



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023006765-4 A2

(22) Data do Depósito: 11/04/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
23/09/2025

(54) Título: PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB), IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO E SEU USO

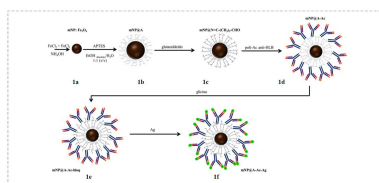
(51) Int. Cl.: G01N 33/543.

(52) CPC: G01N 33/543.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): LUCAS MOREIRA SILVA; HIDEKO YAMANAKA; ANTONIO APARECIDO PUPIM FERREIRA.

(57) Resumo: PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB), IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO E SEU USO. O presente pedido de patente consiste da elaboração de um transdutor modificado com nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano e recobertas com anticorpos policlonais anti-HLB, assim como o imunossensor e o seu uso. A análise química é realizada por meio da interação biológica antígeno-anticorpo e detecção empregando a técnica eletroquímica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um dispositivo de detecção e quantificação impedimétrica, voltado a área citrícola no diagnóstico de HLB (greening). O imunossensor impedimétrico, que mede a interação antígeno-anticorpo por impedância, composto por um anticorpo sintético inédito desenvolvido especificamente para identificação deste antígeno, associado à partícula magnética, resultando em um anticorpo imobilizado sobre partícula magnética. A base tecnológica permite o desenvolvimento de kits diagnóstico e equipamentos portáteis para identificação do antígeno em amostras.



PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB), IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO E SEU USO.

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente consiste da elaboração de um transdutor modificado com nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano e recobertas com anticorpos policlonais anti-HLB, assim como o imunossensor e o seu uso. A análise química é realizada por meio da interação biológica antígeno-anticorpo e detecção empregando a técnica eletroquímica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção se insere no campo da biotecnologia e química analítica e descreve um dispositivo de detecção e quantificação impedimétrica, voltado a área citrícola no diagnóstico de HLB (*“greening”*).

ESTADO DA TÉCNICA

[003] O Brasil é um dos países com maior atividade agroindustrial. Dentre elas destaca-se a citricultura, setor com ampla estruturação organizacional e dispondo de fundações empresariais de assessoria e monitoramento da produção e qualidade dos citros. De acordo com Pesquisa de Estimativa de Safra (PES) do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), o cinturão citrícola de São Paulo/Triângulo Mineiro foi responsável pela produção de 10,77 milhões toneladas de laranjas na safra 2021/2022. No entanto, há diversas doenças causadas por diferentes agentes que atacam pomares de laranja e prejudicam a produção.

[004] O *Huanglongbing* (HLB), ou conhecido como *“greening”*, relatado inicialmente em 1919 na China e descrito como doença biótica em 1956, atualmente, está presente em todo o cinturão citrícola de São Paulo/ Minas Gerais. O HLB causa deterioração das árvores contaminadas, diminuindo a produtividade pela queda de frutos e a qualidade dos frutos, pela alteração na qualidade do suco. Desta maneira, diferentes tópicos em relação à resolução desta problemática vêm sendo examinados, os quais podem ser ressaltados, como estudos referentes à incidência, epidemiologia e distribuição do HLB

(Da Graça *et al.* Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 373–387, 2015. (<https://doi.org/10.1111/jipb.12437>). De acordo com Graça e colaboradores, o controle do inseto vetor, o desenvolvimento de modificação genética e a busca por genótipos resistentes ao HLB, constituem em alternativas que podem ser utilizadas.

[005] O HLB é uma fitopatologia que afeta severamente a citricultura mundial e visto que o Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, a incidência do HLB em São Paulo/Minas Gerais foi de 24,42%, equivalente a 48,7 milhões de laranjeiras. No Brasil o HLB é associado a presença das bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. L. americanus*, ambas transmitidas para as plantas de citros pelo psíldeo *Diaphorina citri* que se alimenta da seiva elaborada presente no floema das plantas de citros. *Ca. L. asiaticus* é a bactéria predominantemente associada ao HLB no Brasil, enquanto *Ca. L. americanus* não é detectada em pomares há quatro anos.

[006] Devido a importância fitossanitária e econômica, se faz necessário o desenvolvimento de um dispositivo capaz de monitorar de forma rápida, sensível, seletiva e de baixo custo o HLB em plantas cítricas, visto que, a metodologia utilizada para diagnóstico de HLB em citros é o teste molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR), que apesar de exibir uma alta sensibilidade e especificidade, necessita de um corpo técnico altamente especializado e infraestrutura física/laboratorial extremamente estabelecida, com elevado custo das análises, ainda mais não sendo possível a execução das medidas de diagnósticos em campo.

[007] A detecção em campo das plantas infectadas com HLB, geralmente, é realizada de forma subjetiva, através da observação de visuais em folhas. O sintoma diagnóstico é denominado de mosqueado, com manchas verdes e amarelas delimitadas pelas nervuras. Porém, estes sintomas nem sempre são típicos e podem ser confundidos com outras doenças, como por exemplo, a Gomose, com algumas das deficiências de micronutrientes, como zinco ou cobre, ou mesmo com a anomalia genética conhecida como *wood pocket*, sendo de difícil caracterização sintomatológica em limões verdadeiros. Há que se considerar também o período de incubação da bactéria, em média 6 meses, que dificulta a detecção e o controle da contaminação no pomar.

[008] Diante das características apresentadas pelas HLB, são empregadas atualmente medidas de controle do HLB em pomares citrícolas, como: aplicação de defensivos agrícolas com a finalidade de contenção do inseto vetor, erradicação de plantas que favoreçam a cópula do inseto vetor nos municípios produtores de citros, em especial a murta ou dama da noite (*Murraya paniculata*) e após diagnóstico positivo de plantas cítricas, deve-se realizar a eliminação destas.

[009] O diagnóstico laboratorial mais utilizado atualmente é o teste molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Teixeira *et al.* *Distribution and quantification of Candidatus Liberibacter americanus, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. Molecular and Cellular Probes*, 22(3), 139–150, 2008. (<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.12.006>).

[010] A literatura registra também a avaliação das folhas de citros empregando espectroscopia de emissão com plasma induzido por “laser” (LIBS) e quimiometria (Pereira *et al.* *Evaluation of the effects of Candidatus Liberibacter asiaticus on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. Talanta*, 83(2), 351–356, 2010. (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.021>), assim como através de imageamento espectrométrico (Pontes *et al.*, 2020; Pontes JGM, Vendramini PH, Fernandes LS, Souza FH, Pilau EJ, Eberlin M, Magnani RF, Wulff NA, Fill TP. 2020. *Mass spectrometry imaging as a potential technique for diagnostic of Huanglongbing disease using fast and simple sample preparation. Scientific Reports*, 10, 13457-13457; 10.1038/s41598-020-70385-4). Diante busca na literatura não se identificou metodologia eletroanalítica para a detecção do HLB.

[011] Biossensores são definidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), como dispositivos analíticos constituídos pelo elemento biológico reconhecedor, o qual pode ser uma enzima, anticorpo, antígeno, proteína, organela ou uma célula inteira, associado a um transdutor físico-químico, que consiste em um elemento que transforma o sinal resultante da interação do analito com o elemento biológico num sinal físico mensurável e que pode ser mais facilmente medido e quantificado, e um amplificador de sinal, que é responsável pela leitura e processamento eletrônico da

medida (Hammond, et al. *Electrochemical biosensors and nanobiosensors. Essays in Biochemistry*, 60(1), 69–80, 2016. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>) e (Thévenot, et al. *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification 1 International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytic. Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131, 2001. ([https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)).

[012] Os imunossensores são dispositivos analíticos usados para detectar o evento de ligação entre o anticorpo (Ac) e o antígeno (Ag) com a formação de um complexo estável, apresentam alta seletividade e sensibilidade (Felix, F. S., & Angnes, L. *Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. Biosensors and Bioelectronics*, 102, 470–478, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>), tornando-os muito atrativos para muitas aplicações em diferentes campos da ciência. Dentre os diferentes tipos de biossensores destaca-se os eletroquímicos, onde a grandeza física mensurável está relacionada com as características elétricas do sistema, podendo ser aferido potencial elétrico, corrente elétrica, carga elétrica, condutancia, entre outras.

[013] Os anticorpos (Ac) são glico-proteínas de conformação globulinas, imunoglobulinas (Ig) que apresentam em geral um peso molecular de ~150 kDa. Estas globulinas são produzidas por linfócitos B e reagem de forma específica ao antígeno (Ag) que induziu a sua produção. Os Ac apresentam estrutura na forma “Y” e uma região constante pesada (Fc) e duas cadeias variáveis (Fab), onde ocorre o reconhecimento e formação do complexo Ag-Ac.

[014] Na literatura é reportado trabalhos utilizando imunossensores eletroquímicos na detecção de diversos analitos. Uliana e Yamanaka (Uliana, C. V., & Yamanaka, H. *Immunosensor for Detection of the Textile Dye Disperse Orange 1 Based on Non-conventional Competitive Assay. Electroanalysis*, 32, 70–75, 2020. <https://doi.org/10.1002/elan.201900059>) descreveram o desenvolvimento e aplicação de imunossensor amperométrico para detecção e quantificação de corante textil 4-anilino-4'-nitroazobenzene (“Disperso Orange 1”) em amostragem de água fluvial. Os autores

associaram o uso de mNP e anticorpos, assim, foi possível a pré-concentração do analíto e não foi necessário etapa de preparo da amostra, devido ao emprego das mNP. O dispositivo apresentou alta especificidade quando colocado em contato com diferentes corantes.

[015] Mendes e colaboradores, (Mendes *et al.* *A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust*, 166-167, 135-140, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.004>.), utilizaram mNP modificadas com proteína G para a imobilização de Ac anti-micélio de *Phakopsora pachyrhizifoi*, desta forma, desenvolvendo um biossensor voltamétrico para a detecção e quantificação de ferrugem asiática da soja. No trabalho os pesquisadores empregaram o uso de eletrodos descartáveis do tipo impresso de carbono serigrafados e o imunoteste foi do tipo sanduíche, utilizando um anticorpo secundário marcado com a enzima fosfatase alcalina. O dispositivo apresentou bom potencial para diagnóstico precoce da ferrugem da soja em campo com baixo custo e fácil manuseio.

[016] Devido a característica inventiva dos imunossensores eletroquímicos, podemos destacar sua vasta aplicabilidade em diferentes áreas, como na saúde visto o depósito BR102019002803-3, onde os inventores descrevem método imunossensor eletroquímico para detecção do biomarcador cardíaco troponina I onde foi empregado como substrato eletrodo de trabalho de grafite modificado com oxido de grafeno reduzido. Para imobilização de IgM anti-troponina I foi realizado etapa prévia de polimerização de tiramina sobre a superfície de trabalho. A detecção e quantificação de troponina I em amostras de soro foi realizada por voltametria de pulso diferencial (VPD).

[017] Na pecuária há depósito de número BR102015030443-9, em que os inventores descrevem IMUNOSSENSOR PARA APLICAÇÃO DIAGNÓSTICA DA CISTICERCOSE BOVINA, em que foram empregados um eletrodo automontado, que compreende uma matriz de imobilização de fibroína da seda para o anticorpo monoclonal da classe IgM. O monitoramento em amostras de soro foi realizado por meio da técnica de voltametria cíclica (VC).

[018] Diante das diferentes técnicas eletroquímicas, podemos ressaltar a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), baseada na análise da resposta linear da relação

perturbação/resposta (função de transferência) quando uma perturbação do tipo senoidal é aplicada no eletrodo de trabalho. É uma ferramenta de medição que permite avaliação de processos faradaicos e não-faradaicos na interface eletrodo/solução em função de um potencial elétrico alternado ($E(t)$), em uma amplitude constante, gerando uma corrente alternada de resposta ($I(t)$) em função do tempo em sistema eletroquímico contendo um eletrodo de trabalho (E_t), um eletrodo de referência (E_r) e um eletrodo auxiliar (E_a). A razão entre as duas grandezas é denominada de impedância eletroquímica ($Z(t)$).

[019] Na literatura é reportado o desenvolvimento de imunossensores empregando a técnica de EIS. Johnson e colaboradores, (*Johnson et al. Sensitive Affimer and Antibody Based Impedimetric Label-Free Assays for CReactive Protein, Analytical Science*, 84, 6553-650, 2021. <https://doi.org/10.1021/ac300835b>) imobilizaram Ac policlonais anti-proteína C reativa sobre superfície de ouro. Para a construção do imunossensor, os pesquisadores modificaram a superfície de trabalho com carboxi-PEG12-tiol, formando uma camada autoorganizada. Devido às características da técnica de EIS os autores demonstraram uma faixa linear de trabalho 0 nM a 1000 nM, e constante de dissociação (K_d) igual $75 \text{ nM} \pm 10 \text{ nM}$, exibindo dessa forma que o dispositivo desenvolvido pode ser aplicável na detecção e quantificação de proteína C reativa sérica em fase aguda.

[020] Rocha e colaboradores, (*Rocha et al. Label-free impedimetric immunosensor for detection of the textile azo dye Disperse Red 1 in treated water. Sensors and Actuators B: Chemical*, 236, 52-59, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.040>), desenvolveram imunossensor impedimétrico para a determinação do corante azo têxtil Disperse Red 1 (DR1). Anticorpos anti-DR1 (Ab anti-DR1) foram acoplados com sucesso à superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) por ligação usando grupos carboxílicos ativados eletroquimicamente gerados. O trabalho demonstrou faixa linear de trabalho com a concentração de DR1 na faixa de 8,40 nM a 100 nM, limite de detecção ($LOD = 2,52 \text{ nM}$) e quantificação ($LOQ = 8,40 \text{ nM}$). Os autores realizaram avaliação da resposta impedimétrica, após contato com outras moléculas interferentes da classe de corantes azo, foi constatado que não nenhuma interferência significativa no sinal avaliado. O dispositivo foi aplicado no monitoramento de resíduos de corante em amostra de água da torneira enriquecida com 20,0 nM DR1, apresentado uma recuperação satisfatória de

98,5%. Os autores concluíram que o imunossensor proposto é simples, relativamente barato e apresenta boa sensibilidade para esta aplicação.

[021] Os inventores do depósito BR 10 2016 030817 8, Imunossensor impedimétrico para detecção e quantificação de bactérias redutoras de sulfato pela presença da enzima APS-redutase, utilizaram de eletrodos comerciais de ouro interdigitais (IDEs) Dropsens G-IDEAU5 como transdutor para monitoramento do risco de biocorrosão em sistemas de produção de petróleo com foco na construção de biossensores para detecção de BRS com base na utilização de anticorpos monoclonais e policlonais como moléculas de reconhecimento de enzima APS-redutase. O IDE é conectado a um potenciostato com analisador de frequência adequado para realizar espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

[022] WO2020070486 *Methods for immunoassays using electrochemical measurement*, em que os inventores divulgam um método para detectar um evento de ligação entre um antígeno e anticorpo utilizando da técnica de EIS como técnica de detecção direta da presença ou ausência do alvo de estudo. Os inventores utilizaram um anticorpo anti-proteína C reativa, adsorvido fisicamente ou conjugado quimicamente à superfície do eletrodo de ouro, possibilitando a detecção de proteína C reativa em amostras biológicas como sangue total ou um componente sanguíneo, como soro ou plasma.

[023] Metodologia eletroanalítica, como os biossensores eletroquímicos apresentam-se como uma opção viável, uma vez que são dispositivos bastante sensíveis, de baixo custo de análise, podem ser miniaturizados e empregados para medida em campo. (Thévenot, *et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification 1 International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytic. Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131, 2001. ([https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)).

[024] A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), baseada na análise da resposta linear da relação perturbação/resposta quando uma perturbação do tipo senoidal é aplicada no sistema eletroquímico. É uma ferramenta não destrutiva de

medição, proporcionando assim uma resposta rápida e sensível das mudanças ocorridas nas interface de trabalho.

[025] A nanotecnologia é uma temática que se refere à ciência e tecnologia de projetar, construir, manipular e compreender materiais e sistemas em nanoescala (tamanho variando de aproximadamente 1 a 100 nm), o que demonstrou impactos abrangentes em uma miríade de aplicações. Dentre os diferentes nanomateriais, podemos ressaltar nanopartículas magnéticas (mNP) como a magnetita (Fe_3O_4).

[026] O uso de nanotecnologia demonstrou impactos abrangentes em uma miríade de aplicações nas áreas da saúde, meio ambiente, energia e agrícola. Dessa maneira o desenvolvimento de biossensores baseados em nanomateriais, dentre os quais podemos ressaltar nanopartículas magnéticas, magnetita, possibilitam uma maior aplicabilidade de sistemas de diagnosticos em campo.

[027] Para a presente invenção a magnetita é o nanomaterial mais adequado, pois esta apresenta baixa ou nenhuma toxicidade, alta biocompatibilidade, possibilita um aumento da área superficial e/ou diminuição da resistência à transferência de carga e exibe comportamento superparamagnético, sendo assim, uma fácil separação do meio reacional (Hammond, *et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. Essays in Biochemistry*, 60(1), 69–80, 2016. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>) e (Lv, *et al. Engineering nanomaterials-based biosensors for food safety detection. Biosensors and Bioelectronics*, 106, 122–128, 2018. (<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.049>)).

[028] É reportado na literatura o trabalho de Freitas e colaboradores (Freitas *et al. Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device. Talanta*, 205(1), 2019. doi.org/10.1016/j.talanta.2019.07.005), onde é descrito um imunossensor eletroquímico para a detecção e quantificação de Tristeza dos Citrus (CTV), causada pelo vírus *Citrus tristeza virus*. Neste trabalho foram empregadas nanopartículas magnéticas modificadas com anticorpo anti-CTV, evidenciando que o uso de nanomateriais, em especial nanopartículas magnéticas favorecem a captura e detecção de Ag em amostras complexas.

[029] Diante do exposto, se faz necessário um dispositivo impedimétrico para detecção e quantificação de HLB (*“greening”*) que apresente baixo custo e aplicabilidade em campo, assim é vantajoso o emprego de nanopartículas magnéticas associadas a anticorpos, tendo como finalidade a captura de antígeno, e a diminuição das etapas de preparo de amostra.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[030] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para a detecção e quantificação de HLB (*“greening”*), baseado no uso de nanopartículas magnéticas modificadas com APTES e técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica.

[031] Nanopartículas magnéticas: Na presente invenção as nanopartículas magnéticas (mNP), magnetita (Fe_3O_4), foram sintetizadas de forma simples pelo método de co-precipitação utilizando a proporção 1:2 Fe^{2+} e Fe^{3+} , respectivamente em meio alcalino utilizando NH_4OH . Posteriormente foi realizado a modificação da superfície das mNP com o (3-aminopropil)-triethoxisilano (APTES).

[032] Biossensores impedimétricos: Na presente invenção as medidas de eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab® 302N contendo modulador de frequência FRA32M Metrohm Autolab® conectados a microcomputador pessoal. Foi utilizado uma célula eletroquímica convencional com três eletrodos, sendo estes um eletrodo referência de $\text{Ag}|\text{AgCl}||\text{KCl}_{3,0 \text{ ml L}^{-1}}$, eletrodo auxiliar de platina (Pt) e como eletrodo de trabalho de carbono vítreo com diâmetro de 3,0 mm, área geométrica de $7,069 \text{ mm}^2$, contendo em seu interior um ímã de neodímio (mGCE). Antes de cada medida de EIS o mGCE foi polido em lixa d'água com granulidade 4000, lavado com EtOH e H_2O Milli-Q e seco em N_2 .

[033] Para medidas de EIS a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ constituída pelos compostos ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio na concentração equimolar de 5,0 mM em meio de KCl a uma concentração de 500,0 mM. Todas as medidas foram realizadas aplicando potencial de circuito aberto (OCP) com tempo de estabilização de 120 segundos, a onda senoidal foi modulada no intervalo de frequência (f) de 50 kHz a 10 mHz com amplitude de modulação (a) de 10 mV (rms), a 10 pontos por década.

[034] Imobilização dos anticorpos: A presente invenção fez o uso de glutaraldeído como via de imobilização dos anticorpos policlonais produzido comercialmente em coelho obtidos comercialmente RHEA BIOTECH, anti pep-Omp, após etapa de imobilização dos Ac, foi realizado bloqueio com solução aquosa de glicina. Seguidamente a material foi colocado sob incubação por 3 horas em agitador horizontal a temperatura ambiente para captura de Ag pelos Ac inseridos sobre a superfície das mNP@A. O Ag empregado foi o peptídeo sintético constituído de 20 aminoácidos, ([NH₂]-FPRSFQMGIILFYAIFGLS-[OH] e obtido comercialmente, da proteína OMP da bactéria *Ca. L. asiaticus*. Entre cada etapa de imobilização de Ac, bloqueio e captura de Ag foram realizadas três etapas de lavagem com solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,5. Para separação das mNP@A-Ac do meio, foi aplicado campo magnético externo utilizando imã de neodímio (Nd₂Fe₁₄B).

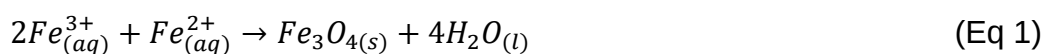
[035] A presente invenção é explicada em mais detalhes pelos exemplos a seguir, sem, contudo, ser limitada pelos mesmos.

Exemplos de concretizações da invenção:

1. Síntese e modificação de mNP

[036] As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (mNP), foram sintetizadas pelo método de co-precipitação (Kim, H., & Kim, D. Polysuccinimide graft copolymer nano aggregates encapsulating magnetites for imaging probe. *Macromolecular Research*, 20(3), 259–265, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13233-012-0052-z>). Inicialmente foram pesados em um bequer 4,85 g de FeCl₃.6H₂O e 1,92 g de FeCl₂.4H₂O, estes foram dissolvidos primeiramente em 5 mL de HCl concentrado e adicionados sobre 75 mL de H₂O.

[037] Posteriormente o béquer a solução foi colocada sob fluxo de N₂ por 30 min e agitação mecânica a uma velocidade de 800 rpm, em seguida foram adicionados 15 mL de NH₄OH concentrado, o meio reacional foi mantido sob fluxo de N₂ e agitação durante 30 min, totalizando um tempo de uma hora, a reação química geral de formação das mNP está descrita na Equação 1. Exibido na Figura 1a.



[038] As nanopartículas de óxido de ferro, magnetita (Fe_3O_4), foram lavadas H_2O Milli-Q até atingir pH 7,0 e entre cada etapa de lavagem foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi separado utilizando um ímã de neodímio, posteriormente foram suspensas em um volume de 80 mL de H_2O , atingindo uma concentração de $28,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Com o intuito de aumentar a força magnética das mNP foi realizado um tratamento térmico, para isso a suspensão contendo o material foi colocado em balão de fundo redondo, o qual foi conectado a um condensador a temperatura de 15°C e levado a banho de glicerol a uma temperatura de 80°C por 6 horas com agitação magnética a uma velocidade de 800 rpm sob fluxo de N_2 , posteriormente foi realizada etapa de silanização.

[039] Visando a inserção de grupos passíveis de ligação com Ac, foi transferido para um balão de fundo redondo um volume de 35 mL das mNP previamente sintetizadas e tratadas termicamente, as quais foram separadas magneticamente com um ímã de neodímio e ressuspensas em 250 mL de uma solução de etanol absoluto/ H_2O 1:1 (v/v) (Shen *et al.*, 2004). Em seguida foram ultrasonificadas por 5 min e adicionados $357,7 \mu\text{L}$ de APTES, sendo a razão de APTES no meio de $1,43 \mu\text{L mL}^{-1}$. Em seguida o sistema, foi colocado sob fluxo de N_2 , com agitação magnética a uma velocidade de 800 rpm a temperatura de 40°C por 60 min, formado assim as mNP@A. Após esta etapa o meio foi lavado com H_2O por 5 vezes e ressuspensão em 35 mL de H_2O , permanecendo na concentração final de $26,11 \text{ mg mL}^{-1}$ (Del Campo *et al.* *Multifunctional magnetite and silica–magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 33–40, 2005. (<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.040>).

[040] Após etapa de síntese das mNP e modificação com APTES (mNP@A), estas foram caracterizadas, por espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier. Os espectros foram obtidos pela técnica de reflectância total atenuada (ATR), utilizando cristal de diamante, 100 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

[041] Os espectros de FTIR mostrados na Figura 2 indicam que mNP apresentou uma banda de transmissão em 550 cm^{-1} a qual é referente ao estiramento da ligação Fe-O, que mNP@A apresentou uma banda em 975 cm^{-1} e 1115 cm^{-1} , indicando que há uma vitrificação da superfície das mNP, outra banda em 1625 cm^{-1} referente vibração C-N,

dessa forma indicado que houve a modificação da superfície das mNP pelo APTES (Del Campo *et al.* Multifunctional magnetite and silica–magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 33–40, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.040>).

2. Imobilização de anticorpos sobre as mNP@A

[042] Para imobilização dos anticorpos policlonais anti-HLB inicialmente foi pipetado em microtubos plástico 14,2 μL de mNP@A na concentração de 26,11 mg mL^{-1} , e ressuspensos em 500 μL solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,5 atingindo uma concentração final de 0,75 mg mL^{-1} .

[043] Em seguida, as mNP@A foram separadas magneticamente e ressuspensas em 500 μL de uma solução aquosa de glutaraldeído 5,0 % (m/v) e agitados a uma velocidade constante por 60 min. Após decorrido o tempo, foram realizadas duas lavagens com H_2O Milli-Q e outra em solução tampão PBS 10 mM, pH 7,5, formando assim as mNP@N=C-(CH₂)₃-CHO, Figura 1c.

[044] Posteriormente, as mNP@N=C-(CH₂)₃-CHO foram separadas magneticamente e ressuspensas em solução de Ac na concentração de 120,0 ng mL^{-1} , preparadas em solução tampão PBS 10 mM, pH 6,5 e colocadas sob agitação por 120 min. Como na estrutura tridimensional dos anticorpos apresenta grupamentos NH₂ livres em suas cadeias laterais, estes são passíveis de formação de uma segunda ligação imina entre o grupamento aldeído presente em mNP@N=C-(CH₂)₃-CHO, desta maneira formando mNP@A-Ac, Figura 1d. A concentração de Ac empregada foi obtida após análise da Figura 3, onde pode-se notar que a melhor relação entre Ag e Ac foi na diluição de 1:50 em ambos, estes valores correspondem a uma concentração de 120,0 pg mL^{-1} , ponto no qual há intersecção entre as diluições de Ac e Ag (*Foguel et al. A Low-Cost Label-Free AFB1 Impedimetric Immunosensor Based on Functionalized CD-Trodes. Chemosensors*, 4(3), 17, 2016. (<https://doi.org/10.3390/chemosensors4030017>)).

[045] Após etapa de ligação de Ac sobre mNP@A, foram realizadas três etapas de lavagem em meio de solução tampão PBS 10 mM, pH 7,5 e ressuspensas em 500 μL de uma solução de glicina 0,5% m/v preparada em meio de solução tampão PBS 10 mM, pH 7,5 para bloqueio químico dos grupamentos aldeídos livres presentes nas mNP@A.

Os tubos foram colocados sob agitação por 60 min e em seguida foram lavados por três vezes em solução tampão PBS 10 mM, pH 7,5, Figura 1e.

3. Parametros analíticos

[046] Após imobilização e bloqueio, como descrito no item 2, as mNP@A-Ac, foram construídas curvas analíticas em triplicada.

[047] Para tal etapa, avaliou-se diferentes concentrações de pep-OMP em meio de solução tampão PBST 10 mM pH 7,5 no intervalo de $1,0 \text{ fg mL}^{-1}$ a $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$. Após etapa de incubação sob agitação por 180 min entre mNP@A-Ac e pep-OMP foram realizadas três etapas de lavagem, utilizado solução tampão PBS 10 mM pH 7,5 e o material foi ressuspenso em 500 μL de solução tampão PBS adicionado Twenn 20 na concentração 0,05% (m/v), PBST 10 mM pH 7,5 para serem realizadas posteriormente medidas de EIS. Posteriormente, foram pipetados 7,5 μL de mNP@A-Ac-OMP sob a superfície do eletrodo de mGCE.

[048] A Figura 4 exibe múltiplos diagramas de Nyquist referentes as diferentes concentrações de pep-OMP, intervalo de $0,0 \text{ fg mL}^{-1}$ a $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$ indicando que os anticorpos imobilizados sobre as mNP@A capturam o Ag presente no meio reacional. Para avaliar efetivamente esse efeito, foi realizado a normalização da resposta impedimétrica, utilizando os valores de ΔR_{tc} , para tal, foi realizado a subtração dos valores de R_{tc} em cada concentração distinta de pep-OMP avaliada do valor de R_{tc} exibido pelo branco (■), mNP@A-Ac-bloq.

[049] A Figura 5 exibe curva analítica construída, pep-OMP no intervalo de $0,5 \text{ fg mL}^{-1}$ a $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$, as barras de erro mostram o desvio padrão obtido a partir da triplicata dos dados dos experimentos. Foi possível observar um aumento linear de ΔR_{tc} em função do $\log [\text{Ag}]$, a regressão linear ajustada sobre os dados apreentou equação $\Delta R_{tc} = 245,84 (\Omega) + 202,06 \left(\frac{\Omega}{\text{fg mL}^{-1}} \right) \times \log[\text{Ag}] (\text{fg mL}^{-1})$, com coeficiente de regressão linear, $r = 0,9995$. Utilizando os valores de coeficiente linear (a) e coeficiente angular (b), foi possível cálculo dos valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) como sendo $0,25 \text{ fg mL}^{-1}$ e $0,83 \text{ fg mL}^{-1}$, respectivamente.

[050] Foram calculados valores de repetibilidade que exibiu valor igual a 3,2% e reprodutibilidade igual a 2,7%. Para obtenção desses valores, foi calculado o coeficiente

de variação, (%CV) pela Equação 2. Para a repetibilidade, foram realizadas 10 medidas técnicas sucessivas de uma mesma preparação de mNP@A-Ac, enquanto que para a reprodutibilidade foram realizadas 1 medida técnicas de 10 preparações distintas de mNP@A-Ac.

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Eq 2})$$

Sendo:

s = desvio padrão apresentado por 10 leituras técnicas;

$\bar{x}$ = media apresenta por 10 medidas leituras técnicas.

[051] Partindo dos dados exibidos na Figura 5, obteve-se a Figura 6, gráfico de Hanes-Woolf, sendo assim possível o cálculo da constante de dissociação (K_d) para o Ag e o Ac imobilizado sobre a superfície das mNP@A na presente invenção. A Figura 6 expressou equação da reta $\frac{[Ag]}{\Delta C_{dl}} = 3039,5614 (fg mL^{-1}) + 4,0015 * [Ag](fg mL^{-1})$, e calculou-se o valor de K_d igual a $759,11 fg mL^{-1}$, demonstrando uma alta associação do Ac e Ag utilizados.

[052] Na Figura 7, estão exibidos as repostas analíticas do biossensor impedimétrico em função dos dias de estocagem avaliados. Na Figura 7a, observamos que o material exibiu um %Sinal igual a 97,8% em quatro dias de estocagem da suspensão de mNP@A-Ac foram estocadas a temperatura ambiente e após 15 dias do início do período avaliado esse valor decaiu para 12,6%. Na Figura 7b, em que as mNP@A-Ac foram estocadas na forma de suspensão em geladeira a 5 °C, observamos que o material a exibiu resposta de 90,6% em 20 dias de monitoramento.

[053] Constatou-se que o processo de liofilização preserva as características das mNP@A e dos anticorpos imobilizados sobre elas e a Figura 7c indica que após 120 dias as mNP@A-Ac apresentam valor igual 80,3% do valor inicial.

[054] O objeto ora pleiteado não necessariamente limita-se ao que foi descrito anteriormente, sendo possíveis outras variações sem fugir do que é contemplado nas reivindicações em anexo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[055] A Figura 1 representa a síntese e modificação nas nanopartículas magnéticas, onde em 1a é visualizada a nanopartícula magnética, cuja a síntese é realizada pelo método de coprecipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino. 1b representa a modificação com APTES, 1c, 1d, 1e exibem as etapas de modificação com glutaraldeído, anticorpo policlonal e etapa de bloqueio com glicina, respectivamente. 1f representa mNP@A-Ac após captura de antígeno.

[056] A Figura 2 exibe espectros de infravermelho com transformada de Fourier das mNP (—) e após modificação com APTES (—).

[057] A Figura 3 exibe a variação do sinal de R_{tc} obtido em função da combinação de diferentes diluições de Ac (■) e Ag (■). As soluções estoque partiram de uma concentração de $6,0 \text{ ng mL}^{-1}$.

[058] A Figura 4 exibe diagramas no plano complexo para o sistema em questão, onde a curva (■) representa o branco, mNP@A-Ac, e as demais curvas exibem a resposta após captura de diferentes concentrações de Ag. Foram avaliadas um intervalo de $[\text{Ag}]$ de $0,5 \text{ fg mL}^{-1}$ a $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$.

[059] A Figura 5 exibe a curva analítica construída, $\Delta R_{tc} \times \text{Log}[\text{Ag}]$, no intervalo de trabalho proposto de $[\text{Ag}]$ de $0,5 \text{ fg mL}^{-1}$ a $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$.

[060] A Figura 6 exibe a curva de Hanes-Woolf, $[\text{Ag}]/\Delta C_{dl} \times [\text{Ag}]$.

[061] A Figura 7 exibe a resposta normalizada do sistema, %Sinal em função do tempo de estocagem das mNP@A-Ac em diferentes condições. Em 7a, suspensão em meio de solução tampão PBST 10 mM pH 7,5 a temperatura ambiente, em 7b, suspensão em meio de solução tampão PBST 10 mM pH 7,5 em geladeira a temperatura de 5°C e em 7c, após processo de liofilização.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- a) Imobilização de anticorpo anti-HLB sobre nanopartículas magnéticas modificadas quimicamente;
- b) Incubação de material formado na etapa a) com antígeno pep-Omp;
- c) Detecção eletroquímica de huanglongbing dos citros em sistema convencional de três eletrodos;
- d) Detecção eletroquímica de huanglongbing dos citros utilizado como sonda redox solução de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio em meio de solução de cloreto de potássio.

2. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** processo de síntese de nanopartículas magnéticas (mNP) Fe_3O_4 acontecer por meio do procedimento de co-precipitação dos sais de FeCl_3 e FeCl_2 na proporção 2:1 em meio alcalino de NH_4OH .

3. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO, de acordo com a reivindicação 1 e 2, **caracterizada pelo** processo de modificação de mNP acontecer com (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) em meio de $\text{EtOH}_{\text{absoluto}}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v).

4. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO, de acordo com a reivindicação 1 e 3, **caracterizada pelo** processo de ligação de agente de imobilização ser solução aquosa de glutaraldeído.

5. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO, de acordo com a reivindicação 1 a 4, **caracterizada pelo** processo de imobilização do anticorpo anti-HLB sobre nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano.

6. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO, de acordo com a reivindicação 1 e 5, **caracterizada pelo** processo de bloqueio acontecer com solução de glicina 0,5 % (m/v) por período de 180 min sobre nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano e anticorpo.
7. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** processo de incubação nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano, anticorpo e antígeno pep-Omp.
8. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB), **caracterizada pelo** processo de detecção eletroquímica utilizando técnica de Espectroscopia de Impedância e material descrito nas reivindicações 1, 2, 3 e 4, como eletrodo de trabalho.
9. PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB), de acordo com a reivindicação 1 a 8, **caracterizada por** utilizar como modificação da superfície do eletrodo de trabalho nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano e anticorpo com concentração entre $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e volume entre $2,5 \mu\text{L}$ e $10,0 \mu\text{L}$.
10. IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB), de acordo com as reivindicações 1 a 9, **caracterizado por** ser formado por nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano e anticorpo.
11. USO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO, de acordo com as reivindicações 1 a 10, caracterizado por ser utilizado para DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB).

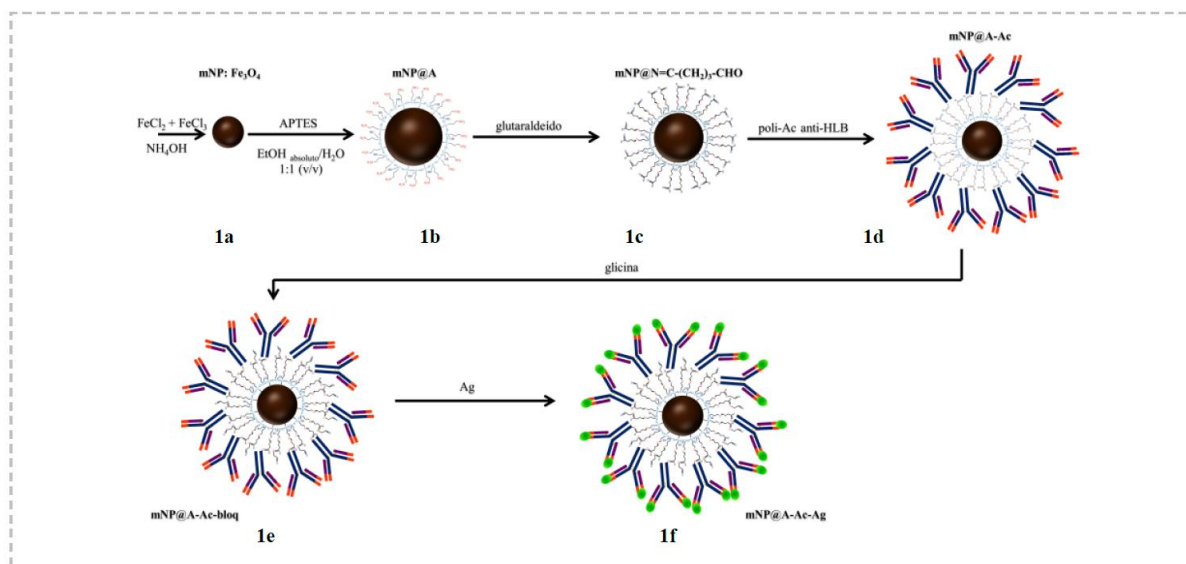


FIGURA 1

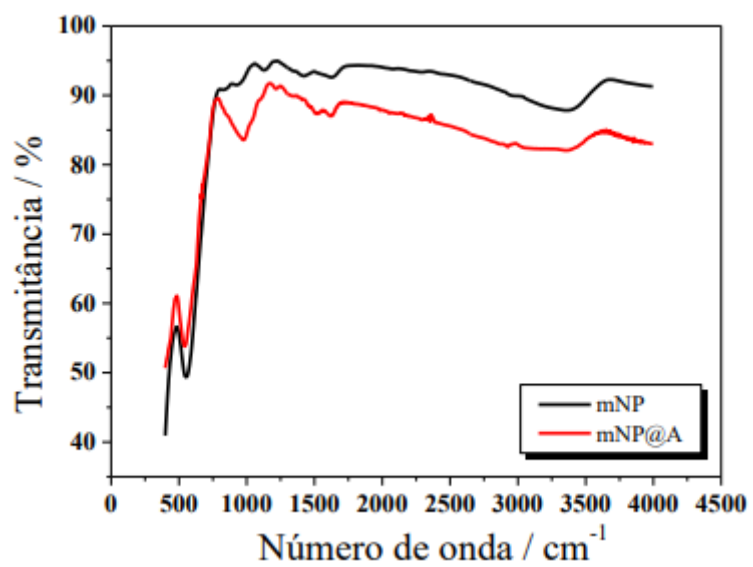


FIGURA 2

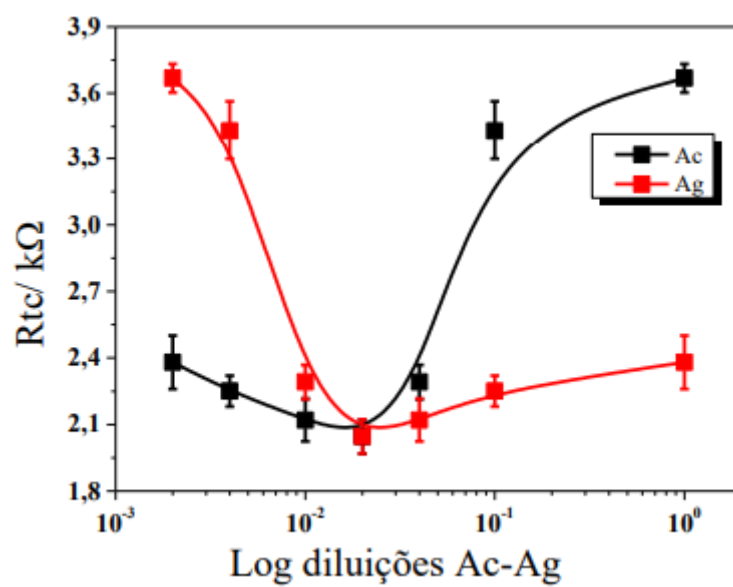


FIGURA 3

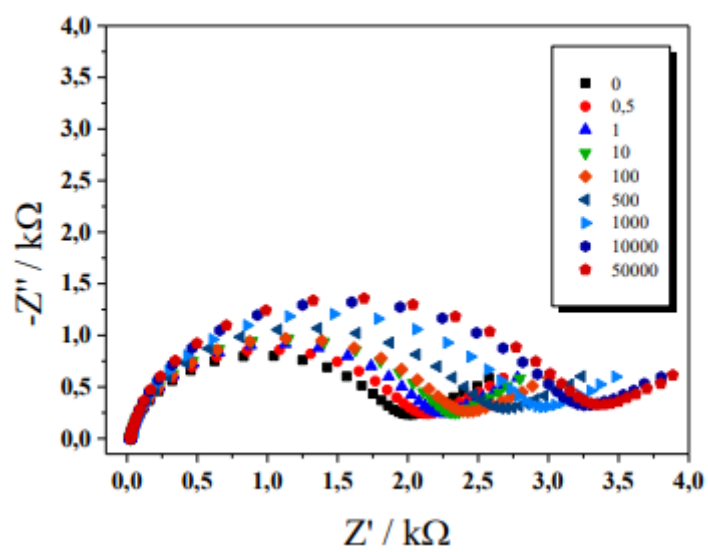


FIGURA 4

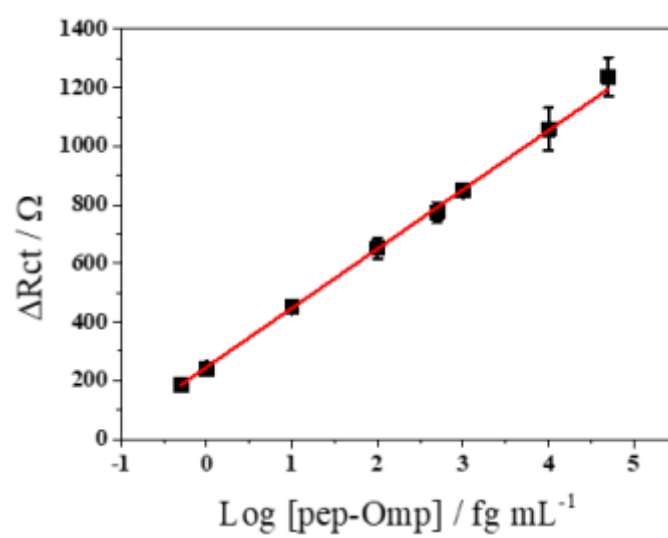


FIGURA 5

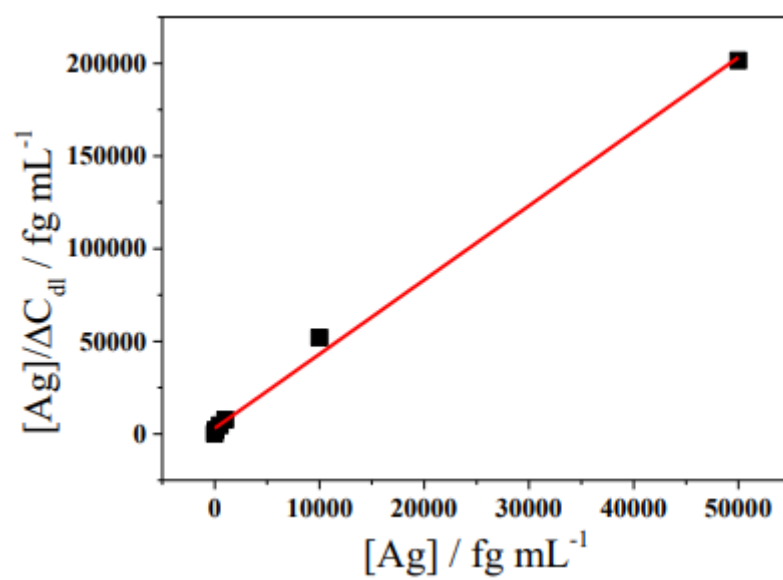


FIGURA 6

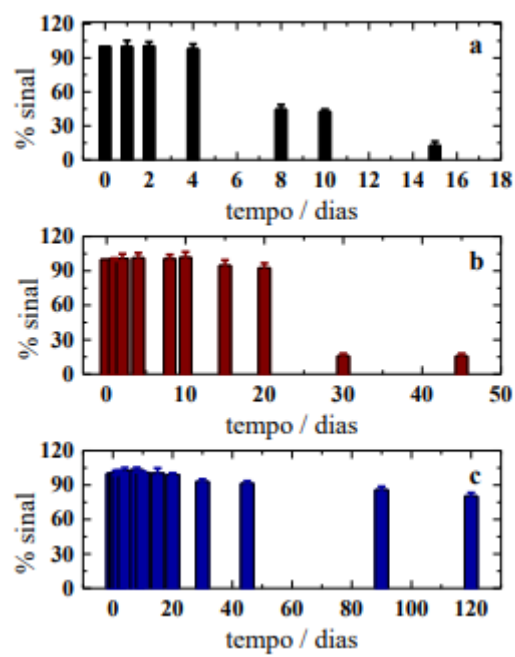


FIGURA 7

RESUMO

PROCESSO DE FORMAÇÃO DO IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DO HUANGLONGBING (HLB), IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO E SEU USO.

O presente pedido de patente consiste da elaboração de um transdutor modificado com nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano e recobertas com anticorpos policlonais anti-HLB, assim como o imunossensor e o seu uso. A análise química é realizada por meio da interação biológica antígeno-anticorpo e detecção empregando a técnica eletroquímica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um dispositivo de detecção e quantificação impedimétrica, voltado a área citrícola no diagnóstico de HLB (*“greening”*). O imunossensor impedimétrico, que mede a interação antígeno-anticorpo por impedância, composto por um anticorpo sintético inédito desenvolvido especificamente para identificação deste antígeno, associado à partícula magnética, resultando em um anticorpo imobilizado sobre partícula magnética. A base tecnológica permite o desenvolvimento de kits diagnóstico e equipamentos portáteis para identificação do antígeno em amostras.