REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020020292-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102020020292-8

(22) Data do Depósito: 02/10/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/04/2022

(51) Classificação Internacional: A61B 5/1455; G01N 21/64; G01N 33/68; G01N 33/569; G01N 21/77; A61B 5/00; A61K 39/00; A61K 49/00; G01N 33/50; A61B 10/00.

(52) Classificação CPC: A61B 5/1455; G01N 21/64; G01N 33/6893; G01N 33/569; G01N 21/77; A61B 5/0059; A61K 39/00; A61K 49/00; G01N 33/5091; A61B 2010/0006.

(54) Título: BIOSSENSOR ÓPTICO PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS UTILIZANDO POLÍMEROS CONJUGADOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2O ANDAR, CENTRO, CURITIBA, PR, BRASIL (BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: MAIARA DE JESUS BASSI; LUCIMARA STOLZ ROMAN; MARIA LUISA TERRIBILE BUDEL; MARITZA ARAUJO TODO BOM; MARCELO MÜLLER DOS SANTOS; EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 02/10/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 05/11/2024

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues
Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

BIOSSENSOR ÓPTICO PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS UTILIZANDO POLÍMEROS CONJUGADOS

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata de um dispositivo óptico para o sensoriamento de vírus através amostras biológicas utilizando polímeros conjugados como transdutor. O sensor em questão detecta a ligação do antígeno com o anticorpo através da interação desses compostos com o polímero conjugado, resultando em um sinal óptico. Esses materiais são depositados em um substrato com posterior secagem em temperatura e pressão ambientes.

Histórico da Invenção

[002] As infecções virais tem causado grande impacto na sociedade por meio de seus efeitos na saúde pública. Todos os anos, milhares de pessoas em todo o mundo morrem como resultado de infecções que abrange uma ampla gama de vírus. Os vírus são capazes de se espalhar rapidamente por meios naturais, e se transformarem em uma pandemia semelhante à gripe espanhola em 1988, que matou mais de 50 milhões de pessoas ou até mesmo na atual pandemia do novo corona vírus SARS-CoV2, que tem matado milhares de pessoas a cada dia. Devido a isso, a detecção precoce de doenças infecciosas virais tem sido determinante nos últimos anos, levando ao desenvolvimento de novos sensores capazes de detectar os vírus de uma forma rápida e precisa [1,2].

[003] O primeiro imunodetector, chamado radioimunoensaio (RIA), foi desenvolvido pelos médicos Rosalyn Sussman Yalow e Solomon Berson, rendendo a Rosalyn um Prêmio Nobel no ano de 1977. Esse teste utilizava marcadores radioativos que eram capazes de indicar a presença do

antígeno ou anticorpo procurado na amostra. Todavia, por utilizar marcadores radioativos, a técnica apresentava sérios riscos para a saúde dos pacientes. Com isso, iniciou-se pesquisas a fim de desenvolver técnicas que utilizavam marcadores não radioativos, dando início ao desenvolvimento do método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [3].

[004] O Teste ELISA é um método convencional de diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de imunoglobilinas, entre outras. Descrito originalmente por Engvall e Perlmann (1971), o método permite a análise de amostras de proteínas imobilizadas em poços de microplacas utilizando anticorpos específicos. Neste teste, é necessário fixar o antígeno a uma superfície sólida, e então ligar ao antígeno um anticorpo ligado a um marcador enzimático. A detecção se completa ao analisar a presença do marcador depois de lavar os poços, que - no caso da detecção enzimática - vai mudar a coloração do substrato cromogênico adicionado a placa de teste [4].

[005] Apesar dos avanços, os métodos convencionais são procedimentos laboriosos e demorados, confinados a laboratórios especializados com instrumentação de leitura cara. Nas últimas décadas, a tecnologia de biossensores surgiu como um princípio alternativo de detecção poderosa e versátil, como o potencial para superar muitas das deficiências dos métodos tradicionais, principalmente devido à velocidade de análise e simplicidade de operação [5].

[006] Biossensores compreendem um elemento de reconhecimento biológico necessários para a interação específica com o analítico alvo, em interface com um transdutor físico-químico para converter a interação biológica em um sinal mensurável [6–9].

[007] Dentro da classe de biossensores, é possível destacar os biossensores ópticos, que são baseados na medição de luz absorvida ou emitida como consequência de uma reação bioquímica. Eles são

capazes de detectar ligações específicas entre analitos, como com outras tecnologias de detecção, mas fazem isso sem a necessidade de conexão elétrica direta, fornecendo uma técnica altamente eficaz para a detecção sensível, seletiva e quase imediata de uma vasta gama de analitos [10–13].

[008] Dois dos formatos de biossensores ópticos mais populares são baseados em fibras ópticas e superfícies de ressonância de plasma de superfície (SPR). As fibras ópticas dependem da reflexão interna total da luz e da caracterização de uma superfície pela diferença no ângulo de incidência da luz refletida na modificação da superfície do sensor [14].

[009] Os biossensores disponíveis comercialmente, utilizam o SPR, são, o sistema BIAcore™ e os instrumentos do Texas Spreeta™. No entanto, a desvantagem desses equipamentos é que as máquinas apresentam um valor elevado.

[010] Dentro do contexto de biossensores, também é possível destacar a utilização de polímeros conjugados, utilizados como transdutores. Devido a suas inúmeras características, como alta condutividade elétrica, transições ópticas de baixa energia, baixo potencial de ionização, alta afinidade eletrônica, boa estabilidade e biocompatibilidade, os polímeros conjugados são capazes de agir como uma matriz adequada para imobilização de biomoléculas e facilitar a transferência de elétrons em reações redox ou enzimáticas, sendo essa, um processo chave para o desenvolvimento de novos biossensores [15–17].

[011] A literatura científica e as patentes registradas apresentam biossensores ópticos como o invento BR 10 2018 068722 0 que se tratar de um biossensor óptico a ser utilizado na detecção rápida de microrganismos, cujo princípio de funcionamento baseia-se na propriedade óptica de fotoluminescência de microrganismos e no uso de peptídeos antimicrobianos (ou PAMs) que servem para uma dupla

confirmação da presença dos microrganismos, e também o invento US2020116734A1 que utiliza duas camadas de polímeros onde a primeira camada é constituída também de anticorpos compostos, e a segunda camada tem uma estrutura de cristal fotônico opala inversa, onde nanopartículas de ouro e os segundos anticorpos são distribuídos. Pelo menos um dos anticorpos compostos, um antígeno e pelo menos um dos segundos anticorpos formam um complexo na segunda camada de polímero e uma concentração de antígeno é obtida por uma intensidade de fluorescência, um grau de desvio para o vermelho ou uma mudança em um visual cor do biossensor.

[012] Apesar dessas invenções descreverem biossensores ópticos, nenhuma delas relata o presente pedido de patente.

Descrição detalhada da Invenção

[013] A invenção trata de um dispositivo capaz de detectar vírus utilizando polímeros conjugados como material sensor através da caracterização óptica.

[014] Nessa invenção, foi utilizado o polímero conjugado F8T2, solubilizado em o-diclorobenzeno em uma concentração de 4 mg/ml. Após a solubilização do material, o mesmo foi depositado por spin coating em um substrato de vidro previamente limpo, submetido a tratamento térmico de 100 °C.

[015] A fim de detectar o vírus SARS-CoV2, sobre esse filme, foi depositado por drop cast, 100 µl do antígeno referente ao vírus, 100 µl do bloqueador de superfícies BSA e 100 µl do anticorpo referente a detecção do vírus, conforme apresentado na Figura 1. Cada camada foi seca sob temperatura e pressão ambiente.

[016] Antes de cada deposição os filmes foram mergulhados em água destilada e deixado secar sob temperatura e pressão ambiente.

[017] A caracterização óptica foi feita utilizando um fluorímetro. Os filmes foram excitados em 450 nm, e os espectros de fotoluminescência são apresentados na Figura 2.

Citação de Figuras

[018] A Figura 1 apresenta um esquema da montagem do sensor óptico, onde as camadas são constituídas de vidro, F8T2, proteína, BSA, anticorpo

[019] A Figura 2 apresenta os espectros de fotoluminescência da amostra com o polímero F8T2 (curva preta); da amostra com o F8T2+proteína+BSA+anticorpo (curva vermelha); e da amostra com o F8T2+BSA+anticorpo (curva azul). É possível notar uma ampliação no espectro de fotoluminescência na região de 600-650 nm quando há interação da proteína com o anticorpo (curva vermelha). O mesmo não acontece na amostra que não é adicionado a proteína (curva azul).

Referências

[1] A. Balasubramanian, B. Bhuva, R. Mernaugh, F.R. Haselton, Si-based sensor for virus detection, IEEE Sens. J. 5 (2005) 340–344. https://doi.org/10.1109/JSEN.2005.844543.

[2] R.B. Channon, Y. Yang, K.M. Feibelman, B.J. Geiss, D.S. Dandy, C.S. Henry, Development of an Electrochemical Paper-Based Analytical Device for Trace Detection of Virus Particles, Anal. Chem. 90 (2018) 7777–7783. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02042.

[3] R.P. Stokes, A. Cordwell, R.A. Thompson, A simple, rapid ELISA method for the detection of DNA antibodies, J. Clin. Pathol. 35 (1982) 566–573. https://doi.org/10.1136/jcp.35.5.566.

[4] A.A. Yanik, M. Huang, O. Kamohara, A. Artar, T.W. Geisbert, J.H. Connor, H. Altug, An optofluidic nanoplasmonic biosensor for direct detection of live viruses from biological media, Nano Lett. 10 (2010)

4962–4969. https://doi.org/10.1021/nl103025u.

[5] S. Po-Chedley, B.D. Cohen, M.E. Hagerman, Fast, ultrasensitive virus detection using a young interferometer sensor, Chemtracts. 19 (2007) 350–357.

[6] Manju.Gerard, Ashab.Choubey, B.D.Malhotra, Review: Application of Conducting Polymer to Biosensors, Biosens. Bioelectron. 17 (2001) 345–359.

[7] J. Lai, Y. Yi, P. Zhu, J. Shen, K. Wu, L. Zhang, J. Liu, Polyaniline-based glucose biosensor: A review, J. Electroanal. Chem. 782 (2016) 138–153. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.033.

[8] D. Bhatta, E. Stadden, E. Hashem, I.J.G. Sparrow, G.D. Emmerson, Multi-purpose optical biosensors for real-time detection of bacteria, viruses and toxins, Sensors Actuators, B Chem. 149 (2010) 233–238. https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.040.

[9] R.L. Caygill, G.E. Blair, P.A. Millner, A review on viral biosensors to detect human pathogens, Anal. Chim. Acta. 681 (2010) 8–15. https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.038.

[10] G.G. Daaboul, C.A. Lopez, A. Yurt, B.B. Goldberg, J.H. Connor, M.S. Ünlü, Label-free optical biosensors for virus detection and characterization, IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 18 (2012) 1422–1433. https://doi.org/10.1109/JSTQE.2011.2180516.

[11] O.I. Guliy, M. V. Kanevskiy, A.S. Fomin, S.A. Staroverov, V.D. Bunin, Progress in the use of an electro-optical sensor for virus detection, Opt. Commun. 465 (2020) 125605. https://doi.org/10.1016/j.optcom.2020.125605.

[12] S. Pal, A.R. Yadav, M.A. Lifson, J.E. Baker, P.M. Fauchet, B.L. Miller, Selective virus detection in complex sample matrices with photonic crystal optical cavities, Biosens. Bioelectron. 44 (2013) 229–234. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.004.

[13] G. Robinson, The commercial development of planar optical

biosensors, 29 (1995) 31–36.

[14] Y. Saylan, Ö. Erdem, S. Ünal, A. Denizli, An alternative medical diagnosis method: Biosensors for virus detection, Biosensors. 9 (2019). https://doi.org/10.3390/bios9020065.

[15] M. Şenel, Simple method for preparing glucose biosensor based on in-situ polypyrrole cross-linked chitosan/glucose oxidase/gold bionanocomposite film, Mater. Sci. Eng. C. 48 (2015) 287–293. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.020.

[16] G. Harsányi, Sensor Review Emerald Article : Polymer films in sensor applications : a review of present uses and future possibilities Article information : Tutorial Polymer films in sensor applications : a review of present uses and future possibilities Ga, (2000).

[17] M. Ates, A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers, Mater. Sci. Eng. C. 33 (2013) 1853–1859. https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.035.

REIVINDICAÇÕES

1. BIOSSENSOR ÓPTICO PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS SARS-CoV2 caracterizado por utilizar um filme fino do polímero conjugado poli [(9,9-di-noctilfluorenil-2,7-di-il)-alt-2,2'-bitiofeno-5,5'-diilo] (F8T2) depositado sobre um substrato de vidro e utilizado como material sensor por meio da modificação de seu espectro de fotoluminescência e, depositadas sobre esse filme, uma camada do antígeno referente ao referido vírus, uma camada do bloqueador de superfícies albumina sérica bovina (BSA) e uma camada do anticorpo referente a detecção do referido vírus.

2. BIOSSENSOR ÓPTICO PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS SARS-CoV2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar o polímero conjugado F8T2, solubilizado em o-diclorobenzeno com uma concentração de 4 mg/ml, depositado por spin coating em um substrato de vidro e submetido a um tratamento térmico de 100 °C.

3. BIOSSENSOR ÓPTICO PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS SARS-CoV2, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar um filme fino do polímero conjugado F8T2 e sobre esse filme, depositado por drop cast, 100 µl do antígeno referente ao vírus, 100 µl do bloqueador de superfícies BSA e 100 µl do anticorpo referente a detecção do vírus.

4. BIOSSENSOR ÓPTICO PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS SARS-CoV2 de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por detectar a presença do referido vírus através da ampliação do espectro de fotoluminescência do F8T2, na região de 600-650 nm com excitação em 450 nm.

FIGURAS

Figura 1
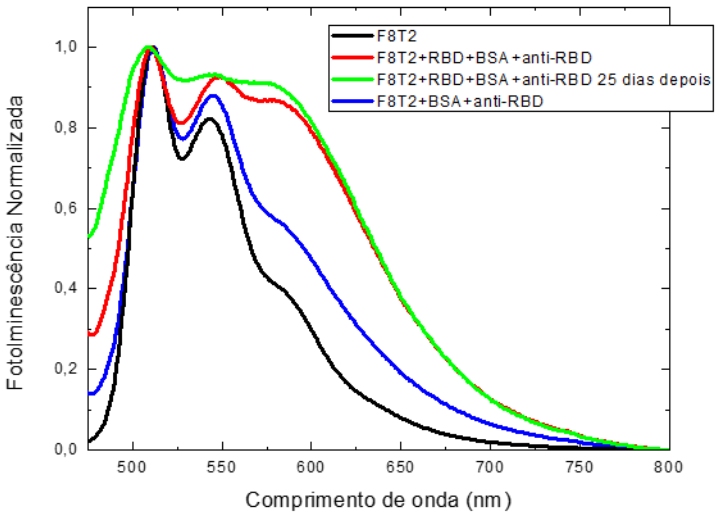
Figura 2