (dez para cada gene) que se encaixam em localizações diferentes ao longo das fitas ssDNA permitindo simultaneamente múltiplas gerações de cópias cruzadas. Foram selecionados 2 genes para amplificação: ORF1ab (frame de abertura, codifica proteínas **pp1a** and **pp1ab**) e N (codifica proteína de nucleocapsídeo), dos quais foram criados os primers CP1 e CP2 ambos também modificados para incluírem uma sequência PAM (TTTT). A reação ocorre separadamente para cada gene com seus primers específicos, e leva 35 minutos.
- **Clivagem com CRISPR-Cas12a:** um complexo CRISPR-Cas12a com guias gRNAs são projetados, sendo que a sequência de gRNA é escolhida para cada um dos genes especificados. A presença da sequência PAM serve como um guia para o início das clivagens do complexo CRISPR-Cas12a/gRNA, que ocorrem de modo ultra rápido e de modo **não específico**. O denominado **ensaio de trans-clivagem** deve ocorrer na presença de um ssDNA da molécula repórter 5'-FITC-TTATTATTATT-biotin-3', 10 µm.
- **Ensaio com biosensor *lateral flow*:** foi feito um biosensor com base absorvente, base de conjugação, base de amostra e uma membrana de nitrocelulose para o transporte da amostra (Figura 10). Na área de conjugação, foram depositadas nanopartículas de ouro com estreptavidina imobilizada, uma proteína com altíssima afinidade por biotina. Em duas linhas sobre a membrana foram espalhados os agentes de captura, albumina do soro bovino biotinilada (*biotin-BSA*) na linha de controle e anticorpo anti-fluoresceína (Anti-FITC) na linha de teste. Quando o ensaio de trans-clivagem ocorre normalmente, a molécula repórter é clivada também e a biotina pode ser identificada na linha de teste. Caso contrário, o ssDNA permanece intacto e é imobilizado na linha de controle.

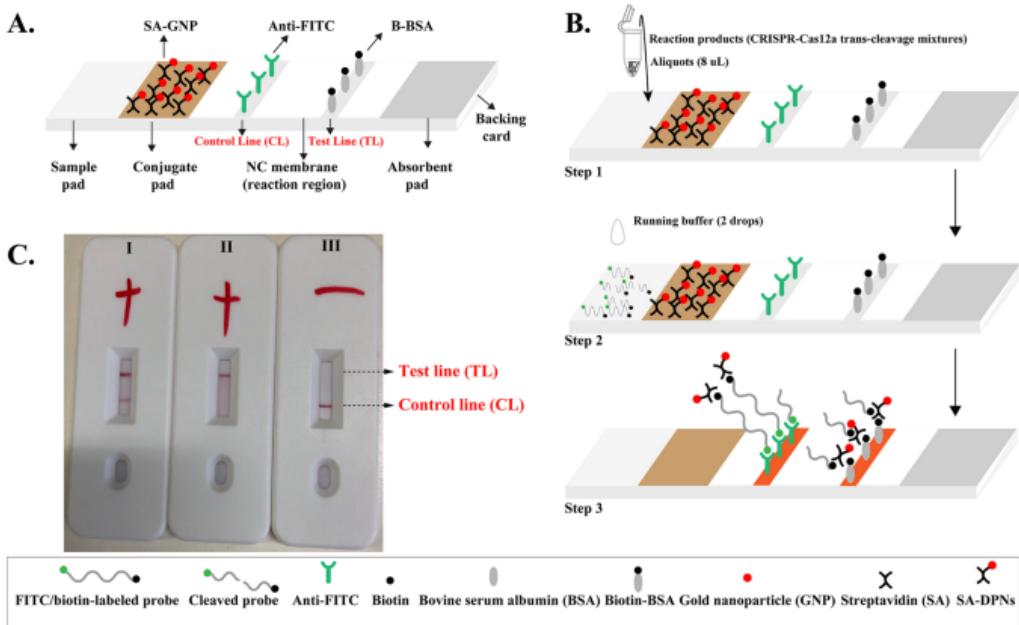


Figura 10: Princípio e esquema da visualização dos resultados pelo biossensor. (A) Detalhes do biossensor de lateral flow. (B) Princípio e funcionamento de detecção positiva do biossensor. (C) À esquerda e no meio, dois resultados positivos na presença da linha de teste. À direita, apenas a marcação de controle indica não-ocorrência da clivagem, com resultado negativo. Fonte: (Zhu et al., 2021).

A clivagem foi feita comparativamente com outras moléculas repórter com sondas para teste de fluorescência. Foram divididos as amostras em concentrações diferentes, para analisar o limite de detecção tanto da leitura fluorescente quanto do resultado pelo biossensor (Figura 11). Comparando os métodos de fluorescência e LFA, foi concluído que o limite de detecção foi o mesmo para ambos, com detecção de apenas 7 (7×10^0) cópias por reação de amplificação.

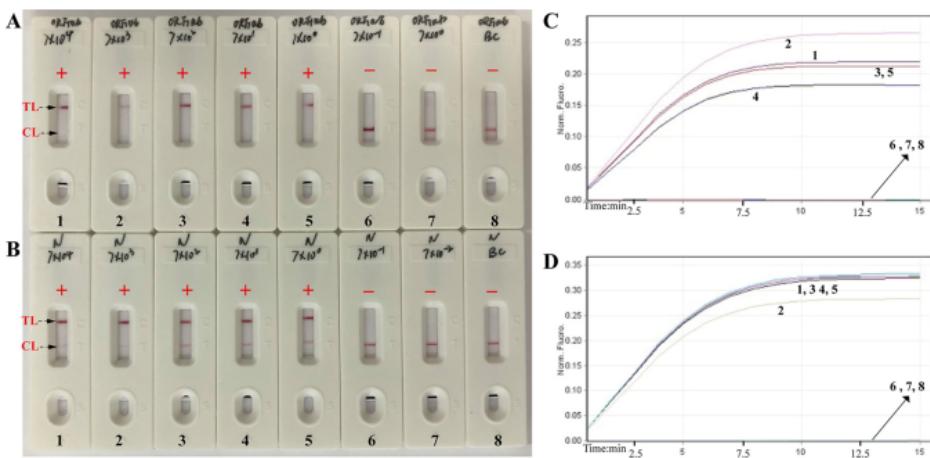


Figura 11: Sensibilidade do ensaio COVID-19 MCCD. (A) e (B) representam os resultados das leituras dos biossensores para os genes ORF1ab e N, respectivamente. (C) e (D) demonstram os gráficos adquiridos por análise de fluorescência em tempo real. As concentrações estão descritas nos biossensores, cada um representado por uma curva no gráfico com a mesma concentração. As concentrações variam de 7×10^{-2} a 7×10^4 cópias por reação. Fonte: (Zhu et al., 2021).

b. Nanomateriais contra COVID-19

O uso de nanomateriais é imperativo para captura de sinais de baixa magnitude que ocorrem nas interações entre bio-receptores e analitos. Propriedades como alta razão superfície/volume, efeitos quânticos, alta adsorção e capacidade reativa, que podem ser essenciais para o funcionamento de um biossensor, são expressas por esses materiais (M. Srivastava et al., 2021). Alguns materiais apresentam atividades antivirais o que torna indispensável o uso combate contra o vírus da COVID-19.

Nanopartículas metálicas são a categoria que apresenta o maior número de possibilidades, visto a quantidade de materiais disponíveis. Nanopartículas de ouro são um exemplo que possuem características ópticas e elétricas relevantes. Semelhante a nanopartículas de prata, suas propriedades plasmônicas podem ser úteis para análises em biossensores mais robustos de LSPR, em técnicas de fluorescência e colorimetria em sensores à olho nu (Singh, 2016). A condutividade e o comportamento redox são definitivos para biossensores eletroquímicos (Guo & Wang, 2007; Yeh et al., 2012). Ainda dentro da categoria de nanopartículas metálicas, o aspecto do magnetismo é importante para análises de fluorescência, eletroquímicas e de ressonância magnética (M. Srivastava et al., 2021). Nanopartículas ferromagnéticas, em especial óxidos de ferro, são notáveis por participar de processos de extração e enriquecimento de diversos vírus, além da detecção (Khizar et al., 2022).

O advento das **quantum dots** abriu um leque de nanopartículas viáveis para estudo de fluorescência (Lim et al., 2015). Nanopartículas que exibem esse comportamento são semicondutores com 1–10 nm de diâmetro, que possuem elétrons que podem ser excitados a níveis mais altos de energia ao receberem um fóton (Ghaemi et al., 2021; Jamieson et al., 2007). Quantum dots de carbono são um exemplo utilizado predominantemente como “sondas fluorescentes” em biossensores para detecção viral (Belza et al., 2021), e inclusive foi notado por Łoczechin et al. que seria possível a inibição viral pela ligação de um dos grupos funcionais das quantum dots de carbono com um dos receptores de entrada do vírus (Łoczechin et al., 2019).

Outro importante uso de carbono é na forma de **grafeno**. Alta versatilidade, baixo custo e com as mesmas propriedades antivirais, o material tem fácil implementação em têxteis, possibilitando a aplicação para a detecção e proteção em máscaras (Palmieri & Papi, 2020; Zhong et al., 2020), além de poder ser utilizado em impressão tridimensional para componentes eletrônicos médicos de diferentes nanoestruturas (A. K. Srivastava et al., 2020). Como já citado, Seo et. al foi um dos primeiros a desenvolver um biossensor de grafeno funcionalizado com o método FET para a

detecção do vírus da COVID-19, pouco depois de um mês da declaração da pandemia pela OMS (Seo et al., 2020).

Outro conjunto de nanopartículas são as baseadas em **polímeros**, que possuem foco maior em tratamento dentro da área médica por sua adaptabilidade para sistemas de entrega de fármacos e vacinas, e sua subsequente degradação enzimática no sangue (Ghaemi et al., 2021). Zhao et al. reportou um uso de partículas magnéticas que aumentaria a detecção mediante melhora na extração do RNA de SARS-COV-2. As nanopartículas magnéticas eram funcionalizadas por **polímero de aminoésteres** com grupos carboxílicos, e o método de extração combinou a lise do vírus com a captura do material genético, o que aumentou diretamente os resultados em detecção RT-PCR e que poderia ser útil em dispositivos miniaturizados (Z. Zhao et al., 2020). A **celulose** é outro polímero com grande uso, sendo origem de biossensores de papel com uso de técnicas como LFA, e oferece grande variedade com suas estruturas de nanocristais, nanofibras, *whiskers*, entre outras. Dispositivos de celulose possuem a vantagem de ser facilmente renovável, com possibilidade de produção em massa com baixo custo, e com metodologias sustentáveis com descarte seguro (Pinheiro et al., 2021).

4. CONCLUSÃO

O uso de biossensores é muito explorado para o auxílio no diagnóstico de doenças, mas a detecção em si pode não ser o objetivo final. O ambiente clínico, por ser infeccioso, muitas vezes requer cuidado redobrado e o uso desses aparelhos pode trazer vantagens (Bahl et al., 2020; Haleem et al., 2021). A tecnologia pode ser usada para monitoramento de temperatura em pacientes que manifestem sintomas febris (Liu et al., 2017), ou ainda para monitoramento de ambientes clínicos por coletas de superfícies ou diretamente do ar (Narita et al., 2021). Diversos aspectos de um paciente podem ser controlados para a garantia de bem-estar, como acompanhamento da frequência cardíaca e supervisão de dieta, inclusive no controle de contaminação cruzada (Patel et al., 2016; Yoo & Lee, 2010).

No geral, biossensores apresentam uma ideia atrativa para diagnósticos e outras aplicações médicas. São sempre valorizadas características de rápida resposta, de fácil uso, portabilidade, baixo custo, sempre na tentativa limites cada vez menores de detecção, muitas vezes ultrapassando os valores dos equipamentos padrão ouro utilizados atualmente, demonstrando uma alternativa hábil para o combate de infecções como a COVID-19 (Tabela 1). E mesmo com uma grande diversidade de técnicas já disponíveis, a área de estudos dos sensores é significantemente influenciada pela

avanços em ciências de materiais, possibilitando constantes avanços tecnológicos e novas adaptações constantes com as últimas atualidades, em contínuo aperfeiçoamento para a detecção e o combate de novas doenças emergentes.

Tabela 1 - Compilação de estudos de uso de biossensores para comparação com método PCR.

Tipo de biosensor	Analito e Amostra	Limite de Detecção (LOD)	Tempo de testagem	Referência
FET amperométrico	Proteínas spike de <i>swabs</i> nasofaríngeos	1.6×10^1 pfu/mL em meio de cultura, 2.42×10^2 cópias/mL em amostras clínicas	<1 minuto	(Seo et al., 2020)
SPR	Anticorpos anti-nucleocapsídeos diluído em soro humano	1 µg/mL nas amostras de laboratório	15 min	(Djaileb et al., 2020)
LFIA colorimétrico	Anticorpos IgM e IgG no sangue humano	Valor não encontrado, mas sensibilidade de 88.66% e especificidade de 90.63% para os testes	15 minutos	(Li et al., 2020)
LFA com método MCCD (CRISPR-based)	Genes ORF1ab e N por <i>swab</i> <td>7 cópias por reação de amplificação</td> <td><1 hora</td> <td>(Zhu et al., 2021)</td>	7 cópias por reação de amplificação	<1 hora	(Zhu et al., 2021)
Eletroquímico voltamétrico (DPV)	RNA viral de <i>swabs</i> orofaríngeo	200 cópias/mL	>3 horas para preparação de amostras	(H. Zhao et al., 2021)
Eletroquímico amperométrico	Antígeno spike da saliva	10 fM	<1 minuto	(Mahari et al., 2020)
MÉTODO PCR	RNA viral de swabs orofaríngeo	1.50×10^1 cópias/mL	<3 horas	(Chu et al., 2020)

REFERÊNCIAS

- Abid, S. A., Ahmed Muneer, A., Al-Kadmy, I. M. S., Sattar, A. A., Beshbishi, A. M., Batiha, G. E.-S., & Hetta, H. F. (2021). Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. *Life Sciences*, 273, 119117.
- Antiochia, R. (2021). Developments in biosensors for CoV detection and future trends. *Biosensors and Bioelectronics*, 173, 112777.
- Bahl, S., Javaid, M., Bagha, A., Singh, R., Haleem, A., Vaishya, R., & Suman, R. (2020). Biosensors applications in fighting COVID-19 pandemic. In *Apollo Medicine* (Vol. 0, Issue 0, p. 0). https://doi.org/10.4103/am.am_56_20
- Balkourani, G., Brouzgou, A., Archonti, M., Papandrianos, N., Song, S., & Tsiakaras, P. (2021). Emerging materials for the electrochemical detection of COVID-19. In *Journal of Electroanalytical Chemistry* (Vol. 893, p. 115289). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115289>
- Belza, J., Opletalová, A., & Poláková, K. (2021). Carbon dots for virus detection and therapy. *Mikrochimica Acta*, 188(12), 430.
- Borisov, S. M., & Wolfbeis, O. S. (2008). Optical biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 423–461.
- Bousse, L. (1996). Whole Cell Biosensors. In *Proceedings of the International Solid-State Sensors and Actuators Conference - TRANSDUCERS '95*. <https://doi.org/10.1109/sensor.1995.721853>
- Carvalho, R. M. de, de Carvalho, R. M., Rath, S., & Kubota, L. T. (2003). SPR: Uma nova

- ferramenta para biosensores. In *Química Nova* (Vol. 26, Issue 1, pp. 97–104). <https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000100017>
- Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., Wan, C. K. C., Yang, P., Wang, Q., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*, 66(4), 549–555.
- Clark, L. C., Jr, & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29–45.
- Coulet, P. R., & Blum, L. J. (2019). *Biosensor Principles and Applications*. CRC Press.
- Djaileb, A., Charron, B., Jodaylami, M. H., Thibault, V., Coutu, J., Stevenson, K., Forest, S., Live, L. S., Boudreau, D., Pelletier, J. N., & Masson, J.-F. (2020). *A Rapid and Quantitative Serum Test for SARS-CoV-2 Antibodies with Portable Surface Plasmon Resonance Sensing*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12118914.v1>
- Fogel, R., Limson, J., & Seshia, A. A. (2016). Acoustic biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 101–110.
- Garg, M., Sharma, A. L., & Singh, S. (2021). Advancement in biosensors for inflammatory biomarkers of SARS-CoV-2 during 2019–2020. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 171, p. 112703). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112703>
- Ghaemi, F., Amiri, A., Bajuri, M. Y., Yuhana, N. Y., & Ferrara, M. (2021). Role of different types of nanomaterials against diagnosis, prevention and therapy of COVID-19. *Sustainable Cities and Society*, 72, 103046.
- Gui, Q., Lawson, T., Shan, S., Yan, L., & Liu, Y. (2017). The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. *Sensors*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/s17071623>
- Guo, S., & Wang, E. (2007). Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 598, Issue 2, pp. 181–192). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.054>
- Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Suman, R., & Rab, S. (2021). Biosensors applications in medical field: A brief review. In *Sensors International* (Vol. 2, p. 100100). <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100100>
- Higson, S. (2012). *Biosensors for Medical Applications*. Elsevier.
- Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., & Seifalian, A. M. (2007). Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 28(31), 4717–4732.
- Khizar, S., Al-Dossary, A. A., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., & Elaissari, A. (2022). Contribution of magnetic particles in molecular diagnosis of human viruses. *Talanta*, 241, 123243.
- Lim, S. Y., Shen, W., & Gao, Z. (2015). Carbon quantum dots and their applications. *Chemical Society Reviews*, 44(1), 362–381.
- Liu, Y., Shen, T., Hu, L., Gong, H., Chen, C., Chen, X., & Cai, C. (2017). Development of a thermosensitive molecularly imprinted polymer resonance light scattering sensor for rapid and highly selective detection of hepatitis A virus in vitro. In *Sensors and Actuators B: Chemical* (Vol. 253, pp. 1188–1193). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.166>
- Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., Sun, R., Wang, Y., Hu, B., Chen, W., Zhang, Y., Wang, J., Huang, B., Lin, Y., Yang, J., Cai, W., Wang, X., Cheng, J., Chen, Z., ... Ye, F. (2020). Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*, 92(9), 1518–1524.
- Łoczechin, A., Séron, K., Barras, A., Giovanelli, E., Belouzard, S., Chen, Y.-T., Metzler-Nolte, N., Boukherroub, R., Dubuisson, J., & Szunerits, S. (2019). Functional Carbon Quantum Dots as

- Medical Countermeasures to Human Coronavirus. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(46), 42964–42974.
- Mahari, S., Roberts, A., Shahdeo, D., & Gandhi, S. (2020). eCovSens-Ultrasensitive Novel In-House Built Printed Circuit Board Based Electrochemical Device for Rapid Detection of nCovid-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2. In *bioRxiv* (p. 2020.04.24.059204). <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.059204>
- Malhotra, B. D., & Turner, A. (2003). *Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors*. Elsevier.
- Narang, J., & Pundir, C. S. (2017). *Biosensors: An Introductory Textbook*. CRC Press.
- Narita, F., Wang, Z., Kurita, H., Li, Z., Shi, Y., Jia, Y., & Soutis, C. (2021). A Review of Piezoelectric and Magnetostrictive Biosensor Materials for Detection of COVID-19 and Other Viruses. *Advanced Materials*, 33(1), e2005448.
- Ozer, T., Geiss, B. J., & Henry, C. S. (2020). Review-Chemical and Biological Sensors for Viral Detection. *Journal of the Electrochemical Society*, 167(3), 037523.
- Palchetti, I., & Mascini, M. (2010). Biosensor Technology: A Brief History. In *Lecture Notes in Electrical Engineering* (pp. 15–23). https://doi.org/10.1007/978-90-481-3606-3_2
- Palmieri, V., & Papi, M. (2020). Can graphene take part in the fight against COVID-19? In *Nano Today* (Vol. 33, p. 100883). <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100883>
- Pascarella, G., Strumia, A., Piliego, C., Bruno, F., Del Buono, R., Costa, F., Scarlata, S., & Agrò, F. E. (2020). COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 288, Issue 2, pp. 192–206). <https://doi.org/10.1111/joim.13091>
- Pashchenko, O., Shelby, T., Banerjee, T., & Santra, S. (2018). A Comparison of Optical, Electrochemical, Magnetic, and Colorimetric Point-of-Care Biosensors for Infectious Disease Diagnosis. *ACS Infectious Diseases*, 4(8), 1162–1178.
- Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S., & Mohapatra, E. (2016). Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis. *Biochemistry Research International*, 2016, 3130469.
- Pejcic, B., De Marco, R., & Parkinson, G. (2006). The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. *The Analyst*, 131(10), 1079–1090.
- Pinheiro, T., Cardoso, A. R., Sousa, C. E. A., Marques, A. C., Tavares, A. P. M., Matos, A. M., Cruz, M. T., Moreira, F. T. C., Martins, R., Fortunato, E., & Sales, M. G. F. (2021). Paper-Based Biosensors for COVID-19: A Review of Innovative Tools for Controlling the Pandemic. *ACS Omega*, 6(44), 29268–29290.
- Ponti, G., Maccaferri, M., Ruini, C., Tomasi, A., & Ozben, T. (2020). Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. In *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 57, Issue 6, pp. 389–399). <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1770685>
- Samson, R., Navale, G. R., & Dharne, M. S. (2020). Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19. *3 Biotech*, 10(9), 385.
- Seo, G., Lee, G., Kim, M. J., Baek, S.-H., Choi, M., Ku, K. B., Lee, C.-S., Jun, S., Park, D., Kim, H. G., Kim, S.-J., Lee, J.-O., Kim, B. T., Park, E. C., & Kim, S. I. (2020). Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano*, 14(4), 5135–5142.
- Singhal, T. (2020). A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian Journal of Pediatrics*, 87(4), 281–286.
- Singh, P. (2016). SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. In *Sensors and Actuators B: Chemical* (Vol. 229, pp. 110–130). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.118>
- Srivastava, A. K., Dwivedi, N., Dhand, C., Khan, R., Sathish, N., Gupta, M. K., Kumar, R., & Kumar, S. (2020). Potential of graphene-based materials to combat COVID-19: properties, perspectives, and prospects. *Materials Today. Chemistry*, 18, 100385.

- Srivastava, M., Srivastava, N., Mishra, P. K., & Malhotra, B. D. (2021). Prospects of nanomaterials-enabled biosensors for COVID-19 detection. *The Science of the Total Environment*, 754, 142363.
- Teymouri, M., Mollazadeh, S., Mortazavi, H., Naderi Ghale-Noie, Z., Keyvani, V., Aghababaei, F., Hamblin, M. R., Abbaszadeh-Goudarzi, G., Pourghadamayari, H., Hashemian, S. M. R., & Mirzaei, H. (2021). Recent advances and challenges of RT-PCR tests for the diagnosis of COVID-19. *Pathology - Research and Practice*, 221, 153443.
- Ukhurebor, K. E., Onyancha, R. B., Aigbe, U. O., Uk-Eghonghon, G., Kerry, R. G., Kusuma, H. S., Darmokoesoemo, H., Osibote, O. A., & Balogun, V. A. (2022). A Methodical Review on the Applications and Potentialities of Using Nanobiosensors for Disease Diagnosis. *BioMed Research International*, 2022, 1682502.
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. (n.d.). Retrieved November 15, 2022, from <https://covid19.who.int/>
- Yeh, Y.-C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. In *Nanoscale* (Vol. 4, Issue 6, pp. 1871–1880). <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>
- Yoo, E.-H., & Lee, S.-Y. (2010). Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors*, 10(5), 4558–4576.
- Zhao, H., Liu, F., Xie, W., Zhou, T.-C., OuYang, J., Jin, L., Li, H., Zhao, C.-Y., Zhang, L., Wei, J., Zhang, Y.-P., & Li, C.-P. (2021). Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 327, 128899.
- Zhao, S. S., Bukar, N., Toulouse, J. L., Pelechacz, D., Robitaille, R., Pelletier, J. N., & Masson, J.-F. (2015). Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosensors & Bioelectronics*, 64, 664–670.
- Zhao, Z., Cui, H., Song, W., Ru, X., Zhou, W., & Yu, X. (2020). *A simple magnetic nanoparticles-based viral RNA extraction method for efficient detection of SARS-CoV-2*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.22.961268>
- Zhong, H., Zhu, Z., Lin, J., Cheung, C. F., Lu, V. L., Yan, F., Chan, C.-Y., & Li, G. (2020). Reusable and Recyclable Graphene Masks with Outstanding Superhydrophobic and Photothermal Performances. *ACS Nano*, 14(5), 6213–6221.
- Zhu, X., Wang, X., Li, S., Luo, W., Zhang, X., Wang, C., Chen, Q., Yu, S., Tai, J., & Wang, Y. (2021). Rapid, Ultrasensitive, and Highly Specific Diagnosis of COVID-19 by CRISPR-Based Detection. *ACS Sensors*, 6(3), 881–888.