



* B R 1 0 2 0 2 2 0 0 1 6 7 6 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022001676-3 A2

(22) Data do Depósito: 28/01/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
08/08/2023

(54) **Título:** MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS FERROCENO- FUNCIONALIZADAS, USO DA MESMA, BIOSSENSORES

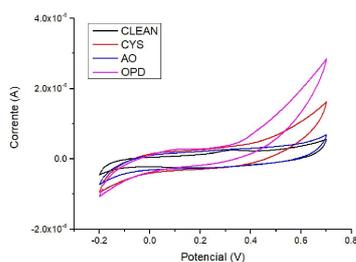
(51) **Int. Cl.:** C25B 3/00; G01N 27/414.

(52) **CPC:** C25B 3/00; G01N 27/414.

(71) **Depositante(es):** ROSA AMALIA FIREMAN DUTRA; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** ROSA AMALIA FIREMAN DUTRA; ANA CECILIA CRUZ DE BARROS.

(57) **Resumo:** MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS FERROCENOFUNCIONALIZADAS, USO DA MESMA, BIOSSENSORES. A presente invenção fornece a descrição de um filme eletrocatalítico constituído por monocamadas auto-organizadas funcionalizadas com ferroceno. O filme tem aplicação em sensores enzimáticos e de afinidade com a detecção do analito realizada com base nas alterações de correntes faradaicas resultantes da oxidação do ferroceno em um baixo potencial redox (0,15V), na interface eletrodo-eletrólito. A invenção tem aplicação em sensores eletroquímicos, sendo útil para aplicação em sensores amperométricos e voltamétricos para as medidas de corrente e sensores que se utilizam de transdutores de efeito de campo por íons eletivos (ISFET). O filme eletrocatalítico tem aplicação na identificação de diferentes analitos, em tempo real. A plataforma possui propriedade eletrocatalíticas que permite que sejam detectados à superfície sensora interações do tipo antígeno-anticorpo, lectina-carboidrato, análises moleculares e reações enzimáticas. A superfície eletrocatalítica pode ser montada sobre superfícies metálicas de ouro, ou qualquer outro metal, caracterizada por um filme auto-organizado de alcanotióis funcionalizado com ferroceno. Como prova-de-conceito, a plataforma sensora detectou proteína de soro bovino (BSA) sem a necessidade de utilização de sondas redox ou de anticorpos marcados, podendo ser aplicada a qualquer outro analito.



“MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS FERROCENO-FUNCIONALIZADAS, USO DA MESMA, BIOSENSORES”

[001] A presente invenção descreve o processo de obtenção de um filme eletrocatalítico baseado em monocamadas auto-organizadas funcionalizadas com derivados do ferroceno. **A presente inovação trata de filme eletrocatalítico na área de** eletroquímica e de materiais. A construção de filmes eletrocatalíticos compreende invenção para aplicação na área de energia em eletrocatalizadores, sensores e biossensores para o diagnóstico de analitos, proporcionando um incremento nos níveis de sensibilidade e especificidade com alcances superiores aos sensores já existentes, ou equiparados aos testes diagnósticos adotados pelos órgãos oficiais do governo para realização de prevenção, tratamentos e, também, inquérito epidemiológico como: Imunoensaio enzimático (ELISA), testes diagnósticos de doenças, pesticidas e diagnóstico molecular para interações de DNA-RNA, DNA-DNA.

[002] O Ferroceno (Fc) é um organometálico que pode sofrer oxidação ou redução, podendo apresentar excelentes propriedades eletroquímicas sob a coexistência de oxigênio dissolvido, sendo muito útil ao campo dos biossensores. A velocidade de reação percebida nos biossensores quando se usa o Fc é muito rápida, o que pode ter grande influência na sensibilidade analítica. Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em Fc, que é simples de operar, boa repetibilidade, alta sensibilidade e outros excelentes desempenhos de análise.

[003] A invenção visa resolver os problemas de operação complexa, baixa repetibilidade, na produção de monocamadas auto-organizadas ferroceno-funcionalizadas, um imunossensor eletroquímico estabelecido com base no sensor e aplicação do mesmo.

[004] O campo de biossensores constitui-se num dos mais crescentes em termos de inovação tecnológica, abrangendo uma taxa de crescimento global de 9,8% ao ano (período 2016 – 2022). Embora grandes avanços tenham sido alcançados no campo dos biossensores enzimáticos, permitindo a determinação segura de glicose e demais metabólitos baseados na reação enzima-substrato,

no campo dos biossensores para imunoenaios, imunossensores, os progressos têm sido desafiadores devido às dificuldades em se alcançarem os limites desejáveis de detecção, estabilidade nas respostas e seletividade confiável.

[005] De acordo com o tipo de interação analito-biorreceptor, os biossensores podem ser classificados em sensores catalíticos ou de afinidade. Particularmente, a interação antígeno-anticorpo envolve uma reação de afinidade, junção, ou seja, uma ligação estereoquímica decorrente de interações eletrostáticas ou de forças mais fracas (Van der Waals, Iônica, etc.). Neste caso, a interação antígeno-anticorpo não gera espécies eletroativas, ao contrário dos sensores catalíticos.

[006] Diferentes tipos de transdução podem ser empregados na conversão da resposta bioquímica de interação analito-biorreceptor (óptica; acústica; térmica; eletroquímica, podendo esta última ser do tipo amperométrica, potenciométrica, condutimétrica, impedimétrica; entre outras). Considerando-se a interação de afinidade, foram inicialmente desenvolvidos os imunossensores ópticos e os piezoelétricos desde a década de 90, que se baseiam, por exemplo, no fenômeno de ressonância de plásmons de superfície (SPR) para detectar a ligação antígeno-anticorpo através da mudança no índice de refração dos meios dielétricos, produzindo uma alteração no modo de propagação dos plásmons de superfície (Sunita Kumbhat and others, 'Surface Plasmon Resonance Based Immunosensor for Serological Diagnosis of Dengue Virus Infection', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52.2 (2010), 255–59); e no fenômeno da piezoelectricidade, por meio de sistemas de microbalança de cristal de quartzo (QCM) que medem alterações pela massa de anticorpos/antígenos adsorvida numa microbalança (Tzong-Zeng Wu and others, 'Piezoelectric Immunochip for the Detection of Dengue Fever in Viremia Phase', *Biosensors and Bioelectronics*, 21.5 (2005), 689–95); respectivamente.

[007] Embora tenham alcançados grandes avanços, e permitirem o monitoramento em tempo real da interação antígeno-anticorpo, os sensores por SPR e QCM não se tornaram sistemas portáteis (*point-of-care testings*), e difundidos como os glicosímetros devido a diversos fatores, dentre eles: o alto custo dos eletrodos de SPR e QCM comparados com as tiras lateral (de papel cromatográfico) ou os tipos de eletrodos impressos de tinta condutora dos

sensores de glicose que são descartáveis, serem técnicas que necessitam de grandes cuidados durante as medidas (por exemplo, requerem isolamento elétrico e mecânico-vibrações), não são facilmente operados em batelada (*batch*), além disso, eles são sistemas de difícil miniaturização, etc. Ainda hoje, somente a tecnologia de SPR vem sendo utilizada, porém em laboratórios, não sendo, portanto, uma tecnologia aprovada ou atrativa para as medidas *point-of-care*.

[008] Visando aproximar-se da tecnologia eletroquímica dos sensores de glicose, devido aos mesmos serem facilmente produzidos em massa, constituírem uma tecnologia muito lucrativa devido ao baixo custo dos tips que são de fácil escalonamento, muitas tentativas de produzir imunossensores à base de eletrodos impressos com transdução eletroquímica vêm constantemente sendo propostas. Entretanto, observa-se que até o presente estudo, não há tecnologia que seja similar em tempo, ausência de mediadores redox e transdução amperométrica que permita de fato, a detecção em tempo real de antígenos em amostras sangue total.

[009] Os glicosímetros constam, em geral, de um tip sensor acoplado a um leitor eletrônico que fornece o potencial elétrico necessário para a geração da corrente elétrica. Esta é decorrente de íons gerados da reação de oxido/redução da enzima glicose oxidase com o substrato que está presente na amostra. O sistema é portátil e o processamento é amigável, pois as unidades de correntes são convertidas digitalmente em escala numérica compreensível a um usuário não treinado. Os tips sensores constam de três eletrodos (típico de um sistema amperométrico) de tintas de carbono impressas em um substrato de baixo custo (polietilenotereftalato-PET, por exemplo) e curados para receber a enzima. Neste tip, onde ocorre a reação enzimática, há a adição de compostos químicos que facilitam a transferência eletrônica, como os mediadores químicos.

[010] Devido ao baixo custo, os tips são descartáveis e o sistema é facilmente portabilizado e hoje, muitos destes sistemas são acoplados a aplicativos de celulares. Nesse caso, tanto a tecnologia pode ser portátil quanto não-portátil, sendo esta última melhor adaptada a equipamentos laboratoriais, contando com a vantagem de dispensar os reagentes químicos. Além disso, os eletrodos podem ser reutilizados por muitas vezes, uma vez que há regeneração

da enzima, sendo também sistemas mais rápidos que os analisadores automatizados de glicose.

[011] Devido às inúmeras vantagens anteriormente citadas, muitas tentativas de empregar a tecnologia de eletrodos impressos (tips sensores) vêm sendo realizadas na detecção da interação antígeno-anticorpo. Uma das primeiras abordagens de transdução eletroquímica amperométrica foi a de utilizar imunoenaios tipo 'sanduíche', contendo uma enzima conjugada a um segundo anticorpo ou antígeno (anticorpo marcado), de modo que a geração de corrente ocorresse na presença do substrato específico. Conhecidos como imunossensores marcados, diversas abordagens foram propostas, alterando-se, por exemplo, o tipo de marcação conjugando as biomoléculas à peroxidase, fosfatase alcalina, nanopartículas de ouro, etc. (WO 20100173396; WO 20100203550; WO 2012166198). Entretanto, estes sistemas apresentam muitas limitações para uso *point-of-care* comparado com os sensores de glicose: não realizam a detecção em tempo real, pois são semelhantes aos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), são demorados no (mínimo 30 minutos) por requererem mais uma etapa bioquímica (reação com segundo anticorpo/antígeno conjugado), exigirem a adição do substrato enzimático para a geração do sinal, não podem empregar sangue sem anticoagulantes dado ao tempo, amostra precisa ser tratada; e necessitam possivelmente de um profissional especializado para manuseio. Portanto, pelas diversas razões mencionadas, não são práticos, rápidos e econômicos.

[012] Outras tentativas de uso de eletrodos impressos à base de transdução elétrica foram propostas, agora com a vantagem de realizar a detecção sem o uso de anticorpos ou antígenos marcados, porém com a limitação ainda de não se fazer a detecção em tempo real. Neste caso, as amostras de sangue ou fluidos biológicos incubados com os anticorpos ou antígenos imobilizados na superfície eletródica são enxaguadas (ou aspiradas) e substituídas por uma solução contendo uma sonda redox, por exemplo, de hexacianoferrato(II) de potássio para permitir a geração da corrente elétrica. Esta é produzida devido à presença de íons decorrentes da sonda redox em potenciais característicos de oxidação ou redução dessas espécies químicas. A

quantidade de anticorpos/antígenos é detectada pela redução da amplitude da corrente elétrica devido à natureza isolante das proteínas.

[013] Nesta abordagem foram descritos os imunossensores que empregam a técnica de espectroscopia de impedância elétrica (Juliana Cecchetto and others, *An Impedimetric Biosensor to Test Neat Serum for Dengue Diagnosis, Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015; Krongkaew Navakul and others, 'A Novel Method for Dengue Virus Detection and Antibody Screening Using a Graphene-Polymer Based Electrochemical Biosensor', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016; US 103472238), as técnicas amperométricas de voltametria de onda quadrada (D. Brondani and others, 'A Label-Free Electrochemical Immunosensor Based on an Ionic Organic Molecule and Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles for the Detection of Cardiac Troponin T', *Analyst*, 139.20 (2014).), de voltametria de pulso diferencial B.V.M. Silva and others, 'An Ultrasensitive Human Cardiac Troponin T Graphene Screen-Printed Electrode Based on Electropolymerized-Molecularly Imprinted Conducting Polymer', *Biosensors and Bioelectronics*, (2016), 77). e cronoamperometria (Jang-Zern Tsai and others, 'Screen-Printed Carbon Electrode-Based Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of Microalbuminuria', *Biosensors and Bioelectronics*, 77 (2016), 1175–82) .

[014] Até o presente momento, não existem sistemas eletroquímicos amperométricas que realizem a detecção da ligação antígeno-anticorpo sem a necessidade de utilização de sondas redox ou espécies eletroativas baseadas em filmes de ferroceno–funcionalizados e detecção em meio inerte eletroquimicamente.

O método de preparação da plataforma eletrocatalítica baseada no Fc compreende as seguintes etapas:

(1) preparação de filme eletrocatalítico de Ferroceno

[015] 2 μL de uma solução de cisteamina hidrocloreada (CYS) em meio alcoólico é depositada por drop casting em uma superfície de ouro previamente preparada e ativada. A interação molecular resulta em sua curva ótima após um período de 2 horas, em temperatura ambiente.

[016] As caracterizações das interações moleculares foram realizadas por meio de duas técnicas eletroanalíticas bastante utilizadas, voltametria cíclica e

voltametria de onda quadrada, devido ao baixo custo das análises e resultados capazes de mensurar quantidade de analito nas interações a nível molecular na superfície em estudo.

[017] O ácido oxálico (AO) é adicionado a monocamada após um processo de dos grupos carboxílicos, visando aumentar a eficiência e estabilidade da ligação amida resultante, via intermediários reativos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) cloridrato de carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). As soluções são preparadas separadamente e misturadas respeitando a estequiometria da reação, que ocorre em sistema fechado sob agitação por um período de 1 hora em temperatura ambiente. Após agregar o ácido oxálico devidamente preparado a monocamada de Au-S, o sistema é deixado em repouso por um período de 12 horas.

[018] O ortofenilenodiamida (OPD) é um composto fotossensível e deve ser manuseado com cuidado e abrigado da luz, a fim de evitar degradação precoce do material. O mesmo interage de forma mais rápida, 40 min, tornando-se mais estável e preparando a monocamada para receber o ferroceno.

[019] A solução de ferroceno em isopropanol aprimora a camada final do filme eletrocatalítico, tornando-o mais estável.

[020] Por fim, o filme é testado frente a proteína de albumina de soro bovino (BSA) como prova conceito. Neste caso, o eletrodo foi incubado com uma solução tamponada de PBS pH 7,4 contendo 0,1 mg/mL de BSA. Após a incubação de 30 min em temperatura ambiente e lavagem em água, as leituras foram processadas.

[021] Com o intuito de utilizar-se do filme produzido em configuração FET, transistor de efeito de campo. O sistema eletroquímico tri-eletrodo é conectado a *probe station* por meio dos terminais fonte, porta e dreno aos eletrodos de trabalho, referência e contra, respectivamente.

[022] A caracterização da superfície na configuração FET é realizada com o auxílio de um equipamento de medição eletrônica com unidade de alimentação e precisão (KEYSIGHT B2902A), aplicando-se uma variação linear com os seguintes parâmetros: -0,2 a 1,5 V; contagem de 300 degraus. A resultante desse experimento mostra que o sistema de geração de espécies eletroativas está baseado na oxidação do ferroceno. O sistema eletrocatalítico de difusão

das espécies à superfície sensora tem a sua taxa de fluxo bloqueada pela adsorção de filmes resistivo, por exemplo de camadas de proteínas, indicando sua aplicação em imunossensores, em que a resposta é uma reação de imunoafinidade com adsorção de antígenos ou anticorpos à superfície sensora aos anticorpos ou antígenos imobilizados. Desta forma, a prova de conceito pode ser aplicada também em configurações com transistores de efeito de campo, transistores de efeito de campo íons seletivos operando no modo corrente, e sensores eletroquímicos trí-eletródicos para detecção de analitos.

- Nas **figuras 1 e 2**, os voltamogramas cíclico e de onda quadrada mostram a mudança de corrente nas seguintes condições: (CLEAN) da superfície de Au preparada e ativada; (Cys) a deposição da monocamada auto-organizada Au-S; (AO) a ligação amida; (OPD)

- Nas **figuras 3 e 4**, apresenta-se o sistema em sua etapa final o filme eletrocatalítico, comparando os perfis em cada etapa, por meio dos voltamogramas cíclicos e de onda quadrada. Neste, observa-se uma ampliação significativa do sinal com pico catódico em 0,345 V e amplitude de 6,130 μA caracterizando a redução dos íons na interface eletrodo/eletrólito, o pico anódico se encontra em 0,196 V e amplitude negativa em 5,063 μA com características de oxidação desses íons. Dessa forma, fica evidenciado na apresentação gráfica por meio dos sinais descritos o filme eletrocatalítico ferroceno-funcionalizado.

- A **figura 5**, a prova conceito em presença de uma proteína comercial o BSA.

- A **figura 6**, mostra curva de variação de potencial versus corrente na qual observa-se a geração de corrente eletrocatalítica a partir de potencial de 0,82 V representando a corrente gerada na superfície eletródica.

REIVINDICAÇÕES

1. “MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS FERROCENO-FUNCIONALIZADAS, USO DA MESMA, BIOCENSORES” constituída por uma plataforma sensora em que a leitura é caracterizado pela possibilidade de realizar as medidas em tempo real, sem a utilização de sondas redox ou anticorpos conjugados.

2. A presente invenção, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizada por sua capacidade de, a partir de uma superfície modificada por um filme de monocamadas auto-organizadas ferroceno-funcionalizadas, ser capaz de detectar a interação antígeno-anticorpo de modo quali e quantitativamente, podendo ser aplicado a qualquer interação receptor-analito compreendendo espécies de DNA-RNA, DNA-RNA, lectina-carboidrato, anticorpo-pesticida e outras interações.

3. “MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS FERROCENO-FUNCIONALIZADAS, USO DA MESMA, BIOCENSORES” contendo filme modificado ferroceno, processo caracterizado por permitir a intensificação das propriedades condutoras e capacitivas para detecção por meio de sistema eletroquímico amperométrico.

4. O tipo sensor, de acordo com a reivindicação 2, é caracterizado por sua possibilidade de compatibilidade com a tecnologia de eletrodos de glicose podendo ser utilizado para uma gama de heterogeneidade tanto de sensores como de biossensores.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por permitir a obtenção de filme eletrocatalítico com intensificação das propriedades condutoras, baseado no uso ortofenilendiamina, sejam ferroceno amino ou não funcionalizados.

6. Processo, de acordo com reivindicação 5, caracterizado por utilizar proporções de alcanotóis, O-Fenilendiamina, ferroceno e em função do sensor ou biossensor desejado, podendo a condutividade elétrica ser controlada pela escolha desta proporção;

7. Processo, de acordo com reivindicação 2, caracterizado por obter uma superfície eletrocatalítica que quando empregada como plataforma sensora

aumenta consideravelmente a sensibilidade e seletividade do sensor ou biossensor, implicando em limites de detecção baixos.

DESENHOS

Figura 1

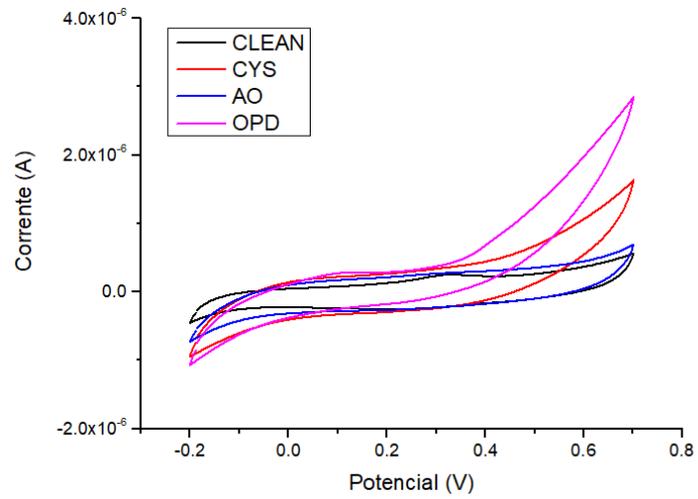


Figura 2

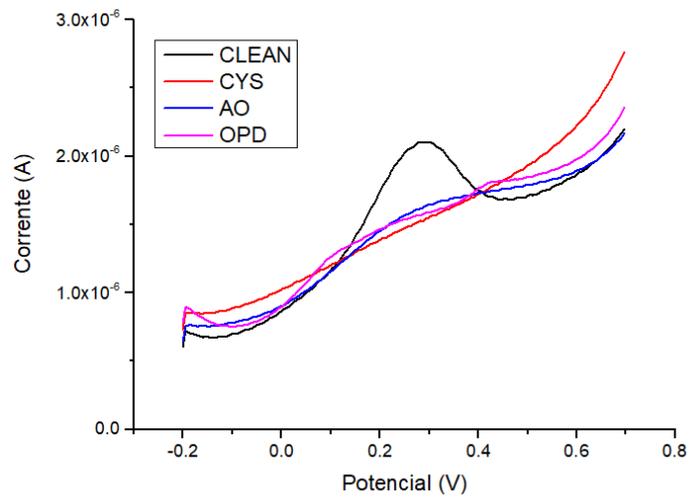


Figura 3

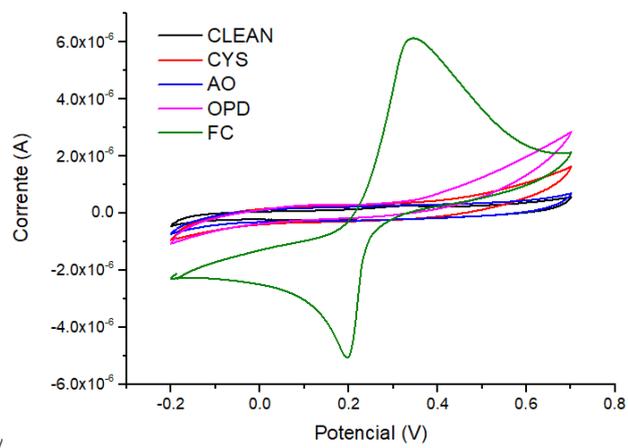


Figura 4

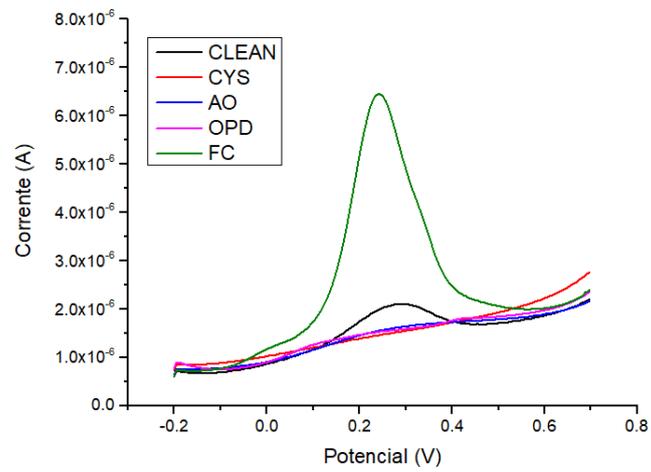


Figura 5

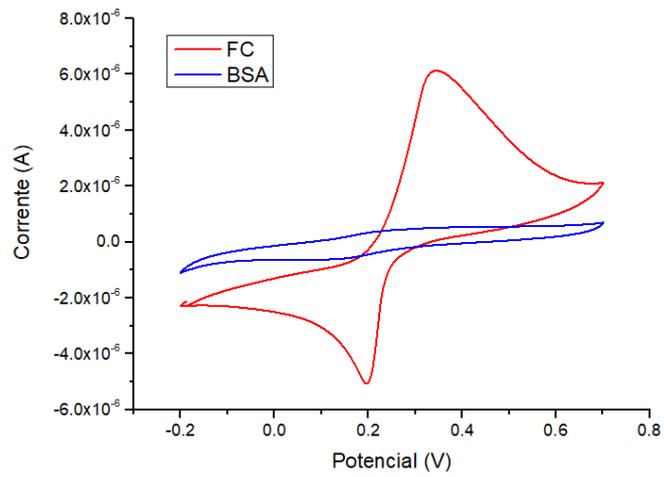
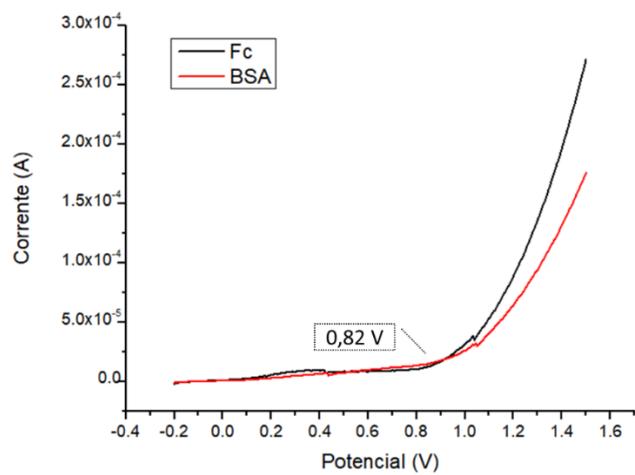


Figura 6



RESUMO**“MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS FERROCENO-FUNCIONALIZADAS, USO DA MESMA, BIOCENSORES”**

A presente invenção fornece a descrição de um filme eletrocatalítico constituído por monocamadas auto-organizadas funcionalizadas com ferroceno. O filme tem aplicação em sensores enzimáticos e de afinidade com a detecção do analito realizada com base nas alterações de correntes faradaicas resultantes da oxidação do ferroceno em um baixo potencial redox (0,15V), na interface eletrodo-eletrólito. A invenção tem aplicação em sensores eletroquímicos, sendo útil para aplicação em sensores amperométricos e voltamétricos para as medidas de corrente e sensores que se utilizam de transdutores de efeito de campo por íons eletivos (ISFET). O filme eletrocatalítico tem aplicação na identificação diferentes analitos, em tempo real. A plataforma possui propriedade eletrocatalíticas que permite que sejam detectados à superfície sensora interações do tipo antígeno-anticorpo, lectina-carboidrato, análises moleculares e reações enzimáticas. A superfície eletrocatalítica pode ser montada sobre superfícies metálicas de ouro, ou qualquer outro metal, caracterizada por um filme auto-organizado de alcanotóis funcionalizado com ferroceno. Como prova-de-conceito, a plataforma sensora detectou proteína de soro bovino (BSA) sem a necessidade de utilização de sondas redox ou de anticorpos marcados, podendo ser aplicada a qualquer outro analito.