



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

(21) BR 102020024522-8 A2



(22) Data do Depósito: 30/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 21/06/2022

(54) **Título:** NANODISPOSITIVO IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS REACIONAIS PARA O VÍRUS ZIKA

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/569; C12Q 1/689; C12Q 1/04.

(52) **CPC:** G01N 33/569; C12Q 1/689; C12Q 1/04.

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

(72) **Inventor(es):** ESTEFANI PONTES SIMÃO; DAMMYRES BARBOZA DE SANTANA SILVA; MARLI TENÓRIO CORDEIRO; LAURA HELENA VEJA GONÇALVES GIL; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE; MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA.

(57) **Resumo:** NANODISPOSITIVO IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS REACIONAIS PARA O VÍRUS ZIKA. O presente invento é resultado de uma metodologia simples, baseada na imobilização química de zika vírus (ZIKV) em uma plataforma nanoestruturada composta de cisteína e nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx). O nanodispositivo descreve a construção de um biossensor capaz de interagir com anticorpos anti-ZIKV, com o propósito de identificar o contato do organismo humano com ZIKV. Objetivando-se aprimorar a performance analítica dos eletrodos, a plataforma nanoestruturada foi caracterizada com a utilização de NpZnOx modificadas quimicamente, sendo baseada em uma monocamada automontada de cisteína, que serviu de suporte para as NpZnOx e posterior imobilização do ZIKV. Verifica-se a importância do uso desse nanomaterial para o desenvolvimento do biossensor, caracterizado pela excelente biocompatibilidade que otimiza os resultados obtidos com o processo de biointeração com o analito alvo. As técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica foram utilizadas durante todas as etapas de desenvolvimento do sensor, para caracterizar eletroquimicamente todos os processos de imobilização química e biológica. O sistema sensor proposto nesta patente é capaz de detectar anticorpos anti-ZIKV em paciente sensibilizados pelo ZIKV, apresentando-se como um sistema útil para identificar pacientes infectados pelo zika.



NANODISPOSITIVO IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS REACIONAIS PARA O VÍRUS ZIKA

→ Campo técnico

1. O zika vírus (ZIKV) tem se tornado um arbovírus endêmico no Brasil nos últimos anos, preocupando a população devido às graves complicações neurológicas resultantes do neotropismo do vírus atingindo adultos e neonatos (Durce; Gomes, 2016; Zanluca *et al.*, 2015). Diante das graves consequências à saúde humana, a necessidade de um diagnóstico rápido e preciso para a identificação de sinais de infecção pelo ZIKV é emergente, tendo em vista que os testes atuais possuem limitações em relação ao período de latência do vírus, além da necessidade de profissionais habilitados nas técnicas padronizadas de diagnóstico (Nicolini; McCracken; Yoon, 2017; Zanluca *et al.*, 2015).

2. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um nanodispositivo eletroquímico, baseado em uma camada automontada (SAM) de cisteína e nanopartículas de óxido de zinco modificadas, para imobilização de partículas do ZIKV, tendo como objetivo final a detecção de anticorpos anti-ZIKV.

3. A plataforma desenvolvida é uma nova invenção tecnológica capaz de aliar nanomateriais e materiais de origem biológica para detectar anticorpos anti-ZIKV. A utilização de nanomateriais no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos tem acrescentado na sensibilidade e funcionalidade desses dispositivos.

4. As nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx) são nanomateriais, condutores, que exibem uma grande área de superfície livre para ligação de biomoléculas, excelente biocompatibilidade, alta estabilidade, característica pela capacidade de transferência de elétrons (Ahmed *et al.*, 2011; Hwa; Subramani, 2014). Desta forma, as

NpZnOx apresentam-se como uma boa alternativa para imobilização de proteínas devido ao seu alto ponto isoelétrico.

5. Em adição, a utilização de modificações químicas possibilita a interação covalente entre esse nanomaterial e biomolécula, em exemplo do que se realizou no presente trabalho, onde as NpZnOx foram aminadas e ativação dos grupos aminos livres promoveram a imobilização da biomolécula ConA. Diante das características apresentadas, a nanoestrutura é uma excelente alternativa para imobilização do ZIKV para detecção de anticorpos anti-ZIKV em pacientes sensibilizados.

6. A utilização de técnicas eletroquímicas no desenvolvimento de biossensores nanoestruturados possibilita uma análise química, física e biológica dos componentes do biossensor (Randviir; Banks, 2013). Essa característica engrandece o diagnóstico devido às diversas possibilidades de análises presentes em um único dispositivo.

→ Sumário

7. O invento foi desenvolvido por meio da funcionalização do eletrodo de trabalho com cisteína, seguida da modificação química de NpZnOx com 3-aminopropiltriethoxysilano (APTES), as quais aderiram firmemente ao eletrodo funcionalizado. Desta forma, foi possível associar partículas virais nas NpZnOx para interação com anticorpos específicos reacionais à infecção viral em pacientes sensibilizados pelo ZIKV.

8. A plataforma sensora foi desenvolvida pela técnica de automontagem, facilitada pelas características físico-químicas das moléculas utilizadas e das NpZnOx. Desta forma, foi possível avaliar eletroquimicamente cada etapa de modificação do eletrodo de trabalho

até o processo de biointeração entre o vírus imobilizado e os anticorpos reacionais à *zika*.

→ Estado da técnica

9. O ZIKV é um arbovírus da família *Flaviviridae*, que possui em sua estrutura RNA de sentido positivo, responsável pela codificação de proteínas estruturais (C, prM / M e E) e proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Qin; Qi; Gao, 2016). A glicoproteína E, formada por dímeros, recobre toda a superfície viral, é responsável pela endocitose do vírus a célula do hospedeiro, além de ser um alvo importante para anticorpos neutralizantes (Dordick; Linhardt, 2017).

10. Alguns estudos revelam que as infecções pelo vírus podem comprometer funções neurológicas dos indivíduos infectados, como a síndrome de Guillian Barrét e malformação neurológica fetal, como a microcefalia (Faria *et al.*, 2016; Vodušek *et al.*, 2016; Zanluca *et al.*, 2016).

11. Apesar de todos os problemas decorrentes da infecção pelo ZIKV, o diagnóstico é dificultado devido à pouca especificidade dos sintomas, além da variação de biomarcadores sanguíneos específicos para o diagnóstico em várias fases da doença, prejudicando ensaios imunológicos (Chakraborty, 2016; Qin; Qi; Gao, 2016).

12. Em busca de um diagnóstico preciso e eficiente, o presente invento apresenta um novo método diagnóstico capaz de eliminar as reações cruzadas e obter uma maior sensibilidade na detecção dos biomarcadores.

13. As técnicas utilizadas para auxiliar o diagnóstico, como os testes imunológicos rápidos (MAC-ELISA), são inespecíficos para infecção

aguda, e os testes específicos (RT-PCR) são de alto custo (Pardee *et al.*, 2016).

14. Diante da necessidade de um instrumento específico e eficiente na identificação do ZIKV, a utilização do biossensor apresenta uma alternativa para auxiliar no diagnóstico das arboviroses.

15. Os biossensores eletroquímicos são dispositivos capazes de detectar rapidamente espécies químicas e/ou biológicas, tendo como objetivo a produção de um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração do analito, os quais interagem com o elemento biossensível (Monošík; Střed'anský; Šturdík, 2012).

16. A aplicação de nanomateriais em biossensores eletroquímicos possibilita uma maior amplitude de sinal elétrico, que contribui para a sensibilidade na detecção do analito alvo (Randviir; Banks, 2013).

17. As NpZnOx são nanopartículas de elevada biocompatibilidade e rápida cinética de elétrons, sendo característica importante no desenvolvimento de sensores eletroquímicos (Ahmed *et al.*, 2011). Apesar de ser empregada em biossensores, ainda não foi utilizada como componente de uma plataforma para imobilização do ZIKV. O presente invento apresenta um novo biossensor baseado em uma plataforma nanoestruturada com nanopartículas de óxido de zinco e ZIKV para detecção de anticorpos anti-*zika*.

18. O novo método diagnóstico apresentado é exclusivo, nenhum outro invento divulgado apresenta a utilização de nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx) modificadas quimicamente como suporte de imobilização do ZIKV para detecção de anticorpos reacionais à infecção pelo ZIKV, como apresentado na Figura 4.

→ Problemas e limitações do estado da técnica

19. O invento apresentado inicialmente limita-se a um estudo de interações químicas e elétricas com componentes biológicos, para uma futura miniaturização do biodispositivo. Esta etapa inicial é fundamental para o processo de miniaturização, pois é possível avaliar os interferentes em cada etapa de montagem do biossensor, além de um estudo aprofundado do processo de biointeração entre o sistema desenvolvido e ZIKV.

→ Objetivo da invenção

20. O objetivo do invento apresentado é o desenvolvimento de um biossensor baseado em NpZnOx para imobilização do ZIKV na detecção sensível e seletiva aos anticorpos anti-ZIKV. A aplicação de NpZnOx como suporte do ZIKV é uma inovação para o diagnóstico preciso e seletivo de anticorpos reacionais ao vírus em estudo.

→ Solução

21. O presente invento é capaz de ser reproduzido em um dispositivo miniaturizado, devido à simplicidade do processo de montagem do sistema sensor e da estabilidade das moléculas quando quimicamente ligadas à plataforma sólida. Sendo, assim, uma alternativa inovadora para o diagnóstico de infecções pelo ZIKV.

→ Vantagens

22. O biodispositivo desenvolvido apresenta algumas vantagens em relação aos métodos imunológicos e moleculares padrões para o diagnóstico do ZIKV. É um dispositivo de desenvolvimento simples, não necessita de equipamentos robustos e de reagentes de elevado custo, além de ser uma metodologia diferenciada, capaz de minimizar as

reações imunológicas cruzadas a outras arboviroses. Possibilitando um diagnóstico mais rápido, preciso e de menor custo, quando comparado aos métodos já padronizados.

→ **Descrição da invenção**

23. O desenvolvimento do biossensor inicia-se na modificação química com APTES das NpZnOx. Esta funcionalização química permite a conjugação desse nanomaterial a biomoléculas.

24. O eletrodo de ouro é polido em alumina para eliminar qualquer molécula interferente, em seguida, enxaguado em água deionizada, finalizando o processo de limpeza da superfície de ouro. Posteriormente, 2µL de 70 mM de cisteína (cys) são adicionados à superfície do eletrodo para obter SAM de cys. Em seguida, 2µL da mistura de 0,4 M de EDC e 0,1 M de NHS (1:1, v/v) foram adicionados na superfície do eletrodo por um período de 10 min, a fim de favorecer a ligação química do APTES e NpZnOx. Após, 2µL ZIKV foi colocado na superfície do eletrodo e incubado por 10 min. O desempenho do biossensor avaliado frente a anticorpos monoclonal e IgG anti-ZIKV, além do anti-NS3 por um período de incubação de 10 min.

→ **Caracterização eletroquímica do biossensor**

25. A caracterização eletroquímica do biodispositivo desenvolvido foi realizada através das técnicas eletroquímicas amperométricas e impedimétricas. Os ensaios eletroquímicos foram realizados no equipamento PGSTAT 128N potenciostato/galvanostato (Autolab, Netherlands), utilizando três eletrodos (eletrodo de trabalho, referência e auxiliar) e uma célula eletroquímica convencional, na presença de uma solução eletrolítica de ferro-ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$) a 10mM.

26. O eletrodo de trabalho é composto por ouro, o auxiliar de platina, e o de referência (Ag/AgCl) saturado com KCl. A voltametria cíclica (VC) foi realizada em um potencial entre -0,2 e +0,7 V em uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi realizada na frequência de 100 mHz e 100 kHz com um potencial aplicado de 10 mV.

→ **Deteccção eletroquímica de anti-ZIKV**

27. A Figura 1 demonstra o esquema de desenvolvimento do nanobiodispositivo para detecção de anti-ZIKV. Composto por uma SAM de cisteína, que após adição do EDC:NHS, proporciona um suporte para ancorar as NpZnOx aminadas. O ZIKV é imobilizado à plataforma nanoestruturada desenvolvida e desta forma é capaz de interagir com anticorpos monoclonais e IgG anti-ZIKV.

28. As etapas de construção do biossensor são avaliadas pela técnica de VC e EIE, como apresentado na Figura 2. Observa-se uma alteração nas correntes de picos anódicas (ipa) e catódicas (ipc) do voltamograma cíclico (VC), assim como no diâmetro do semicírculo do Diagrama de Nyquist (EIE), após adição de cada molécula à superfície do eletrodo.

29. Essas modificações eletroquímicas são correspondentes às características elétricas de cada molécula adicionada à superfície do eletrodo de trabalho, e, quando submetida a uma corrente em uma solução eletrolítica, fornece informações sobre as propriedades interfaciais do sistema desenvolvido (Randviir *et al.*, 2013).

30. Na Figura 2a, é demonstrado um decaimento das correntes de pico após a formação da SAM de cisteína, refletindo em um pequeno bloqueio na condutividade elétrica (Oliveira *et al.*, 2011; Simão *et al.*, 2016). Em seguida, com a adição das NpZnOx, ocorre um aumento na

área do voltamograma, devido à grande condutividade característica do nanomaterial funcionalizado (Hwa; Subramani, 2014; Kumar; Chen, 2008). Por fim, com adição do ZIKV, observa-se uma diminuição das correntes de picos, demonstrando a imobilização das partículas virais na plataforma nanoestruturada. Em adição, a Figura 2b complementa os resultados obtidos na VC, onde é observado um comportamento eletroquímico semelhante.

31. Na Figura 3, podemos confirmar a sensibilidade do presente invento aos anti-ZIKV, com a análise dos dados teóricos obtidos por meio de dados experimentais da EIE. A análise do circuito equivalente do sistema, por meio do circuito de Randles, onde foi extraído o valor de R_{ct} (resistência à transferência de carga), é importante para o cálculo do $\Delta R_{ct}\%$ (percentual da variação da resistência à transferência de carga), que reflete o processo de biointeração entre o vírus imobilizado e os anticorpos testados. A Figura 3 demonstra que o biossensor foi sensível a anticorpos monoclonais e IgG anti-ZIKV em diversas concentrações, comprovando a eficiência do biossensor para a identificação de anticorpos reacionais à infecção pelo ZIKV. A resposta eletroquímica ao anti-NS3 foi inferior quando comparada aos outros anticorpos, apesar de ser um anticorpo presente nas infecções pela *zika* e dengue.

32. Diante do desempenho apresentado, o nanobiodispositivo eletroquímico baseado em nanopartículas de óxido de zinco e ZIKV para detecção de anticorpos reacionais para ZIKV, é um biossensor inovador para o auxílio diagnóstico da *zika*.

→ Referências

33. Ahmed, S. *et al.* Designing and surface modification of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9):2107-2115, 2011.
34. Chakraborty, S. Computational analysis of perturbations in the post-fusion dengue virus envelope protein highlights known epitopes and conserved residues in the *zika* virus [version 2; referees: 3 approved]. *Referee Status*, 0:1-22, 2016.
35. Dordick, J. S.; Linhardt, R. J. Interaction of *zika* virus envelope protein with glycosaminoglycans. 56:1151-1162, 2017.
36. Durce, M.; Gomes, C. Síndrome da infecção congênita pelo vírus *zika*. *Cad. Saúde Pública*, 32(7):1-3, 2016.
37. Faria, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*, 352:6283, 2016.
38. Hwa, K.; Subramani, B. Biosensors and bioelectronics synthesis of zinc oxide nanoparticles on graphene - carbon nanotube hybrid for glucose biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronic*, 62:127-133, 2014.
39. Kumar, S. A.; Chen, S. Nanostructured zinc oxide particles in chemically modified electrodes for biosensor applications. *Analytical Letters*, 41(2):141-158, 2008.
40. Monošík, R.; Stred'anský, M.; Šturdík, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1):109-120, 2012.
41. Nicolini, A. M.; McCracken, K. E.; Yoon, J. Future developments in biosensors for field-ready *zika* virus diagnostics. *Journal of Biological Engineering*, 11(7):1-9, 2017.
42. Oliveira, M. D. L. *et al.* Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin

for bacterial lipopolysaccharide recognition. *Journal of Colloid and Interface Science*, 362(1):194-201, 2011.

43. Pardee, K. *et al.* Rapid, low-cost detection of *zika* virus using programmable biomolecular components resource rapid. *Cell*, 165(5):1255-1266, 2016.

44. Qin, C.; Qi, J.; Gao, G. F. Structures of the *zika* virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective article, structures of the *zika* virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host and Microbe*, 19(5):696-704, 2016.

45. Randviir, E. P. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy versus cyclic voltammetry for the electroanalytical sensing of capsaicin utilising screen printed carbon nanotube electrodes. *The Analyst*, 138(10):2970-2981, 2013.

46. Randviir, E. P.; Banks, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Analytical Methods*, 5(5):1098-1115, 2013.

47. Simão, E. P. *et al.* Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6):1040-1047, 2016.

48. Vodusek, V. F. *et al.* *Zika* virus associated with microcephaly. *N Engl J Med*, 374:951-958, 2016.

49. Zanoluca, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of *zika* virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 110:569-572, 2015.

50. Zanoluca, C. *et al.* *Zika* virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet*, 387:2016, 2016.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Nanobiodispositivo impedimétrico, **caracterizado por** conter um sistema biossensível composto por camadas automontadas (SAM) de aminoácido cisteína e nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx) ligados a vírus.
- 2) Nanobiodispositivo impedimétrico, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** ter o respectivo sistema biossensível ligado ao antígeno *zika* vírus (ZIKV) capaz de interagir com anticorpos reacionais à infecção pelo ZIKV.
- 3) Nanobiodispositivo impedimétrico, de acordo com as Reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelo** fato de apresentar uma plataforma nanoestruturada composta por SAM de cisteína ligados quimicamente às NpZnOx, servindo de suporte para imobilização de ZIKV, promovendo uma maior estabilidade ao sistema biossensível desenvolvido.
- 4) Nanobiodispositivo impedimétrico, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de utilizar a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) como técnicas fundamentais para o estudo das interfaces moleculares durante cada etapa de desenvolvimento do sistema biossensível.
- 5) Nanobiodispositivo impedimétrico, de acordo com as Reivindicações 1-3, **caracterizado por** ser capaz de interagir seletivamente com anticorpos monoclonais e policlonais anti-ZIKV.
- 6) Nanobiodispositivo impedimétrico, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** ser passível de miniaturização, devido à estabilidade fornecida pela organização molecular durante o processo de montagem do biossensor.

FIGURAS

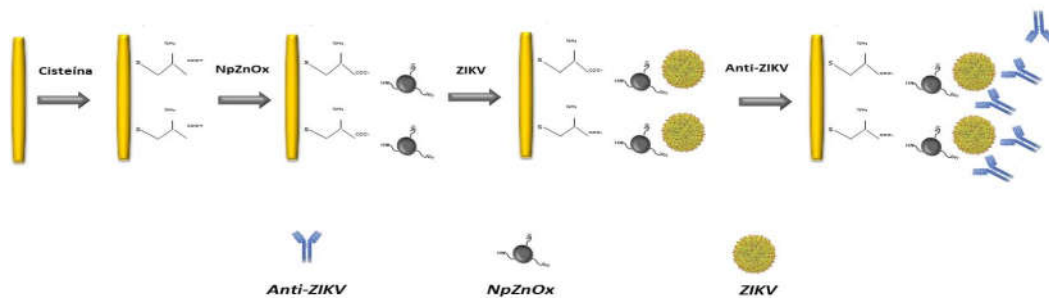


Figura 1

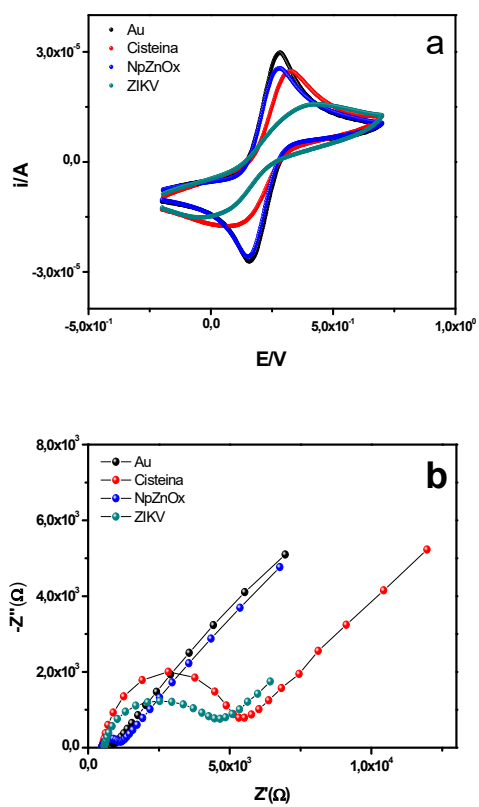


Figura 2

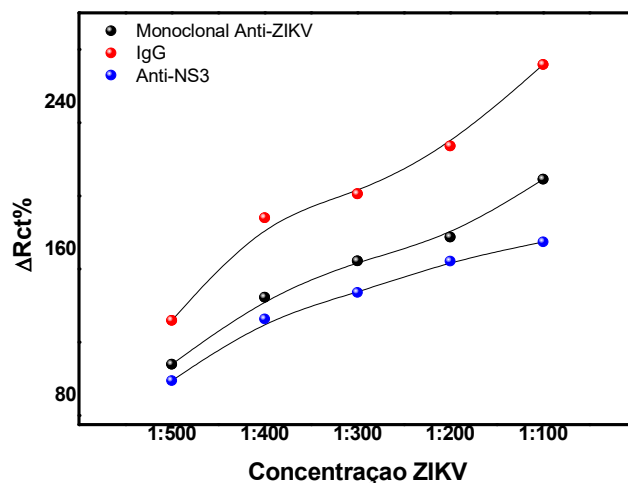


Figura 3

Invento	Biossensor	Técnica	Analito	Referência
Rapid zika virus detection using nano-enabled electrochemical sensing system	Nanopartículas metálicas + anticorpo	Eletroquímica	ZIKV	US 10.012.645 B2
Functionalized particles for label-free dna impedmetric biosensor for DNA and RNA sensing	Óxido de grafeno funcionalizado (APTES) + Primer	Eletroquímica	Dengue	US 2017 0107565 A1
Multiplexed immunoassay for detecting biomarkers of disease	Nitrocelulose + anticorpo + nanopartículas metálicas	Imunocromatografia	ZIKV e Dengue	US 2018 0372755 A1
Presente invento	Cisteína + NpZnOx + ZIKV	Eletroquímica	Anti-ZIKV	-

Figura 4

RESUMO

NANODISPOSITIVO IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS REACIONAIS PARA O VÍRUS *ZIKA*

O presente invento é resultado de uma metodologia simples, baseada na imobilização química de *zika* vírus (ZIKV) em uma plataforma nanoestruturada composta de cisteína e nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx). O nanodispositivo descreve a construção de um biossensor capaz de interagir com anticorpos anti-ZIKV, com o propósito de identificar o contato do organismo humano com ZIKV. Objetivando-se aprimorar a performance analítica dos eletrodos, a plataforma nanoestruturada foi caracterizada com a utilização de NpZnOx modificadas quimicamente, sendo baseada em uma monocamada automontada de cisteína, que serviu de suporte para as NpZnOx e posterior imobilização do ZIKV. Verifica-se a importância do uso desse nanomaterial para o desenvolvimento do biossensor, caracterizado pela excelente biocompatibilidade que otimiza os resultados obtidos com o processo de biointeração com o analito alvo. As técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica foram utilizadas durante todas as etapas de desenvolvimento do sensor, para caracterizar eletroquimicamente todos os processos de imobilização química e biológica. O sistema sensor proposto nesta patente é capaz de detectar anticorpos anti-ZIKV em paciente sensibilizados pelo ZIKV, apresentando-se como um sistema útil para identificar pacientes infectados pelo *zika*.