



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

(21) PI 1104815-8 A2

(22) Data do Depósito: 31/10/2011

(43) Data da Publicação: 12/01/2016

(RPI 2349)



**(54) Título:** BIOSSENSOR TENDO ELETRODOS INTERDIGITADOS PARA APLICAÇÃO EM NANOMEDICINA NA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO

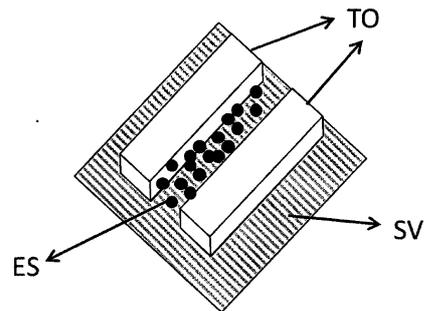
**(51) Int. Cl.:** G01N 33/549; G01N 33/551; G01N 27/02; A61K 39/008

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

**(72) Inventor(es):** VALTENCIR ZUCOLOTTO, PIETRO CIANCAGLINI, OSVALDO NOVAIS OLIVEIRA JUNIOR, FABIANA RODRIGUES DOS SANTOS, ANGELO CESAR PERINOTTO, KATIA REGINA PEREZ, MARCELLE CAROLINA COLHONE GIMENEZ, RODRIGO GUERINO STABELI

**(74) Procurador(es):** MARIA APARECIDA DE SOUZA

**(57) Resumo:** BIOSSENSOR TENDO ELETRODOS INTERDIGITADOS PARA APLICAÇÃO EM NANOMEDICINA NA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO. Construção de um biossensor para detecção de anticorpos específicos anti-Leishmania utilizando-se um eletrodo contendo trilhas interdigitadas de ouro. Sobre esta superfície é imobilizado o proteolipossomo contendo um pool de proteínas antigênicas através de automontagem em camadas alternadas com polieletrólitos positivos. A detecção destes anticorpos é realizada segundo medidas elétricas de impedância e resistência, as quais podem ser relacionadas com as concentrações dos analitos em um simples eixo de coordenadas, com capacitância ou resistência versus concentração. Esta metodologia permite a obtenção de um biossensor para anticorpos anti-Leishmania. Além disso, com a utilização de proteolipossomos contendo antígenos da Doença de Chagas, o dispositivo revelado na presente invenção pode também diagnosticar a doença de Chagas, sem o risco de falso-positivo como na Leishmaniose.



## BIOSSENSOR TENDO ELETRODOS INTERDIGITADOS PARA APLICAÇÃO EM NANOMEDICINA NA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO

### CAMPO DE APLICAÇÃO

Esta invenção se refere em geral a biossensores interdigitados e, em particular, a  
5 biossensores interdigitados contendo antígenos imobilizados da *Leishmania sp*  
produzidos na forma de proteolipossomos sobre plataformas nanoestruturadas  
compostas por um eletrodo de vidro, polímero ou cerâmica, contendo trilhas  
interdigitadas de ouro.

### ESTADO DA TÉCNICA

10 A leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui uma das afecções  
dermatológicas que merecem grande atenção no Brasil e no exterior devido à magnitude  
da doença, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que podem ser  
provocadas no homem. O controle da leishmaniose, tanto em saúde pública como  
individualmente, é pouco eficiente não existindo medidas simples e eficazes de proteção  
15 (Silva & Camargo-Neves, 2004).

Outro ponto importante a considerar é a necessidade de métodos e materiais que  
possibilitem um diagnóstico eficiente, rápido e barato da doença, eliminando possíveis  
problemas de “falso-positivo” e a quantidade de testes diferentes para a confirmação da  
infecção por *Leishmania sp*.

20 Nesse cenário, o processamento de materiais para aplicações biológicas em  
escalas nanométricas tem sido cada vez mais utilizado no desenvolvimento de estruturas  
e dispositivos supramoleculares. Um exemplo é o uso de materiais poliméricos em  
conjunto com materiais biológicos em filmes ultrafinos nanoestruturados para a  
fabricação de biossensores, nos quais propriedades específicas podem ser projetadas e  
25 otimizadas, resultando em dispositivos altamente seletivos e sensíveis a anticorpos  
presentes no soro de pacientes contaminados com *Leishmania*.

A imobilização de biomoléculas em filmes ultrafinos nanoestruturados pode ser  
empregada para a construção de biossensores. Estes, por sua vez, possibilitam grandes  
avanços nas áreas biológicas e médicas, devido à capacidade de caracterização e  
30 quantificação de biomoléculas. A força diretriz para o desenvolvimento de pesquisas  
relacionadas aos biossensores surgiu do crescente interesse na miniaturização destes  
dispositivos analíticos, particularmente para aplicação em sistemas de diagnóstico.

Diversos métodos já são utilizados de rotina para o diagnóstico dessa doença,  
entre eles o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta  
35 (RIFI) e o exame direto ao microscópio. Contudo, nenhuma destas técnicas permite um  
diagnóstico sensível, rápido e definitivo além de apresentar alto custo. Outras técnicas de

detecção de anticorpos são a hemaglutinação direta, o Western Blot e o radioimunoensaio. Diagnósticos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) também têm sido empregados recentemente. Apesar da técnica de PCR apresentar a vantagem de ser mais sensível que os métodos imunológicos, essa

5 técnica apresenta as desvantagens de ser mais complexa na sua execução e de possuir um custo maior. Além disso, essas técnicas para detecção de anticorpos podem ser úteis para a leishmaniose visceral, mas tem um valor limitado na leishmaniose cutânea, em que muitos pacientes não desenvolvem uma significativa resposta imunológica. Outro problema dos diagnósticos para leishmaniose é a reatividade cruzada, ou seja, a ligação

10 de um anticorpo inespecífico ao antígeno, os chamados falso-positivos. A reatividade cruzada culmina em diagnóstico errôneo e tratamento desnecessário.

Uma alternativa para resolver esses problemas é usar biossensores com medidas diretas da presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* a partir de uma plataforma contendo o antígeno imobilizado.

15 Um biossensor é geralmente definido como um dispositivo que consiste em um sistema de reconhecimento biológico e um transdutor. O sistema de reconhecimento é freqüentemente chamado de biorreceptor. A interação do analito com o biorreceptor gera um efeito que será captado pelo transdutor, o qual converte este efeito em uma informação mensurável, tal como um sinal elétrico, óptico, etc. O biorreceptor é uma

20 camada constituída de espécies moleculares biológicas que utilizam um mecanismo bioquímico para reconhecimento. Esta camada contém um material biológico imobilizado, permitido que ocorram interações antígeno-anticorpo, interações receptor-ligante, interações de ácidos nucleicos, interações enzimáticas, entre outras. A transdução do efeito obtido por estas interações pode ser realizada através de medidas ópticas (por

25 exemplo, luminescência, absorção, ressonância de plasma de superfície, etc), medidas eletroquímicas, medidas de massa e medidas de impedância elétrica.

O atrativo dos sensores baseados na afinidade entre biomoléculas a partir dos tipos de transdução previamente citados está na determinação direta do analito. Porém, um dos problemas associados à afinidade destes biossensores consiste em ligações não

30 específicas, pois não há diferença entre os sinais medidos de interações específicas e não específicas. Deste modo, o transdutor deve ser sensível às mudanças conformacionais do sítio de ligação do receptor ou às mudanças de carga que ocorrem em torno deste. Para isso, é importante que a superfície do transdutor contenha uma camada biorreceptora específica para que possa reduzir os efeitos de ligações não

35 específicas.

O documento US 2009/0084686, publicado em 02/04/2009, "Biosensor comprising

interdigitated electrode sensor”, revela um biossensor para detectar a presença e a concentração de vários biomateriais, tais como, genes e proteínas, pelo método elétrico, uma unidade sensora de eletrodo interdigitado para formar o biossensor e um método para medir concentração de um biomaterial usando o biossensor. O biossensor deste documento compreende uma pluralidade de (a) unidades sensoras de eletrodo interdigitado operando independentemente integradas a um substrato, em que cada unidade de sensor de eletrodo interdigitado compreende: primeiro eletrodo e segundo eletrodo formados interdigitadamente e afastados entre si no substrato e um receptor de biomolécula imobilizada no sensor imobilizado no substrato exposto entre o primeiro eletrodo e o segundo eletrodo, de modo que o primeiro eletrodo esteja eletricamente conectado ao segundo eletrodo mediante ligação a uma biomolécula e especificamente ligando à biomolécula, em que a biomolécula é analisada pelo número das (b) unidades sensoras de eletrodo digitado eletricamente conectadas à biomolécula capturada pelo receptor de biomolécula imobilizado no sensor.

O documento US 2009 0191616, publicado em 30/07/2009, “Biosensor structure and fabricating method thereof”, revela uma estrutura de biossensor e um método para fabricar a mesma. A estrutura de biossensor para detectar pelo menos uma única célula inclui um substrato com uma superfície isolante, uma camada condutora e uma pluralidade de moléculas de captura. A camada condutora é disposta no substrato e tem um primeiro padrão e um segundo padrão separados entre si. O primeiro padrão inclui uma pluralidade de configurações de primeiros dedos e o segundo padrão inclui uma pluralidade de configurações de segundos dedos, de modo a formar um conjunto interdigitado. As moléculas de captura são imobilizadas na camada condutora, de modo que a célula que é ligada especificamente às moléculas de captura em duas configurações adjacentes de primeiro e segundo dedos é detectada. A estrutura do biossensor é viável para detecção de célula alvo em tempo real (<3min.), específica e quantitativa até uma única célula.

#### **OBJETO DA INVENÇÃO**

É um objeto da presente invenção apresentar um biossensor tendo antígenos imobilizados da *Leishmania amazonensis* produzidos na forma de proteolipossomos sobre plataformas nanoestruturadas compostas por um eletrodo de vidro, polímero ou cerâmica, contendo trilhas interdigitadas de ouro ou outro metal.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 é um esquema ilustrativo da imobilização de proteolipossomos sobre eletrodos interdigitados do biossensor da presente invenção.

#### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

Um dos diferenciais da presente invenção é a imobilização dos antígenos na forma de proteolipossomos, mais estáveis. Os proteolipossomos imobilizados nos biossensores da presente invenção são capazes de reconhecer e interagir com anticorpos anti-*Leishmania*.

5 Após a imobilização, o sistema eletrodo + proteolipossomo é utilizado para detecção específica de anticorpos anti-*Leishmania* através de medidas de espectroscopia de impedância elétrica. A detecção ocorre em meio líquido e os anticorpos específicos podem ser detectados em concentrações da ordem de ng/ml, suficientemente baixas e comparáveis aos níveis encontrados em fluidos fisiológicos.

10 O biossensor aqui proposto possui grande potencial para aplicação tecnológica e clínica, podendo ser utilizado como dispositivo analítico em análises clínicas, para o diagnóstico rápido e de baixo custo da leishmaniose.

Na presente invenção, o método de transdução do biossensor desenvolvido é realizado através de medidas de impedância elétrica. Neste método de transdução, é necessário que a camada biorreceptora tenha características dielétricas, evitando que íons movimentem-se nesta camada, o que promoveria curto-circuito do sistema. Isto ocasionaria a redução ou mesmo ausência de sinal no transdutor. As medidas são realizadas utilizando-se eletrodos interdigitados. Neste sistema, a medida é obtida pela variação de capacitância entre duas trilhas de metal condutor muito próximas entre si, contendo o elemento de reconhecimento biológico imobilizado entre elas. Este espaço intermediário entre as duas trilhas de metais condutores forma um meio dielétrico. Quando ocorre a reação entre o antígeno imobilizado e o anticorpo há variação das propriedades dielétricas do biorreceptor, resultando na variação da resposta elétrica do eletrodo.

25 O biorreceptor para o sistema estudado consiste de um filme nanoestruturado contendo camadas do polieletrólito poliamidoamina G4 (PAMAM) alternadas com camadas dos proteolipossomos contendo os antígenos.

O biossensor da presente invenção pode ser produzido mediante as seguintes etapas: 1) preparação dos proteolipossomos contendo o antígeno, 2) imobilização dos proteolipossomos em filmes nanoestruturados sobre os eletrodos interdigitados. A detecção dos anticorpos provenientes de pacientes (possivelmente) infectados é conduzida por meio de medidas de espectroscopia de impedância.

Primeiramente, as formas amastigotas de *Leishmania* são centrifugadas a 1.200 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão Tris [(amino metano de hidróxi metila]-HCl (ácido clorídrico) (5 mM, pH 7,5) contendo 1 mM EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), 1,6 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), 0,1 mM E-64 [trans-epoxi succinil-L-

leucilamido-(4-guanidino)butano] e 1 mM 1,10-fenantrolina (Sigma, USA). A suspensão é sonicada a 4°C com um sonificador de ponta com 3 pulsos de 30 segundos a 60 W. Para solubilizar as proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*, alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto são incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com  
5 detergente, 1%, SDS (dodecil sulfato de sódio). As proteínas solubilizadas são separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora e a porcentagem de proteína solubilizada, que foi empregada no preparo dos proteolipossomos (sobrenadante), é acompanhada pela dosagem de proteínas no pélete e no sobrenadante.

Os proteolipossomos são preparados pelo método de co-solubilização de lipídeos  
10 e proteína na presença de detergente. Na preparação, 10 mg de lipídeos (DPPC, DPPS e colesterol na razão em massa de 5:1:4) são dissolvidos em 1 mL de clorofórmio, o qual é removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução até sua completa evaporação. O filme de lipídeos formado nas paredes do recipiente é mantido a vácuo por 1 hora para garantir a completa secagem do meio. Posteriormente, os lipídeos  
15 são ressuspensos em tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5) contendo 25 mg/mL de SDS e mantidos por 1 hora a 60°C com agitações em intervalos de aproximadamente 10 minutos. Os lipídeos solubilizados são sonicados por 2 minutos a 240 W com um sonificador de ponta e em seguida mantidos em repouso por 1 hora. Após esse período, a solução é incubada durante 45 minutos com 0,5 mg do sobrenadante do extrato bruto  
20 tratado com SDS 0,1 %.

Para promover a remoção do detergente da suspensão é utilizada a resina hidrofóbica Calbisorb® na proporção de 200 mg para cada mililitro de amostra com 3 trocas, duas a cada 2 horas e uma por uma noite. As duas primeiras incubações são realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante e a última realizada a 4°C.  
25 Após a decantação da resina, a suspensão é coletada e centrifugada a 140.000 x g por 1 hora a 4°C. O pélete, constituído dos proteolipossomos, foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5). Na preparação dos proteolipossomos são utilizados dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS) e colesterol (Sigma, USA). As  
medidas de distribuição de tamanho dos proteolipossomos são realizadas empregando-se o equipamento Beckman Coulter, modelo N5.  
30

Em seguida, os proteolipossomos contendo as proteínas (antígenos) da *Leishmania* são imobilizados na forma de filmes finos multicamadas, alternando-se uma camada de proteolipossomos (que possuem carga negativa) com uma camada de um polieletrólito, nesse caso, o dendrímero poliamidoamina (PAMAM, geração 4), que tem  
35 carga positiva. Todos os materiais são dissolvidos em tampão fosfato. Desse modo, filmes automontados são depositados sobre eletrodos especiais, e podem ser

caracterizados por técnicas convencionais de caracterização de filmes orgânicos. Os eletrodos utilizados serão eletrodos interdigitados de ouro TO, Figura 1A, que correspondem a uma lâmina de vidro BK7, o substrato SV da Figura 1A, sobre a qual são depositadas trilhas de ouro TO (Figura 1A), numa configuração semelhante a capacitores acoplados. Utilizamos eletrodos contendo de 50 a 70 pares de trilhas, cada uma com largura de 20  $\mu\text{m}$ , e espessura de 100 nm. As trilhas possuem um espaçamento de 10  $\mu\text{m}$  entre si, e é nesse espaço ES que fica adsorvida a maior parte do filme que contém os proteolipossomos, e que atua como o dielétrico de um capacitor. Esses eletrodos interdigitados podem ser adquiridos comercialmente. Os proteolipossomos também podem ser depositados sobre eletrodos interdigitados contendo trilhas de ouro ou prata ou cobre ou estanho.

Para as medidas de detecção, Figura 1B, os eletrodos são conectados a uma fonte CA, e são realizadas medidas de impedância, em uma ampla faixa de frequência do sinal CA, por exemplo, de 100 Hz a 1 MHz, com o filme imerso em diferentes soluções contendo diferentes anticorpos que se queiram detectar. Ao ser imerso em uma solução tampão contendo os anticorpos, estes interagem com os antígenos imobilizados no eletrodo (na forma de proteolipossomos), levando a uma variação na resposta elétrica do filme, principalmente condutividade e capacitância. As medidas são feitas para diferentes anticorpos a diferentes concentrações. Para comparação, utilizamos também um eletrodo puro, sem filme imobilizado. Ao final, as variações dos valores de capacitância são analisadas utilizando-se métodos estatísticos, de maneira que podemos correlacionar as variações da capacitância com o tipo e concentração do anticorpo [Zucolotto et al., Analytical Chemistry, 2007, Perinotto et al., Thin solid Films, 2008, Zucolotto et al., Biosensors and Bioelectronics, 2006]. O esquema mostrando o eletrodo, o filme imobilizado e o processo de detecção de medidas elétricas é mostrado nas Figuras 1A, 1B.

As medidas elétricas são obtidas por meio da imersão do biossensor E em soluções contendo o analito (SA, Figura 1B) onde, a partir da varredura de uma faixa previamente validada de frequências, valores de capacitância e de resistência podem ser obtidos em tempo real (Figura 1B). Estes valores podem ser relacionados com as concentrações dos analitos com o uso de uma simples curva analítica. Nesta curva, a um dado valor de frequência, a ordenada pode conter os valores de capacitância ou resistência e a abscissa, os valores de concentração do analito.

Esta invenção a biossensores tendo antígenos imobilizados da *Leishmania amazonensis* produzidos na forma de proteolipossomos sobre plataformas nanoestruturadas compostas por um eletrodo de vidro, polímero ou cerâmica, contendo

trilhas interdigitadas de ouro. Estes proteolipossomos imobilizados são capazes de reconhecer e interagir com anticorpos anti-*Leishmania*. Após a imobilização, o sistema eletrodo + proteolipossomo é utilizado para detecção específica de anticorpos anti-*Leishmania* através de medidas de espectroscopia de impedância elétrica. A detecção  
5 ocorre em meio líquido e os anticorpos específicos podem ser detectados em concentrações da ordem de ng/ml, suficientemente baixas e comparáveis aos níveis encontrados em fluidos fisiológicos.

O biossensor aqui proposto possui grande potencial para aplicação tecnológica e clínica, podendo ser utilizado como dispositivo analítico em análises clínicas, para o  
10 diagnóstico da leishmaniose. O biossensor da presente invenção também encontra aplicação em nanomedicina na detecção e diagnóstico.

Na área médica, atualmente, o diagnóstico da leishmaniose ou da doença de Chagas, através de detecção de anticorpos específicos tem sido realizado basicamente por imunoenaios do tipo ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI),  
15 hemaglutinação direta, Western Blotting, radioimunoensaio e mais recentemente diagnósticos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR). Contudo, nenhuma destas técnicas permite um diagnóstico sensível, rápido e definitivo destas duas doenças infecciosas, além de apresentar altos custos. Além disso, no diagnóstico da *Leishmania*, pode ocorrer reatividade cruzada, como com *Trypanosoma*  
20 *cruzi*, causador da Doença de Chagas, culminando em diagnóstico errôneo e tratamento desnecessário. Uma alternativa a esses problemas seria o uso do biossensor da presente invenção, que proporciona a capacidade de obter medidas diretas da presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, a partir de uma plataforma contendo o antígeno imobilizado (biossensor), com alta sensibilidade e especificidade e com um menor custo.  
25 Além disso, com a utilização de proteolipossomos contendo antígenos da Doença de Chagas, o dispositivo revelado na presente invenção pode também diagnosticar a doença de Chagas, sem o risco de falso-positivo como na Leishmaniose.

---

## REIVINDICAÇÕES

1. Biossensor tendo eletrodos interdigitados, caracterizado por compreender antígenos imobilizados da *Leishmania amazonensis* produzidos na forma de proteolipossomos sobre plataformas nanoestruturadas compostas por um eletrodo de vidro, polímero ou cerâmica, contendo trilhas interdigitadas de ouro no mesmo.  
5
2. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os proteolipossomos serem depositados sobre eletrodos contendo trilhas interdigitadas de ouro ou prata ou cobre ou estanho.
3. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os proteolipossomos contendo as proteínas (antígenos) da *Leishmania* serem imobilizados na forma de filmes finos multicamadas, alternando uma camada de proteolipossomos (que possuem carga negativa) com uma camada de um polieletrólito.  
10
4. Biossensor, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de o polieletrólito ser o dendrímero poliamidoamina (PAMAM, geração 4), que tem carga positiva.  
15
5. Biossensor, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de o polieletrólito com carga positiva incluir polialilamina hidrocloreada (PAH), quitosana, polietileno imina (PEI), poli cloreto de dimetil dialil amônio (PDAC).
6. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o biossensor detectar qualquer anticorpo anti-*Leishmania*, incluindo os tipos *amazonensis* e *chagasi*.  
20
7. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os proteolipossomos incluírem proteolipossomos com antígenos do *Tripanossoma cruzi* (causador da doença de Chagas).
8. Aplicação em nanomedicina na detecção e diagnóstico, do biossensor definido nas reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de ser aplicada na detecção de anticorpo anti-*Leishmania*, incluindo os tipos *amazonensis* e *chagasi* ou na detecção da doença de Chagas.  
25

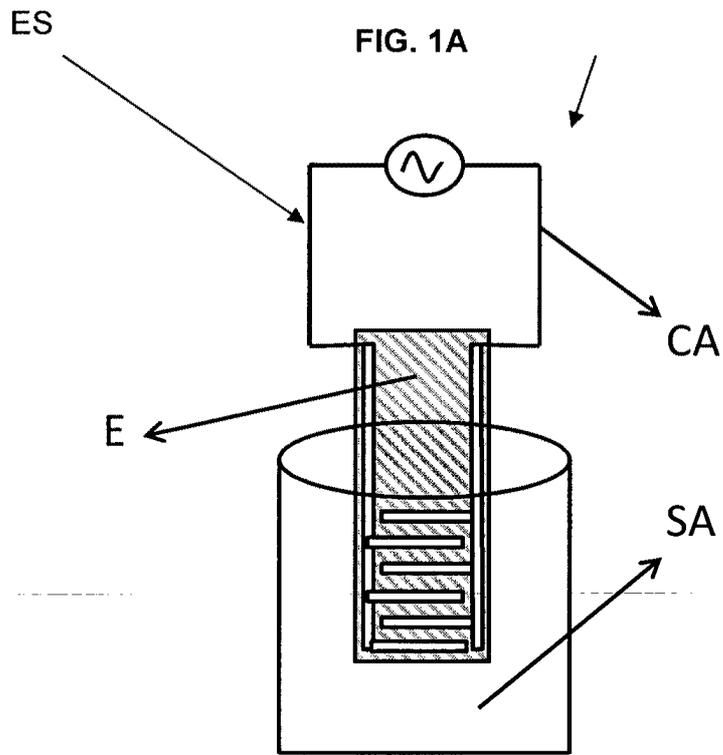
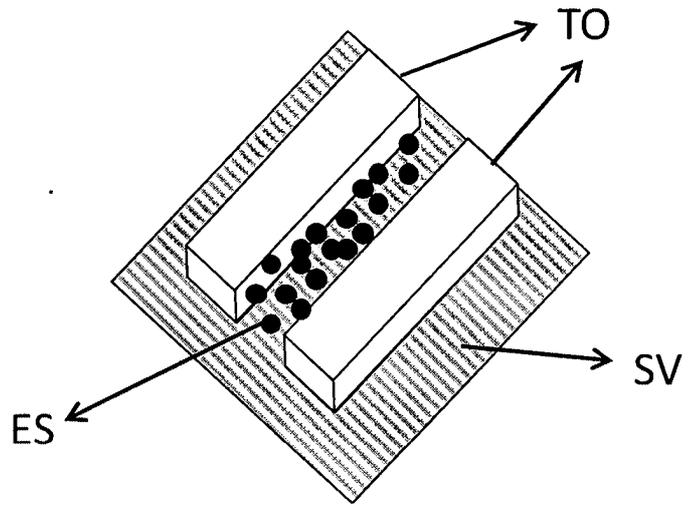


FIG. 1B

**RESUMO****BIOSENSOR TENDO ELETRODOS INTERDIGITADOS PARA APLICAÇÃO EM  
NANOMEDICINA NA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO**

5 Construção de um biossensor para detecção de anticorpos específicos anti-  
*Leishmania* utilizando-se um eletrodo contendo trilhas interdigitadas de ouro. Sobre esta  
superfície é imobilizado o proteolipossomo contendo um *pool* de proteínas antigênicas  
através de automontagem em camadas alternadas com polieletrólitos positivos. A  
10 detecção destes anticorpos é realizada segundo medidas elétricas de impedância e  
resistência, as quais podem ser relacionadas com as concentrações dos analitos em um  
simplex eixo de coordenadas, com capacitância ou resistência *versus* concentração. Esta  
metodologia permite a obtenção de um biossensor para anticorpos anti-*Leishmania*. Além  
disso, com a utilização de proteolipossomos contendo antígenos da Doença de Chagas,  
o dispositivo revelado na presente invenção pode também diagnosticar a doença de  
Chagas, sem o risco de falso-positivo como na Leishmaniose.