



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

(21) BR 102014002008-0 A2

(22) Data do Depósito: 27/01/2014

(43) Data da Publicação: 27/10/2015

(RPI 2338)



(54) Título: IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO E DISPOSITIVO COMPREENDENDO O MESMO

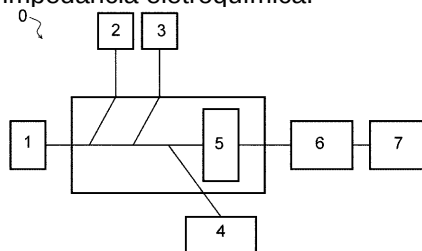
(51) Int. Cl.: G01N 27/02; G01N 30/64

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE FEDERA DO PIAUÍ, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

(72) Inventor(es): FERNANDO MANUEL ARAÚJO MOREIRA, ANA CRISTINA VASCONCELOS FIALHO, ANTONIO APARECIDO PUPIM FERREIRA

(74) Procurador(es): MARCELO FERRO GARZON

(57) Resumo: IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO E DISPOSITIVO COMPREENDENDO O MESMO. O presente pedido de patente revela um dispositivo de detecção impedimétrico voltado a áreas críticas de contaminação microbiana, compreendendo um eletrodo construído a partir de monocamadas autoorganizadas e proteína A imobilizadas na superfície de seu transdutor. A avaliação da contaminação microbiana é efetuada por meio da sucção da atmosfera interna do ambiente, interação Ag-Ac e detecção por impedância eletroquímica.



**"IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO E DISPOSITIVO
COMPREENDENDO O MESMO"**

CAMPO DE APLICAÇÃO

O presente modelo de utilidade revela um
5 dispositivo de detecção impedimétrico voltado a áreas críticas de
contaminação microbiana, compreendendo um transdutor modificado a
partir de monocamadas auto organizadas (SAM), proteína A de *S.*
aureus e anticorpos anti-*S. aureus* imobilizadas na superfície de
trabalho. A avaliação da contaminação microbiana é efetuada por
10 meio da sucção da atmosfera interna do ambiente, interação Ag-Ac e
detecção por impedância eletroquímica.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

Uma das maiores preocupações na esfera da saúde
pública vem a ser as comorbidades em Unidades de Terapia Intensiva
15 e áreas cirúrgicas, decorrentes de infecções nosocomiais. A
prevalência mundial para estas corresponde a cerca de 5%, sendo
estimado 15,5% no Brasil. A elevada exposição a diversos patógenos
nos ambientes hospitalares constitui uma das maiores causas para
estas taxas de mortalidade sendo outros agravantes a associação
20 destes elementos ao próprio perfil dos pacientes (por exemplo,
idade e nível de depressão do sistema imunológico). Tais
parâmetros não raro comprometem a eficiência do seguimento
farmacoterapêutico adotado, além de elevar os riscos da mesma,
dada a possibilidade de reações adversas de medicamentos e
25 interações medicamentosas. Em termos de saúde pública, uma postura
racional deve compreender a adoção de medidas preventivas de modo
a evitar tratamentos custosos e prolongados.

Neste sentido, um dos agentes microbianos de maior relevância vem a ser a bactéria *Staphylococcus aureus* por conta da seleção e proliferação de cepas resistentes à antibioticoterapia - a linhagem MRSA (*S. aureus* resistente a oxacilina, por exemplo). O controle de MRSA endêmica compreende a adoção de diversas estratégias complementares; a identificação e isolamento de carreadores sintomáticos e assintomáticos, a lavagem das mãos antes e após cada procedimento, procedimentos padronizados para lavagem de materiais, restrição da antibioticoterapia e higienização seguida de desinfecção nos ambientes críticos. Apesar destes procedimentos mitigarem de certa forma o risco de contágio entre pacientes, existe a necessidade de se executar ensaios para o monitoramento ambiental. De maneira geral, uma análise via PCR apresenta uma alta sensibilidade; entretanto, a amostragem para a execução da mesma demanda condições extremamente rigorosas, exigindo horas para a obtenção dos resultados. Salienta-se ainda que o uso de PCR não é adequado para monitoramento em campo por agentes da vigilância sanitária, devido à baixa portabilidade do equipamento. Uma abordagem alternativa é por meio de imunoenaios como ELISA; as principais desvantagens desta metodologia consistem na execução de procedimentos contínuos de rinsagem para remoção do excesso de analito e anticorpos, e dificuldade em se automatizar todo o protocolo (amostragem e obtenção dos reagentes, por exemplo).

Diante do exposto, existem no estado da técnica algumas tentativas visando contornar as desvantagens previamente mencionadas. Uma relativamente comum consiste em um sistema de detecção eletroquímico dotado de um eletrodo inerte compreendendo

espécies protéicas imobilizadas. Um exemplo desta proposta é revelado na publicação internacional WO1995024641, no qual se descreve um imunossensor compreendendo um eletrodo dotado de uma camada de ouro coloidal que por sua vez apresenta moléculas receptoras (preferencialmente anticorpos) imobilizadas que reagem com o analito. A molécula receptora e o analito são conjugados com uma enzima de transferência de elétrons, gerando em conjunto com os eletrodos de trabalho e referência, uma corrente elétrica. No caso, a enzima provê uma corrente catalítica na presença do substrato. A adição do analito desloca o conjunto enzima/substrato e reduz a corrente medida de maneira proporcional à quantidade enzima/analito conjugado. Uma das principais desvantagens associadas a esta abordagem reside na aleatoriedade na orientação dos anticorpos sobre o colóide, o que limita a disponibilidade de sítios ligantes e consequentemente afeta o intervalo de confiabilidade do ensaio.

A patente US7332327 tenta contornar os problemas da falta de especificidade do analito ao anticorpo, implementando-se biomoléculas (peptídeos, anticorpos ou um grupo Fab') ancorados em um grupo funcionalizado sobre uma superfície sólida inerte. Após, liga-se este conjugado com biomoléculas repelentes que por sua vez irão bloquear estericamente a região inespecífica entre cada biomolécula. Entretanto é razoável supor que o aumento na especificidade se ampara na interação resultante dos grupos hidroxilas terminais das moléculas repelentes e dos grupos das biomoléculas ancoradas sobre a superfície; a força resultante de atração seria menor do que a força resultante de repulsão. As moléculas repelentes consistiriam majoritariamente em polímeros

hidrofílicos como poliacrilamida por exemplo. A principal limitação desta abordagem está na possibilidade da força de atração resultante ser maior do que a força de repulsão total como é o caso em interações de alta afinidade entre a proteína A e
5 imunoglobulinas. A aplicação desta técnica em eletrodos visando a detecção de microorganismos é claramente limitada neste sentido.

Um outro aspecto a ser considerado durante a especificação do projeto de dispositivos biossensores de amostras biológicas se relaciona a padronização das variáveis, tais como
10 temperatura, presença de interferentes e substâncias similares. Uma concepção para contornar estas desvantagens é revelada no pedido US 2013/0140178 no qual se descreve um dispositivo biossensor compreendendo uma carcaça removível e terminais de conexão em contato com um sistema de eletrodos termoacopláveis.
15 Obviamente neste dispositivo não cabe a análise de amostras de ar, sendo necessário a coleta de amostras por swabs, por exemplo, para aferição da contaminação ambiental.

Diante do exposto anteriormente, existe a necessidade de um dispositivo impedimétrico que viabilize a
20 avaliação da contaminação microbiana de maneira reprodutível e sensível.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

Neste sentido, visando contornar as desvantagens do estado da técnica, a presente invenção revela um dispositivo
25 imunossensor impedimétrico compreendendo um eletrodo dotado de uma SAM de cistamina, glutaraldeído, proteína A e anticorpo *anti-S. aureus*.

O dispositivo prevê a detecção da presença de

bactérias patogênicas presentes nos ambientes hospitalares, como centro cirúrgico e UTIs, através da sucção do ar ambiental. Utilizando-se anticorpos imobilizados na superfície de transdutores (área de trabalho do *screen-printed electrodes* - SPE)

5 haverá a interação antígeno-anticorpo que indicará a presença dos microrganismos nos ambientes. Esta interação se dá quando a proteína A da parede celular dos *S. aureus* é detectada por anticorpos específicos imobilizados na superfície dos eletrodos permitindo a avaliação da concentração bacteriana através de
10 medidas de impedância eletroquímica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 ilustra um diagrama esquemático dos componentes do dispositivo ora pleiteado.

A Figura 2 ilustra uma vista superior do eletrodo
15 impresso.

A Figura 3 ilustra um esquema da imobilização dos anticorpos na superfície do eletrodo impresso.

A Figura 4 ilustra a superfície do eletrodo impresso compreendendo os anticorpos monoclonais anti-*S. aureus*.

20 A Figura 5 ilustra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos SPE sobre eletrodo de trabalho não modificado (a), eletrodo modificado com CYS (b), CYS-GA (c), CYS-GA-Proteína A (d) e CYS-GA-Proteína A - Ac (e).

A Figura 6 ilustra diagramas no plano complexo
25 para eletrodo impresso sem modificação (a), modificado, sem SAM, com a proteína A na diluição de 1:20 e com tempos de incubação de 2 h (b) e 12 h (d) e na diluição de 1:10 com tempo de incubação de 2 h (c) em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) na presença do

par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 7 ilustra diagramas no plano complexo em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para eletrodo impresso modificado diretamente com a proteína A nas diluições de 1:10 (a) e 1:20 (b) e com tempo de incubação de 2h; imobilização do anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* na diluição de 1:50 e com o tempo de incubação de 2 h sobre a superfície de ouro contendo a proteína A adicionada diretamente nas diluições de 1:10 (c) e 1:20 (d).

10 A Figura 8 ilustra uma representação esquemática da ligação da proteína A com a superfície do eletrodo (E_T) e desta com a porção F_c do anticorpo.

A Figura 9 representa diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a), modificado com cistamina nas concentrações de 4×10^{-2} (b) e $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (c) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

20 A Figura 1 ilustra de maneira esquemática o dispositivo imunossensor (0) compreendendo um meio de sucção de ar (1) acoplado a uma bomba de vácuo (4). Em uma construção preferencial, o meio (1) consiste em um funil de sucção.

O meio de sucção de ar (1) se comunica com uma célula (2) contendo solução PBS, e a uma segunda célula (3) contendo uma solução de ferri/ferrocianeto. A amostra é conduzida por meio de um sistema de microcanaletas até o eletrodo (5), que por meio de reações de imunoafinidade gera sinais elétricos mensurados por um dispositivo potenciostato (6), este último

acoplado a uma unidade processadora (7). A dita unidade (7) realizará o tratamento dos dados e a leitura das medidas obtidas.

A Figura 2 representa esquematicamente a descrição dos eletrodos (5) impressos em suporte de cerâmica.

5 Estes são constituídos por um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho (8), pseudo-referência (9) e auxiliar (10), compreendendo a seguinte composição:

-Eletrodo de trabalho (8): Au-Pd (98,2%), $A_{geom} = 0,0070 \text{ cm}^2$;

10 -Eletrodo de referência (9): Ag-Pd (98,2%), $A_{geom} = 0,137 \text{ cm}^2$;

-Eletrodo auxiliar (10): Au-Pd (98,2%), $A_{geom} = 0,072 \text{ cm}^2$.

15 Estes sistemas de eletrodos apresentam uma camada isolante que reveste as trilhas condutoras próxima aos contatos elétricos (11), constituídos preferencialmente de prata.

Para fins de comparação, aplicaram-se dois procedimentos para a imobilização dos anticorpos (Ac) anti- *S. aureus* na superfície do eletrodo impresso:

20 a) SAM de cistamina ($\text{SH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) + glutaraldeído ($\text{OHC-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHO}$) + proteína A de *S. aureus* + Ac anti-*S. aureus*;

b) Proteína A de *S. aureus* + Ac anti-*S. aureus*.

25 Para as medidas eletroquímicas foram usadas uma célula eletroquímica convencional de 2 mL de eletrólito de suporte contendo as espécies redox $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. A célula eletroquímica foi adaptada no interior de uma Gaiola de Faraday com o intuito de proteger o sistema de perturbações elétricas ou

eletromagnéticas. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Na imobilização dos anticorpos anti-*S. aureus* sobre a superfície do transdutor modificado, os espaços livres
5 entre os anticorpos foram bloqueados com soroalbumina bovina para evitar reações inespecíficas. O imunossensor, por meio de reação de afinidade reconheceu o antígeno, sendo monitorada por impedância eletroquímica. As modificações do eletrodo de trabalho (E_T) dos SPE empregando SAM de cistamina e glutaraldeído por sua
10 vez seguiram as etapas abaixo:

- Lavagem dos eletrodos com etanol;
- Secagem à temperatura ambiente;
- Aplicação de 10 mL de solução aquosa de cistamina 2×10^{-2} ou 4×10^{-2} mol L^{-1} sobre a superfície do
15 eletrodo de trabalho;
- Incubação por 2 h à temperatura ambiente;
- Lavagem dos eletrodos com água destilada, por imersão e agitação branda, três vezes de cinco segundos;
- Adição de 10 mL de solução de glutaraldeído (GA)
20 2,5% em solução tampão salino (PBS) $0,1 \text{ mL } L^{-1}$ (pH 7,5) por eletrodo;
- Incubação por 1 h à temperatura ambiente;
- Lavagem dos eletrodos com água destilada, por imersão e agitação branda, três vezes de cinco segundos.

25 As etapas a seguir ilustram os ensaios para a obtenção do eletrodo modificado, comparando-os a uma técnica tradicional de imobilização direta da proteína A e a modificação proposta do eletrodo empregando monocamadas autoorganizadas.

A. Imobilização da proteína A para *S. aureus* via glutaraldeído na cistamina e diretamente na superfície de trabalho do SPE:

5 A proteína A foi imobilizada sobre a SAM de cistamina via glutaraldeído e também adicionada diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho - SPE. Em ambos os procedimentos empregou-se uma alíquota de 10 uL da solução tampão salino 0,1 ml L⁻¹ (pH 7,5) contendo as diferentes diluições da proteína A (1 mg mL⁻¹). A adição direta da proteína A sobre a
10 superfície de ouro foram investigadas nas diluições de 1:10 e 1:20 e com tempo de incubação de 2 h e 12 h para a diluição de 1:20 da proteína A. A diluição de 1:20 foi usada para a imobilização da proteína A sobre as monocamadas (CYS-GA) e tempo de incubação de 12 h. Em ambos os procedimentos experimentais a incubação ocorreu
15 à temperatura de 4 a 8°C. Decorrido o tempo de incubação procedeu-se à lavagem na mesma solução-tampão de diluição da proteína A, por imersão e agitação branda, três vezes com duração de 5 segundos em cada lavagem. As avaliações das imobilizações da proteína A foram empregando impedância eletroquímica.

20 B. Imobilização dos anticorpos monoclonais anti-*Staphylococcus aureus* sobre a superfície do transdutor modificada com SAMs e proteína A

Com base nos resultados de impedância, procedeu-se a imobilização dos anticorpos monoclonais somente sobre as SAMs
25 contendo a proteína A. Foi estudada a diluição de 1:20 para o anticorpo monoclonal em solução tampão salino 0,1 ml L⁻¹ (pH 7,5) a partir de uma solução estoque de 0,0184 mg mL⁻¹. Uma alíquota de 10 uL foi adicionada sobre a superfície de trabalho modificada (CYS +

GA + proteína A) e incubada à temperatura ambiente durante 3 h. Após o tempo de incubação, os eletrodos foram lavados na mesma solução tampão de diluição dos anticorpos, por imersão e agitação branda, três vezes com duração de 5 segundos em cada lavagem.

5 Medidas de impedância foram realizadas para avaliar a imobilização dos anticorpos monoclonais.

C. Bloqueio dos espaços livres entre os anticorpos com soroalbumina.

10 Após as modificações e imobilização dos anticorpos orientados pela presença da proteína A na superfície do eletrodo impresso, realizou-se o bloqueio da superfície com a aplicação de 10 uL de solução tampão PBS-T (solução tampão PBS 0,1 ml L⁻¹ (pH 7,5) contendo 0,02% de Tween 20) acrescida de 0,5% de soroalbumina bovina (solução de bloqueio). Uma solução de bloqueio
15 sobre a superfície do transdutor com incubação de 1 h foi adotada para o desenvolvimento do imunossensor. O bloqueio da superfície do sensor foi avaliado através de medidas EIS.

D. Interação antígeno-anticorpo na superfície de trabalho dos eletrodos impressos

20 No desenvolvimento do imunossensor, empregaram-se cepas de *S. aureus* ATCC-6535, como antígeno específico para o anticorpo monoclonal. Uma amostra de *S. aureus* coletada em meio de cultura foi primeiramente diluída em água peptonada tamponada e em seguida na proporção de 1:1 em solução de bloqueio (solução tampão
25 PBS-T). Sobre a superfície do SPE modificado e contendo os anticorpos anti-*S. aureus* imobilizados foi aplicado 10 uL da solução antigênica. O tempo de incubação para a reação de afinidade foi de 30 min à temperatura ambiente.

E. Condições experimentais para as medidas de impedância

Para os eletrodos não modificados ou modificados, as análises de impedância foram realizadas no intervalo de
5 frequência de 50 kHz a 10 mHz. Os eletrodos foram transferidos imediatamente para a célula eletroquímica. Os tempos de estabilização do potencial e corrente foram de 15 min, respectivamente, empregando o potencial de circuito aberto (E_{oc}). Foi aplicada uma amplitude de 10 mV *rms* (*root mean square*)
10 previamente determinada, 10 pontos/década e um capacitor de 0,1 μF conectado entre o eletrodo de referência e um fio de platina. As medidas foram realizadas em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) aerada e contendo o par redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 1 x 10⁻³ mol L⁻¹. Todas as medidas de impedância foram realizadas em triplicata, temperatura
15 ambiente e empregando uma gaiola de Faraday.

F. Monitoramento voltamétrico das modificações e imobilizações da superfície de trabalho do SPE

Para o monitoramento voltamétrico do SPE sem modificações (*bare*) e nas modificações (CYS e CYS-GA) e
20 imobilizações (SAMs + proteína A e SAMs + proteína A + Ac) foi utilizado o intervalo de potencial de -0,25 a +0,40 V em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

G. Análise da superfície de trabalho (ET - SPE)
25 por microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica da superfície de trabalho sem qualquer modificação foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observar a rugosidade e a

uniformidade da camada de pasta metálica sobre a matriz de cerâmica quanto à presença de espaços ou cavidades existentes após o processo de fabricação do eletrodo impresso. As medidas de microscopia foram realizadas com um feixe de elétrons de 20 kV de
5 potência e ampliação de 700 x. Para todas as etapas de modificações, imobilização do anticorpo monoclonal e imunoensaio sobre a superfície de trabalho do transdutor, os tempos de incubação, seja à temperatura ambiente (aprox. 25°C) ou sob refrigeração (4-8°C), ocorreram em câmara simulando atmosfera
10 umidificada com o objetivo de evitar a evaporação do pequeno volume adicionado sobre a superfície de trabalho do transdutor. Um recipiente plástico contendo água foi colocado no centro da placa de Petri e ao redor os eletrodos impressos, simulando uma câmara úmida.

15 H. Caracterização da superfície do eletrodo de trabalho - SPE empregando técnica não-eletroquímica: microscopia eletrônica de varredura

Em uma imagem topográfica da superfície (Au-Pd) do eletrodo de trabalho impresso em que foram realizadas todas as
20 modificações e imobilizações empregando microscopia eletrônica de varredura indica uma superfície irregular e com alta rugosidade com o emprego da pasta metálica (Au/Pd) no processo serigráfico. Estas irregularidades e defeitos da superfície podem causar uma distribuição de corrente heterogênea, o que pode gerar uma maior
25 complexidade na resposta eletroquímica.

I. Caracterização das SAMs, imobilizações da proteína A de *S. aureus* e anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* usando técnicas eletroquímicas

I.1 Voltametria cíclica

A Figura 5 ilustra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos SPE em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN)₆^{3-/4-} 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, sobre eletrodo de trabalho não modificado (a), e o eletrodo modificado com CYS (b), CYS-GA (c), CYS-GA-Proteína A (d) e CYS-GA-Proteína A - Ac (e).

Para o eletrodo de trabalho sem modificação (Figura 7a), foi obtido um típico voltamograma cíclico empregando o par redox ferri/ferro com um par de picos a +0,04 V (pico catódico) e +0,18 V (pico anódico), caracterizando um processo de transferência de elétrons quase-reversível. O processo de transferência de carga com ferro/ferricianeto nesta etapa ocorreu com uma área efetiva do eletrodo de 0,0056 cm². Essa área pode ser obtida a partir da equação de Randles-Sevcik desde que conhecidos o número de elétrons, coeficiente de difusão e concentração da espécie eletroativa, velocidade de varredura do potencial e corrente de pico a uma dada temperatura. A modificação do eletrodo impresso com CYS (Figura 7b) somente deslocou ambos os picos, catódico (+0,03 V) e anódico (+0,15 V), para valores menos positivos e com pequeno aumento na intensidade de corrente. Esta pequena distorção quando comparado com o eletrodo sem modificação sugere que a reação de transferência de elétrons ocorre sem um significativo efeito de barreira e que a cistamina não bloqueia totalmente a superfície do eletrodo. Isto significa que uma superfície com baixa cobertura foi provavelmente obtida e com fácil acesso das espécies eletroativas por difusão em áreas não modificadas da superfície eletródica. Outro fator que pode influenciar a cobertura da superfície com CYS é a presença de um

excesso de cargas positivas sobre o amino grupo, devido ao pH da água (pH 6,5) durante a formação da SAM comparado com o pKa da CYS (8,2). O excesso de cargas positivas pode contribuir para o aumento da repulsão lateral, na qual pode diminuir a cobertura da superfície. Outros resultados eletroquímicos sugerem a possibilidade de influência de cargas positivas sobre a cistamina e a difusão das espécies redox para as áreas não modificadas. Quando o glutaraldeído foi adicionado sobre a SAM de cistamina (Figura 7c), observou-se um pequeno decréscimo na intensidade de corrente dos picos do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e um aumento na diferença de potencial entre os picos catódico (0,0 V) e anódico (+0,20 V). Este resultado sugere algum bloqueio na reação de transferência de elétrons e consequentemente uma perda na reversibilidade. A aplicação da equação de Randles-Sevcik forneceu valores de área iguais a 0,0065 e 0,0039 para os eletrodos impressos modificados com CYS e CYS-GA, respectivamente. A Figura 7d mostra a imobilização da proteína A de *S. aureus* sobre as SAMs de CYS-GA. Os picos anódico (aproximadamente +0,24 V) e catódico (aprox. 0,012 V) não são bem definidos e ocorre um aumento de separação entre os mesmos. Esta é a indicação de um maior impedimento na transferência de cargas envolvendo as espécies redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Quando a proteína A foi adicionada sobre as monocamadas (CYS-GA), uma densa camada foi provavelmente formada através da ligação covalente entre o grupo aldeído terminal da SAM de glutaraldeído e o grupo NH_2 da proteína, inibindo o processo Faradáico. Com a imobilização do anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* (Figura 7e), o voltamograma tende a uma forma sigmoidal, o que mostra um maior bloqueio da superfície do eletrodo de

trabalho. Observa-se uma maior separação dos picos anódico (aprox. +0,28 V) e catódico (aprox. 0,045 V), o que é indicativo de uma baixa reação de transferência de carga. Os resultados obtidos mostraram que a voltametria cíclica tradicional é adequada para o estudo envolvendo as diferentes etapas de construção do imunossensor.

I.2. Estudos de impedância eletroquímica

Antes da aquisição dos espectros de impedância, os potenciais de circuito aberto para o eletrodo de trabalho sem modificação (*bare*) e nas diferentes etapas de modificações na presença do par redox foram observados e o potencial de estabilização foi ao redor de +0,120 V. Inicialmente foram realizadas medidas de impedância do eletrodo sem modificação, para posterior análise dos resultados de impedância com os eletrodos impressos modificados. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

A Figura 6 ilustra diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a), modificado, sem SAM, com a proteína A na diluição de 1:20 e com tempos de incubação de 2 h (b) e 12 h (d) e na diluição de 1:10 com tempo de incubação de 2 h (c) em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 1×10^{-3} mol L⁻¹. Observa-se na Figura 6a a presença de um semicírculo seguido de um prolongamento linear com um ângulo ao redor de 40°, onde o raio do semicírculo representa o processo cinético de transferência de elétrons e a reta caracterizando o processo difusional das espécies eletroativas. O eletrodo modificado com proteína A diretamente sobre a superfície (ET) na diluição 1:20 e com tempo de incubação por 2 h (Figura

6b), houve um aumento da impedância real e imaginária do arco capacitivo. Com o mesmo procedimento de modificação da superfície eletródica com a proteína A na diluição 1:10 direto e com tempo de incubação de 2 h (Figura 6c), verifica-se um aumento da impedância, o que mostra um maior bloqueio da superfície à transferência de elétrons. Com o intuito de garantir uma melhor imobilização da proteína A na superfície metálica foi investigado o comportamento impedimétrico com a diluição 1:20 e tempo de incubação 12 h (*overnight*) (Figura 6d). Os resultados mostraram um aumento da impedância real e imaginária do arco capacitivo em comparação com o tempo de incubação de 2 h (Figura 6b). Neste caso o aumento de resistência na transferência de elétrons na presença das espécies redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ mostra uma maior cobertura da superfície do eletrodo, o que não garante a permanência da camada protéica nas etapas subsequentes de construção do imunossensor. A proteína A é um componente da parede celular do *S. aureus* que se liga com a parte Fc das moléculas de imunoglobulinas G (IgG) de muitas espécies de mamíferos. A vantagem da utilização da proteína A para posterior imobilização do anticorpo é uma orientação adequada que ela proporciona ao Ac que vai se ligar a sua superfície. Quando imunoglobulinas como IgG são imobilizadas em superfícies sólidas sua atividade geralmente é diminuída sendo que a principal razão é uma imobilização com orientação aleatória. Portanto, a imobilização de Ac mediada pela proteína A leva a imunorreações altamente eficientes o que aumenta o desempenho do sistema utilizado. As interações eletrostáticas podem ser consideradas um fator importante para adsorção das proteínas juntamente com o pH da solução e forças iônicas. A proteína A

possui entre suas características um ponto isoelétrico (pI) que é de 5,1 ponto este onde há um equilíbrio entre suas cargas elétricas.

Interações eletrostáticas e outros tipos de
5 ligações fracas fazem com que as proteínas tendam a se agregar e precipitar quando estão no seu pI. Assim sendo, a adsorção de proteínas por interações eletrostáticas é mínima quando o pH da solução utilizada é próximo ao seu ponto isoelétrico porque o aumento na força iônica da solução bloqueia as cargas da proteína
10 e da superfície reduzindo a adsorção. Os resultados de impedância apresentados na Figura 6 mostraram a adsorção da proteína A na superfície de ouro nas diferentes diluições em solução tampão salino fosfato 0,1 ml L⁻¹ (pH 7,5). A presença de aminoácidos que apresentam em sua estrutura o elemento químico enxofre é de
15 fundamental importância para garantir a interação da proteína A com o substrato ouro. A proteína A de *S. aureus* apresenta pouca quantidade de aminoácidos metionina na estrutura molecular (UHLÉN et al., 1984), o que pode significar uma fraca adsorção e um provável processo de lixiviação.

20 A Figura 7 mostra os resultados de impedância para as diferentes diluições 1:10 (Figura 7 a) e 1:20 (Figura 7 b) da proteína A e com tempo de incubação de 2 h. A indicação do processo de lixiviação da proteína A da superfície de ouro pode ser observado com os resultados de impedância em que os anticorpos
25 monoclonais anti-*S. aureus* na diluição de 1:50 e com tempo de incubação de 2 h foram imobilizados sobre a camada protéica (Figura 7c e 9d). A diminuição da impedância real e imaginária do arco capacitivo em ambos os casos indica que durante a etapa de

lavagem da superfície do eletrodo de trabalho, após o tempo de incubação com os anticorpos, foi determinante para o desprendimento da proteína A e/ou proteína A-Ac. A imobilização de anticorpos monoclonais anti- *S. aureus* sobre a proteína A ocorre devido a uma interação entre a porção F_c do anticorpo com a porção NH_2 - terminal da proteína. O domínio da proteína A que se liga com a IgG consiste de três alfa-hélices antiparalelas, sendo que a terceira se rompe quando a proteína é complexada com a região F_c da IgG.

A Figura 8 está representando esquematicamente as modificações e imobilizações realizadas no eletrodo e caracterizadas eletroquimicamente na Figura 23. Com base nos resultados de impedância mostrados nas Figuras 7d e 11a em que a proteína A foi adicionada diretamente na superfície de ouro na diluição de 1:20 e incubação de 12 h, diferentes tempos de incubação e diluição de 1:20 para os anticorpos anti-*S.aureus* foram estudados. Para os tempos de incubação dos anticorpos de 3 e 6 h (Figuras 11c e 11b, respectivamente) não se observaram diferenças significativas entre os resultados de impedância. Diferença expressiva ocorreu entre os arcos capacitivos correspondentes aos anticorpos imobilizados nos diferentes tempos de incubação e o que contém somente a proteína A imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho. O decréscimo nos valores de impedância é indicativo do processo de lixiviação da proteína A e conclui-se que a imobilização direta da proteína A não é o melhor procedimento analítico para o desenvolvimento do imunossensor.

Na concretização proposta utilizou-se cistamina para modificação do eletrodo de trabalho nas concentrações de 4 x

10^{-2} e 2×10^{-2} mol L⁻¹, para avaliar o melhor recobrimento da superfície. Conforme observado na Figura 9 e na ampliação da região referente às altas frequências, os resultados de impedância para as concentrações de cistamina 4×10^{-2} (Figura 9 b) e 2×10^{-2} (Figura 9c) mostraram-se similares. Verifica-se um pequeno arco capacitivo em altas a médias frequências e um processo difusional acentuado para ambas as superfícies recobertas com SAM CYS. A modificação com CYS apresentou um padrão difusional de transferência de elétrons bem significativo o que pode ser justificado pela formação de uma camada com irregularidades ou defeitos permitindo assim a transferência de elétrons.

As ligações da cistamina com a superfície do ouro é do tipo tiol onde o átomo de enxofre forma ligações Au-S, ficando seus grupos amino livres ativos para ligações com outros grupos da monocamada. Estas ligações podem levar a formação de cadeias carbônicas curtas e espaçadas resultando uma monocamada com pouco grau de organização o que justifica a diminuição da impedância observada na Figura 9b e 12c. Isto sugere que a reação de transferência de elétrons ocorre como se não houvesse uma barreira de espessura significativa e que a CYS não está bloqueando totalmente a superfície do eletrodo favorecendo um processo de difusão das espécies eletroativas permitindo a passagem das mesmas para superfície do eletrodo através das áreas não recobertas. A presença de um excesso de cargas positivas sobre o grupo amino também contribui para a diminuição da impedância real e imaginária do arco capacitivo. A cistamina é um dissulfeto, portanto, possui dois átomos de enxofre ligados entre si, tendo nas outras extremidades o grupo amina (NH₂). Quando há

imobilização da cistamina, ocorre o rompimento das ligações S-S e cada enxofre será adsorvido na superfície do eletrodo, isto se dá devido a alta afinidade do enxofre pelo Au. O átomo de enxofre da molécula propicia a ligação de uma cadeia de hidrocarbonetos de comprimentos variados à superfície do metal, o que pode ocorrer por ligações covalentes, enquanto que a estabilização da estrutura das moléculas vizinhas ocorre por interações de van der Waals. Quando o GA é adicionado sobre a monocamada de CYS o grupo carbonila do GA reage com o grupo amina da CYS ficando o outro grupo carbonila (GA) livre na superfície. O GA em solução tampão tem seu pH reduzido sugerindo que os grupos aldeídos do GA adquirem cargas negativas e reagem com a CYS através da formação da base de Schiff.

A Figura 3 ilustra as etapas de construção do imunossensor (este último apresentado na Figura 4) na presença do analito (*S. aureus*). Na modificação do eletrodo com CYS (etapa i), incubação por 2 h, e CYS-GA (etapa ii) verificou-se um comportamento representado inicialmente por um semicírculo típico da resistência de transferência de elétrons seguido de um processo difusional. A imobilização da proteína A (etapa iii) sobre o eletrodo modificado com CYS-GA mostrou um aumento de impedância bem caracterizado em comparação aos recobrimentos com as SAMs. Na interação GA - proteína A, os grupos amino da proteína se ligam com o grupo aldeído do GA através da formação de base de Schiff. Entre os fatores que influenciam a interação GA - proteína A, o pH é considerado um dos mais importantes. O aumento do pH geralmente aumenta a capacidade de ligação do GA, ou seja um aumento na concentração de íons-H acelera a ligação do GA, sendo que o pH

considerado ideal para ligações com proteínas é 7,5 a 8,0, um pouco superior ao fisiológico que é entre 7,2 a 7,4.

O eletrodo modificado com CYS-GA-proteína A, no qual se imobilizou os anticorpos anti-*S. aureus* apresentou um
5 aumento da impedância real e imaginária do arco capacitivo, o que representa um maior grau de resistência a transferência de elétrons. O resultado de impedância foi significativo com o bloqueio com soroalbumina bovina. A principal finalidade deste bloqueio é preencher as irregularidades da superfície após as
10 modificações evitando assim as reações inespecíficas no imunoensaio. No estudo preliminar empregando *S. aureus* como antígeno específico para o anticorpo monoclonal, observou-se um significativo aumento do arco capacitivo, o que mostra a ocorrência da interação antígeno-anticorpo. Novos imunoensaios
15 serão de fundamental importância para assegurar os resultados do imunossensor impedimétrico. Na etapa de aplicação do imunossensor em amostras contendo *S. aureus*, a reação de afinidade antígeno (analito)-anticorpo envolve as regiões determinantes de complementaridade ou CDRs (*complementarity determining regions*).
20 Na porção N-terminal dos anticorpos localizam-se os fragmentos Fab onde se encontram os dois sítios de ligação (CDRs) ao antígeno as quais se ligam por complementaridade ao epítipo do antígeno. Esta região hipervariável forma cinco ou seis alças que compreendem um total de cerca de cinquenta resíduos de aminoácidos, os quais
25 participam na formação do paratopo da molécula de Ig. Assim, o paratopo é constituído de peptídeos contendo aminoácidos que são complementares àqueles que são constituintes do epítipo do antígeno. A maior força que atua na atração primária entre

epítomos e paratopos são as interações hidrofóbicas e eletrostáticas. As reações seguem um padrão onde a molécula se amolda a outra por mecanismo de indução. Há uma complementariedade entre os sítios de ligação específicos e um encaixe entre as

5 moléculas.

Aqueles versados na técnica irão perceber que 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.

REIVINDICAÇÕES

1. "IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO E DISPOSITIVO COMPREENDENDO O MESMO", o dito imunossensor caracterizado por compreender um eletrodo de trabalho (8) formado a partir de uma superfície de monocamada autoorganizada de cistamina modificada por glutaraldeído e por ao menos uma proteína de membrana.

2. "IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da proteína de membrana ser a proteína A de *S. aureus*.

3. "DISPOSITIVO" (0) compreendendo o imunossensor definido na reivindicação 1, caracterizado por compreender:

-um meio de sucção de ar (1) em comunicação com uma bomba de vácuo (4);

-uma célula (2) contendo solução PBS, e uma segunda célula (3) contendo uma solução de ferri/ferrocianeto;

-sistema de eletrodos (5) dotado de um eletrodo de trabalho (8) contendo uma superfície de monocamada autoorganizada de cistamina ($\text{SH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), modificada por glutaraldeído ($\text{OHC-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHO}$) e uma proteína de membrana;

-um dispositivo potenciostato (6) acoplado a uma unidade processadora (7).

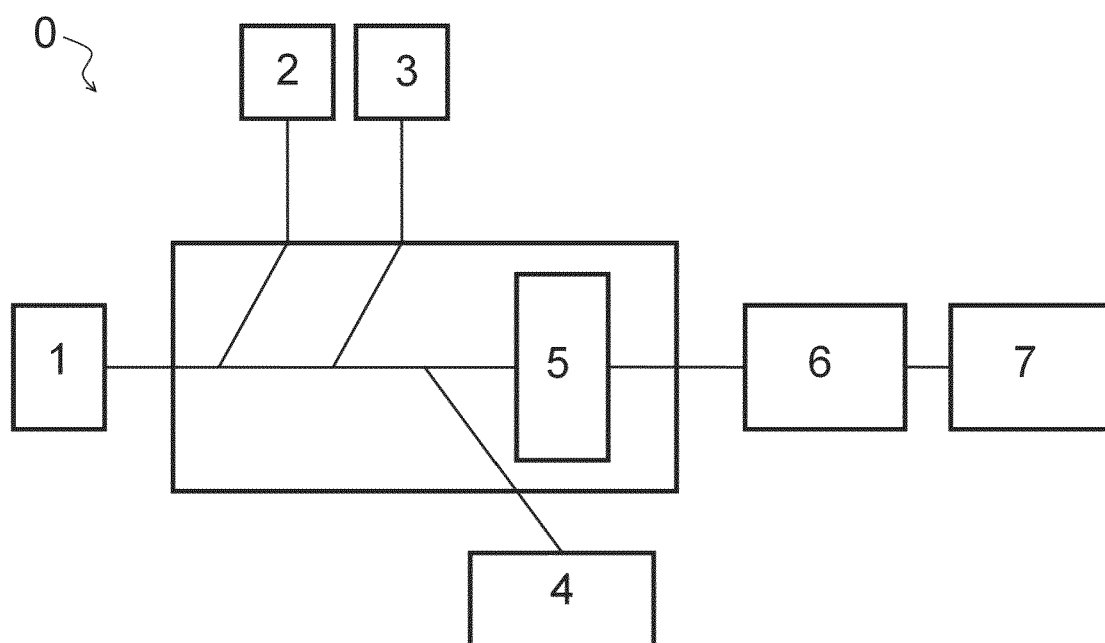


FIG. 1

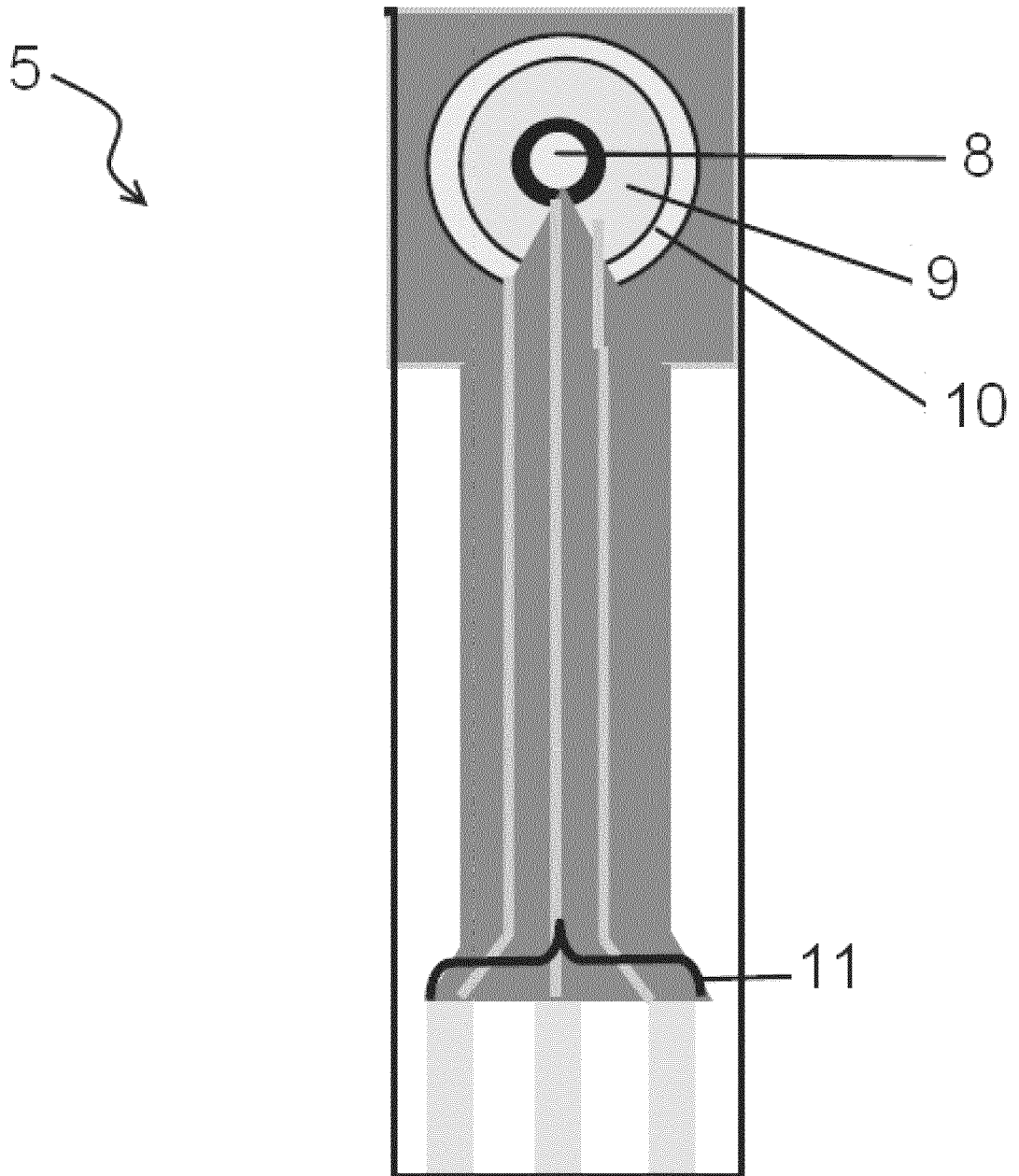


FIG. 2

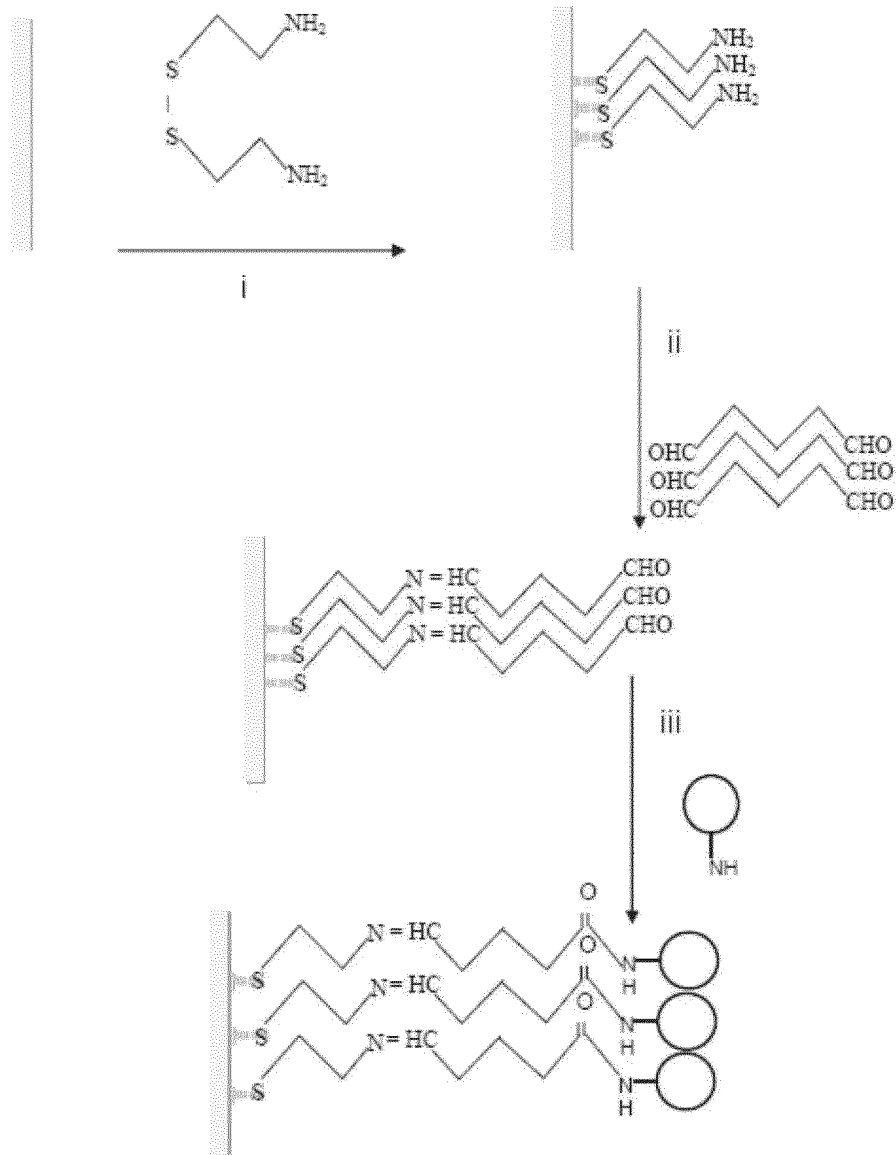


FIG. 3

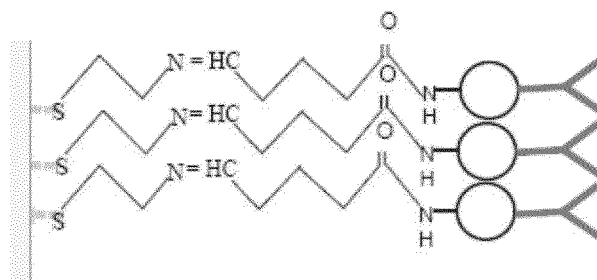


FIG. 4

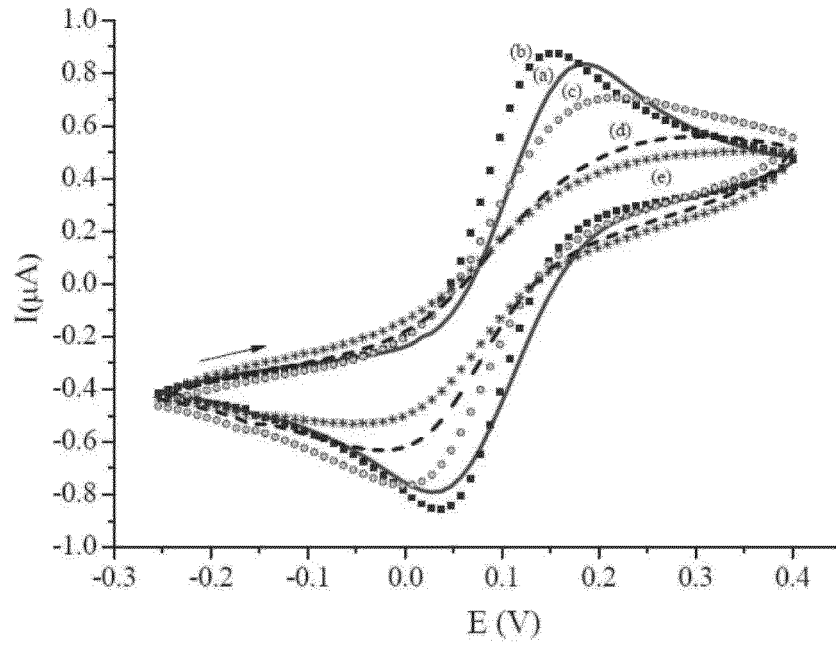


FIG. 5

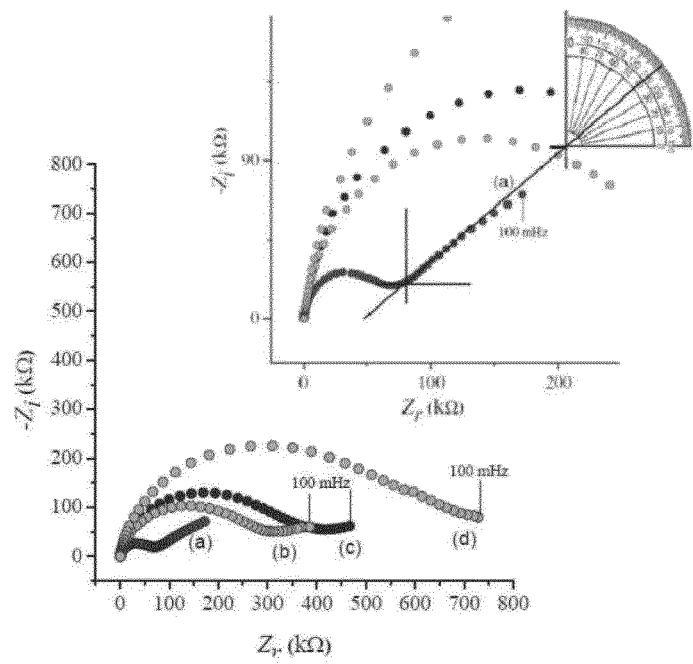


FIG. 6

5/6

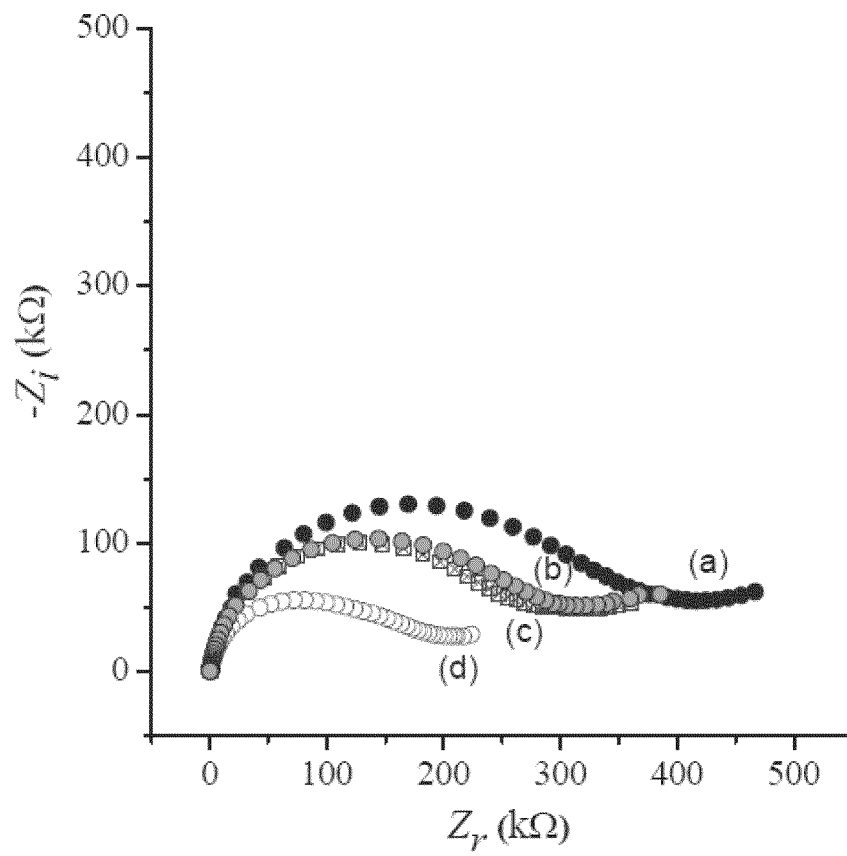


FIG. 7

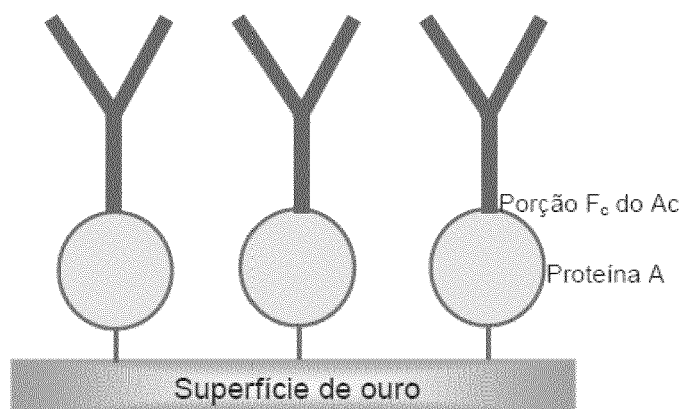
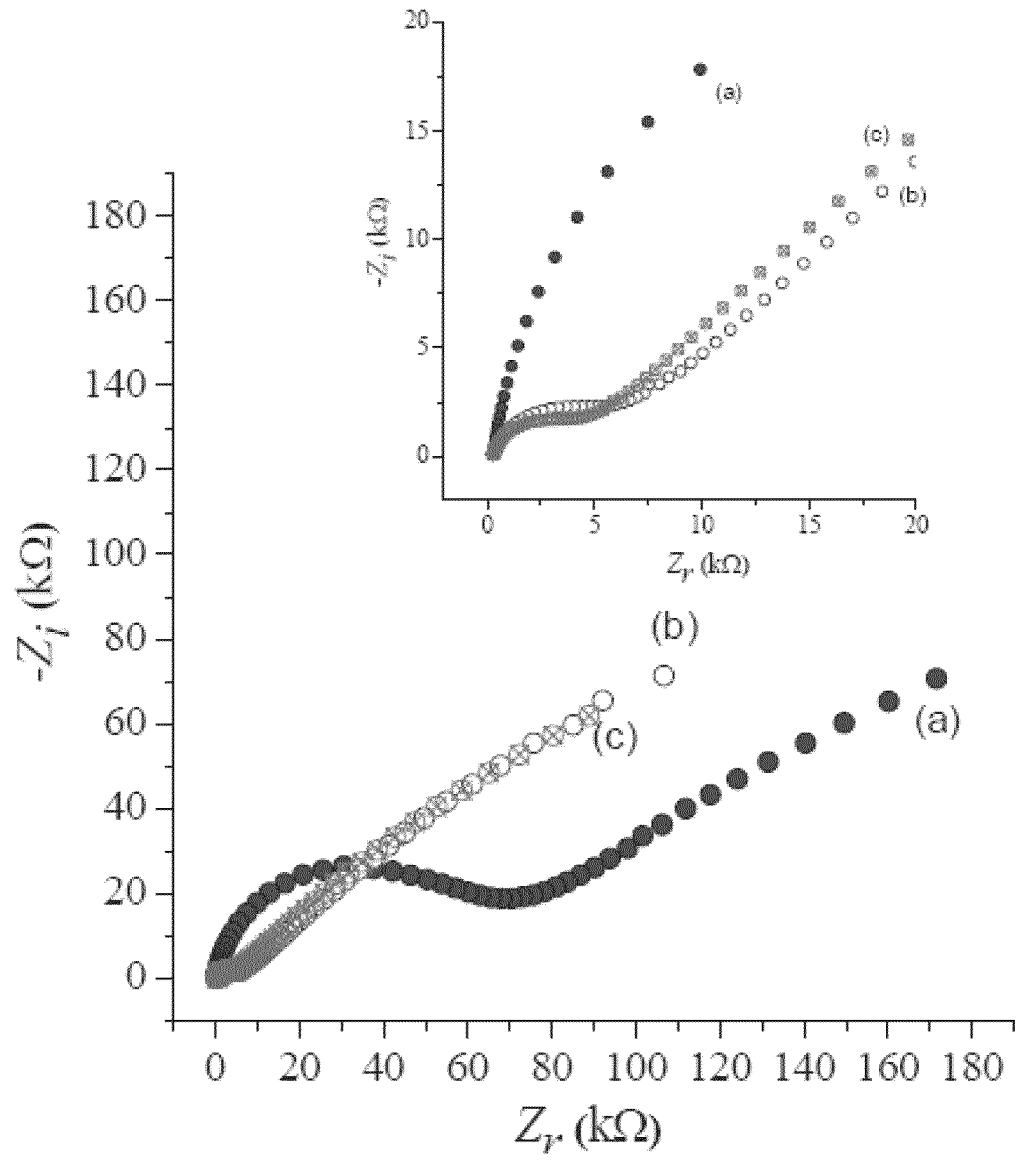


FIG. 8

**FIG. 9**

RESUMO**"IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO E DISPOSITIVO
COMPREENDENDO O MESMO"**

O presente pedido de patente revela um dispositivo de detecção impedimétrico voltado a áreas críticas de contaminação microbiana, compreendendo um eletrodo construído a partir de monocamadas autoorganizadas e proteína A imobilizadas na superfície de seu transdutor. A avaliação da contaminação microbiana é efetuada por meio da sucção da atmosfera interna do ambiente, interação Ag-Ac e detecção por impedância eletroquímica.