



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016019655-8 A2

(22) Data do Depósito: 25/08/2016

(43) Data da Publicação: 13/03/2018



* B R 1 0 2 0 1 6 0 1 9 6 5 5 A

(54) Título: DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

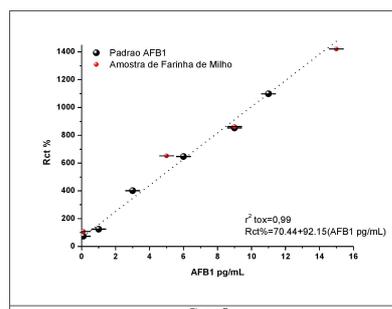
(51) Int. Cl.: G01N 33/02; G01N 27/327; C01B 32/158; C07C 323/63

(52) CPC: G01N 33/02, G01N 27/3278, C01B 32/158, C07C 323/63

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) Inventor(es): MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA; MAURÍLIA PALMEIRA DA COSTA; ISAAC AARÓN MORALES FRÍAS; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE

(57) Resumo: A invenção apresentada emprega um método inovador de construção de um dispositivo imunoeletróquímico para ser utilizado como ferramenta na identificação de toxinas presente em alimentos e essa detecção ocorre em concentrações na faixa de picogramas por mililitro. Destacando que o dispositivo apresentado não utiliza moléculas orgânicas ou inorgânicas sulfuradas, de difícil descarte e/ou de alta toxicidade para o meio ambiente. O método empregado é o de química molhada por etapas, para que ocorra uma correta deposição dos analitos na superfície do dispositivo. Além de ser uma ferramenta de baixo custo, análise rápida e em tempo real.



DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

Campo da Invenção

01. O processo aqui apresentado é um método para formular e construir dispositivos biossensores baseados em nanoestruturas de carbono e o aminoácido sulfurado cisteína ou qualquer outra biomolécula sulfurada para a imobilização de imunoglobulinas, sendo estendido a aptâmeros, proteínas ligantes a hidratos de carbono ou quaisquer outras biomoléculas que, natural ou artificialmente, sejam criadas ou selecionadas para reconhecer moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar. Nesta patente, destacamos dispensar o uso de moléculas orgânicas ou inorgânicas sulfuradas, de difícil descarte e/ou de alta toxicidade para o meio ambiente, as quais são rotineiramente utilizadas como ligantes entre a camada transdutora e superfícies metálicas, óxido-metálicas ou derivadas de carbono durante o desenvolvimento de superfícies biossensoras.

02. A presente invenção é relevante para as mais diversas aplicações e desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico conhecidos como imunossensores eletroquímicos nanoestruturados, com ênfase nos constituídos por materiais carboxilados ou aminados. Outrossim, refere-se a métodos e composições para detecção de uma ou mais moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar quando encontradas em concentrações mínimas na faixa de picograma por mililitro. Este método de detecção pode ser classifi-

cado dentro do grupo dos nanossensores pois sua capacidade de detecção depende da aplicação de estruturas de carbono em nano-escala, cuja função é a de constituir a camada transdutora. Já a especificidade sensora está relacionada diretamente com o uso de anticorpos, criados ou selecionados, para reconhecer moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar.

Sumário

03. A presente patente descreve procedimentos e metodologias para promover a modificação química de eletrodos metálicos ou óxido metálicos com a intenção de serem utilizados como plataformas em sensores eletroquímicos impedimétricos. Com esta finalidade, é descrito um método de química molhada por etapas. Para isso, deve ser realizada a imobilização covalente de uma camada de bioreconhecimento na superfície transdutora nanoestruturada. Por sua vez, a nanoestrutura deve se encontrar previamente ligada covalentemente à superfície de um eletrodo metálico ou óxido metálico por meio do uso de biomoléculas contendo grupos funcionais livres para serem aproveitados em ligações covalentes ou então, utilizando quaisquer métodos de ancoragem que empreguem os defeitos atômicos da rede cristalina do substrato a ser empregado.

Estado da Técnica

04. A classificação dos perigos alimentares é feita, principalmente, com base na natureza biológica, química ou física. Dentre os mencionados, os perigos biológicos estão associados principalmente com fatores não controláveis e dependem de condições

ambientais como temperatura e umidade, inclusive antes do processamento dos alimentos. O crescimento dos microrganismos ocorre naturalmente durante a deterioração dos alimentos. Embora alguns deles sejam usados controladamente na fermentação de determinados alimentos para o aprimoramento de suas características organolépticas, o crescimento de eventuais microrganismos patogênicos pode ser igualmente favorecido. De fato, independentemente da qualidade dos alimentos, é normal encontrar um determinado nível aceitável de microrganismos patogênicos nos alimentos crus. Adicionalmente, o armazenamento e/ou manipulação inadequada dos alimentos contribui significativamente para a rápida multiplicação destes microrganismos, incrementando dessa maneira a periculosidade do alimento.

05. Como resultado do crescimento descontrolado de microrganismos patógenos, ocorre o aumento proporcional na concentração de metabolitos secundários tóxicos para o ser humano. Nesta categoria encontramos as aflatoxinas. Produzidas por fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, estas biomoléculas formam parte do maior grupo de carcinógenos alimentares exógenos conhecidos. As aflatoxinas também representam o grupo de micotoxinas com maior número de resultados positivos em alimentos já relatado. No âmbito internacional, a AOAC (Association of Official Analytical Chemists) recomenda que a confirmação do diagnóstico positivo para aflatoxinas seja realizada tanto por métodos qualitativos como quantitativos, baseados em cromatografia de camada fina e cromatografia líquida de alto rendimento, ou então por métodos imunológicos como o teste ELISA. Contudo, a necessidade de pessoal especializado e treinado

para a correta realização dos complicados protocolos, dificultam ainda a sua utilização como alternativa rápida e de monitoramento contínuo durante o processamento ou manipulação de alimentos. Por sua parte os imunoenaios abrangem grande parte do mercado da segurança alimentar, e são implementados por disponibilizar métodos que podem ser muito bem utilizados dentro e fora dos laboratórios sem precisar de equipamentos especializados e relativamente caros. Embora os imunoenaios sejam conhecidos por sua notável especificidade, ressaltamos que no caso de testes colorimétricos como o ELISA, o limite de detecção pode ser afetado pela alta probabilidade de obter reações cruzadas entre os cromóforos e moléculas naturalmente presentes nas amostras obtidas diretamente dos alimentos como, por exemplo, as gorduras.

06. Como alternativa, os biossensores têm sido propostos como uma ferramenta rápida e barata para a detecção de aflatoxinas, visando conseguir ou melhorar a sensibilidade, acurácia e especificidade dos métodos convencionais. De fato, nos últimos 15 anos, o uso de diferentes técnicas de transdução para a biodetecção de micotoxinas em alimentos têm sido amplamente exploradas. Resultados promissores demonstram a diminuição de riscos durante a manipulação das amostras, sobretudo, devido a que neste processo de detecção, precisa-se de uma pequena quantidade de amostra cujo fator de diluição corresponde propriamente ao limite de detecção. Consequentemente, destacamos que a utilização do imunossensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de carbono e cisteína aqui apresentado, também pode ser considerado seguro para uso por pessoal técnico não especializado para aplicações em segurança alimentar.

07. O uso de eletrodos nanoestruturados como ferramentas da química analítica vem se tornando uma tendência em diversas áreas da ciência aplicada. Reiteradamente, o melhoramento da sensibilidade, seletividade e rendimento dos sensores analíticos eletroquímicos e biossensores é atribuída ao aumento do desempenho eletroanalítico dos eletrodos nanoestruturados. Conforme descrito no presente relatório, o procedimento objeto desta patente, aprimora características amplamente desejadas nos biossensores, tais como área superficial, sensibilidade, estabilidade e biocompatibilidade.

08. Dentre os biossensores eletroquímicos, os baseados no princípio impedimétrico são especialmente reconhecidos por sua alta sensibilidade. Muitas alternativas têm sido exploradas para aprimorar sua seletividade e estabilidade, com o objetivo de tentar conseguir uma resposta rápida a partir do uso mínimo de reagentes e de amostras sem pré-tratamento. Destaca-se que o funcionamento destes dispositivos é simples. A presença e concentração do analito de interesse pode ser determinado na superfície do eletrodo a partir das mudanças da corrente elétrica resultantes da oxidação ou redução de uma solução de espécies eletroativas, na qual o biossensor deve se encontrar submerso.

09. Em eletroquímica, os eletrodos de carbono são conhecidos por seu baixo custo, boa transferência de elétrons e biocompatibilidade. Apesar disso, os nanomateriais de carbono se encontram ainda sob investigação para se conseguir o desempenho especulado com base em suas propriedades catalíticas e eletrônicas intrínsecas.

10. As nanoestruturas de carbono apresentam propriedades dimensionais, eletroquímicas e catalíticas bem documentadas que as tornam em candidatas ideais a serem empregadas na nanoestruturação dos biossensores. Ademais, sua inocuidade ao meio ambiente e compatibilidade biológica se apresentam como características adequadas para seu uso no desenvolvimento de biossensores de monitoramento contínuo in vivo. Desde a descoberta dos fulerenos, os materiais carbônicos estruturados à nanoescala contam com grande popularidade. Praticamente, o acúmulo de excelentes pesquisas se focam no estudo de suas propriedades eletrônicas, magnéticas e ópticas, que podem ser customizadas a partir do arranjo estrutural da rede hexagonal de carbonos unidos por ligações sp^2 , comum a todas elas. Até a presente data, já foram descritas um grande número de nanoestruturas de carbono tais como os nanocones, nanodiscos, toróides, schwarzitas, nanotubos de carbono, grafeno e, posteriormente, as nanofitas de grafeno. Outrossim, as propriedades mais destacadas na literatura estão relacionadas principalmente com o fato dos materiais em nanoescala apresentarem um destacado aumento da área superficial associado à diminuição de volume. Claramente, o uso de nanopartículas representa uma solução prática para o aumento da área superficial, e assim, da densidade dos sítios para modificação química.

11. A grande maioria das metodologias que empregam nanoestruturas de carbono para a modificação de eletrodos de uso eletroquímico envolvem interações físico-químicas. Contudo, interações fracas e não direcionadas são insuficientes para resistir aos mais simples protocolos de preparação de biossensores. Por outro lado, quando ligações covalentes são exploradas, moléculas alta-

mente tóxicas como os organo-silanos, são preferidas. Por estas razões, mostraremos a seguir que o maior diferencial encontrado na presente invenção, com relação aos trabalhos publicados, tanto na literatura científica quanto na de patentes, corresponde ao uso de biomoléculas sulfuradas inócuas com o objetivo de imobilizar covalentemente nanoestruturas de carbono na superfície de eletrodos metálicos ou óxido-metálicos.

12. Diversas publicações científicas demonstram certa facilidade na modificação de eletrodos de carbono vítreo ou de ouro. Uma técnica popularizada até o momento é a de gotejamento direto. Como requisito, é necessário conseguir preparar uma solução homogênea de qualquer tipo de nanoestrutura ou compósito a ser testada como plataforma eletroquímica. Contudo, diversas contradições quanto a natureza do material e o solvente selecionado são encontradas na literatura. Ademais, soluções coloidais são igualmente empregadas. Uma vez obtida a solução desejada, o eletrodo a ser modificado é tratado com uma limpeza excepcional. Água régia, diversos ácidos e solventes orgânicos além de protocolos de polimento e sonicação são usualmente utilizados. A limpeza eletroquímica realizada pela ciclagem de um potencial elétrico durante a imersão do eletrodo em uma solução diluída de ácido sulfúrico é igualmente um procedimento comum. Uma vez limpo o eletrodo, a fisissorção é facilitada. Inúmeros materiais têm sido assim imobilizados, contudo, sua reprodutibilidade é baixa e sua reversibilidade é praticamente impossível dado que qualquer processo de limpeza levará à desestabilização do material adsorvido.

13. Em se tratando de pesquisas que visam aumentar a robustez da plataforma de transdução, ligações covalentes empregam principalmente organo-silanos, quaisquer moléculas orgânicas ou inorgânicas tioladas ou as conhecidas como ligantes moleculares. No entanto, seu descarte é problemático, sendo preciso armazenamento por tempo indefinido dos rejeitos, e assim mesmo, assegurados contra vazamentos. Devido ao risco latente para o meio ambiente é importante encontrar substitutos de baixa toxicidade, e se possível, com opção a tratamento de biodegradação.

14. Não é numerosa a literatura específica de patentes, identificada por sua similaridade com os termos contidos no presente trabalho. Em geral, quando comparadas entre si, as patentes identificadas descrevem a modificação de substratos por meio do uso de filmes meso-porosos orgânicos ou inorgânicos, caracterizados quimicamente como revestimentos hidrofóbicos. A patente WO2009118739A1, relacionada com a construção de sensores químicos nanoestruturados para detecção de explosivos, reivindica o uso de revestimentos orgânicos criados com pequenas moléculas, monômeros, oligômeros e polímeros, contendo tióis, tiolatos, sulfuretos, dissulfuretos, carbamatos, aminas, fosfinas, carboxilatos, cianetos ou isocianetos, etc. Contudo, salientamos que o método de imobilização se mantém do tipo não-covalente para a maioria dos substratos listados, ademais de que, moléculas biológicas não foram empregadas para a imobilização das nanoestruturas. A patente US7745856B2 descreve um sensor que compreende o uso de nanotubos ou nanofios recobertos por uma dupla camada de lipídio em torno do mesmo. Diferentemente do método aqui apresentado, essa patente pretende imobilizar junto com a bicamada lipídica

um elemento de detecção. O nanotubo recoberto pela bicamada lipídica ou sensor de nanofios, pode detectar variações no transporte de íons através de uma proteína transmembranar. A eficiência de detecção fornecida utiliza métodos de amplificação de sinal, além de permitir uma multiplexação integrada.

15. Em se tratando de literatura de patentes encontradas por similaridade de termos, podemos citar a patente US7911009B2, que se refere à preparação de nanossensores para o diagnóstico de doenças usando uma plataforma baseada em nanofibras de carbono. Compreendendo uma nanofibra, um marcador substituto, e um agente para a detecção de uma espécie química específica. Tais conjuntos de nanopartículas são ligados à plataforma sensora pela sua combinação com polímeros iônicos para a detecção plasmática de soro fetal bovino. Contudo, salientamos que o método de imobilização carece de modificação covalente, sendo obtido por interações de fisissorção. A patente WO2013033359A1 tenta estender-se a todas as possibilidades de construção de biossensores baseados em nanotubos de carbono. Salientamos que o objetivo da supracitada patente foi o desenvolvimento de uma arquitetura tipo transistor. Entretanto, o método para construção da plataforma consiste no crescimento de nanotubos diretamente sobre uma placa de silício pelo método de deposição química de vapor. Embora este método permita uma interação forte entre substrato e nanoestrutura, a mesma não é covalente, e portanto sua desestabilização pode ocorrer. Outra diferença importante consiste em que no procedimento aqui descrito, as moléculas biológicas são expressamente empregadas para a imobilização das nanoestruturas ao substrato. A patente CN100410656 descreve um método para pre-

parar compósitos de nanotubos de carbono com cisteína sobre eletrodos de carbono vítreo. Uma das principais reivindicações consiste em conseguir a polimerização do aminoácido L-cisteína pela sua exposição à luz ultravioleta. Os nanotubos de carbono têm de ser previamente dispersados numa solução aquosa de cisteína para posteriormente ser gotejada diretamente sobre o eletrodo, e finalmente, ao ser exposto o eletrodo à luz ultravioleta por determinado tempo de cura. Desta forma, os nanotubos ficaram presos nas cadeias poliméricas. Contudo, do mesmo modo salientamos que, neste caso, a relação compósito-carbono vítreo não pode ser considerada como covalente. As diferenças existentes entre as patentes descritas podem ser observadas através da comparação entre esses documentos na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação entre as componentes características de cada invento

	PRESENTE INVENTO	WO2009118739 A1	US7745856B2	US7911009B2	WO2013033359 A1	CN100410656
Estrutura de carbono nanométrica	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM
Imobilização covalente ao substrato	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Aminoácido sulfurado	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM
Agente de detecção específico	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
Imobilização covalente do agente específico	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO

Plataforma eletroquímica	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
--------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

16. As limitações que podemos identificar nos procedimentos atuais são as seguintes: primeiro, a imobilização da camada transdutora sobre o substrato depende do uso de matrizes iônicas que permitam interações físico-químicas entre elas, o substrato e as nanopartículas. Não sendo imobilizada covalentemente, a estabilidade da camada transdutora se vê comprometida durante os passos de preparação consecutivos, incubação, lavagem com água abundante, processos térmicos, etc. A variabilidade da área biosensora, dificulta assim a reprodutibilidade e acurácia dos eletrodos eletroquímicos preparados por esse tipo de protocolos. Quando comparados os métodos de imobilização covalente com os que propiciam uma simples adsorção, ressaltamos que os primeiros conseguem uma maior porcentagem de reprodutibilidade entre amostras, e também, que o eletrodo possa ser regenerado ao seu estado inicial para apresentar uma outra amostra a ser testada. Destaca-se que este fenômeno é o resultado da força da ligação covalente que impede que o material ligado seja arrastado por forças mecânicas simples, tais como um jato contínuo de água. Em segundo lugar, quando as ligações covalentes são escolhidas, os protocolos requerem o uso de moléculas com elevada toxicidade para o meio ambiente. Dessa maneira, os procedimentos aqui apresentados diminuem a necessidade de uso de reagentes de difícil manuseio. Outrossim, os procedimentos aqui apresentados se distinguem pela fácil modificação de eletrodos metálicos ou óxido metálicos com

biomoléculas orgânicas, como por exemplo, os aminoácidos sulfurados.

Objetivos da Invenção

17. O escopo da presente invenção compreende: a) uma metodologia para imobilização de nanoestruturas de carbono funcionalizadas com grupos carboxílicos pela ação simultânea de um tratamento ácido seguido por um tratamento de oxidação; b) ademais, apresentamos, sem intenção de limitá-la, uma das formas de imobilização covalente em um único passo, que se desenvolve através de um método de química molhada, na presença de aminoácidos sulfurados como a cisteína; c) propomos sua aplicação em sensores eletroquímicos baseados no princípio impedimétrico para a detecção, identificação e quantificação de biomoléculas de interesse para a segurança alimentar. Deve ser observado, ainda, que, no processo apresentado, dispensamos o uso de moléculas não biológicas que sejam orgânicas ou inorgânicas sulfuradas. Assim mesmo, esta invenção evita e dispensa a necessidade de marcadores, uma vez que esta técnica revela o aprimoramento nas propriedades elétricas da superfície do eletrodo tais como a resistência e/ou capacitância, mesmas que têm uma resposta representativa a partir da captura da molécula alvo, sem adição de amplificadores de sinal.

18. A presente invenção tem, também, como objetivo, o desenvolvimento de novos sistemas eletroquímicos estruturados com pelo menos um tipo de partícula de carbono de dimensionalidade nanométrica para produção em pequena, média ou grande

escala, com custo operacional reduzido, e, excepcionalmente, fácil manuseio dos rejeitos químicos.

Solução

19. A patente relacionada com o processo aqui apresentado se refere à preparação de biossensores eletroquímicos baseados em pelo menos um tipo de nanoestrutura de carbono e pelo menos um tipo de biomolécula sulfurada para seu uso em segurança alimentar, especificamente, para a detecção de micotoxinas em amostras alimentares. Ressaltamos que este processo fornece vantagens operacionais e de disposição de rejeitos químicos com resultados na economia de tempo e custos. Como características principais apontamos: a) a utilização de ligações covalentes direcionadas à imobilização das nanoestruturas de carbono sob o eletrodo; b) o incremento no controle e número de sítios de imobilização; c) o aprimoramento da sensibilidade. Na hipótese atual, o aumento da sensibilidade do dispositivo aqui apresentado se encontra relacionado com a modificação dirigida e controlada dos eletrodos metálicos ou óxido-metálicos. A modificação da superfície do eletrodo ocorre pela formação de um filme homogêneo, denso e compacto composto por pelo menos um tipo de biomolécula sulfurada. Estas pequenas moléculas terminam enxertadas na superfície do eletrodo seja, devido a ligações covalentes ocorrendo entre seus átomos de enxofre e os átomos de ouro da superfície do eletrodo, ou então, por meio de quaisquer métodos de ancoragem que empreguem os defeitos atômicos da rede cristalina do substrato. Posteriormente, esse filme será utilizado para prosseguir com a ancoragem covalente das nanopartículas de carbono. Por exemplo,

o aminoácido cisteína possui um grupo amino que pode ser utilizado para unir os grupos carboxílicos presentes nos nanotubos de carbono.

Vantagens

20. Uma das vantagens mais destacadas do processo de imobilização covalente de nanoestruturas aqui descrito, está associada ao fato de dispensar o uso de moléculas orgânicas ou inorgânicas sulfuradas que apresentem toxicidade ao meio ambiente. As moléculas aqui empregadas para imobilizar as nanoestruturas de carbono podem conter pelo menos um alquiltiol, tioálcool, tioéter, tioéster, tiocetona, tiofenol e/ou derivados destes. Estas biomoléculas não são tóxicas nem precisam de armazenagem ou descarte especial.

21. Como característica, não são utilizados monômeros ou polímeros iônicos nem quaisquer metodologias de polimerização para gerar ou empregar polímeros com a intenção de serem reticuladores que propiciem a imobilização por aprisionamento das nanopartículas de carbono. Igualmente, os procedimentos não empregam quaisquer outras moléculas ou processos que tenham a ver unicamente com a fisissorção da camada transdutora sobre o eletrodo.

22. A especificidade dos dispositivos preparados pelos processos aqui descritos depende da capacidade de bioreconhecimento do anticorpo imobilizado covalentemente com as nanoestruturas de carbono disponibilizados sobre o transdutor eletroquímico. As pesquisas sobre anticorpos contam com mais de 100 anos de expe-

riência e aproximadamente 40 anos de desenvolvimento industrial. De fato, os anticorpos dominam a atuação em diagnósticos moleculares e praticamente existem versões humanizadas de qualquer um deles. Contudo, destacamos que o processo aqui apresentado é relativamente simples, porque os anticorpos empregados não precisam ser modificados para administração humana. De acordo com o fabricante, quando empregado em ELISA, o anticorpo anti-aflatoxina B1 produzido em coelho é capaz de detectar diluições próximas a 1:1000. Contudo, destacamos que a imobilização de anticorpos tem demonstrado contribuir com a diminuição nesses limites de detecção. A sensibilidade dos imunossensores varia dependendo do transdutor e dos métodos de imobilização empregados, diante disso, salientamos que o procedimento aqui apresentado exhibe respostas satisfatórias na análise de amostras de farinha de milho contaminadas com aflatoxina B1 em concentrações na faixa de picograma por mL.

23. O presente dispositivo aumenta a segurança durante a manipulação de amostras tóxicas. Para realizar a detecção da aflatoxina, o imunossensor aqui apresentado necessita unicamente de 2 microlitros de amostra alimentar com uma faixa de concentração de 0.1 picograma por mililitro até 1 nanograma por mililitro. O presente dispositivo pode ser utilizado em laboratórios de análises clínicas, de ensino ou pesquisa. Da mesma maneira nada impede a adaptação de um potenciostato portátil para sua aplicação no campo, permitindo assim, o monitoramento contínuo de alimentos líquidos como sucos de frutas, verduras, grãos de cereais, derivados lácteos ou suas versões sólidas.

Novidade e Efeito Técnico Alcançados

24. A novidade da presente invenção tem a ver com a metodologia empregada na preparação de dispositivos utilizados para diagnosticar a presença de moléculas de interesse para a segurança alimentar. Biomoléculas sulfuradas foram empregadas para conseguir a imobilização covalente de pelo menos uma nanoestrutura de carbono carboxilada. Até o presente momento, este tipo específico de imobilização não havia sido identificado nem reclamado por nenhuma outra instituição de pesquisa ou ensino ou mesmo descrito na literatura.

Descrição Detalhada

25. Sem a intenção de limitar o escopo de nossa invenção, os exemplos a seguir são fornecidos somente como maneira de ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a preparação dos biossensores, em alinhamento com os quais a presente invenção se refere.

26. Fica compreendido, como “ácido diluído”, o grupo que inclui reagentes químicos como H_3PO_4 , H_2SO_4 , HCl, HNO_3 , ou qualquer outro que apresente característica de ácido e que se encontre diluído em concentrações abaixo de 5 molar.

27. Fica compreendido, como biomolécula sulfurada, qualquer molécula que apresente pelo menos um dos seguintes grupos: alquiltiol, tioálcool, tioéter, tioéster, tiocetona, tiofenol, ou misturas das mesmas e que sejam produzidas, isoladas, extraídas ou preparadas a partir de partes ou do total de células animais, vegetais, bacterianas, ou então microrganismos em geral.

28. Ficam compreendidos, como nanoestruturas de carbono, os nanocones, nanodiscos, toróides, schwarzitas, nanotubos de carbono, grafeno, nanofitas de grafeno ou qualquer arranjo estrutural da rede hexagonal conformada por átomos de carbono ligados por hibridização do tipo sp^2 que culmine na criação de uma partícula finita à escala nanométrica.

29. Sem a intenção de limitar o presente processo, a ativação dos grupos funcionais presentes nas nanoestruturas de carbono pode ser realizada com derivados de carbodiimidas, azidas, cloretos de acila, carbóxi-anidridos, ésteres de cianometilo, hidróxi-succinimida, hidroxiftalimida, nitroindolinas ou tio-tiazolidinas.

30. Ficam compreendidos, como agentes de especificidade, as imunoglobulinas, aptâmeros, proteínas ligantes a hidratos de carbono ou quaisquer outras biomoléculas que, natural ou artificialmente, sejam criadas ou selecionadas para reconhecer moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar.

31. Ficam compreendidos, como agentes bloqueadores inespecíficos, a albumina de soro bovino, caseína, glicina, pepsina, surfactantes não iônicos, polietileno glicol, gelatina de peixe e derivados de soro, já como agentes bloqueadores específicos se encontram quaisquer nanopartículas direcionadas para o fim de minimizar ou eliminar interações específicas. Em geral, o objetivo é o de bloquear qualquer ligação indesejada entre o eletrodo final modificado e as moléculas presentes nas amostras suspeitas por não serem complementares ou afins aos agentes de especificidade. Pelo próprio objetivo destes agentes bloqueadores, a maioria das vezes os mesmos terminam unidos ao eletrodo por meio de intera-

ções físico-químicas como a fisissorção dirigida por sítios hidrofóbicos e inespecíficos.

32. De forma geral, o processo aqui apresentado consegue construir o biodispositivo final, através da imobilização covalente da nanoestrutura de carbono. De forma geral, o procedimento para conseguir a montagem da plataforma requer que em cada incubação realizada neste processo seja mantida uma atmosfera úmida controlada em pelo menos 80%. Assim, um eletrodo metálico ou de óxido metálico é inicialmente polido durante 3 minutos com um papel feltro e pó de alumina de 50 nm. Seguidamente, o eletrodo é enxaguado e colocado em um banho ultrassônico moderado (entre 20 e 200 KHz) com água deionizada por um período não inferior a cinco minutos e posteriormente seco a 25°C. Posteriormente, uma solução aquosa de cisteína é gotejada sobre o eletrodo que deve ser incubado por um período não inferior a cinco minutos. Uma vez concluída esta etapa, o eletrodo é lavado com abundante água deionizada e colocado no banho ultrassônico mencionado por um período não inferior a 30 segundos. Subsequentemente, uma solução de nanoestruturas de carbono com grupos funcionais ativados propriamente para se unir covalentemente ao aminoácido sulfurado é gotejada sobre o eletrodo que será então incubado por um período não inferior a cinco minutos. Após a incubação, o eletrodo é lavado minuciosamente com água deionizada abundante. Finalmente, o eletrodo deve ser imediatamente modificado com o anticorpo anti-AFB1. Esta última ancoragem ocorre sobre o eletrodo modificado com nanoestruturas de carbono gotejando a solução do anticorpo com grupos funcionais ativados adequadamente para este fim. Após a incubação, o eletrodo é lavado com abundante

água deionizada e colocado no banho ultrassônico por um período não inferior a 30 segundos. Como etapa final, os sítios livres para interações inespecíficas no eletrodo modificado devem ser bloqueados. Para isso, uma solução de agente bloqueador deve ser gotejada e mantida em incubação por, pelo menos, 5 min. Passado este tempo, o eletrodo deve ser lavado e armazenado de acordo ao agente bloqueador empregado nesta última etapa. Após esta etapa final o imunossensor se encontra pronto para ser utilizado. Ele mantém a capacidade transdutora das nanoestruturas de carbono e a capacidade de biorreconhecimento do anticorpo contra a AFB1.

Preparação e caracterização dos biossensores

- Preparação dos biossensores

33. Sem intenção de limitar os procedimentos e com o único objetivo de exemplificar uma das muitas metodologias cobertas por esta patente, na Fig. 1, mostramos o processo de montagem de um biossensor eletroquímico baseado em nanotubos de carbono e cisteína para seu uso como imunossensor impedimétrico de aflatoxina B1. Inicialmente, 3 microlitros de uma solução 15 mM de cisteína (Cys) é gotejada sobre a superfície do eletrodo permitindo 20 minutos de incubação (Fig. 1a). Após este tempo, o eletrodo é lavado com água deionizada e colocado em banho ultrassônico por 1 min. Posteriormente (Fig. 1b), 3 microlitros de uma solução aquosa contendo nanotubos de carbono carboxilados diluídos em uma solução 1:1 de 0.4 M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 0.1 M de N-hidroxisuccinimida (NHS) são gotejados sobre a camada de cisteína. O eletrodo é incubado por 50 min para se obter o sistema Cys-EDC:NHS-NTC. Subsequentemente (Fig. 1c), 3

microlitros de uma solução de anticorpo anti-aflatoxina B1 previamente ativada com o conjugado 1:1 de 0.4 M EDC e 0.1 M NHS é gotejada e incubada por 40 minutos. Finalmente (Fig. 1d), os sítios livres para interações inespecíficas presentes no eletrodo são bloqueados gotejando 3 microlitros de uma solução de BSA e incubando o eletrodo por 20 min. Após a incubação o eletrodo se encontra finalizado e pronto para ser usado.

34. Com o objetivo de determinar o intervalo de detecção linear do biossensor aqui apresentado, diversas amostras com concentrações de aflatoxina B1 (AFB1) variando de 0.1 picograma/mililitro até 13 picogramas/mililitro são testados em triplicata (Fig. 1e).

- Caracterização do biossensor

35. Na Fig. 2, apresentamos os espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR, Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy), obtidos da superfície do substrato de ouro nas diferentes etapas de modificação. Inicialmente, logo após do tratamento com cisteína, percebemos que a ausência de bandas ao redor de 2600 cm^{-1} indica a correta imobilização do grupo sulfidril sobre o eletrodo de ouro. No mesmo espectro, as bandas presentes em 1329 cm^{-1} e 1413 cm^{-1} indicam a presença do grupo amino que será empregado para imobilização dos nanotubos de carbono. Após a imobilização das nanoestruturas podemos perceber a banda larga entre 3100 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} , região característica ao estiramentos dos grupos O-H ácidos, a banda em 1634 cm^{-1} correspondente ao modo fônon ativo da banda G dos materiais gráficos, já as bandas

em 1350 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 902 cm^{-1} e 782 cm^{-1} correspondem aos modos de estiramento dos grupos carboxílicos. Após a imobilização dos AcAFB1, fica evidente o desaparecimento das bandas anteriormente presentes em 782 cm^{-1} e 900 cm^{-1} , sendo este o resultado da ocupação dos grupos carboxílicos dos nanotubos de carbono. Da mesma maneira vemos uma redução drástica da larga banda que ocorria na etapa anterior entre $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ correspondente aos grupos O-H ácidos.

36. A evolução topográfica do eletrodo foi analisada ao final de cada etapa de modificação. As imagens da superfície do eletrodo modificado foram obtidas utilizando microscopia de força atômica. Na Fig. 3, apresentamos o processo de montagem do sistema sensor Cys-EDC:NHS-NTC-EDC:NHS-AcAFB1. Na Fig. 3a, observamos a topografia inicial da superfície do eletrodo. Nesse momento o eletrodo se encontra limpo. Após a modificação com a cisteína (Fig. 3b) podemos observar uma mudança na morfologia. Pela imagem podemos identificar a imobilização de um filme denso e homogêneo do aminoácido de 37 nm de altura, assim mesmo, podemos relatar que a preparação recente de cisteína e o processo de incubação propiciaram uma forte adesão covalente entre o grupo sulfidril presente no aminoácido e a superfície do eletrodo. Na Fig. 3c, apresentamos a morfologia da superfície após a ancoragem covalente dos nanotubos de carbono. Relatamos que, após uma minuciosa lavagem, pode ser observada uma drástica mudança na topologia do substrato, já que a altura do filme alcança 200 nm . Após a seguinte etapa, na Fig. 3d, apresentamos a morfologia da superfície do eletrodo após a imobilização covalente do AcAFB1. Notamos que a topologia aparece um tanto mais homogênea e

também um aumento na altura da camada transdutora para 300 nm. Finalmente, após o bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA (Fig. 3e), relatamos o aumento na altura média para 420 nm e também, a presença de uma morfologia mais homogênea e suave, sendo este, o resultado da interação inespecífica entre sítios livres ainda presentes na superfície do eletrodo e as moléculas do BSA. Como resultado deste bloqueio, agora a especificidade do biossensor se encontra aprimorada e o dispositivo se encontra pronto para realizar as detecções de AFB1. Na Fig. 3f, podemos observar que o biorreconhecimento da AFB1 pelo anticorpo Anti-AFB1 ocasiona ainda uma pequena mudança na altura para 430 nm.

37. Nas Fig. 4a e 4b, mostramos os resultados da espectroscopia de impedância eletroquímica na forma de um gráfico de Nyquist. Neles é plotada a relação entre a impedância real Z' no eixo das abcissas contra a impedância imaginária Z'' no eixo das ordenadas. As respostas obtidas para cada amostra foram analisadas ajustando seu comportamento a um circuito equivalente modificado de tipo Randles mostrado na Fig. 4c. Com ele, é possível avaliar a variação da resposta impedimétrica resultante das interações antígeno-anticorpo. Em termos dos componentes do circuito, temos que o R_s se refere à resistência da solução eletrolítica, W é a impedância de Warburg, resultante da difusão dos íons, desde a solução eletrolítica em direção à interface do eletrodo, CPE é o elemento de fase constante que se refere à somatória de capacidades do sistema, no qual N é a constante de transferência de elétrons da sonda redox que provém das camadas de biomoléculas adsorvidas à superfície, e, finalmente, R_{ct} é a resistência à transferência de carga gerada pelo impedimento à movimentação do

par redox. Na Tabela 2, são apresentados os resultados dessa análise, tanto para as amostras de AFB1 pura utilizada para a curva de calibração, como para as amostras de farinha de milho contaminada. Inicialmente, podemos observar que o biossensor modificado Au_Cys_NTC_AcAFB1 apresenta um valor Rct 4030 Ω. A partir da detecção da primeira amostra podemos ver um aumento gradual da resistência desde 6970 Ω para 0.1 pg/mL, 9030 Ω para 1.0 pg/ml, 20200 Ω para 3.0 pg/mL, 30100 Ω para 6.0 pg/mL, 38400 Ω para 9 pg/mL até 48300 Ω para 11 pg/mL. Seguindo a mesma tendência, as respostas associadas às amostras de farinha de milho contaminada com AFB1 começam desde 8380 Ω para 0.1 pg/mL, 30300 Ω para 5.0 pg/mL, 38800 Ω para 9.0 pg/mL, 47200 Ω 11.0 pg/mL e 61300 Ω para 15.0 pg/mL.

38. O biorreconhecimento da AFB1 permite a formação de camadas isolantes sobre o eletrodo modificado com AcAFB1. Dessa maneira, a concentração de AFB1 presente nas amostras permite a variação gradual de Rct. A variação relativa de Rct (%ΔRct) é útil para avaliar o desempenho do imunossensor, sendo calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \Delta R_{ct} = \left| \frac{R_{ct}(\text{Au_Cys_NTC_AcAFB1_AFB1}) - R_{ct}(\text{Au_Cys_NTC_AcAFB1})}{R_{ct}(\text{Au_Cys_NTC_AcAFB1})} \right| \times 100.$$

Aqui, o valor de Rct correspondente ao eletrodo modificado com AcAFB1 (Au_Cys_NTC_AcAFB1) é comparado com a resposta do biossensor após sua interação com a AFB1 (Au_Cys_NTC_AcAFB1_AFB1). Os valores %ΔRct são mostrados na Tabela 3 com o resultado do cálculo do erro correspondente ao desvio dos resultados obtidos por triplicata em cada ponto.

Tabela 2

	Rs (Ω)	CPE (μ Mho)	N	RCT (Ω)	W (μ Mho)
Au_Cys_NTC_AcAFB1	651	3.68	0.827	4030	396
AFB1_(0.1 pg/mL)	703	2.89	0.854	6970	402
AFB1_(1.0 pg/mL)	666	2.38	0.866	9030	424
AFB1_(3.0 pg/mL)	670	2.50	0.876	20200	485
AFB1_(6.0 pg/mL)	644	2.37	0.874	30100	621
AFB1_(9.0 pg/mL)	722	2.31	0.878	38400	848
AFB1_(11.0 pg/mL)	649	2.29	0.874	48300	1540
Farinha_(0.1 pg/mL)	642	2.44	0.871	8380	419
Farinha_(5.0 pg/mL)	773	2.11	0.833	30300	660
Farinha_(9.0 pg/mL)	742	2.01	0.892	38800	709
Farinha_(11.0 pg/mL)	706	2.01	0.887	47200	1310
Farinha_(15.0 pg/mL)	776	1.94	0.888	61300	4640

39. Na Fig. 5, são apresentados os valores de $\% \Delta R_{ct}$ em função das concentrações conhecidas da toxina. A relação encontrada entre elas é linear (círculos pretos) e pode ser modelada pela equação $R_{ct}\% = 70.44 + 92.15(\text{AFB1 pg/mL})$ com um coeficiente de correlação de 0.99. Neste mesmo gráfico, em círculos menores vermelhos, são apresentados os valores de $\% \Delta R_{ct}$ obtidos a partir

das amostras de farinha de milho contaminada. Desta forma, foi comprovado que as respostas obtidas apresentam uma tendência linear da curva padrão.

Tabela 3

	% Δ Rct	Desvio padrão \pm
AFB1_(0.1 pg/mL)	72.95	0.254
AFB1_(1.0 pg/mL)	124.07	0.187
AFB1_(3.0 pg/mL)	401.24	0.078
AFB1_(6.0 pg/mL)	646.89	0.174
AFB1_(9.0 pg/mL)	852.85	0.220
AFB1_(11.0 pg/mL)	1098.51	0.181
Farinha_(0.1 pg/mL)	107.9	0.244
Farinha_(5.0 pg/mL)	651.9	0.211
Farinha_(9.0 pg/mL)	862.8	0.201
Farinha_(11.0 pg/mL)	107.2	0.201
Farinha_(15.0 pg/mL)	1421.1	0.194

REIVINDICAÇÕES

1. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR um biossensor constituído das seguintes partes: a) uma molécula de reconhecimento (Anticorpo Monoclonal de Aflatoxina B1), b) uma superfície onde será feita a imobilização das moléculas, c) uma fonte de corrente elétrica, d) Nanotubo de Carbono (NTC) funcionalizado com Cisteína (Cys).

2. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 1 caracterizadas por serem obtidas a partir de um processo de automontagem dos analitos na superfície de ouro do sensor.

3. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO , caracterizado por referenciar a métodos e composições para identificação de toxinas a invenção baseia-se na aplicação de uma plataforma sensora com AcAFB1 em nanotubo de carbono ligado a cisteína para detecção da toxina em amostras com baixas concentrações. Em particular foi desenvolvido um Imunosensor para a identificação da AFB1 em amostras de alimentos contaminados como a farinha de milho.

4. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 1, caracterizada pelo fato da referida superfície ser de ouro, o que proporciona uma maior condutibilidade elétrica e biocompatibilidade ao dispositivo facilitando assim a interações molecular.

5. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, conforme reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que o referido compósito é indispensável para aumentar a eficiência do dispositivo além de apresentar uma alta reatividade química.

6. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por cada etapa de montagem do nanocompósito pela junção de cisteína na superfície do sensor, ativado com EDC/NHS e seguida por NTC previamente diluído em água deionizada e depositado na superfície do sensor seguida de lavagem simples com água deionizada.

7. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado pela modificação camada a camada da superfície do biodispositivo seguida da análise impedimétrica e voltamétrica ao término de cada etapa de modificação A lavagem foi executada com água deionizada após cada período de incubação.

8. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO caracterizado por está de acordo com a reivindicação 7, em que os métodos de detecção espectroscópica foram por meio de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Voltametria Cíclica.

9. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a cisteína ser uma molécula bioativa com seu grupamento R-SH facilmente oxidável facilitando sua ligação ao nanotubo de carbono.

10. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO ,conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o conjugado 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N- Hidroxisuccinimida (NHS) devido a suas propriedades, viabiliza a ligação do nanotubo de carbono a cisteína.

11. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido nanotubo por apresentar propriedades eletrônicas e sua estrutura química superficial que afeta a cinética do eletrodo, sendo portanto importantes ferramentas na construção de biossensores.

12. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal imobilizado na superfície do nanotubo de carbono é caracterizado por facilitar a troca de elétrons entre o centro redox do anticorpo e a superfície do eletrodo, permitindo que a atividade eletrocatalítica seja monitorada sem a utilização de marcadores proporcionando ao referido biossensor uma alta especificidade da resposta.

13. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a referida análise é feita em uma faixa de frequência de 100 MHz e 100 kHz e numa faixa de potencial de -0.2V e 0.7 V, respectivamente.

14. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por abranger ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações moleculares, para a elaboração de ferramentas para uso diagnóstico.

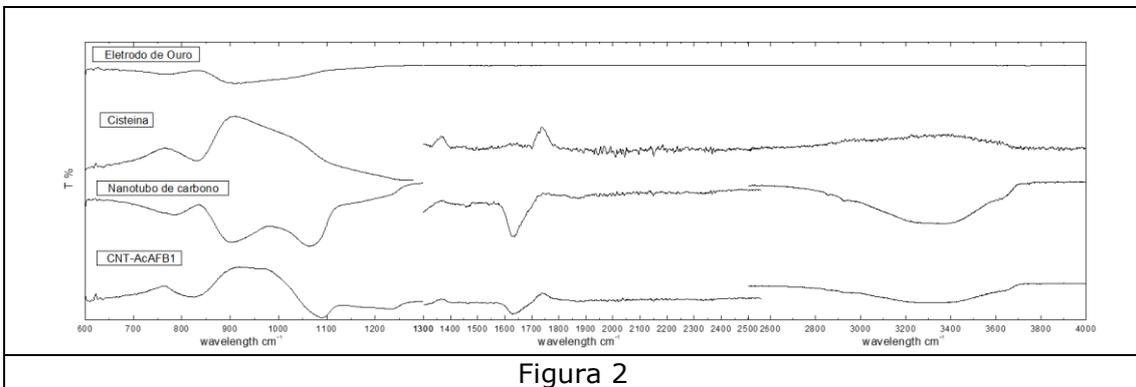
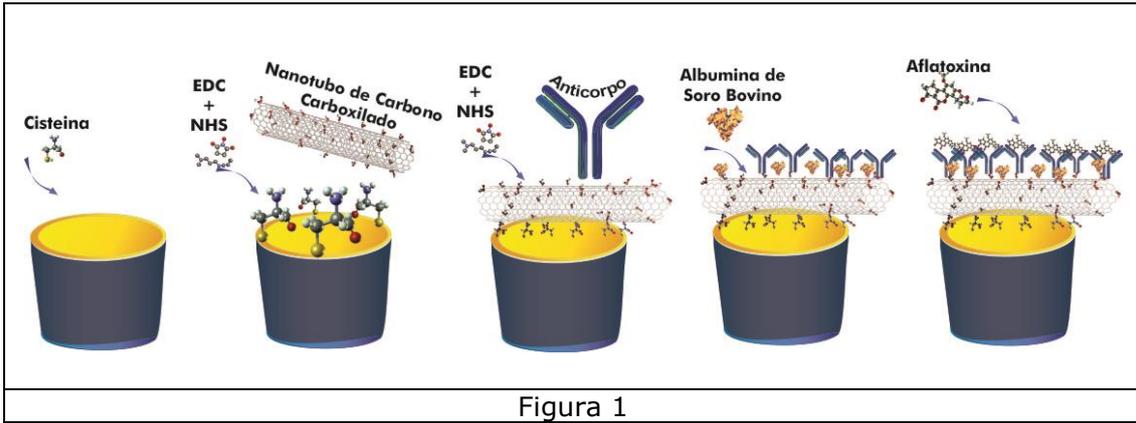
15. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por abranger ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações, para o desenvolvimento de biodispositivos eletroquímicos.

16. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado pelo fato de que o referido dispositivo é um imunossensor eletroquímico, conforme reivindicação 15.

17. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por abranger ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações caracterizado por ter caráter conjugado, para a elaboração de ensaios eletroquímicos para rápida e específica detecção amostras de alimentos contaminados.

18. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO caracterizado por está presente na área médica, biológica e farmacológica.

19. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO caracterizado por conter no mínimo monômero funcionalizado com oligonucleotídeo para elaboração de biossensores e biodispositivos.



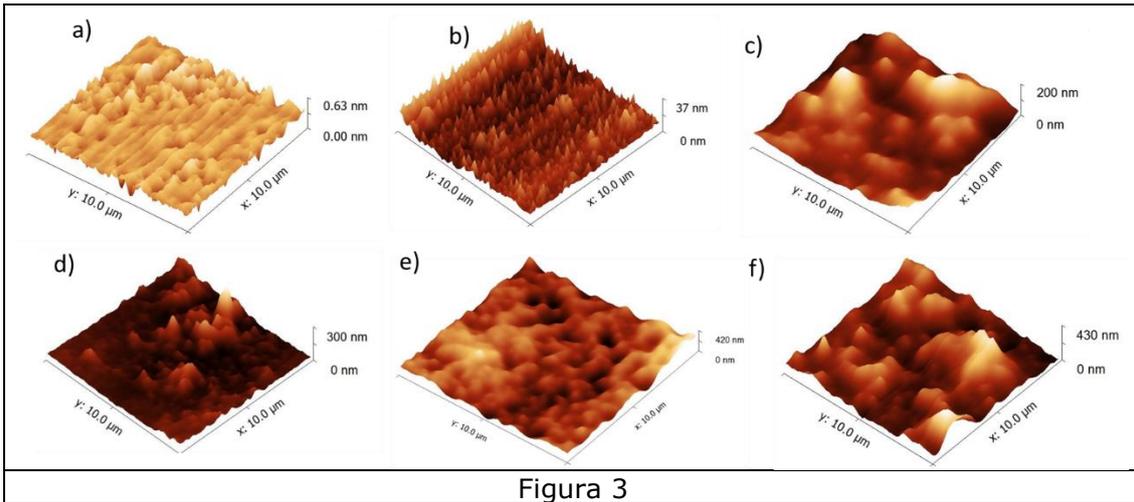


Figura 3

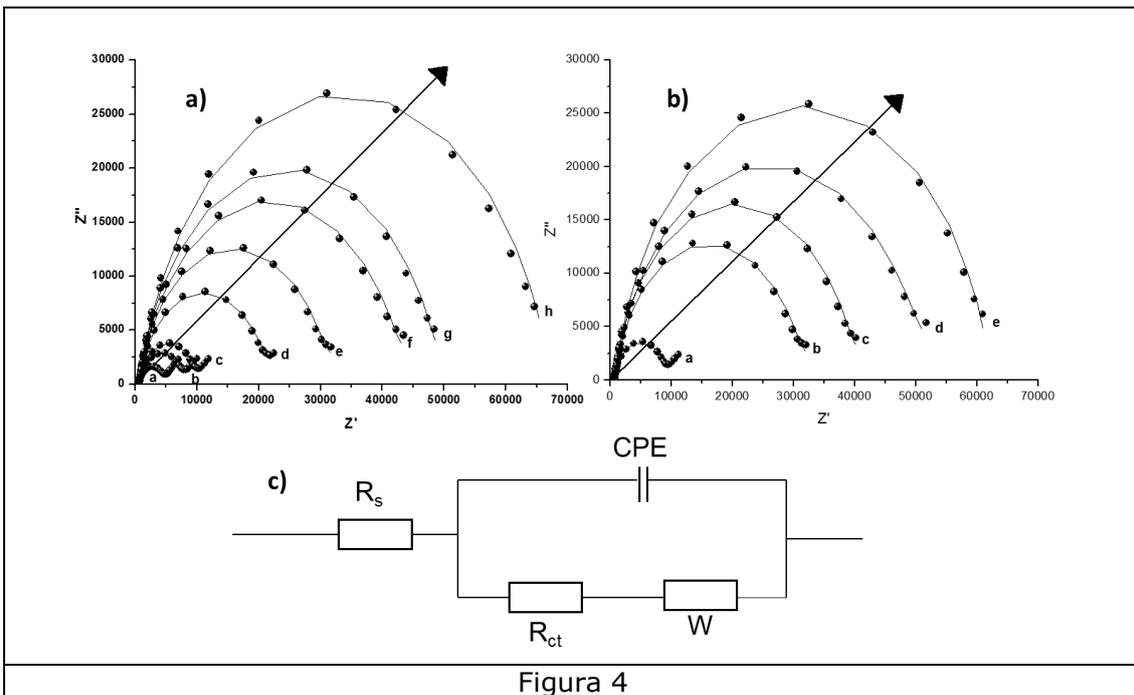


Figura 4

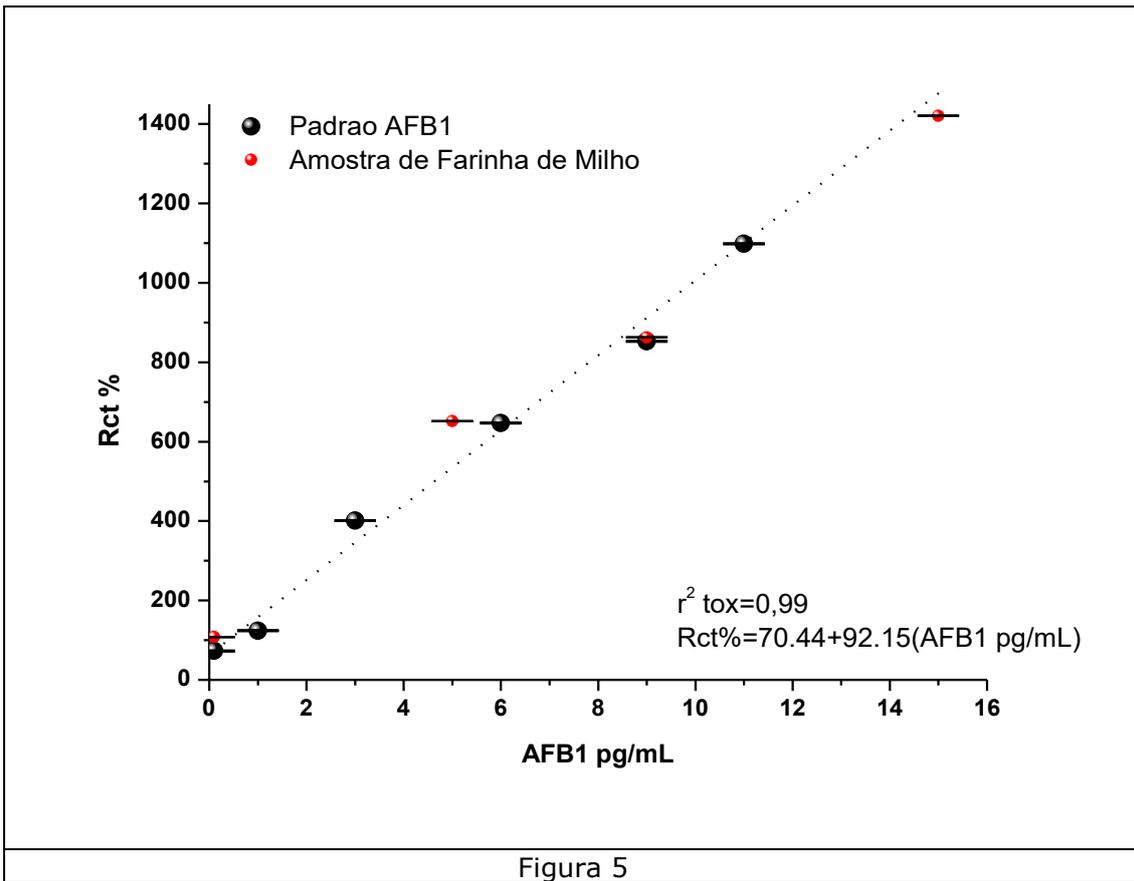


Figura 5

**DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM
CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA
ALIMENTAR**

A invenção apresentada emprega um método inovador de construção de um dispositivo imunoeletroquímico para ser utilizado como ferramenta na identificação de toxinas presente em alimentos e essa detecção ocorre em concentrações na faixa de picogramas por mililitro. Destacando que o dispositivo apresentado não utiliza moléculas orgânicas ou inorgânicas sulfuradas, de difícil descarte e/ou de alta toxicidade para o meio ambiente. O método empregado é o de química molhada por etapas, para que ocorra uma correta deposição dos analitos na superfície do dispositivo. Além de ser uma ferramenta de baixo custo, análise rápida e em tempo real.