



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

(21) BR 102016020702-9 A2



(22) Data do Depósito: 08/09/2016

(43) Data da Publicação: 20/03/2018

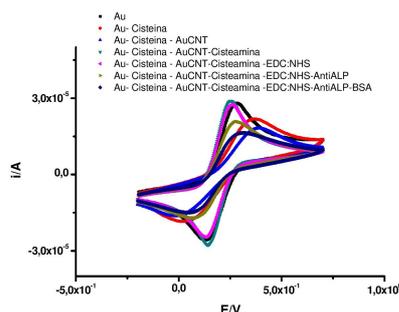
(54) **Título:** DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/68; G01N 27/26

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

(72) **Inventor(es):** MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA; ESTEFANI PONTES SIMÃO; CÉSAR AUGUSTO DE SOUZA ANDRADE

(57) **Resumo:** DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA O invento apresentado é caracterizado pela detecção de fosfatase alcalina (ALP) em amostras biológicas humanas, esta enzima é de extrema importância como auxílio no diagnóstico de diversas doenças, porém os métodos utilizados atualmente para a identificação dessa enzima exigem várias etapas de processamento da amostra, além de uma escala de detecção limitada. Diante de algumas limitações para a detecção da fosfatase alcalina, os biossensores eletroquímicos são uma alternativa para o diagnóstico laboratorial devido a sua capacidade de miniaturização e baixo custo. Na presente invenção, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico nanoestruturado com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro (AuCNT) acoplados quimicamente a anticorpos monoclonais (Anti-ALP) para a detecção eficaz de pequenas às mais altas concentrações de fosfatase alcalina. Algumas nanoestruturas como as nanopartículas de ouro, são bastante utilizadas na biotecnologia e principalmente no desenvolvimento de bios(...)



DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA

01. Campo da invenção

02. A detecção de fosfatase alcalina (ALP) em amostras biológicas é de extrema importância como auxílio no diagnóstico de diversas doenças, porém os métodos utilizados atualmente para a identificação dessa enzima sorológica humana exigem várias etapas de processamento da amostra, além de uma escala de detecção limitada. Diante de algumas limitações para a detecção da fosfatase alcalina, os biossensores eletroquímicos são uma alternativa para o diagnóstico laboratorial devido a sua capacidade de miniaturização e baixo custo. Na presente invenção, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico nanoestruturado com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro (AuCNT) acoplados quimicamente a anticorpos monoclonais (Anti-ALP) para a detecção eficaz de pequenas às mais altas concentrações de fosfatase alcalina.

03. As nanopartículas de ouro são bastante utilizadas na biotecnologia e principalmente no desenvolvimento de biossensores, atuando como suporte para biomoléculas, sem alterar as suas propriedades biológicas e como adjuvantes em outros nanomateriais. Os nanotubos de carbono são nanomateriais muito utilizados no desenvolvimento de sensores, devido a sua elevada área específica de ligação e condutividade elétrica, e quando acoplados a nanopartículas de ouro, potencializam o desempenho dos biodispositivos.

04. Sumário

05. O invento foi desenvolvido por meio da síntese de nanopartículas de ouro adsorvidas a nanotubos de carbono, posteriormente modificadas com

cisteamina. Finalmente, para a obtenção do dispositivo sensível a fosfatase alcalina em amostras de soro humano foram acoplados anticorpos monoclonais ao nanocomplexo para a detecção específica da enzima. O imunossensor foi desenvolvido através do uso da técnica de automontagem, que foi possível devido as propriedades físico-químicas das moléculas utilizadas proporcionando uma maior estabilidade ao sistema biossensível.

06. Os nanomateriais utilizados nesse invento possuem propriedades físicas próprias como, por exemplo as propriedades elétricas destacadas, que podem ser modificadas. Os nanotubos decorados com as nanopartículas de ouro modificadas com cisteamina (AuCNT) foram capazes de aumentar a área de ligação a anticorpos específicos para a fosfatase alcalina na superfície nanoestruturada do biossensor. Esse efeito foi observado devido a uma modificação química na superfície das nanopartículas de ouro através do uso da cisteamina. Desta forma, a cisteamina atuou como braço ligante covalente entre o ouro e os anticorpos aumentando a sensibilidade na detecção da fosfatase alcalina.

07. Anterioridades: Estado da Técnica

08. A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima sorológica humana presente em células musculares lisas das artérias e em outros tipos de células. Esta enzima participa do processo de mineralização óssea auxiliando na deposição do fosfato de cálcio no processo de formação dos cristais de hidroxiapatita (ATSUSHI SHIOI, 2012). Alguns estudos demonstram a relação entre o aumento da fosfatase alcalina e o processo de calcificação intravascular, os quais supõem que a inflamação vascular causada por agentes mecânicos ou o aumento do LDL com a formação de placas ateroscleróticas, pode provocar um estímulo a calcificação localizada nos vasos. Esse tipo de calcificação é comum em pacientes portadores de aterosclerose, inflamação vascular e doenças cardíacas (SONOKO NARISAWA, 2007; ATSUSHI SHIOI, 2012). Os níveis séricos de ALP variam normalmente entre 56 e 156 UI/L em

adultos entre 13 e 43 UI/L em crianças. Alterações nos níveis séricos dessa enzima podem ser indicadores de diversas patologias como a Doença de Paget, osteomalacia, uremia, doença renal, tumores, doenças hepáticas, processos de calcificações vasculares em pacientes portadores de doenças cardíacas (HONG-JEONG KIM, 2005; XIAOJING ZHU, 2007; ATSUSHI SHIOI, 2012).

09. A quantificação da ALP em líquidos biológicos é atualmente realizada por algumas técnicas como espectrofotometria, fluorescência, quimioluminescência, eletroquímica e imunossaios enzimáticos, porém a padrão ouro é a espectrofotometria (HONG-JEONG KIM, 2005; XIAOJING ZHU, 2007). A identificação da fosfatase alcalina pelo método padrão apresenta algumas limitações, como uso de kits específicos e várias etapas de processamento da amostra até a identificação da enzima, que podem ser suprimidas com a utilização de biossensores nanoestruturados. A tendência do uso da nanotecnologia no desenvolvimento de sensores tem como objetivo principal promover uma maior sensibilidade e estabilidade ao biossensor.

10. O nanocomplexo formado por AuCNT têm sido bastante utilizados no desenvolvimento de biossensores (YU SHI, 2009; MEHMET LÜTFI YOLA, 2014). Alguns trabalhos presentes na literatura demonstram a eficiência deste nanomaterial no desempenho de diversos tipos de sensores como os eletroquimioluminescentes, amperométricos e eletroquímicos (BEHZAD HAGHIGHI, 2011; SHIHONG CHEN, 2007).

11. O invento apresentado é exclusivo, pois nenhum outro invento semelhante foi ainda descrito utilizando o nanocomplexo AuCNT modificados e acoplados a anticorpos para detecção da enzima fosfatase alcalina sorológica humana.

12. Problemas e Limitações do Estado da Técnica

13. Um dos principais problemas no desenvolvimento de imunossensores é a sensibilidade. Para solucionar a baixa sensibilidade, o presente invento adicionou uma plataforma nanoestrutura ao imunossensor

composta por AuCNT, que são capazes de aumentar a superfície de ligações para anticorpos monoclonais promovendo uma maior sensibilidade e especificidade a fosfatase alcalina sorológica humana.

14. Objetivos da Invenção

15. O presente invento tem como objetivo desenvolver um biossensor eletroquímico sensível, específico, de baixo custo e pequeno volume de amostra utilizada para auxiliar no diagnóstico de diversas doenças, além de monitorar o processo de calcificação vascular em pacientes portadores de doenças arteriais, através da identificação e quantificação da fosfatase alcalina sorológica humana.

16. O principal objetivo do imunossensor baseado em AuCNT é promover uma maior sensibilidade na detecção de concentrações de fosfatase alcalina sorológica quando comparada aos testes de quantificação convencionais.

17. Solução

18. O biossensor eletroquímico nanoestruturado com AuCNT ligadas quimicamente a anticorpos monoclonais apresentado, possui características próprias, que favorecem uma maior sensibilidade ao sensor, sendo assim uma efetiva alternativa para a detecção da fosfatase alcalina sorológica humana, assim como no monitoramento de processos de calcificações vasculares.

19. Vantagens

20. O imunossensor apresenta algumas vantagens comparadas aos métodos até então desenvolvidos para a detecção da fosfatase alcalina sorológica, uma das vantagens é o melhor desempenho do sistema

apresentado baseado na utilização dos nanomateriais como plataforma estrutural do biossensor.

21. Maior estabilidade se deve a plataforma sensora desenvolvida através do uso dos AuCNT ligados covalentemente a um suporte sólido. Em adição, os anticorpos são fortemente acoplados às nanopartículas de ouro favorecendo o aumento da estabilidade, e um maior número de ligações de anticorpos a plataforma desenvolvida. Essa nova estratégia provoca uma maior sensibilidade e estabilidade do biossensor.

22. A ligação específica entre o anticorpo monoclonal e a fosfatase alcalina ocorre através de interações químicas ou físicas, entre elas as pontes de hidrogênio, eletrostática, Van der Waals. A interação da fosfatase alcalina e o anticorpo monoclonal é mensurada por alteração de corrente gerada no invento proposto.

23. A novidade e o efeito técnico alcançado

24. O imunossensor eletroquímico nanoestruturado capaz de detectar a fosfatase alcalina em amostra sorológica humana e monitorar processos de calcificação vascular, é a novidade proposta. Em adição, a sensibilidade do novo sistema é capaz de superar as técnicas utilizadas atualmente.

25. O biodispositivo desenvolvido é inovador, pois nenhum outro semelhante foi descrito na literatura para a identificação e quantificação da fosfatase alcalina sorológica.

26. Descrição Detalhada

27. Inicialmente, para reproduzir a invenção se faz necessário a síntese das nanopartículas de ouro para posterior adsorção aos nanotubos de carbono. A formação do nanocomplexo AuCNT se dá pela agitação da mistura dos

nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro seguida de lavagens com água deionizada e secagem.

28. O processo de montagem no imunossensor foi realizada pelo processo de automontagem iniciado pela limpeza da superfície do eletrodo de trabalho, que foi polido em alumina por 1 minuto, enxaguado em água deionizada e secou-se em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado a superfície do eletrodo 5 μ L de cisteína a 70mM por 10 minutos para modificar a superfície do eletrodo. Posteriormente os 5 μ L AuCNT foram fortemente acoplados ao sistema. Após a ligação do nanocomplexo, foi adicionado ao sistema 70mM de cisteamina que foi capaz de modificar quimicamente as nanopartículas de ouro para posterior ligação dos anticorpos. Para ativar os grupos carboxílicos da cisteamina e promover a ligação do anticorpo ao biossensor, foi adicionado 2 mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N- Hidroxisuccinimida (NHS) 5 mM numa proporção de 1: 1 em tampão acetato (pH 5.0) por 2 horas. Após a ativação foi possível adicionar 225 μ g/mL de anticorpos monoclonais (Anti-ALP) ao sistema sensor e incubado por 10 minutos. Após adicionar o anticorpo se fez necessário a adição de soro albumina bovina (BSA), para bloquear os sítios remanescentes ainda ativos. Finalmente, o biossensor desenvolvido foi incubado com concentrações de ALP (0.5 a 600 UI/L) por 10 minutos. Em adição, foi realizado um enxague com água deionizada a cada etapa de montagem do imunossensor.

29. Preparação das nanopartículas de ouro

30. A metodologia utilizada para síntese das nanopartículas foi descrita por Shi (YU SHI, 2009). Inicialmente, 0,5 mL de uma solução aquosa de 0,01 M $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foi misturado com 0,5 mL de uma solução aquosa a 0,01 M de citrato trissódico e 18,4 mL de água deionizada. Essa mistura foi realizada sob refrigeração. Em seguida foi adicionado a mistura 0,6 mL de uma solução de NaBH_4 a 0,1 M sob agitação. Após a agitação foi possível observar a mudança

da coloração da mistura se aproximando da cor rosa indicando a formação das nanopartículas de ouro.

31. Preparação das nanopartículas de ouro ligadas a nanotubos de carbono

32. A ligação dos nanotubos de carbono (CNT) às nanopartículas (AuNPS) de ouro foi realizada pela mistura de 9,3 mg de CNT e 10 mL da solução de nanopartículas de ouro sintetizada. Após a mistura dos nanomateriais, foi adicionado a mistura 6 mL de etanol sob agitação vigorosa e posteriormente sonicada por 10 minutos. A adição do etanol foi capaz de diminuir a tensão superficial entre os nanotubos de carbono e a água favorecendo a adsorção física das nanopartículas de ouro aos nanotubos de carbono. A mistura foi agitada por 10 horas e logo em seguida foi submetida a 5 ciclos de lavagem com água deionizada, a cada ciclo de lavagem a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm. Após as lavagens a amostra obtida secou a temperatura de 70°C.

33. Caracterização do imunossensor para detecção da fosfatase alcalina

34. O imunossensor eletroquímico desenvolvido foi caracterizado através das técnicas eletroquímicas amperométricas e potenciométricas. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas no PGSTAT 128N potentiostato/galvanostato (Autolab, Netherlands) com três eletrodos e uma célula eletroquímica convencional, sendo um eletrodo de trabalho de ouro, outro auxiliar de platina, e um de referência Ag/AgCl saturado com KCl. Todos os experimentos foram realizados na presença de 10mM de uma solução eletrolítica de ferro-ferricianeto de potássio. A voltametria cíclica (VC) foi realizada em um potencial entre -0,2 e +0,7V em uma velocidade de varredura de 50m.Vs⁻¹. A espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada a frequência de 100 mHz e 100 kHz com um potencial aplicado de 10mV.

35. Características do imunossensor para detecção da fosfatase alcalina

36. Durante todas as etapas de desenvolvimento do imunossensor foram realizadas análises eletroquímicas para avaliar e acompanhar todo o processo de montagem do biossensor.

37. Na Fig 1 e 2 obtivemos o voltamograma cíclico e o diagrama de Nyquist respectivamente, de toda a caracterização eletroquímica do biossensor. Inicialmente, foi demonstrado o eletrodo limpo, em seguida a cisteína foi adsorvida, provocando uma diminuição das correntes de picos anódicas e catódicas no voltamograma e um aumento no diâmetro no semicírculo do diagrama de Nyquist, demonstrando a modificação da superfície do eletrodo. Em seguida, com a ligação dos AuCNT ao sistema foi observado um aumento na resistência a transferência de elétrons. Posteriormente, a cisteamina foi adicionada ao sensor, resultando em uma mudança nas correntes de pico e no diagrama de Nyquist promovendo em uma maior condutividade do sistema. Para contribuir com uma maior estabilidade ao sensor, o EDC:NHS foi adicionado, e por ser um agente ativador houve aumento adicional na resistência elétrica do sistema e possibilitando a ligação do anticorpo à plataforma nanoestruturada. Após a ligação do anticorpo foi adicionado o BSA que provocou uma discreta diminuição das correntes de pico e um aumento no semi-círculo do diagrama de Nyquist, demonstrando que ocorreu a inativação dos sítios ativos remanescentes.

38. Na Fig 3 e 4 representa o voltamograma cíclico e o diagrama de Nyquist respectivamente, na detecção da fosfatase alcalina sintética. Foi possível detectar a enzima sorológica humana em uma escala de concentração de varia de 0.5 a 600 UI/L. Obtivemos uma diminuição gradativa das correntes de picos e um aumento gradativo no semicírculo do diagrama de Nyquist com o aumento da concentração da fosfatase alcalina. Obtivemos resultados semelhantes nas análises de fosfatase alcalina em amostras reais (figura 5 e 6). Esses resultados demonstram que o sensor desenvolvido apresenta

sensibilidade para a fosfatase alcalina, além de apresentar uma boa escala de detecção, tendo em vista que os testes convencionais só apresentam linearidade até a concentração de 400 a 500 UI/L.

39. Na figura 7 e 8 demonstra o teste de seletividade. Observamos que o invento apresentado não demonstrou resposta significativa a outro marcador sorológico que geralmente se apresenta aumentando juntamente com fosfatase alcalina. A elevada concentração de proteína C reativa (PCR) não provocou mudança relevante nos padrões eletroquímicos do imunossensor. Podemos concluir que o invento apresentado demonstrou ser um dispositivo nanoestrurado inovador para a detecção sensível e específica da fosfatase alcalina sorológica humana.

40. Bibliografia

41. ATSUSHI SHIOI, M. K. Y. O. K. M. S. J. Induction of Bone-Type Alkaline Phosphatase in Human. **Circulation Research**, Osaka, v. 91, n. 1, p. 9-16, July 2012.
42. SONOKO NARISAWA, D. H. M. C. Y. W. O. M. F. H. J. L. M. Novel Inhibitors of Alkaline Phosphatase Suppress Vascular Smooth. **Journal of Bone and mineral Research**, California, v. 22, n. 11, p. 1700-1710, July 2007.
43. HONG-JEONG KIM, J. K. Electrochemical determination of total alkaline phosphatase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 577 , p. 243–248, 2005.
44. XIAOJING ZHU, C. J. 8-Quinoyl phosphate as a substrate for the fluorimetric. **Clinica Chimica Acta** , v. 377 , p. 150–153, 2007.
45. YU SHI, R. Y. P. K. Y. Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold. **Carbon**, v. 47, p. 1146-1151, 2009.

46. MEHMET LÜTFI YOLA, N. A. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in. **Electrochimica Acta** , v. 119, p. 24– 31, 2014.

47. BEHZAD HAGHIGHI, S. B. L. G. Fabrication of a novel electrochemiluminescence glucose biosensor using. **Sensors and Actuators B** , v. 155, p. 577–583, 2011.

48. SHIHONG CHEN, R. Y. Y. C. L. Z. N. W. X. L. Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22 , p. 1268–1274, 2007.

REIVINDICAÇÕES

1. DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizada por um biodispositivo composto por: a) anticorpos monoclonais capazes de identificar especificamente a fosfatase alcalina, b) nanocomplexo formado por nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro (AuCNT) funcionalizadas com cisteamina, c) suporte sólido para imobilização das biomoléculas, d) fonte de corrente elétrica capaz de nos fornecer informações a respeito das interações moleculares entre o analito e o biossensor desenvolvido.
2. OS NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuCNT) são caracterizados por meio da mistura entre nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro ligados a superfície do eletrodo pelo processo de automontagem para posterior funcionalização com a cisteamina.
3. O IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE é caracterizado por uma tecnologia inovadora capaz de utilizar nanoestruturas para otimizar a eficiência do biossensor.
4. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado por proporcionar uma maior condutibilidade elétrica ao sistema devido a presença de uma superfície de ouro como suporte para a ligação e a manutenção da bioatividade do anticorpo e biomoléculas em geral, prestando-se para uma análise pioneira de fosfatase alcalina.

5. OS NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO conforme as reivindicações 1-4, são caracterizados pela adsorção física entre os nanotubos de carbono e as nanopátículas de ouro, promovida pela adição do etanol a mistura que é capaz de diminuir a tensão superficial entre os nanotubos de carbono e a água favorecendo a ligação das nanopartículas de ouro.
6. OS NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO conforme reivindicação 5, são caracterizados por meio da mistura sob agitação de 9,3 mg de nanotubos de carbono e 10 mL da solução de nanopartículas de ouro com posterior adição de etanol a mistura.
7. DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado pelo processo de automontagem de camada por camada de cada etapa do desenvolvimento do sensor, seguido de medidas eletroquímicas de voltametria cíclica e impedância para caracterizar cada etapa de montagem do biossensor.
8. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA conforme a reivindicação 7, é caracterizado pelas técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).
9. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado pelo nanocomplexo AuCNT ligado quimicamente a superfície do eletrodo de ouro modificado com cisteína.

10. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA conforme a reivindicação 6, é caracterizado pela cisteamina que proporciona a modificação química nas nanopartículas de ouro favorecendo a posterior ligação dos anticorpos ao sistema desenvolvido.
11. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado pela presença do agente ativador 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-Hidroxisuccinimida (NHS) capaz de ativar os grupos carboxílicos da cisteamina favorecendo a ligação dos anticorpos, conforme a reivindicação 9-10.
12. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado por detectar a fosfatase alcalina sorológica humana diluída em tampão fosfato de sódio em uma faixa de concentrações que varia de 0.5 a 600 UI/L.
13. NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA conforme a reivindicação 3, são caracterizados por apresentarem uma excelente alternativa no melhoramento do desempenho da sensibilidade dos biossensores.
14. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado por um método inovador que utiliza anticorpos para a detecção da fosfatase alcalina sorológica.

15. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado por uma ferramenta útil para a análise dos níveis sorológicos da fosfatase alcalina humana, assim como no monitoramento de algumas doenças como Doença de Paget, osteomalacia, doenças renais, tumores, doenças hepáticas e processos de calcificações vasculares em pacientes portadores de doenças cardíacas, como na doença arterial coronariana.

16. IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA é caracterizado por diminuir os custos para análise quantitativa da fosfatase alcalina, devido a necessidade de pequenos volumes de amostra além de dispensar as várias etapas processamento utilizadas nos métodos convencionais.

FIGURAS

Figura 1

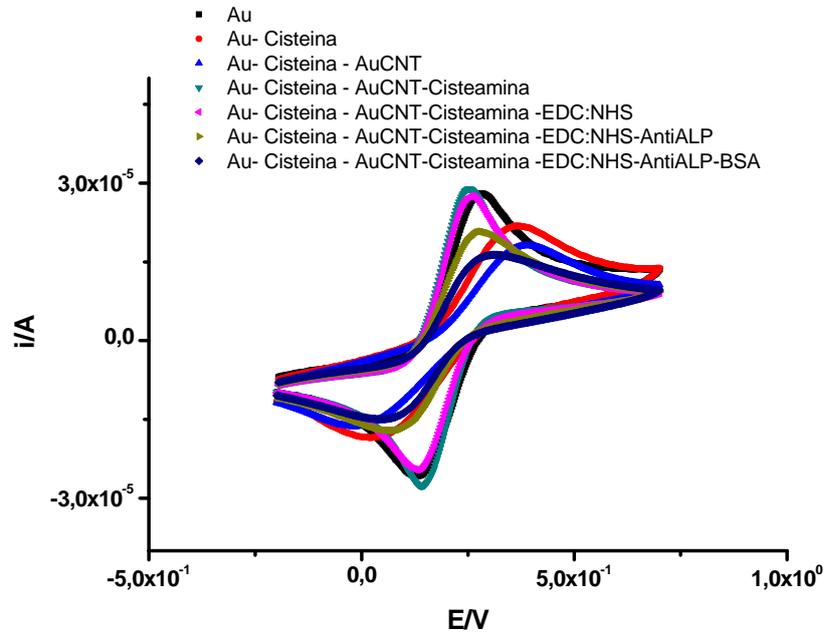


Figura 2

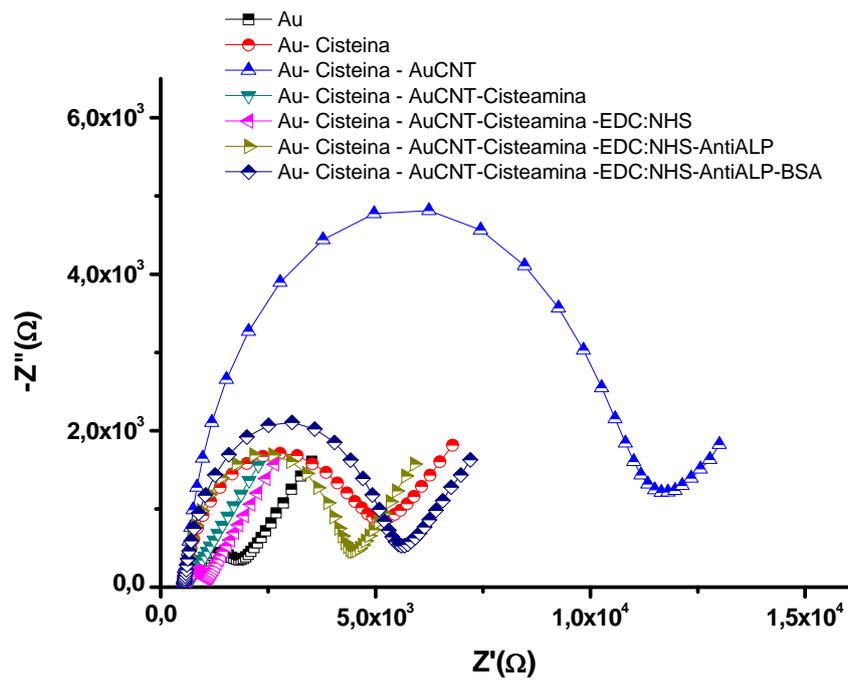


Figura 3

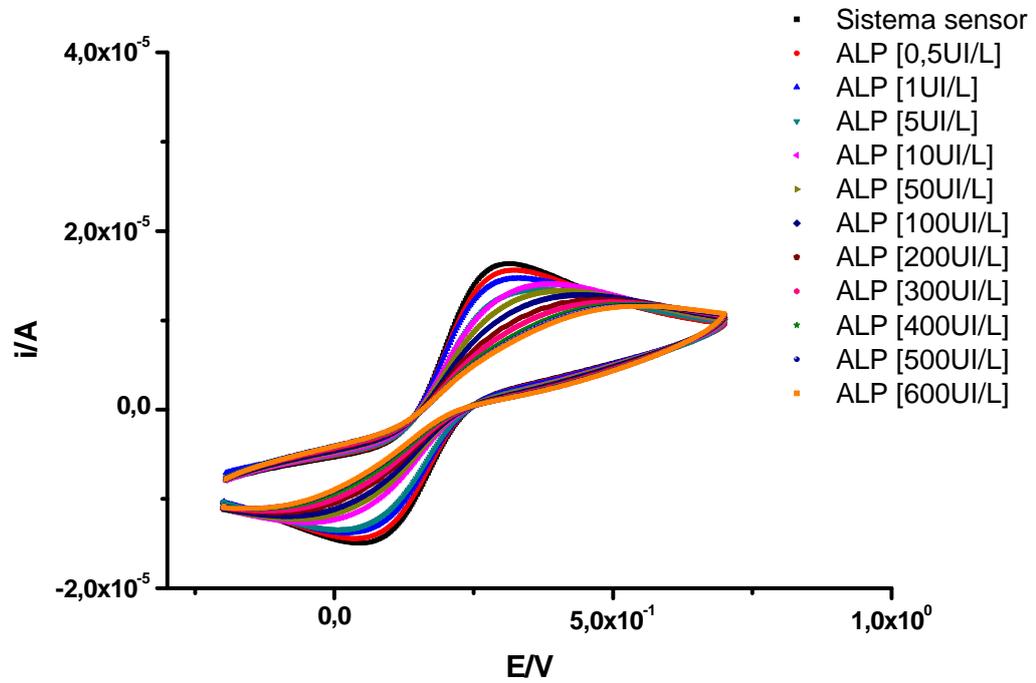


Figura 4

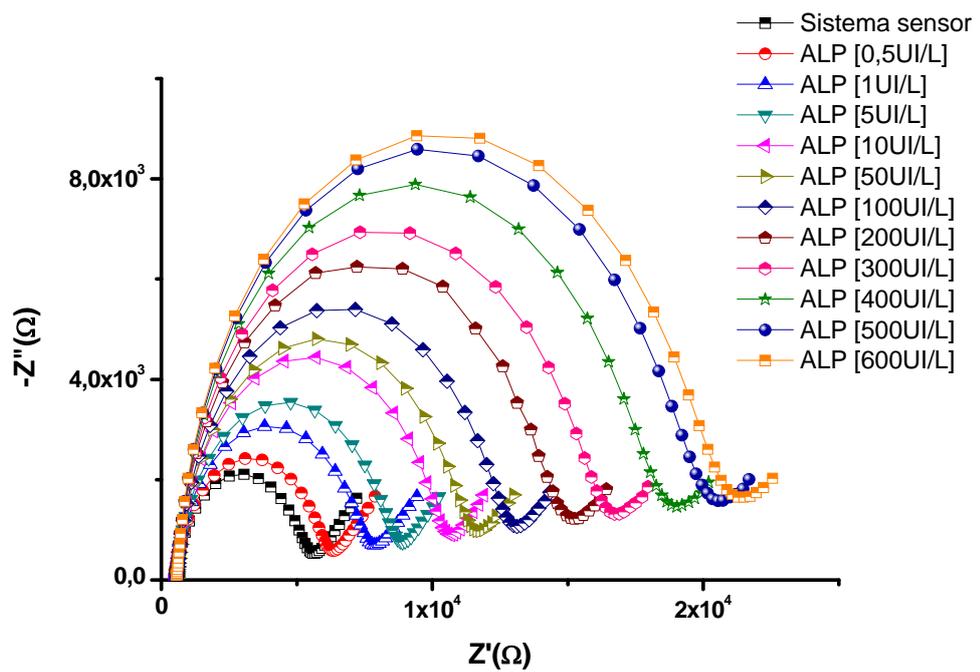


Figura 5

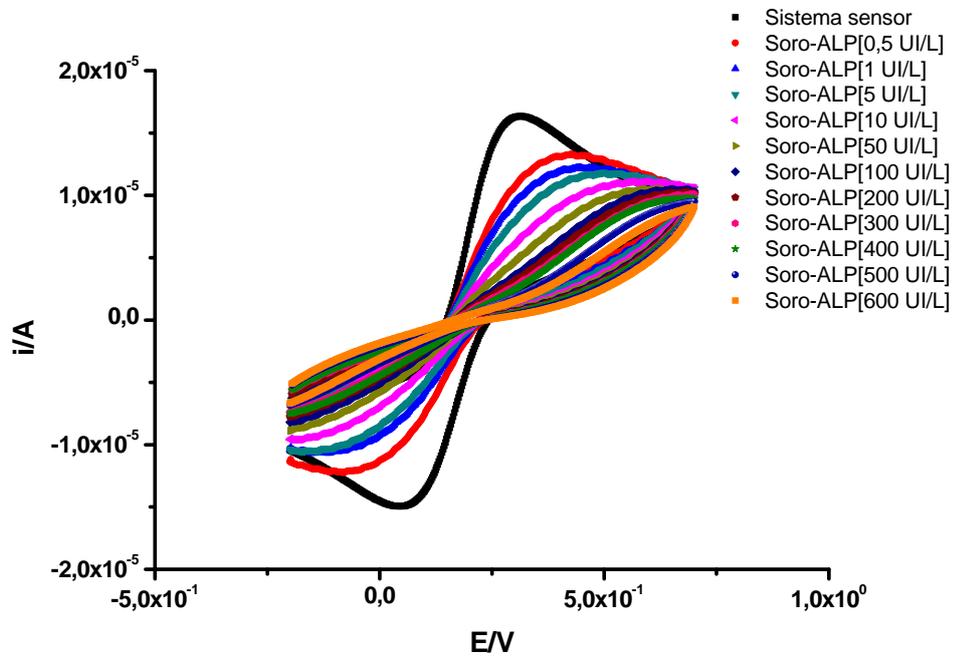


Figura 6

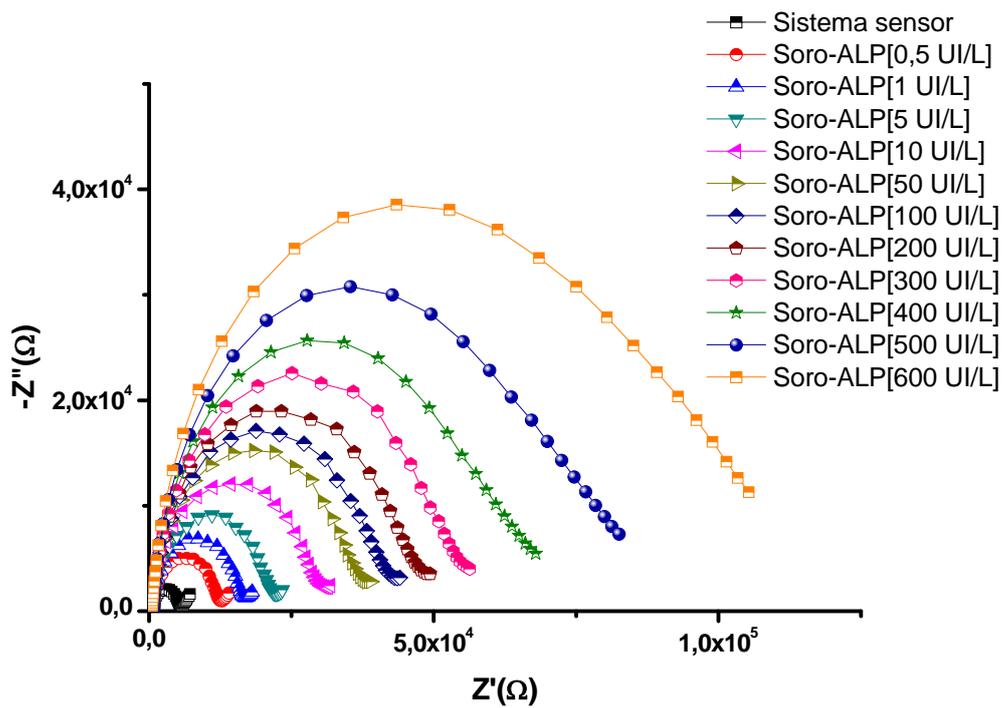


Figura 7

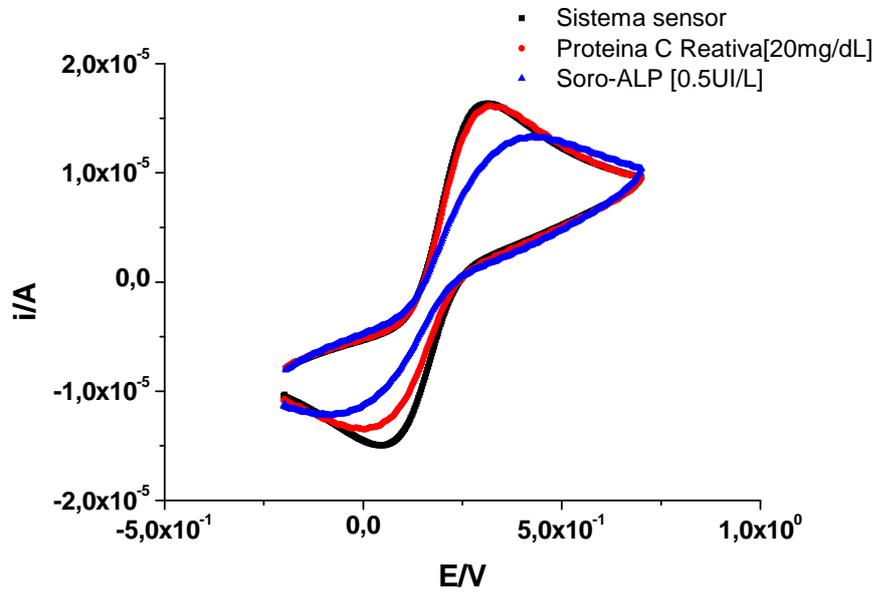
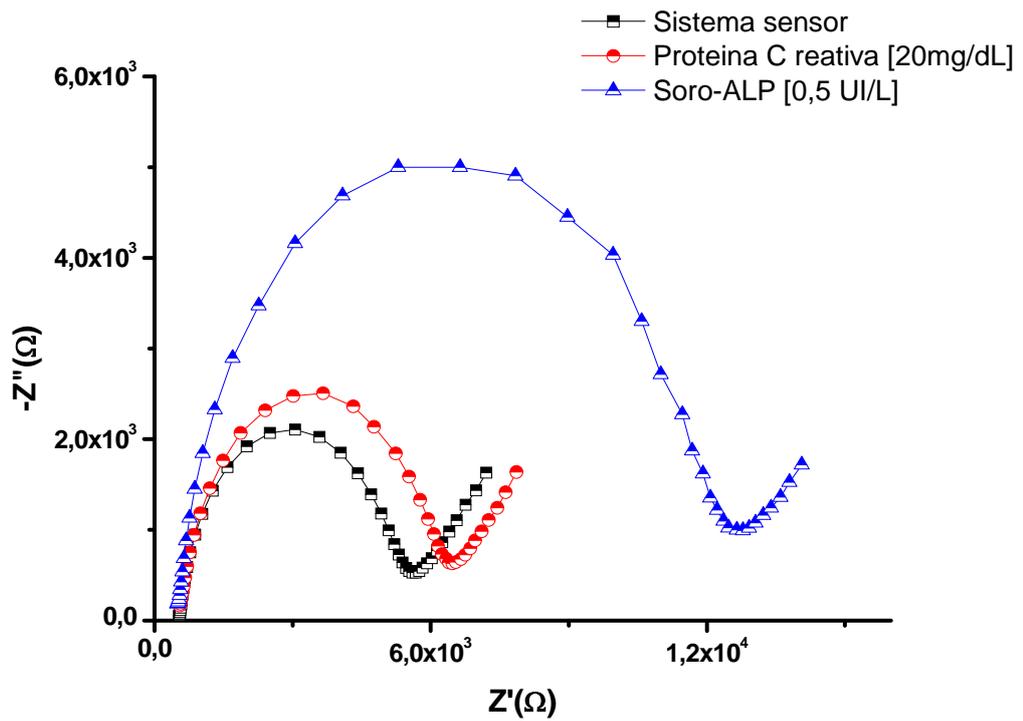


Figura 8



DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA

O invento apresentado é caracterizado pela detecção de fosfatase alcalina (ALP) em amostras biológicas humanas, esta enzima é de extrema importância como auxílio no diagnóstico de diversas doenças, porém os métodos utilizados atualmente para a identificação dessa enzima exigem várias etapas de processamento da amostra, além de uma escala de detecção limitada. Diante de algumas limitações para a detecção da fosfatase alcalina, os biossensores eletroquímicos são uma alternativa para o diagnóstico laboratorial devido a sua capacidade de miniaturização e baixo custo. Na presente invenção, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico nanoestruturado com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro (AuCNT) acoplados quimicamente a anticorpos monoclonais (Anti-ALP) para a detecção eficaz de pequenas às mais altas concentrações de fosfatase alcalina.

Algumas nanoestruturas como as nanopartículas de ouro, são bastante utilizadas na biotecnologia e principalmente no desenvolvimento de biossensores, atuando como suporte para biomoléculas, sem alterar as suas propriedades biológicas e como adjuvantes em outros nanomateriais. Os nanotubos de carbono são nanomateriais muito utilizados no desenvolvimento de sensores, devido a sua elevada área específica de ligação e condutividade elétrica, e quando acoplados a nanopartículas de ouro, potencializam o desempenho dos biodispositivos.