



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102013006812-8

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

(21) Número do Depósito: BR 102013006812-8

(22) Data do Depósito: 25/03/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 13/01/2015

(51) Classificação Internacional: G01N 27/02; G01N 27/414.

(54) Título: PLATAFORMA NANOESTRUTURADA PARA DETECÇÃO DA FEBRE AFTOSA E MONITORAMENTO DO PROCESSO DE VACINAÇÃO, MÉTODO DE DETECÇÃO DA FEBRE AFTOSA E MONITORAMENTO DO PROCESSO DE VACINAÇÃO E KIT

(73) Titular: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP. CGC/CPF: 63025530000104. Endereço: AV BRASIL, 1971, JD PAULISTA, SÃO PAULO, SP, BRASIL(BR), 01430-010; SAPRA ASSESSORIA S/C LTDA. CGC/CPF: 02770875000106. Endereço: RUA CID DA SILVA CÉSAR, 600 - SL 1, SÃO CARLOS, SP, BRASIL(BR), 13562-400

(72) Inventor: VALTENCIR ZUCOLOTTO; BONALD CAVALCANTI DE FIGUEIREDO; YVONE MARIA MASCARENHAS; PAULO ROBERTO MASCARENHAS; GUSTAVO HENRIQUE FRIGIERI VILELA; NÍBIO JOSÉ MANGERONA; NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA; FABRÍCIO APARECIDO DOS SANTOS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 25/03/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 01/12/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**PLATAFORMA NANOESTRUTURADA PARA DETECÇÃO DA FEBRE
AFTOSA E MONITORAMENTO DO PROCESSO DE VACINAÇÃO,
MÉTODO DE DETECÇÃO DA FEBRE AFTOSA E MONITORAMENTO
DO PROCESSO DE VACINAÇÃO E KIT**

Campo da invenção:

[01] Esta invenção se insere no campo da nanobiotecnologia e nanomedicina, mais especificamente, na aplicação dos conhecimentos destas tecnologias na detecção de doenças e zoonoses, e descreve plataformas nanoestruturadas que detectam e reconhecem anticorpos anti-aftosa por meio de medidas de condutividade elétrica.

[02] Adicionalmente, a presente invenção ensina um método de detecção da febre aftosa e o monitoramento do processo de vacinação utilizando as plataformas, bem como um kit apropriado para tal.

Fundamentos da invenção:

[03] Devido, principalmente, ao grande rebanho bovino e aliado à importância econômica da atividade pecuarista no Brasil, a febre aftosa se tornou uma zoonose de enorme importância em saúde pública, afetando diversos produtores e famílias rurais.

[04] Um dos maiores problemas relacionados à febre aftosa, além da perda de produtividade, deve-se ao seu impacto negativo na balança comercial e nas exportações, devido às rígidas barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional. Além disso, o elevado custo necessário para a sua prevenção, controle e erradicação oneram sobremaneira os cofres

públicos e privados.

[05] A febre aftosa é uma enfermidade viral, contagiosa e de evolução aguda, de um vírus pertencente à família Picornaviridae e o gênero Aphthovirus, de incidência em bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos e suínos.

[06] Nos animais, provoca febre e leva à formação de vesículas na boca e nos espaços interdigitais. Os casos de ocorrência em humanos são raros.

[07] Devido, principalmente, ao fato de seu agente causador apresentar mutações genéticas, as barreiras sanitárias impostas visam evitar que tipos e cepas diferentes do vírus sejam trazidos em carne e/ou animais, mesmo que a doença já esteja presente em um determinado país.

[08] Apesar de ser uma enfermidade amplamente difundida e estudada, o diagnóstico da doença pode ser extremamente difícil, devido à pequena intensidade das lesões presentes nos animais.

[09] Tal fato implica que o diagnóstico da febre aftosa seja principalmente baseado em sintomas clínicos e no diagnóstico laboratorial, o qual, em particular, é baseado no isolamento e identificação do vírus a partir de tecidos coletados em animais suspeitos de contaminação.

[10] Apesar de existirem métodos imunológicos convencionais para a detecção da febre aftosa, estes são, na maioria dos casos, de custo moderado e requerem equipamentos dedicados ou mão de

obra especializada. Além disso, os métodos imunológicos atuais podem não ser eficientes tratando-se de animais vacinados, pela ocorrência de "falso-positivos", e metodologias para rastreamento da vacinação efetiva de rebanhos em larga escala ainda são escassas.

[11] De acordo com a classificação recente, imunoensaios podem ser divididos em duas categorias principais:

- Testes sorológicos para detecção de anticorpos ou antígenos no soro, e
- Testes cutâneos para a detecção de linfócitos.

[12] Em relação ao sistema de detecção, várias técnicas têm sido empregadas, por exemplo, precipitação, floculação, imunofluorescência, radioimunoensaios e, ainda, testes imunoenzimáticos.

[13] Existem, atualmente, vários imunoensaios utilizados na detecção de anticorpos específicos e, conseqüentemente, da doença. As técnicas utilizadas atualmente para imunoensaios são soro-aglutinação rápida em placa, imunodifusão em gel de ágar, inibição da hemaglutinação e ELISA.

[14] Dentre os métodos acima, o ELISA é o mais importante, e tem sido mais empregado para detecção de antígenos e anticorpos para diagnóstico em humanos ou em animais.

[15] Basicamente, o método consiste na imobilização de antígenos sobre uma fase sólida, geralmente uma micro-placa de poliestireno, os quais reagem com anticorpos, e direta ou indiretamente

produzem uma reação cujo produto, na maioria dos casos, um indicador de cor, é medido por um espectrofotômetro.

[16] A interpretação dos resultados é baseada na leitura da absorbância do meio reacional, em comprimento de onda adequado. Esta absorbância será proporcional à quantidade do antígeno ou do anticorpo específico presente na amostra testada.

[17] Embora seja o ensaio mais comumente utilizado para testes de detecção e diagnóstico da febre aftosa, existe a necessidade de desenvolvimento de novas técnicas ou aprimoramento da ELISA, com o objetivo de baratear custos e possibilitar o rastreamento da doença ou da ocorrência de vacinação em todo território nacional.

[18] Além de métodos tradicionais, outros não convencionais têm sido amplamente divulgados, nos quais o monitoramento de anticorpos é feito com a utilização de materiais nanoestruturados, incluindo as nanopartículas marcadoras fluorescentes.

[19] Esses métodos, apesar de ainda não totalmente estabelecidos e não disponíveis comercialmente, possuem grande potencial para aplicação biotecnológica, devido a sua elevada eficiência, seletividade e sensibilidade. Em vários casos, os resultados são mais confiáveis, reduzindo-se os riscos de "falso-positivos".

[20] Recentemente, os "nanomateriais" têm sido utilizados em conjunto com moléculas biológicas no desenvolvimento de novos dispositivos para

aplicação em áreas que envolvam nanociência ou biotecnologia. Estes dispositivos incluem desde sistemas de liberação controlada de fármacos e marcadores biológicos, até sistemas para diagnóstico.

[21] Para o eficiente desenvolvimento destes dispositivos, no entanto, é imprescindível o entendimento dos mecanismos de interação que ocorre entre as biomoléculas imobilizadas e os nanomateriais, bem como o controle dos métodos de manipulação utilizados para imobilização.

[22] Outro ponto importante é que, através do entendimento das interações entre nanomateriais e sistemas biológicos (como as proteínas e os anticorpos), é possível otimizar o processo de complexação, aumentando a estabilidade do nanocompósito nanopartícula / biomolécula.

[23] As nanopartículas metálicas, em particular, apresentam propriedades químicas e físicas diferenciadas, em muitos casos devido ao aumento de sua área superficial.

[24] Dentre os metais utilizados, destacam-se platina, ouro e prata. Uma atenção considerável tem sido dirigida às nanopartículas de ouro (AuNPs) ou de óxido de ferro (magnéticas), por possuírem alta estabilidade química e facilidade de complexação com biomoléculas através de pontes de sulfeto.

[25] Assim, a presente invenção refere-se a plataformas nanoestruturadas que detectam e reconhecem anticorpos anti-aftosa por meio de medidas de condutividade elétrica.

[26] A condutividade elétrica pode ser mensurada por meio de dois sistemas distintos:

- Plataformas interdigitadas associadas a medidas de espectroscopia de impedância AC e eletrodos interdigitados; ou

- Plataformas baseadas nos transistores de efeito de campo (FETs).

[27] Adicionalmente, a presente invenção ensina um método de detecção da febre aftosa e monitoramento do processo de vacinação utilizando as referidas plataformas e um kit para tal.

[28] Assim, é possível monitorar não apenas a presença da enfermidade em rebanhos, como também se o processo de vacinação do rebanho ocorreu de maneira eficiente, podendo atuar como certificadores de vacinação.

[29] Estado da técnica:

[30] O documento de anterioridade WO 02/054055 A1 descreve biossensores para uso na detecção de um analito em uma amostra líquida, em que o biossensor apresenta circuitos múltiplos e a análise baseia-se em medidas eletroquímicas e utilizando quadrupolos.

[31] O documento WO 03/027679 A1 faz referência a um método e um biossensor para a análise de biomoléculas ligadas a um substrato para detectar a presença de analito em uma amostra pela ligação deste. O biossensor utiliza a técnica de detecção óptica.

[32] O documento inglês GB 2405203 B descreve

sistemas e métodos compreendendo um sensor de um alvo biológico, podendo este ser DNA, RNA, peptídeos, proteínas, anticorpos, antígenos, vetores, vírus, lipídeos, ácidos graxos e substratos inorgânicos ou eletroquímicos.

[33] O WO 03/056338 A1 se refere a métodos não invasivos para a detecção da presença ou ausência do antígeno da *Helicobacter pylori* ou um metabólito por ela produzido em uma amostra biológica. Para isto, faz-se uso de um biossensor contendo anticorpos específicos contra a *H. pylori* ou fragmentos ligantes de antígenos.

[34] Em nenhum dos documentos de anterioridade citados são utilizadas medidas elétricas de capacitância ou o conceito de FET, tal como na presente invenção. Além disso, nenhum dos documentos menciona a detecção de anticorpos anti-aftosa.

[35] Sumário da invenção:

[36] Esta invenção descreve plataformas nanoestruturadas que detectam e reconhecem anticorpos anti-aftosa por meio de medidas de condutividade elétrica.

[37] Adicionalmente, a presente invenção ensina um método de detecção da febre aftosa e monitoramento do processo de vacinação utilizando as plataformas e um kit para tal.

[38] Breve descrição das figuras:

[39] A Figura 1 é um esquema ilustrativo de montagem das plataformas interdigitadas.

[40] A Figura 2 é um esquema ilustrativo do

método de detecção utilizando plataformas FETs.

[41] As Figuras 3A e 3B representam graficamente a curva resposta de detecção de anticorpos anti-aftosa a várias concentrações.

[42] Descrição detalhada da invenção:

[43] A invenção descreve plataformas nanoestruturadas que detectam e reconhecem anticorpos anti-aftosa por meio de medidas de condutividade elétrica.

[44] A invenção consiste no princípio de que os anticorpos que podem estar presentes no sangue dos animais (em casos positivos da enfermidade ou vacinação) reagem com antígenos previamente obtidos por extração de vírus inativados (por meio de radiação gama ou tratamento com paraformaldeído) e imobilizados em circuitos elétricos.

[45] Após a reação, as plataformas de leitura que contém os circuitos impressos são exaustivamente lavadas, de maneira que somente os anticorpos da doença fiquem ligados à plataforma.

[46] Em seguida, são realizadas as medidas elétricas AC e DC, verificando-se variações da impedância ou da corrente, respectivamente, e, de acordo com o padrão de resposta analisado, pode-se inferir se ocorreu reação com anticorpos específicos (casos positivos) ou não (casos negativos).

[47] Dessa forma, pelo uso das plataformas da invenção, ainda é ensinado um método de detecção da febre aftosa e monitoramento do processo de vacinação.

[48] Fabricação dos circuitos elétricos e método de detecção da febre aftosa e monitoramento do processo de vacinação:

[49] O método de detecção da febre aftosa e monitoramento do processo de vacinação baseia-se na propriedade de que nanopartículas metálicas, ligadas a anticorpos específicos, terem a capacidade de aumentar a condutividade elétrica.

[50] A condutividade elétrica pode ser mensurada por meio de dois sistemas distintos, os quais estão mais bem descritos abaixo.

- Plataformas interdigitadas:

[51] As plataformas interdigitadas são circuitos os quais são constituídos por trilhas micrométricas metálicas (ouro, cobre, cromo ou de platina) sobre uma lâmina de vidro ou resina epóxi.

[52] Esta metalização origina dois contatos elétricos depositados lado a lado na lâmina, separados por um intervalo ("gap") micrométrico sem metal, nos quais são conectados dois fios finos para contato elétrico com o sistema de leitura.

[53] No intervalo entre as trilhas, o qual apresenta uma faixa que pode variar de 10 a 100 μm , preferencialmente 100 μm , são depositados os antígenos específicos.

[54] A plataforma pode conter dezenas ou centenas de trilhas, permitindo a realização de dezenas ou centenas de exames.

[55] Na figura 1, essa concretização é ilustrada e quatro duplas de trilhas estão

representadas.

[56] A amostra proveniente dos animais investigados é adicionada à plataforma e deixada para reagir por 15 a 30 minutos, seguido de pelo menos 3 lavagens com imersão em tampão.

[57] Após a complexação com a amostra, a plataforma é colocada em contato com anticorpos anti-IgG bovinos, os quais estão complexados com nanopartículas metálicas.

[58] As nanopartículas são obtidas pela reação química de redução na presença de agentes redutores e um polímero estabilizante, como a poliamidoamina (PAMAM), poli cloreto de alilamina (PAH) ou quitosana. A complexação com os anticorpos anti-IgG bovino ocorre por meio de interações eletrostáticas ou covalentes.

[59] Após a reação, a plataforma é novamente lavada por 3 vezes em imersão em tampão e, nos casos em que houve reação entre o anti-IgG bovino e o anticorpo antifebre aftosa, a plataforma ficará ligada.

[60] O anti-IgG bovino está associado às nanopartículas metálicas e é capaz de alterar a condutividade local do circuito elétrico.

[61] A impedância da plataforma é registrada a partir dos contatos elétricos, nos quais é aplicada uma tensão AC. No caso de uma reação positiva, a presença das nanopartículas aumenta a condutividade, uma vez que as mesmas são capazes de conduzir eletricidade.

[62] Nas plataformas em que não ocorre reação (resultado negativo), os anti-IgGs não ancoram com as nanopartículas e a condutividade é extremamente baixa.

- Plataformas tipo FET:

[63] Nesta abordagem, não são necessários os anticorpos secundários complexados com as nanopartículas.

[64] A plataforma utilizada é a porta de um transistor de efeito de campo (FET) ligado a um circuito eletrônico, sobre o qual é depositado o antígeno da aftosa. Essa concretização está demonstrada na Figura 2.

[65] Quando em contato com anticorpos específicos anti-aftosa, há uma variação da resposta elétrica do transistor, mais especificamente, da tensão, que determina a quantidade de anticorpos que se ligaram à plataforma.

[66] O sistema de medida é constituído de um amplificador instrumental operando como de seguidor de tensão e de um eletrodo de referência de prata / cloreto de prata.

[67] Ou seja, a tensão de entrada é igual à tensão de saída. O eletrodo de trabalho e eletrodo de referência são imersos em tampão fosfato pH 7,5 (5 mM) e, depois de um tempo de estabilização, alíquotas de antígeno anti-aftosa foram adicionadas no sistema de medida.

[68] Preparo das plataformas:

[69] Os métodos da presente invenção podem ser executados pelo uso das plataformas interdigitadas

ou tipo FET descritas, as quais são preparadas como se segue:

- Plataformas interdigitadas:

[70] A lâmina metalizada é preparada para o diagnóstico através da imobilização de antígenos da febre aftosa em sua superfície.

[71] Este procedimento consiste em imergir os substratos em uma solução etanólica 1 mM de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) por 24 horas e lavá-los com etanol ou água deionizada pra se retirar o excesso, formando, assim, uma monocamada de MUA.

[72] A monocamada é imersa em uma solução a 0,1 M de N-hidroxisuccinimida (NHS) e 0,1 M de N-etil-N-(3-dietilamino propil) carbodiimida (EDC), para a formação de um éster de NHS.

[73] Em seguida, o eletrodo é imerso em uma solução contendo os antígenos e, através de uma ligação covalente, os antígenos são imobilizados sobre a plataforma.

[74] Após este período, a lâmina é lavada três vezes com PBS (pH 7,4 15 mM) e recebe suspensão bloqueadora (leite desnatado 3% em PBS) por 1 h em temperatura ambiente.

[75] A suspensão bloqueadora tem a função de preencher todos os espaços da lâmina que não receberam os antígenos, impedindo, com isto, as ligações diretas dos anticorpos ao metal e, dessa forma, excluindo falsos positivos.

[76] Por fim, a lâmina é lavada três vezes com PBS e é utilizada imediatamente ou armazenada a -

20°C.

- Plataformas tipo FET:

[77] Nesse caso, os antígenos são depositados sobre substratos de vidro recobertos com uma película fina de ouro (metalizados).

[78] Os substratos são imersos em uma solução etanólica (1 mM) de MUA (ácido 11-mercaptoundecanóico) por 24 horas e lavados com etanol ou água deionizada pra se retirar o excesso.

[79] Uma monocamada automontada de MUA é, então, formada. A monocamada é imersa em uma solução a 0,1 M de NHS (N-hidroxisuccinimida) e 0,1 M de EDC (N-etil-N-(3-dietilamino propil) carbodiimida) para formação de um éster de NHS.

[80] Em seguida, o eletrodo é imerso em uma solução contendo os antígenos e, através de uma ligação covalente, os antígenos são imobilizados sobre a plataforma FET que é então conectada ao circuito eletrônico.

[81] Análise do material biológico:

[82] Para a análise, pode ser utilizado soro, plasma ou sangue total do animal, sendo mais prática a coleta de uma gota de sangue da orelha.

[83] A Figura 3 é um exemplo de uma curva resposta de detecção de anticorpos anti-aftosa a várias concentrações.

[84] A análise é realizada incubando o material coletado na lâmina de diagnóstico e, em seguida, a mesma deve ser lavada com PBS.

[85] Após essa reação, a lâmina recebe os

anticorpos anti-IgG previamente complexados com as nanopartículas. Após incubação, as lâminas são exaustivamente lavadas.

[86] São realizadas medidas de condutividade DC, aplicando-se uma tensão aos contatos metalizados na placa, e medindo-se a corrente gerada.

[87] A ideia desta estratégia é de que, após a segunda reação, certa quantidade de nanopartículas deposite-se no intervalo entre os eletrodos, através de reação entre os anticorpos anti-IgG e anticorpos anti-febre aftosa imobilizados.

[88] Como essa reação é altamente específica, os anticorpos anti-IgG aderem-se no intervalo e, por estarem ligados a nanopartículas metálicas, aumentam a condutividade do sistema.

[89] Este método possibilita a realização do exame *in loco*, uma vez que necessita apenas de uma simples reação e de um equipamento portátil para leitura de corrente, tal como uma fonte de tensão com leitura de corrente ou um multímetro.

[90] Com isso, é possível obter o resultado sorológico em 2 horas após a coleta do sangue.

[91] A presente invenção possibilita averiguar se o animal foi vacinado ou se está doente, pela inversão da montagem da placa.

[92] Para tal fim, os anticorpos podem ser adsorvidos no intervalo da placa e a reação com o sangue do animal permite a detecção de antígenos da doença (e não dos anticorpos).

[93] Kit:

[94] Para a execução do método descrito, é possível desenvolver um kit para realização do diagnóstico *in loco*.

[95] O kit é composto por:

1) plataformas interdigitadas ou plataformas tipo FETs;

2) solução compreendendo anticorpos anti-IgG bovino ou suíno ligados a nanopartículas, em tampão apropriado;

3) solução tampão para lavagem; e

4) circuito eletrônico integrado em um compartimento ao qual será conectada a placa para leitura e diagnóstico.

[96] As gotas do sangue são coletadas e gotejadas sobre cada circuito elétrico. Aguarda-se 1 hora para reação e, em seguida, a placa é lavada com a solução tampão.

[97] A dispersão com anticorpos anti-IgG bovino ou suíno é gotejada, aguarda-se 1 hora e lava-se novamente a placa, a qual é conectada ao circuito eletrônico, e mede-se a variação da resposta elétrica do circuito.

REIVINDICAÇÕES

1. Plataforma nanoestruturada para detecção da febre aftosa e monitoramento do processo de vacinação **caracterizada** pelo fato de ser:

- uma plataforma interdigitada constituída por trilhas micrométricas metálicas sobre uma lâmina de vidro ou resina epóxi, ou

- uma plataforma tipo FET (transistor de efeito de campo).

2. Plataforma, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a plataforma interdigitada apresenta dezenas ou centenas de trilhas micrométricas metálicas de ouro, cobre, cromo ou de platina, espaçadas entre si por um intervalo "gap" que varia de 10 a 100 µm, preferencialmente 100 µm.

3. Plataforma, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que são conectados dois fios finos para contato elétrico com o sistema de leitura.

4. Plataforma, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, para a plataforma tipo FET, o sistema de medida é constituído de um amplificador instrumental e de um eletrodo de referência de prata / cloreto de prata.

5. Método de detecção da febre aftosa e monitoramento do processo de vacinação utilizando a plataforma descrita na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, quando utiliza-se a plataforma interdigitada, o método compreende as etapas de:

- a) Adicionar a amostra proveniente dos animais à plataforma e deixar reagir por 15 a 30 minutos;

b) Lavar a plataforma pelo menos 3 vezes com imersão em tampão;

c) Colocar a plataforma em contato com anticorpos anti-IgG bovinos complexados com nanopartículas metálicas;

d) Lavar novamente a plataforma com imersão em tampão por pelo menos 3 vezes;

e) Aplicar uma tensão AC nos contatos elétricos da plataforma; e

f) Registrar a impedância da plataforma.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que as nanopartículas são obtidas pela reação química de redução na presença de agentes redutores e um polímero estabilizante.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o polímero estabilizante é a poliamidoamina (PAMAM), poli cloreto de alilamina (PAH) ou quitosana.

8. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que, quando utiliza-se a plataforma do tipo FET, as etapas (c) e (d) são suprimidas e a tensão aplicada é constante (DC).

9. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a amostra para análise é o soro, o plasma ou o sangue total do animal.

10. Kit para a execução do método descrito nas reivindicações 5 a 9, caracterizado pelo fato de compreender:

1) as plataformas interdigitadas ou tipo FET;

2) solução compreendendo anticorpos anti-IgG bovino ou suíno ligados a nanopartículas, em tampão apropriado, quando as plataformas são interdigitadas;

- 3) solução tampão para lavagem; e
- 4) circuito eletrônico integrado em um compartimento ao qual será conectada a placa para leitura e diagnóstico.

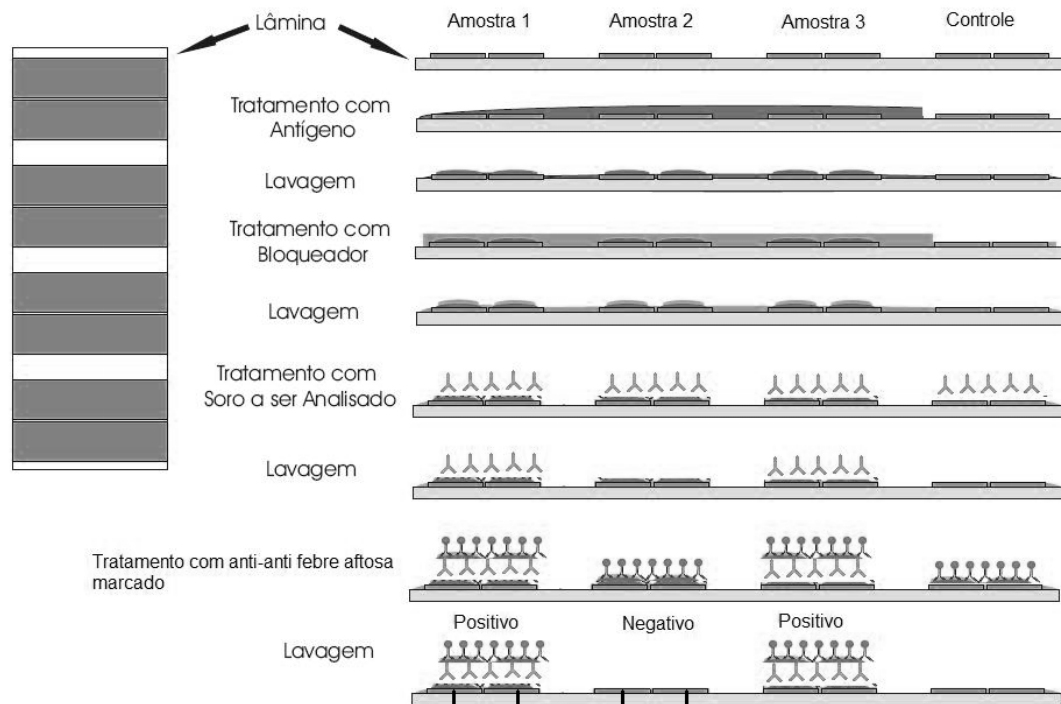


FIGURA 1

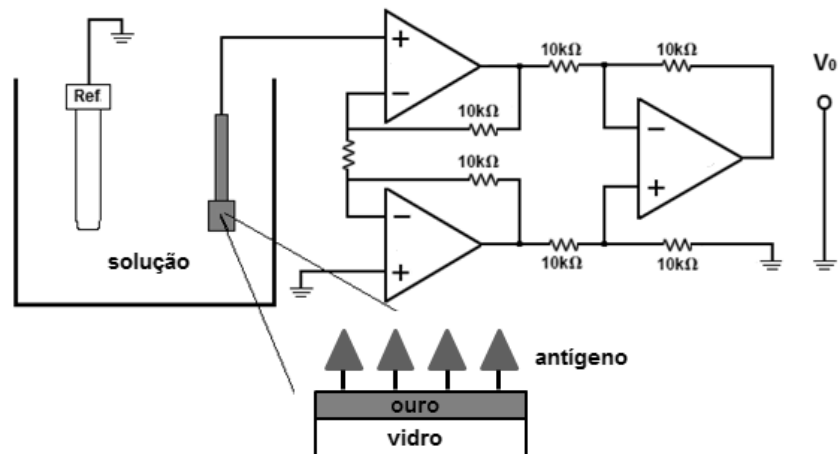


FIGURA 2

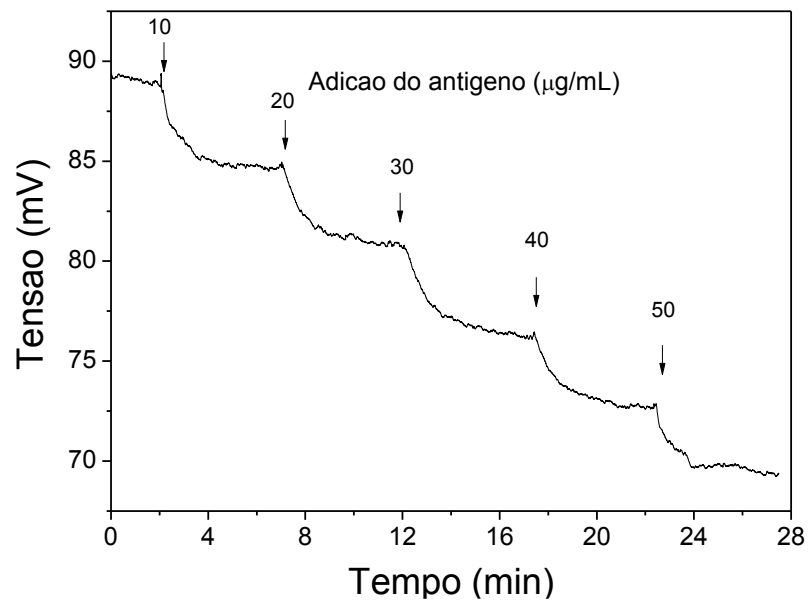


FIGURA 3A

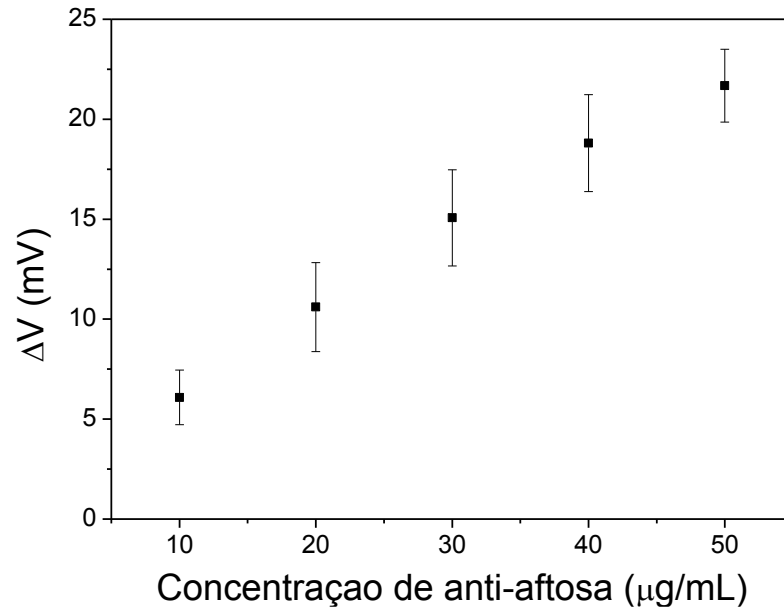


FIGURA 3B