



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

(21) BR 102014024605-3 A2

(22) Data do Depósito: 02/10/2014

(43) Data da Publicação: 07/02/2017



(54) **Título:** BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO ADIPONECTINA EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA; MÉTODO DE PRODUÇÃO DOS BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO ADIPONECTINA; E MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DISFUNÇÕES METABÓLICAS

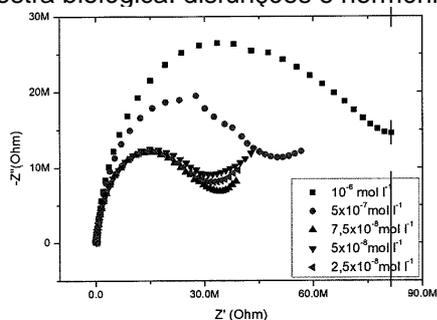
(51) **Int. Cl.:** G01N 27/327; G01N 27/02

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

(72) **Inventor(es):** VALTENCIR ZUCOLOTTO; LAÍS CANNIATTI BRAZACA; BRUNO CAMPOS JANEGITZ; JULIANA CANCINO BERNARDI

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

(57) **Resumo:** BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO ADIPONECTINA EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA; MÉTODO E PRODUÇÃO DOS BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO O HORMÔNIO ADIPONECTINA; E MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DI METABÓLICAS
RESUMO A presente invenção se refere aos biossensores para a detecção e quantificação do hormônio adiponec ina em uma amostra biológica que são consistidos de m eletrodo revestido com agentes reticulantes; e, uma biomolécula detectora; ao método de produção dos biosse sores para detecção e quantificação do hormônio adiponec ina em uma amostra biológica que compreende as etapas de p eparação do eletrodo; revestimento; e, imobilização da biomolécula detectora; e, método de diagnóstico de metabólicas pela detecção e quantificação adiponectina em uma amostra biológica. disfunções o hormônio



BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO
ADIPONECTINA EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA; MÉTODO DE PRODUÇÃO
DOS BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO
ADIPONECTINA; E MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DISFUNÇÕES
METABÓLICAS

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Esta invenção pertence ao campo dos dispositivos para análise de materiais pelo uso de meios elétricos, eletroquímicos; especificamente, ao campo dos dispositivos para análise de material biológico líquido.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] O crescimento contínuo da obesidade tem atraído a atenção às diversas condições associadas, como diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e, a que pode ser mais devastante, diabetes mellitus tipo 2 (DM 2). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a diabetes mellitus afeta atualmente 347 milhões de pessoas, e seu crescimento indica que esta doença estará entre as sete principais causas de morte em 2030. Além disso, a diabetes afeta indivíduos de todas as idades e níveis socioeconômicos, se tornando um problema de saúde pública em todo o mundo ocidental.

[003] Tanto a diabetes quanto a obesidade estão relacionadas à resistência à insulina. Para a obesidade, esta relação pode ser explicada, em parte, pela secreção alterada das adipocinas pelo tecido adiposo, tais como a adiponectina. A adiponectina é um hormônio proteico que possui um papel essencial na homeostase energética por afetar a sensibilidade ao hormônio insulina, o metabolismo de glicose e lipídeos, o sistema coagulatório e o processo

de inflamação. A secreção deste é regulada negativamente pelo excesso de gordura corporal, e sua concentração na corrente sanguínea típica de entre 5,0 a 30 mg mL⁻¹ ou 0,15 a 1,0 μmol L⁻¹, está associada a quadros de resistência à insulina e, subsequentemente, ao desenvolvimento de DM 2. O desenvolvimento do DM2 se dá de forma muito lenta - evidências mostram que a resistência à insulina pode ser detectada de 10 a 20 anos antes do início da hiperglicemia crônica. Além disso, foi relatado que a resistência à insulina é um bom indicador do futuro desenvolvimento do DM 2.

[004] A correlação entre obesidade, resistência à insulina e DM 2 pode ser explicada, em nível molecular, pela análise da fosforilação do AMPK (quinase AMP-ativada). A ativação desta proteína leva à translocação de receptores de insulina para a membrana plasmática e promove a oxidação de glicerídeos nos hepatócitos. Como a adiponectina promove essa fosforilação, seus baixos níveis - que ocorrem na obesidade - resultam em um baixo número de receptores de insulina na membrana plasmática e um decaimento na oxidação de glicerídeos nos hepatócitos, induzindo o desenvolvimento de DM 2.

[005] A baixa concentração de adiponectina no soro sanguíneo não é associada somente com DM 2 e obesidade, mas com diversas outras condições tais como a acumulação de gordura visceral, artrite reumatoide, arteriosclerose, câncer e doenças hepáticas. Em contrapartida, o aumento de seu nível sérico já mostrou ser capaz de reduzir níveis de glicose pela inibição de enzimas hepato-gliconeogênicas, melhorar a sensibilidade à insulina nos casos de diabetes

tipo I e tipo II, além de promover perda de peso. Seu reconhecimento, *in vivo*, é feito pelos receptores transmembrana AdipoR1 e AdipoR2, presentes abundantemente no músculo esquelético e no fígado, respectivamente. Enquanto o primeiro possui alta afinidade pelo domínio globular da adiponectina, o segundo interage com estruturas do hormônio combinadas.

[006] Dessa maneira, a quantificação da adiponectina plasmática possui grande potencial para o diagnóstico precoce de pacientes pré-diabéticos e pode oferecer uma melhor perspectiva para a saúde futura destes. Atualmente, a quantificação deste hormônio é realizada majoritariamente pelo método ELISA (do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), o qual demanda altos custos e tempo. Os documentos de patente PI 0717803-4 e US 7435551 descrevem composições e ensaios que podem ser utilizados para a quantificação de adiponectina por meio do método de ELISA.

[007] Por outro lado, é sabido que desenvolvimento de biossensores eletroquímicos é de grande interesse em diversas áreas, como a ambiental, alimentícia, médica e de diagnóstico. Entre estas, podemos citar a última como uma das mais beneficiadas por estes dispositivos, principalmente devido a sua simplicidade, baixo custo e rapidez.

[008] Outro pedido brasileiro de patente, o PI 0619503-2 descreve fragmentos O-terminais solúveis do receptor da adiponectina e o seu uso no diagnóstico e tratamento de distúrbios, tais como a DM 2.

[009] A detecção desse hormônio também pode ser realizada pela técnica de SDS-PAGE, conforme indicado pelo

documento EP2071333.

[010] Os biossensores podem funcionar por meio de diferentes técnicas de transdução, dentre elas, vemos que a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é muito eficiente para traduzir a interação do analito em superfícies funcionalizadas. Para isso, sinais AC de baixa amplitude em uma grande diversidade de frequências, na faixa de entre 10 MHz e 100 mHz, são usados para a excitação da amostra. A partir da resposta do sistema, pode-se obter então, dados sobre a resistência e capacitância da amostra analisadas. Softwares especializados, tais como Zplot/Zview (Scribner Associates Inc.) e Gamry EIS 300 (Gamry Instruments), são capazes de criar circuitos equivalentes baseados nos espectros EIS, fornecendo detalhes sobre as características elétricas do filme. Imunossensores, genossensores e biossensores enzimáticos baseados na detecção por EIS são comumente encontrados na literatura. Por exemplo, o pedido americano de patente US2003159927 antecipa um sensor interdigitado com capacidade de detectar analitos baseada em regiões contendo materiais condutores e não-condutores.

[011] Outra técnica comumente aplicada a biossensores é a voltametria cíclica (VC). Esta consiste, basicamente, na aplicação de ciclos de uma janela de potencial no eletrodo de trabalho enquanto a corrente-resposta é monitorada. A partir deste método, é possível obter informações sobre a oxidação e redução de espécies através da observação de picos formados no voltamograma. A funcionalização do eletrodo de trabalho usualmente possui a função de tornar as reações de oxidação-redução mais seletivas, sensíveis

e/ou diminuir o potencial de trabalho. Uma abordagem diferente consiste no acompanhamento dos picos das reações de um composto já bem estabelecido para a obtenção de informações sobre espécies adsorvidas no eletrodo de trabalho, de acordo com suas características, estas podem deslocar os picos para potenciais diferentes ou modificar a corrente-resposta.

[012] Além da técnica de transdução, outra característica que afeta diretamente a sensibilidade e especificidade dos dispositivos é o tipo de imobilização utilizada para os receptores biológicos. Diversos métodos estão sendo amplamente investigados atualmente, tais como o layer-by-layer (LbL), Langmuir-Blodgett (LB) e monocamadas automontadas (SAM). Entre esses, as SAM apresenta uma ótima flexibilidade, sendo capaz de imobilizar uma grande variedade de materiais orgânicos tais como DNA, anticorpos, proteínas ou mesmo células inteiras em diversos substratos.

[013] Biossensores capazes de detectar os fragmentos C-terminais solúveis do receptor de adiponectina são descritos no documento brasileiro de patentes PI 0619503-2.

[014] Já o documento EP2147315 descreve um método de quantificação de diversos biomarcadores, inclusive adiponectina, para o diagnóstico de indivíduos pré-diabéticos. Neste documento, não fica evidenciado qual o tipo de biossensor é utilizado pelos inventores.

[015] A construção de um biossensor contendo enzimas combinadas com um mediador que ajuda na transferência dos elétrons provenientes da reação enzimática é antecipada pela patente americana US4545382.

[016] Portanto, fica aqui evidenciado que o estado da

técnica não contempla até o presente momento, nenhum método eletroquímico de detecção direta do hormônio adiponectina.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[017] O primeiro objetivo da invenção é propor biossensores para detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica.

[018] O segundo objetivo da presente invenção é o método de produção dos biossensores para detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica.

[019] O terceiro objetivo da presente invenção é propor um Método de diagnóstico de disfunções metabólicas pela detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[020] A presente invenção se refere aos biossensores para a detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica, que são consistidos de um eletrodo revestido por agentes reticulantes; e, uma biomolécula detectora.

[021] O biossensor para a detecção e quantificação do hormônio adiponectina da invenção é altamente seletivo apenas para essa proteína. Nenhuma outra biomolécula sintética atualmente disponível é capaz de detectar com alta eficiência o hormônio adiponectina.

[022] A invenção também se refere ao método de produção dos biossensores para detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica, que compreende as etapas de:

- (a) preparação do eletrodo;

- (b) revestimento; e,
- (c) imobilização da biomolécula detectora.

[023] Finalmente, a invenção se refere ainda, ao Método de diagnóstico de disfunções metabólicas pela detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[024] Para se obter uma total e completa visualização do objeto da presente invenção, acompanham os desenhos, aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

[025] A Figura 1 é o diagrama de Nyquist da construção do filme com cisteamina/receptores e detecção de adiponectina.

[026] A Figura 2 é o diagrama de Nyquist para o teste negativo de detecção de adinopectina, com eletrodo funcionalizado contendo cisteamina.

[027] A Figura 3 é o diagrama de Nyquist relativo ao teste negativo da funcionalização do eletrodo de ouro com 3 MPA/EDC/NHS.

[028] A Figura 4 mostra a detecção de adiponectina e medidas realizadas em cada etapa de montagem do eletrodo: A) receptores Adipo R1/R2 imobilizados e B) anticorpos anti-adiponectina imobilizados.

[029] A Figura 5 mostra a resposta do eletrodo com receptores Adipo R1/R2 imobilizados frente a diferentes concentrações de adiponectina: A) diagramas de Nyquist e B) curva de calibração.

[030] A Figura 6 mostra a resposta do eletrodo com anticorpos anti-adiponectina imobilizados frente a diferentes concentrações de adiponectina: A) diagramas de

Nyquist e B) curva de calibração.

[031] A Figura 7 apresenta a resposta do eletrodo com receptores Adipo R1/R2 imobilizados frente a diferentes concentrações de adiponectina: A) Voltamogramas cíclicos e B) curva de calibração.

[032] A figura 8 apresenta a resposta do eletrodo com anticorpos anti-adinopectina imobilizados frente a diferentes concentrações de adiponectina: A) voltamogramas cíclicos e B) curva de calibração.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[033] A presente invenção trata dos biossensores para a detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica, que são consistidos de um eletrodo revestido com agentes reticulantes; e, uma biomolécula detectora.

[034] Para fins da presente invenção, o eletrodo é pertencente ao grupo que compreende lâminas metálicas de ouro, platina, prata, ou lâminas de vidro recobertas com óxido de índio e estanho (ITO). Os agentes reticulantes que formam o revestimento do eletrodo são aqueles que possuem uma química de ligação bem estabelecida que possa ser realizada tanto em soluções quanto em superfícies e, pertencentes ao grupo consistido de cistamina, curcumina, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), o-acilisouréia ou uma associação destes. A biomolécula detectora é um anticorpo anti-adiponectina Q (anti-adipoQ), um receptor AdipoR1, um receptor AdipoR2, ou uma mistura destes.

[035] Preferencialmente, nesta invenção, o eletrodo é

um eletrodo de ouro; os agentes reticulantes são pertencentes ao grupo consistido de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 3-mercaptopropiônico (3 MPA) ou uma associação destes; e, a biomolécula detectora é um anticorpo anti-adiponectina Q (anti-adipoQ), um receptor AdipoR1, um receptor AdipoR2, ou uma combinação destes.

[036] Em uma modalidade da invenção os biossensores são um eletrodo de ouro revestido por camadas de agentes reticulantes consistidos de uma solução aquosa de entre 0,25 mmol L⁻¹ e 1,5 mmol L⁻¹ de ácido 3-mercaptopropiônico; uma solução de entre 2,0 e 8,0 mmol L⁻¹ de EDC e entre 5,0 e 12 mmol L⁻¹ de NHS; e a biomolécula detectora é uma solução contendo entre 0,5 e 3,0 ng μL⁻¹ e entre 0,25 e 2,0 ng μL⁻¹ de AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente.

[037] Em outra modalidade da invenção, os biossensores são um eletrodo de ouro revestido por camadas de agentes reticulantes consistidos de uma solução aquosa de entre 0,25 mmol L⁻¹ e 1,5 mmol L⁻¹ de ácido 3-mercaptopropiônico; uma solução de entre 2,0 e 8,0 mmol L⁻¹ de EDC, e entre 5,0 e 12 mmol L⁻¹ de NHS; e a biomolécula detectora é uma solução de concentração entre 1,0 e 5,0 ng μL⁻¹ do anticorpo anti-adipoQ.

[038] Devido à biomoléculas marcadoras utilizadas, os biossensores da presente invenção são empregados na detecção direta do hormônio adiponectina em uma amostra biológica por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e/ou voltametria cíclica (VC).

[039] Os sensores são capazes de detectar diretamente esse hormônio, dentro da faixa de concentrações usualmente

encontradas em plasma humano, ou seja, os biossensores da presente invenção detectam a uma concentração de entre 0,15 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do hormônio adiponectina presentes em uma amostra biológica.

[040] A invenção também trata do método de produção dos biossensores para detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica, que compreende as etapas de:

- (a) preparação do eletrodo;
- (b) revestimento; e,
- (c) imobilização da biomolécula detectora.

[041] Na etapa (a) um eletrodo pertencente ao grupo compreendido de lâminas metálicas de ouro, platina, prata, ou lâminas de vidro recobertas com óxido de índio e estanho (ITO) é limpo pela imersão do mesmo em uma solução de limpeza altamente oxidante contendo um ácido forte. Preferencialmente, a solução de limpeza tem uma razão de entre 3:1 e 4:1, respectivamente, de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

[042] Em seguida o eletrodo é submetido a entre 30 e 60 ciclos de voltametria em uma solução ácida, em uma janela de potenciais de -0,5 e + 2,0 V, em velocidade entre 200 e 400 mV s^{-1} e, posteriormente, entre 50 e 150 mV s^{-1} . Em seguida, os eletrodos são lavados em água e secos com um gás inerte.

[043] Preferencialmente, a solução ácida é uma solução entre 0,1 e 1,0 mol L^{-1} de ácido sulfúrico (H_2SO_4); a água usada é deionizada e, o gás inerte é o nitrogênio (N_2).

[044] Após a voltametria, os eletrodos limpos são submetidos ao revestimento com os agentes reticulantes.

Estes agentes viabilizam a adesão das biomoléculas detectoras ao eletrodo, viabilizando assim a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), tornando eficiente a interação do analito com a superfície do eletrodo.

[045] Os agentes reticulantes da etapa (b) são pertencentes ao grupo consistido de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 3-mercaptopropiônico (3 MPA) ou uma associação destes.

[046] Preferencialmente, na etapa (b) os eletrodos são imersos em uma solução de entre $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ácido 3-mercaptopropiônico durante entre 1 e 4 horas. Em seguida, o eletrodo é imerso em tampão fosfato salino pH 7,2 contendo entre $2,0$ e $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, e em tampão fosfato salino pH 7,2 contendo entre $5,0$ e 12 mmol L^{-1} de N-hidroxisuccinimida.

[047] Alternativamente, a etapa (b) ocorre pela imersão do eletrodo durante entre 1 e 3 horas em um solução contendo entre $0,1$ e 10 mmol L^{-1} de cistamina e um solvente. Preferencialmente, o solvente é um álcool C1-C4. Mais preferencialmente ainda, o solvente é o álcool etílico.

[048] Na última etapa do método da presente invenção, ocorre a imobilização da biomolécula detectora ao eletrodo. Nesta etapa, a biomolécula é um anticorpo anti-adiponectina Q (anti-adipoQ), um receptor transmembrana AdipoR1, um receptor AdipoR2, ou uma combinação destes.

[049] Em uma modalidade da invenção, a biomolécula detectora imobilizada no eletrodo são os receptores

transmembrana AdipoR1 e AdipoR2. A imobilização ocorre pela submersão do eletrodo revestido durante 1 e 5 horas em uma solução Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , pH 7,5 contendo entre 0,5 e $3,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e entre 0,25 e $2,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente. Em seguida os eletrodos são lavados em água e secos com um gás inerte.

[050] Em uma outra modalidade do método da invenção, a biomolécula detectora imobilizada no eletrodo são anticorpos adipoQ. A imobilização ocorre pela submersão do eletrodo durante entre 1 e 5 horas em uma solução tampão fosfato salino $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 contendo entre 1,0 e $5,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de anticorpos e 0,1% de soro albumina bovina (BSA). Em seguida os eletrodos são lavados em água e secos com um gás inerte.

[051] Preferencialmente, os eletrodos são cuidadosamente lavados com água deionizada e secos sob um fluxo de nitrogênio (N_2).

[052] O método de produção dos biossensores para detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica é realizado em temperatura entre 15 e 30°C , preferencialmente 25°C .

[053] Finalmente, a invenção trata ainda do Método de diagnóstico de disfunções metabólicas pela detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica, que é consistido da aplicação de uma amostra biológica sobre os biossensores da presente invenção.

[054] O método de diagnóstico é realizado por impedância eletroquímica (EIS) e/ou voltametria cíclica (VC) e, a amostra biológica é uma amostra de sangue ou urina.

[055] As disfunções metabólicas desta invenção são aquelas relacionadas aos níveis séricos do hormônio adiponectina, tais como, por exemplo, obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) e doenças cardiovasculares.

[056] Não obstante terem sido detalhadamente descritos, os objetos desta invenção poderão ser melhor compreendidos pelos exemplos que se seguem. Entretanto, cabe ressaltar que tais exemplos são meramente ilustrativos das concretizações da invenção, e que, portanto, não devem ser usados para delimitar os direitos do titular, que são somente delimitados pelo escopo das reivindicações.

[057] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

Exemplos

Exemplo 1 - Detecção direta de adiponectina por eletrodos de ouro modificados com cistamina:

[058] Para comprovar a inespecificidade da ligação entre cistamina e adiponectina, foi realizada a imobilização da adiponectina sobre a cistamina sem os receptores. Observa-se na Figura 2 que não houve aumento da resistência de transferência de carga na imobilização da adiponectina, mostrando que esta não tem interação alguma com a cistamina. Isso evidencia a necessidade de uma camada específica das moléculas AdipoQ, AdipoR1 e AdipoR2 para a detecção do hormônio adiponectina.

Exemplo 2 - Imobilização das biomolécula detectora com EDC/NHS:

[059] Para isso, os eletrodos são imersos em uma solução de ácido 3-mercaptopropiônico (entre 0,25 mmol L⁻¹ e 1,5 mmol L⁻¹, MiliQ) por um tempo entre 1 e 4 horas. O processo é então repetido com soluções de EDC (entre 2,0 e 8,0 mmol L⁻¹, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2) e NHS (entre 5,0 e 12 mmol L⁻¹, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2). A imobilização dos receptores transmembrana AdipoR1 e AdipoR2 ou dos anticorpos anti-adipoQ ocorre conforme a seguir: os receptores AdipoR1 e AdipoR2 são adsorvidos na superfície pela submersão do eletrodo de ouro por 1 a 5 horas em uma solução contendo entre 0,5 e 3,0 ng µL⁻¹ e entre 0,25 e 2,0 ng µL⁻¹ de AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente (Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5). Já para a imobilização dos anticorpos, os eletrodos são imersos por 1 a 5 horas em uma solução de concentração entre 1,0 e 5,0 ng µL⁻¹ (tampão fosfato salino (PBS) 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4; contendo soro albumina bovina (BSA) 0,1%). Após cada etapa, os eletrodos são cuidadosamente lavados em MiliQ e secos sob um fluxo de gás inerte. Todos os experimentos são realizados em temperatura ambiente (entre 15 e 30°C, preferencialmente 25°C).

[060] Este método apresentou resultados satisfatórios, sendo, assim, utilizado para o desenvolvimento do biossensor para a detecção do hormônio adiponectina.

Exemplo 3 - detecção direta de adiponectina por eletrodos de ouro modificados com EDC/NHS:

[061] Detecção de adiponectina com um eletrodo recoberto com 3 MPA/EDC-NHS; sem os agentes biosseletores do hormônio: o eletrodo foi colocado em contato com o hormônio, não foi observada mudança na resistência de

transferência de carga (Figura 3), indicando que não houve interação do hormônio com a plataforma. Assim, reforça-se a necessidade da existência, no filme biossensor, da camada contendo agentes seletivos (anti-adipoQ, adipoR1/adipoR2) para detecção eficiente de adiponectina.

Exemplo 4 - medidas eletroquímicas:

[062] Medidas eletroquímicas são realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato em uma cela de 3 eletrodos convencional. Os eletrodos modificados são usados como eletrodo de trabalho, enquanto uma placa de platina e um eletrodo de prata-cloreto de prata são utilizados como contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. Porém, o contra eletrodo pode ser composto de qualquer material inerte que permita conexão elétrica de forma que possa ser aplicado um potencial ao eletrodo de trabalho - como metais nobres, carbono e grafite. O eletrodo de referência pode ser substituído por qualquer um que ofereça um potencial constante, tais como eletrodo de calomelano saturado ou de hidrogênio. As medidas são feitas em tampão fosfato, 4,0 mmol L⁻¹ (podem ser utilizadas concentrações entre 2,0 mmol L⁻¹ e 8,0 mmol L⁻¹) de ferricianeto de potássio, em temperatura ambiente (15 a 30°C; preferencialmente 25°C). Antes de cada medida de impedância eletroquímica, uma voltametria cíclica (CV) é feita a fim de ativar o sensor (-0,4 e -0,2 a 0,8 e 1,0 V, 50 a 150 mV s⁻¹, 2 a 4 ciclos). Os experimentos de EIS são feitos em potencial zero. As medidas de VC são realizadas na janela de (-0,4 e -0,2 a 0,8 e 1,0 V, 50 a 150 mV s⁻¹, 2 a 4 ciclos. Antes de cada experimento, a solução é agitada para garantir sua homogeneidade.

REIVINDICAÇÕES

1 - Biossensores para a detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica caracterizados por serem consistidos de um eletrodo revestido com agentes reticulantes; e, uma biomolécula detectora.

2 - Biossensores, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por o eletrodo ser pertencente ao grupo que compreende lâminas metálicas de ouro, platina, prata, ou lâminas de vidro recobertas com óxido de índio e estanho (ITO); os agentes reticulantes serem pertencentes ao grupo consistido de cistamina, curcumina, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), o-acilisouréia ou uma associação destes; e, a biomolécula detectora ser um anticorpo anti-adiponectina Q (anti-adipoQ), um receptor AdipoR1, um receptor AdipoR2, ou uma mistura destes.

3 - Biossensores, de acordo com a reivindicação 2, caracterizados pelo fato de o eletrodo ser um eletrodo de ouro; os agentes reticulantes serem pertencentes ao grupo consistido de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 3-mercaptopropiônico (3 MPA) ou uma associação destes; e, a biomolécula detectora ser um anticorpo anti-adiponectina Q (anti-adipoQ), um receptor AdipoR1, um receptor AdipoR2, ou uma combinação destes.

4 - Biossensores, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizados pelo fato de serem um eletrodo de ouro revestido por camadas de agentes

reticulantes consistidos de uma solução aquosa de entre 0,25 mmol L⁻¹ e 1,5 mmol L⁻¹ de ácido 3-mercaptopropiônico; uma solução de entre 2,0 e 8,0 mmol L⁻¹ de EDC e entre 5,0 e 12 mmol L⁻¹ de NHS; e a biomolécula detectora ser uma solução contendo entre 0,5 e 3,0 ng µL⁻¹ e entre 0,25 e 2,0 ng µL⁻¹ de AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente.

5 - Biossensores, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizados pelo fato de os biossensores serem um eletrodo de ouro revestido por camadas de agentes reticulantes consistidos de uma solução aquosa de entre 0,25 mmol L⁻¹ e 1,5 mmol L⁻¹ de ácido 3-mercaptopropiônico; uma solução de entre 2,0 e 8,0 mmol L⁻¹ de EDC, e entre 5,0 e 12 mmol L⁻¹ de NHS; e a biomolécula detectora ser uma solução de concentração entre 1,0 e 5,0 ng µL⁻¹ do anticorpo anti-adipoQ.

6 - Método de produção dos biossensores para detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica, caracterizado por compreender as etapas de:

- (a) preparação do eletrodo;
- (b) revestimento; e,
- (c) imobilização da biomolécula detectora.

7 - Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por na etapa (a) um eletrodo pertencente ao grupo compreendido de lâminas metálicas de ouro, platina, prata, ou lâminas de vidro recobertas com óxido de índio e estanho (ITO) ser limpo pela imersão em uma solução de limpeza altamente oxidante contendo um ácido forte.

8 - Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de a solução de limpeza ter uma razão de entre 3:1 e 4:1, respectivamente, de ácido

sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

9 - Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de em seguida o eletrodo ser submetido a entre 30 e 60 ciclos de voltametria em uma solução ácida, em uma janela de potenciais de -0,5 e + 2,0 V, em velocidade entre 200 e 400 mV s^{-1} , posteriormente, entre 50 e 150 mV s^{-1} ; e, em seguida, os eletrodos serem lavados em água e secos com um gás inerte.

10 - Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de a solução ácida ser uma solução entre 0,1 e 1,0 mol L^{-1} de ácido sulfúrico (H_2SO_4); a água usada ser deionizada e, o gás inerte ser o nitrogênio (N_2).

11 - Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de agentes reticulantes da etapa (b) serem pertencentes ao grupo consistido de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 3-mercaptopropiônico (3 MPA) ou uma associação destes.

12 - Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de na etapa (b) os eletrodos serem imersos em uma solução de entre 0,25 mmol L^{-1} e 1,5 mmol L^{-1} ácido 3-mercaptopropiônico durante entre 1 e 4 horas; em seguida, o eletrodo ser imerso em tampão fosfato salino pH 7,2 contendo entre 2,0 e 8,0 mmol L^{-1} de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, e em tampão fosfato salino pH 7,2 contendo entre 5,0 e 12 mmol L^{-1} de N-hidroxisuccinimida.

13 - Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de alternativamente a etapa (b) ocorrer pela imersão do eletrodo durante entre 1 e 3 horas

em um solução contendo entre 0,1 e 10 mmol L⁻¹ de cistamina e um solvente.

14 - Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de o solvente ser um álcool C1-C4.

15 - Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de a biomolécula detectora imobilizada no eletrodo serem os receptores transmembrana AdipoR1 e AdipoR2; a imobilização ocorrer pela submersão do eletrodo revestido durante 1 e 5 horas em uma solução Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo entre 0,5 e 3,0 ng µL⁻¹ e entre 0,25 e 2,0 ng µL⁻¹ de AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente; e, em seguida os eletrodos serem lavados em água e secos com um gás inerte.

16 - Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de a biomolécula detectora imobilizada no eletrodo serem anticorpos adipoQ; a imobilização ocorrer pela submersão do eletrodo durante entre 1 e 5 horas em uma solução tampão fosfato salino 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4 contendo entre 1,0 e 5,0 ng µL⁻¹ de anticorpos e 0,1% de soro albumina bovina (BSA); e, em seguida os eletrodos serem lavados em água e secos com um gás inerte.

17 - Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 ou 16, caracterizado pelo fato de os eletrodos serem lavados com água deionizada e secos sob um fluxo de nitrogênio (N₂).

18 - Método de diagnóstico de disfunções metabólicas pela detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica, caracterizado por ser consistido de aplicar uma amostra biológica sobre os biossensores

definidos nas reivindicações 1 a 5.

19 - Método de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por ser realizado por impedância eletroquímica (EIS) e/ou voltametria cíclica (VC); e pelo fato de amostra biológica ser uma amostra de sangue ou urina.

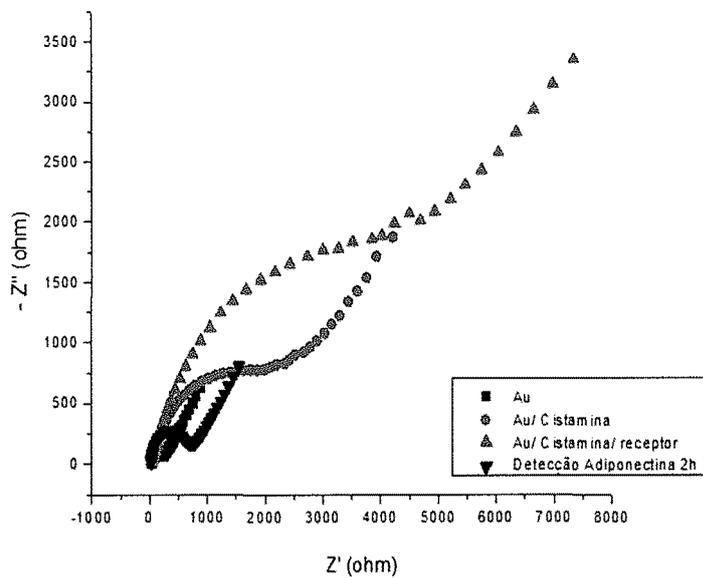


Figura 1

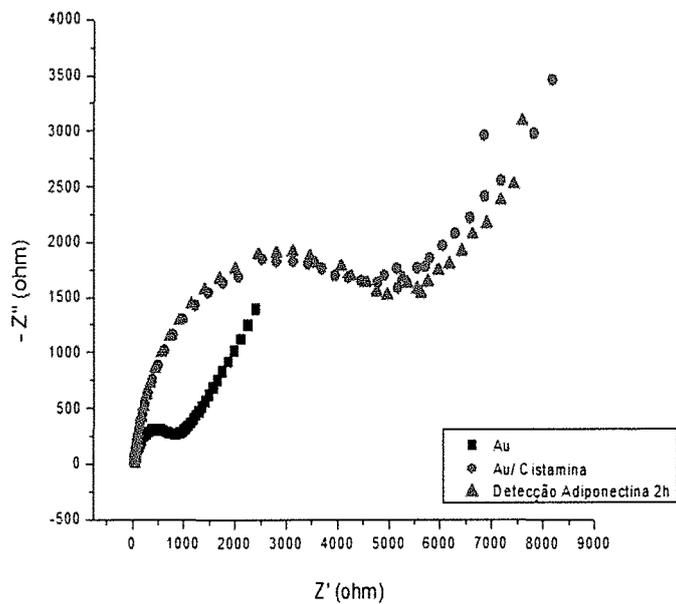


Figura 2

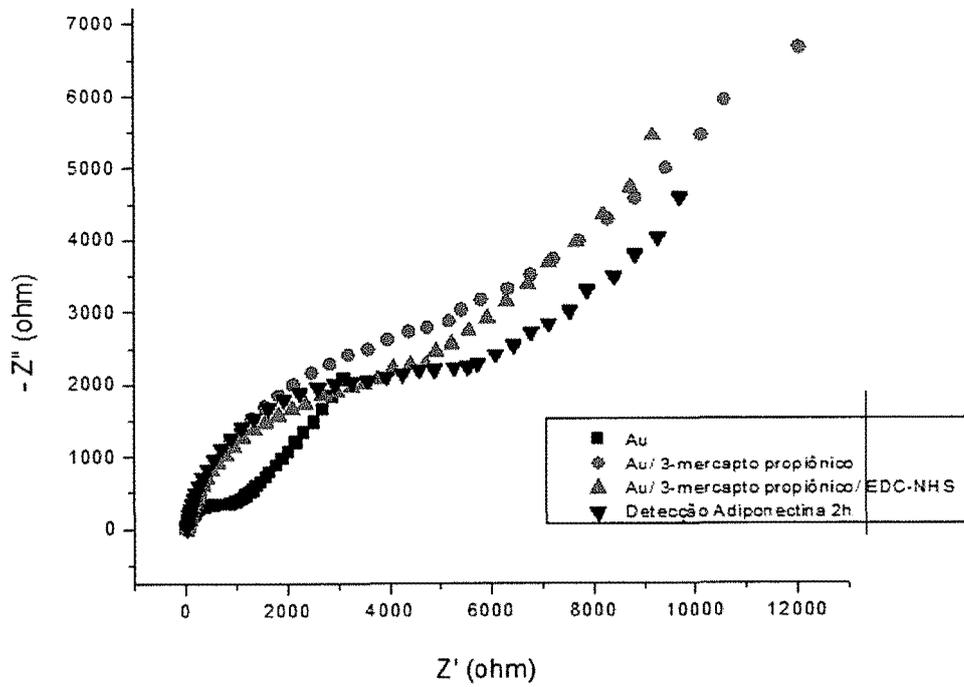


Figura 3

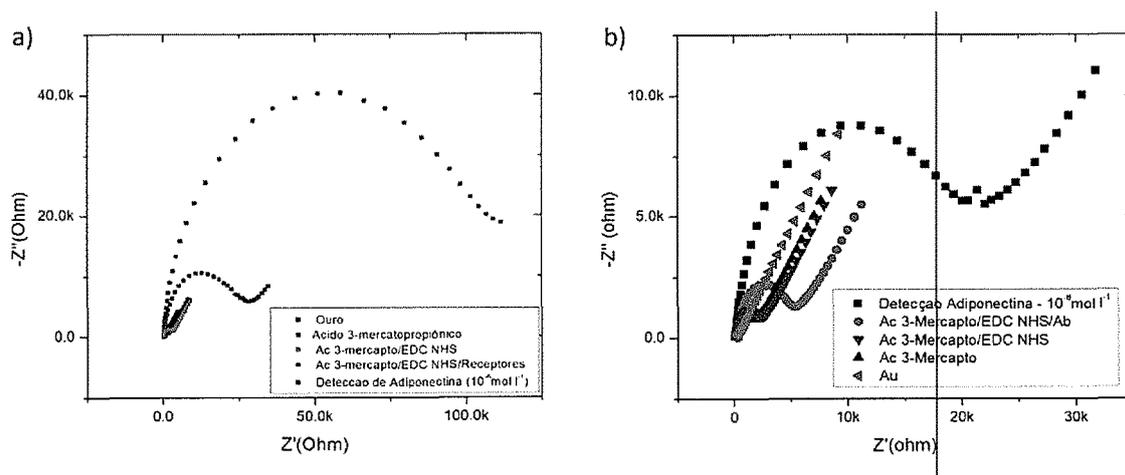
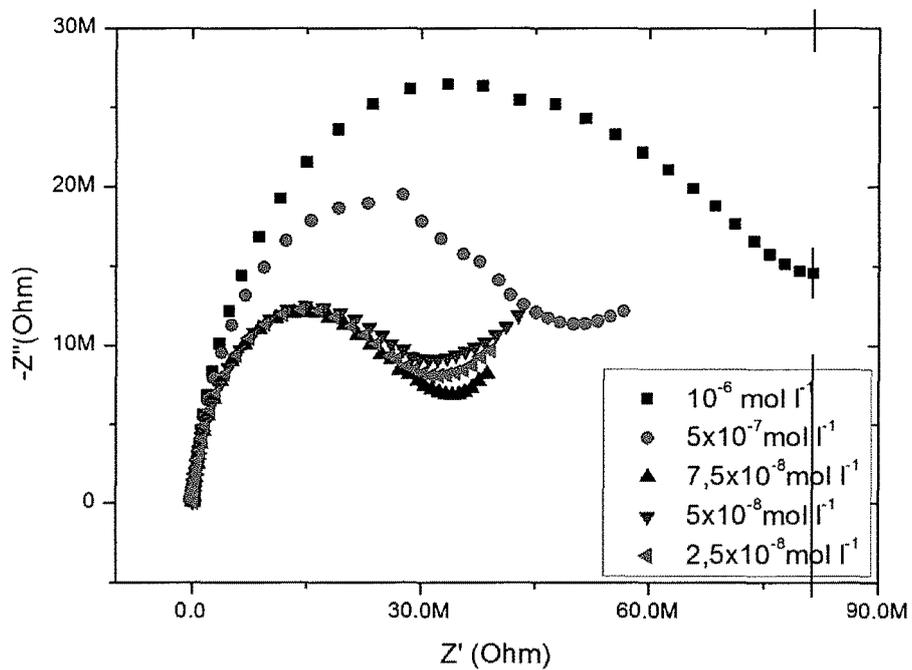
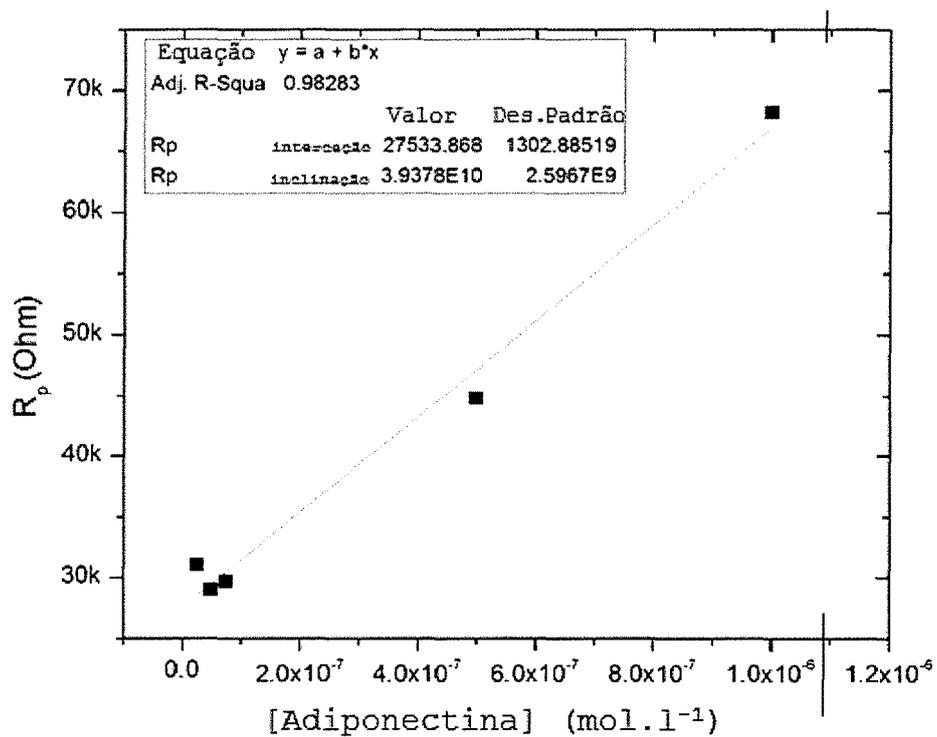


Figura 4

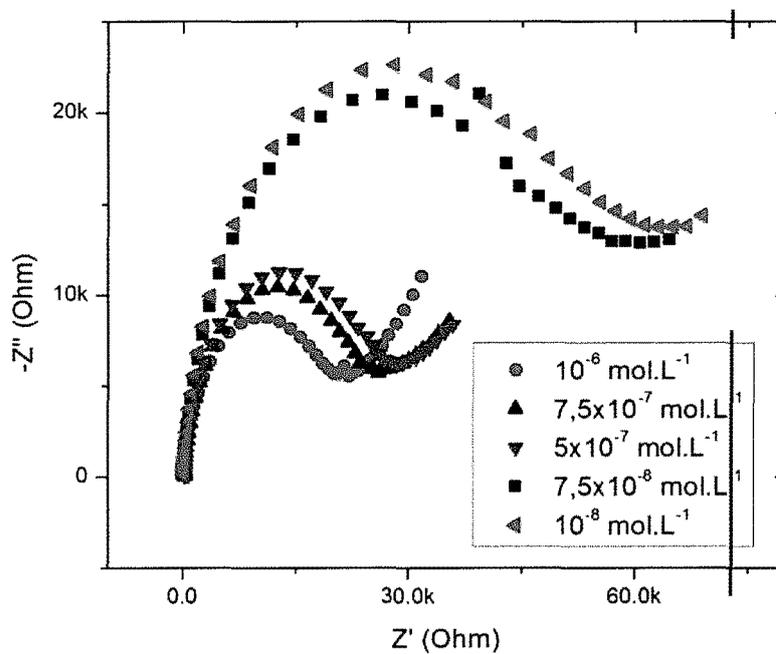


A

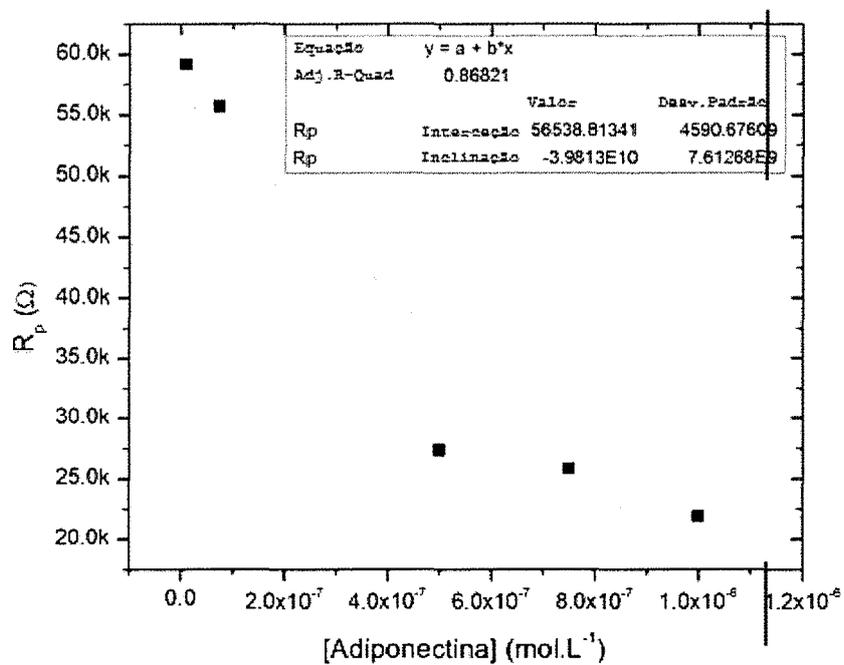


B

Figura 5

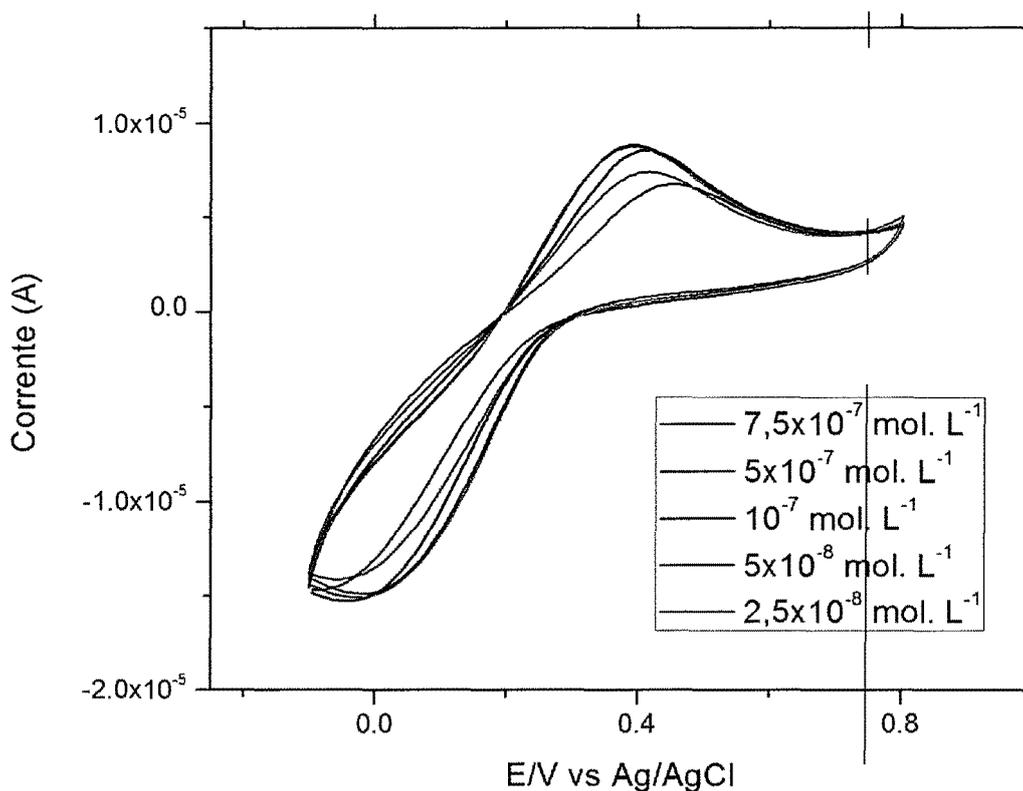


A

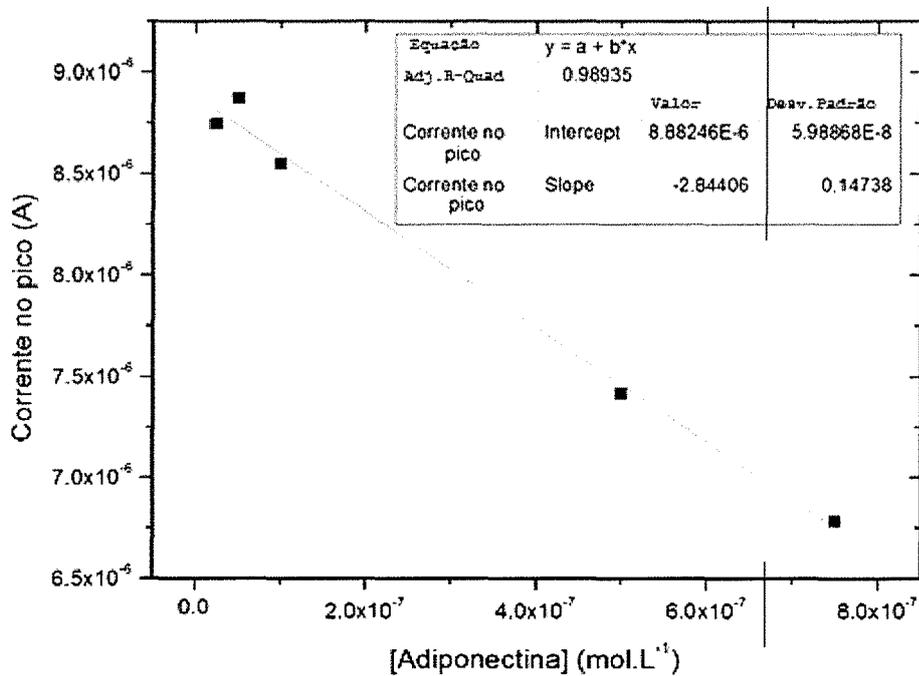


B

Figura 6

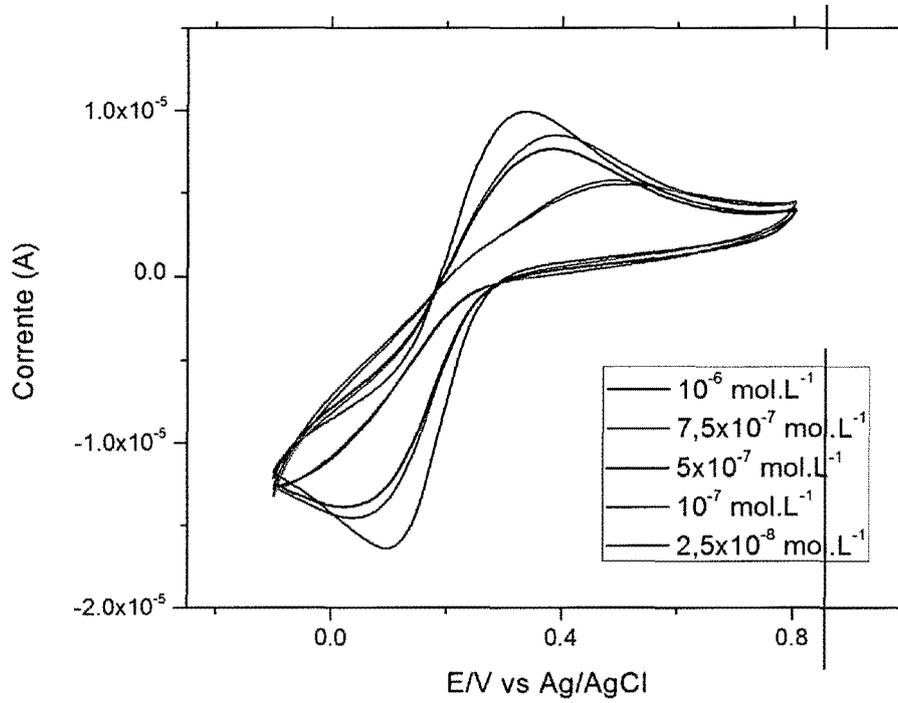


A

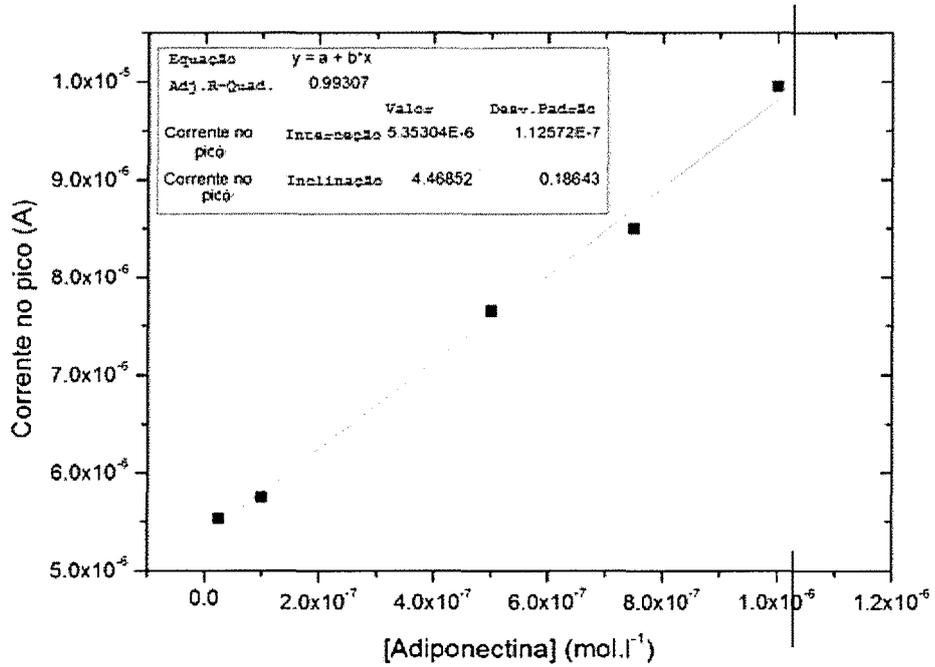


B

Figura 7



A



B

Figura 8

BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO
ADIPONECTINA EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA; MÉTODO DE PRODUÇÃO
DOS BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO
ADIPONECTINA; E MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DISFUNÇÕES
METABÓLICAS

RESUMO

A presente invenção se refere aos biossensores para a detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica que são consistidos de um eletrodo revestido com agentes reticulantes; e, uma biomolécula detectora; ao método de produção dos biossensores para detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica que compreende as etapas de preparação do eletrodo; revestimento; e, imobilização da biomolécula detectora; e, método de diagnóstico de disfunções metabólicas pela detecção e quantificação do hormônio adiponectina em uma amostra biológica.