

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

(21) **PI0705295-2 A2**



(22) Data de Depósito: 22/11/2007
(43) Data da Publicação: 21/07/2009
(RPI 2011)

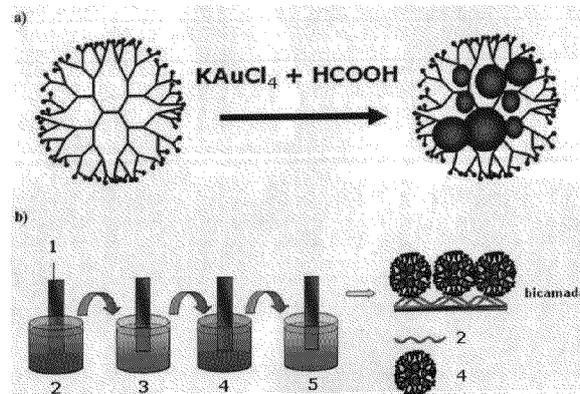
(51) *Int.Cl.*:
H01M 2/16 (2009.01)
B82B 3/00 (2009.01)

(54) Título: **MEMBRANAS ELETROATIVAS NANOESTRUTURADAS (MEN), PROCESSO DE PREPARO DAS MESMAS E DISPOSITIVOS CONTENDO AS MESMAS**

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -USP

(72) Inventor(es): Christopher M. A. Brett., Frank Nelson Crespilho, Osvaldo Novais de Oliveira Junior, Valtencir Zucolotto

(57) Resumo: MEMBRANAS ELETROATIVAS NANOESTRUTURADAS (MEN), PROCESSO DE PREPARO DAS MESMAS E DISPOSITIVOS CONTENDO AS MESMAS. A presente invenção pertence ao campo das membranas contendo mediadores redox. Em especial, a membrana da presente invenção é uma membrana nanoestruturada contendo mediadores redox ao redor de nanopartículas metálicas. As nanopartículas metálicas são inicialmente sintetizadas utilizando dendrímeros, depositadas em substratos sólidos e depositadas com mediadores redox. As membranas da invenção são obtidas por processo de auto-montagem e podem ser aplicadas em diversas áreas da ciência e da indústria nas quais mediadores redox são necessários, tais como na obtenção de sensores e biossensores.





PI0705295-2

Relatório Descritivo

MEMBRANAS ELETROATIVAS NANOESTRUTURADAS (MEN), PROCESSO
DE PREPARO DAS MESMAS E DISPOSITIVOS CONTENDO AS MESMAS

5

Campo da Invenção

A presente invenção pertence ao campo das membranas contendo mediadores redox. Em especial, a membrana da presente invenção é uma membrana nanoestruturada contendo mediadores redox ao redor de nanopartículas metálicas. As nanopartículas metálicas são inicialmente sintetizadas utilizando dendrímeros, depositadas em substratos sólidos e depositadas com mediadores redox. As membranas da invenção são obtidas por processo de auto-montagem e podem ser aplicadas em diversas áreas da ciência e da indústria nas quais mediadores redox são necessários, tais como na obtenção de sensores e biossensores.

15

Antecedentes da Invenção

Pesquisas relacionadas à modificação da superfície de eletrodos sólidos objetivam estabelecer condições nas quais a velocidade da transferência heterogênea de carga para certas espécies químicas seja aumentada. A idéia envolve a imobilização de mediadores apropriados na superfície do eletrodo de forma que o processo eletroquímico ocorra com menor sobrepotencial. Neste sentido, a interação química entre a espécie imobilizada e o substrato exerce papel preponderante no mecanismo catalítico. Um eletrodo modificado é geralmente preparado para funcionar num processo dinâmico no qual camadas imobilizadas reduzem perdas de energia (no caso de conversores de energia), melhoram a seletividade e eventualmente a sensibilidade em sensores analíticos ou ainda atuam como inibidores de processos de corrosão.

20

25

A modificação da superfície de eletrodos com propósitos analíticos apresenta uma série de vantagens, por exemplo:

30

- a) permitir a estabilidade química e mecânica do filme,

características básicas para garantir a durabilidade do sensor e reprodutibilidade dos experimentos;

b) emprego de matrizes que permitam a imobilização de uma ou mais espécies catalíticas;

5 c) larga faixa dinâmica de trabalho, com resposta linear em função da concentração do substrato/analito;

d) correntes relativamente baixas e estáveis na ausência do substrato em faixa larga de potencial;

e) compatibilidade com meios orgânicos e aquosos;

10 f) facilidade de preparação de maneira reprodutível;

g) sensibilidade (devido à melhoria na eficiência na etapa de transferência de elétrons) e seletividade de resposta no que se refere ao substrato investigado;

15 h) viabilidade de acoplamento a técnicas complementares (espectroscópicas ou de separação); e

i) uso em sistemas biológicos para medições *in situ*.

Os sistemas tradicionais de preparação de mediadores redox imobilizados em substratos condutores utilizam dois possíveis caminhos de obtenção: o primeiro por meio de síntese química e o segundo por eletrodeposição. Na eletrodeposição, o mediador redox é imobilizado ou pela aplicação de um potencial constante em um eletrodo de trabalho (substrato) ou pela aplicação de vários ciclos voltamétricos, pela técnica de Voltametria Cíclica.

20 Como o próprio nome diz, os mediadores redox são compostos que atuam como auxiliar na transferência de elétrons. Por exemplo, os hexacianoferratos de metais de transição (MHCF) são uma importante classe de compostos de valência mista com propriedades de oxi-redução. Quando depositados na superfície de eletrodos sob a forma de filmes finos atuam como mediadores redox que facilitam a transferência de elétrons.

30 Os eletrodos modificados com mediadores possuem aplicações em diversas áreas como eletroanálise, eletrocatalise, estudos de troca iônica e

transferência de elétrons. Apesar de haver vários mediadores redox para modificação de eletrodos, os MHCs sólidos têm atraído atenção, uma vez que as reações redox podem ocorrer sem a dissolução do composto sólido adsorvido ao eletrodo.

5 Dependendo das condições de síntese, são obtidos filmes com diferentes espessuras. Um dos setores que utilizam mediadores redox é a indústria farmacêutica, com a fabricação de eletrodos enzimáticos amperométricos com mediadores redox. Pode-se citar, por exemplo, os eletrodos que funcionam como sensores de glicose no sangue e são utilizados
10 em casos de controle da concentração dessa molécula no organismo humano.

Um dos problemas mais conhecidos na área de sensores enzimáticos é a estabilidade desses mediadores em água e na presença de outros compostos iônicos em solução. Outro fator importante é preparar um sistema com mediadores redox que seja biocompatível, pois em biossensores a enzima
15 é imobilizada após uma camada muito fina de mediadores redox e nem sempre as moléculas biológicas mantêm sua atividade em contato com os mediadores.

Para contornar os problemas oriundos do uso da técnica acima descrita, outros processos têm sido desenvolvidos, incluindo sistemas nanoestruturados. Um exemplo é a preparação de nanopartículas de mediadores redox em
20 solução e subsequentemente sua imobilização em eletrodo. Por algum motivo, o uso de mediadores redox em nanopartículas parece ter melhor desempenho do que fora das nanopartículas. Para realizar a imobilização, a técnica de automontagem ou *layer-by-layer* (LBL) apresenta diversas vantagens. A principal vantagem é a simplicidade dos aparatos experimentais utilizados na
25 fabricação dos filmes.

A princípio, a técnica pode ser utilizada para o recobrimento de superfícies de qualquer forma ou tamanho. Inicialmente descrita por Sagiv e colaboradores no início da década de 1980, a técnica foi aplicada à construção de sistemas denominados multicamadas, baseada em interações químicas
30 (geralmente ligações covalentes) entre as camadas depositadas. Este processo, embora ainda utilizado, apresenta desvantagens como a

necessidade de síntese de moléculas com funcionalidades específicas para a construção das camadas, que é forte limitante do método. Para superar essas limitações, Decher e colaboradores propuseram no documento US 5,208,111 um novo método de obtenção de filmes finos por automontagem. Ao invés da adsorção química entre as camadas, a técnica descrita por Decher baseia-se em interações físicas (eletrostáticas) de camadas com cargas de sentido contrário. Desta forma, podem-se adsorver alternadamente polieletrólitos aniônicos e catiônicos sobre substratos sólidos (ver Figura 5). Ao contrário da técnica de Sagiv, nenhuma ligação covalente precisa ser formada na construção das bicamadas. Um substrato sólido, por exemplo, é imerso na solução catiônica, de maneira que uma camada do polycation adsorva na superfície do substrato. Em seguida, o substrato é imerso na solução aniônica, promovendo a adsorção do poliânion na camada previamente adsorvida de polycation. Obtém-se assim uma bicamada, sendo que a repetição do processo permite a fabricação de filmes finos compostos por quantas camadas forem desejadas.

O potencial de aplicação da técnica de automontagem pode ser ilustrado pela variedade dos tipos de materiais empregados. Por exemplo, podem ser usados polímeros com corantes, materiais biológicos, materiais cerâmicos, dendrímeros, polieletrólitos orgânicos e outros.

Diante destes fatos, os inventores da presente invenção procuraram desenvolver um sistema que apresentasse melhor condução do sinal gerado na membrana do sensor até o sistema de detecção do sinal e apresentasse maior estabilidade quando em ambiente aquoso ou em ambiente contendo outros íons como, por exemplo, o plasma humano ou animal. Os inventores da presente invenção consideraram então, que o desenvolvimento de uma membrana contendo nanopartículas dendriméricas sobre as quais são depositados mediadores redox e sobre as quais pode-se depositar uma proteína de detecção proporcionaria um sistema de melhor condução de sinal e de maior estabilidade.

Um novo e melhorado biossensor de glicose foi desenvolvido usando eletrodos de vidro cobertos com ITO modificados com 3 bicamadas de (PVS/PAMAM-Au) automontados em um eletrodo suporte. A eletrodeposição de hexacianoferrato de cobalto nas partículas de ouro levou à determinação bem-sucedida de peróxido de hidrogênio em potenciais baixos enquanto outros compostos tiveram menor eletroatividade. Após a otimização da imobilização da glicose oxidase na superfície do eletrodo, a glicose foi determinada no modo amperométrico. O biossensor mostrou resposta linear acima de 100 μM de glicose com um limite de detecção (3s) de 5,5 μM .

Um estudo com interferentes indicou que o biossensor é seletivo para detectar glicose em amostras naturais. Além disso, o biossensor teve uma boa estabilidade operacional e de estocagem, abrindo excelentes perspectivas futuras para biossensores eletroquímicos construídos usando esta estratégia de modificação de auto-montagem.

A literatura patentária revela vários exemplos de biossensores, dos quais destacamos os mais relevantes.

O documento US 7,138,121 mostra um biossensor que compreende o uso de um dendrímero. No referido documento, o dendrímero preferencialmente possui três "braços": 2 para ligação no substrato e 1 para ligação da molécula de reconhecimento da molécula-alvo. Especificamente, este dendrímero compreende um núcleo formado por uma molécula que contém 1 ou mais anéis tais como cicloalquil, aril, ou estruturas multi-anéis que contém estes anéis, e em uma composição preferencial, compreende pelo menos um polímero hidrofílico como o polietileno-glicol. Diferentemente da presente invenção, no referido documento é preferencialmente utilizado um dendrímero que possua uma estrutura de ligação ao substrato a qual dependerá da estrutura do substrato. Diferentemente da presente invenção, o substrato a ser utilizado no referido documento é escolhido do grupo que compreende metais, carbono, sílica, vidro, vidro funcionalizado, plástico, sílica, ou materiais à base de sílica ou celulose e não necessariamente deve apresentar características de condução de corrente elétrica. Numa composição

preferencial desta invenção, o substrato utilizado é ouro e o dendrímero possui um grupamento tiol que viabiliza a ligação ao substrato. Diferentemente da presente invenção, no referido documento não se pressupõe a deposição de uma camada de polímero no substrato e propõe ainda a deposição de apenas 1 camada de dendrímero enquanto na presente invenção, várias camadas alternadas de dendrímero e polímero são propostas. Diferentemente da presente invenção, o referido documento não descreve uma etapa de deposição de mediadores redox como proposto na presente invenção e nem a sua execução seria óbvia a partir deste documento.

10 O documento US 2007/0224652 revela um método direcionado à determinação de tipo sanguíneo, cujo sistema baseia-se no contato entre uma amostra de plasma humano e uma superfície aderida com microesferas de látex. Aderidas à essas microesferas, estão os antígenos correspondentes à cada tipo sanguíneo. A informação da ligação do anticorpo ao antígeno é transmitida à um sistema de detecção. Entretanto, diferentemente da presente invenção, no referido documento não são utilizados dendrímeros, metais, nem qualquer mediador redox.

20 O documento US 7,109,271 revela um sensor sob o qual são depositadas várias moléculas de polímeros hidrofóbicos e sob estes, várias moléculas de polímeros hidrofílicos. Sobre estas, são depositadas mediadores redox. Os polímeros hidrofóbicos utilizados na presente invenção são monômeros de metil-metacrilatos, os polímeros hidrofílicos são N-vinilpirrolidinona (N/P) e os mediadores redox são ferrocenos. Entretanto, diferentemente da presente invenção, no referido documento não são utilizados dendrímeros ou qualquer tipo de metal.

25 O documento WO 2007/121111 mostra um biossensor para a detecção de glicose cujo eletrodo compreende uma enzima com atividade oxidação/redução, e 2 mediadores de elétrons. Porém, diferentemente da presente invenção, este documento não cita o uso de dendrímeros, polímeros e nem o seu uso seria óbvio.

30 O documento WO 2007/078315 descreve um biossensor ou um

dispositivo bioeletrônico que compreende um substrato tratado sob o qual são depositadas enzimas dependentes de NADP^+ usando um polímero para a transferência de elétron. Entretanto, diferentemente da presente invenção, não há menção quanto ao uso de dendrímeros.

5 O documento US 7,109,271 revela um sensor sob o qual são depositados polímeros hidrofóbicos, hidrofílicos e mediadores redox. Especificamente, os polímeros hidrofóbicos que recobrem o eletrodo são polímeros redox que tem a propriedade de evitar que o mediador redox se desprenda do eletrodo e permaneça em solução na vizinhança do eletrodo.
10 Esta camada de polímero compreende um polímero hidrofóbico e "braços de polímeros hidrofílicos anexados ao polímero hidrofóbico. Neste documento não há menção quanto ao uso de dendrímeros como proposto na presente invenção e nem o seu uso seria óbvio.

O documento US 5,089,112 revela um biossensor que compreende um
15 polímero sob o qual é depositado um mediador redox. Especificamente, o polímero utilizado é um polímero flexível que permite a ligação de moléculas mediadoras que formam o complexo receptor/doador de elétrons. Opcionalmente, este biossensor pode conter uma enzima. Diferentemente da presente invenção, no referido documento não são utilizados dendrímeros nem
20 o seu uso seria óbvio aos versados na técnica.

Objetos da Invenção

É um objeto da presente invenção proporcionar uma membrana nanoestruturada compreendendo um substrato sólido condutor ou semi-
25 condutor compreendendo, em sua superfície, mediadores redox e nanopartículas metálicas e opcionalmente moléculas de reconhecimento, aderidas através de um polímero de adesão.

Em uma realização preferencial, as nanopartículas metálicas são compostas de Au e são estabilizadas nas cavidades de dendrímeros, em
30 especial feitos de PAMAM; os mediadores redox são preferencialmente hexacianoferrato de cobalto e/ou ferro.

É um adicional objeto da presente invenção um processo de síntese das membranas nanoestruturadas compreendendo um substrato sólido condutor ou semi-condutor compreendendo, em sua superfície, mediadores redox e nanopartículas metálicas e opcionalmente moléculas de reconhecimento compreendendo as etapas de:

a) recobrir o substrato condutor ou semi-condutor com uma camada de um polímero de adesão;

b) aderir ao substrato condutor ou semi-condutor nanopartículas metálicas, onde essas nanopartículas metálicas estão localizadas nas cavidades de um dendrímero.

c) aderir ao substrato condutor ou semi-condutor do item b) mediadores redox.

d) opcionalmente, aderir ao substrato condutor ou semi-condutor do item c) moléculas de reconhecimento.

É um adicional objeto da presente invenção um dispositivo compreendendo uma membrana nanoestruturada, a qual compreende um substrato sólido condutor ou semi-condutor compreendendo, em sua superfície, mediadores redox e nanopartículas metálicas e opcionalmente enzimas, aderidas através de um polímero de adesão. Tal dispositivo pode ser utilizado em sensores de diferentes formas ou tamanhos e em diferentes tipos de sensores tais como em biossensores, sensores para eletroanálise, eletrocatalise, estudos de troca iônica e transferência de elétrons e/ou quaisquer outros tipos de dispositivos eletrônicos que envolvam a transmissão de corrente elétrica.

Breve Descrição das Figuras

A **Figura 1** apresenta a coloração das soluções. A Fig. 1a apresenta a coloração da solução de KAuCl_4 . A Fig. 1b apresenta a coloração das nanopartículas de ouro após serem preparadas pelo método descrito na presente invenção.

A **Figura 2** apresenta a imagem das nanopartículas formadas obtida por

microscopia eletrônica de transmissão.

A **Figura 3** apresenta a fotografia do filme formado no substrato de ITO.

A **Figura 4** mostra uma representação esquemática de todo o processo de síntese dos filmes automontados compreendendo PVS e PAMAM-Au: a) formação de PAMAM-Au, b) deposição sequencial das multicamadas do filme automontado pela imersão do substrato (1) alternadamente nas soluções de PVS (2) e PAMAM-Au (4) por 5 minutos. Antes de cada etapa de deposição, o excesso de moléculas não adsorvidas foi removido pela imersão do substrato em água (3 e 5).

A **Figura 5** apresenta o processo de automontagem esquematizado. O item 1 representa o substrato de ITO. O passo 2 apresenta a etapa de deposição da nanopartículas. O passo 3 apresenta a etapa de imersão do substrato em água para a remoção de nanopartículas em excesso, fracamente adsorvidas. O passo 4 apresenta a etapa de deposição do polieletrólito negativo. O passo 5 apresenta a etapa de imersão do substrato em água para a remoção de polieletrólito negativo em excesso, fracamente adsorvido.

A **Figura 6** apresenta um voltamograma cíclico indicando a formação do mediador azul da Prússia em volta das nanopartículas.

A **Figura 7A** mostra a espectroscopia UV-Vis antes e depois da formação da nanopartícula de ouro dentro das moléculas de PAMAM. O detalhe mostra a absorbância a 550 nm para vários tempos de reação. b) imagem em campo claro (bright-field) de nanopartículas de Au.

A **Figura 8** mostra a varredura linear de ITO-(PVS/PAMAM-Au)_n com diferentes números de bicamadas ($n=1, 2, \text{ and } 3$). No destaque, voltamogramas cíclicos de ITO-(PVS/PAMAM-Au)_n; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹. Solução de eletrólito 0.5 mol L⁻¹ H₂SO₄.

A **Figura 9** mostra a micrografia eletrônica (SEM) obtida por microscopia eletrônica de emissão de campo (FE-SEM at 2 kV) para a), b) Filme cast PAMAM-Au e c), d) filmes automontados de 1-bicamada PVS/PAMAM-Au

A **Figura 10** mostra os voltamogramas cíclicos mostrando o crescimento contínuo de eletrodos de a) FeHCF, b) NiHCF, c) CoHCF, and d) CuHCF on ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃

5 A **Figura 11** mostra os voltamogramas cíclicos de eletrodos modificados de a) FeHCF, b) NiHCF, c) CoHCF, e d) CuHCF em 0.1 M KPB (pH 6.75) a diferentes velocidades de scan.

A **Figura 12** mostra o espectro complexo da impedância para 3 bicamadas PVS/PAMAM antes (— & —) e após (—*—) a eletrodeposição do mediador redox. Potencial de circuito aberto de a) FeHCF, b) NiHCF, c) 10 CoHCF, e d) CuHCF, variação de frequência de 65 kHz a 0.1 Hz.

A **Figura 13** mostra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados de a) FeHCF, b) NiHCF, c) CoHCF, e d) CuHCF em 0.1 M KPB (pH 6.75) (linha cheia) e após a adição de 1 mmol L⁻¹ H₂O₂ (linha pontilhada) e 5 mmol L⁻¹ H₂O₂ (linha tracejada).

15 A **Figura 14** mostra um esquema da ligação cruzada entre PAMAM e o sistema BSA/GOx usando glutaraldeído.

A **Figura 15** mostra em (a) as imagens topográficas 3D de AFM de ITO e ITO-(PVS/PAMAM-Au)_n (n=1,2,3) e em (b) imagens topográficas de AFM de ITO-(PVS/PAMAM-Au)₂.

20 A **Figura 16** mostra em (a) os voltamogramas cíclicos mostrando crescimento contínuo de CoHCF em eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃ e dependência do pico das correntes anódicas e catódicas no número de ciclos. Em (b) a dependência das correntes de picos catódicos e anódicos na raiz quadrada da velocidade de varredura para o eletrodo ITO-(PVS/PAMAM- 25 Au)₃@CoHCF em 0.1 M NaPBS (pH 7.0).

A **Figura 17** mostra o espectro da impedância complexa plana para eletrodo a 0.0 V vs. SCE em 0.1 M NaPBS, pH 7.0 de (a) eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃ antes (-□-) e após (-○-) CoHCF a eletrodeposição; (b) ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx na ausência (-□-) e presença (-○-) de 30 glicose. Variação de frequência: 65 kHz a 0.1 Hz.

A **Figura 18** mostra as curvas de resposta de glicose de eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx preparados com 20 mg mL⁻¹ BSA, 50 mg mL⁻¹ GOx e 25 % GA por mergulho (a) e gotejamento (b) usando (■) 1 bicamada; (▲) 2 bicamadas; (●) 3 bicamadas de (PVS/PAMAM-Au) em 0.1 M NaPBS (pH 7.0). Potencial aplicado 0.0 V vs. SCE.

A **Figura 19** mostra as curvas de resposta da glicose em eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-Gox obtido por (▼) mergulho e (*) gotejamento em 0.1 M NaPBS (pH 7.0). Potencial aplicado 0.0 V vs. SCE. Detalhe: plote cronoamperométrico.

A **Figura 20** mostra as curvas de resposta da glicose em eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx em 0.1 M NaPBS (pH 7.0) a 0.0 V vs. SCE usando (a) diferentes concentrações de GOx: (●) 10; (■) 20; (▲) 50 mg mL⁻¹ with 20 mg mL⁻¹ BSA e (b) diferentes concentrações de BSA: (▲) 20; (*) 50; (■) 100 mg mL⁻¹ com 50 mg mL⁻¹ GOx. 2.5 % GA foram usados em todos os casos.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos mostrados a seguir não tem o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de apenas exemplificar uma maneira preferida de realizar a invenção. Métodos semelhantes que produzam resultados equivalentes são também objeto da presente invenção.

Substrato Sólido Condutor ou Semi-Condutor

O substrato sólido condutor ou semi-condutor é preferencialmente escolhido do grupo que compreende, sem contudo se limitar a, vidro recoberto com ITO (vidro recoberto com filme de óxido de estanho e índio), metais como ferro, prata, cobre, níquel, ouro, molibdênio, tungstênio, platina, titânio, alumínio, paládio, zinco, manganês, nióbio, zircônio, escândio, vanádio, cromo, cobalto, ítrio, molibdênio, tecnécio, rutênio, ródio, cádmio, ósmio, irídio, índio, gálio, tálio, estanho, germânio, outros metais, óxidos de metais tais como óxido de ferro, óxido de prata, óxido de cobre, óxido de níquel, óxido de ouro, óxido

de molibdênio, óxido de tungstênio, óxido de platina, óxido de titânio, óxido de alumínio, óxido de paládio, óxido de zinco, óxido de manganês, óxido de nióbio, óxido de zircônio, óxido de escândio, óxido de vanádio, óxido de crômio, óxido de cobalto, óxido de ítrio, óxido de molibdênio, óxido de tecnécio, óxido de rutênio, óxido de ródio, óxido de cádmio, óxido de ósmio, óxido de irídio, óxido de índio, óxido de gálio, óxido de tálio, óxido de estanho, óxido de germânio, óxidos de outros metais, cerâmicas industriais, vidro, carbono, semelhantes.

Em especial, o substrato sólido condutor utilizado na presente invenção é o substrato condutor ITO que compreende vidro recoberto com filme de óxido de estanho e índio.

Polímero de Adesão

O polímero de adesão é preferencialmente escolhido do grupo que compreende, sem contudo limitar, os polímeros sintéticos tais como polietileno, poliestireno, ácido polivinilsulfonado (PVS) polietilenoglicol, polipropileno, poliuretano, poliolefinas, poliacrilamida, poliuretano, peptidoglicano, neoprene, poliéster, policarbonato, teflon, poli acetato, poli cloreto de vinila (PVC), politereftalato de etila (PET), polianilina, semelhantes e/ou combinações dos mesmos.

Em especial, a presente invenção utiliza como polímero o ácido polivinilsulfonado (PVS).

Nanopartículas Estruturadas

As nanopartículas estruturadas são, em sua essência, nanopartículas de um metal o qual está depositado na cavidade de um dendrímero.

O metal a ser depositado na cavidade é um metal de transição, e está inicialmente na forma de um sal, com estado de valência maior que zero. Tal sal é escolhido do grupo que compreende, sem contudo limitar, os sais de prata, sais de cobre, sais de níquel, sais de ouro, sais de molibdênio, sais de tungstênio, sais de platina, sais de titânio, sais de paládio, sais de zinco, sais de manganês, sais de nióbio, sais de zircônio, sais de escândio, sais de

vanádio, sais de cromo, sais de cobalto, sais de ítrio, sais de tecnécio, sais de rutênio, sais de ródio, sais de cádmio, sais de ósmio, sais de irídio, sais de índio, sais de gálio, sais de tálio, sais de estanho, sais de germânio, bem como sais de outros metais e/ou combinações dos mesmos. Em especial, a presente invenção utiliza um sal de ouro, em especial o KAuCl_4 .

O dendrímero é escolhido do grupo que compreende, sem contudo limitar, os dendrímeros de PAMAM, polipropilenoimina, polietileno, poliestireno, ácido polivinilsulfonado (PVS) polietilenoglicol, polipropileno, poliuretano, poliolefinas, poliacrilamida, poliuretano, peptidoglicano, neoprene, poliéster, policarbonato, teflon, poliacetato, poli cloreto de vinila (PVC), politereftalato de etila (PET), polianilina e os dendrímeros obtidos a partir de pelo menos 2 moléculas estruturalmente diferentes e/ou combinações dos mesmos, onde o número de gerações varia de 1 a 24 gerações. Em especial, a presente invenção utiliza dendrímeros PAMAM com aproximadamente 4 gerações.

Mediador Redox

O mediador redox é escolhido do grupo que compreende, sem contudo limitar, hexacianoferratos de ferro, como azul da Prússia, e hexacianoferratos de cobalto e hexacianoferratos de níquel.

Moléculas de Reconhecimento

Como exemplo destas moléculas, pode-se utilizar peptídeos, polipeptídeos, anticorpos, enzimas e/ou qualquer outro tipo de proteína, açúcares mono, oligo e/ou polissacarídeos bem como qualquer outro tipo de moléculas ou macromoléculas de reconhecimento e/ou a mistura das mesmas.

As enzimas úteis na presente invenção são todas as enzimas capazes de realizar reações redox. Exemplos de tais enzimas compreendem, sem contudo limitar, oxidoredutases, enzimas pertencentes a classificação EC 1.

Processo de Preparo

A presente invenção provê um processo de preparo das membranas

nanoestruturadas compreendendo um substrato sólido condutor ou semicondutor compreendendo, em sua superfície, mediadores redox e nanopartículas metálicas e opcionalmente enzimas compreendendo as etapas de:

5 a) recobrir o substrato condutor ou semi-condutor com uma camada de um polímero de adesão;

b) aderir ao substrato condutor ou semi-condutor nanopartículas metálicas, onde essas nanopartículas metálicas estão localizadas nas cavidades de um dendrímero.

10 c) aderir ao substrato condutor ou semi-condutor do item b) mediadores redox.

d) opcionalmente, aderir ao substrato condutor ou semi-condutor do item c) enzimas.

O recobrimento do substrato condutor ou semi-condutor se dá numa
15 solução contendo o polímero de adesão em uma concentração que varia de 0,0005 M a 1 M. Em especial, a presente invenção utiliza uma solução de PVS a 0.5 g L⁻¹.

A espessura do filme formado varia conforme o tempo de imersão. Valores de espessura adequados estão compreendidos na faixa que vai de 4
20 nm a 500 nm.

A presente invenção também proporciona um processo de síntese das nanopartículas metálicas estabilizadas em dendrímeros, que compreende a etapa de preparar uma solução compreendendo um dendrímero, um sal do metal a ser depositado e um agente redutor, e manter sob agitação, até que a
25 coloração da reação mude, evidenciando a redução do metal.

Os agentes redutores usados aqui incluem os agentes comumente conhecidos pelo técnico no assunto de síntese orgânica. Em especial, o agente utilizado foi ácido fórmico.

As concentrações do dendrímero, do sal do metal a ser depositado e do agente
30 redutor estão compreendidas na faixa que vai de 0,0005 M a 1 M, para cada componente.

As nanopartículas formadas ao final desse processo possuem diâmetros que dependem das características da síntese tais como o diâmetro do dendrímero utilizado, a concentração de metal na solução, tipo de agente redutor, tempo de reação, podendo gerar partículas variando de 1 nm a 50 nm de diâmetro. Em especial, as nanopartículas formadas na presente invenção possuem 3 nm de diâmetro.

A imersão do substrato recoberto com o polímero em uma solução contendo as nanopartículas como descrito na etapa b) é feita em uma solução aquosa das nanopartículas cuja concentração pode variar de 0,0005 M a 1 M. Em especial, a presente invenção utiliza uma solução aquosa de nanopartículas a 1 mM.

A deposição do mediador redox da etapa c) compreende imersão do substrato condutor ou semi-condutor do item b) em uma solução contendo precursores do mediador redox e aplicação de um potencial elétrico durante um período de tempo adequado, através da técnica de voltametria cíclica.

O potencial elétrico a ser aplicado pode variar de 0 a 1,2 ou 0 a -1,2 V, dependendo do material a ser depositado, vários ciclos em diferentes tempos de deposição poderão ser utilizados.

Numa opcional concretização da presente invenção, após a deposição do mediador redox, pode ser feita a deposição de uma molécula ou macromolécula de reconhecimento que tem a propriedade de se ligar à determinada substância presente na amostra.

Em especial, o método de deposição desta molécula de reconhecimento pode ser feito pelo método do gotejamento e/ou pelo método do mergulho.

A superfície condutora ou semi-condutora pode ser lavada entre uma etapa e outra, de modo a retirar o excesso de reagente. Tal lavagem é preferivelmente realizada com água.

A superfície condutora pode ainda ser secada pelo uso de fluxo de nitrogênio, fluxo de outro gás inerte ou da mistura dos mesmos, fluxo de ar, mas preferencialmente à temperatura ambiente. Em especial, a presente invenção seca o eletrodo recoberto à temperatura ambiente por fluxo de N₂.

Exemplo 1. Síntese de membranas automontadas

Exemplo 1.1. Síntese das nanopartículas estruturadas

A síntese das nanopartículas de ouro com dendrímero, (PAMAM-Au), segue o seguinte procedimento: em um frasco de reação adicionam-se 2 mL de solução de KAuCl_4 (1 mmol L^{-1}), 2 mL de solução de G4 PAMAM (1 mmol L^{-1}) e 2 mL de solução de ácido fórmico (10%). Essa solução é agitada por 15 segundos e a reação de obtenção da nanopartícula de ouro ocorre durante 4 horas. A Fig. 1 apresenta a coloração das soluções. A Figura 1a apresenta a coloração da solução de KAuCl_4 e a Fig. 1b apresenta a coloração das nanopartículas de ouro após serem preparadas pelo método descrito acima. A Figura 2 apresenta a imagem das nanopartículas formadas, obtida por microscopia eletrônica de transmissão. As nanopartículas possuem 3 nm de diâmetro, mas podem variar dependendo das características da síntese. Essa síntese também pode ser aplicada para outros metais.

Exemplo 1.2. Obtenção dos filmes automontados

A mesma solução citada anteriormente é usada para preparar filmes automontados com ácido polivinilsulfonado (PVS). Esse novo sistema é denominado agora como PVS/PAMAM-Au. Várias camadas de PVS/PAMAM-Au podem ser depositadas em substrato condutor de ITO (vidro recoberto com filme de óxido de estanho e índio). A concentração das soluções utilizadas no processo de preparação do filme automontado é: 1 mmol L^{-1} e 0.5 g L^{-1} para PAMAM-Au e PVS, respectivamente. O tempo de imersão do substrato de ITO nas soluções é de 5 minutos. Depois da deposição de cada monocamada, o substrato é imerso em água por 10 segundos e seco com gás nitrogênio. A Figura 3 apresenta o filme formado no substrato de ITO e a Figura 5 apresenta o processo de automontagem esquematizado, onde a etapa de imersão do substrato em água para a remoção de polieletrólito negativo está em excesso e fracamente adsorvido.

Após a construção do filme, os mediadores foram eletrodepositados por

voltametria cíclica. Como exemplo, a Figura 6 apresenta um voltamograma cíclico indicando a formação do mediador azul da Prússia em volta das nanopartículas, um dos possíveis mediadores que pode ser eletrodepositado. Esse processo pode ser acompanhado pelo surgimento do voltamograma característico desse mediador. O recobrimento das nanopartículas de ouro pode ser acompanhado pela diminuição do pico de oxidação das nanopartículas de ouro, presente no mesmo voltamograma.

Exemplo 2. Síntese de uma membrana automontada contendo enzimas

Exemplo 2.1. Materiais utilizados

Glicose oxidase (GOx, E.C. 1.1.3.4, de *Aspergillus niger*, 24 U/mg) foi adquirida da Fluka, α -D(+)-glicose, glutaraldeído (GA) (25% v/v em água) e albumina do soro bovino 5 (BSA) Sigma. Hexacianoferrato de potássio (III) ($K_3Fe(CN)_6$) e cloreto de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) Merck. Eletrólito suporte para as medidas eletroquímicas foi tampão fosfato-salina (NaPBS) (0.1 M NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 + 0.05 M NaCl, pH 7.0), preparado com água ultrapura Millipore Milli-Q nanopure system (resistividade > 18 M Ω cm). Os experimentos foram feitos à temperatura ambiente, 25 ± 1 °C. Poliamidoamina (PAMAM) e polivinilsulfonato (PVS) Aldrich.

20

Exemplo 2.2 Métodos e instrumentos

As medidas foram feitas em uma célula de 1 compartimento de 15 mL, contendo o eletrodo modificado de ITO (óxido de índio-estanho) com área geométrica de 1.0 cm², um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo saturado calomelano (SCE) como referência. Experimentos voltamétricos e amperimétricos foram feitos usando um analisador voltamétrico CV-50 W da Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA, controlado pelo software BAS CV-2.1 ou uma corrida em um potenciostático/galvanostático μ -Autolab Tipo II com o software GPES 4.9 (Eco Chemie, Netherlands). Medidas da impedância eletroquímica foram feitas com um analisador de resposta de frequência PC controlled Solartron 1250 acoplado a uma interface eletroquímica Solartron

30

1286 usando o software ZPlot 2.4 (Solartron Analytical, UK). Uma perturbação de voltagem sinoidal de amplitude de 10 mV foi aplicada na variação de frequência entre 65 kHz e 0.1 Hz com 10 frequências de passo por década. As medidas do pH foram feitas com um micro pH-metro CRISON 2001. Imagens de Microscopia de Força Atômica Atomic (MFA) foram obtidas com um microscópio de força atômica Multimode™ controlado por um controlador Digital Instruments Nanoscope E (Veeco Instruments, USA). Os cantileveres foram nitratos de silicone NanoProbes™ na forma-V, de 100 μm, e com uma constante de mola de 0.58 N m⁻¹. Todas as imagens de microscopia de força atômica foram feitas no modo contato com o ar, à temperatura ambiente. O contraste e brilho das imagens foram ajustados.

Exemplo 2.3- Preparação do eletrodo

O eletrodo foi preparado a partir de um eletrodo ITO-coberto por vidro com deposição eletrostática acima de 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au. Brevemente, nanopartículas de ouro metálico de 3 nm de diâmetro estabilizadas por dendrímeros de PAMAM foram sintetizados em solução aquosa, que foi então utilizada como polieletrólito catiônico para construir multicamadas contendo nanopartículas junto com poli(vinilsulfonato) (PVS). A deposição seqüencial foi feita imergindo o substrato ITO alternadamente em soluções de PAMAM-Au e PVS por 5 minutos (foi encontrado por voltametria cíclica e espectroscopia UV-Vis que 5 minutos é suficiente para a completa cobertura da superfície com a quantidade de PAMAM-Au depositada). A seguir, hexacianoferrato de cobalto foi eletroquimicamente depositado no eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)_n ($n = 1, 2$ ou 3) e finalmente a glicose oxidase (GOx) foi imobilizada usando o método de ligação cruzada. O hexacianoferrato de cobalto foi depositado pela ciclagem do eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)_n 30 vezes entre -0.2 V e 0.9 V vs. SCE, a uma velocidade de *scan* 50 mV s⁻¹ em uma solução recém-preparada contendo 0.5 mmol L⁻¹ CoCl₂, 0.25 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆ e 0.05 mol L⁻¹ NaCl a pH 3.0 (pH ajustado com HCl). A imobilização da enzima foi feita usando a reação de ligação cruzada com glutaraldeído

mostrado na Figura 14. Dois procedimentos de imobilização foram comparados: mergulho e gotejamento.

5 A imobilização de GOx por mergulho foi feita usando uma mistura da enzima com glutaraldeído (GA) e albumina do soro bovino (BSA). No procedimento otimizado, a mistura continha 100 μL of GA (2.5% v/v em água) e 240 μL de solução de enzima. A solução da enzima foi preparada pela dissolução de 20 mg BSA e 50 mg GOx em 1 mL of 0.1 M NaPBS (pH 7.0). Eletrodos previamente modificados com o mediador foram imersos na mistura por 2 horas e então, permitidos secar por outras 2 horas à temperatura ambiente.

10 Para o gotejamento, 10 μL de solução de enzima (GOx e BSA nas mesmas proporções que usadas acima) foram colocadas nos eletrodos modificados com o mediador. Após 1h, 10 μL of GA (2.5 % v/v em água) foram colocados no topo dos eletrodos, permitindo-se a secagem por 2h. Os biossensores foram usados 1 dia após a preparação quando a resposta foi melhor. Quando não estavam em uso, os eletrodos foram mantidos a 4°C em eletrólito de tampão fosfato, pH 7.0.

Exemplo 2. 4. Preparação de um eletrodo modificado (ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF) contendo uma membrana nanoestruturada eletroativa (ENM):

20 Usando dendrímeros PAMAM como matriz, nanopartículas metálicas de ~3 nm de diâmetro foram depositadas de uma solução aquosa em um substrato ITO usando a técnica do filme auto-montado anteriormente descrito. Em estudos prévios, foi observado que a configuração de 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au era a melhor configuração para preparar um eletrodo modificado ITO uma vez que os filmes de 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au LbL possuem alta organização e uniformidade de resultados. Para verificar a influência de multicamadas de PVS/PAMAM-Au na morfologia da superfície ITO, um ITO desencapado e um sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au)_n (n = 1, 2 ou 3 bicamadas) foram examinados por microscopia de força atômica (AFM), **Figura**

30 **15.** As imagens de ITO-(PVS/PAMAM-Au)_n revelaram uma morfologia globular,

análoga a outros filmes LbL. Análise de rugosidade e de perfil feitas nas imagens de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, revelaram algumas diferenças em parâmetros morfológicos com o número de bicamadas. A raiz quadrática média da rugosidade, representando o desvio padrão na distribuição das alturas da superfície, e tipicamente usada para quantificar variações na elevação da superfície, aumenta com o número de bicamadas. Os valores foram $\sim 1.93\ \text{nm}$ para ITO e $\sim 2.88\ \text{nm}$, $\sim 3.31\ \text{nm}$ e $\sim 4.35\ \text{nm}$ para ITO-(PVS/PAMAM-Au) $_n$ com $n = 1, 2$ ou 3 bicamadas, respectivamente. Os gráficos da morfologia da superfície da primeira bicamada mostraram uma distribuição uniforme de partículas com uma altura máxima de ca. $14\ \text{nm}$, que é a altura de uma nanopartícula de ouro (não mostrada aqui). A segunda e terceira bicamadas, mostraram uma distribuição uniforme de nano-anéis PAMAM contendo nanopartículas de Au dentro das suas cavidades, que podem ser vistas na imagem 2D de AFM para a segunda bicamada na **Figura 15b**.

O último passo para a construção de ITO-(PVS/PAMAM-Au) $_3$ @CoHCF foi usar o sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au) $_3$ como eletrodo de trabalho para modificar a superfície de PAMAM-Au usando uma abordagem eletroquímica. Os inventores da presente invenção haviam demonstrado previamente que estruturas ITO-(PVS/PAMAM-Au) $_3$ são apropriadas para biossensores e eletrocatalises devido à sua baixa capacitividade e alta corrente faradaica com baixa queda ôhmica. A Eletrodeposição por ciclagem potencial de hexacianoferrato de cobalto em eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au) $_3$ foi feita de acordo com condições previamente otimizadas pelos inventores da presente invenção. Como mostrado na **Figura 16a**, CoHCF foi sucessivamente depositado em eletrodos ITO- (PVS/PAMAM-Au) $_3$ por ciclagem potencial, onde as correntes do pico catódico e anódico aumentaram linearmente com o número de ciclos **Figura 16a**. O mediador depositado foi caracterizado por voltametria cíclica em um eletrodo suporte $0.1\ \text{M NaPBS}$ ($\text{pH } 7.0$), as correntes de pico anódico e catódico aumentam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, como mostrado na **Figura 16b**. Consequentemente, o processo eletroquímico é controlado por difusão do contra-íon.

Comparando o espectro de impedância eletroquímica de diferentes mediadores eletrodepositados, foi demonstrado que a transferência de carga entre eletrodos Au@Me e ITO é mais rápida que a ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃, e que a resistência de transferência de carga entre Au@Me e eletrodos ITO é mais rápida que a ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃ e a resistência à transferência de carga usando CoHCF é menor que para outros hexacianoferratos (tais como CuHCF, FeHCF e NiHCF). Em termos gerais, o espectro coletado após a deposição do mediador difere daqueles dos de eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃ com o mediador em solução. A estratégia utilizada na presente invenção foi analisar os mecanismos difusionais e de transporte de cargas para analisar a impedância a altas frequências para eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃ antes e após a imobilização do mediador redox CoHCF. Após a ciclagem para imobilizar o mediador redox, o espectro do novo sistema contendo Au@CoHCF foi gravado. Os resultados obtidos nos ensaios de potencial de circuito aberto são mostrados nos gráficos de plano complexo da **Figura 17**, contendo um semi-círculo para altas frequências no gráfico de plano complexo após a imobilização do mediador redox. O diâmetro relativamente pequeno é evidência do rápido transporte de carga, e o valor da resistência de transferência de carga pode também ser relacionado ao grau de cobertura das nanopartículas de ouro por CoHCF, assumindo que as reações de transferências de elétrons ocorrem em sítios CoHCF dentro do filme LbL. O espectro para o sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃ ambos com e sem CoHCF também exibiram linhas verticais próximas paralelas muito reprodutíveis a baixas frequências, um comportamento de difusão finita típica observada para eletrodos cobertos por filmes condutores. O eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF foi usado para medidas amperimétricas de H₂O₂ em 0.1 M NaPBS (pH 7.0), a um potencial aplicado de 0.0 V vs. SCE. A corrente mudou catodicamente com a injeção de alíquotas de solução estoque de H₂O₂ para o tampão, com uma boa linearidade entre 20 e 100 mM (dados não mostrados). O limite de detecção (três vezes a relação sinal-ruído) foi 5.7 µM. A equação de regressão do gráfico linear foi $I/nA = 3.44 - 237.55c$, com o coeficiente de correlação $R = 0.9989$, onde c é a

concentração de H_2O_2 em μM . A estabilidade operacional do mediador CoHCF no eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃ foi estudada pela análise de sucessivas curvas de calibração no mesmo eletrodo e nenhuma mudança significativa foi observada após várias medidas.

5

Exemplo 2.5. Imobilização da enzima em eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF usando os procedimentos de mergulho e gotejamento .

A imobilização de enzima em ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF foi feita pela união de GOx usando as técnicas de mergulho ou o gotejamento como descrito previamente. A arquitetura resultante é o eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx. A resposta à glicose foi avaliada no modo amperimétrico a 0.0 V. vs. SCE. A detecção deste potencial baixo representa uma melhora significativa na determinação de glicose, quando comparada aos prévios dispositivos enzimáticos de glicose usando dendrímeros, nos quais os potenciais usados (vs. SCE) são 0.67 V, 0.55 V e 0.25 V.

10

Vários parâmetros foram avaliados para se otimizar a resposta do biossensor. Inicialmente, foi avaliado se o número de bicamadas (acima de 3) depositadas no eletrodo ITO influenciava os resultados. Previamente, os inventores da presente invenção, otimizaram o eletrodo preparado com 3 bicamadas e observaram que bicamadas adicionais não resultaram em aumento de resposta. Eletrodos com uma, duas ou três bicamadas de (PVS/PAMAM-Au) foram preparados, o mediador CoHCF foi eletrodepositado e então, a enzima foi imobilizada por mergulho ou gotejamento da solução de enzima (veja a etapa descrita no item "preparação do eletrodo"). A **Figura 18a** mostra uma melhor curva da resposta da glicose para um eletrodo mergulhado com três bicamadas de (PVS/PAMAM-Au), em comparação com aquela com uma ou duas bicamadas. Resultados similares foram obtidos com o eletrodo preparado por gotejamento da solução de enzima, **Figura 18b**. O método do gotejamento provou ser mais apropriado que o mergulho para a imobilização da enzima, como indicado na **Figura 19** que mostra uma maior resposta para o sistema com a camada de enzima produzida pela técnica do gotejamento.

20

25

30

Por último, uma alíquota da solução de enzima com BSA foi colocada no eletrodo modificado pelo mediador e lá mantida por 1 hora para a sua secagem, o tempo necessário para a enzima ligar no grupo amino do dendrímero. Então, o glutaraldeído foi colocado no topo da enzima para permitir a ligação-cruzada. A maior resposta para a amostra gotejada é provavelmente devido à uma ligação mais forte da enzima ao dendrímero PAMAM (veja a **Figura 14**), levando à uma maior sensibilidade e estabilidade. Além disso, a quantidade de enzima imobilizada é melhor controlada pelo gotejamento. A influência da concentração de enzima e BSA na resposta do eletrodo foi estudada mantendo a concentração de BSA constante e variando a concentração de GOx e vice-versa. A **Figura 20a** mostra uma maior resposta de glicose para diferentes concentrações de enzima (10 a 50 mg mL⁻¹); é provável que a resposta possa posteriormente ser aumentada com maiores quantidades da enzima, mas isto aumentaria o custo do biossensor. Com a concentração de GOx fixada a 50 mg mL⁻¹, a sensibilidade diminuiu para concentrações crescentes de BSA, como mostrado na **Figura 20b**. Conseqüentemente, para estudar o efeito da concentração de glutaraldeído, 50 mg mL⁻¹ de GOx e 20 mg mL⁻¹ de BSA foram empregados. A resposta com 25 % GA foi 5 vezes menor que aquele para 2.5 % GA, o que pode ser devido à desativação da enzima durante o processo de ligação cruzada.

Exemplo 2.6. Características analíticas do eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx

O sistema do eletrodo otimizado é ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx obtido com a GOx imobilizada pelo método do gotejamento usando uma solução de 50 mg mL⁻¹ de GOx, 20 mg mL⁻¹ de BSA e 2.5 % GA. Com estes parâmetros otimizados, a resposta à glicose medida em 0.1 M NaPBS (pH 7.0) a 0.0 V vs. SCE levou a uma resposta linear acima de 100 µM glicose com uma sensibilidade de 115.11 nA mM⁻¹ e limite de detecção (três vezes a relação sinal/ruído) de 5.5 µM. A equação da parte linear da curva de calibração foi // nA = 0.35 - 115.1c, com R = 0.9987, onde c é a concentração de glicose em

mM. Uma outra característica importante deste eletrodo que pode ser obtido dos dados de impedância eletroquímica (ver **Figura 17b**), é a menor resistência de transferência de carga para a redução de peróxido de hidrogênio quando a glicose está presente na solução de eletrólito. Isto suporta a hipótese de que o eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx facilita a reação de transferência de elétrons. Isto se torna mais evidente quando a constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) é determinada do gráfico Lineweaver-Burk. Considerando que os biossensores ITO-(PVS/PAMAM-Au)₃@CoHCF-GOx seguem a cinética de Michaelis-Menten, menores valores de K_M correspondem à maior atividade biocatalítica. O valor de K_M^{app} obtido foi 0.20 mM. Isto demonstra que a abordagem da presente invenção é promissora para as enzimas de biossensores com boas propriedades biocatalíticas e boa estabilidade. A estabilidade operacional foi testada medindo a resposta à uma concentração de glicose de 0.74 mM durante 20 medidas, após as quais, a resposta de corrente caiu 30 %. A estabilidade de estoque foi boa quando os eletrodos foram mantidos a 4°C em solução de tampão fosfato. Após 1 mês de estoque, o biossensor ainda mantinha 65% da sua resposta inicial. A seletividade do biossensor foi medida pela checagem da influência dos interferentes tais como espécies químicas normalmente presentes no vinho. Nestes experimentos, foi usada uma concentração de 0.30 mM de glicose e de 0.60 mM de interferente. Dentre os interferentes estudados, a saber, frutose, etanol, ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido oxálico e ácido tartárico, apenas o ácido ascórbico foi detectado a 0.0 V vs. SCE. Para reduzir a interferência do ácido ascórbico, experimentos nos quais a glicose foi medida em 2 outros potenciais, -0.050 V e -0.180 V vs. SCE foram feitos. A resposta para o ácido ascórbico então diminuiu e a -0.180 V vs. SCE o sinal foi apenas 8.6% daquele a 0.0 V. A resposta à glicose também mostrou alguma redução, mas por muito menos que 78.3%. Consequentemente, a -0.180 V vs. SCE é possível medir a glicose sem interferências de quaisquer dos compostos acima mencionados, e o biossensor é apropriado para medidas em amostras naturais.

Os versados na arte valorizarão os ensinamentos da presente invenção e compreenderão que pequenas variações na forma de concretizar a invenção aqui descrita devem ser consideradas como dentro do espírito da invenção e do escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações**MEMBRANAS ELETROATIVAS NANOESTRUTURADAS (MEN),
PROCESSO DE PREPARO DAS MESMAS E DISPOSITIVOS CONTENDO
AS MESMAS**

5

1. Membrana nanoestruturada caracterizada por compreender um substrato sólido condutor ou semi-condutor compreendendo, em sua superfície, mediadores redox e nanopartículas metálicas aderidas através de um polímero de adesão.

10

2. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo substrato sólido condutor ou semi-condutor ser escolhido do grupo que compreende vidro recoberto com ITO (vidro recoberto com filme de óxido de estanho e índio), ferro, prata, cobre, níquel, ouro, molibdênio, tungstênio, platina, titânio, alumínio, paládio, zinco, manganês, nióbio, zircônio, escândio, vanádio, cromo, cobalto, ítrio, molibdênio, tecnécio, rutênio, ródio, cádmio, ósmio, irídio, índio, gálio, tálio, estanho, germânio, óxido de ferro, óxido de prata, óxido de cobre, óxido de níquel, óxido de ouro, óxido de molibdênio, óxido de tungstênio, óxido de platina, óxido de titânio, óxido de alumínio, óxido de paládio, óxido de zinco, óxido de manganês, óxido de nióbio, óxido de zircônio, óxido de escândio, óxido de vanádio, óxido de cromo, óxido de cobalto, óxido de ítrio, óxido de molibdênio, óxido de tecnécio, óxido de rutênio, óxido de ródio, óxido de cádmio, óxido de ósmio, óxido de irídio, óxido de índio, óxido de gálio, óxido de tálio, óxido de estanho, óxido de germânio, cerâmicas industriais, vidro, carbono e mistura dos mesmos.

15

20

25

3. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo substrato sólido condutor ou semi-condutor ser vidro recoberto com ITO (vidro recoberto com filme de óxido de estanho e índio).

4. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela nanopartícula metálica ser composta de um dendrímero e um metal.

30

5. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 4,

5 caracterizada pelo dendrímero ser escolhido do grupo que compreende PAMAM, polipropilenoimina, polietileno, poliestireno, ácido polivinilsulfonado (PVS) polietilenoglicol, polipropileno, poliuretano, poliolefinas, poliacrilamida, poliuretano, peptidoglicano, neoprene, poliéster, policarbonato, teflon, poliacetal, poli cloreto de vinila (PVC), politereftalato de etila (PET), polianilina e mistura dos mesmos.

6. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo dendrímero ser PAMAM.

10 7. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo metal ser escolhido do grupo que compreende prata, cobre, níquel, ouro, molibdênio, tungstênio, platina, titânio, paládio, zinco, manganês, nióbio, zircônio, escândio, vanádio, cromo, cobalto, ítrio, tecnécio, rutênio, ródio, cádmio, ósmio, irídio, índio, gálio, tálio, estanho, germânio e mistura dos mesmos.

15 8. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo metal ser ouro.

20 9. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos mediadores redox serem escolhidos do grupo que compreende hexacianoferratos de ferro, hexacianoferratos de cobalto, hexacianoferratos de níquel e mistura dos mesmos.

25 10. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo polímero de adesão ser escolhido do grupo que compreende polietileno, poliestireno, ácido polivinilsulfonado (PVS), polietilenoglicol, polipropileno, poliuretano, poliolefinas, poliacrilamida, poliuretano, peptidoglicano, neoprene, poliéster, policarbonato, teflon, poliacetal, poli cloreto de vinila (PVC), politereftalato de etila (PET), polianilina e mistura dos mesmos.

11. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo polímero de adesão ser ácido polivinilsulfonado (PVS).

30 12. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por opcionalmente compreender uma molécula de reconhecimento.

13. Membrana nanoestruturada, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pela molécula de reconhecimento ser escolhida do grupo que compreende peptídeos, polipeptídeos, anticorpos, enzimas, monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e mistura dos mesmos.

5 14. Processo de preparo de uma membrana nanoestruturada caracterizado por compreender as etapas de:

a) recobrir o substrato condutor ou semi-condutor com uma camada de um polímero de adesão;

10 b) aderir ao substrato condutor ou semi-condutor nanopartículas metálicas, onde essas nanopartículas metálicas estão localizadas nas cavidades de um dendrímero.

c) aderir ao substrato condutor ou semi-condutor do item b) mediadores redox.

15 d) opcionalmente, aderir ao substrato condutor ou semi-condutor do item c) moléculas de reconhecimento.

20 15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo substrato sólido condutor ou semi-condutor ser escolhido do grupo que compreende vidro recoberto com ITO (vidro recoberto com filme de óxido de estanho e índio), ferro, prata, cobre, níquel, ouro, molibdênio, tungstênio, platina, titânio, alumínio, paládio, zinco, manganês, nióbio, zircônio, escândio, vanádio, cromo, cobalto, ítrio, molibdênio, tecnécio, rutênio, ródio, cádmio, ósmio, irídio, índio, gálio, tálio, estanho, germânio, óxido de ferro, óxido de prata, óxido de cobre, óxido de níquel, óxido de ouro, óxido de molibdênio, óxido de tungstênio, óxido de platina, óxido de titânio, óxido de alumínio, óxido de paládio, óxido de zinco, óxido de manganês, óxido de nióbio, óxido de zircônio, óxido de escândio, óxido de vanádio, óxido de cromo, óxido de cobalto, óxido de ítrio, óxido de molibdênio, óxido de tecnécio, óxido de rutênio, óxido de ródio, óxido de cádmio, óxido de ósmio, óxido de irídio, óxido de índio, óxido de gálio, óxido de tálio, óxido de estanho, óxido de germânio, 25
30 cerâmicas industriais, vidro, carbono e mistura dos mesmos.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo substrato sólido condutor ou semi-condutor ser vidro recoberto com ITO (vidro

recoberto com filme de óxido de estanho e índio).

17. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pela nanopartícula metálica ser composta de um dendrímero e um metal.

18. Processo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo dendrímero ser escolhido do grupo que compreende PAMAM, polipropilenoimina, polietileno, poliestireno, ácido polivinilsulfonado (PVS) polietilenoglicol, polipropileno, poliuretano, poliolefinas, poliácridamida, poliuretano, peptidoglicano, neoprene, poliéster, policarbonato, teflon, poliacetal, poli cloreto de vinila (PVC), politereftalato de etila (PET), polianilina e mistura dos mesmos.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo dendrímero ser PAMAM.

20. Processo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo metal ser escolhido do grupo que compreende prata, cobre, níquel, ouro, molibdênio, tungstênio, platina, titânio, paládio, zinco, manganês, nióbio, zircônio, escândio, vanádio, cromo, cobalto, ítrio, tecnécio, rutênio, ródio, cádmio, ósmio, irídio, índio, gálio, tálio, estanho, germânio e mistura dos mesmos.

21. Processo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo metal ser ouro.

22. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pela nanopartícula metálica ser produzida por um processo compreendendo as etapas de preparar uma solução compreendendo um dendrímero, um sal do metal a ser depositado e um agente redutor, e manter sob agitação.

23. Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pela nanopartícula ter diâmetro compreendido da faixa que vai de 1 nm a 50 nm.

24. Processo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pela nanopartícula ter diâmetro de aproximadamente 3 nm.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pela concentração do dendrímero, do sal do metal a ser depositado e do agente redutor estar, independentemente, compreendida na faixa que vai de 0,0005M a 1M.

26. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelos mediadores redox serem escolhidos do grupo que compreende hexacianoferratos de ferro, hexacianoferratos de cobalto, hexacianoferratos de níquel e mistura dos mesmos.

5 27. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo mediador redox ser aderido através da técnica de voltametria cíclica.

28. Processo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo potencial elétrico da voltametria cíclica estar compreendido numa faixa de -1,2V a 1,2V.

10 29. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo polímero de adesão ser escolhido do grupo que compreende polietileno, poliestireno, ácido polivinilsulfonado (PVS), polietilenoglicol, polipropileno, poliuretano, poliolefinas, poli(acrilamida), poliuretano, peptidoglicano, neoprene, poliéster, policarbonato, teflon, poli(acetal), poli(cloreto de vinila (PVC),
15 politereftalato de etila (PET), polianilina e mistura dos mesmos.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo polímero de adesão ser ácido polivinilsulfonado (PVS).

20 31. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo polímero de adesão estar presente em uma concentração que varia de 0,0005M a 1M.

32. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo polímero de adesão formar um filme sobre a superfície condutora ou semicondutora com uma espessura compreendida na faixa que vai de 4nm a 500nm.

25 33. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por opcionalmente compreender uma molécula de reconhecimento.

30 34. Processo, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pela molécula de reconhecimento ser escolhida do grupo que compreende peptídeos, polipeptídeos, anticorpos, enzimas, monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e mistura dos mesmos.

FIGURA 1



FIGURA 2

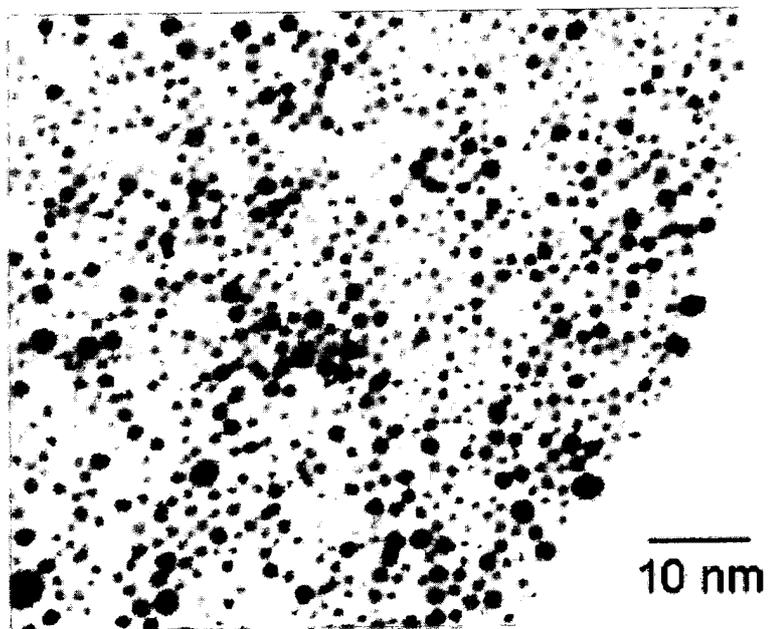


FIGURA 3



FIGURA 4

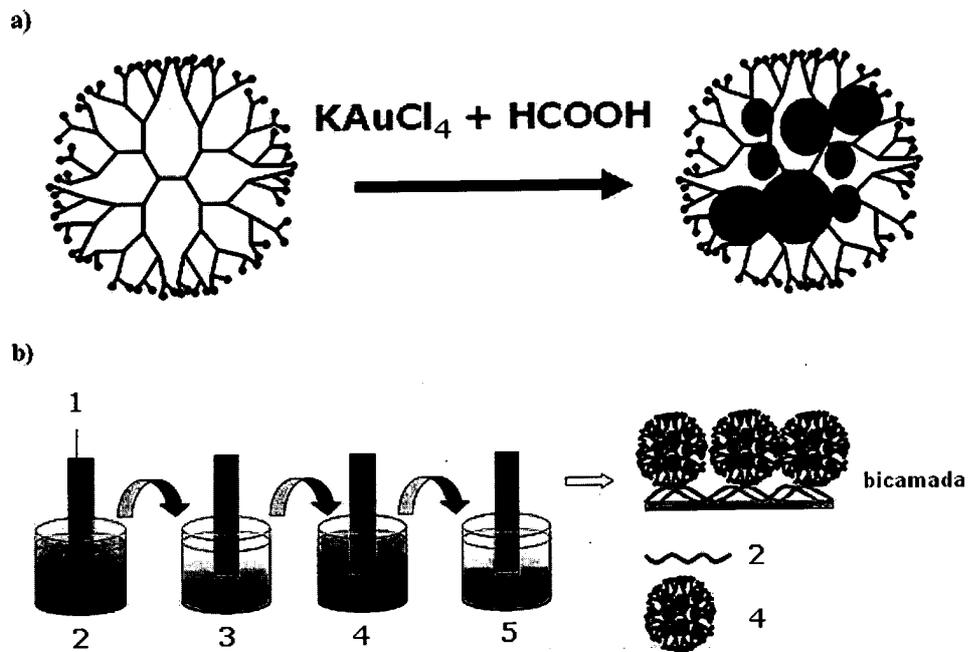


FIGURA 5

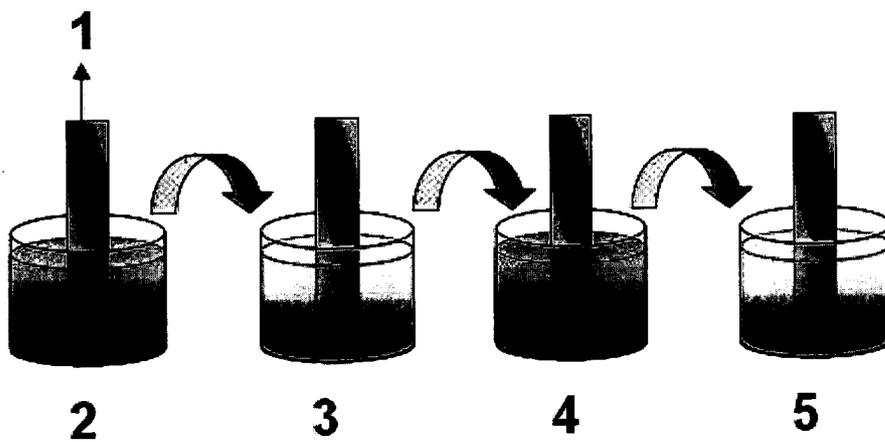


FIGURA 6

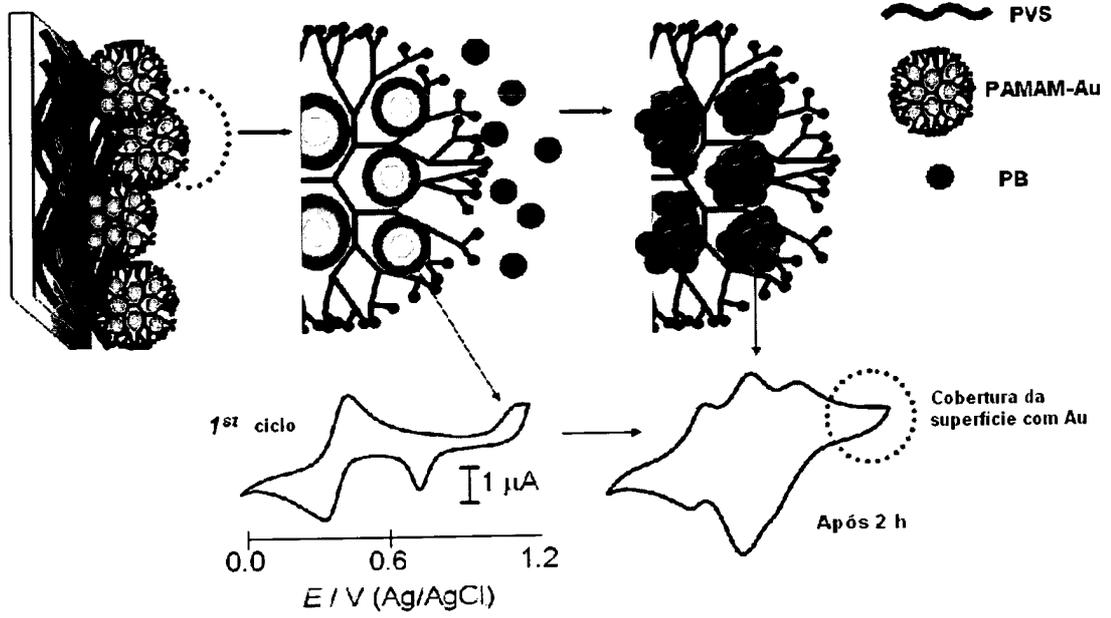


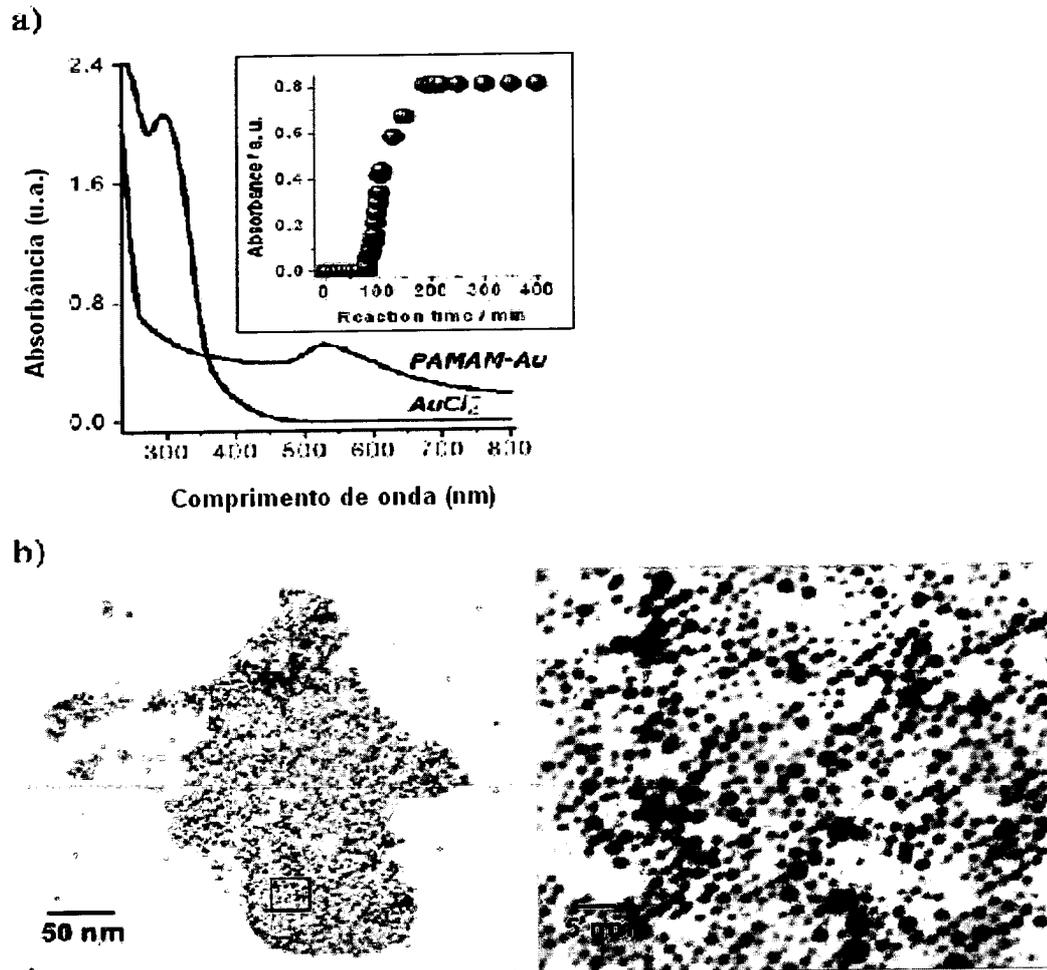
FIGURA 7

FIGURA 8

Número de bicamadas

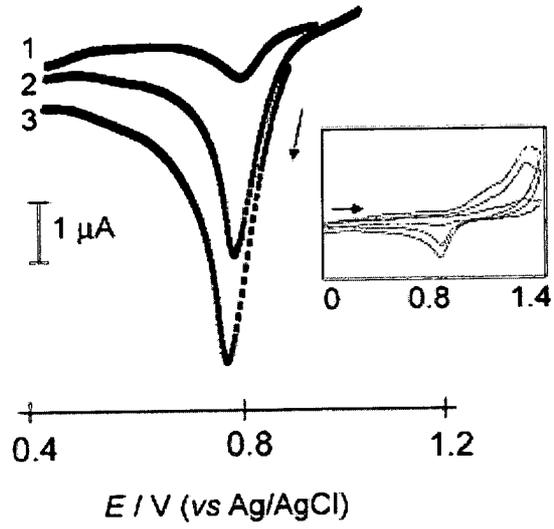


FIGURA 9

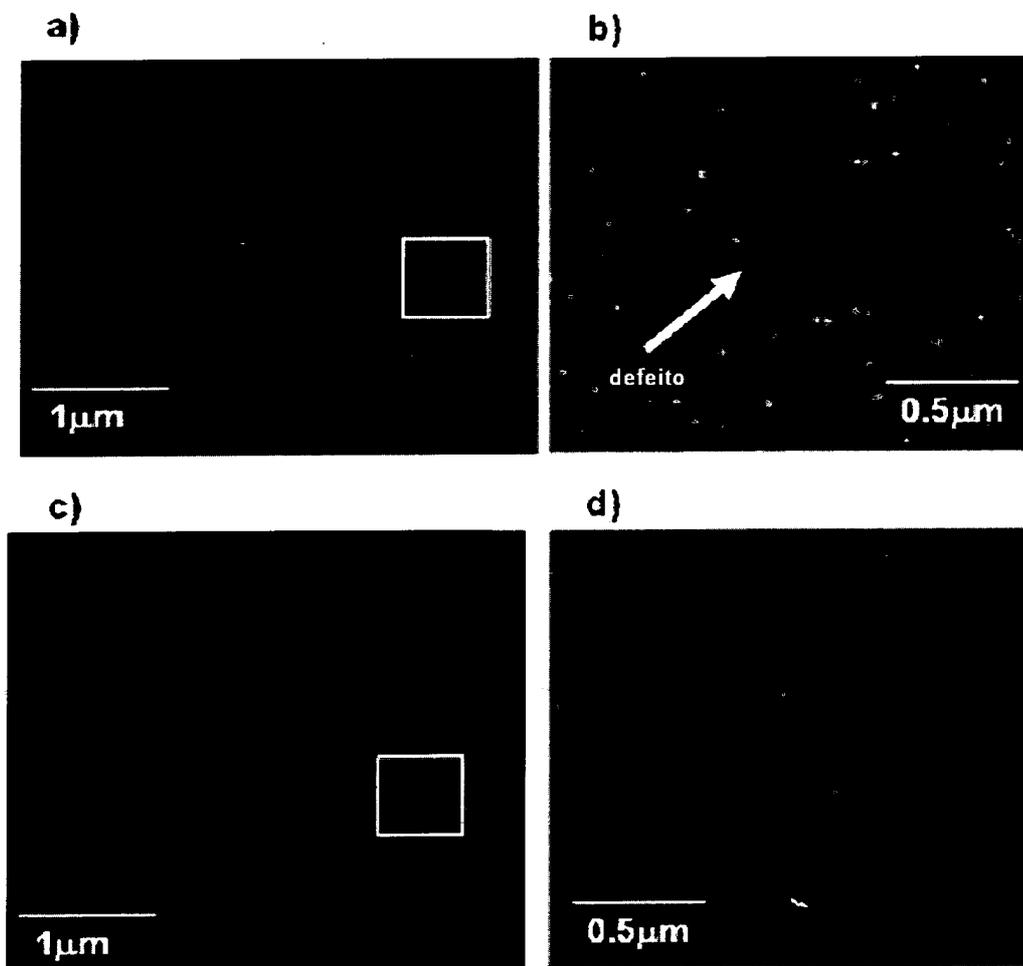


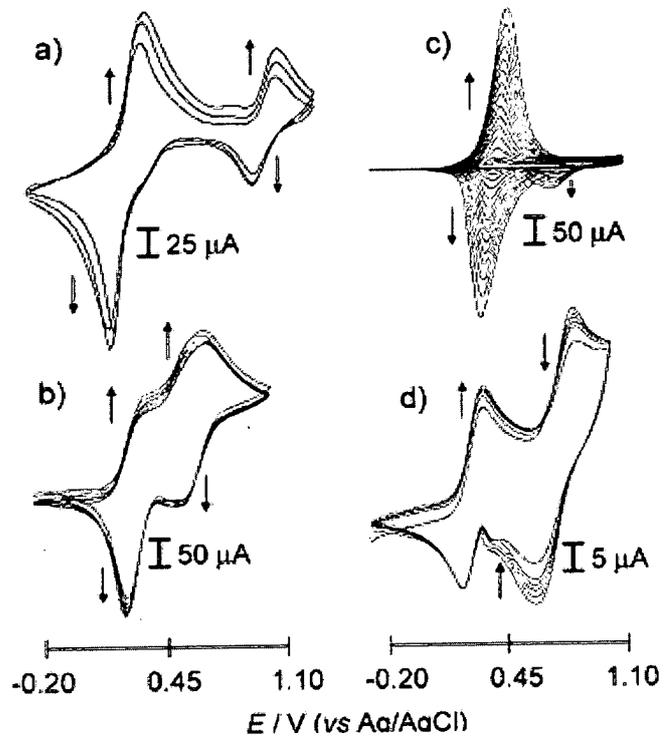
FIGURA 10

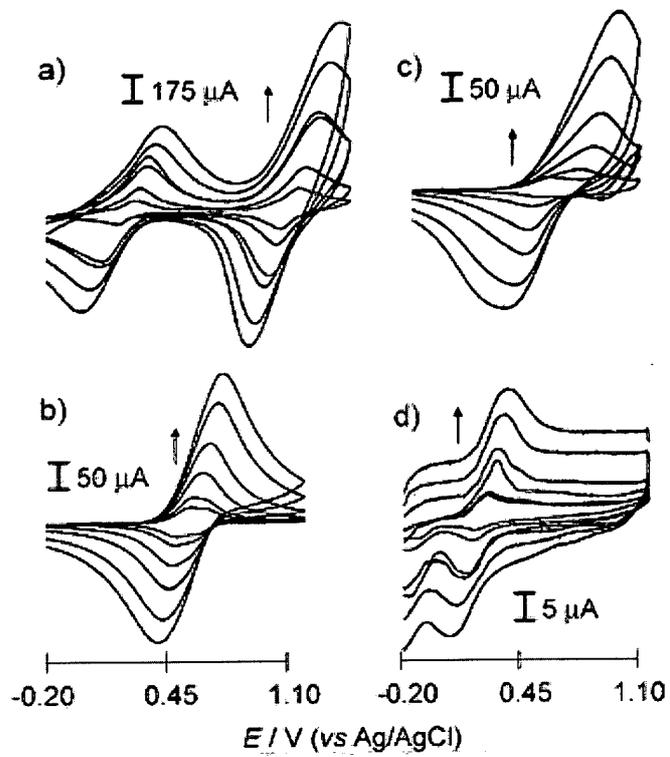
FIGURA 11

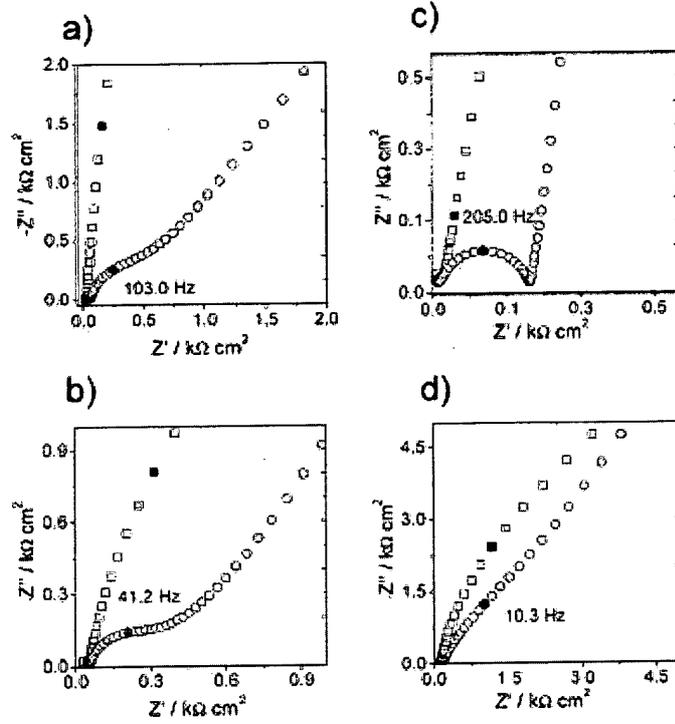
FIGURA 12

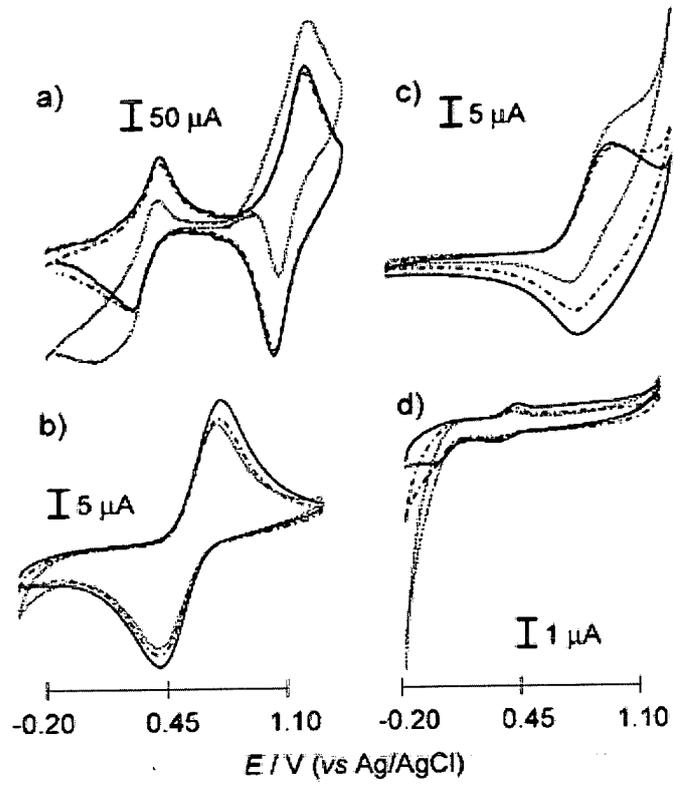
FIGURA 13

FIGURA 14

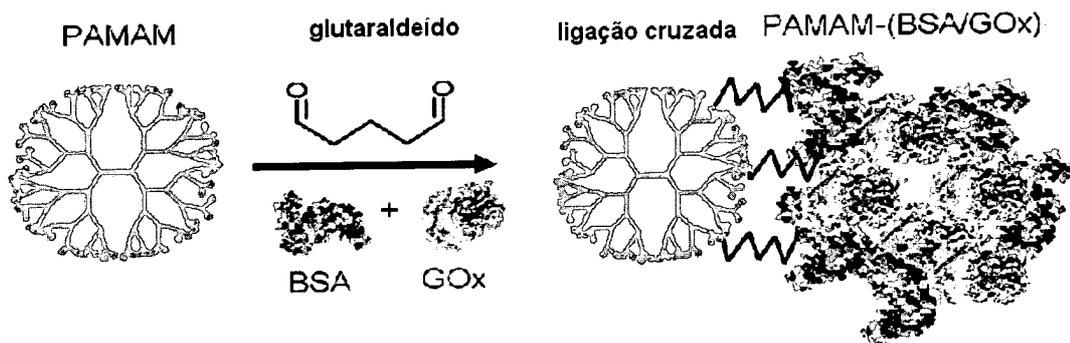
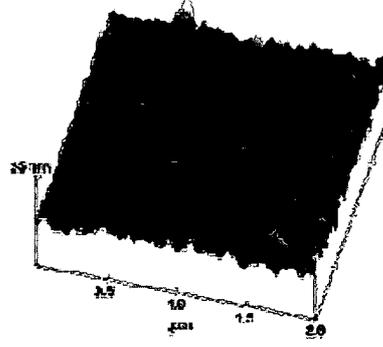
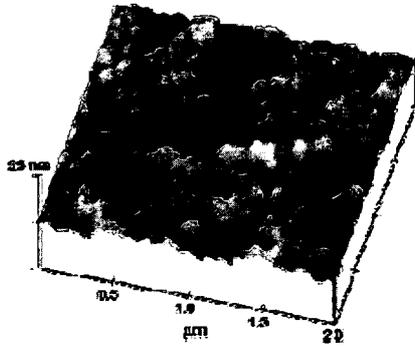


FIGURA 15

(a)

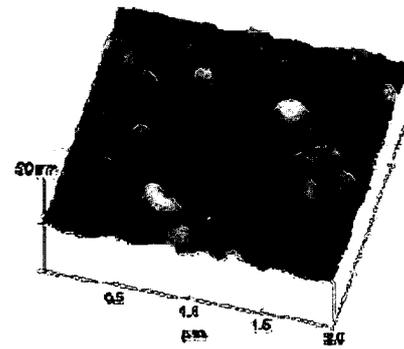
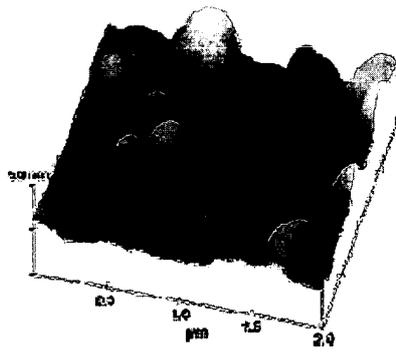
ITO sem cobertura

1- bicamada



2-bicamadas

3-bicamadas



(b)

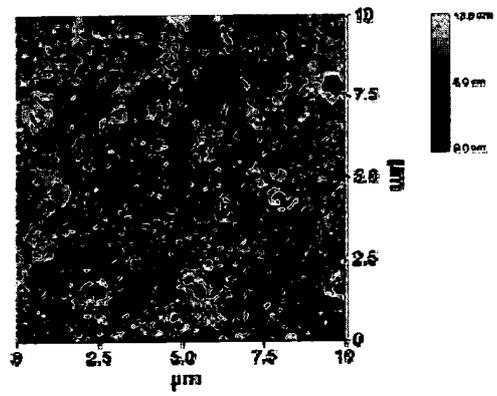
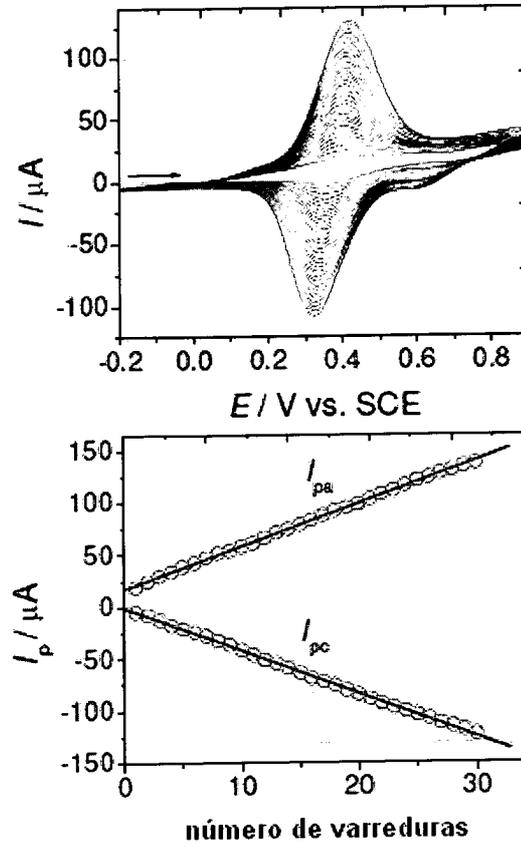


FIGURA 16

(a)



(b)

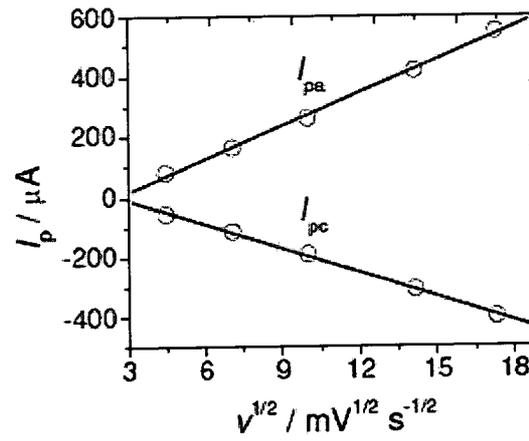
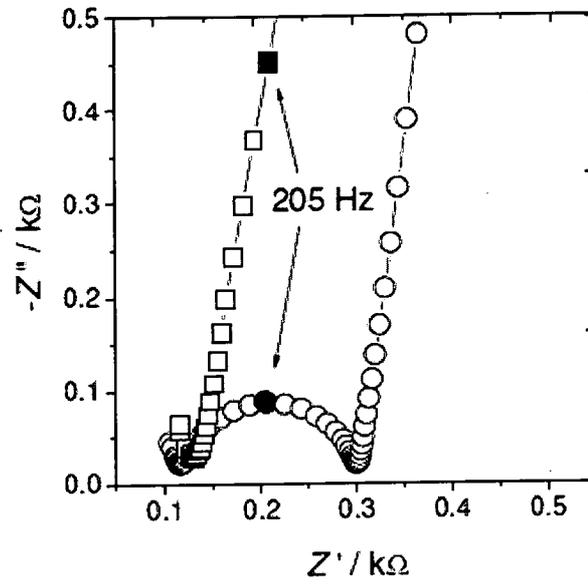


FIGURA 17

(a)



(b)

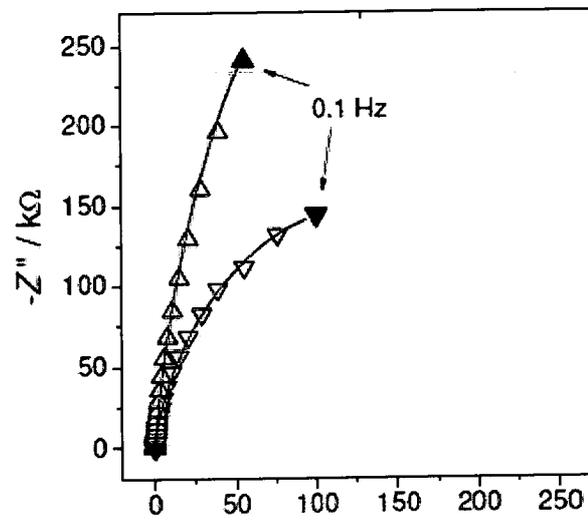
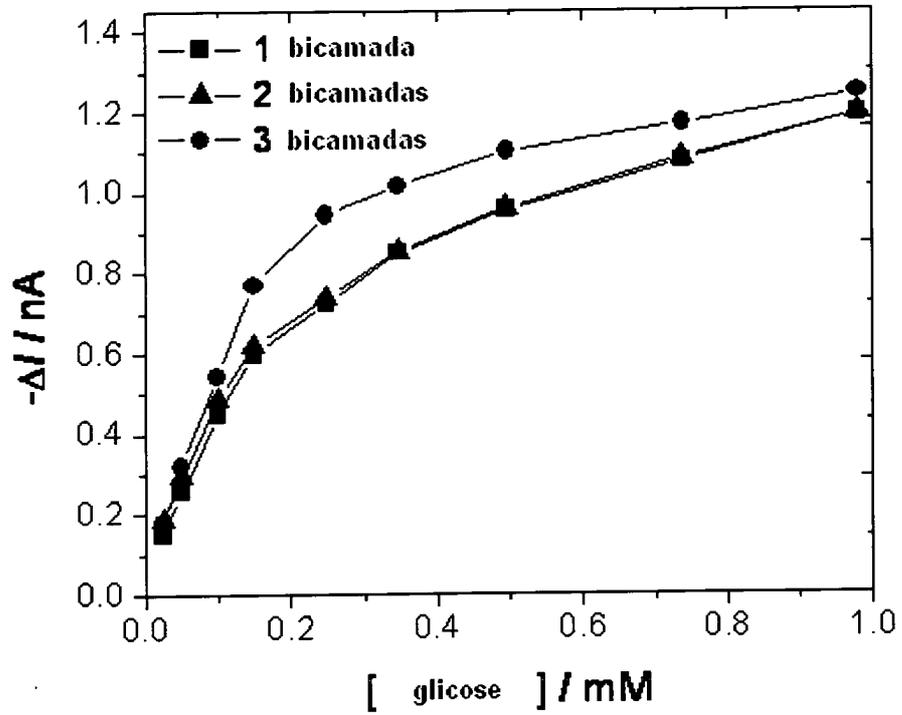


FIGURA 18

a)



b)

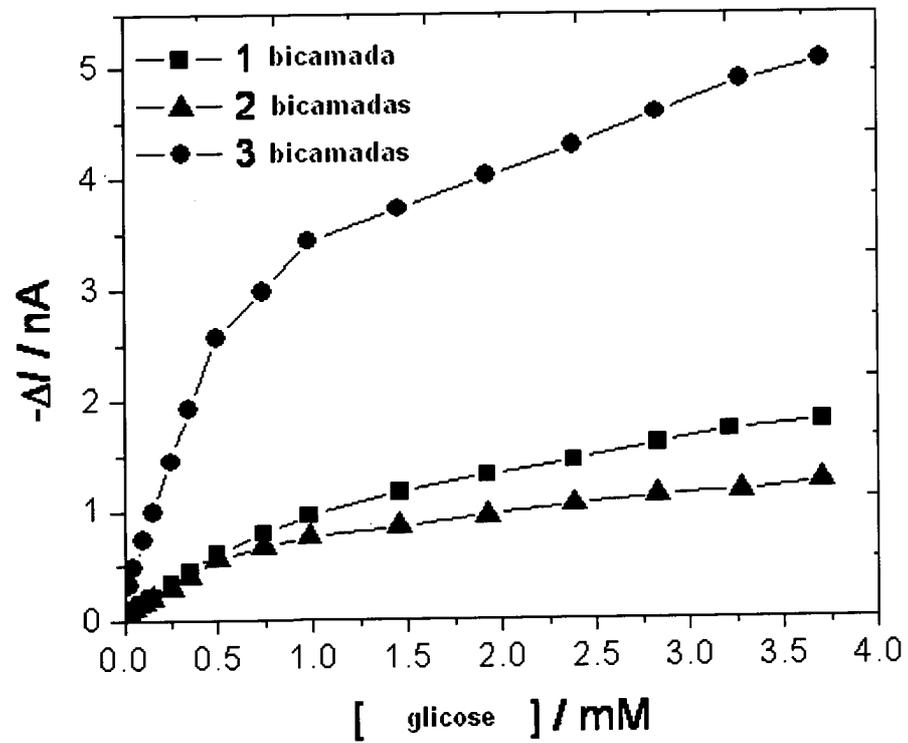


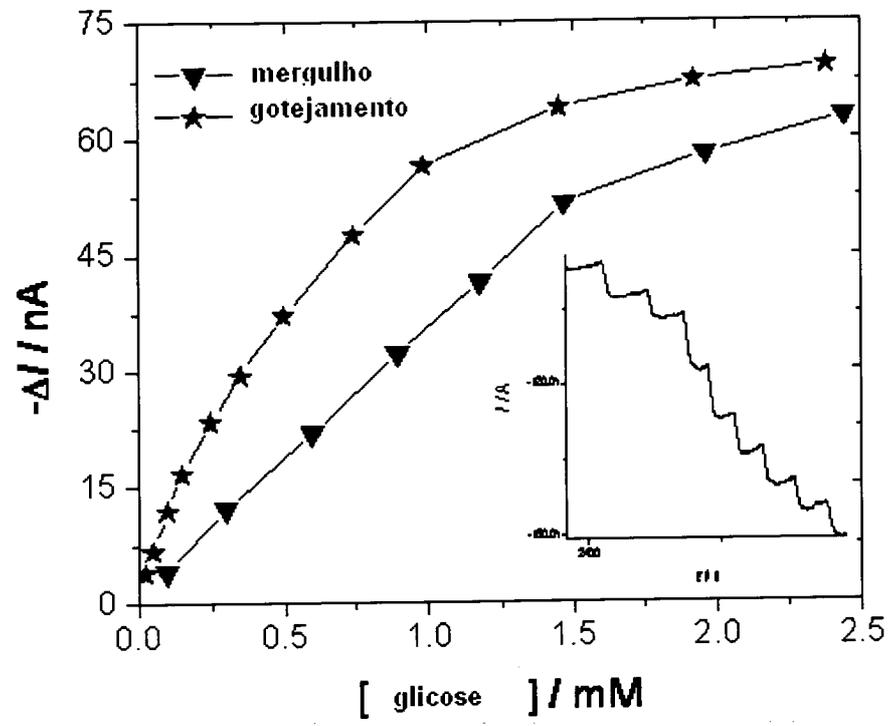
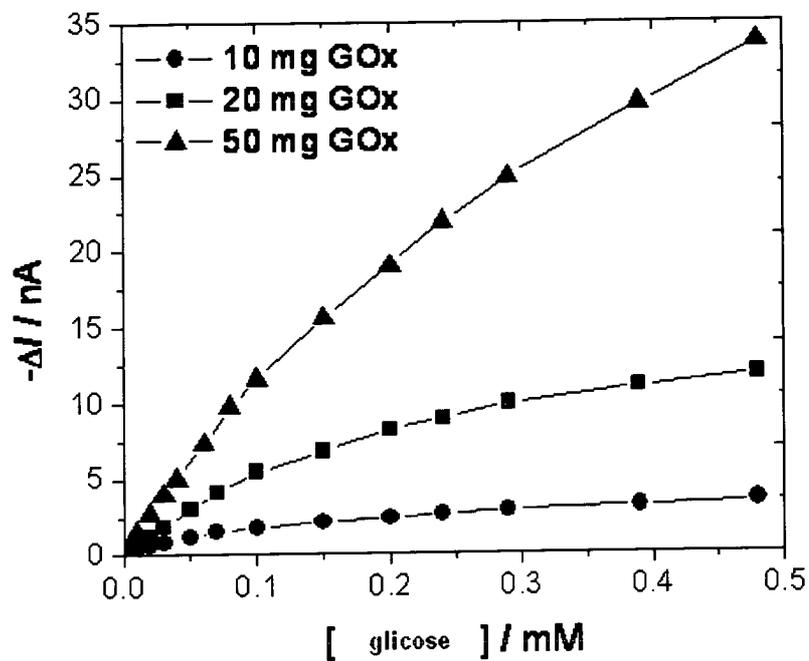
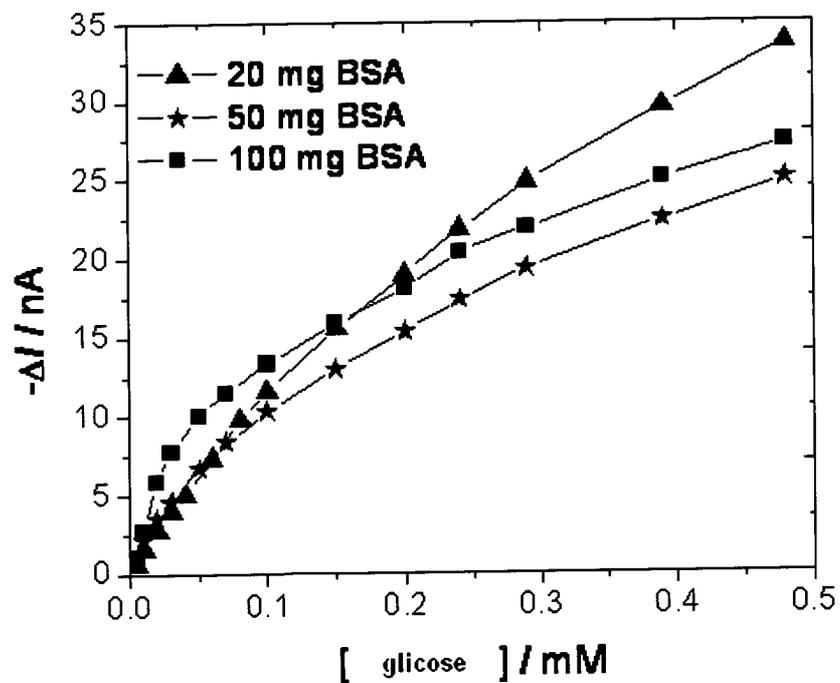
FIGURA 19

FIGURA 20

a)



b)



Resumo**MEMBRANAS ELETROATIVAS NANOESTRUTURADAS (MEN),
PROCESSO DE PREPARO DAS MESMAS E DISPOSITIVOS CONTENDO
AS MESMAS**

A presente invenção pertence ao campo das membranas contendo mediadores redox. Em especial, a membrana da presente invenção é uma membrana nanoestruturada contendo mediadores redox ao redor de nanopartículas metálicas. As nanopartículas metálicas são inicialmente sintetizadas utilizando dendrímeros, depositadas em substratos sólidos e depositadas com mediadores redox. As membranas da invenção são obtidas por processo de auto-montagem e podem ser aplicadas em diversas áreas da ciência e da indústria nas quais mediadores redox são necessários, tais como na obtenção de sensores e biossensores.