



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019020805-8 A2



(22) Data do Depósito: 03/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 20/04/2021

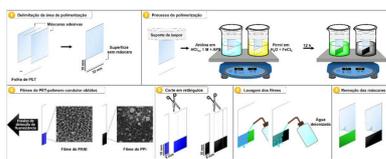
(54) **Título:** FILMES NANOESTRUTURADOS DE POLÍMEROS CONDUTORES, PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEU USO COMO PLATAFORMAS PARA O SENSORIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

(51) **Int. Cl.:** C08G 73/02; C08G 65/331; C08G 65/333; C08F 16/30; B82B 3/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** CELSO PINTO DE MELO; GRACIELA DA COSTA PEDRO; FILIPE DIONE SOUZA GORZA; ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA; KAMILA TERESA OLIVEIRA DO NASCIMENTO; GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI; JUAN CARLOS MEDINA LLAMAS; ALICIA ELIZABETH CHÁVEZ GUAJARDO; JOSÉ JARIB ALCARAZ ESPINOZA.

(57) **Resumo:** FILMES NANOESTRUTURADOS DE POLÍMEROS CONDUTORES, PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEU USO COMO PLATAFORMAS PARA O SENSORIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS. A presente invenção estende-se à síntese de filmes finos de polímeros condutores (PC) sobre substratos flexíveis de polietileno tereftalato (PET) e a seu uso como uma plataforma para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos (isto é, o sensoriamento molecular) de agentes infecciosos, como *Leishmania infantum*, o vírus da Zika, o vírus do Papiloma Humano tipo 18 (HPV-18), dentre outras doenças de importância para a saúde pública. A presente metodologia é baseada na detecção de ácidos nucleicos (por meio de sua hibridização com sondas de caráter específico) e tem como objetivo permitir a incorporação do substrato polimérico assim preparado em protocolos simples, rápidos, e de baixo custo para o diagnóstico simplificado de doenças infecciosas ou genéticas em pontos primários de atendimento (possibilitando, em especial, maneiras de prevenção ou tratamento dessas doenças ainda em um estágio inicial), para o monitoramento ambiental e para uma rápida identificação de patógenos pela indústria alimentar.



FILMES NANOESTRUTURADOS DE POLÍMEROS CONDUTORES, PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEU USO COMO PLATAFORMAS PARA O SENSORIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

[001] A presente invenção estende-se à síntese de filmes finos de polímeros condutores (PC) sobre substratos flexíveis de polietileno tereftalato (PET) e a seu uso como uma plataforma para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos (isto é, o sensoriamento molecular) de agentes infecciosos, como *Leishmania infantum*, o vírus da Zika, o vírus do Papiloma Humano tipo 18 (HPV-18), dentre outras doenças de importância para a saúde pública. A presente metodologia é baseada na detecção de ácidos nucleicos (por meio de sua hibridização com sondas de caráter específico) e tem como objetivo permitir a incorporação do substrato polimérico assim preparado em protocolos simples, rápidos, e de baixo custo para o diagnóstico simplificado de doenças infecciosas ou genéticas em pontos primários de atendimento (possibilitando, em especial, maneiras de prevenção ou tratamento dessas doenças ainda em um estágio inicial), para o monitoramento ambiental e para uma rápida identificação de patógenos pela indústria alimentar.

Antecedentes da invenção

[002] Nas últimas décadas, o desenvolvimento de biossensores simples, portáteis e de baixo custo para a detecção de rápida de cadeias de ácidos nucleicos (DNA, RNA) se faz desejável para possibilitar o diagnóstico imediato de doenças infecciosas ou genéticas, o monitoramento ambiental e a identificação de patógenos pela indústria alimentar. Dentre os procedimentos adotados para a detecção altamente específica da hibridização de fitas de DNA, se destaca a exploração da variação das propriedades óticas, eletroquímicas, impedimétricas, espectrométricas, ou gravimétrica dos materiais empregados nos mais diversos sensores. Por sua vez, alguns desses métodos são complicados, laboriosos e exigem o uso de equipamentos especializados, o que termina por impossibilitar sua implementação em pontos primários de atendimento. Assim, métodos mais sensíveis e específicos, rápidos e econômicos baseados no uso de

nanomateriais vêm sendo muito explorados no campo de bioreconhecimento de molecular.

[003] Recentemente, esses novos nanomateriais têm sido explorados na construção de sensores fluorescentes e utilizados como nanosupressores da fluorescência (nanoquenchers) em ensaios de detecção de DNA. Assim, a nanoestrutura interage com o fluoróforo de uma sonda de DNA marcada, com a fluorescência sendo extinta através de processos de transferência de elétrons. Por sua vez, essa supressão é revertida apenas quando o DNA alvo complementar esteja presente de modo a permitir a hibridização entre a sonda e o alvo, o que leva à desorção da sonda marcada, e assim à recuperação do sinal de fluorescência. Assim, exemplos dos materiais citados e outros são listados na **Tabela 1**.

TABELA 1. PATENTES E ARTIGOS DE DIFERENTES PLATAFORMAS QUE REALIZAM SENSORIAMENTO DE ACIDOS NUCLEICOS UTILIZANDO SONDAS DE DNA

PATENTE/ ARTIGO	Plataforma (tipo)	Material utilizado para a modificação da matriz	Meio de detecção	Tipo de biomolécula
CN104263833A	Membranas	Ácidos nucleicos	Soluções aquosas	DNA
US6613528B2	Filmes de celulose	-	Soluções aquosas ou biológicas	Ácidos nucleicos
US6265155B1	Filme metálico	-	-	Ácidos nucleicos
LU ET AL. (2011)	Nanoesferas de PPY	-	Soluções aquosas	DNA
LIU ET AL. (2011)	Nanofibras de PANI	-	Soluções aquosas	DNA
YAN ET AL. (2015)	Nanopartículas de prata	Oligossacarídeos	Soluções aquosas	DNA
US20150126393A1	Filmes de Teflon	Nanopartículas de ouro	-	DNA

WANG ET AL. (2010)	Nanofitas de poli(p-fenilenodiamina)	-	Soluções aquosas	DNA
XIE ET AL. (2018)	Estrutura metal-orgânica (MOF)	-	Soluções aquosas	DNA e RNA
PRESENTE TRABALHO	Filmes polietileno tereftalato (PET)	Polianilina ou polipirrol	Soluções aquosas e complexas	DNA

[004] A patente (CN104263833A) [1] descreve o uso de membranas de nylon com superfícies modificadas com ácidos nucleicos para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos para a identificação de espécies de fungos do gênero *Candida* e a detecção de mutações genéticas.

[005] A patente (US6613528B2) [2] descreve o uso de filmes de celulose para o a identificação ou triagem de ativos como compostos biológicos ou sequências de ácidos nucleicos que os codificam a partir de sistemas aquosos ou biológicos.

[006] A patente (US6265155B1), [3] descreve o uso de filmes metálicos modificados em sua superfície com a incorporação de ácidos nucleicos por meio de ligantes para a detecção de ácidos nucleicos.

[007] Lu e col. [4] descreveram o uso de nanoesferas de polipirrol (PPi) imobilizadas com sequências fluorescentes de ácidos nucleicos como plataforma para a detecção de DNA. Em particular, essa plataforma foi usada para a detecção do vírus de HIV (vírus da imunodeficiência humana) a partir de sistemas aquosos.

[008] Liu e col. [5] reportaram o uso de nanofibras de polianilina (PAni) para a detecção de ácidos nucleicos em sistemas aquosos como uma plataforma de detecção por fluorescência.

[009] Yan e col. [6] descreveram o uso de nanopartículas de prata modificadas em sua superfície através do uso de oligossacarídeos para a detecção de ácidos nucleicos em sistemas aquosos.

[010] A patente (US20150126393A1) [7] reportou o uso de filmes de teflon modificados em sua superfície através do crescimento de cones de poliestireno recobertos com nanopartículas de ouro para a detecção de biomarcadores e/ou polinucleotídeos.

[011] Wang e col. [8] descreveram o uso de nanofitas de poly(p-fenilenodiamina) para a detecção de DNA; em particular, nesse trabalho o material foi utilizado para detectar sequências específicas de ácidos nucleicos de modo a identificar a presença do HIV em sistemas aquosos.

[012] Xiu e col. [9] reportaram o uso de estruturas metal-orgânicas (MOF) para a detecção de DNA e RNA a partir de sistemas aquosos para sequências específicas dos vírus da Dengue e do Zika.

[013] Verificamos assim que os materiais sintetizados, filmes de nanoestruturados de polímeros condutores foram comparados com kits e plataformas reportados na literatura. Diante do apresentado, ressaltamos que até o momento não foi descrita a utilização dos mesmos para a detecção de ácidos nucleicos a partir de sistemas aquosos ou biológicos.

Sumário

[014] A presente invenção apresenta um novo método, simples, rápido e de baixo custo para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir da imobilização de suas cadeias de DNA pelo estabelecimento de interações moleculares específicas (no processo de hibridização), através do uso de uma plataforma polimérica formada por filmes nanoestruturados de polímeros condutores depositados em substratos flexíveis.

[015] Em um primeiro aspecto, a invenção descreve os métodos utilizados para a síntese, crescimento e caracterização de filmes nanoestruturados de PC em substratos de PET. Para esse fim, foi realizado o crescimento dos polímeros polianilina (PAni) e polipirrol (PPi) em substratos de PET através da rota de polimerização *in situ*, a baixa temperatura e sob reduzidas concentrações de reagentes. A caracterização da composição e morfologia dos filmes nanoestruturados foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

[016] Os filmes obtidos são estruturalmente compostos por um substrato flexível de PET, mas não limitado ao uso de apenas esse material, recoberto por uma ou mais camadas de qualquer PC, ou ainda camadas alternadas de dois ou mais PCs. A utilização dos PCs como material ativo se deve ao fato dos mesmos serem compostos por estruturas com anéis conjugados, que podem vir a interagir de forma hidrofóbica com as bases nitrogenadas de fitas simples das cadeias de ácidos nucleicos de interesse, de acordo com características (pH, concentração iônica, entre outras) controladas do meio físico-químico em que a interação ocorre. Além disso, a peculiar propriedade de boa condutividade elétrica dos PCs permite que eles possam atuar como supressores de fluorescência das moléculas repórter por meio da captura e subsequente deslocalização dos elétrons fotoexcitados da molécula, de acordo com a proximidade observada entre ela e o PC. Por exemplo, o PPI é capaz de adsorver ácidos nucleicos pelo processo de empilhamento π - π (uma interação hidrofóbica) das bases nitrogenadas com os anéis heterocíclicos da cadeia polimérica.

[017] Em um segundo aspecto, a atual invenção descreve filmes nanoestruturados de PCs, para os quais não existem precedentes de uso como uma plataforma em metodologias para o biossensoriamento de interações moleculares de ácidos nucleicos e de outras biomoléculas. A isso se acrescenta o fato de que, devido ao crescimento dos PCs em substratos sólidos, se torna possível um fácil manuseio da plataforma, um melhor controle da imobilização de sondas e a não contaminação da amostra (uma vez que o material ativo, o PC, não se apresenta em uma forma coloidal, o que tornaria difícil sua separação quando posto em contato com as amostras).

[018] Em um outro aspecto, o método de detecção das interações moleculares utilizando a plataforma PET-PC pode envolver uma resposta de natureza ótica ou espectroscópica, preferencialmente, mas não apenas, via monitoramento da intensidade de fluorescência das sondas de DNA marcadas com fluoróforos. Os ácidos nucleicos de interesse a serem detectados podem ser provenientes de bactérias, fungos, vírus, parasitas, ou qualquer outro agente de natureza infecciosa ou não.

[019] Em um último aspecto, o método de reconhecimento por meio de interações moleculares específicas, utilizando a plataforma PET-PC, mesmo que preferencialmente aplicável à detecção de ácidos nucleicos, não se limita apenas a esse tipo de moléculas e pode ser adaptado para a detecção de outras biomoléculas, como, por exemplo, no estabelecimento de interações moleculares proteicas (antígeno – anticorpo), desde que a

molécula de bioreconhecimento a ser imobilizada na plataforma possa ser marcada com um repórter fluorescente.

[020] Nas exemplificações demonstradas desta invenção, utilizamos plataformas compostas dos polímeros condutores PANi e PPI na forma de monocamadas (PET-PANi e PET-PPI) e bicamadas alternadas (PET-PANi/PPI e PET-PPI/PANi). As plataformas constituídas de filmes em monocamadas foram usadas em ensaios de biossensoriamento fluorescente de cadeias de ácidos nucleicos específicas do parasita da doença leishmaniose visceral, pela utilização de sistemas modelos e amostras de soro de sangue humano (um sistema complexo e mais realista). Já as plataformas com filmes bicamadas foram usadas para a detecção de ácidos nucleicos específicas do vírus da Zika, sob condições controladas. Em ambas as exemplificações, especificamente, mas não se limitando a elas, a invenção se utiliza de métodos de biossensoriamento que envolvem as seguintes etapas: (i) a imobilização de sondas de cadeias simples de ácidos nucleicos marcadas com um molécula repórter (um fluoróforo, no caso específico), (ii) a lavagem da plataforma com as sondas imobilizadas para a remoção de moléculas fracamente adsorvidas, (iii) a inclusão das plataformas com as sondas imobilizadas em amostras contendo ou não a sequência de ácidos nucleicos de interesse, (iv) a remoção da plataforma do meio de interação, (v) a detecção da recuperação de fluorescência a partir de medidas das amostras em um fluorímetro.

[021] Pelos termos “*biossensoriamento*” compreende-se a capacidade de biossensores (dispositivos analíticos que combinam a especificidade das biomoléculas na detecção, qualificação e quantificação de um analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor na conversão de uma resposta biológica em um domínio elétrico ou ótico, térmico, magnético, etc) de obter informações sobre as moléculas biológicas alvo através do registro de interação intermoleculares por meio de uma resposta elétrica, ótica, magnética, ou térmica, entre outras.

[022] Pelo termo “*PC*” compreende-se todo a classe de polímeros aromáticos ou não que, apresentando uma sequência de ligações simples e duplas alternadas, do tipo carbono-carbono ou carbono-heteroátomo, sejam capazes de transportar carga ao longo da cadeia polimérica mediante a deslocalização espacial de defeitos estruturais (íons radicais, quase partículas) tipo pólarons e/ou bipólarons formados durante a síntese polimérica, ou através de dopagem óxido-redutiva ou por meio da protonação da cadeia.

[023] Pelo termo “*ácidos nucleicos*” compreende-se macromoléculas biológicas poliméricas constituídas por nucleotídeos ligados entre si através de ligações fosfodiéster. Os ácidos nucleicos são de dois tipos: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), que se diferenciam por seus grupos sacarídeos, bases nitrogenadas, estrutura, e as funções desempenhadas no organismo.

[024] Pelo termo “*hibridização*” compreende-se um fenômeno fundamental na área da biologia molecular, que se deve à propriedade que os ácidos nucleicos em fitas simples têm de emparelhar suas bases com outras complementares mediante a formação de pontes de hidrogênio. Estas reações ocorrem entre ácidos nucleicos independentemente da sua natureza, sendo apenas necessário que as cadeias simples envolvidas no emparelhamento sejam complementares entre si.

[025] Pelo termo “*interação hidrofóbica*” compreende-se, particularmente na presente invenção, uma interação não covalente, caracterizada pelo empilhamento de cadeias aromáticas devido ao acoplamento entre seus sistemas de elétrons π .

[026] Pelo termo “*filmes nanoestruturados*” compreende-se qualquer camada (ou película) constituída de moléculas ou nanoestruturas características homogeneamente distribuídas ao longo de uma determinada superfície (o substrato). É a variação de parâmetros como espessura e o grau de empacotamento molecular que permite ajustar as propriedades diferenciadas da superfície.

Problemas e limitações do estado da técnica

[027] Como apresentado anteriormente, nas últimas décadas pesquisas extensivas têm sido dedicadas ao desenvolvimento de biossensores simples, rápidos, portáteis e de baixo custo para a detecção rápida de cadeias de ácidos nucleicos. Essa detecção é um passo fundamental para um diagnóstico mais rápido e específico de doenças infecciosas ou de origem genética em pontos primários de atendimento (em especial para a prevenção ou o tratamento dessas doenças ainda em seu estágio inicial), e a rápida identificação de patógenos no monitoramento ambiental e na indústria alimentar [10, 11]. Deste modo, existem muitos métodos bem estabelecidos baseados em diferentes princípios de transdução para a detecção altamente específica da hibridização de fitas de ácidos nucleicos (explorando propriedades óticas [12, 13], eletroquímicas [14, 15], impedimétricas [16, 17], espectrométricas [18], gravimétrica [19], entre outras). No entanto, alguns desses métodos são mais elaborados e caros, além de demorados, exigindo

o uso de equipamentos especializados, características que representam um entrave à maior difusão de sua implementação em pontos primários de atendimento [6].

[028] À vista disso, a invenção descrita na presente patente propõe a utilização de uma plataforma na forma de filme que seja composto por polímeros intrinsecamente condutores nanoestruturados depositados em folhas de PET e que possa ser utilizado como um eficiente sistema de biossensoriamento baseado na supressão da fluorescência de sondas específicas de ácidos nucleicos.

Vantagens da invenção

[029] A utilização da presente invenção como sistemas de biossensoriamento baseados na supressão da fluorescência de sondas específicas de ácidos nucleicos traz como vantagens essenciais;

- 1) A metodologia proposta pode ser usada como uma plataforma universal de detecção de ácidos nucleicos por fluorescência, uma vez que basta adotar a sequência do ssDNA sonda que seja específica para a molécula alvo de interesse.
- 2) Excelente seletividade com relação ao DNA alvo específico, com a possibilidade de distinção efetiva daquelas sequências perfeitamente complementares em relação a outras que dela difiram, mesmo que por apenas uma única base.
- 3) Apresentar uma forma conveniente dos procedimentos de manipulação das amostras, uma vez que o material ativo se encontra depositado em substrato sólido.
- 4) Boa relação linear (e uma relativamente larga faixa de detecção) entre a intensidade de fluorescência e a concentração do DNA alvo.
- 5) Baixo limite de detecção, estimado entre 10^{-9} a 10^{-12} Molar.
- 6) Curto tempo de detecção, estimado em tipicamente apenas 60 min, para completar o ensaio.
- 7) Bom nível de aplicabilidade em ambientes complexos como amostras de soro humano.

A novidade e o efeito técnico alcançado

[030] O avanço alcançado com essa invenção consiste no fato de que até o presente momento nenhuma instituição de pesquisa, ensino ou setor privado empregou filmes nanoestruturados de polímeros condutores como nanosupressores do sinal de fluorescência (nanoquenchers) em ensaios de detecção de ácidos nucleicos (biossensoriamento).

Breve descrição das Figuras

[031] Na **Fig. 1** é apresentada uma representação pictórica das principais etapas do processo de preparação dos filmes de PPI e PANi

[032] Na **Fig. 2** são apresentados os espectros ATR-FTIR da folha de PET (a) e dos filmes de PET-PPI (b) e PET-PANi (c).

[033] Na **Fig. 3** são apresentados os espectros de UV-Vis dos filmes de PET-PPI (a) e PET-PANi (b).

[034] Na **Fig. 4** são apresentadas as micrografias de MEV da superfície da folha de PET limpa (a), dos filmes monocamadas de PET-PANi (b), PET-PPI (c), e dos filmes de bicamadas alternadas PET-PPI/PANi (d) e PET-PANi/PPI (e).

[035] Na **Fig. 5** é apresentada uma ilustração esquemática do mecanismo de detecção de fluorescência de ácidos nucleicos pelo uso de filmes PET-PC como plataformas de biossensoriamento.

[036] Na **Fig. 6** é apresentada uma representação esquemática das principais etapas da metodologia empregada para realizar os ensaios de biossensoriamento por fluorescência a partir do uso das plataformas PET-PC.

[037] Na **Fig. 7** são apresentados os espectros de emissão de fluorescência da solução de FAM-ssDNA sob diferentes condições: antes (a) e após a interação com filmes monocamadas PET-PANi (b) e PET-PPI (c). No detalhe, é mostrada a intensidade da fluorescência após a interação dos sistemas PET-PANi/FAM-ssDNA e PET-PPI/FAM-ssDNA com o ssDNA alvo complementar e não complementar do protozoário *Leishmania infantum*.

[038] Na **Fig. 8** é apresentado o estudo cinético da imobilização da solução de FAM-ssDNA em filmes PET-PPi e PET-PAani (a) e de recuperação da fluorescência do FAM-ssDNA imobilizado (b) após interação dos sistemas PET-PPi/FAM-ssDNA e PET-PAani/FAM-ssDNA com o ssDNA alvo complementar – T0.

[039] Na **Fig. 9** é apresentada a resposta da intensidade de fluorescência dos sistemas PET-PPi/FAM-ssDNA (a) e PET-PAani/FAM-ssDNA (b) após a adição do ssDNA alvo complementar na faixa de (1–600) nM (em detalhe nas figuras, os gráficos correspondentes ao intervalo de resposta linear do ensaio).

[040] Na **Fig. 10** são apresentados os histogramas da seletividade dos sistemas PET-PPi/FAM-ssDNA (a) e PET-PAani/FAM-ssDNA (b) para a detecção de (T0) ssDNA alvo complementar e com (T1) uma base incompatível, (T2) duas bases incompatíveis e (ncDNA) ssDNA alvo não complementar.

[041] Na **Fig. 11** é apresentada a curva de calibração e a faixa de resposta linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de ssDNA alvo complementar presente em amostras de SSH diluídas 10x para os sistemas PET-PPi/FAM-ssDNA (a) e PET-PAani/FAM-ssDNA (a).

[042] Na **Fig. 12** são apresentados os espectros de emissão de fluorescência da solução de FAM-ssDNA sob diferentes condições: antes (I) e após (II) interação com filmes bicamadas PET-PPi/PAani e (c) PET-PAani/PPi. No detalhe, a intensidade da fluorescência após interação dos sistemas PET-PPi/PAani/FAM-ssDNA e PET-PAani/PPi/FAM-ssDNA com o ssDNA alvo complementar e não complementar do vírus Zika.

[043] Na **Fig. 13** é apresentado o estudo cinético da imobilização da solução de FAM-ssDNA em filmes bicamadas PET-PAani/PPi e PET-PPi/PAani (a) e da recuperação da fluorescência do FAM-ssDNA imobilizado após interação dos sistemas PET-PAani/PPi/FAM-ssDNA e PET-PPi/PAani/FAM-ssDNA com o ssDNA alvo complementar – T0 do vírus Zika (b).

[044] Na **Fig. 14** é apresentada a curva de calibração e a faixa de resposta linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de ssDNA alvo complementar T0 do vírus Zika para os sistemas (a) PET-PPi/PAani/FAM-ssDNA e (b) PET-PAani/PPi/FAM-ssDNA.

Descrição detalhada da invenção

Exemplo 1. Preparação e caracterização das formas de realização preferidas dos filmes nanoestruturados de PC sobre PET

Exemplo 1.1. Preparação das folhas de PET

[045] Folhas quadradas de PET com lados de tamanho igual a 32 mm foram limpas com detergente e enxaguadas com água deionizada, e depois sonicadas em isopropanol. Em seguida, máscaras retangulares, preparadas utilizando fita adesiva, foram coladas em ambos os lados dos substratos de PET recém limpos. A deposição de PPI e PANi sobre as folhas de PET foi realizada através de um procedimento de polimerização química *in situ*.

Exemplo 1.2. Preparação dos filmes de PET-PPI via polimerização química *in situ*

[046] As cadeias de PPI foram depositadas de acordo com a seguinte metodologia. Inicialmente, o monômero de pirrol foi diluído em água deionizada e adicionado a um béquer de 250 mL, onde a folha de PET com máscara foi colocada verticalmente para permitir o crescimento do filme polimérico sobre ambos os lados do substrato. Em seguida, uma solução aquosa de FeCl₃ foi adicionada lentamente para iniciar a polimerização, que ocorreu por algumas horas a baixa temperatura e sob agitação constante. Finalmente, os filmes obtidos foram lavados várias vezes com água deionizada, secos com um fluxo de ar comprimido seco e cortados em tiras de largura idênticas.

Exemplo 1.3. Preparação dos filmes de PET-PANi via polimerização química *in situ*

[047] Os filmes PANi foram obtidos através da implementação de leves alterações do procedimento descrito acima para o PPI (**exemplo 1.2**). A síntese foi realizada em uma solução aquosa de HCl, adicionando o monômero anilina e o APS (do inglês, Ammonium Persulfate), usado como oxidante. Na **Fig. 1**, apresentamos uma representação pictórica do processo de preparação dos filmes de PPI e PANi.

Exemplo 1.4. Preparação dos filmes bicamadas de PET-PANi/PPI e PET-PPI/PANi via polimerização química *in situ*

[048] Neste exemplo especificamente, os filmes em bicamadas, sobre os quais é realizado o crescimento de camadas alternadas, são formados primeiramente pelo crescimento de uma camada de PPI sobre o PET, conforme a metodologia de

polimerização descrita no **exemplo 1.2**. Posteriormente, uma segunda camada de outro PC, no caso, Pani, é incorporada sobre a primeira camada de PPI, de acordo com o processo de polimerização apresentado no **exemplo 1.3**, formando deste modo a bicamada polimérica nanoestruturada PET-PPi/PAni. Filmes com a sequência invertida das bicamadas nanoestruturada (PET-PAni/PPi), onde inicialmente é crescida a PAni e posteriormente o PPI, foram preparados utilizando o mesmo processo.

Exemplo 1.5. Métodos de caracterização e as características dos filmes de PET-PC

[049] Para investigar a composição dos filmes nanoestruturados de PC depositados sobre o substrato de PET produzidos conforme os procedimentos descritos nos **Exemplos 1.2, 1.3 e 1.4**, análises de FTIR foram realizadas (no intervalo de 2000–630 cm^{-1}) usando um espectrômetro IR Tracer-100 (Shimadzu, Japão), utilizando uma célula ATR com cristal de ZnSe. Para confirmar a composição do material e identificar o estado de oxidação da PAni e do PPI, espectros de UV-Vis dos filmes foram coletados utilizando um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão). As características morfológicas desses filmes foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio Mira3-LM FEG (TESCAN, República Tcheca).

[050] Como pode ser observado na **Fig. 2**, o espectro de FTIR do PET (curva a) apresenta quatro picos principais: um em 1714 cm^{-1} , associado às vibrações C=O do grupo éster do ácido tereftálico, outros dois em 1248 cm^{-1} e 1099 cm^{-1} , que são característicos do polietileno tereftalato e podem ser atribuídos respectivamente ao estiramento assimétrico C–C–O e O–C–C, e um em 722 cm^{-1} , relacionado às vibrações de dobramento C–H nas estruturas aromáticas [20]. No espectro dos filmes de PET-PPi (curva b), as bandas características do PPI estão presentes. As bandas em 1548 cm^{-1} e 1452 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento C=C e C–N, respectivamente, enquanto que as bandas em 1300 cm^{-1} e 1163 cm^{-1} estão associadas às vibrações C–H no plano, e as bandas em 887 cm^{-1} e 777 cm^{-1} são atribuídas às vibrações C-H fora do plano [21-23]. No caso dos filmes de PET-PAni (curva c), as bandas principais que são observadas em 1573 cm^{-1} e 1496 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento C=C nos anéis quinóides e benzenóides, respectivamente. Finalmente, as bandas em 1300 cm^{-1} e 817 cm^{-1} estão correlacionadas às vibrações de estiramento C–N e flexão C–H fora do plano nos anéis benzenóides, respectivamente [23-25]. A técnica ATR é uma medida de superfície

e no caso dos espectros dos filmes bicamadas foi observado que o espectro da camada superior (que varia de acordo com a configuração, PET-PAni/PPi ou PET-PPi/PAni) se sobressai, de modo a que foram observados os mesmos picos característicos dos filmes monocamadas do respectivo PC. Com isso, pudemos comprovar que por meio da polimerização *in situ* conseguimos de fato incorporar as cadeias tanto da PAni como do PPi na superfície do PET.

[051] Quanto ao estado de oxidação da PAni e do PPi depositados sobre o PET, os espectros de UV-Vis apresentados na **Fig. 3** mostram que para os filmes de PET-PPi (curva a), a banda de absorção observada em 450 nm pode ser atribuída às transições $\pi-\pi^*$, enquanto que, como usual, a ampla banda acima de 600 nm é associada à presença de bipólarons, que são os portadores de cargas típicos do PPi dopado (isto é, em seu estado condutor) [26, 27]. Já para os filmes de PET-PAni (curva b), o espectro exibe duas bandas, uma em 330 nm e a outra em 620 nm, que são características do estado base esmeraldina, a forma não dopada da PAni. A primeira está associada à transição $\pi-\pi^*$ dos anéis benzênicos, enquanto a segunda corresponde à transição do éxciton molecular [28, 29]. Essas diferenças observadas no estado de oxidação dos filmes de PET-PPi e PET-PAni ocorrem porque mudanças no pH do meio não afetam tanto o estado dopado do PPi, enquanto que a transição entre os estados de oxidação da PAni é muito susceptível à mudança de pH. Assim, mesmo em pH 6,0, cargas positivas permanecerão presentes nas cadeias de PPi.

[052] As micrografias de MEV com alta ampliação obtidos das folhas de PET puro (**Fig. 4a**) mostram que a superfície é lisa e uniforme, não apresentando nenhuma rugosidade evidente. Por outro lado, para todos os filmes, PET-PAni (**Fig. 4b**) e PET-PPi (**Fig. 4c**), PET-PPi/PAni (**Fig. d**) e PET-PAni/PPi (**Fig. e**) depositados sobre os substratos de PET, foi observado que as camadas nanoestruturadas são homogêneas e rugosas ao longo de toda a área de deposição. Além disso, é possível observar que os filmes são formados por nanofibras, no caso da PAni, e nanogrãos, para o PPi, estruturas já esperadas para a rota de síntese adotada para esses PCs [30, 31].

Biossensoriamento de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos usando a plataforma de filmes PET-PC nanoestruturados

[053] A presente invenção compreende a produção de filmes finos nanoestruturados de polímeros condutores sobre substratos flexíveis, como lâminas de

PET, mas não somente estes, e seu uso como uma plataforma universal para o biossensoriamento fluorescente de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos, preferencialmente DNA.

[054] Os filmes de PET-PC descritos na presente invenção possuem afinidade não específica por ácidos nucleicos, do tipo hidrofóbica, o que possibilita sua utilização na adsorção de fitas simples de ácidos nucleicos, como cadeias de RNA e de DNA (ssDNA). Tais fitas de ácidos nucleicos, por sua vez, podem estar modificadas com moléculas fluorescentes (os fluoróforos), ou não. O polímero depositado no substrato de PET, por ter propriedades condutoras e ser constituído por estruturas aromáticas, desempenha duas funções. A primeira, como mencionado, está associada à capacidade de adsorção das fitas simples de ácidos nucleicos pela interação hidrofóbica entre as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos e suas estruturas aromáticas [32, 33]. Em segundo lugar, devido à propriedade de condutividade, o PC age ao mesmo tempo como um supressor de fluorescência das moléculas repórteres por meio da captura e posterior dispersão do elétron fotoinduzido da molécula ao longo da cadeia polimérica do PC [5]. Na presente invenção, é explorada a supressão de fluorescência, mas não se limitando apenas a ela, como mecanismo de bio-reconhecimento. Nas seções a seguir serão descritas algumas exemplificações de uso dos filmes nanoestruturados de PET-PC, com o objetivo apenas de ilustrar algumas das diferentes possibilidades de aplicação da invenção. Assim, deixa-se desde já compreendido que a presente invenção não se limita às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos apresentados.

Exemplo 2. Imobilização de sondas de DNA fita simples e mecanismo de supressão de fluorescência

[055] O uso de filmes de PET-PC como uma plataforma para a detecção de ácidos nucleicos envolve primeiro a imobilização de um DNA de fita simples marcado com um fluoróforo (FAM¹-ssDNA) na superfície do filme, em um processo que ocorre devido à interação hidrofóbica (não específica) entre as bases nitrogenadas e as estruturas aromáticas das cadeias poliméricas dos PCs. Isso, por sua vez, leva à supressão do sinal de luminescência devido à captura do elétron do fluoróforo pelo PC pela proximidade

¹ **FAM** – O 5 (6) – carboxifluoresceína é um corante fluorescente derivado da fluoresceína mais comum para marcação de biomoléculas. Ele tem uma alta capacidade de absorção, excelente rendimento quântico de fluorescência e boa solubilidade em água, e um máximo de excitação que corresponde exatamente à linha espectral de 488 nm do laser de íons de argônio.

entre os dois. Subsequentemente, quando o filme composto PET-PC/FAM-ssDNA é posto em contato com a solução de DNA alvo, a hibridização específica da sonda com sua fita complementar causa a liberação do FAM-ssDNA. As cadeias de DNA de fita dupla (dsDNA) assim formadas retornam ao meio líquido, e, como resultado, a fluorescência é restaurada. O mecanismo é mostrado esquematicamente, e de forma resumida, na **Fig. 5**.

Exemplo 3. Ensaio de sensoriamento por fluorescência de DNA do parasita *Leishmania infantum* com base no uso de filmes de PET-PAni e PET-PPi

[056] Como uma exemplificação de uso da presente invenção, avaliou-se a capacidade de sensoriamento. Para isso, escolhemos utilizar como sistema modelo moléculas sonda compostas por sequências de oligonucleotídeos² (marcadas com FAM) associadas ao parasita *Leishmania infantum*. A metodologia adotada para o sensoriamento consistiu em colocar inicialmente os filmes de PET-PAni e PET-PPi para interagir com 1 mL de uma sonda ssDNA marcada com FAM diluída em um tampão Tris³-HCl, na presença de MgCl₂ durante um período de 30 a 360 min e sob agitação constante. Em seguida, os filmes foram removidos da solução de FAM-ssDNA e submetidos a um processo de limpeza que consistiu em lavagens consecutivas com tampão Tris-HCl (pH 7,4) na presença de MgCl₂. Posteriormente, para realizar a etapa de hibridização, os sistemas PET-PPi/FAM-ssDNA e PET-PAni/FAM-ssDNA foram colocados em contato com diferentes concentrações – na faixa de (1-600) nM – do DNA alvo complementar durante um intervalo de tempo entre 10 e 360 min. Finalmente, o filme foi removido da solução contendo o DNA alvo complementar e a intensidade de fluorescência da sobrenadante medida em um fluorímetro FluoroLog-3 (Horiba, EUA). Na **Fig. 6** são apresentadas de forma esquemática as principais etapas da metodologia desenvolvida na presente invenção.

[057] Na **Fig. 7** são mostrados os espectros de emissão de fluorescência da sonda FAM-ssDNA obtidos sob diferentes condições. Na curva a, é possível observar que a solução de sonda inicial (ou seja, como preparada) exibe uma forte emissão de

²**Oligonucleotídeo** – É um fragmento curto de uma cadeia simples de ácido nucleico, com um tamanho típico de não mais do que algumas poucas dezenas de pares de base.

³**Tris** – É uma abreviação do composto (hidroximetil)aminometano, N(CH₂OH)₃, muito usado para a preparação de tampões biológicos.

fluorescência devido ao corante fluoresceína acoplado à estrutura da sonda, enquanto que a intensidade da emissão de fluorescência diminui 57% [84%] após uma interação em um intervalo de tempo entre 20 e 360 minutos com filmes de PET-PAni (curva b) [PET-PPi (curva c)]. De fato, isso é uma indicação de que esses filmes adsorvem fortemente a sonda FAM-ssDNA. Após a sonda estar firmemente imobilizada, cada um dos dois sistemas PET-PC/FAM-ssDNA filme foi imerso em uma solução do DNA alvo (uma cadeia simples complementar (T0) ou não complementar (ncDNA)). Quando as intensidades da fluorescência recuperada dos sobrenadantes de T0 e ncDNA foram comparadas, a maior resposta foi de fato encontrada para o caso do DNA alvo complementar (detalhe da **Fig. 7**), confirmando que sob este protocolo os filmes PET-PAni e PET-PPi são eficazes para monitorar a intensidade das interações biomoleculares.

[058] Nas **Figs. 8a e 8b**, apresentamos os resultados da investigação sobre a cinética do processo de imobilização do FAM-ssDNA em ambos os filmes de PET-PAni e PET-PPi e mostramos a evolução da recuperação da intensidade de fluorescência conforme prossegue a hibridização dos sistemas de filmes PET-PC/FAM-ssDNA com seu respectivo DNA complementar. Como pode ser observado na **Fig. 8a**, para os dois tipos de filmes, nas condições estudadas, é necessário um tempo de 180 min de incubação, mas que não se limita a esse, para que a adsorção da sonda atinja o equilíbrio. Quando na presença do DNA alvo complementar (**Fig. 8b**), uma recuperação rápida da fluorescência é observada durante os primeiros 30 min, com a situação de equilíbrio sendo alcançada em 60 min. Assim, para ambos os filmes baseados em PET-PPi e PET-PAni (não se limitando apenas a esses), os tempos ótimos escolhidos para o processo de imobilização da sonda e para a liberação do FAM-ssDNA foram de 180 min e 60 min, respectivamente. Aqui, novamente lembrando que a presente invenção não se limita às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos.

Exemplo 3.1. Ensaios de sensibilidade e seletividade da detecção de DNA de *Leishmania infantum*

[059] Para avaliar a faixa de detecção efetiva, bem como para estimar o menor limite de detecção para os filmes de PET-PPi e PET-PAni, implementamos um estudo detalhado empregando diferentes concentrações do DNA alvo complementar, seguindo a metodologia apresentada em [056] e os tempos ótimos de [058]. A recuperação da fluorescência para T0 no intervalo de 1 a 600 nM para PET-PPi e PET-PAni é mostrada

nas **Figs. 9a e 9b**. Como pode ser visto, após exposição a concentrações crescentes do DNA alvo, uma maior quantidade de FAM-ssDNA é liberada da superfície dos filmes, resultando na formação de um maior número de cadeias de dsDNA e, conseqüentemente, no aumento da intensidade da fluorescência. Nesse exemplo específico, a saturação é alcançada para uma concentração de 300 nM [500 nM] de DNA alvo, no caso dos filmes de PET-PPi [PET-PAni]. Uma relação linear, com coeficiente de determinação (R^2) em torno de 0,994, foi encontrada entre a intensidade de fluorescência a 520 nm (**F**) e a concentração do DNA alvo (**c**), na forma $\log F = 5,54 + 0,548 \log c$, no intervalo de (1 – 500) nM, para os filmes de PET-PAni. Para os filmes de PET-PPi, do mesmo modo, neste exemplo foi obtido um R^2 alto (por volta de 0,992) no intervalo de (1 – 300) nM, a partir de um ajuste do gráfico $\log(F)$ versus $\log(c)$, na forma $\log F = 5,31 + 0,508 \log c$. O limite de detecção foi estimado como 1,1 nM [1,3 nM] para os filmes de PET-PPi [PET-PAni], usando a relação $3\sigma/S$ (onde σ = desvio padrão da amostra branco, e S a inclinação da curva de calibração) [34].

[060] A sensibilidade é uma característica relevante de um sistema de detecção, mas na avaliação do desempenho de detecção correspondente um parâmetro importante a ser também considerado é a seletividade em relação à molécula-alvo específica. Para avaliar a seletividade de recuperação da intensidade de fluorescência dos sistemas de filmes PET-PC/FAM-ssDNA, usamos tipos distintos de ssDNA alvo: i) ssDNA perfeitamente complementar (T0), ii) com uma única (T1) ou iii) duas bases nitrogenadas incompatíveis (T2) e iv) ssDNA não complementar (ncDNA), seguindo a metodologia descrita em [056] e [058] e mantendo fixa a concentração das diferentes sondas alvo (T0, T1, e T2). Nesse exemplo, como mostrado na **Fig. 10a**, no caso dos filmes de PET-PPi a intensidade de recuperação de fluorescência para T1 [T2] foi significativamente menor (32% [18%]) do que o valor obtido quando o ssDNA alvo totalmente complementar foi usado. De maneira semelhante, os valores correspondentes para os filmes de PET-PAni foram 37% e 23% (**Fig. 10b**). Além disso, quase nenhuma alteração na fluorescência foi observada quando o sistema PET-PPi/FAM-ssDNA ou PET-PAni/FAM-ssDNA foi exposto a um ssDNA alvo não-complementar. A boa reprodutibilidade desses resultados, assim como o aumento observado na intensidade de fluorescência quando os filmes com sonda imobilizadas são expostos ao DNA complementar, se constituem em evidências da ocorrência de um bom emparelhamento das bases complementares da sonda imobilizada com os alvos apropriados. Ambos os tipos de sistemas de detecção apresentam uma alta

seletividade para o ssDNA alvo complementar correto (T0), como demonstrado pelo fato de que respostas equivalentes não foram observadas mesmo quando sequências de oligonucleotídeos apresentando apenas uma única base incompatível (T1) foram testadas.

Exemplo 3.2. Ensaios de sensoriamento em amostras complexas

[061] Para verificar a viabilidade do uso de filmes PET-PC para a análise de amostras reais, avaliamos sua tolerância à interferência quando as cadeias alvo foram diluídas em amostras de soro de sangue humano (SSH). Nestes ensaios, as amostras de SSH originais foram inicialmente pré-tratadas para a eliminação de proteínas. Para isso, Proteinase K foi adicionada em amostras de SSH. Em seguida, a mistura obtida foi aquecida por um intervalo de tempo de 5 a 30 min e depois centrifugada. O sobrenadante obtido foi diluído 10x em tampão Tris-HCl (na presença de $MgCl_2$) e depois diferentes concentrações de ssDNA alvo T0 (1, 5, 10, 20, 30 e 50 nM), que, especificamente para este caso, foram reforçadas (“spiked”) pelo método de adição padrão). Os ensaios de detecção por fluorescência foram realizados conforme a metodologia descrita em [056] e [058].

[062] Uma nova curva de calibração, conforme a metodologia relatada em [059], foi construída, quando foi verificado que, para ambos os sistemas de PICs avaliados, nas presentes condições há também uma boa linearidade (o coeficiente de correlação (R^2) é igual a 0,99 e 0,98 para o PET-PPi e a PET-PAni, respectivamente) na relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração de ssDNA alvo complementar em amostras de SSH (**Fig. 11**), com os desvios padrão relativos (DPR, $n=5$) encontrados sendo todos menores que 5%. Portanto, estes resultados mostram que o biossensor construído com base em sistemas de filmes PET-PC/FAM-ssDNA pode vir a ser aplicado para a detecção direta de cadeias de ácido nucleico em amostras biológicas complexas.

Exemplo 4. Ensaios de sensoriamento por fluorescência de DNA do vírus Zika com base no uso de filmes de PET-PAni/PPi e PET-PPi/PAni

[063] Em uma outra exemplificação da presente invenção, filmes bicamadas de PET-PAni/PPi e PET-PPi/PAni foram preparados para avaliar tanto o desempenho de biossensoriamento das plataformas PET-PC e a influência da interação entre diferentes camadas de PC. Em acréscimo, essa exemplificação também mostra o uso dos filmes de

PET-PC para a detecção de ácidos nucleicos de outro agente patogênico. Para isso, os filmes de bicamadas foram obtidos conforme a metodologia do **exemplo 1.4**. Já os experimentos de sensoriamento foram realizados de acordo com as metodologias de imobilização [056], cinética [058], e sensibilidade (com uma faixa de concentração de 5 – 100 nM) [059] dos **exemplos 3 e 3.1**, utilizando neste caso como sistema modelo um conjunto de sonda compostas por sequências de oligonucleotídeos (marcadas com FAM) associadas ao vírus Zika.

[064] Na **Fig. 12** é mostrado o espectro de fluorescência da sonda FAM-ssDNA, antes (curva I), e depois da imobilização utilizando os filmes de PET-PPi/PAni (curva II) e PET-PAni/PPi (curva III). De modo similar ao ocorrido com os filmes monocamadas [057], pode ser observado que a solução inicial de sonda tem uma forte fluorescência, com sua intensidade diminuindo em 74% no filme de PET-PPi/PAni (contra 57% com filme monocamada de PAni), e 91% no filme de PET-PAni/PPi (contra 84% com filme monocamada de PPi), depois da imobilização. Isso permite comprovar que há uma maior eficiência de imobilização da sonda FAM-ssDNA nos filmes bicamadas PET-PAni/PPy e PET-PPy/PAni, quando comparados aos filmes monocamadas correspondentes (PET-PPy e PET-PAni). Já quando os filmes com as sondas imobilizadas são colocados em contato com soluções de DNA alvo e não complementar (ncDNA) e é medida a intensidade de fluorescência (detalhe da **Fig. 12**), como esperado a recuperação para as amostras de DNA alvo para os dois filmes se mostrou muito superior à do ncDNA. Esses resultados mostram que, assim como no caso dos filmes monocamadas de PAni e PPi, os filmes bicamadas também são eficazes para o monitoramento de interações biomoleculares, tendo inclusive uma melhor capacidade de imobilização de sonda de ssDNA, neste caso específico, referente ao vírus Zika.

[065] Os resultados dos estudos das cinéticas de imobilização da sonda FAM-ssDNA e da recuperação da intensidade de fluorescência via a hibridização da sonda com seu DNA complementar para ambos os filmes bicamadas (PET-PPi/PAni e PET-PAni/PPi) são mostrados na **Fig. 13**. Como é possível observar, para os dois filmes bicamadas, nas presentes condições, os tempos de equilíbrio para a imobilização e recuperação de fluorescência encontram-se próximos de 180 e 60 min, respectivamente. Valores nessa faixa também foram observados para os filmes monocamadas (PET-PAni e PET-PPi).

[066] Finalmente, na avaliação da faixa de detecção efetiva para os filmes bicamadas se observou que para os filmes PET-PPi/PAni (**Fig. 14a**) foi obtido um coeficiente de determinação (R^2) próximo a 0,976, através da relação linear $F = 66457,7 + 10780,0 c$, para a intensidade de fluorescência (F) em 520 nm e a concentração do DNA complementar (c) na faixa entre 5 – 100 nM. Já para os filmes de PET-PAni/PPi (**Fig. 14b**) foi encontrado um valor de R^2 em torno de 0,9968, e a relação linear da forma $F = 75642,09 + 24683,89 c$. A partir desses resultados, e utilizando a relação $3\sigma/S$ apresentada em [059], estimamos os limites de detecção como sendo da ordem de 278 pM para o PET-PPi/PAni e 345 pM para o PET-PAni/PPi. Esses valores de detecção se mostram inferiores aos observados para os filmes monocamadas (PET-PAni e PET-PPi) – sendo, portanto, melhores, o que vem evidenciar a versatilidade da presente invenção, que, como mostrado através dos exemplos de uso dados, apresenta a perspectiva de ser otimizada (no tocante à sensibilidade) de acordo com as diferentes metodologias de preparação dos filmes adotadas, e a escolha dos PCs a serem utilizados.

REIVINDICAÇÕES

1. Filmes nanoestruturados de polímeros condutores caracterizados por serem obtidos através do revestimento de substratos sólidos com polímeros condutores, a partir de uma rota de síntese química por polimerização *in situ*.
2. Filmes nanoestruturados de polímeros condutores, conforme reivindicação 1, caracterizados por serem compostos por uma ou mais camadas de um polímero condutor, ou camadas alternadas de diferentes polímeros condutores.
3. Filmes nanoestruturados de polímeros condutores, conforme reivindicação 1, caracterizados por apresentarem espessura entre 20 nm e 300 µm.
4. Filmes nanoestruturados de polímeros condutores, conforme reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que o polímero condutor compreende qualquer uma macromolécula que pertença à classe de polímeros aromáticos ou não, que apresente uma sequência de ligações simples e duplas alternadas capazes de permitir o transporte de carga ao longo da cadeia polimérica via a deslocalização de defeitos (íons radicais, quase partículas) tipo pólarons e/ou bipólarons formados durante a síntese polimérica, ou através de dopagem óxido-redutiva ou de protonação, tais como polianilina, polipirrol, politiofeno, poli (3,4-etilenodioxitiofeno), entre outros.
5. Filmes nanoestruturados de polímeros condutores, conforme reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que o substrato pode ser flexível e composto por polímeros termoplásticos, ou rígido e constituído de silicatos ou materiais cerâmicos.
6. Processo para obtenção de filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definido nas reivindicações de 1 a 3, e caracterizado por serem os filmes obtidos através da síntese química de polimerização *in situ* do polímero condutor sobre a superfície de substratos sólidos para a obtenção das propriedades desejadas.
7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 e 6, caracterizado pelo fato de serem os referidos filmes nanoestruturados obtidos pela deposição via polimerização de um monômero da classe dos polímeros condutores, tal como

anilina, pirrol, tiofeno, 3,4-etilenodioxítiofeno, 2-Acetilíofeno e/ou a combinação desses, que possa ser polimerizado através da ação de agentes oxidantes.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 e 6, caracterizado pelo fato de serem os referidos filmes obtidos por polimerização, em uma síntese que emprega um agente oxidante que pode ser FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$, CuBr_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuSO}_4\text{CuCl}_2$, ou CuSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, ou a combinação desses ou de qualquer outra molécula ou composto com potencial de redução superior ao do monômero.
9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 e 6, caracterizado pelo fato de serem os referidos filmes obtidos por polimerização, com o dopante do polímero condutor a ser adicionado ao meio reacional podendo ser um ácido inorgânico, tal como HCl , HNO_3 , H_3PO_4 , H_2SO_4 , ácido p-toluenossulfônico, e/ou surfactante, mas, preferencialmente HCl , cujo dopante são os íons Cl^- .
10. Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado por serem usados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento por interações moleculares específicas, em um processo que seja de preferência, mas não apenas, por hibridização.
11. Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado por serem utilizados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, com a sonda a ser usada para o bioreconhecimento sendo uma cadeia de fita simples de ácidos nucleicos com sequência específica correspondente ao patógenos de interesse.
12. Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem usados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, sendo que devido à composição polimérica os filmes são

capazes de interagir com fitas simples de ácidos nucleicos, mas não somente, através de interações hidrofóbicas, de caráter não específico.

- 13.** Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem usados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, sendo a sonda usada para o bioreconhecimento marcada preferencialmente, mas não somente, com uma molécula ou qualquer outro repórter fluorescente.
- 14.** Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem usados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, podendo o repórter fluorescente ser uma molécula marcadora de ácidos nucleicos obtida comercialmente, ou um nanocompósito híbrido de polímero condutor e nanopartículas metálicas.
- 15.** Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem utilizados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, sendo a identificação do ácido nucleico do patógeno alvo, feita preferencialmente, mas não apenas, pela recuperação da intensidade de fluorescência das sondas desorvidas da plataforma via sua mudança conformacional ocasionada pelo processo de hibridização.
- 16.** Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem usados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, podendo os patógenos de interesse serem vírus, bactérias, protozoários, ou qualquer outro organismo constituído por ácidos nucleicos.

- 17.** Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem usados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, podendo os ácidos nucleicos do patógenos de interesse serem provenientes de amostras biológicas complexas, tais como sangue, plasma, urina, saliva, ou outros diferentes tipos de tecidos animal.
- 18.** Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem utilizados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, podendo o ácido nucleico alvo de detecção ser o ácido desoxirribonucleico (DNA).
- 19.** Uso dos filmes nanoestruturados de polímeros condutores, definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizados por serem utilizados como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência para a detecção de cadeias de ácidos nucleicos de agentes patogênicos a partir do bioreconhecimento de interações moleculares específicas, podendo o ácido nucleico alvo de detecção ser o ácido ribonucleico (RNA).

Figuras

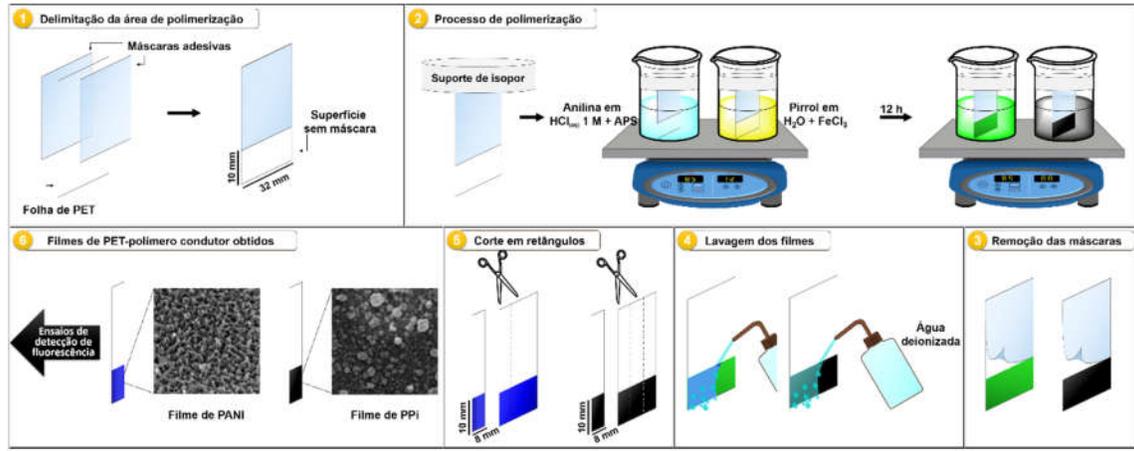


Fig. 1

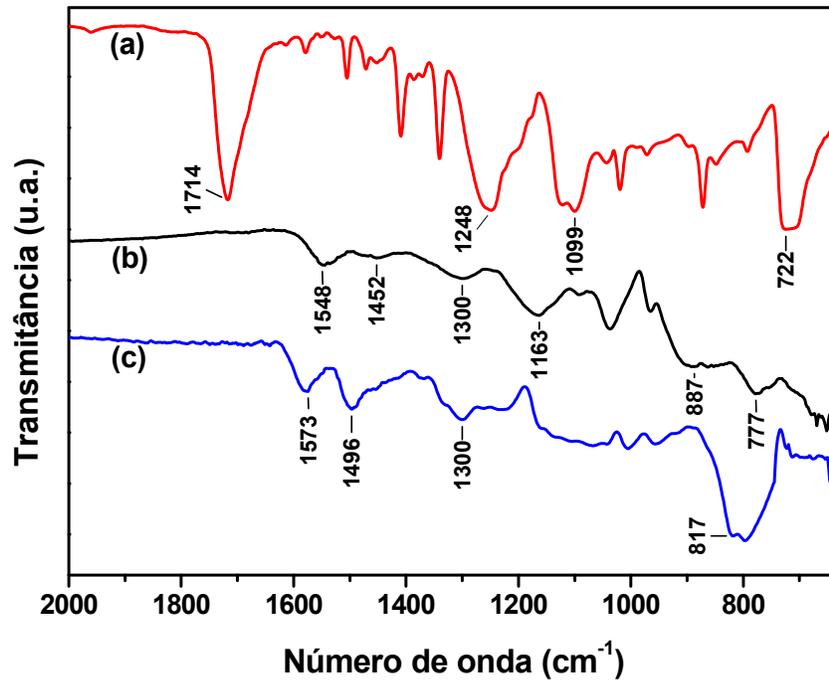


Fig. 2

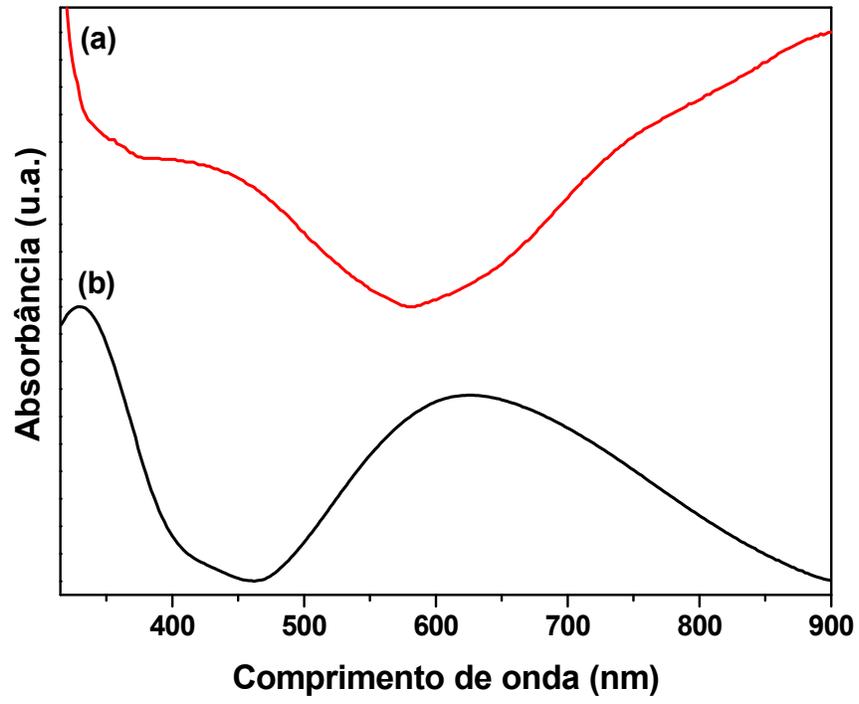


Fig. 3

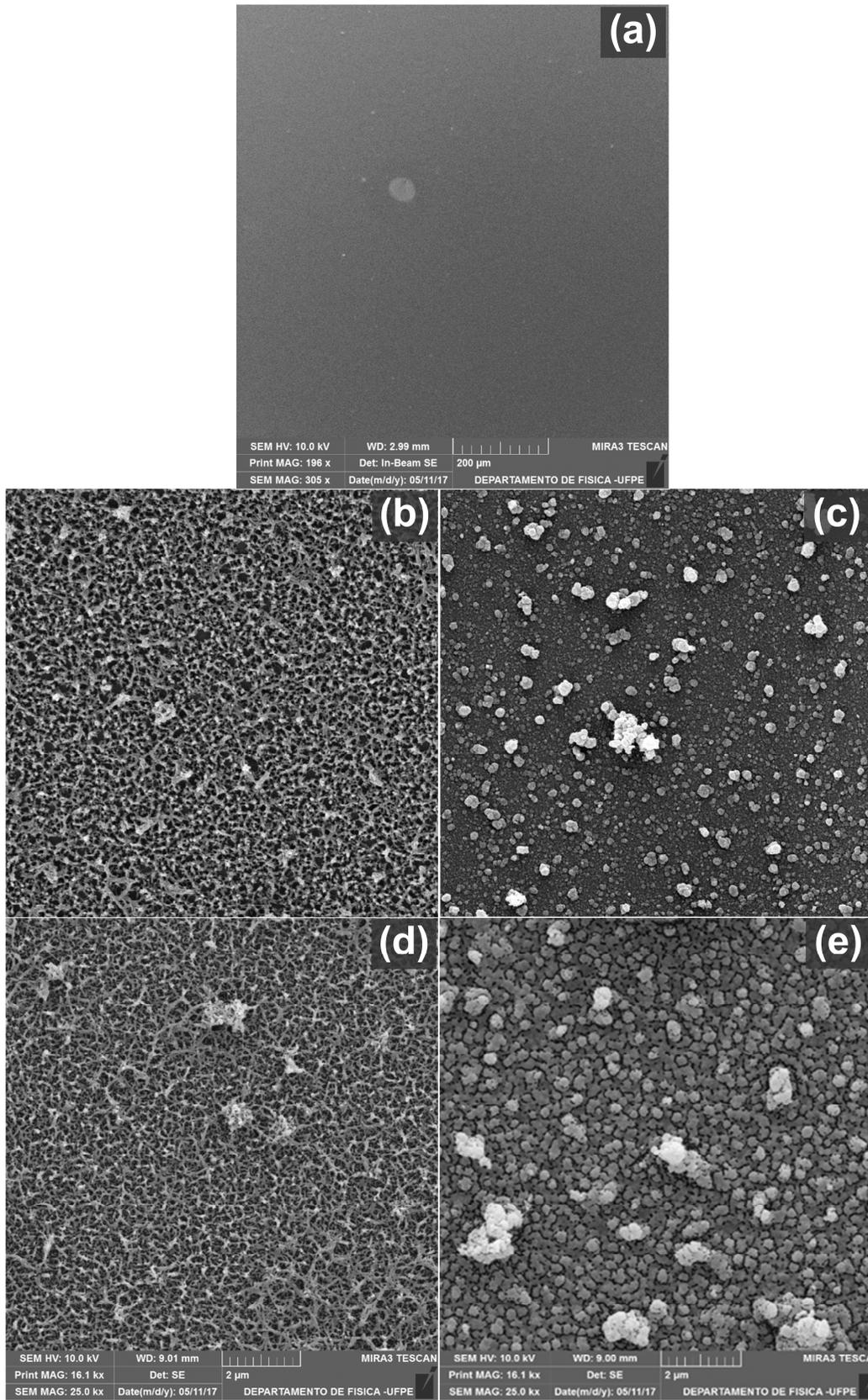


Fig. 4

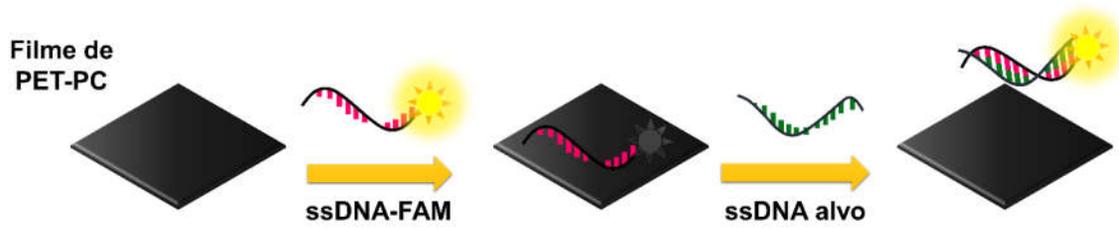


Fig. 5

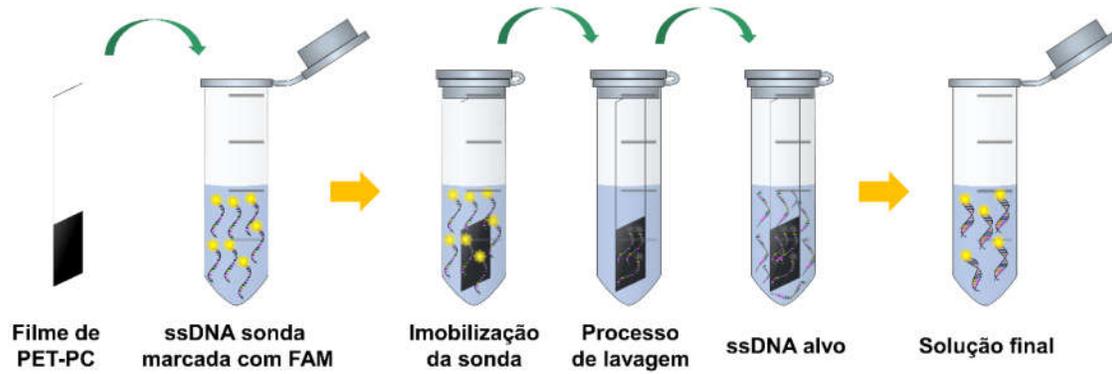


Fig. 6

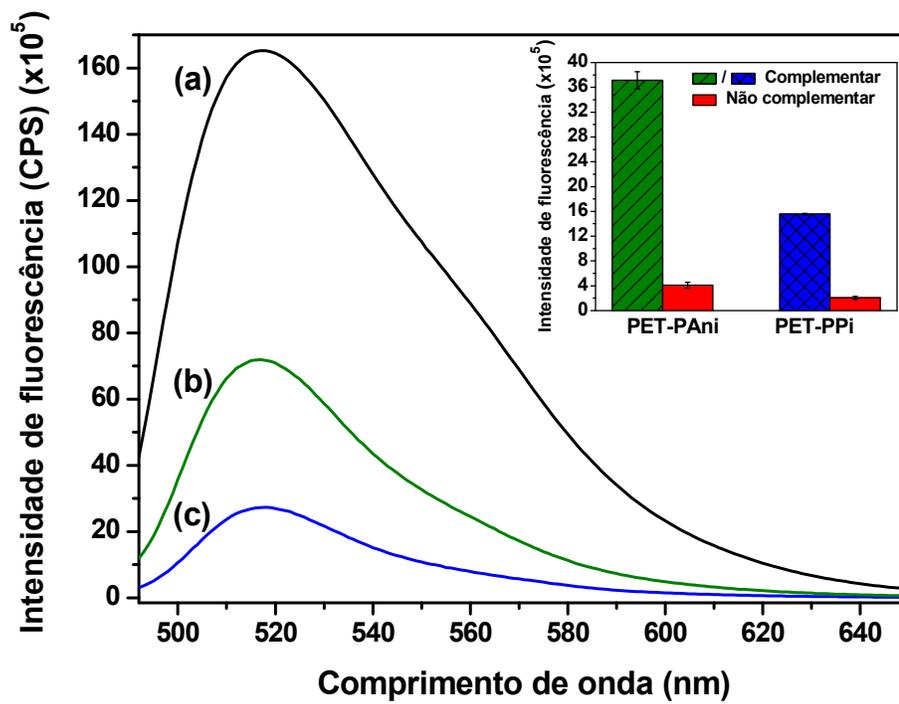


Fig. 7

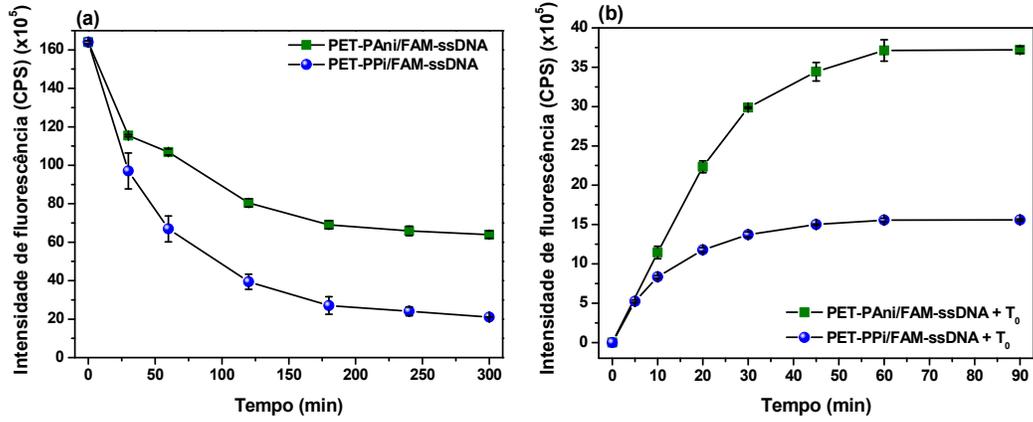


Fig. 8

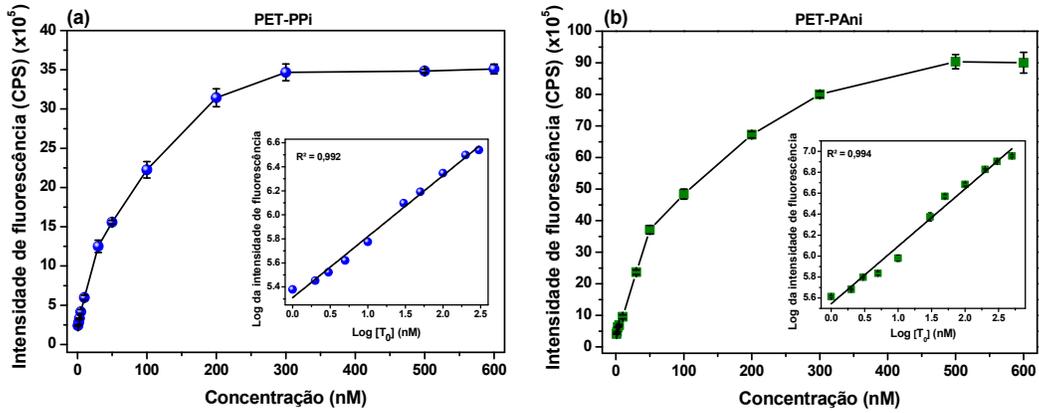


Fig. 9

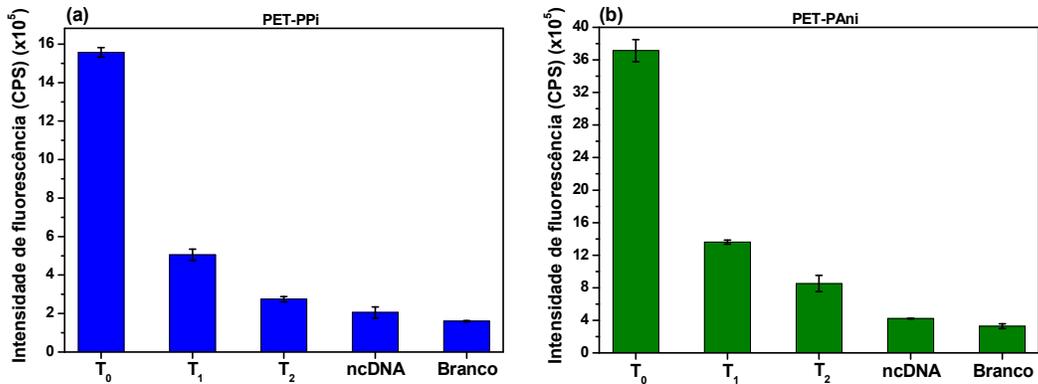


Fig. 10

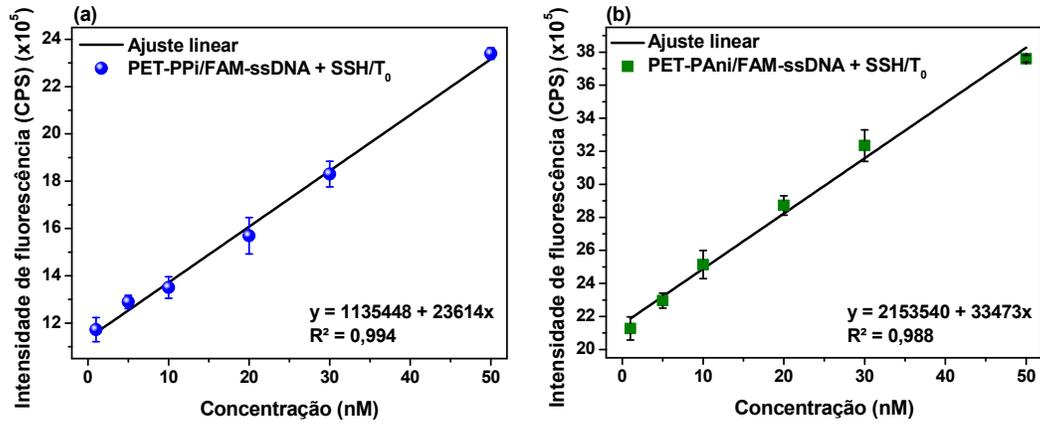


Fig. 11

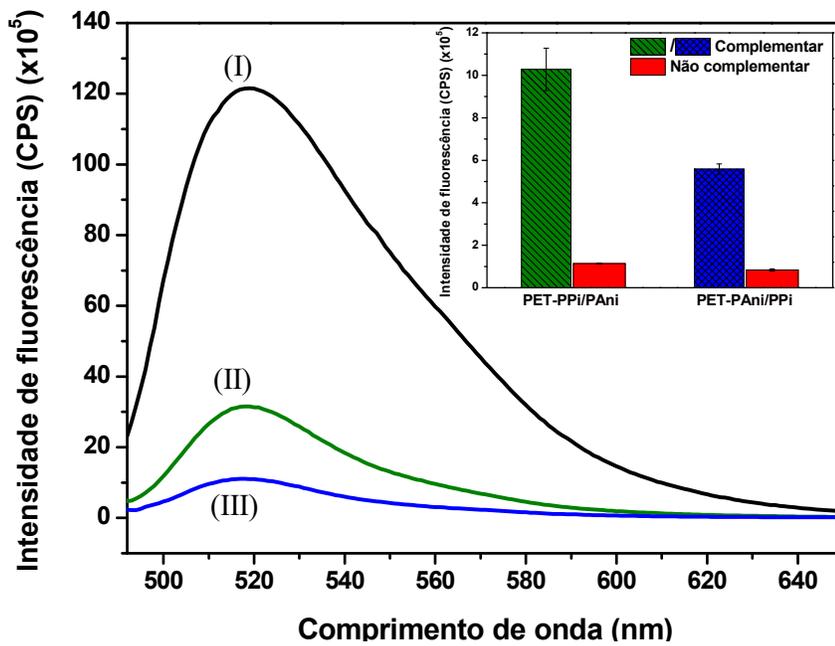


Fig.12

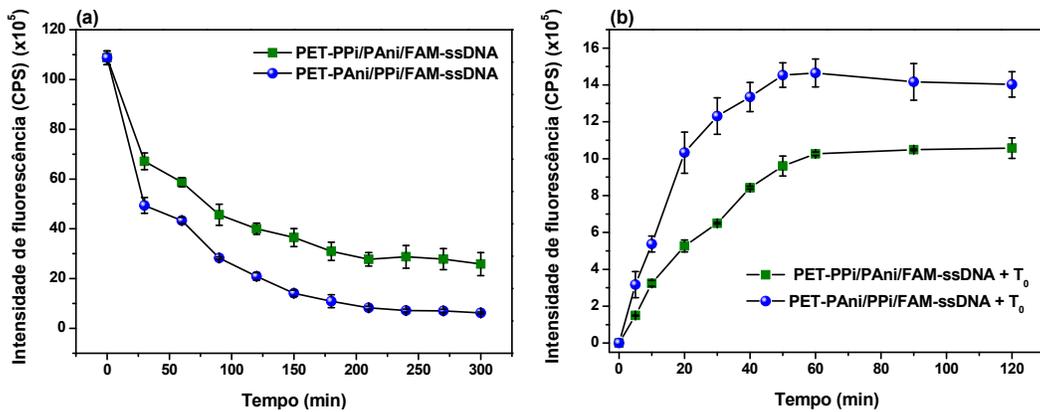


Fig. 13

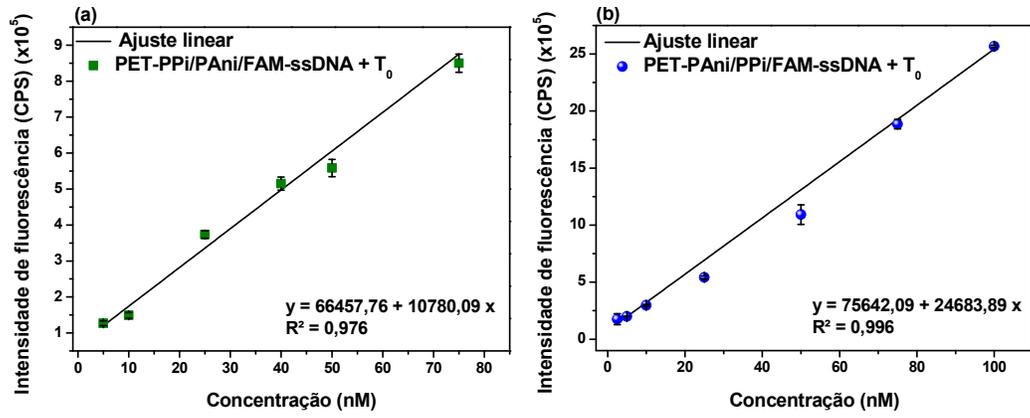


Fig. 14

RESUMO

FILMES NANOESTRUTURADOS DE POLÍMEROS CONDUTORES, PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEU USO COMO PLATAFORMAS PARA O SENSORIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A presente invenção estende-se à síntese de filmes finos de polímeros condutores (PC) sobre substratos flexíveis de polietileno tereftalato (PET) e a seu uso como uma plataforma para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos (isto é, o sensoriamento molecular) de agentes infecciosos, como *Leishmania infantum*, o vírus da Zika, o vírus do Papiloma Humano tipo 18 (HPV-18), dentre outras doenças de importância para a saúde pública. A presente metodologia é baseada na detecção de ácidos nucleicos (por meio de sua hibridização com sondas de caráter específico) e tem como objetivo permitir a incorporação do substrato polimérico assim preparado em protocolos simples, rápidos, e de baixo custo para o diagnóstico simplificado de doenças infecciosas ou genéticas em pontos primários de atendimento (possibilitando, em especial, maneiras de prevenção ou tratamento dessas doenças ainda em um estágio inicial), para o monitoramento ambiental e para uma rápida identificação de patógenos pela indústria alimentar.