

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

(21) PI 1102880-7 A2



★ B R P I 1 1 0 2 8 8 0 A 2 ★

(22) Data de Depósito: 29/06/2011

(43) Data da Publicação: 16/07/2013

(RPI 2219)

(51) Int.Cl.:

G01N 33/02

(54) Título: BIOSSENSOR, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ÍONS CÁLCIO

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): ANA PAULA ULIAN DE ARAUJO, ASSUERO FARIA GARCIA, EDSON GIULIANI RAMOS FERNANDES, FRANCISCO EDUARDO GONTIJO GUIMARÃES, NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA, VALTENCIR ZUCOLOTTI

(57) Resumo: BIOSSENSOR, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE IONS CÁLCIO. A presente invenção se refere a um biossensor para detecção de íons metálicos, particularmente íons cálcio, utilizando um eletrodo de vidro recoberto de ouro (BK7/Au) cuja superfície foi modificada com tiois por meio da técnica de monocamadas auto-organizadas (SAMs). Sobre estas superfícies preparadas, foram imobilizadas enzimas CaGc por meio de ligação covalente entre os grupos lisinas das mesmas e os grupos terminais ativados presentes na monocamada. A detecção dos íons cálcio é realizada segundo medidas elétricas de potencial elétrico, por meio da excitação elétrica na porta de um dispositivo do tipo SEGFET.

BIOSENSOR, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ÍONS CÁLCIO

Campo da invenção

A presente invenção se refere a um biossensor utilizado na detecção e quantificação de íons de cálcio, seja na área alimentícia, seja na área médica.

5 Descrição do estado da técnica

A imobilização de proteínas em filmes de ouro é uma técnica já conhecida que pode ser empregada para a construção de biossensores. Os biossensores possibilitam grandes avanços para a indústria de alimentos e na área ambiental, devido à capacidade de caracterização e quantificação de certos analitos de
10 interesse.

Um biossensor é definido como um dispositivo compacto capaz de fornecer informação analítica, quantitativa ou semiquantitativa, incorporando um elemento de reconhecimento biológico intimamente ligado a um transdutor. O transdutor é capaz de converter uma resposta bioquímica em sinal apropriado,
15 podendo este sinal ser: potenciométrico, amperométrico, condutométrico, óptico, piezelétrico ou entalpimétrico, segundo o princípio físico de transdução [1].

Um biossensor consiste essencialmente de dois elementos: um elemento bioseletivo e um transdutor. O elemento bioseletivo pode reconhecer o analito de interesse e, desta maneira, reagir ou-se ligar a ele gerando, por meio de uma
20 reação bioquímica, um sinal que pode ser um produto da variação de massa, absorção ou emissão de luz, emissão de calor, mudança de estado de oxidação, liberação de gases e etc. Já o elemento transdutor possibilita o controle de um processo ou fenômeno, ou pode realizar uma medição, através da conversão do sinal bioquímico em sinal elétrico.

25 A força motriz para o desenvolvimento de biossensores surgiu do crescente interesse na miniaturização destes dispositivos, particularmente para aplicação em sistemas de diagnóstico. Biossensores eletroquímicos são uma escolha corrente uma vez que os mesmos apresentam melhor sensibilidade e podem ser nanoestruturados.

30 A determinação de íons metálicos como o Cálcio é de fundamental

interesse em muitos setores industriais. Um exemplo comum é a questão do leite enriquecido, importante medida adotada em programas de combate à desnutrição infantil. O íon Cálcio está presente no organismo humano em concentrações de cerca de 2% (4,5 a 5,4 mg/dL em plasma sanguíneo) sendo um fator importante na formação óssea do organismo. O íon cálcio também está presente em outros processos como coagulação sanguínea e batimento cardíaco. Ele também pode ser encontrado na urina, em concentrações variando entre 50 e 150 mg/24 hs podendo atingir até 300 mg/24 hs em dietas enriquecidas [2-3]. Ainda como íon de sinalização intracelular, o íon Ca^{2+} está envolvido em muitas funções celulares (como a fertilização, contração, diferenciação celular, proliferação, apoptose e até mesmo no surgimento do câncer, em casos de falta de regulação).

Os métodos usuais para detecção de íons metálicos baseiam-se em medidas de fluorescência.

A patente US 5,154,890 intitulada "Fiber optic potassium ion sensor" descreve um sensor para detectar a concentração de íons potássio. O referido sensor compreende a molécula 2,2-bis(3,4-(15-crown-5)-2-nitrofenilcarbamoximetil) tetradecanol-14 conhecida como BME-44 que complexa seletivamente os íons potássio. A molécula BME-44 se liga, através do seu sítio de ligação, a um agente fluorescente como Rodamina-B e depois é imobilizada em gel de acrilamida, complexando os íons de potássio de forma que a intensidade da fluorescência aumente. A mudança na intensidade da fluorescência é uma medida direta da concentração de íons potássio.

O primeiro indicador fluorescente de cálcio foi o 2-((2-(bis(carboximetil)amino)-5'-metilfenoxi)metil)-6-metoxi-8-(bis(carboximetil)amino)quinolina, no qual a ligação do cálcio a esta molécula causa um aumento na intensidade do sinal de fluorescência [4].

A patente US 5,496,522 intitulada "Biosensor and chemical sensor probes for calcium and other metal ions" descreve um sensor químico e sondas biosensoras para medir concentrações baixas de metais e íons metálicos em amostras complexas tais como: fluidos biológicos, células vivas e amostras

ambientais. Mais especificamente, a invenção se refere a sondas sensoras químicas contendo o agente fluorescente Indo-1, Fura-2 e Quin-2 para medir baixas concentrações de cálcio, cádmio, magnésio e outros. Embora sensores baseados em métodos fluorimétricos sejam muito sensíveis podendo distinguir 5 sinais inferiores a 1 μM , esta técnica necessita de um fluorímetro e, para uso industrial, se mostra pouco prática.

A proteína Calgranulina C recombinante (CaGC), também conhecida como S100A12, é uma proteína que sofre mudanças conformacionais pela ligação de cálcio, dando suporte ao seu potencial envolvimento em eventos 10 celulares de transdução de sinal dependentes de Ca^{2+} . In vitro, essas mudanças conformacionais sofridas pela ligação do cálcio tornam a CaGC uma atraente molécula para ser usada em biossensores. A CaGC possui um sítio ligante adicional de Zn^{2+} , comum para a maioria das proteínas da família S100 da qual ela faz parte. A ligação do Zn^{2+} induz uma profunda variação nas propriedades da 15 proteína em se ligar ao Ca^{2+} . Na ausência de Zn^{2+} , a CaGC se liga a um íon Ca^{2+} por monômero, enquanto que na presença de Zn^{2+} , a proteína se liga a dois íons por monômero, sendo consistente com a presença de dois motivos ligantes de cálcio ("EF-hands") preditos na sua seqüência primária [5]. Sendo os sítios de ligação dos íons cálcio e zinco separados, podemos melhorar a eficiência da 20 ligação e, conseqüentemente, de detecção de cálcio quando trabalhamos na presença de zinco. Ainda é importante salientar que a CaGC não se liga a outros metais bivalentes que não sejam o cálcio, garantindo especificidade para a detecção.

O Transistor de Efeito de Campo Íon-seletivo (ISFET) foi apresentado 25 pela primeira vez por P. Bergveld, em 1970 [6]. Um ISFET é um dispositivo eletrônico íon-seletivo usado para medir íons H^+ e outros íons, sendo que a troca da camada dielétrica pode melhorar a sensibilidade do dispositivo. Tal dispositivo se baseia em um MOSFET sem a metalização da porta onde a mesma é posta diretamente em contato com uma solução. Uma das desvantagens deste tipo de 30 dispositivo é a isolamento entre o dispositivo e o meio químico. Além disso, efeitos

ópticos também podem comprometer a sensibilidade dos mesmos [7].

Em 1983, J. Van der Spiegel *et al.* publicaram o primeiro artigo utilizando uma nova configuração ao sistema proposto por Bergveld onde o FET é isolado do meio químico, o Transistor de Efeito de Campo de Porta Estendida (EGFET) [8].

Chi *et al.* propuseram uma estrutura de porta estendida separada sensível a íons H^+ (SEGFET) onde a estrutura original foi dividida em duas partes: um eletrodo íon-seletivo conectado à porta, por meio de um fio metálico, de um MOSFET comercial [9-10]. Este tipo de estrutura permite uma melhor estabilidade em longo prazo e um custo baixo de produção uma vez que se utilizam dispositivos comerciais já produzidos em larga escala como elemento transdutor.

A publicação internacional WO 88/08972 descreve um instrumento de medição que possui uma proteína imobilizada, de forma reversível de ligação, seletiva no transistor IGFET localizado em um sensor. Com o sensor imerso na solução, a proteína liga-se a um componente selecionado da solução produzindo um efeito sobre uma corrente fluindo através do IGFET. Apesar do objetivo deste documento ser semelhante ao da presente invenção, tal documento descreve um dispositivo FET com arquitetura IGFET, onde o eletrodo está no próprio semicondutor. Já na presente invenção, é proposta uma arquitetura SEGFET, onde o eletrodo está desacoplado do dispositivo sensor. Nesse caso, há a vantagem de termos o eletrodo livre para ser imerso na solução que se deseja detectar cálcio. Além disso, na referida publicação não é mencionada especificamente a proteína que estamos utilizando. Na invenção, usamos especificamente a proteína CaGC, para detecção específica de íons cálcio. Esse analito não é mencionado no referido documento.

Embora filmes finos compostos de materiais de alta impedância sejam apreciáveis a dispositivos íon-seletivos baseados em estruturas FET (ISFETs), filmes com melhor condutividade e sensibilidade se mostram mais adequados aos dispositivos do tipo SEGFET. A imobilização de uma proteína diretamente ao eletrodo de ouro revestido de uma monocamada molecular automontada

funcionalizada possibilita um tempo de resposta rápido uma vez que a resposta do biossensor eletroquímico depende da transferência de massa do analito até o biorreceptor imobilizado.

Na literatura ainda não foram publicados biossensores específicos para íons metálicos como o Ca^{2+} baseados em estruturas FET com enzimas imobilizadas. Contudo, este protótipo para o sensoriamento de íons metálicos oferece vantagens, tais como: simplicidade do biossensor, possibilidade de miniaturização, portabilidade, baixo custo e a não necessidade de pessoal treinado para a utilização do mesmo. Portanto, o biossensor desenvolvido se mostra promissor para a quantificação do íon metálico Ca^{2+} com detecção de até 30 vezes o valor da concentração de cálcio no leite comercial (cerca de 1,2 g/L).

Sumario da invenção

A presente invenção se refere a um biossensor compreendendo uma proteína CaGC imobilizada em uma monocamada automontada de tiol, como elemento bioseletivo e um transistor de efeito de campo (FET) pelo qual as medições são realizadas, como elemento transdutor. O biossensor é utilizado para detecção específica de íons cálcio em meio aquoso.

Breve descrição das figuras

A figura 1 mostra as etapas de fabricação do biossensor.

A figura 2 mostra o esquema do aparato de medição do biossensor utilizando configuração SEGFET.

A figura 3 é um gráfico do sinal de saída expresso como uma variação de tensão em relação à quantidade de íons cálcio presentes na solução.

Descrição detalhada da invenção

Preparação da proteína

A preparação da proteína é realizada mediante duas etapas principais, conforme mostrado na figura 1. Na etapa A, ocorre a formação de uma monocamada automontada de tiol, enquanto que na etapa B é realizada a imobilização da proteína CaGC por ligação covalente através da imersão do substrato em solução contendo esta proteína.

Na etapa A, o eletrodo de vidro (BK7) recoberto com ouro, ou seja, o substrato de BK7/Au, previamente limpo, é imerso por 24 horas em uma solução etanólica de ácido mercaptoundecanóico a 1,5 mM (11-mercaptoundecanoic acid, MUA). Em seguida, o substrato é lavado com uma solução recém preparada de etanol:água deionizada (75:25 v/v) para a retirada do excesso de material e seco em fluxo de N₂. Uma monocamada automontada de MUA é então formada. A monocamada de tiol é incubada em uma solução tampão contendo 100 mM de NHS (N-hydroxysuccinimide) e 100 mM de EDC (N-ethyl-N-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide) por aproximadamente 16 horas, durante a noite, para a ativação dos grupos terminais da monocamada do éster de NHS.

Para a imobilização covalente da CaGC (etapa B), os eletrodos foram lavados em solução tampão e imediatamente incubados em solução enzimática de CaGC a 2 mg/mL por 3 horas. Os grupos lisinas presentes na proteína se ligam com o éster formando uma ligação amida. A Figura 1 apresenta o esquema dos passos descritos acima.

Método de medição de cálcio usando o biossensor

A Figura 2 apresenta o esquema utilizado na transdução do biossensor. O sistema de medida (SEGFET) é constituído de um amplificador operacional de instrumentação comercial, operando como um seguidor de tensão e de um eletrodo de referência Ag/AgCl. Assim, a tensão de entrada é igual à tensão de saída. O eletrodo de referência é aterrado e o eletrodo de trabalho é o substrato de ouro contendo a enzima imobilizada (conforme descrito acima). O circuito elétrico é, então, fechado pela imersão de ambos os eletrodos, eletrodo de trabalho e eletrodo de referência, na solução de medida (que pode ser água deionizada ou solução tampão de baixa força iônica). Após estabilização do sistema, para calibração do mesmo, alíquotas sucessivas de uma solução padrão de cloreto de cálcio, de determinada concentração, foram adicionadas à solução de medida sob agitação suave. A agitação serve para homogeneização da solução e pode ser feita por meio de uma barra magnética. As medidas foram realizadas a cada adição de solução contendo íons cálcio, após homogeneização

da solução, sendo o sinal de saída expresso como uma variação de tensão que é proporcional à quantidade de íons cálcio presentes na solução (figura 3). Mais especificamente, a detecção dos íons cálcio é realizada segundo medidas elétricas de potencial elétrico, por meio da excitação elétrica na porta do dispositivo SEGFET, sendo o sinal resultante representado por uma curva Diferença de Potencial Elétrico em Relação ao Branco (solução isenta do íon) em relação ao Tempo, onde após adição de amostras do analito, há o aparecimento de picos intensos dos quais podem ser relacionados com as concentrações dos analitos em um simples eixo de coordenadas do tipo ΔV versus Concentração.

Quanto mais íons cálcio são capturados pela proteína, mais alta é a carga elétrica que esses íons geram na superfície do eletrodo e maior o valor da corrente. Embora o sistema apresente sinal após a primeira adição de solução, verificou-se que o sistema pode ser quantitativo apenas para a primeira adição. O sinal de resposta (V_0) foi medido por meio de um multímetro digital conectado à saída do amplificador operacional de instrumentação e foi expresso pela variação de tensão com o tempo.

Na figura 2 são mostradas as conexões do amplificador operacional de instrumentação e o esquema de medição.

As etapas de medição podem, portanto, ser definidas pela: a) adição de alíquota de solução padrão de cloreto de cálcio; b) homogeneização da solução por agitação mecânica; c) tomada da medida.

Referencias

1. IUPAC: <http://old.iupac.org/reports/1999/7112thevenot/>, último acesso 19/07/2010.

2. Onifade, K. U., Mohammad, A. A., Petersen, J. R. and Okorodudu, A. O. Ionized calcium: indications and advantages of its measurement, **J. Lab. Med.** 29(4) (2005), pp. 235–240.

3. Heilberg, I. P. and Schor, N. Calciose renal: causas, avaliação e tratamento médico, **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 50(4) (2006), pp. 823-831.

4. Tsien, R. Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity

against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures, **Biochemistry** 19(11) (1980), pp. 2396-2404.

5. E.C. Dell'Angelica, C.H. Schleicher, J.A. Santome, Primary structure and binding proteins of cargranulin C, a novel S100-like calcium-binding protein from pig granulocytes, **J. Biol. Chem.** 269 (1994) 28929–28936.

6. BERGVELD, P. Development of an ion sensitive solid-state device for neurophysiological measurements, **IEEE Trans. Biomed. Eng. BME-17**, p. 70-71, 1970.

7. Chou, J. C., Chang, J. L., Wu, C. L. pH and procaine characteristics of the extended gate field effect transistor based on ITO glass **Jpn. J. Appl. Phys.** 44 (2005), pp.4838-4842.

8. Van der Spiegel, J.; Lauks, I.; Chan, D. Babic, P. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane. **Sens. Act. B** 4 (1983), pp. 291-298.

9. Chi, L. L., Yin, L. T., Chou, J. C., Chung, W. Y., Sun, T. P., Hsiung, K. P., Hsiung, S. K. Study on separative structure of EnFET to detect acetylcholine, **Sens. Act. B** 71 (2000), pp. 68-72.

10. Chi, L. L., Chou, J. C., Chung, W. Y., Sun, T. P., Hsiung, S. K. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane, **Mater. Chem. Phys.** 63 (2000), pp. 19-23.

REIVINDICAÇÕES

1. Biossensor para detecção de íons cálcio **caracterizado** por compreender um elemento bioseletivo e um transdutor.

2. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do elemento bioseletivo ser a proteína CaGC imobilizada em monocamada automontada de tiol.

3. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do transdutor ser um dispositivo SEGFET.

4. Método de medição de cálcio utilizando o biossensor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, **caracterizado** por compreender as etapas de:

a) adicionar alíquotas de solução padrão de cloreto de cálcio;

b) homogeneizar a solução por agitação mecânica; e

c) fazer a tomada da medida.

5. Uso do biossensor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, **caracterizado** por ser para a medição de cálcio.

FIGURA 1

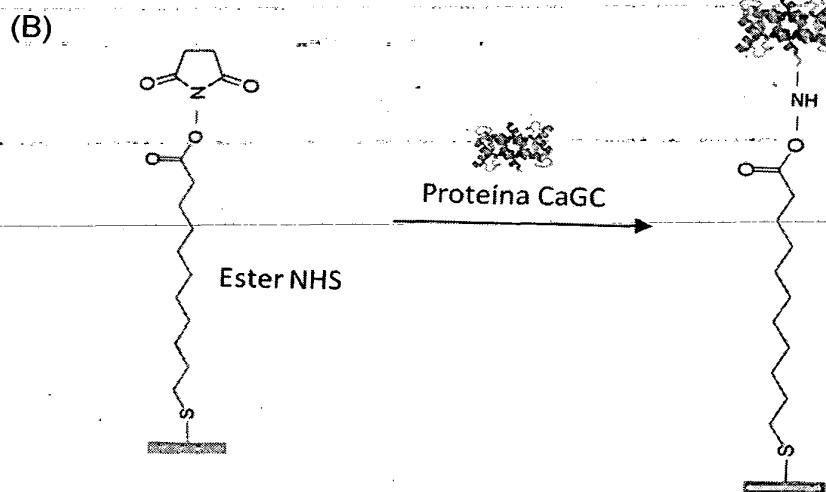
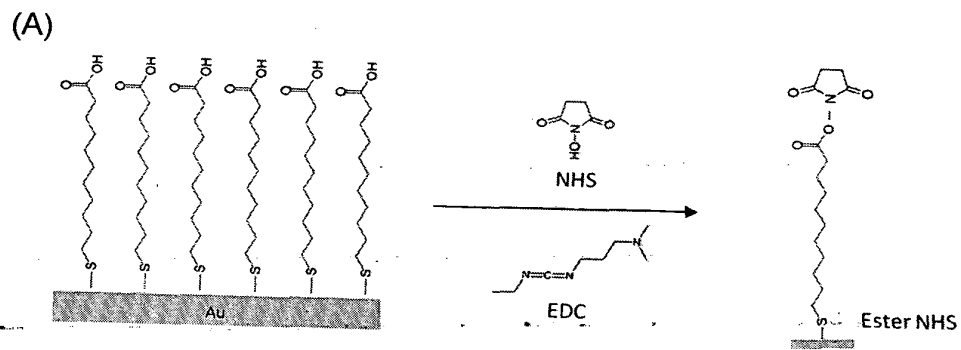


FIGURA 2

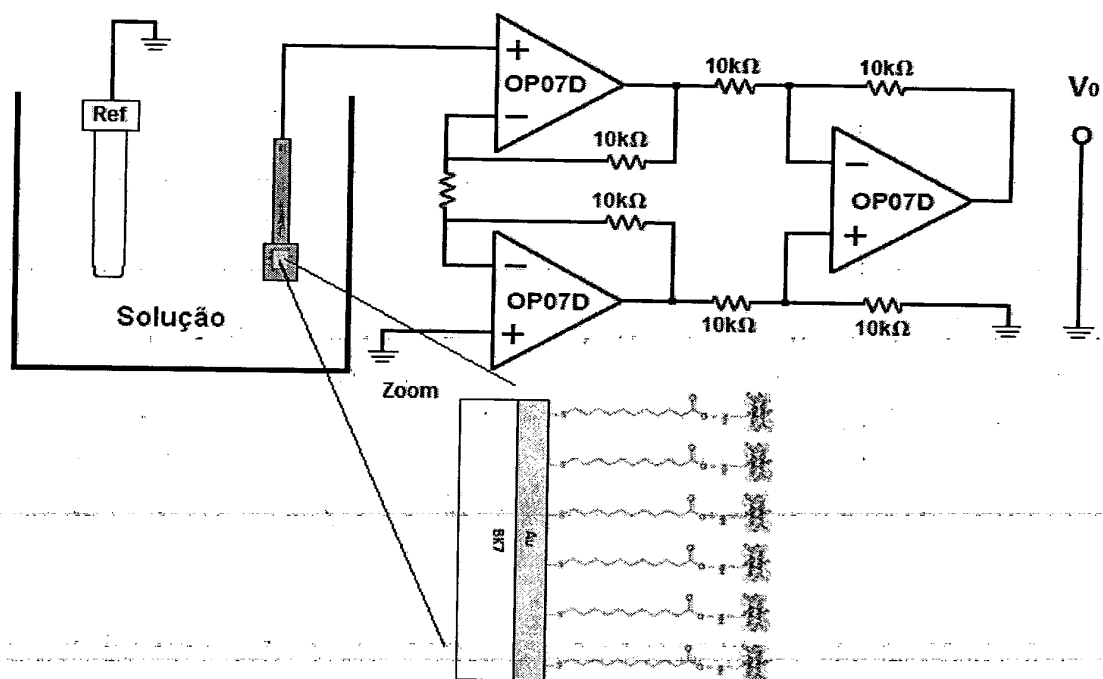
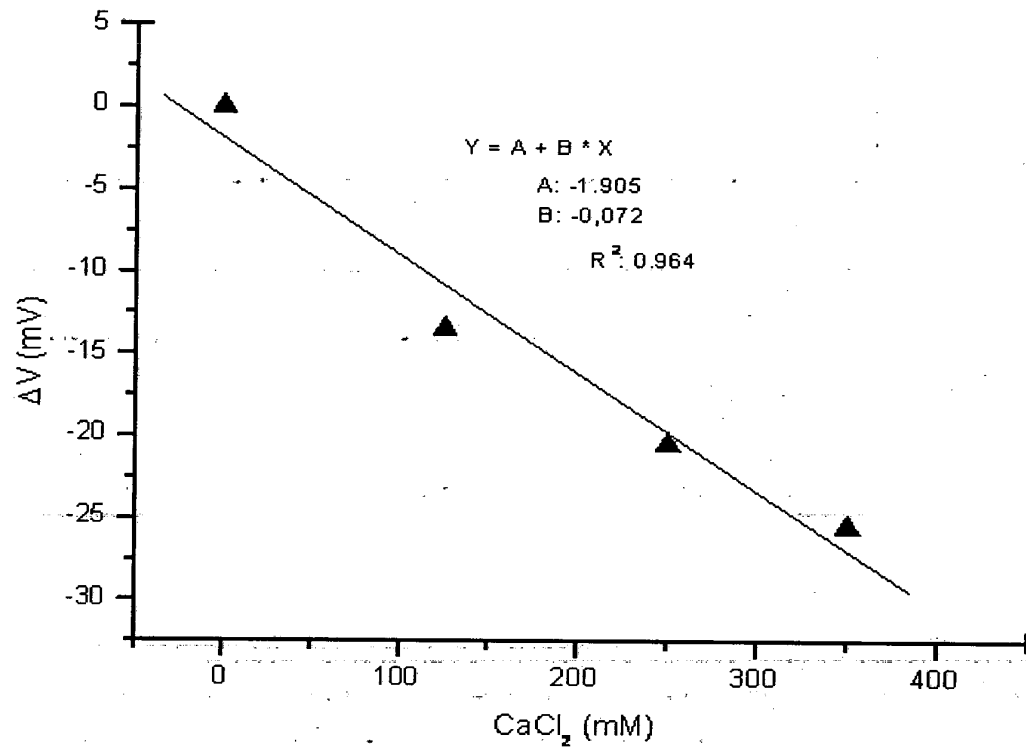


FIGURA 3



Resumo**BIOSSENSOR, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ÍONS CÁLCIO**

A presente invenção se refere a um biossensor para detecção de íons metálicos, particularmente íons cálcio, utilizando um eletrodo de vidro recoberto de ouro (BK7/Au) cuja superfície foi modificada com tiois por meio da técnica de monocamadas auto-organizadas (SAMs). Sobre estas superfícies preparadas, foram imobilizadas enzimas CaGc por meio de ligação covalente entre os grupos lisinas das mesmas e os grupos terminais ativados presentes na monocamada. A detecção dos íons cálcio é realizada segundo medidas elétricas de potencial elétrico, por meio da excitação elétrica na porta de um dispositivo do tipo SEGFET.