



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

(21) BR 102016004353-0 A2

(22) Data do Depósito: 26/02/2016

(43) Data da Publicação: 20/02/2018



* B R 1 0 2 0 1 6 0 0 4 3 5 3 A

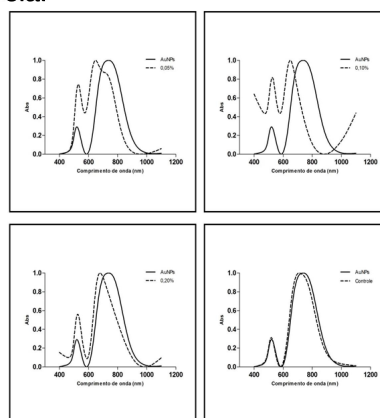
(54) Título: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE FLAVIVIRUS UTILIZANDO NANOBASTÕES DE OURO

(51) Int. Cl.: C07K 16/10; B82Y 5/00; G01N 33/553; G01N 33/569

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

(72) Inventor(es): BRENO DE MELLO SILVA; FLÁVIO GUIMARÃES DA FONSECA; CRISTIANO FANTINI LEITE; LUIZ ORLANDO LADEIRA; ERICA MILENA DE CASTRO RIBEIRO; CYNTIA FERREIRA; ANDERSON CAIRES DE JESUS

(57) Resumo: O modelo descreve o desenvolvimento de metodologias de funcionalização de nanobastões de ouro (AuNRs) com anticorpos monoclonais específicos para a proteína estrutural E (proteína do envelope) viral e seu uso para detecção direta de vírus de Dengue virus (DENV) e demais Flavivirus, como, Zika virus e Febre amarela vírus, em solução. Estas nanopartículas podem ser ajustadas para a detecção de biomoléculas como proteínas e anticorpos ligados às AuNRs a partir da leitura do seu espectro de absorção. Neste modelo, as imunoglobulinas anti-DENV ou anti-Flavivirus são ligadas aos nanobastões previamente funcionalizados à polietilenoimina e então incubadas com amostras contendo vírus. A detecção de partículas virais na solução é obtida através análise de alteração do perfil de ressonância plasmônica da solução utilizando um espectrômetro de varredura UV-Vis. Este método de diagnóstico possui sensibilidade e especificidade de detecção, baixo custo de produção, não necessita de profissional qualificado e pode ser mais rápido, preciso e prático que as técnicas já existentes de diagnóstico direto de Dengue, Zika e Febre Amarela.



DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE FLAVIVIRUS UTILIZANDO NANOBASTÕES DE OURO

Campo da invenção

[001] A invenção propõe desenvolvimento de um sistema de diagnóstico de dengue, zika e febre amarela utilizando nanobastões de ouro para aplicação na indústria de kits de diagnóstico.

Estado da técnica

[002] A nanotecnologia tem sido amplamente utilizada na biotecnologia principalmente devido ao fato de que as nanopartículas se assemelham em tamanho a várias biomoléculas comuns e este tamanho é controlado com precisão durante a síntese das mesmas. Além disso, é possível controlar a forma das partículas, como nanoesferas, nanocristais, nanoconchas e nanobastões, e fazer modificações na camada superficial para atingir uma melhor solubilidade aquosa bem como biocompatibilidade (WEST, J. L. e HALAS, N. J. 2000. Applications of nanotechnology to biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, v.11, p.215–217). A nanobiotecnologia poderia então, ser amplamente utilizada na medicina, produtos farmacêuticos, diagnóstico e processos industriais e agricultura (HULLMANN, A. 2007. Measuring and assessing the development of nanotechnology. Scientometrics, v.70, p.739–758).

[003] Nanopartículas de ouro (AuNRs) são as nanopartículas metálicas mais estáveis que se tem conhecimento (DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chemical reviews, v.104, p.293–346.) e possuem propriedades, incluindo propriedades ópticas, magnéticas, eletrônicas e estruturais, que propiciam sua utilização em muitas aplicações biológicas. (PISSUWAN, D.; VALENZUELA, S. e CORTIE, M. B. 2008. Prospects for gold nanorod particles in diagnostic and therapeutic applications. Biotechnology & genetic engineering reviews, v.25, p.93–112). A utilização destas nanopartículas poderia facilmente tornar-se a próxima geração de ferramentas de diagnóstico, uma vez que elas mostram grande sensibilidade e especificidade que podem substituir os métodos moleculares convencionais,

tais como PCR (LIZ-MARZÁN, L. M. 2006. Tailoring Surface Plasmons Through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir*, v. 22, n. 1, p. 32–41).

[004] Existem vários métodos para síntese de AuNRs com estruturas diferentes e apesar do material original ser de alto custo, é geralmente utilizado em concentrações muito baixas e se tornam econômicos. (WILSON, R. 2008. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society reviews*, v.37, p.2028–2045). As partículas com forma esférica (nanoesferas) e em forma de bastão (nanobastões, AuNRs ou “*nanorods*”) são as mais estudadas para aplicações biológicas. Existem duas abordagens gerais para a síntese de nanobastões – mediadas por semente e crescimento sem sementes. O primeiro relato de nanobastões sintetizados com qualidade utilizou uma abordagem eletroquímica que foi precursora do processo mediado por sementes, inicialmente descrito por Murphy e colaboradores. em 2001 (VIGDERMAN, L.; KHANAL, B. P. e ZUBAREV, E. R. 2012. Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications. *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla., v.24, p.4811–41).

[005] As nanopartículas são estáveis por longos períodos e podem ser funcionalizadas com vários tipos de moléculas e biomoléculas e serem redissolvidas em solventes orgânicos comuns sem sofrerem agregação irreversível (DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, v.104, p.293–346). E depois, podem ser utilizadas em uma gama de aplicações biológicas e biomédicas, dentre elas biosensoriamento, entrega de genes e drogas, diagnósticos e terapia fototérmica (HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. 2009. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials*, v.21, p.4880–4910).

[006] Segundo El-Sayed e colaboradores em 2009, a funcionalização de biomoléculas em nanobastões de ouro pode ser realizada por quatro diferentes métodos. São eles: adsorção eletrostática, interação direta de ligante, revestimento de superfície e o uso de um ligante biofuncional (HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. 2009. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials*, v.21, p.4880–4910). Na adsorção eletrostática, proteínas, por exemplo, são carregadas negativamente e colocadas em um pH abaixo de seu ponto

isoeletrico, assim ocorre uma atração eletrostática entre a superfície do ouro e a proteína e então, a consequente adsorção. Esta é uma abordagem simples, pois não requer reação química. Já na interação direta de ligante, parte do CTAB é retirada e moléculas se ligam diretamente ao ouro. Uma forma para que isso aconteça é adicionar um grupo tiol (-SH) em uma extremidade destas moléculas (Lipídeos e DNA), uma vez que a ligação metal-enxofre é muito forte (AUBIN-TAM, M-E; HAMAD-SCHIFFERLI, K.2008. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates. Biomedical materials (Bristol, England), v. 3, p.034001).

[007] Uma terceira metodologia seria funcionalizar nanobastões com moléculas poliméricas ou não que reagem naturalmente com biomoléculas específicas por adsorção eletrostática. E por último, a utilização de uma molécula biofuncional é realizada principalmente para moléculas, como proteínas e anticorpos, em que não é possível acrescentar um grupo tiol para a ligação direta na nanopartícula. Nesta abordagem há a ligação covalente da biomolécula ao ligante anteriormente ligado à nanopartícula. Várias moléculas podem ser utilizadas como ligantes e devem ser selecionadas de acordo com a biomolécula a ser funcionalizada, uma vez que uma extremidade do ligante se liga a AuNRs, geralmente por um grupo tiol, e a outra à biomolécula. Portanto, a extremidade que não interage com a nanopartícula deve ser compatível com a porção a ser ligada da molécula biológica para que a mesma não perca sua atividade ou especificidade com antígenos, por exemplo (AUBIN-TAM, M-E; HAMAD-SCHIFFERLI, K.2008. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates. Biomedical materials (Bristol, England), v. 3, p.034001).

[008] Com a ressonância de plasmon de superfície das nanopartículas é possível monitorar a adsorção de moléculas pequenas (JUNG, L. S.; CAMPBELL, C. T.; CHINOWSKY, T. M.; *et al.* 1998. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. Langmuir, v.14, p.5636–5648), ligação receptor-ligante, ligação de antígenos a anticorpos, interação DNA-proteína (REY, B. L.; JORDAN, C. E.; KOMGUTH, S.; *et al.* 1995. Control of the specific adsorption of proteins onto gold surfaces with poly(l-lysine) monolayers. Anal. Chem., v.67, p.4452–4457) e então, utilizar destas abordagens para o desenvolvimento de sistemas de biosensoramento (HALL, D. 2001. Use of optical biosensors for the study of

mechanistically concerted surface adsorption processes. *Analytical biochemistry*, v.288, p.109–25).

[009] Técnicas de detecção foram aperfeiçoadas ao longo do tempo devido à necessidade de um diagnóstico rápido e que pudesse ser empregado na rotina de laboratório de todo o mundo. Vários métodos de detecção por biosensoriamento já foram desenvolvidos, dentre eles os mais utilizados e que são baseados em marcadores são fluorescência, quimiluminescência e radioatividade. Entretanto, estas metodologias ainda possuem um alto custo e necessitam de treinamento especializado. Por isso, os biosensores livres de marcadores deverão se tornar os mais estudados e utilizados por serem de fácil manipulação, maior sensibilidade e estabilidade e serem passíveis de miniaturização (SANG, S.; WANG, Y.; FENG, Q.; *et al.* 2015. Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.00, p.1–17).

[010] Um dos principais desafios enfrentados no desenvolvimento de sensores bioanalíticos é melhorar a eficiência e sensibilidade, pelas quais biomoléculas de baixa massa molecular são detectadas em baixas concentrações em um fluido biológico complexo. O sinal do sensor é geralmente proporcional à cobertura da superfície, o que tipicamente é diretamente dependente da afinidade da interação e concentração de grandes quantidades de moléculas alvo. Portanto, é fundamental que os sensores sejam suficientemente sensíveis para detectar a baixa cobertura de biomoléculas alvo adsorvidas (proteínas, peptídeos, DNA e RNA) dentro de um curto prazo e pequenos volumes de amostras (REIMHULT, E. e HOOK, F. 2015. Design of surface modifications for nanoscale sensor applications. *Sensors*, v.15, p.1635–1675). Uma alternativa para isso seria o desenvolvimento de sensores baseados em propriedades físico-químicas de nanometais. Nanopartículas em formato esférico apresentam uma banda de ressonância de plasmon (SPR) na região do visível muito forte, se comparado com outras formas e materiais (CREIGHTON, J. A.; EADON, D. G. 1991. Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, v.87, p.3881). Já nas partículas com formato de bastão, devido à anisotropia da forma, a oscilação pode ocorrer em dois sentidos, dependendo da polarização da luz incidente, eixos curtos e eixos longos. O eixo curto induz uma banda de absorção no comprimento de onda semelhante ao das nanoesferas e é denominada como banda transversal (HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. 2010. Gold nanoparticles: optical properties

and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, v.1, p.13–28).

[011] A SPR é considerada uma das ferramentas mais importantes de biosensoriamento, uma vez que com ela é possível transformar a informação de reconhecimento biológico em sinais de deslocamento de comprimento de onda de forma precisa, sensível e em tempo real (ZHAO, Q.; DUAN, R.; YUAN, J.; *et al.* 2014 A reusable localized surface plasmon resonance biosensor for quantitative detection of serum squamous cell carcinoma antigen in cervical cancer patients based on silver nanoparticles array. *International journal of nanomedicine*, v.9, p.1097–104). Um estudo realizado em 2014 demonstrou que o método de biosensoriamento por SPR é melhor que outros sensores ópticos. Isso porque nele é possível analisar a interação das moléculas funcionalizadas no ouro com moléculas em solução sem que seja necessário qualquer tipo de marcação molecular, além de reduzir tempo de análise e preparo das amostras (OLARU, A.; BALA, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; *et al.* 2015. Surface plasmon resonance (spr) biosensors in pharmaceutical analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, n. February 2015, p. 00–00, 2015).

[012] Uma importante propriedade única do ouro é a forte ressonância de plasmon, com isso as nanopartículas de ouro se tornam excelente alternativa para o biosensoriamento (ZHAO, Q.; DUAN, R.; YUAN, J.; *et al.* 2014 A reusable localized surface plasmon resonance biosensor for quantitative detection of serum squamous cell carcinoma antigen in cervical cancer patients based on silver nanoparticles array. *International journal of nanomedicine*, v.9, p.1097–104). Além disso, as nanopartículas são facilmente funcionalizadas com moléculas de reconhecimento (como anticorpos, antígenos, oligonucleotídeos, etc.) por métodos que levam a conjugados altamente estáveis (WILSON, R. 2008. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society reviews*, v.37, p.2028–2045). Uma das várias aplicações de biosensores é baseada na alteração do comprimento de onda devido a mudanças nas propriedades dielétricas das partículas (SPR) resultante da ligação de moléculas biológicas, tais como anticorpos, à nanopartículas de ouro (NATH, N. E CHILKOTI, A. 2004. Label free colorimetric biosensing using nanoparticles. *Journal of Fluorescence*, v.14, p.377–389).

[013] Muitos biossensores baseados em SPR já foram estudados e desenvolvidos para a detecção de várias doenças, como por exemplo, a detecção da Síndrome da mancha branca em crustáceos utilizando DNA funcionalizado às AuNRs e até mesmo de detecção de DENV através da ligação de DNAzyme às AuNRs (CARTER, J. R.; BALARAMAN, V.; KUCHARKI, C. A; FRASER, T. S. E FRASER, M. J. 2013. A novel dengue virus detection method that couples DNAzyme and gold nanoparticle approaches. *Virology journal*, v. 10, p. 201). Em 2011 um estudo desenvolveu um imunossensor promissor capaz de detectar o antígeno carcinoembrionário que é biomarcador de câncer (ALTINTAS, Z.; ULUDAG, Y.; GURBUZ, Y. E TOTHILL, E. I. 2011. Surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of the cancer biomarker carcinoembryonic antigen. *Talanta*, v. 86, p. 377–83).

[014] Os imunossensores são baseados em anticorpos policlonais ou monoclonais, que são geralmente utilizados em ensaios imunológicos, pois são capazes de identificar e até quantificar proteínas específicas em soluções repletas de outras proteínas, componentes celulares, entre outros. A partir disso, também podem ser utilizados na identificação de doenças (CRUZ, H. J.; ROSA, C. C.; OLIVA, A. G. 2002. Immunosensors for diagnostic applications. *Parasitology Research*, v.88, p.4–7) como biossensores baseados na detecção da interação específica de anticorpos com antígenos (HAMMOCK, M.P. M.; GEE, S.; BRUCE, D. 1995. Immunochemical techniques for environmental analysis. *Trends in analytical chemistry*, v.14, p.341–350). E o principal motivo de se utilizar imunorreações é pelo fato de serem altamente sensíveis e seletivas (PRICE, C P. 1998. Progress in immunoassay technology. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, v.36, p.341–347).

[015] Portanto, uma tecnologia de biossensor acoplada com o uso de nanopartículas metálicas oferece benefícios comparados aos métodos tradicionais com relação ao tempo de análise, sensibilidade e simplicidade de manipulação. A partir disso, este trabalho propõe desenvolver e analisar a eficácia de metodologias de funcionalização de nanopartículas de ouro com anticorpos específicos anti-DENV e anti-flavivirus (*Zika virus* e *Febra amarela virus*) e a ligação dos mesmos aos antígenos.

[016] Apesar de algumas técnicas apresentadas até o momento fazerem uso de ouro, não implica que se trata do mesmo processo, pois, o ouro ha muito tempo é utilizado

em reações colorimétricas em teste de ELISA lateral, como por exemplo, o teste de gravidez, em que partículas de ouro ligadas a antígenos e anticorpos são depositadas em uma matriz, tal como nitrocelulose, e se deslocar junto com um fluxo líquido (cromatografia) até se posicionarem junto a marcadores onde ocorre uma aglomeração destas partículas gerando uma alteração visual.

[017] Além disso, alguns trabalhos já patenteados (Método de detecção precoce de uma infecção flaviviral, Kit de diagnóstico precoce, processo de purificação da proteína NS1 de um Flavivirus composição imunogênese, utilização da proteína NS1, de pelo menos um anticorpo monoclonal anti-NS1, e, processo de expressão de um polinucleotídeo codificado para a proteína NS1 de um vírus da Dengue – PI0011369-7A; Vírus, cDNA do vírus, polipeptídeo recombinante do vírus, anticorpo monoclonal, vetor de expressão, vacina, método e kit de diagnóstico dengue – PI 0300962-9A; Use of recombinant envelope proteins for diagnosing the Dengue vírus – PCT/FR98/01537; Methods and materials for the detection of Dengue vírus infection – US 2013/0164734 A1; Nanobastões de ouro funcionalizados, uso e Kit para imunodiagnóstico de Dengue) visam a identificação da proteína NS1, genoma viral e até mesmo de anticorpos (IgG e IgM) produzidos pelo hospedeiro em uma resposta imune contra o DENV e demais Flavivirus. Entretanto, neste trabalho propusemos a detecção direta de partículas virais íntegras e não de componentes da partícula viral solúveis como ácido nucleico (genoma viral), proteínas não estruturais (como a NS1) ou de anticorpos gerados contra os vírus.

[018] No método proposto, portanto, utilizamos nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpos monoclonais específicos para DENV e para demais *Flavivirus* para avaliar o perfil de ressonância plasmônica em uma solução contendo nanopartículas em suspensão e não depositadas em uma matriz. Dessa forma, esta proposta, em comparação com os métodos de diagnóstico para tais vírus já disponíveis no mercado, possui vantagens por ser mais rápido, sensível e específico para a detecção direta de DENV e de *Flavivirus*.

Solução do Problema

[019] A dengue, causada pelo *Dengue virus* (DENV) do gênero *Flavivirus*, bem como enfermidades causadas por outros vírus também do gênero *Flavivirus* a saber, *Zika*

virus e *Febre amarela virus*, são conhecidas como as arboviroses mais importante da atualidade, colocando aproximadamente metade da população mundial em áreas de risco iminente de transmissão. Além disso, a transmissão dos diferentes sorotipos do DENV dificulta o desenvolvimento de vacinas e pode ocasionar manifestações clínicas que variam de infecção assintomática até casos graves e potencialmente fatais. Uma forma de evitar a morbidade e mortalidade causadas seria o controle do vetor e diagnóstico precoce e específico, que se tornam ainda mais necessários devido a transmissão de Dengue, Zika, Febre amarela e ainda, Febre Chikungunia ocorrer pelo mosquito vetor e serem doenças de sintomatologia semelhante.

[020] O diagnóstico definitivo da infecção por Flavivirus depende do isolamento viral, da detecção de antígenos virais ou RNA em soro ou tecidos, ou da detecção de anticorpos específicos no soro dos pacientes. Destes, os métodos imunoenzimáticos frequentes na rotina clínica para se confirmar uma infecção recente pelo DENV, *Zika virus* e *Febre amarela virus*, principalmente em razão de sua alta sensibilidade e rapidez. Porém, métodos sorológicos apresentam limitações: dependem do fim do período da resposta imunológica para que o diagnóstico seja concluído e apresentam sensibilidade diminuída em relação à possibilidade de identificação do sorotipo infectante, já que ocorrem reações cruzadas entre os diferentes sorotipos do DENV e mesmo entre *flavivirus* diferentes. Além disso, para amostras de mosquitos a detecção viral é possível apenas com biologia molecular, isolamento de vírus em cultura e testes em validação baseados em cromatografia ou ELISA lateral.

[021] Portanto, uma tecnologia de biossensor acoplada com o uso de nanopartículas metálicas oferece benefícios comparados aos métodos tradicionais com relação ao tempo de análise, sensibilidade e simplicidade de manipulação. A partir disso, este trabalho desenvolveu e analisou a eficácia de metodologias de funcionalização de nanobastões de ouro com anticorpos específicos anti-DENV e anti-flavivirus e a ligação dos mesmos aos antígenos. Logo, poderá ser implementado um novo método de diagnóstico de baixo custo de produção e ser ainda mais rápido, preciso e prático que as técnicas já existentes. E ainda contribuir para estudos de vigilância da virologia em mosquitos.

Sumário da Invenção

[022] O pedido de patente propõe detecção direta de partículas virais de *Dengue vírus*, *Zika virus* e *Febre amarela virus* (e não o RNA, NS1 ou de anticorpos), com utilização de nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpos monoclonais específicos anti-denv e anti-flavivirus.

Descrição detalhada da invenção

[023] Os nanobastões de ouro foram sintetizados por método mediado por semente. Nesta síntese foi utilizado ácido cloroáurico (HAuCl_4) 0,1mM e brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) sob agitação por 1 hora em banho térmico a 40°C para a formação das primeiras partículas. Então, foi adicionada uma solução de crescimento, contendo 0,2M de ácido cloroáurico e CTAB, e 0,2M de ácido ascórbico até que houvesse a mudança de cor da solução de dourado para transparente. Após, uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) em banho térmico a 30°C por até 48 horas, controlando assim o tamanho de crescimento dos nanobastões. Por fim, os nanobastões foram purificados, retirando o excesso de CTAB por centrifugação a 5600 g por 15 minutos, e caracterizados por microscopia.

[024] Biomoléculas foram funcionalizadas em nanopartículas de ouro por intermédio de reagentes ligantes como polietilenoimina. Isso deve ser realizado para que o grupo amina ($-\text{NH}_2$) da extremidade livre do ligante se ligue covalentemente ao grupo carboxila ($-\text{COOH}$) da porção C-terminal do anticorpo. Para que ocorra a ligação dos radicais carboxilas com os aminos é necessário uma reação de amidação por diimida. Por isso, é utilizado cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida (EDAC) como agente acoplante e N-hidroxisuccinimida (NHS) como agente estabilizante, o qual converte os ácidos carboxílicos em ésteres ativos, que em seguida interagem com os grupos amina dos reagentes ligantes.

[025] Para que fosse possível a funcionalização dos anticorpos foi realizada a ligação de polietilenoimina ($(\text{C}_2\text{H}_5\text{N})_n$), o qual é capaz de mediar a ligação eletrostática nanobastão-anticorpo devido aos vários grupos amina reativos (ZAPP, E.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; *et al.* 2014. Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker. *Biosensors & bioelectronics*, v.59, p.127–33.). Para isso, foi previamente definido a concentração de 0,3% de PEI a ser utilizada (FIGURA 1) e então, 250 μL de solução de nanopartículas foram centrifugados a

4000g por 10 minutos e ressuspendidos em 250 μ L de polietilenoimina e incubados a temperatura ambiente por ultrasonicação por 30 minutos, para desestabilização do CTAB presente na superfície das nanopartículas. Após, a solução foi novamente centrifugada a 4000g por 10 minutos e ressuspendidas em 250 μ L de anticorpo previamente preparado.

[026] As imunoglobulinas anti-favivirus foram purificadas (FIGURA 2) e depois de identificada a melhor concentração (0,4 μ g/mL) a ser utilizada (FIGURA 3) foi preparada de modo que foi adicionado 30mM de EDAC/NHS (0,4M:0,1M) e Tampão fosfato (PBS1X, pH 7,4, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ em água ultra pura) para um volume final de 250 μ L. E então, incubada por 30 minutos a 4°C. Por fim, a reação de nanopartículas funcionalizadas com polietilenoimina e anticorpos foi realizada por uma hora a temperatura ambiente em banho ultrassônico. Ao final deste tempo foram novamente centrifugadas a 4000 g por 10 minutos e ressuspendidos em 100 μ l de PBS e 100 μ l de solução com vírus.

Tabela 1 Variação de deslocamento de bandas de ressonância plasmônica para a diferentes concentrações de anti-flavivirus.

Controle/ Concentração	Comprimento de onda	Deslocamento (nm)
Controle	748	-
0,08 μ g/ml	724	24
0,40 μ g/ml	716	32
2,00 μ g/ml	742	6
10,0 μ g/ml	730	18
50,0 μ g/ml	754	6

[027] Para analisar a sensibilidade de detecção uma diluição com diferentes valores de Unidades formadoras de placas (UFP) de *DENV-1* foi realizada em PBS para um volume final de 100 μ L e depois adicionada à concentração definida (0,4 μ g/mL) de anticorpo ligada às nanopartículas. Foi analisado o tempo necessário de incubação para a detecção do vírus (FIGURA 4) de modo que, 30 minutos foi considerado um tempo

suficientemente satisfatório, uma vez que apresentou apenas 8 nm de diferença no deslocamento se comparado com a leitura de 60 minutos (TABELA 2).

Tabela 2 Variação de deslocamento de bandas de ressonância plasmônica para a análise de tempo de detecção de *Dengue vírus*.

Controle/ Tempo	Comprimento de onda	Deslocamento (nm)
Controle	765	-
Tempo 0	783	18
15 minutos	806	41
30 minutos	820	55
60 minutos	828	63

[028] Um biossensor sensível tem que ser capaz de detectar pequenas quantidades de moléculas. Por isso, foi feito um ensaio em que várias concentrações de vírus, expressas em Unidades Formadoras de Placa (UFP), foram incubadas às AuNRs funcionalizadas a 0,3% de PEI e 0,4µg/ml de anti-flavivirus (FIGURA 6). Como pode ser observado na tabela 3, com 50 UFP/ml (10 UFP) um pequeno deslocamento de 4 nm ocorreu, mas se torna mais evidente com 500 UFP/ml (100 UFP), apresentando um deslocamento de 18 nm. Mais evidente ainda com as maiores concentrações de 5000 UFP/ml e 50000 UFP/ml, como era esperado. O deslocamento em baixas concentrações de vírus, mesmo que pequeno, pode indicar que o método é sensível para a detecção de DENV1.

[029] Foi realizado também um ensaio em que as AuNRs funcionalizadas com PEI e anticorpo anti-flavivirus foram incubadas com diferentes concentrações de *Mayaro vírus* (MV), um vírus do gênero *Alphavirus* e família *Togaviridae* (TESH, R. B.; WATTS, D, M.; RUSSELL, K, L.; *et al.* 1999. *Mayaro virus* disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v.28, p.67–73.). Uma vez que o anticorpo utilizado é específico para o gênero *Flavivirus* a ausência de deslocamento após a incubação com vírus de outro gênero, como MV sugere a especificidade do biossensor. A

figura 7 e a tabela 4 mostram este resultado, nas quais se observa que não houve detecção do MV em quatro das cinco concentrações testadas, já que não ocorreu deslocamento em relação ao controle. Um deslocamento de 14 nm ocorreu apenas na presença de alta concentração (500000 UFP/ml) de MV, a qual, entretanto, não é encontrada em amostra biológica natural.

Tabela 3 Variação de deslocamento de bandas de ressonância plasmônica para análise de sensibilidade de detecção de *Dengue vírus*.

Controle/ Concentração	Comprimento de onda	Deslocamento (nm)
Controle	760	-
10 UFP	764	4
100 UFP	778	18
1000 UFP	815	55
10.000 UFP	810	50

Tabela 4 Variação de deslocamento de bandas de ressonância plasmônica para análise de sensibilidade de detecção de *Dengue vírus*.

Controle/ Concentração	Comprimento de onda	Deslocamento (nm)
Controle	760	-
10 UFP	760	0
100 UFP	760	0
1000 UFP	760	0
10.000 UFP	760	0
100.000 UFP	774	14

[030] Para a análise das reações, os espectros foram medidos em espectrômetro UV-Vis, no qual é possível detectar as alterações dos elétrons de superfície resultantes da ligação anticorpos-antígenos, por deslocamento do espectro gerado. Os dados resultantes

da leitura em espectrômetro UV-Vis foram normalizados utilizando PeakFit v4 e os gráficos foram gerados em GraphPad Prism.

[031] Se comparado a técnicas já existentes, as quais geralmente requerem um maior tempo de detecção, o ensaio neste trabalho mostrou-se eficiente com um resultado em curto prazo. Portanto, no que refere ao tempo necessário para realização do teste, este sistema apresenta bons atributos para uma detecção rápida para Dengue, Zika e Febre amarela.

[032] Os resultados obtidos neste trabalho podem ainda ser utilizados como base para outras aplicações. Ensaio de aglomeração podem ser realizados de modo que nanobastões e principalmente nanoesferas se aglomerem na presença do antígeno, podendo resultar no alargamento do pico de ressonância ou mesmo na mudança de cor da solução (NIETZOLD, C. e LISDAT, F. 2012. Fast protein detection using absorption properties of gold nanoparticles. *The Analyst*. v. 137, p. 2821-2816). Além disso, técnicas como microfluidica (HAN, K. N.; LI, C. A. e SEONG, G. H. 2013. Microfluidic chips for immunoassays. *Annual review of analytical chemistry*. v.6, p. 119-141) e SERS (STUART, D. A., HAES, A. J., YONZON, C. R. *et al.*, 2005. Biological applications of localised surface plasmonic phenomena. *IEE proceedings. Nanobiotechnology*. v. 152. p 13-32) poderiam ser associadas a ressonância de plasmon para facilitar e tornar a detecção ainda mais eficiente.

Descrição das figuras

[033] Figura 1 Espectroscopia de UV-Vis da análise de concentração de polietilenoimina. (A) Espectro resultante da ligação de 0,05% de PEI às AuNPs com um deslocamento de 90 nm. (B) Ligação de 0,1% com 90 nm de deslocamento. (C) Ligação de 0,2% com 62 nm de deslocamento. (D) Ligação de 0,3% com 32 nm de deslocamento. Linha contínua (AuNPs): nanopartículas puras. Linha pontilhada: diferentes concentrações de polietilenoimina ligadas às nanopartículas.

[034] Figura 2. SDS-PAGE 12% de imunoglobulinas purificadas em coluna de afinidade: Amostras de sobrenadante de célula foram purificadas em coluna de afinidade. As bandas em destaque representam as cadeias pesada (50KDa) e leve (25KDa) dos anticorpos, sob condição desnaturante. (A) Anticorpo anti-flavivirus (AF) e (B) anti-denv2 (AD2). PMM: padrão de massa molecular.

[035] Figura 3 Espectroscopia de UV-Vis da análise de concentração de anti-flavivirus na presença de polietilenoimina. (A) Espectro de AuNPs puras (Linha contínua) e ligação de 0,3% de polietilenoimina às AuNPs (Linha tracejada) com um deslocamento de 32 nm. (B) Ligação de 0,08 µg/mL. (C) Ligação de 0,4 µg/mL. (D) Ligação de 2 µg/mL. (E) Ligação de 10 µg/mL. (F) Ligação de 50 µg./mL. Linha tracejada (Controle): AuNPs funcionalizadas com 0,3% de polietilenoimina. Linha pontilhada: diferentes concentrações de anticorpos.

[036] Figura 4 Espectroscopia de UV-Vis da análise de tempo de detecção do Dengue vírus (*Flavivirus*). (A) Espectro de detecção de vírus nos diferentes tempos testados: 2 em 2 minutos até 10 minutos e de 5 em 5 minutos até 1 hora. (B) Espectro da detecção do vírus nos quatro principais tempos (0, 15, 30 e 60 minutos). Linha tracejada (Controle): AuNPs funcionalizadas com 0,3% de polietilenoimina e 0,4 µg/mL de anti-flavivirus. Tempo 0: leitura imediatamente após a adição do vírus. Linha pontilhada: diferentes tempos de incubação. Para cada amostra foi adicionado 5000UFP/ml do DENV1.

[037] Figura 5. Análise da variação de deslocamento para diferentes tempos de detecção de Dengue vírus (*Flavivirus*): Tempo de detecção de vírus nos diferentes tempos testados: 2 em 2 minutos até 10 minutos e de 5 em 5 minutos até 30 minutos e 10 em 10 até 1 hora. Tempo 0: leitura imediatamente após a adição do vírus. Para cada amostra foi adicionado 5000UFP/ml do DENV1.

[038] Figura 6 Espectroscopia de UV-Vis da análise da sensibilidade de detecção do Dengue vírus (*Flavivirus*). Espectro de detecção de DENV 1 nas diferentes concentrações. (A) 10 UFP (50 UFP/mL). (B) 100 UFP (500 UFP/mL). (C) 1000 UFP (5000 UFP/mL) e (D) 10000 UFP (50000 UFP/mL). Linha tracejada (Controle): AuNPs funcionalizadas com 0,3% de polietilenoimina e 0,4µg/mL de anti-flavivirus. Linha pontilhada: diferentes concentrações de vírus.

[039] Figura 7 Espectroscopia de UV-Vis da análise da sensibilidade de detecção do Mayaro vírus (*Alphavirus*). Espectro de detecção de *Mayaro virus* nas diferentes concentrações (A) 10 UFP (50 UFP/mL). (B) 100 UFP (500 UFP/mL). (C) 1000 UFP

(5000 UFP/mL), (D) 10000 UFP (50000 UFP/mL) e (E) 100000 (500000 UFP/mL). Linha tracejada (Controle): AuNPs funcionalizadas com 0,3% de polietilenoimina e 0,4 µg/mL de anti-flavivirus. Linha pontilhada: diferentes concentrações de vírus.

REIVINDICAÇÕES

1. Nanobastões de ouro caracterizados pela funcionalização com um anticorpo monoclonal específico para *Dengue virus*, e anticorpo monoclonal específico para demais vírus pertencentes ao gênero Flavivirus (*Zika virus* e *Febre amarela virus*).
2. Nanobastões de ouro, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pela funcionalização ser mediada por polietilenoimina.
3. Uso dos nanobastões de ouro, de acordo com as reivindicações de 1 e 2, caracterizado por ser no diagnóstico direto de *Dengue virus*, e de outros Flavivirus (*Zika virus* e *Febre amarela virus*), através de ressonância platônica.

FIGURAS

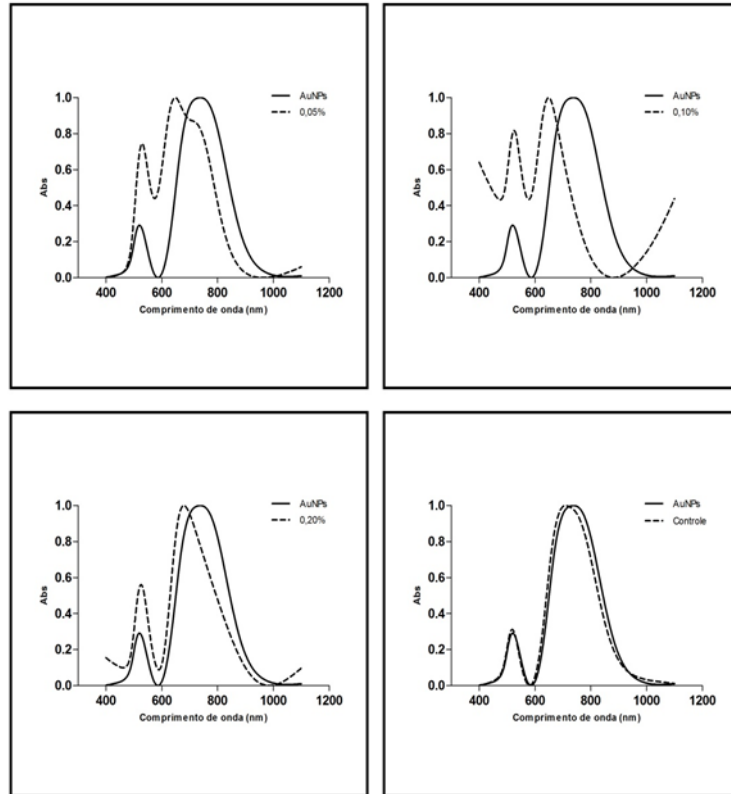


Figura 1

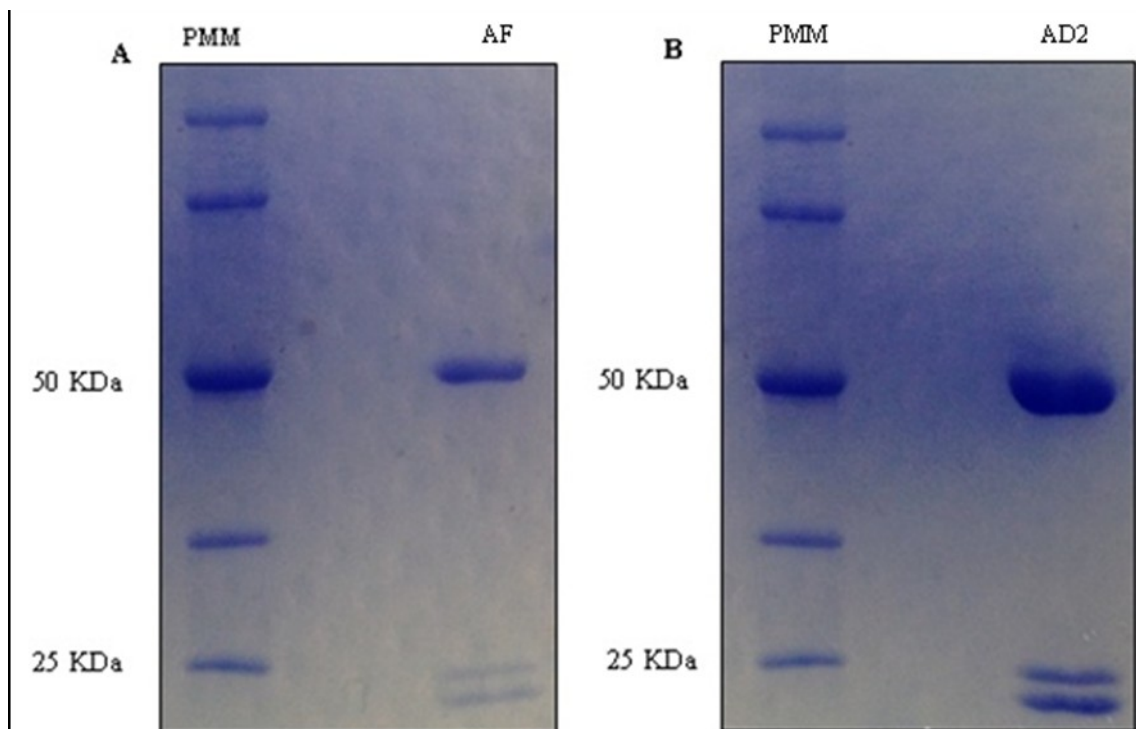
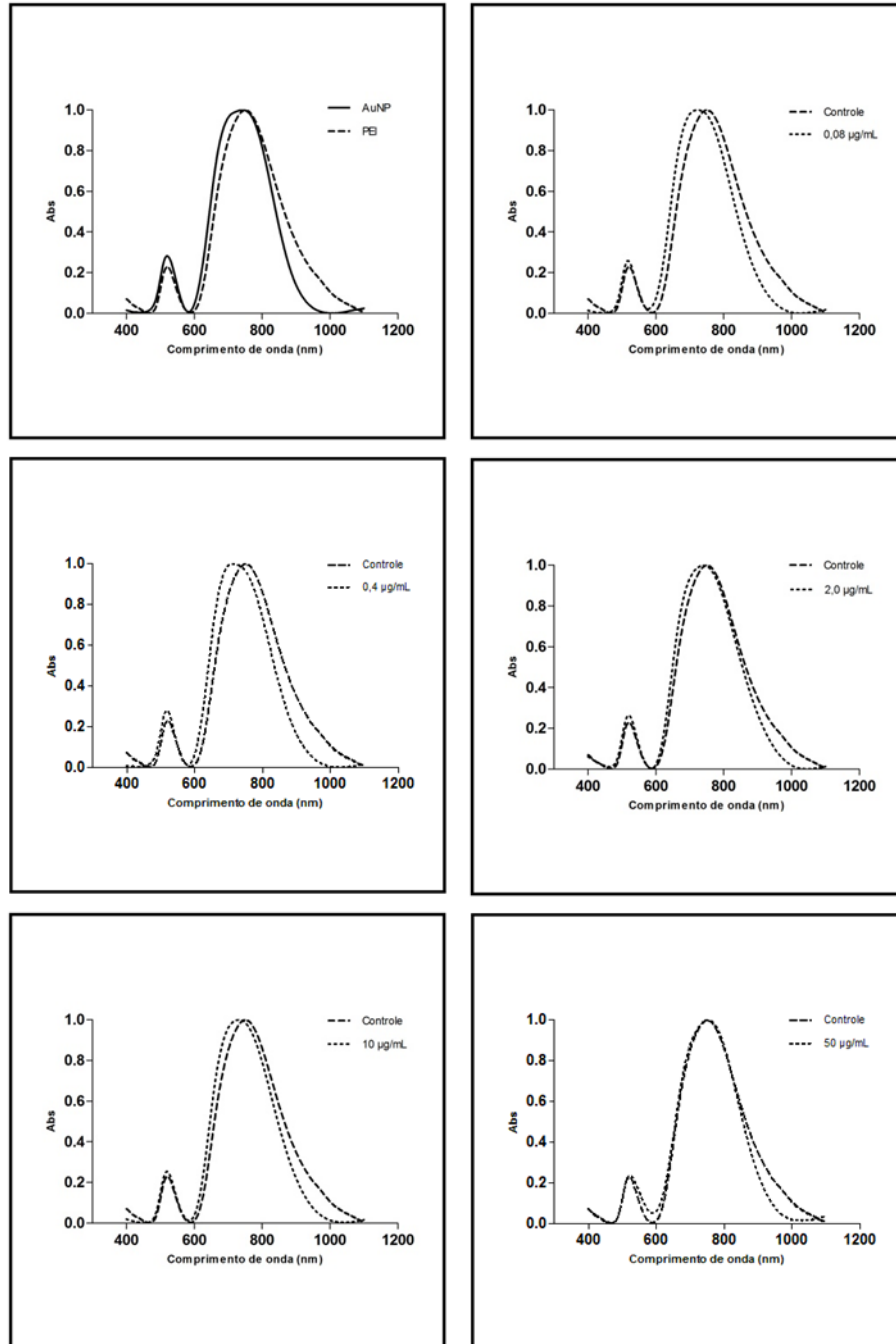


Figura 2

**Figura 3**

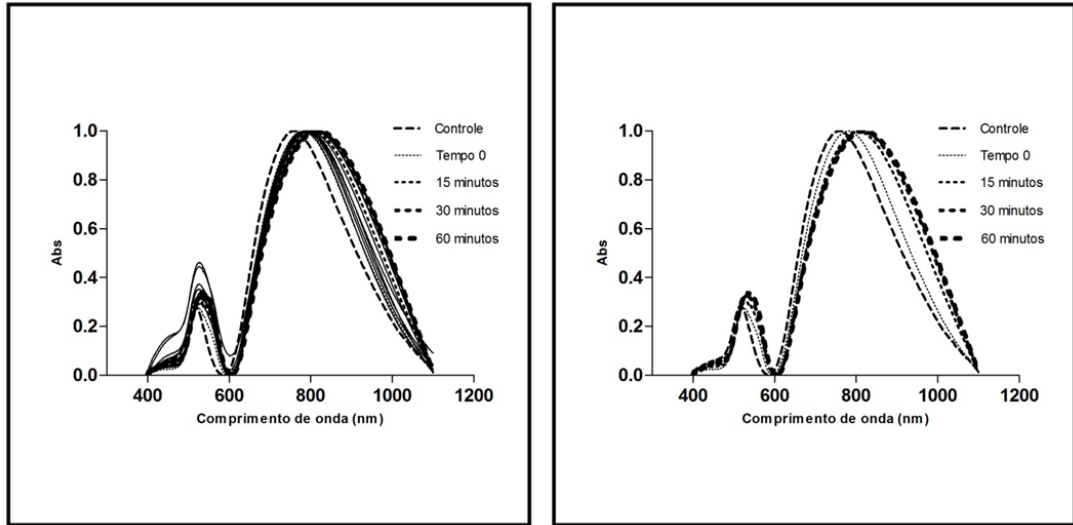


Figura 4

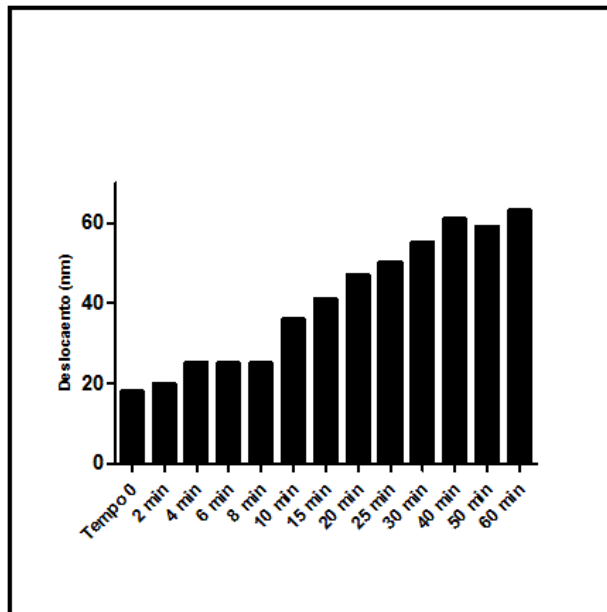


Figura 5

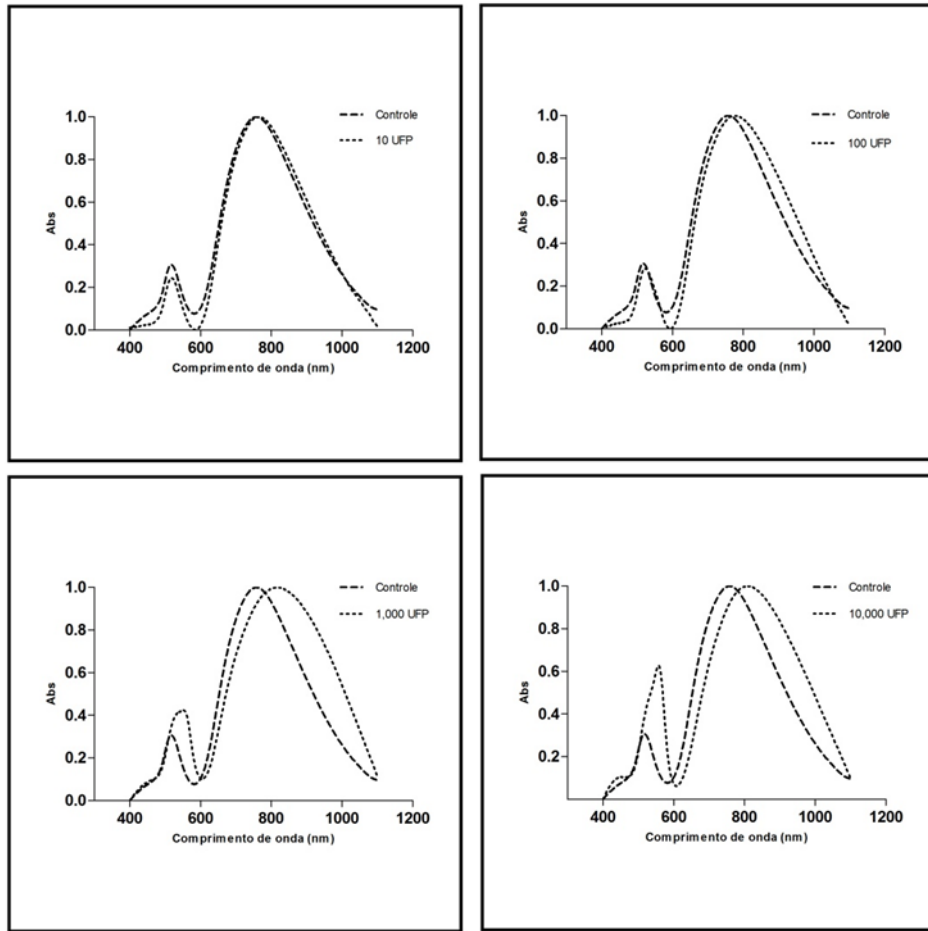


Figura 6

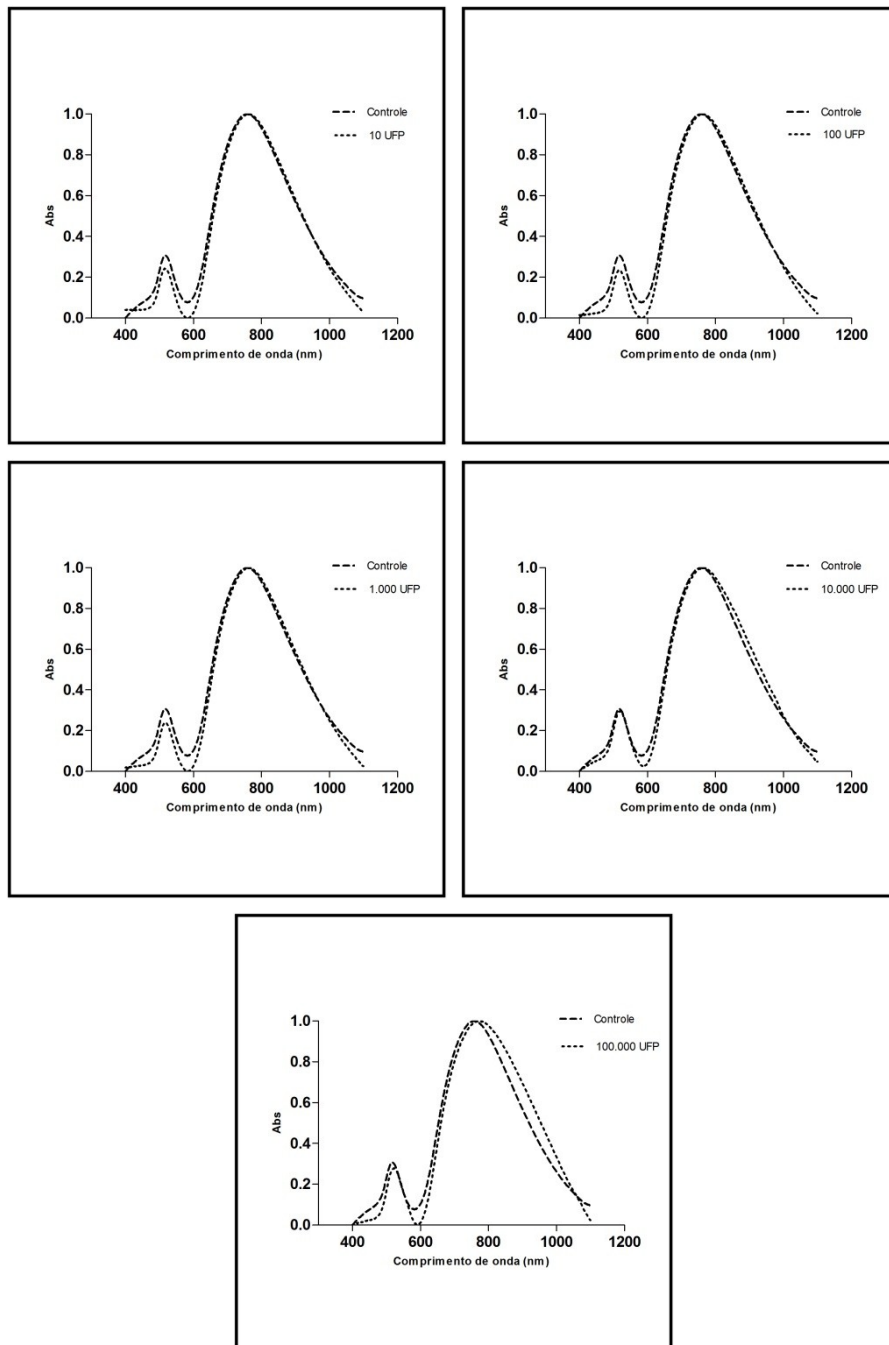


Figura 7

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE FLAVIVIRUS UTILIZANDO NANOBASTÕES DE OURO

RESUMO

O modelo descreve o desenvolvimento de metodologias de funcionalização de nanobastões de ouro (AuNRs) com anticorpos monoclonais específicos para a proteína estrutural “E” (proteína do envelope) viral e seu uso para detecção direta de vírus de *Dengue virus* (DENV) e demais Flavivirus, como, *Zika virus* e *Febre amarela virus*, em solução. Estas nanopartículas podem ser ajustadas para a detecção de biomoléculas como proteínas e anticorpos ligados às AuNRs a partir da leitura do seu espectro de absorção. Neste modelo, as imunoglobulinas anti-DENV ou anti-Flavivirus são ligadas aos nanobastões previamente funcionalizados à polietilenoimina e então incubadas com amostras contendo vírus. A detecção de partículas virais na solução é obtida através análise de alteração do perfil de ressonância plasmônica da solução utilizando um espectrômetro de varredura UV-Vis. Este método de diagnóstico possui sensibilidade e especificidade de detecção, baixo custo de produção, não necessita de profissional qualificado e pode ser mais rápido, preciso e prático que as técnicas já existentes de diagnóstico direto de Dengue, Zika e Febre Amarela.