



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

(21) BR 102013024172-5 A2

(22) Data do Depósito: 20/09/2013

(43) Data da Publicação: 26/01/2016
(RPI 2351)



(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR, IMUNOSSENSOR, KIT PARA DETECÇÃO DE UM VÍRUS E MÉTODO DE DETECÇÃO

(51) Int. Cl.: G01N 27/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): MARLI LEITE DE MORAES, SIDNEY JOSÉ LIMA RIBEIRO, ELENICE DEFFUNE, JOSY CAMPANHÃ VICENTINI DE OLIVEIRA, LAIS RONCALHO DE LIMA, APARECIDA VITÓRIA GONÇALVES DE SOUZA

(74) Procurador(es): FABIOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR, IMUNOSSENSOR, KIT PARA DETECÇÃO DE UM VÍRUS E MÉTODO DE DETECÇÃO. Esta invenção trata de um processo de produção de um imunossensor para a detecção da presença de um vírus em uma amostra biológica; imunossensor para a detecção da presença de um vírus em uma amostra biológica; kit para a detecção de um vírus em uma amostra biológica e método para a detecção de um vírus em uma amostra biológica.

**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR, IMUNOSSENSOR, KIT
PARA DETECÇÃO DE UM VÍRUS E MÉTODO DE DETECÇÃO**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo das medições com
5 finalidade de diagnóstico; especificamente ao campo dos
instrumentos é métodos para a detecção de patógenos.

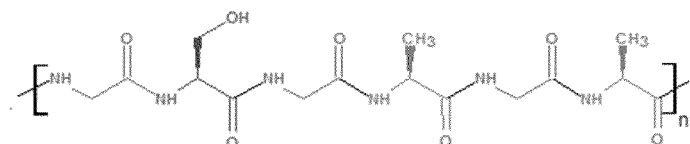
ESTADO DA TÉCNICA

A imobilização de biomoléculas tais como enzimas,
ácidos nucleicos e anticorpos, em superfícies sólidas, é um
10 grande desafio para a aplicação em biossensores. A
organização estrutural ou a atividade dessas biomoléculas é
essencial para o bom desempenho de tais dispositivos. A fim
de melhorar a estabilidade e sensibilidade da biomolécula
imobilizada, uma variedade de métodos tem sido investigada
15 como, por exemplo, monocamadas automontadas (SAM),
Langmuir-Blodgett (LB) e revestimentos automontados camada-
por-camada (Layer-by-Layer-*LbL*).

O método *LbL* tem sido adequado para a imobilização de
moléculas biológicas, devido à sua versatilidade e ao fato
20 de que o processo de adsorção é efetuado sob condições
simples e de baixo custo operacional. A montagem do
revestimento *LbL* baseia-se em interações intermoleculares
entre os materiais, portanto, há um grande interesse em
encontrar materiais adequados para a alternância com a
25 biomolécula, de modo que mantenha a sua função biológica
específica.

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de
interesse na utilização de polímeros naturais como matriz
de imobilização para as biomoléculas, tais como quitina,
30 quitosana e fibroína da seda.

A fibroína da seda é composta quimicamente pelos aminoácidos glicina, alanina, serina e, em menor quantidade, por tirosina e outros aminoácidos residuais. A glicina e a alanina constituem a maior parte de sua
 5 composição, correspondentes a 75% em mol da proteína. As várias repetições desses aminoácidos em sequência constitui a região cristalina da fibroína, formando o arranjo conhecido como folha- β , conforme pode ser visto no esquema 1. A região amorfa contém a maioria dos resíduos de
 10 aminoácidos com uma cadeia lateral volumosa e polar. As propriedades de tensão das fibras da seda dependem principalmente da estrutura cristalina, enquanto outras propriedades como retenção de umidade e resistência química, dependem do estado da região amorfa.



15

Gly Ser Gly Ala Gly Ala

A fibroína vem sendo largamente estudada no campo de biomateriais, pois apresenta compatibilidade com diversos tipos de células, alta resistência mecânica e
 20 microbiológica, além da possibilidade de ser obtida sob diversas formas como pós, revestimentos e hidrogéis.

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (VHC) e que afeta, sobretudo o fígado. Esse vírus é transmitido pelo sangue contaminado ou através
 25 de transfusão de sangue ou injeção intravenosa de drogas foi identificado em 1989.

A infecção é muitas vezes assintomática, embora a

infecção crônica possa levar à fibrose do fígado e por fim à cirrose, que normalmente só se manifesta passados vários anos. Em alguns casos, os indivíduos com cirrose contraem insuficiência hepática ou câncer do fígado, podendo haver
5 ainda complicações que representam risco imediato de vida, como varizes esofágicas ou gástricas.

Por isso é fundamental para a detecção do HCV o uso de métodos rápidos e com baixo custo. Os testes mais utilizados hoje em dia para diagnosticar a hepatite C
10 incluem o método imunoenzimático ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), o ensaio Western Blot e de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR).

O documento CN102229933 descreve um aptâmero capaz de
15 identificar a proteína NS5A do vírus da hepatite C (HCV); além de escrever os derivados do aptâmero, um kit de detecção do HCV e compostos para inibir a replicação viral.

JP2005176757 trata de um método para determinar o HCV e seus subtipos J/W; e trata ainda de um método para o
20 diagnóstico da hepatite C.

Já o documento KR20020034759 trata de um método para a detecção do HCV e kit diagnóstico contendo os mesmos, pelo uso de uma mistura de antígenos recombinantes derivados do HCV.

25 Embora úteis, tais procedimentos envolvem alto custo e demandam um lapso de tempo relativamente grande para a obtenção do resultado.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

O primeiro objetivo da presente invenção é propor o
30 processo de produção de um imunossensor para a detecção do

vírus da hepatite C.

Outro objetivo da invenção é propor um imunossensor capaz de detectar o vírus da hepatite C.

É ainda outro objetivo da presente invenção propor um
5 kit para a detecção do vírus da hepatite C.

O último objetivo da presente invenção é propor um método para a detecção do HCV em uma amostra biológica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Para se obter uma completa visualização dos objetivos
10 da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

Figura 1 - Espectros UV-visível do microsensor revestido com número variado de camadas de polímero.

15 Figura 2 - Espectros UV-visível do microsensor revestido com número variado de camadas de polímero/antígeno.

Figura 3 - Espectros de dicroísmo circular (CD) da fibroína da seda em solução aquosa e em revestimento *LbL*.

20 Figura 4 - Espectros de fluorescência da fibroína da seda em solução aquosa e para o revestimento de fibroína.

Figura 5 - Espectros de dicroísmo circular para o NS5A-1 em solução aquosa e dos revestimentos automontados fibroína/NS5A-1.

25 Figura 6 - Voltamogramas dos imunossensores.

Figura 7 - Curvas analíticas dos revestimentos automontados.

Figura 8 - Voltamogramas dos testes de validação realizados.

30 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção trata de um processo de produção de um imunossensor para a detecção da presença de um vírus em uma amostra biológica, cujo imunossensor é compreendido de um substrato inerte; um polímero orgânico; e um
5 antígeno.

O substrato inerte é tratado com uma primeira solução solvente aquosa durante entre 5 a 20 minutos, a uma temperatura entre 50 a 80 °C; e, em seguida, o substrato inerte é tratado com uma segunda solução solvente aquosa
10 durante entre 5 a 20 minutos, a uma temperatura entre 50 a 80 °C.

Para fins dessa invenção, o substrato inerte é um eletrodo feito de silício, carbono, grafite, poliestireno, polietileno tereftalato (PET), polimetil-metacrilato
15 (PMMA), polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP) circuito impresso em ouro, cromo, prata ou cobre.

A primeira solução solvente aquosa é consistida de uma mistura de 1:1:1 a 1:1:20 entre uma base, um agente oxidante e água; e a segunda solução solvente aquosa é
20 consistida de 1:1:1 a 1:1:20 entre um ácido, um agente oxidante e água. A base é uma monobase pertencente ao grupo consistido de hidróxido de amônia, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio; o ácido é pertencente ao grupo consistido ácido clorídrico, ácido nítrico e ácido
25 perclórico; o agente oxidante é o peróxido de hidrogênio.

Preferencialmente, a primeira solução solvente aquosa é consistida de uma mistura de 1:1:3 a 1:1:6 entre uma base, peróxido de hidrogênio e água; e a segunda solução solvente aquosa é consistida de 1:1:5 a 1:1:8 entre um
30 ácido, peróxido de hidrogênio e água.

A deposição do polímero orgânico ocorre pela imersão durante 5 a 15 minutos do substrato em uma solução contendo entre 0,001 a 0,5 % do polímero orgânico; lavado com água para remoção das moléculas não aderidas a ele e seco. Preferencialmente, a secagem ocorre em atmosfera modificada por nitrogênio. Nesta invenção, o polímero orgânico é a fibroína da seda.

Após a deposição do polímero, o substrato revestido pelo polímero orgânico é imerso durante 5 a 15 minutos em uma solução contendo entre 0,01 a 1 mg/mL⁻¹ de um antígeno; em seguida o substrato é lavado com água para remoção das moléculas não aderidas a ele. Após a lavagem, o substrato é seco em atmosfera modificada por nitrogênio. Este procedimento é repetido de entre 1 a 10 vezes para a obtenção de um filme contendo entre 1 a 10 camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno.

O antígeno usado é um peptídeo viral, consistido de uma proteína ou peptídeo não estrutural de um flavivírus, tal como, por exemplo, o vírus do Oeste do Nilo; da hepatite C (HCV); da dengue; do Iguapé; do Ilhéus; do Rocio; da encefalite de Saint Louis; da Bussuquara, do Cacipacoré e da febre amarela. Preferencialmente, o antígeno é um peptídeo não estrutural do vírus HCV; da dengue ou febre amarela. Mais preferencialmente ainda, o antígeno é o NS5A e NS5B do vírus HCV.

Opcionalmente, de forma vantajosa, após a secagem de cada camada depositada, é realizado o monitoramento da superfície recoberta do substrato. O monitoramento é realizado por métodos conhecidos dos versados na arte, podendo ser realizado por dicroísmo e espectroscopia.

O imunossensor para a detecção da presença de um vírus em uma amostra biológica produzido pelo processo acima descrito é, portanto, consistido de um substrato revestido por um filme que compreende entre 1 a 10 camadas de um polímero orgânico intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno. Preferencialmente, o imunossensor é consistido de um substrato revestido por um filme que compreende entre 2 a 6 camadas de fibroína e intercaladas com 2 a 6 camadas de antígeno.

Neste objeto da invenção, o antígeno usado é um peptídeo viral, consistido de uma proteína ou peptídeo não estrutural de um flavivírus, tal como, por exemplo, o vírus do Oeste do Nilo; da hepatite C (HCV); da dengue; do Iguapé; do Ilhéus; do Rocio; da encefalite de Saint Louis; da Bussuquara, do Cacipacaré e da febre amarela. Preferencialmente, o antígeno é um peptídeo não estrutural do vírus HCV; da dengue ou febre amarela. Mais preferencialmente ainda, o antígeno é o NS5A e NS5B do vírus HCV.

Em uma outra modalidade da invenção, o filme que compreende entre 1 a 10 camadas de um polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno, é aplicado sobre os eletrodos com o uso de uma célula de fluxo e tempo de adsorção de 10 minutos, seguido de lavagem do substrato com água.

O imunossensor produzido pelo processo acima descrito é, portanto, consistido de um substrato revestido por filme que compreende entre 1 a 10 camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno. Preferencialmente, o imunossensor é consistido de um

substrato revestido por um filme que compreende entre 2 a 6 camadas de fibroína intercaladas com a 2 a 6 camadas do antígeno NS5A do HCV.

5 A presente invenção trata ainda de kit para a detecção de um vírus em uma amostra biológica consistido de um imunossensor e uma solução eletrolítica.

O imunossensor produzido pelo processo acima descrito é, portanto, consistido de um substrato revestido por um filme que compreende entre 1 a 10 camadas de polímero
10 intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno; e a solução eletrolítica é pertencente ao grupo consistido de solução aquosa de NaCl, NaOH, KI, HCl, PBS, tampão acetato e outras.

Preferencialmente, o imunossensor é consistido de um
15 substrato revestido por um filme que compreende entre 2 a 6 camadas de fibroína intercaladas com 2 a 6 camadas do antígeno, que é um peptídeo viral, consistido de um peptídeo não estrutural de um flavivírus, tal como, por exemplo, o vírus do Oeste do Nilo; da hepatite C (HCV); da
20 dengue; do Iguapé; do Ilhéus; do Rocio; da encefalite de Saint Louis; da Bussuquara, do Cacipacoré e da febre amarela; e a solução eletrolítica é o PBS.

Mais preferencialmente, o antígeno é um peptídeo não estrutural do vírus HCV; da dengue ou febre amarela. Mais
25 preferencialmente ainda, o antígeno é o NS5A e NS5B do vírus HCV.

A invenção também trata de um método para a detecção de um vírus em uma amostra biológica, que compreende o posicionamento de um imunossensor em um dispositivo de
30 leitura; aplicar uma amostra biológica sobre o sensor; e

aplicar um impulso elétrico sobre o imunossensor.

Neste objeto da invenção, o imunossensor é consistido de um substrato revestido por um filme que compreende entre 1 a 10 camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno produzido de acordo com o processo da presente invenção.

A amostra biológica é proveniente de um indivíduo com suspeita de contaminação por um flavivírus. Preferencialmente, a amostra biológica é uma alíquota de sangue compreendida entre 30 a 640 μL o que representa, aproximadamente, algo entre 1 a 10 gotas de sangue.

O vírus é um flavivírus pertencente ao grupo consistido de o vírus do Oeste do Nilo; da hepatite C (HCV); da dengue; do Iguapé; do Ilhéus; do Rocio; da encefalite de Saint Louis; da Bussuquara, do Cacipacoré e da febre amarela. Preferencialmente, neste objeto da invenção, a amostra biológica é proveniente de um indivíduo com suspeita de contaminação pelo vírus HCV, da dengue ou da febre amarela.

O impulso elétrico aplicado é uma corrente alternada, que, ao sofrer variações entre 5 a 10 μA indica a ligação entre o antígeno imobilizado e os anticorpos presentes na amostra biológica testada; mesmo que os anticorpos estejam presentes em uma concentração entre 50 a 10.000 mil partes de anticorpo por mL de amostra.

Portanto, o imunossensor, objeto desta invenção, é eficaz e sensível. Suas propriedades foram observadas quando o revestimento de polímero orgânico e antígeno foi testado tanto na presença de um anticorpo sintético anti-flavivírus quanto na presença de amostras reais de soros

sanguíneos contaminados por um flavivírus em concentrações relativamente baixas, como 10.000 partes por mL de amostra.

Os objetos desta invenção, acima descritos, têm suas concretizações ilustradas pelos exemplos abaixo.

5 Entretanto, cabe ressaltar que os exemplos apresentados são meramente ilustrativos e não devem ser empregados na limitação dos direitos dos inventores, que se restringem somente àquilo contido nas reivindicações em anexo.

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

Exemplos

15 Exemplo 1 - Seleção dos materiais:

Partiu-se do peptídeo sintético NS5A-1. A sequência SEQ. ID. 1 (PPLLESWKDPDYVPPWHG) foi purificada e isolada por HPLC com pureza > 90% e a sequência foi confirmada por análise através de espectroscopia de massa. As soluções de NS5A-1 foram preparadas com água purificada e deionizada em uma concentração de 0,5 mg mL⁻¹.

Trabalhando-se com o anticorpo específico para o peptídeo NS5A-1 (anti-HCV), cada frasco continha 100 µg mL⁻¹, o qual foi diluído em tampão fosfato salino (PBS), em 25 concentrações de 1:100 a 1:10000.

A fibroína de seda foi extraída de casulos da do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). 10 g de casulos foram fervidos durante 30 minutos em 2 L de solução de Na₂CO₃ 0,02 mol L⁻¹ a fim de remover a sericina. Para cada 10 g de fio de seda 30 restantes, 100 mL de solução CaCl₂/CH₃CH₂OH/H₂O (1:2:8)

foram adicionados e a mistura foi aquecida a 60-70 °C para dissolução. Em seguida, a solução foi dialisada com água purificada e deionizada, utilizando membranas de acetato de celulose, à temperatura ambiente durante 48 h. Após este
5 procedimento, a solução de fibroína foi centrifugada a 20000 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente, para remover impurezas e agregados. A solução foi mantida reservada a aproximadamente 5 °C e a concentração de fibroína em solução foi de 4% em massa (m/m).

10 Exemplo 1.1 – Revestimento do substrato:

Revestimentos de fibroína da seda e de fibroína/NS5A-1 foram montados sobre substratos de quartzo previamente tratados com uma solução 1:1:5 de $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ durante 10 minutos a 70 °C, e em seguida com uma solução 1:1:6 de
15 $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ durante 10 minutos a 70 °C.

O processo de deposição da fibroína da seda foi realizado por imersão do substrato na solução de fibroína 0,1%, durante 10 minutos.

Para a montagem dos revestimentos LbL de
20 fibroína/NS5A-1 foi realizada a imersão do substrato na solução de fibroína 0,1%, durante 10 minutos e em solução de NS5A-1 0,5 mg mL⁻¹ durante 10 minutos. Após cada deposição camada por camada, o substrato foi lavado com água purificada e deionizada para remover moléculas mal
25 adsorvidas e em seguida, secas suavemente com N_2 . Repetiu-se este procedimento até alcançar o número de camadas desejadas de fibroína da seda e de bicamadas de fibroína/NS5A-1.

A formação das multicamadas foi monitorada a cada
30 etapa de deposição por Espectroscopia UV-visível. As

medidas de UV-vis foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-vis.

Exemplo 2 - Monitoramento do revestimento:

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) da fibroína da
5 seda e do peptídeo em solução aquosa foram recolhidos com
uma cubeta de quartzo de 1 milímetro de caminho óptico.

Os espectros de CD dos revestimentos automontados de
10 camadas de fibroína da seda e dos revestimentos
automontados com 10 bicamadas de fibroína/NS5A-1 foram
10 obtidos diretamente sobre os sobre substratos de quartzo
nos quais foram preparados.

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de
dicroísmo circular, com a largura de banda de 1 nm, tempo
de resposta de 0,5 s e velocidade de varredura de 100
15 nm/min. Os espectros CD foram obtidos calculando a média de
oito medidas.

As medidas de fluorescência da fibroína da seda e do
peptídeo NS5A-1 foram realizadas em um espectrofotômetro de
fluorescência com excitação a 280 nm, que é o comprimento
20 de onda de absorção dos resíduos da tirosina (Tyr) e do
triptofano (Trp) presentes em ambas biomoléculas.

Os espectros de Fluorescência foram obtidos utilizando
um Espectrofotômetro de Fluorescência.

Exemplo 3 - Revestimento de eletrodos comerciais:

25 Revestimentos automontados de fibroína da seda e de
fibroína/NS5A-1 contendo 1 e 5 camadas e bicamadas,
respectivamente, foram produzidos em eletrodos de carbono
impressos. Neste caso, as soluções de fibroína e do
peptídeo NS5A-1 foram injetadas através de uma célula de
30 fluxo sobre os eletrodos impressos, com tempo de adsorção

de 10 minutos. A cada camada depositada, o revestimento foi lavado com água purificada e deionizada para remover as moléculas fracamente adsorvidas.

Os voltamogramas foram obtidos utilizando um bipotesiostato/galvanostato. Como solução eletrolítica foi utilizada solução de tampão PBS.

A velocidade de varredura foi de 0,05 V/s, com intervalo potencial de -0,6 a 0,6 V. Antes das medidas, 100 µL de uma solução de anti-HCV em concentrações de 1:100 a 1:10.000 anti-HCV:PBS foram adicionados em cada revestimento por 5 minutos e, em seguida, os revestimentos foram lavados com o tampão PBS.

Exemplo 4 - Análise do revestimento:

As Figuras 1 e 2 mostram os espectros de absorção para as camadas dos revestimentos de fibroína da seda e de fibroína/NS5A-1, respectivamente. As figuras inseridas em cada gráfico mostram aumento linear ($R^2 = 0,98$) do máximo de absorção a 280 nm de acordo com o número de camadas depositadas. Este crescimento linear indica que a mesma quantidade de material foi provavelmente adsorvida em cada deposição.

Exemplo 5 - Caracterização do revestimento por Dicroísmo Circular (CD) e Espectroscopia de Fluorescência:

A Figura 3 mostra os espectros CD da fibroína da seda em solução e em revestimento preparado sobre substrato de quartzo. Nesta Figura, os espectros de CD da fibroína da seda em solução aquosa (linha sólida) e em revestimento LbL contendo 10 camadas da proteína (linha tracejada).

A fibroína em solução (0,025% (p/v)) exibiu mínimo em aproximadamente 197 nm, o que é característico de uma

conformação aleatória. Para a fibroína adsorvida sobre o substrato sólido observa-se conformação folha- β , que tem mínimo característico em aproximadamente 217 nm.

A alteração conformacional pode ser atribuída ao rearranjo molecular devido à imobilização em revestimentos. As cadeias moleculares da fibroína interagem de forma rápida e fortemente umas com as outras e, em seguida, são reagrupadas a uma matriz regular, até certo ponto, o que altera sua conformação de α -hélice ou desestruturado para uma estrutura folha- β .

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica amplamente utilizada no estudo da estrutura de proteínas. Os aminoácidos aromáticos, triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) oferecem intrínsecas sondas fluorescentes de conformação da proteína por interações dinâmicas e intermoleculares. Entre estes três aminoácidos, o Trp é a sonda mais popular para investigar a alteração estrutural da proteína e a interação com outras moléculas, pois a fluorescência do cromóforo é altamente sensível ao meio. A proteína fibroína é composta de 9% de Tyr e 0,25% de Trp, que se repetem com a alternância de grupos laterais hidrofóbicos e hidrofílicos ao longo da cadeia.

A Figura 4 mostra os espectros de emissão para a fibroína em solução e para os revestimentos automontados, ambos excitados a 280 nm. Essa figura, apresenta os espectros de fluorescência da fibroína da seda em solução aquosa (linha sólida) e para o revestimento de fibroína com 10 camadas depositadas (linha tracejada).

A atividade de peptídeos, isto é, o reconhecimento antígeno-anticorpo, está relacionado com a sua conformação

ao local de ligação. O processo de reconhecimento de peptídeo-receptor requer uma conformação preferencial ou um ajuste induzido. Desta forma, uma conformação preferencial é uma característica necessária para o seu reconhecimento.

5 No entanto, os peptídeos não têm conformação preferencial em solução, como pode ser visto com o peptídeo NS5A-1 em solução aquosa. O espectro de CD do NS5A-1 em água é mostrado na Figura 5, que indica a predominância de uma estrutura randômica, com um mínimo em 199 nm.

10 Na Figura 5, são apresentados os espectros CD para o NS5A-1 em solução aquosa (linha sólida) e dos revestimentos automontados fibroína/NS5A-1 com 10 bicamadas depositadas (linha tracejada).

A conformação de um peptídeo bioativo pode depender do
15 ambiente, por exemplo, uma alteração na conformação de peptídeos pode ser induzida através da sua interação com biomembranas. Desta forma, o NS5A-1 foi imobilizado em revestimentos de fibroína, que o induziu a sua conformação bioativa. O espectro de CD do NS5A-1 imobilizado em
20 revestimentos automontados de fibroína exibiu um mínimo em 216 nm que pode ser atribuído à soma de estruturas folha- β e α -hélice da fibroína e do peptídeo NS5A-1, respectivamente.

A deconvolução destes espectros foi realizada por meio
25 de softwares específicos, que apresentou 16% de α -hélice, 8% de estruturas β , 29% de múltiplas voltas (turns) e de 47% de estrutura desordenada para o NS5A-1 em solução aquosa, e 42% de α -hélice, 26% de estruturas β , 16% de múltiplas voltas (turns) e de 16% de formas desordenadas
30 para o revestimento LbL de fibroína/NS5A-1.

Deste modo, é possível confirmar que a fibroína induz a organização da estrutura do peptídeo e o espectro de CD do revestimento de fibroína/NS5A-1 pode ser atribuído à soma de estruturas secundárias da fibroína e do NS5A-1.

5 Exemplo 6 - Aplicação do revestimento de fibroína/NS5A-1 para uso como imunossensor:

Revestimentos automontados de fibroína da seda e NS5A-1 foram produzidos sobre eletrodos de carbono impressos contendo 1 e 5 camadas/bicamadas.

10 A Figura 6 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão PBS. Em 6A o voltamograma foi obtido a partir de revestimentos *LbL* com 5 camada de fibroína da seda pura; e em 6B os voltamogramas foram obtidos a partir de revestimentos com 5 camadas de fibroína e 5 camadas de
15 NS5A-1. A linha pontilhada foi obtida na ausência de anticorpos anti-HCV e a linha contínua na presença de anticorpos anti-HCV.

Os voltamogramas obtidos em revestimentos de fibroína da seda na presença de PBS puro e de anti-HCV em solução
20 PBS mostraram alterações insignificantes com quase nenhuma diminuição na corrente, Figura 6A. Em contraste, para o imunossensor obtido pelo filme automontado de fibroína/NS5A-1, o voltamograma exibiu uma diminuição de corrente de cerca de 9 μA quando o anticorpo anti-HCV (100
25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1:100 anti-HCV:PBS) foi adicionado, como observado na Figura 6B. Para os revestimentos com uma camada de fibroína da seda e de fibroína/NS5A-1 os mesmos resultados podem ser observados, porém com uma diminuição de corrente de 7 μA .

30 A diminuição de corrente pode ser atribuída ao

reconhecimento molecular entre o anticorpo anti-HCV e o peptídeo NS5A-1. Este reconhecimento só é possível quando o peptídeo está estruturado, o que corrobora com os resultados de CD e Espectroscopia de Fluorescência. A corrente negativa em baixos potenciais na Figura 6B pode ser atribuída à redução das espécies gerada pela interação antígeno-anticorpo e/ou a redução das ligações dissulfeto presentes no anticorpo. O mecanismo da interação antígeno-anticorpo não é claro, mas sabe-se que envolve a formação de múltiplas ligações não covalentes, tais como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, pontes salinas e forças hidrofóbicas entre o antígeno e os sítios de ligação dos aminoácidos.

A Figura 7 mostra a resposta do imunossensor com 5 bicamadas de fibroína/NS5A-1 quando a concentração de anti-HCV foi variada, de acordo com diluições a partir da concentração de 1:100 anti-HCV:PBS a 1:10.000. A diminuição de corrente apresentou linearidade no intervalo de 0 a 1:5.000 e acima desta concentração, houve uma tendência para a saturação, o que indica que todos os locais de reconhecimento foram ocupados. O imunossensor aqui descrito foi capaz de detectar o anticorpo utilizando diluições de 1:100 a 1:10.000, com certa sensibilidade.

Ainda na figura 7 temos que os revestimentos contêm 1 bicamada de fibroína/NS5A-1 na presença de diferentes concentrações de anti-HCV:PBS (diluições 0; 1:100; 1:500; 1:1.000; 1:5.000; 1:10.000).

Exemplo 7 - Testes em amostras reais soropositivas do vírus da hepatite C (HCV).

A figura 8 mostra os voltamogramas obtidos a partir de

medidas com amostras reais infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV).

Estes testes foram realizados com amostras soropositivas e soronegativas do HCV. Observa-se na figura 5 o voltamograma em preto com barras de erro como uma curva padrão, obtida através das médias de amostras soronegativas para HCV, ou seja, sem a presença de anticorpo anti-HCV, com desvio padrão ponto a ponto. Os voltamogramas de linhas tracejadas são medidas de amostras soropositivas, ou seja, 10 que possuem o anticorpo anti-HCV. Nestes voltamogramas observa-se um aumento na densidade de elétrons, isto é, quando realizamos medidas de amostras infectadas obtemos uma curva que sai do padrão de sinal negativo para a infecção de HCV.

15 De acordo com tais resultados, foi submetido para análise um pedido de patente para o novo protótipo de imunossensor obtido durante o período deste trabalho.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de produção de um imunossensor para a detecção da presença de um vírus em uma amostra biológica **caracterizado pelo** imunossensor ser compreendido de um
5 substrato inerte; um polímero orgânico; e um antígeno.

2 - Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** substrato inerte ser tratado com uma primeira solução solvente aquosa durante entre 5 a 20 minutos, a uma temperatura entre 50 a 80 °C; e, em seguida,
10 o substrato inerte ser tratado com uma segunda solução solvente aquosa durante entre 5 a 20 minutos, a uma temperatura entre 50 a 80 °C.

3 - Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** substrato inerte ser um eletrodo de
15 silício, carbono, grafite, poliestireno, polietileno tereftalato (PET), polimetil-metacrilato (PMMA), polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP) circuito impresso em ouro, cromo, prata ou cobre.

4 - Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** primeira solução solvente aquosa
20 consistir de uma mistura volumétrica de 1:1:1 a 1:1:20 entre uma base, um agente oxidante e água; e a segunda solução solvente aquosa consistir de mistura volumétrica de 1:1:1 a 1:1:20 entre um ácido, um agente oxidante e água.

25 5 - Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** base ser uma monobase pertencente ao grupo consistido de hidróxido de amônia, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio; o ácido ser pertencente ao grupo consistido ácido clorídrico, ácido nítrico e ácido
30 perclórico; o agente oxidante ser peróxido de hidrogênio.

6 - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela deposição do polímero orgânico ocorrer pela imersão durante 5 a 15 minutos do substrato em uma solução contendo entre 0,001 a 0,5 % do polímero orgânico; 5 lavado com água para remoção das moléculas não aderidas a ele e seco.

7 - Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo substrato revestido pelo polímero orgânico ser imerso durante 5 a 15 minutos em uma solução 10 contendo entre 0,01 a 1 mg/mL⁻¹ de um antígeno; em seguida o substrato ser lavado com água para remoção das moléculas não aderidas a ele; e, após a lavagem, o substrato ser seco em atmosfera modificada por nitrogênio.

8 - Processo, de acordo com a reivindicação 7, 15 caracterizado por repetir o procedimento da etapa anterior entre 1 a 10 vezes para a obtenção de um filme contendo entre 1 a 10 camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno.

9 - Processo, de acordo com qualquer uma das 20 reivindicações precedentes, caracterizado pelo polímero orgânico ser a fibroína da seda e o antígeno ser um peptídeo não estrutural de um flavivírus.

10 - - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por produzir um imunossensor para a detecção 25 da presença de um vírus em uma amostra biológica consistido de um substrato revestido por um filme que compreende entre 1 a 10 camadas de um camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno.

11 - Imunossensor para a detecção da presença de um 30 vírus em uma amostra biológica caracterizado por ser

consistido de um substrato revestido por um filme que compreende entre 1 a 10 camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um antígeno.

12 - Imunossensor, de acordo com a reivindicação 11,
5 **caracterizado pelo** substrato ser revestido por um filme que compreende entre 2 a 6 camadas de fibroína e o antígeno.

13 - Imunossensor, de acordo com a reivindicação 11,
caracterizado pelo filme que compreende entre 1 a 10 camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de um
10 antígeno ser aplicado sobre os eletrodos com o uso de uma célula de fluxo e tempo de adsorção de 10 minutos, seguido de lavagem do substrato com água.

14 - Imunossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 ou 13, **caracterizado por** consistir de um
15 substrato revestido por um filme que compreende entre 2 a 6 camadas de fibroína intercaladas com 2 a 6 camadas do antígeno NS5A do HCV.

15 - Kit para a detecção de um vírus em uma amostra biológica **caracterizado por** ser consistido de um
20 imunossensor e uma solução eletrolítica.

16 - Kit, de acordo com a reivindicação 15,
caracterizado pelo imunossensor ser consistido de um substrato revestido por um filme que compreende entre 1 a 10 camadas de polímero intercaladas com 1 a 10 camadas de
25 um antígeno; e a solução eletrolítica ser pertencente ao grupo consistido de solução aquosa de NaCl, NaOH, KI, HCl, PBS e tampão acetato.

17 - Kit, de acordo com a reivindicação 16,
caracterizado pelo imunossensor ser consistido de um
30 substrato revestido por um filme que compreende entre 2 a 6

camadas de fibroína intercaladas com o antígeno NS5A do HCV; e a solução eletrolítica ser o PBS.

18 - Método para a detecção de um vírus em uma amostra biológica **caracterizado por** compreender o posicionamento de
5 um imunossensor em um dispositivo de leitura; aplicar uma amostra biológica sobre o sensor, e aplicar um impulso elétrico sobre o imunossensor.

19 - Método, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado pela** amostra biológica ser uma alíquota de
10 sangue compreendida entre 30 a 640 μL de um indivíduo com suspeita de contaminação por um flavivírus.

20 - Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado pelo** flavivírus ser pertencente ao grupo
15 consistido de o vírus do Oeste do Nilo; da hepatite C (HCV); da dengue; do Iguapé; do Ilhéus; do Rocio; da encefalite de Saint Louis; da Bussuquara, do Cacipacaré e da febre amarela.

21 - Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado pela** amostra biológica ser proveniente de um
20 indivíduo com suspeita de contaminação pelo vírus HCV, da dengue ou da febre amarela.

22 - Método, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado pelo** impulso elétrico aplicado ser uma
25 corrente alternada, que, ao sofrer variações entre 5 a 10 μA indica a ligação entre o antígeno imobilizado e os anticorpos presentes na amostra biológica testada.

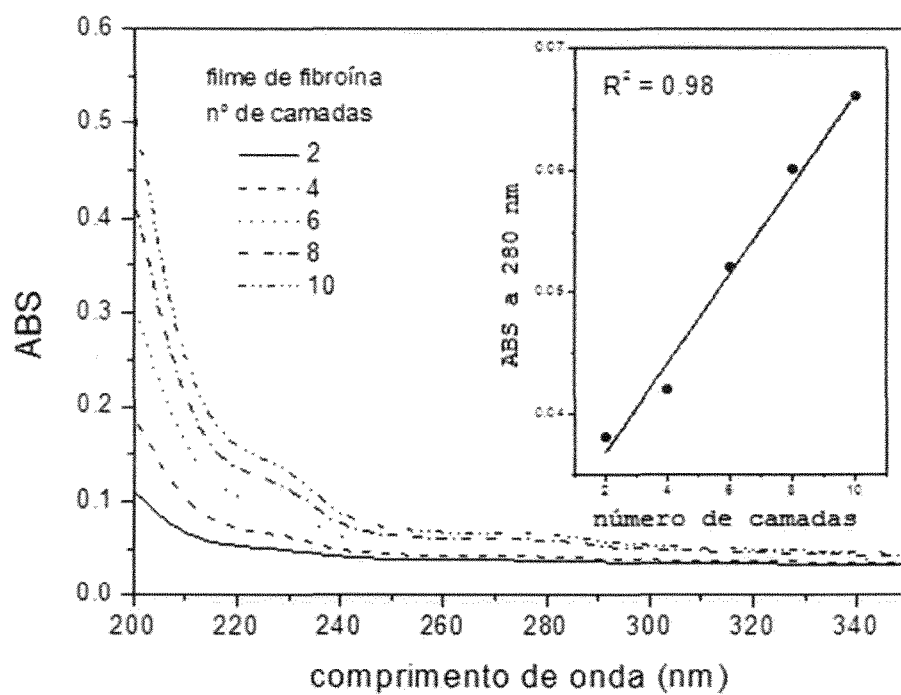


Figura 1

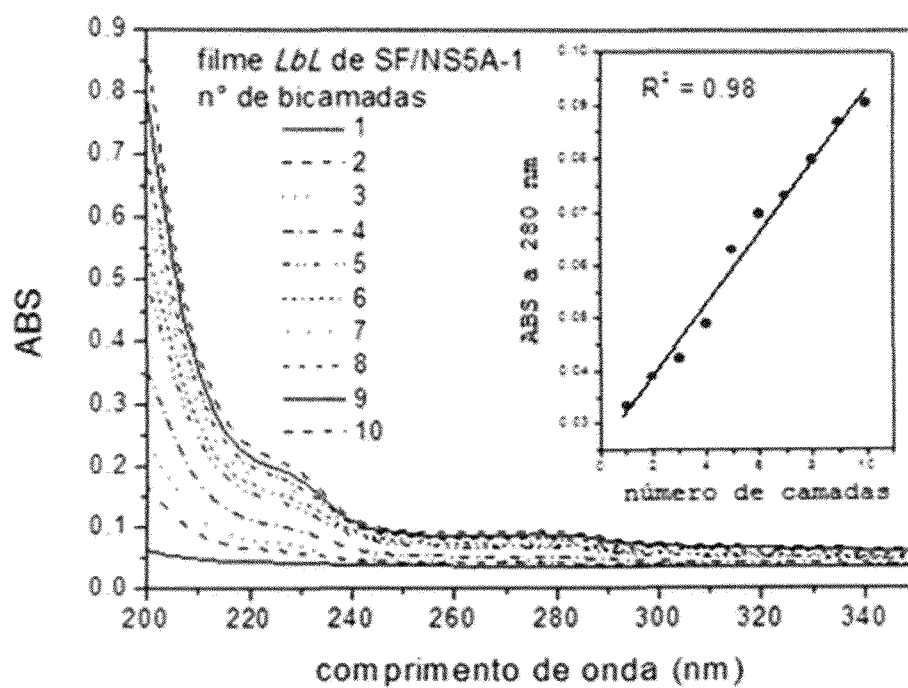


Figura 2

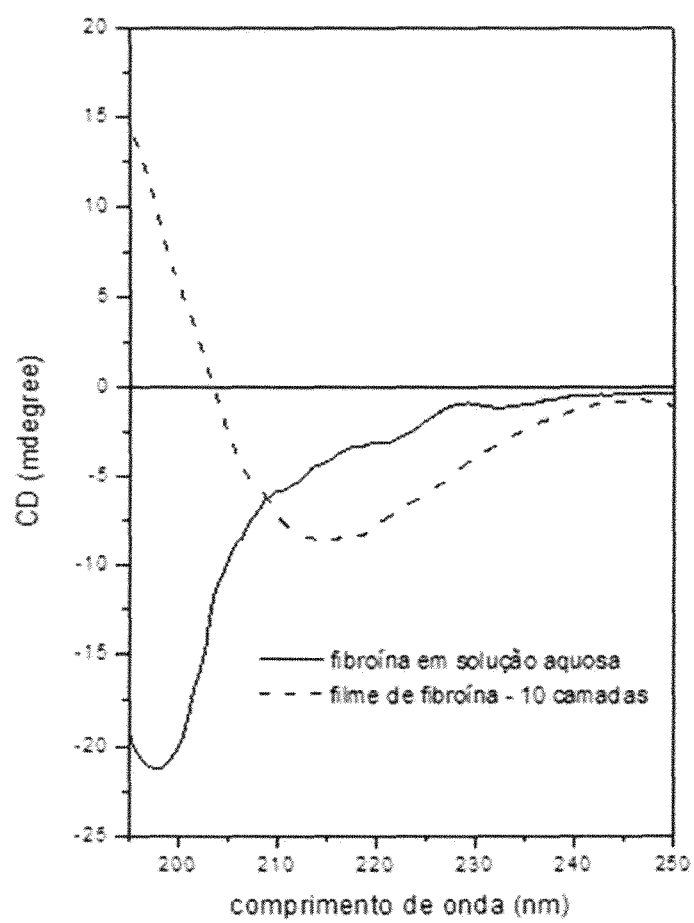


Figura 3

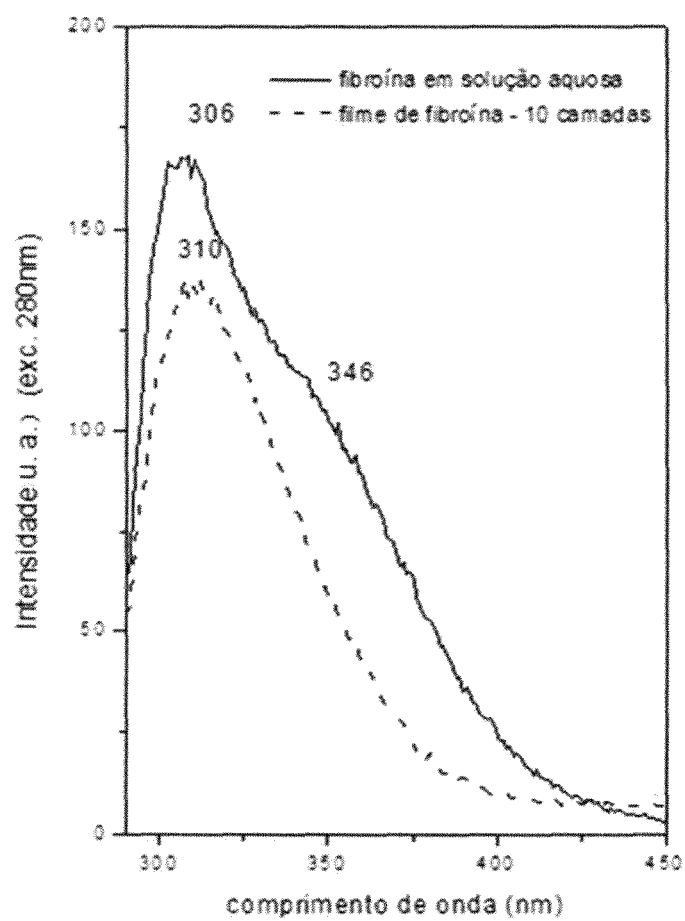


Figura 4

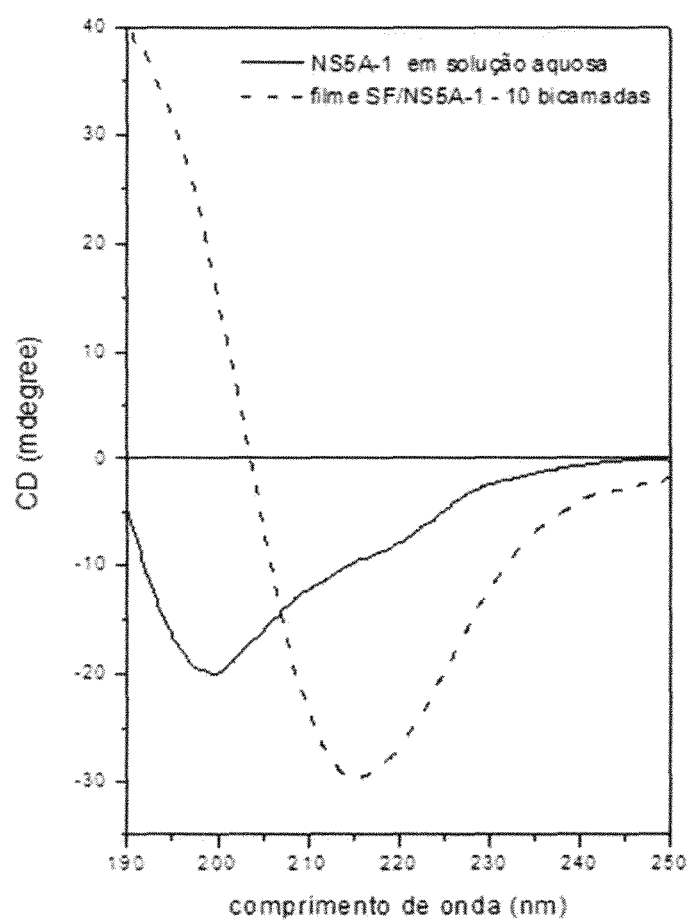


Figura 5

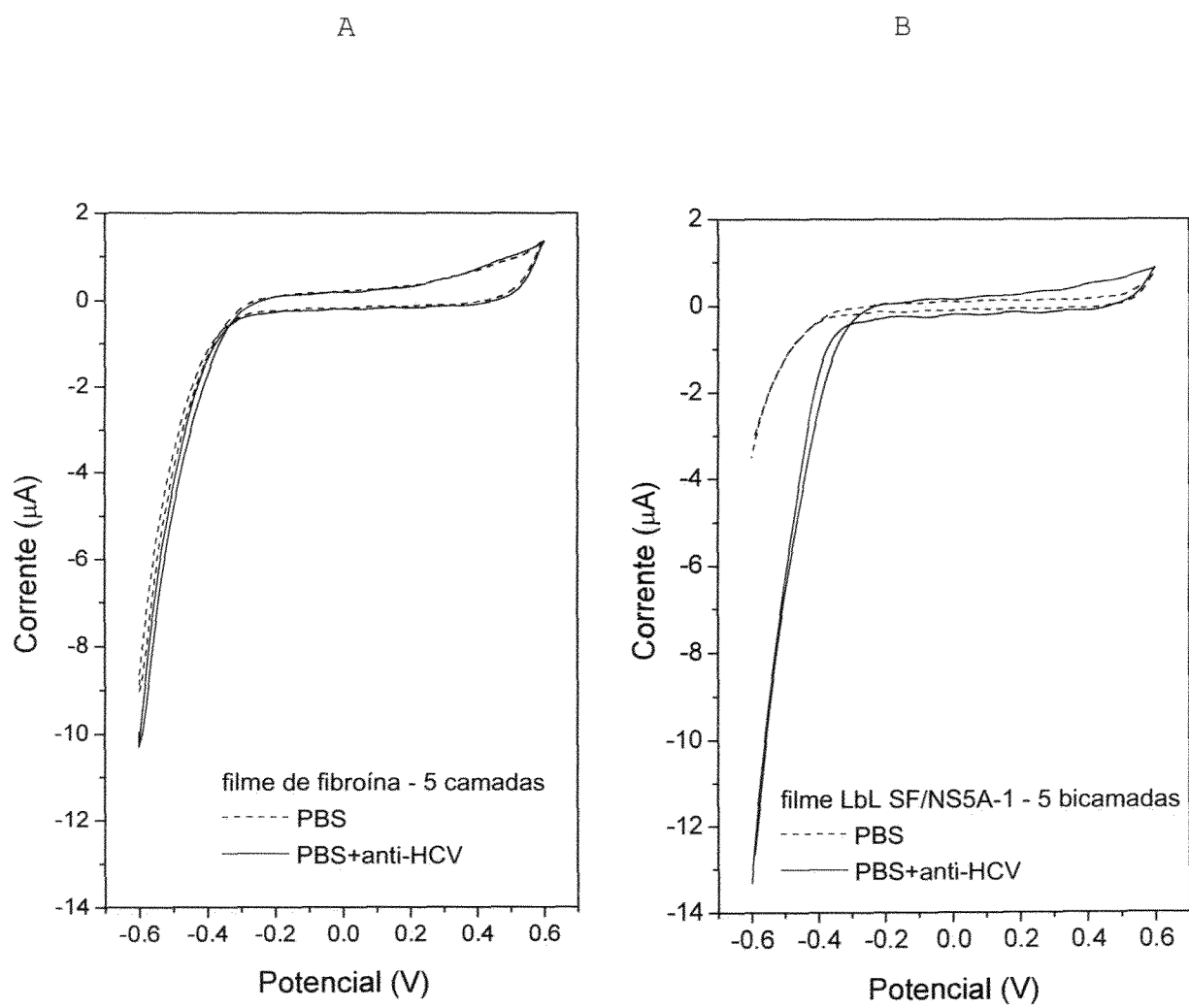


Figura 6

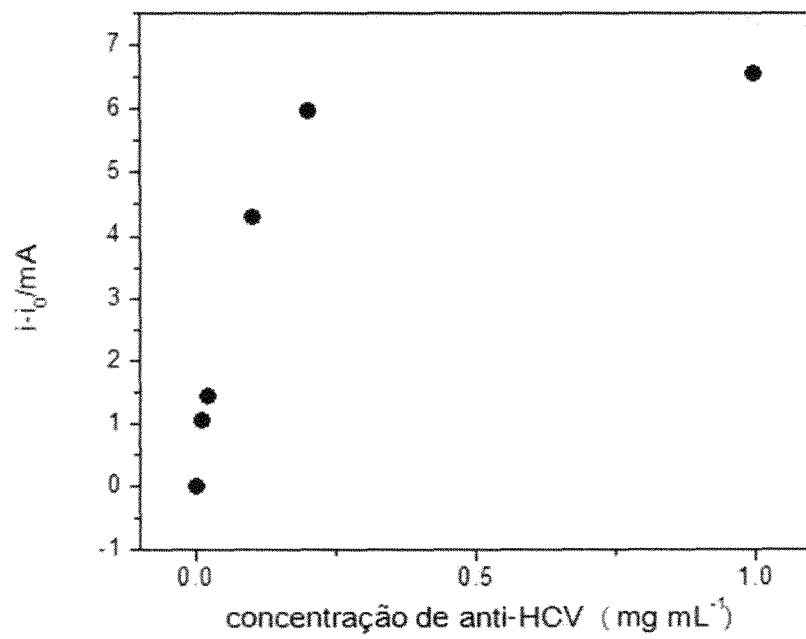


Figura 7

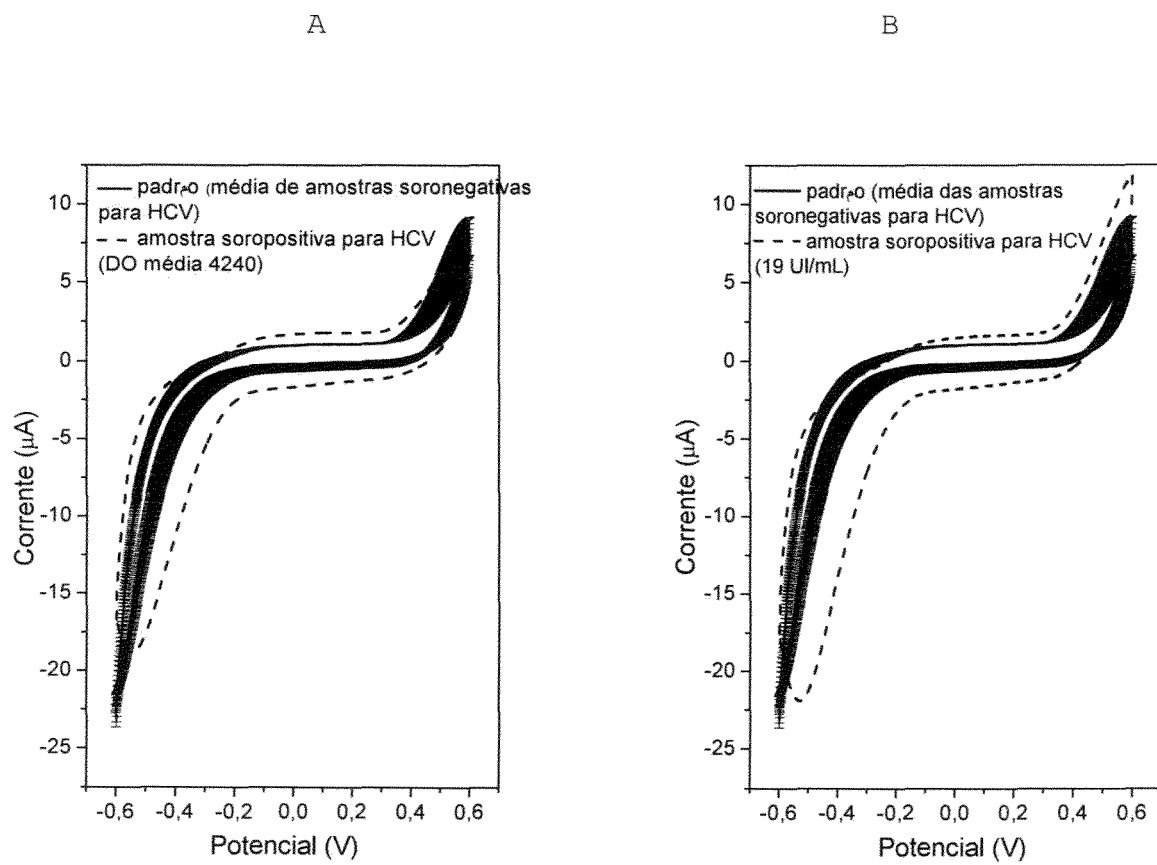


Figura 8

RESUMO

**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR, IMUNOSSENSOR, KIT
PARA DETECÇÃO DE UM VÍRUS E MÉTODO DE DETECÇÃO**

5 Esta invenção trata de um processo de produção de um imunossensor para a detecção da presença de um vírus em uma amostra biológica; imunossensor para a detecção da presença de um vírus em uma amostra biológica; kit para a detecção de um vírus em uma amostra biológica e método para a detecção de um vírus em uma amostra biológica.