



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

(21) BR 102015025909-3 A2

(22) Data do Depósito: 09/10/2015

(43) Data da Publicação: 16/05/2017



(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ELETRODO DE TRABALHO, BIOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, USO E MÉTODO DE MEDIÇÃO DO MESMO

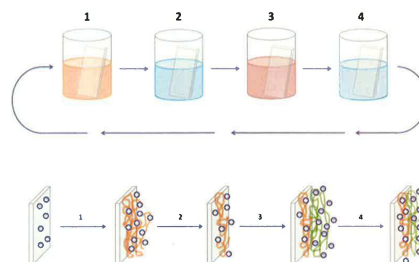
(51) Int. Cl.: G01N 27/327; G01N 27/30

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

(72) Inventor(es): VALTENCIR ZUCOLOTTO; REGINA PEKELMANN MARKUS; BRUNO CAMPOS JANEGITZ; JULIANA CANCINO BERNARDI; CAMILA BARBOSA BRAMORSKI; LAÍS CANNIATTI BRAZACA

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

(57) Resumo: Resumo PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ELETRODO DE TRABALHO, BIOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, USO E MÉTODO DE MEDIÇÃO DO MESMO A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio melatonina composto por uma plataforma de substrato coberta com pelo menos uma camada de filme fino PANI/PVS (polianilina/ácido polivinil sulfônico) construído através da técnica LbL (layer-by-layer). Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica (VC) para a detecção do hormônio melatonina, compreendendo 3 eletrodos independentes: de referência, contra-eletrodo e de trabalho, em que o último é obtido conforme processo aqui descrito. Ainda, a invenção refere-se ao método de medição do biossensor aqui descrito e ao seu uso para a detecção do hormônio melatonina, assim como para maior precisão nos diagnósticos de doenças relacionadas à melatonina, como também para uma melhor dosagem dos remédios utilizados no tratamento destas.



**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ELETRODO DE TRABALHO, BIOSENSOR
ELETROQUÍMICO BASEADO NA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA,
USO E MÉTODO DE MEDIÇÃO DO MESMO**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se aplica no campo da ciência médica, de forma mais específica na área de diagnósticos e faz referência a um processo de obtenção de um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio melatonina composto por uma plataforma de substrato coberta com pelo menos uma camada de filme fino PANI/PVS (polianilina/ácido polivinil sulfônico) construído através da técnica LbL (*layer-by-layer*).

[002] Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica (VC) para a detecção do hormônio melatonina, compreendendo 3 eletrodos independentes: de referência, contra-eletrodo e de trabalho, em que o último é obtido conforme processo aqui descrito.

[003] Adicionalmente, a invenção refere-se ao método de medição do biossensor aqui descrito e ao seu uso para a detecção do hormônio melatonina, assim como para maior precisão nos diagnósticos de doenças relacionadas à melatonina, como também para uma melhor dosagem dos remédios utilizados no tratamento destas.

Fundamentos da invenção:

[004] A melatonina é um hormônio presente na maioria das plantas e animais, e acredita-se que sua sinalização biológica seja uma das mais antigas existentes na natureza. Em seres humanos, a biossíntese da melatonina

é realizada de forma rítmica pela glândula pineal e retina e de forma tônica constitutiva pelo trato gastrointestinal.

[005] Este hormônio também é sintetizado por células da medula óssea, linfócitos, macrófagos e células mono e polimorfonucleares do colostro quando ativadas por agentes patogênicos ou estimuladas por injúrias abióticas.

[006] A melatonina possui uma estrutura simples e devido ao seu caráter anfifílico, atravessa facilmente as membranas celulares através de difusão simples. Sua atividade biológica pode ser mediada por receptores MT1 e MT2 localizados na membrana celular e mitocondrial ou por interações independentes de receptor. Ainda, a mesma e metabólitos têm capacidade anti-oxidante.

[007] O principal ponto de regulação da melatonina na glândula pineal é a transformação de serotonina em N-acetilserotonin catalisada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Esta é influenciada pelo complexo sistema endógeno do ritmo circadiano e depende dos níveis de luminosidade.

[008] Em humanos, a transcrição de AA-NAT é constitutiva. O ritmo circadiano dos núcleos supraquiasmáticos determina a ativação da enzima durante a fase de escuro. A luz bloqueia os núcleos supraquiasmáticos resultando na inibição da síntese de melatonina. Quando há a presença de AA-NAT ativa o passo limitante é a conversão de N-acetilserotonina em melatonina catalisada pela enzima acetilserotonina- metiltransferase (ASMT).

[009] Diversos estudos vêm mostrando que doenças tais como a ansiedade, a depressão sazonal, hipertensão, diabetes tipo 2 e o aumento do risco de desenvolvimento de

alguns tipos de câncer, tais como câncer de mama, estão relacionadas a níveis anormais de melatonina. A mesma está também envolvida no retardo do envelhecimento devido a sua habilidade de combater radicais livres e também pode afetar algumas ações genômicas.

[010] Padrões moleculares associados a patógenos como bactérias e fungos, bem como padrões moleculares associados a perigo e dano, como citocinas pró-inflamatórias e moléculas produzidas por alteração da matriz extracelular inibem a produção de melatonina por glândulas pineais de roedores em cultura e o pico noturno de melatonina em humanos. Na ausência de melatonina ocorre uma facilitação da montagem de respostas inflamatórias não necessárias e que são base para a geração de doenças neurodegenerativas e câncer.

[011] Muitos estudos apoiam a administração exógena da melatonina concomitante com outros tratamentos em pacientes com transtorno do ciclo vigília-sono, insônia, doenças neurodegenerativas, gastrointestinais, oculares, cardiovasculares, imunológicas, dano oxidativo e câncer.

[012] Considerando que a melatonina pode ser produzida por células imunocompetentes quando estimuladas, em muitos casos quando isto não ocorre, a administração exógena desta indolamina tem-se mostrado de alta relevância. A melatonina pode ser aplicada como agente quimioterápico e como agente anti-inflamatório, além de sua aplicação já tradicional na regulação do ciclo vigília-sono. Nesta última aplicação, relatos de aumento da sonolência diurna podem estar relacionados com doses acima do necessário.

[013] Dessa maneira, a quantificação da melatonina plasmática possui grande potencial para facilitar o diagnóstico destes males, o que hoje é comumente realizado de maneira subjetiva no caso de depressão ou ansiedade. Além disso, o diagnóstico destes com bases biológicas ajudam a garantir que o paciente receba as doses corretas dos medicamentos, atingindo, assim, melhores resultados no tratamento.

[014] Atualmente, os métodos mais utilizados para a quantificação de melatonina em fluidos biológicos são a técnica ELISA e os radioimunoensaios. Apesar de estes atualmente possuírem o potencial de detectar os baixíssimos níveis do hormônio no sangue e na saliva, apresentam alta taxa de reações cruzadas, dificultando muito a quantificação exata.

[015] Além disso, estes métodos apresentam diversas desvantagens, tais como alto custo, demora dos resultados, necessidade de preparação de amostra, além da necessidade de pessoal e de equipamentos especializados. No caso do radioimunoensaio, ainda, o pesquisador deve tratar o material radioativo após a determinação da concentração de melatonina.

[016] Assim, o desenvolvimento de técnicas de menor custo, rápidas, mais simples e que exijam menor preparação de amostra são de grande interesse à área médica e de diagnósticos. Desse modo, os biossensores apresentam grande potencial para resolver este impasse.

[017] Um dos aspectos mais críticos de um sensor é o seu sistema de transdução. Este pode ser, por exemplo, óptico, calorimétrico, acústico ou eletroquímico. O sistema

eletroquímico apresenta diversos atrativos, tais como sua rapidez, simplicidade e capacidade de desenvolver dispositivos portáteis e de baixo custo.

[018] Entre as diversas técnicas eletroquímicas, a voltametria cíclica é um método que consiste na aplicação de um potencial que varia de forma linear dentro de uma janela de potencial, em ciclos, e na obtenção da corrente-resposta em cada potencial distinto. Permite, assim, o monitoramento de reações de óxido-redução de espécies interessantes para a detecção. Pode-se associar a magnitude da corrente com a concentração das espécies participantes da reação de óxido redução em solução e, assim, realizar a quantificação dos analitos de interesse.

[019] Para que o eletrodo seja mais eficiente e seletivo, este deve ser revestido através da construção de filmes finos. Diversas técnicas podem ser utilizadas, entre elas a técnica de Langmir Blodgett, Lb, LbL e SAM (*self-assembled monolayers*).

[020] O método LbL apresenta vantagens devido à sua simplicidade, versatilidade e capacidade de controle de espessura de camada. Baseia-se principalmente nas interações eletrostáticas, e consiste na deposição de camadas de materiais com carga oposta.

[021] Filmes LbL apresentam diversas aplicações, tais como a construção de células fotovoltaicas, células solares e de combustível, FET, MOSFET, superfícies superhidrofóbicas, nanoreatores, como também biossensores.

[022] Entre os polímeros condutores, a polianilina (PANI) apresenta propriedades de processamento atrativas, tais como baixa massa molecular, alta flexibilidade

mecânica e baixo custo. Possui três estados distintos de oxidação, os quais apresentam diferentes cores e respostas distintas quando dopadas com ácidos ou bases. Sua aplicação na área de biossensores é de grande interesse pelo potencial de auxiliar na transferência de elétrons nas reações de óxido-redução.

[023] Dessa maneira, este polímero pode auxiliar na diminuição do potencial de oxidação da espécie de interesse, reduzindo assim a possibilidade de oxidações inespecíficas, e no aumento da corrente de pico, aumentando a sensibilidade e o limite de detecção do sensor. Porém, devido a sua baixa solubilidade, seu uso pela técnica LbL é limitado.

[024] Como estudos recentes mostraram que a morfologia nanofibrilar pode aumentar a solubilidade de polímeros semicondutores, nanoestruturas de PANI (N-PANI) foram sintetizadas para a construção de filmes LbL.

[025] Portanto, visando a necessidade de métodos de menor custo, rápidos e mais simples para a detecção do hormônio melatonina, a presente invenção propõe um biossensor eletroquímico nas configurações PANI/PVS, sendo como polycation o polímero N-PANI e como polianion o polímero PVS, para a construção dos filmes finos LbL.

[026] Ainda, é proposto um processo de obtenção de um eletrodo de trabalho, um método de medição do biossensor e o uso para a detecção de melatonina.

[027] Dessa maneira, com o desenvolvimento do biossensor em questão, é esperado o aumento do acesso aos testes, permitindo mais precisão nos diagnósticos de doenças relacionadas à melatonina, como também para uma

melhor dosagem dos remédios.

Estado da técnica:

[028] Alguns documentos do estado da técnica descrevem biossensores composto por filmes PANI/PVS e alguns documentos descrevem biossensores para detecção de melatonina.

[029] Em "*Caracterização Elétrica de Filmes Ultrafinos de PANI/PVS: Material Potencial para Detecção de Amônia em Galpões de Criação Avícola.*" de Santos, M. C. et al. (2010) é descrito o desenvolvimento de filmes ultrafinos de PANI/PVS preparados pela técnica de automontagem para a detecção de amônia.

[030] Apesar de o artigo em questão fazer uso de filmes finos dos polímeros PANI/PVS, este é depositado em um substrato de composição e forma distinta ao do biossensor desenvolvido pela presente invenção que deposita o filme fino preferencialmente em vidro recoberto com ITO de maneira uniforme, enquanto o artigo descreve o uso destes em microeletrodos interdigitados compostos de Au e NiCr. Além disso, o dispositivo é utilizado na detecção de amônia, e este não possui nenhuma relação com a melatonina, hormônio detectado na presente invenção.

[031] Em WO2015106331 (A1), "Electrocatalytic Properties and Voltammetric Determination of Melatonin at a Nanostructured Film Electrode" de WANYUN QU et al. (2005) e "Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode" de Abdulkadir Levent (2012) é relatado o desenvolvimento de um biossensor para a detecção de melatonina.

[032] Diferentemente da presente invenção, os

biossensores descritos nos referidos documentos possuem configurações totalmente distintas do biossensor aqui proposto e ainda não utilizam os polímeros PANI e PVS, que são a base da presente invenção para a detecção de melatonina.

[033] O documento "*Improved electrochemical nucleic acid biosensor based on polyaniline-polyvinyl sulphonate*" de PRABHAKAR, N. et al. (2008) descreve um biossensor baseado em bioeletrodos compostos por uma plataforma de ITO coberta com um filme fino PANI/PVS para detecção de pesticidas organofosforados.

[034] Apesar de o artigo utilizar um filme de PANI/PVS sobre ITO, a maneira de construí-lo é distinta da aplicada pela presente invenção. Enquanto o presente biossensor é construído pela técnica *layer-by-layer*, o artigo utiliza a técnica de aprisionamento eletroquímico (*electrochemical entrapment*) e, além disso, utiliza DNA em conjunto com os polímeros. Ainda mais, o sistema é utilizado para detectar pesticidas organofosforados e não melatonina.

[035] Em "*Preparation of polyaniline-modified electrodes containing sulfonated polyelectrolytes using layer-by-layer techniques*", Yin-Hou Chen et al. (2008) refere-se ao desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica, o qual compreende um eletrodo composto por PANI/PVS para a detecção de íons de amônia.

[036] O artigo realiza a construção do filme PANI/PVS de maneira distinta da presente invenção. Enquanto o presente biossensor é construído somente através da

técnica *layer-by-layer* para ambos os compostos, o artigo em questão utiliza anilina e técnicas eletroquímicas para polimeriza-la e formar PANI diretamente sobre o eletrodo. Após este processo, os autores imergem o eletrodo por 30 minutos em uma solução de PVS em tampão. Diferentemente do processo aqui descrito, em que foi utilizado de 2 a 10 minutos. Além disso, o PVS utilizado por nós é solubilizado em água deionizada. Outro ponto importante é o fato de que eletrodos de ouro são utilizados no referido artigo, enquanto a presente invenção utiliza eletrodos de ITO ou semelhantes. Por último, o sensor é utilizado para detectar amônia, não possuindo relação com melatonina.

[037] Portanto, nenhum dos documentos do estado da técnica descrevem um processo de obtenção de um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio melatonina composto por uma plataforma de substrato coberta com pelo menos uma camada de filme fino PANI/PVS (polianilina/ácido polivinil sulfônico) construído através da técnica LbL (*layer-by-layer*), em que este é utilizado para a formação de um biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica (VC) para a detecção do hormônio melatonina, tal como descrito na presente invenção.

[038] Consequentemente, também não há documentos que fazem referência ao método de medição do biossensor aqui descrito e ao seu uso para a detecção do hormônio melatonina, assim como para maior precisão nos diagnósticos de doenças relacionadas à melatonina, como também para uma melhor dosagem dos remédios utilizados no tratamento destas.

Breve descrição da invenção:

[039] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio melatonina composto por uma plataforma de substrato coberta com pelo menos uma camada de filme fino PANI/PVS (polianilina/ácido polivinil sulfônico) construído através da técnica LbL (*layer-by-layer*).

[040] Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica (VC) para a detecção do hormônio melatonina, compreendendo 3 eletrodos independentes: de referência, contra-eletrodo e de trabalho, em que o último é obtido conforme processo aqui descrito.

[041] Adicionalmente, a invenção refere-se ao método de medição do biossensor aqui descrito e ao seu uso para a detecção do hormônio melatonina, assim como para maior precisão nos diagnósticos de doenças relacionadas à melatonina, como também para uma melhor dosagem dos remédios utilizados no tratamento destas.

Breve descrição das figuras:

[042] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[043] A Figura 1 representa um esquema do método de construção de filmes finos PANI/PVS por LbL, em que (1) é a imersão do substrato no componente policatiônico, (2) é a lavagem, (3) é a imersão do substrato no componente polianiónico e (4) é a lavagem.

[044] As Figuras 2A-C representam a caracterização

do filme por AFM, em que (A) é o substrato, (B) é o filme PANI/PVS de 5 bicamadas e (C) o filme PANI/PVS de 10 bicamadas.

[045] A Figura 3 representa graficamente os voltamogramas cíclicos de substrato (vermelho) e de filme (PANI/PVS) (preto), sob a concentração de 10^{-5}M de melatonina.

[046] As Figuras 4A-B representam graficamente a detecção de melatonina em diferentes velocidades de varredura, em que (A) são voltamogramas cíclicos e (B) o valor de corrente em 1,2 V contra a raiz quadrada da velocidade de varredura.

[047] As Figuras 5A-B representam graficamente (A) os voltamogramas cíclicos do filme (PANI/PVS)₃ sob diferentes concentrações de melatonina e (B) a curva de calibração.

Descrição detalhada da invenção:

[048] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio melatonina, o qual compreende as etapas de:

a) Remover resíduos orgânicos e inorgânicos do substrato;

b) Construir os filmes (polianilina/ácido polivinil sulfônico) PANI/PVS através da técnica LbL (*layer-by-layer*).

[049] As etapas do processo aqui descrito estão melhor detalhadas a seguir.

a) **Remover resíduos orgânicos e inorgânicos do substrato:**

[050] Para o desenvolvimento do eletrodo de trabalho, o referido substrato consiste em óxido de índio dopado com estanho (ITO); vidros recobertos com óxidos, tais como óxido de estanho dopado com flúor (FTO); metais nobres tal como platina ou prata; preferencialmente ITO.

[051] Na etapa "a", a limpeza do substrato é realizada através da inserção do substrato em acetona, onde este é submetido ao ultrassom no período de tempo que varia de 5 a 15 minutos, preferencialmente 10 minutos.

[052] Em seguida, o substrato é inserido no etanol na concentração que varia de 60 a 100%, preferencialmente 90%, e, posteriormente submetido ao ultrassom no período de tempo que varia de 5 a 15 minutos, preferencialmente 10 minutos.

[053] Logo depois, o substrato é inserido em uma solução de KOH na concentração que varia de 0,1 a 0,5 mol.L⁻¹, preferencialmente 0,36 mol.L⁻¹ e posteriormente submetido ao ultrassom no período de tempo que varia de 5 a 15 minutos, preferencialmente 10 minutos.

[054] Após esses procedimentos, o substrato é enxaguado abundantemente com água deionizada e seco com gás inerte, tal como N₂.

[055] Vale ressaltar que, alternativamente, a etapa "a" pode ser realizada por outros procedimentos de limpeza do substrato - tais como protocolos com a aplicação de solventes, como etanol, acetona e isopropanol, desde que remova os resíduos orgânicos e inorgânicos de maneira eficiente sem danificar o eletrodo.

[056] A limpeza pode ser também realizada com a imersão do substrato em ácidos diluídos, tal como ácido

nítrico diluído em água deionizada em uma concentração que varia de 5 a 20%, preferencialmente 10% e posteriormente lavado com água deionizada.

b) Construir os filmes PANI/PVS através da técnica

LbL:

[057] Para a construção do filme na etapa "b", o substrato é primeiramente mergulhado na solução policatiônica de nanoestruturas de polianilina (N-PANI) na concentração que varia de 0,1 a 1 g.L⁻¹ de água deionizada por um período de tempo que varia de 2 a 10 minutos.

[058] Em seguida, é lavado cuidadosamente com água deionizada-HCl com pH que varia de 2,5 a 6,5, preferencialmente 4,1 e seco utilizando um jato de gás inerte, tal como N₂.

[059] Posteriormente, o mesmo é imerso em uma solução polianiônica de ácido polivinil sulfônico (PVS) na concentração que varia de 0,5 a 2g.L⁻¹ de água deionizada por um período de tempo que varia de 2 a 10 minutos.

[060] Após este período, a superfície é lavada cuidadosamente com água deionizada-HCl com pH que varia de 4,5 a 7,5, preferencialmente 6,0 e seca com gás inerte, tal como N₂. Assim, com a execução desses procedimentos tem-se a formação de 1 bicamada (Figura 1).

[061] Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente que varia de 10 a 40°C, preferencialmente 25°C.

[062] Vale ressaltar que os procedimentos da etapa "b" são repetidos de acordo com a quantidade de bicamadas desejadas e que o referido eletrodo possui pelo menos 1 bicamada de filmes PANI/PVS, preferencialmente 3 bicamadas.

As mesmas são adsorvidas por interação eletrostática.

[063] Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica (VC) para a detecção do hormônio melatonina, em que este compreende:

- um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio, que consiste em uma plataforma de substrato, preferencialmente de ITO (1,0 x 0,6 cm), coberta com pelo menos uma bicamada de filme fino PANI/PVS obtido conforme processo aqui descrito;

- um contra-eletrodo que consiste em uma placa de platina, metais nobres, carbono e grafite, preferencialmente uma placa de platina (0,5 x 1,0 cm);

- um eletrodo de referência que consiste em um eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl), eletrodo de calomelano saturado ou de hidrogênio, preferencialmente eletrodo de Ag/AgCl;

[064] Adicionalmente a presente invenção refere-se a um método de medição do biossensor aqui descrito para a detecção do hormônio melatonina conforme a seguir.

[065] As medidas eletroquímicas são realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato em uma cela de 3 eletrodos convencional.

[066] Os filmes (PANI/PVS) são usados como eletrodo de trabalho, enquanto uma placa de platina e um eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) são utilizados como contra-eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente.

[067] Porém, alternativamente, o contra-eletrodo é composto de qualquer material inerte que permita conexão

elétrica de forma que possa ser aplicado um potencial ao eletrodo de trabalho, tal como metais nobres, carbono e grafite.

[068] Ainda, alternativamente, o eletrodo de referência pode ser substituído por qualquer um que ofereça um potencial constante, tais como eletrodo de calomelano saturado ou de hidrogênio.

[069] As medidas são feitas em tampão fosfato, em temperatura ambiente que varia de 15 a 30°C, preferencialmente 25°C.

[070] Para as medidas de voltametria cíclica, utilizou-se a janela de potenciais de -0,4 e -0,2 a 1,4 e 1,9 V, 1 a 6 ciclos, com velocidades de varredura que variam de 50 a 150 mV.s⁻¹. Antes de cada medida eletroquímica, a solução é agitada para garantir sua homogeneidade.

[071] Assim, ao se realizar as medidas de voltametria cíclica nestas condições, um pico relativo à oxidação do hormônio melatonina é observado em torno de 1,0 a 1,2 V. Através da medida da magnitude da corrente ou de potenciais deste pico é possível realizar a quantificação do analito.

[072] Utilizando a corrente máxima do pico como parâmetro para quantificação, o biossensor aqui descrito é capaz de detectar melatonina na faixa de concentração de 5×10^{-6} a 10^{-4} mol.L⁻¹ de maneira simples, rápida e de baixo custo. Ainda, o mesmo se mostrou estável sob a aplicação de medidas sucessivas, e o limite de detecção calculado foi de $2,82 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

[073] Os testes que comprovam os valores de

detecção de melatonina calculados através do biossensor estão melhor detalhados a seguir na seção "Testes Realizados".

[074] Adicionalmente, a invenção refere-se ao uso do biossensor aqui proposto para a detecção do hormônio melatonina e para maior precisão nos diagnósticos de doenças relacionadas à melatonina, como também para uma melhor dosagem dos remédios utilizados no tratamento destas.

Testes Realizados:

- AFM:

[075] A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica indicada para fazer imagens de superfícies em escala nanométrica com alta resolução, sendo assim muito útil em diversos campos da ciência, especialmente na biologia.

[076] Medidas de AFM foram usadas para caracterizar os filmes poliméricos aqui descritos. Para isso, uma versão comercial do microscópio Dimension ICON (Bruker) foi utilizada. O equipamento foi operado em modo intermitente, com uma ponta de silício. O software Gwyddion (versão 2.31) foi utilizado para a análise dos dados.

[077] Para a caracterização dos eletrodos, medidas de AFM foram realizadas no substrato de ITO limpo (Figura 2A) e em filmes de PANI/PVS de 5 (Figura 2B) e de 10 (Figura 2C) bicamadas. Pode-se observar através da figura que conforme as bicamadas de PANI/PVS são depositadas existe a adesão de material sobre o ITO - quanto maior o número de bicamadas, maior a quantidade de material aderido. Ainda, as conclusões são similares quando as

medidas de rugosidade são analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Rugosidade média do ITO limpo, filme PANI/PVS de 5 e de 10 bicamadas. Valores adquiridos por AFM.

Amostra	Rugosidade Média (nm)
ITO	2,35
(PANI/PVS) ₅	3,24
(PANI/PVS) ₁₀	3,86

[078] Enquanto a rugosidade relativa ao ITO limpo, medida em diversos lugares distintos, levou a um valor RMS de $2,36 \pm 0,33$ nm, a mesma medida nos eletrodos modificados com o filme PANI/PVS resultou em valores de $3,25 \pm 0,70$ nm e $3,86 \pm 0,62$ nm, respectivamente.

[079] Como esperado, valores de rugosidade são mais baixos para o ITO do que para os eletrodos modificados, devido à deposição de material em sua superfície.

- Caracterização Eletroquímica:

[080] A caracterização eletroquímica dos eletrodos de ITO cobertos com um filme de PANI/PVS de 3 bicamadas mostrou que estes são estáveis sob sucessivos ciclos de voltametria cíclica, apresentando um decaimento de 20% na corrente do pico de oxidação de melatonina após 17 ciclos (solução de hormônio $5.0 \cdot 10^{-5}$ mol. L⁻¹, tampão fosfato).

[081] Além disso, na detecção de melatonina por voltametria cíclica, o filme PANI/PVS apresentou um aumento na corrente de pico relativo à oxidação do hormônio, se comparado ao ITO sem modificação (Figura 3) ($1,0 \times 10^{-5}$ mol. L⁻¹ de melatonina). Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, 100mV/s.

[082] Foi também realizado um teste de detecção de adiponectina ($5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes velocidades de varredura, variando de 150 a 5 mV.s^{-1} . A corrente do pico de oxidação do hormônio aumentou linearmente em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura utilizada, indicando que a reação é regida pela difusão das substâncias em solução (Figuras 4A-B).

[083] Para a construção de uma curva de calibração, a resposta dos eletrodos modificados foi testada em soluções de melatonina com diversas concentrações diferentes.

[084] A corrente-resposta do eletrodo modificado com o filme PANI/PVS de 3 bicamadas sob concentrações crescentes de melatonina é mostrada nas Figuras 5A-B. Foi observada uma dependência linear da corrente de pico com a concentração do hormônio, como indicado na inserção. Isso ocorre devido a uma maior quantidade de melatonina que leva a uma maior taxa de oxidação, e, assim, a uma corrente-resposta mais elevada. Os valores de corrente foram obtidos em 1,2V e os experimentos foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,2, 100 mV/s .

[085] A curva de calibração mostra uma faixa linear de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,998$) com sensibilidade de 148,87 $\text{nA } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. O limite de detecção (LD) de melatonina foi calculado através da seguinte Fórmula 1, em que DP é o desvio padrão da corrente e M a média de inclinação das curvas de calibração.

$$\text{Fórmula 1: LD} = (3 \times \text{DP}) / \text{M}$$

[086] Neste caso, foram usados 5 filmes distintos para o cálculo do LD. O valor obtido para o sensor

desenvolvido foi de $2,824 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

[087] A reutilização do sensor foi investigada através da medida de uma única concentração de melatonina diversas vezes seguida. Utilizando um eletrodo, na presença de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$ de melatonina houve uma diminuição de aproximadamente 15% na corrente de pico de oxidação após 10 medidas.

[088] Sendo assim, o sensor desenvolvido foi capaz de realizar a quantificação de melatonina de maneira simples, rápida e com grande potencial para portabilidade – superando as principais dificuldades das técnicas atuais de detecção, tais como o método ELISA e os radioimunoensaios. Estes, apesar de possuírem alta sensibilidade e baixo limite de detecção, são de alto custo, demandam muito tempo e necessitam de equipamentos e trabalhadores especializados para a sua realização.

[089] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de um eletrodo de trabalho **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

a) Remover resíduos orgânicos e inorgânicos do substrato; e

b) Construir os filmes (polianilina/ácido polivinil sulfônico) PANI/PVS através da técnica LbL (*layer-by-layer*);

em que este eletrodo de trabalho é responsável pela interação com o hormônio melatonina.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de na etapa "a", o substrato ser selecionado do grupo que consiste em óxido de índio dopado com estanho (ITO); vidros recobertos com óxidos, tais como óxido de estanho dopado com flúor (FTO); metais nobres tal como platina ou prata; preferencialmente ITO.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de na etapa "a", a limpeza do substrato ser primeiramente realizada através da inserção do substrato em acetona, onde este é submetido ao ultrassom no período de tempo que varia de 5 a 15 minutos preferencialmente 10 minutos.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato de na etapa "a", o substrato ser inserido subsequentemente no etanol na concentração que varia de 60 a 100%, preferencialmente 90% e posteriormente submetido ao ultrassom no período de tempo que varia de 5 a 15 minutos, preferencialmente 10 minutos.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 ou 4, **caracterizado** pelo fato de na etapa "a", o substrato

ser inserido subsequentemente em uma solução de KOH na concentração que varia de 0,1 a 0,5 mol.L⁻¹, preferencialmente 0,36 mol.L⁻¹ e posteriormente submetido ao ultrassom no período de tempo que varia de 5 a 15 minutos, preferencialmente 10 minutos.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de na etapa "a", o substrato ser subsequentemente enxaguado com água deionizada e seco com gás inerte, tal como N₂.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de, alternativamente, a etapa "a" ser realizada por procedimentos de limpeza do substrato, selecionados do grupo que consiste em protocolos com a aplicação de solventes, como etanol, acetona e isopropanol; e a imersão do substrato em ácidos diluídos, tal como ácido nítrico diluído em água deionizada em uma concentração que varia de 5 a 20%, preferencialmente 10% e posteriormente lavado com água deionizada.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2 **caracterizado** pelo fato de na etapa "b", o substrato ser primeiramente mergulhado na solução policatiônica de nanoestruturas de polianilina (N-PANI) na concentração que varia de 0,1 a 1 g.L⁻¹ de água deionizada por um período de tempo que varia de 2 a 10 minutos.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 8, **caracterizado** pelo fato de na etapa "b", o substrato ser subsequentemente lavado com água deionizada-HCl com pH que varia de 2,5 a 6,5, preferencialmente 4,1 e seco utilizando um jato de gás inerte, tal como N₂.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2, 8

ou 9, **caracterizado** pelo fato de na etapa "b", o substrato ser subsequentemente imerso em uma solução polianiônica de ácido polivinil sulfônico (PVS) na concentração que varia de 0,5 a 2g.L⁻¹ de água deionizada por um período de tempo que varia de 2 a 10 minutos.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2, 8, 9 ou 10, **caracterizado** pelo fato de na etapa "b", a superfície do substrato ser subsequentemente lavada com água deionizada-HCl com pH que varia de 4,5 a 7,5, preferencialmente 6,0 e seca com gás inerte, tal como N₂.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2, 8, 9, 10 ou 11, **caracterizado** pelo fato de os procedimentos da etapa "b" serem realizados a uma temperatura que varia de 10 a 40°C, preferencialmente 25°C.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2, 8, 9, 10, 11 ou 12, **caracterizado** pelo fato de a execução dos procedimentos da etapa "b" referir-se à formação de 1 bicamada do eletrodo.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13, **caracterizado** pelo fato de na etapa "b", os procedimentos serem, alternativamente, repetidos de acordo com a quantidade de bicamadas desejadas.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de na etapa "b", os procedimentos serem preferencialmente para a formação de 3 bicamadas.

16. Biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica **caracterizado** pelo fato de compreender:

- um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio, que consiste em uma plataforma de substrato, preferencialmente de ITO, coberta com pelo menos

uma bicamada de filme fino PANI/PVS obtido conforme processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15;

- um contra-eletrodo que consiste em uma placa de platina, metais nobres, carbono e grafite, preferencialmente uma placa de platina;

- um eletrodo de referência que consiste em um eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl), eletrodo de calomelano saturado ou de hidrogênio, preferencialmente eletrodo de Ag/AgCl.

17. Biossensor, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de ser capaz de detectar melatonina na faixa de concentração de 5×10^{-6} a 10^{-4} mol.L⁻¹, em que este é estável sob a aplicação de medidas sucessivas e seu limite de detecção calculado é de $2,82 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

18. Uso do biossensor, conforme definido na reivindicação 16 ou 17, **caracterizado** pelo fato de ser para a detecção do hormônio melatonina.

19. Método de medição do biossensor eletroquímico, conforme definido na reivindicação 16 ou 17, **caracterizado** pelo fato de as medidas eletroquímicas serem realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato em uma cela de 3 eletrodos convencionais, em que as medidas são realizadas em tampão fosfato, à temperatura que varia de 15 a 30°C, preferencialmente 25°C.

20. Método de medição, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de as medidas de voltametria cíclica serem a janelas de potenciais de -0,4 e -0,2 a 1,4 e 1,9 V, 1 a 6 ciclos, com velocidades de varredura que variam de 50 a 150 mV.s⁻¹, em que antes de cada medida

eletroquímica, a solução é agitada.

21. Método de medição, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, **caracterizado** pelo fato de o pico relativo à oxidação do hormônio melatonina ser observado em torno de 1,0 a 1,2 V.

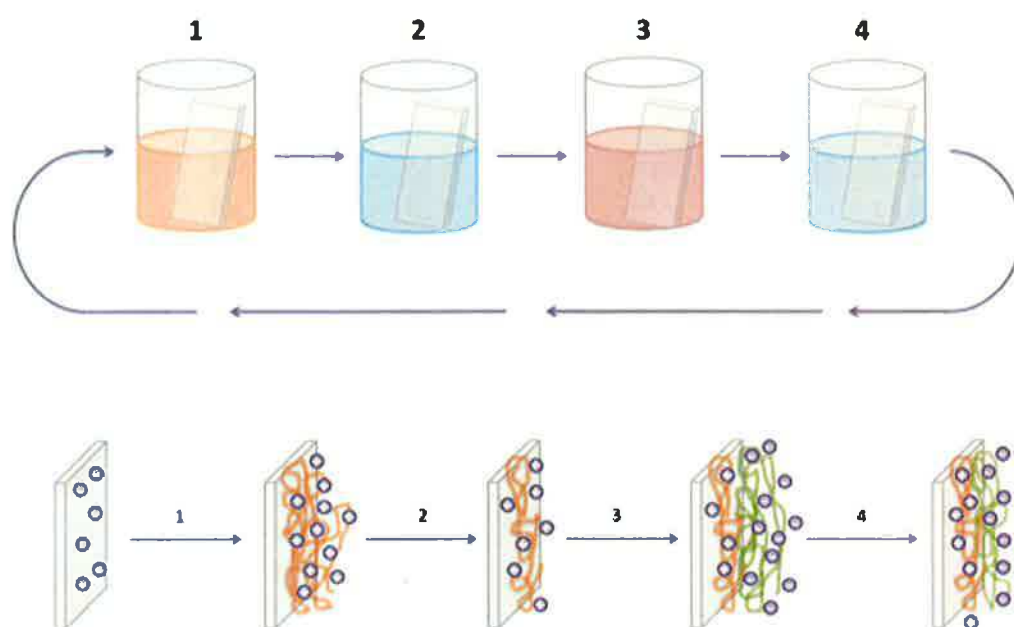


Figura 1

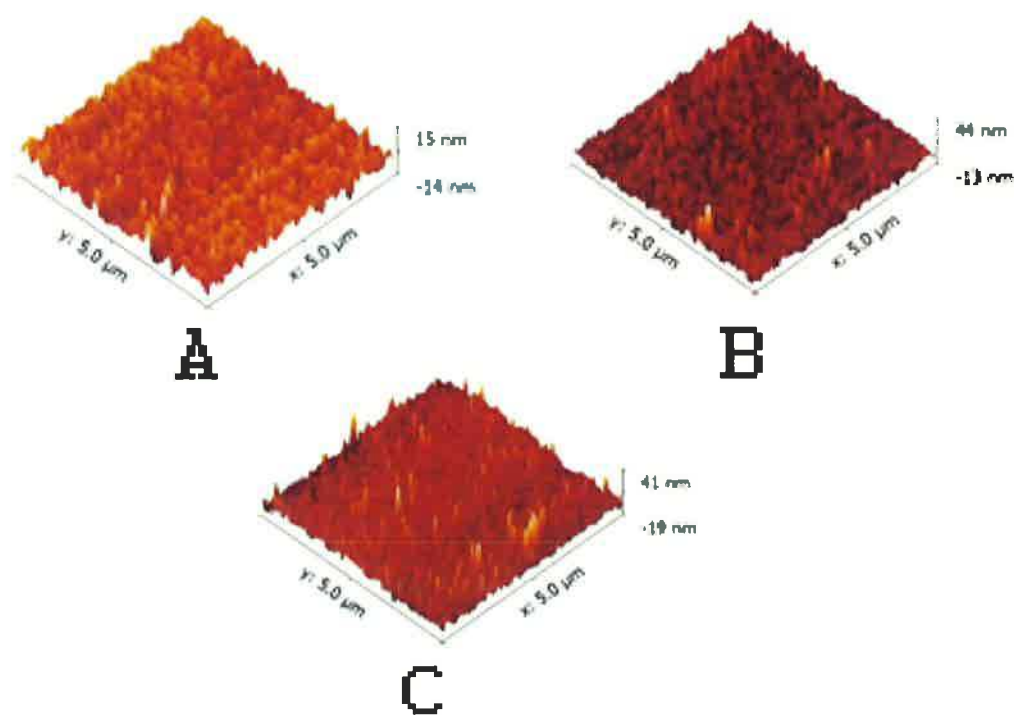


Figura 2

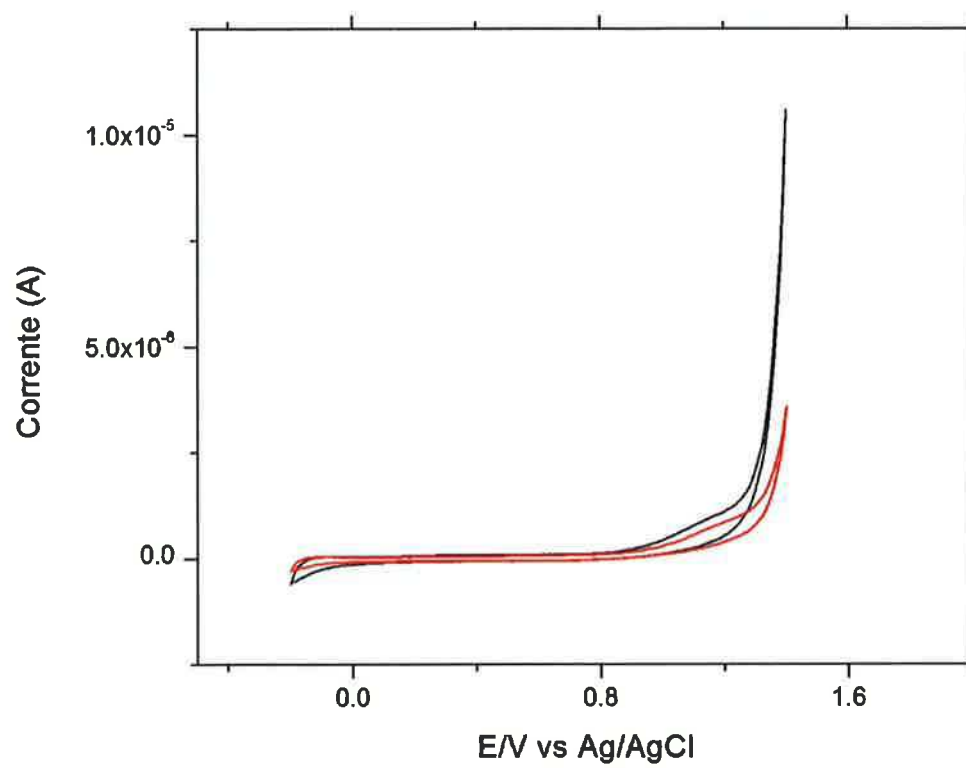


Figura 3

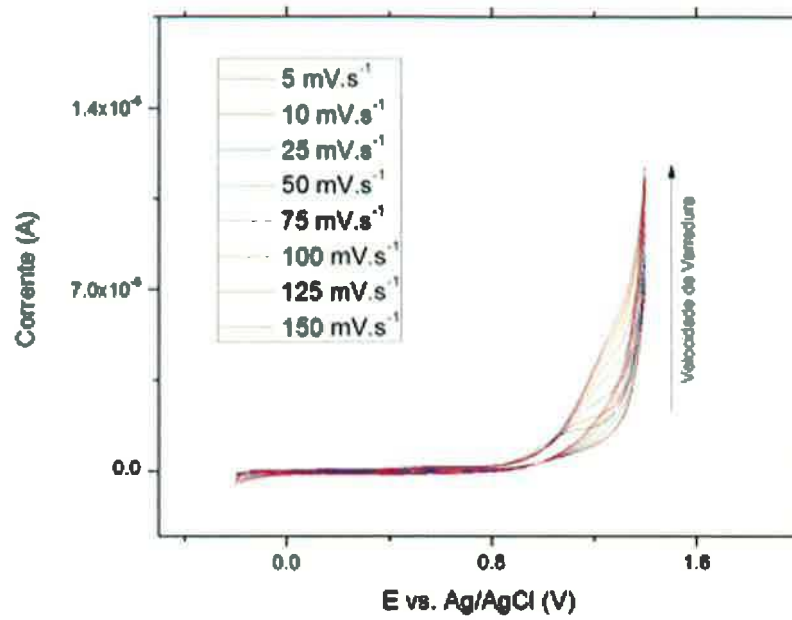


Figura 4A

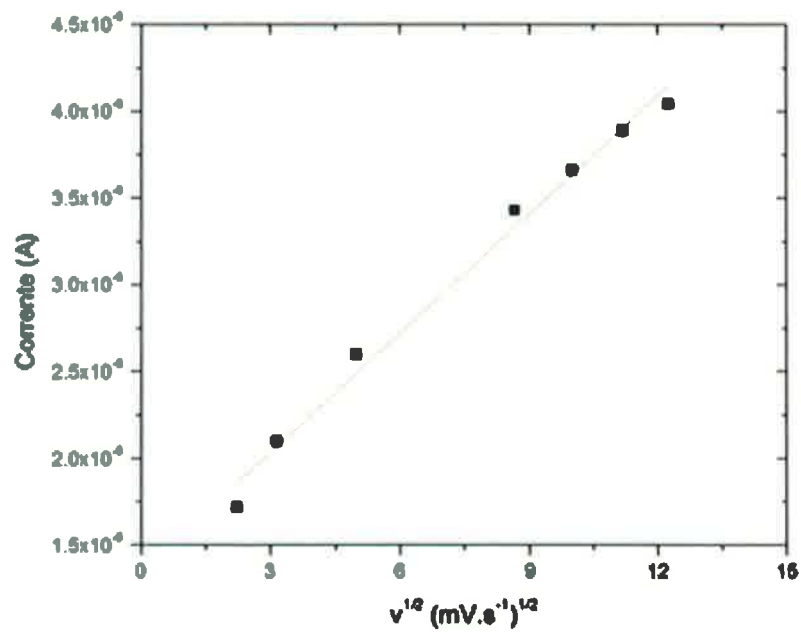


Figura 4B

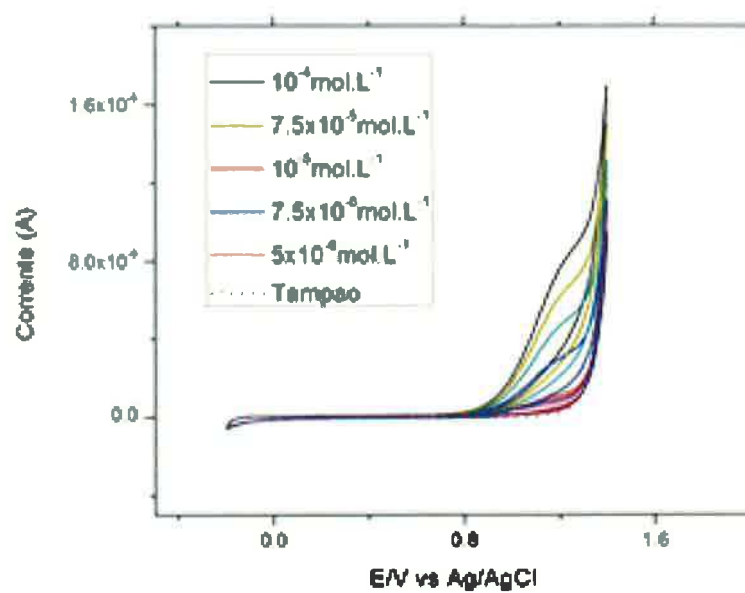


Figura 5A

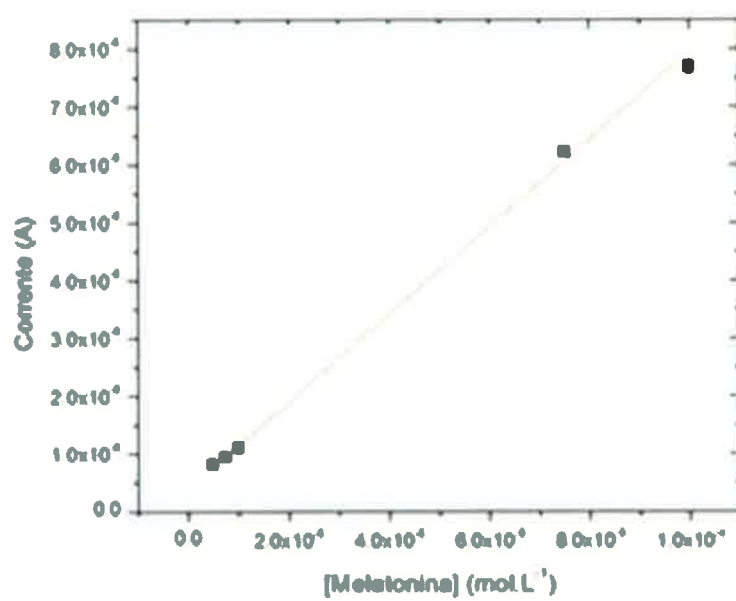


Figura 5B

Resumo

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ELETRODO DE TRABALHO, BIOCSENSOR
ELETROQUÍMICO BASEADO NA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA,
USO E MÉTODO DE MEDIÇÃO DO MESMO**

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de um eletrodo de trabalho responsável pela interação com o hormônio melatonina composto por uma plataforma de substrato coberta com pelo menos uma camada de filme fino PANI/PVS (polianilina/ácido polivinil sulfônico) construído através da técnica LbL (*layer-by-layer*). Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico baseado na técnica de voltametria cíclica (VC) para a detecção do hormônio melatonina, compreendendo 3 eletrodos independentes: de referência, contra-eletrodo e de trabalho, em que o último é obtido conforme processo aqui descrito. Ainda, a invenção refere-se ao método de medição do biossensor aqui descrito e ao seu uso para a detecção do hormônio melatonina, assim como para maior precisão nos diagnósticos de doenças relacionadas à melatonina, como também para uma melhor dosagem dos remédios utilizados no tratamento destas.

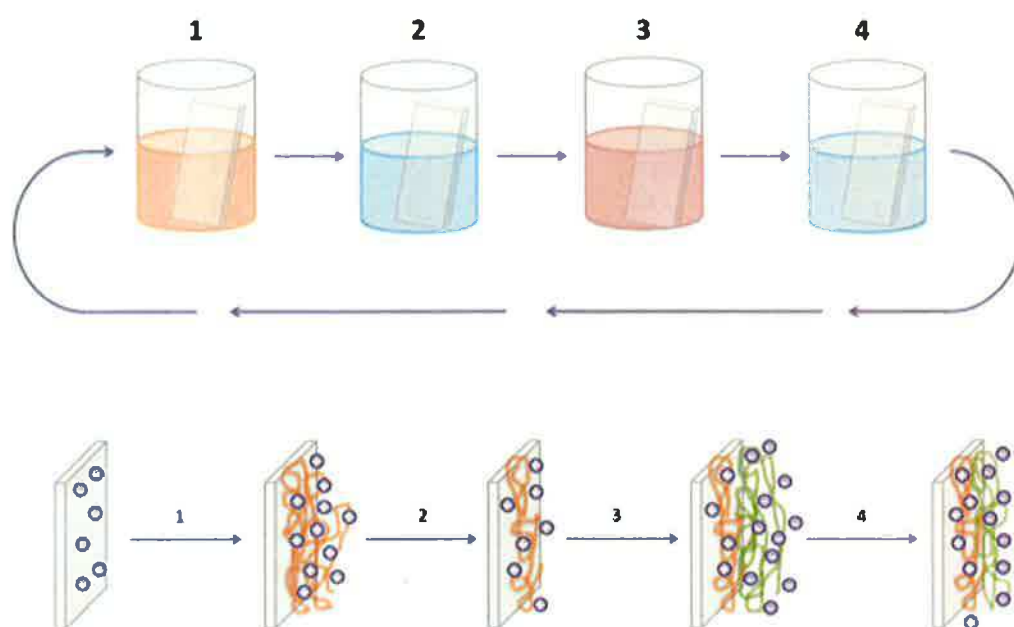


Figura 1

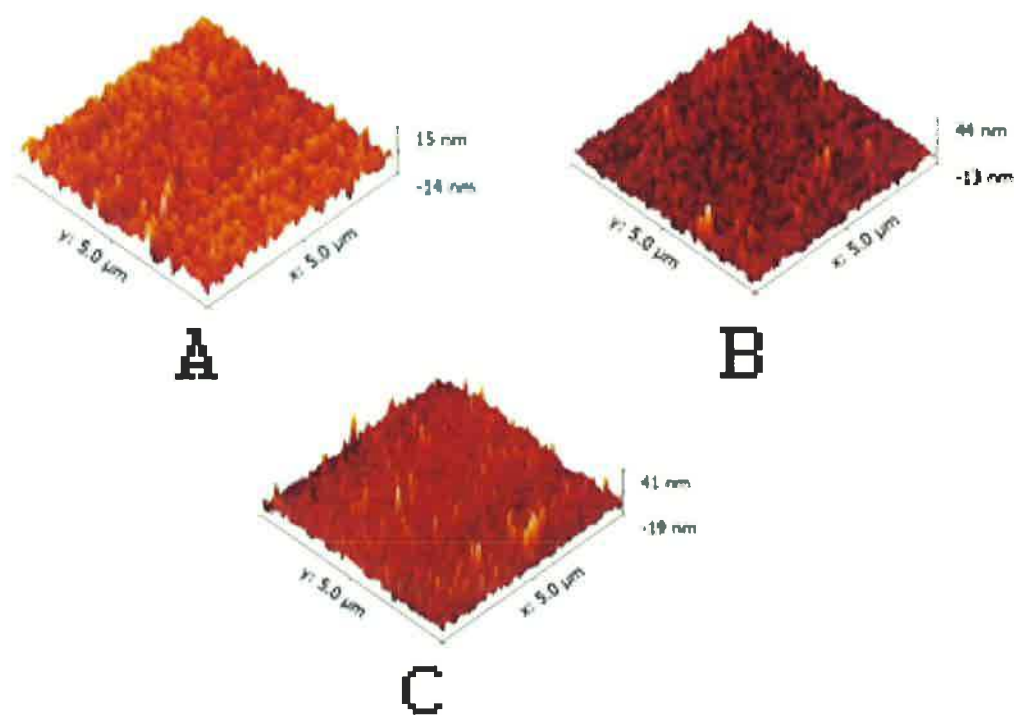


Figura 2