



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020020292-8 A2



(22) Data do Depósito: 02/10/2020

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

(54) **Título:** BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES

(51) **Int. Cl.:** A61B 5/1455; G01N 21/64; G01N 33/68; G01N 33/569; G01N 21/77; (...).

(52) **CPC:** A61B 5/1455; G01N 21/64; G01N 33/6893; G01N 33/569; G01N 21/77; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

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

(57) **Resumo:** BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES. A presente invenção trata de dispositivos sensores capazes de detectar diferentes tipos de infecções virais, contidos em amostras biológicas, através de propriedades ópticas, utilizando polímeros condutores. Os polímeros condutores são utilizados como transdutor que transforma o sinal resultante da interação entre o antígeno e o anticorpo em um sinal que pode ser facilmente caracterizado por propriedades ópticas. Os dispositivos apresentaram alta sensibilidade e foram capazes de detectar quantidades mínimas de antígenos e anticorpos, reduzindo o risco de falsos-negativos. Os dispositivos podem ser fabricados sobre vários tipos de substratos e métodos de deposição, incluindo substratos flexíveis e impressão de rolo para rolo.

Anti-RBD
BSA
RBD
F8T2
Vidro

“BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES”

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata de um dispositivo óptico para o sensoramento de infecções virais em amostras biológicas utilizando polímeros condutores como transdutor. O sensor em questão detecta a ligação do antígeno com o anticorpo através da interação desses compostos com o polímero condutor, 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 coronavírus 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 imunoglobulinas. 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 analito alvo, em interface com um transdutor físico-químico para converter a interação biológica em um sinal mensurável [6–9].

[007] Dentro das classes de biossensores, destacam-se 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™ (GE Healthcare) e Spreeta™ (Texas Instrument). 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 condutores, 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 condutores 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 trata de um biossensor óptico para 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 anticorpos secundários são distribuídos. Pelo menos um dos anticorpos compostos, um antígeno e pelo menos um dos anticorpos secundários 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 de cor no 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 infecções virais utilizando polímeros condutores como material sensor através da caracterização óptica.

[014] Nessa invenção, foi utilizado filmes finos de um polímero condutor. Nosso teste utilizou o polímero F8T2, solubilizado em o-diclorobenzeno em uma concentração de 4 mg/ml. Após a solubilização do material, ele foi depositado por centrifugação de solução em um substrato de vidro previamente limpo, submetido a tratamento térmico de 100 °C. Mas poderia ter sido solubilizado em vários outros solventes, em como poderia ser depositado por vários métodos como impressão da solução, spray, espalhamento por fenda de menisco entre outras. Também poderia ter sido depositado em vários tipos de substrato inclusive plásticos e tecidos, flexíveis ou não.

[015] A fim de detectar anticorpos IgG contra o vírus SARS-CoV2, sobre esse filme, foi depositado por gotejamento de solução, 100 µl do antígeno recombinante RBD da proteína Spike de SARS-CoV produzido

na bactéria *Escherichia coli*, 100 µl do bloqueador de superfícies soroalbumina bovina (BSA) e 100 µl do anticorpo IgG anti-RBD da proteína Spike de SARS-CoV-2 produzido em coelhos, conforme apresentado na Figura 1. Cada camada poderia ter sido depositada utilizando várias metodologias, o importante é a obtenção dos filmes empilhados na ordem certa. 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 para avaliação da interação do anticorpo com a proteína do vírus foi feita utilizando um fluorímetro HORIBA. Para este caso demonstrado de combinação de materiais, os filmes foram excitados em 450 nm, e os espectros de fotoluminescência são apresentados na Figura 2. Em outras combinações de polímero condutor, antígeno e anticorpo poderá haver a necessidade de adequar a energia da luz (comprimento de onda) de sensibilização. O sensor depois de caracterizado poderá ser montado em um sistema eletrônico simplificado para medir apenas uma faixa de luz, neste caso (600-650nm), tornando o sensor portátil.

Citação de Figuras

[018] A Figura 1 apresenta um esquema da montagem do sensor óptico, onde as camadas são constituídas de vidro, F8T2, antígeno RBD, BSA, anticorpo IgG anti-RBD.

[019] A Figura 2 apresenta os espectros de fotoluminescência da amostra com o polímero F8T2 (curva preta); da amostra com o F8T2+antígeno RBD+BSA+anticorpo IgG anti-RBD (curva vermelha); e da amostra com o F8T2+BSA+anticorpo IgG anti-RBD (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). O sensor é muito estável, mantendo seu comportamento por vários dias (curva verde). Sendo assim a presente invenção detecta o anticorpo através da emissão de luz vermelha (600-650nm) com intensidade diferenciada para as amostras com anticorpo presente.

Referências

- [1] A. Balasubramanian, B. Bhuvu, 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 O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** caracterizado por utilizar filmes finos de polímero condutor como material sensor para a detecção de infecções virais.
2. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por utilizar tintas do polímero condutor como material sensor depositado sobre qualquer tipo de substrato.
3. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por utilizar tintas de polímero condutor ou misturas de polímeros condutores como material sensor para a detecção de qualquer infecção viral.
4. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por utilizar o polímero condutor F8T2 (poli [(9,9-di-n-octilfluorenil-2,7-di-il)-alt-2,2'-bitiofeno-5,5'-diilo]) como material sensor para a detecção da infecção viral causado pelo vírus SARS-CoV2.
5. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por deposição de soluções de um antígeno e um anticorpo.

6. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por deposição de soluções de um antígeno, um bloqueador de superfícies e um anticorpo.
7. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** segundo a reivindicação 6, caracterizado por utilizar polímero condutor como material sensor, seguido de um antígeno, o bloqueador de superfícies albumina sérica bovina (BSA) e um anticorpo.
8. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** segundo a reivindicação 5, 6 e 7 caracterizado por utilizar polímero condutor como material sensor, seguido de um antígeno, um bloqueador de superfícies e um anticorpo, depositados em diferentes tipos de substratos, como vidro, materiais flexíveis e transparentes.
9. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** segundo a reivindicação 5, 6 e 7 caracterizado por utilizar polímero condutor como material sensor, seguido de um antígeno, um bloqueador de superfícies e um anticorpo, depositados em substratos, por qualquer método impressão,
10. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** segundo a reivindicação 5, 6 e 7 caracterizado por utilizar polímero

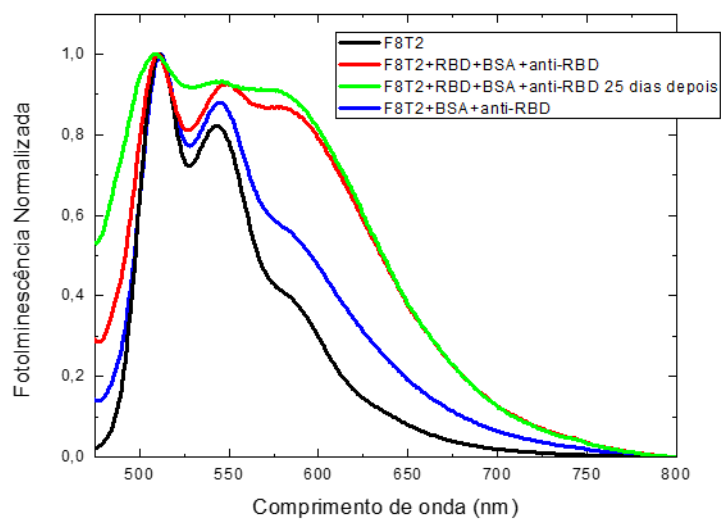
condutor como material sensor, que transforma o sinal resultante da interação entre o antígeno e o anticorpo em um sinal que pode ser facilmente caracterizado por propriedades ópticas.

11. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** segundo a reivindicação 10 caracterizado por utilizar polímero condutor como material sensor, que transforma o sinal resultante da interação entre o antígeno e o anticorpo em um sinal que pode ser facilmente caracterizado por medidas de fotoluminescência.
12. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** segundo a reivindicação 1 e 2, caracterizado por utilizar o polímero condutor poli [(9,9-di-n-octilfluorenil-2,7-di-il)-alt-2,2'-bitiofeno-5,5'-diilo] (F8T2) como material sensor.
13. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** de acordo com a reivindicação 1 e 2 caracterizado por utilizar qualquer polímero condutor como material sensor, solubilizados em qualquer solvente compatível.
14. **BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES** de acordo com a reivindicação 13 caracterizado por utilizar qualquer polímero

condutor como material sensor, solubilizados em o-diclorobenzeno (O-DCB).

FIGURASFigura 1

Anti-RBD
BSA
RBD
F8T2
Vidro

Figura 2

RESUMO**“BIOSSENSOR ÓPTICO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS
UTILIZANDO POLÍMEROS CONDUTORES”**

A presente invenção trata de dispositivos sensores capazes de detectar diferentes tipos de infecções virais, contidos em amostras biológicas, através de propriedades ópticas, utilizando polímeros condutores. Os polímeros condutores são utilizados como transdutor que transforma o sinal resultante da interação entre o antígeno e o anticorpo em um sinal que pode ser facilmente caracterizado por propriedades ópticas. Os dispositivos apresentaram alta sensibilidade e foram capazes de detectar quantidades mínimas de antígenos e anticorpos, reduzindo o risco de falsos-negativos. Os dispositivos podem ser fabricados sobre vários tipos de substratos e métodos de deposição, incluindo substratos flexíveis e impressão de rolo para rolo.