

(11) Número de Publicação: **PT 2878950 T**

(51) Classificação Internacional:

**G01N 33/543** (2017.01) **G01N 21/55** (2017.01)

**G01N 21/552** (2017.01) **B82Y 15/00** (2017.01)

**G01N 21/78** (2017.01) **G01N 21/29** (2017.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2013.07.26**

(30) Prioridade(s): **2012.07.26 ES 201231209**

(43) Data de publicação do pedido: **2015.06.03**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.04.26**  
**148/2017**

(73) Titular(es):

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS (CSIC)**

**C/ SERRANO 117 28006 MADRID ES**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA ES**

**FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA  
INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (ARAI)ES**

(72) Inventor(es):

**PABLO DEL PINO GONZÁLEZ DE LA HIGUERA ES**

**BEATRIZ PELAZ GARCIA DE**

**ESTER POLO TOBAJAS IE**

**VALERIA GRAZÚ BONAVÍA ES**

**JESÚS MARTÍNEZ DE LA FUENTE ES**

(74) Mandatário:

**JOÃO PEREIRA DA CRUZ**

**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **BIOSENSOR COMPREENDENDO NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REVELA UM BIOSENSOR PARA A DETECÇÃO VISUAL DE UM ANALITO, COM BASE NAS PROPRIEDADES DE CONVERSÃO DA LUZ EM CALOR DE NANOPARTÍCULAS DE METAL: O ANALITO É VISUALMENTE DETETADO PELA ALTERAÇÃO DE COR NAS ÁREAS DE SUPORTE (QUANDO O ANALITO ESTÁ PRESENTE), PRODUZIDO COMO RESULTADO DO CALOR PRODUZIDO PELAS NANOPARTÍCULAS DE METAL QUANDO ESTAS SÃO IRRADIADAS POR UMA FONTE DE LUZ EXTERNA. A UTILIZAÇÃO DO REFERIDO BIOSENSOR NUM MÉTODO PARA A DETECÇÃO DE ANALITOS É TAMBÉM REIVINDICADA.

**RESUMO**

**"BIOSENSOR COMPREENDENDO NANOPARTÍCULAS METÁLICAS"**

A presente invenção revela um biossensor para a detecção visual de um analito, com base nas propriedades de conversão da luz em calor de nanopartículas de metal: o analito é visualmente detetado pela alteração de cor nas áreas de suporte (quando o analito está presente), produzido como resultado do calor produzido pelas nanopartículas de metal quando estas são irradiadas por uma fonte de luz externa. A utilização do referido biossensor num método para a detecção de analitos é também reivindicada.

**DESCRIÇÃO****"BIOSENSOR COMPREENDENDO NANOPARTÍCULAS METÁLICAS"****Campo da Técnica**

A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia, especificamente ao campo dos biossensores, mais especificamente ao campo dos biossensores com nanopartículas de metal como um sistema de transdução de sinal.

**Antecedentes da Invenção**

Em anos recentes, os biossensores foram contemplados como alternativas analíticas aos métodos convencionais em campos diferentes. Um biossensor é um dispositivo de análise constituído dois elementos fundamentais: um biorrecetor (um anticorpo, uma Sonda de DNA, ou uma célula...) preparado para detetar especificamente uma substância, tirando vantagem da especificidade das interações moleculares, e um transdutor ou sensor, capaz de interpretar a reacção de reconhecimento biológico produzida pelo recetor e "de o transduzir" num sinal ótico ou elétrico quantificável. As características mais relevantes destes dispositivos que os tornam opções altamente atrativas como ferramentas analíticas são a sua especificidade, elevada sensibilidade, capacidade de resposta que leva a um tempo de análise curto, a sua capacidade para ser incluída em sistemas integrados, facilidade de automação, capacidade para trabalhar em tempo real, sua versatilidade e baixo custo.

O progresso no campo dos biossensores reside na experiência adquirida ao longo dos anos no que respeita à capacidade de reconhecimento e propriedades de várias biomoléculas. Muitos instrumentos biológicos que variam desde os mais simples tais como enzimas ou anticorpos até produtos geneticamente modificados mais complexos foram utilizados como elementos de reconhecimento. Por exemplo, Haes Aj *et al.* "Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor", *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127(7), 2264-2271), descreve um biossensor adequado para a deteção de ligandos difusíveis derivados de amiloide- $\beta$ , ADDLs. Por outro lado, os recentes avanços na microeletrónica, nanotecnologia e as únicas propriedades dos materiais específicos foram chaves para estes dispositivos.

Apesar do mencionado, os presentes métodos de sensor não são sempre capazes de preencher os requisitos para a fiabilidade e velocidade. O tempo necessário para realizar o ensaio e a sensibilidade da técnica são algumas das limitações mais significativas. Embora o desenvolvimento destes dispositivos tenha sido principalmente focado no campo do diagnóstico clínico, no seu interesse em outros campos de aplicação incluindo os campos ambiental, agroalimentar, químico, farmacêutico e militar é está a crescer atualmente.

A presente invenção propõe um novo biossensor com base nas propriedades de conversão de luz em calor de nanopartículas de metal.

**Breve Descrição da Invenção**

Um primeiro aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para a deteção visual de um analito compreendendo:

- a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo, imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;
- b. Uma fonte de luz externa; e
- c. Uma nanopartícula metal possuindo uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) capaz de reconhecer o analito alvo;

em que o termo "superfície sensível ao calor" entende-se como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Um segundo aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para deteção visual de um analito compreendendo:

- a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;
- b. Um fonte de luz externa;

c. Uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) capaz de reconhecer o analito alvo, opcionalmente ligado a uma marca molécula; e

d. Nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com biomoléculas que reconhecem especificamente a biomolécula de deteção ou a molécula marca com a qual a biomolécula de deteção foi modificada;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Um terceiro aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para deteção visual de um analito como definido no segundo aspeto da invenção, compreendendo:

a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;

b. Uma fonte de luz externa;

c. Uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) capaz de reconhecer o

analito alvo, a uma ou várias moléculas de biotina;  
e

d. Nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com moléculas de estreptavidina, moléculas de avidina ou semelhante, que reconhecem especificamente as moléculas de biotina;

em que o termo "superfície sensível ao calor" entende-se como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Um quarto aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para deteção visual de um analito como definido no segundo aspeto da invenção, compreendendo:

a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;

b. Uma fonte de luz externa;

c. Uma segunda molécula de reconhecimento em que a molécula é um anticorpo (anticorpo de deteção) capaz de reconhecer o analito alvo; e

d. Nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com ligação de anticorpos anti-Fc ao anticorpo de deteção;

em que o termo "superfície sensível ao calor" entende-se como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem. Numa forma de realização particular de qualquer dos aspetos da invenção, as moléculas de reconhecimento (biomoléculas de captura e de deteção) são seleccionadas a partir da lista consistindo em anticorpos, péptidos, enzimas, polissacáridos, ácidos nucleicos (DNAs, RNAs), aptâmeros ou péptidos ácidos nucleicos (PNAs), preferencialmente moléculas de DNA e anticorpos.

Em outra forma de realização de qualquer dos aspetos da invenção, a fonte de luz externa é um laser, em que o laser tem um comprimento de onda igual ao comprimento de onda do máximo da banda de plasmão de superfície da nanopartícula de metal.

Em outra forma de realização de qualquer dos dois aspetos da invenção, a nanopartícula de metal é seleccionada a partir da lista consistindo em:

- a. Nanopartículas de ouro;
- b. Nanopartículas de prata; ou
- c. Nanopartículas de cobre

A nanopartícula de metal é preferencialmente um nanoprisma de ouro triangular.



Em outra forma de realização de qualquer dos dois aspetos da invenção, a superfície do suporte compreende um papel sensível ao calor ou uma membrana de celulose, membrana de nitrato de celulose ou membrana de acetato de celulose. Preferencialmente, o papel sensível ao calor aderiu a um segundo suporte selecionado a partir da lista consistindo em vidro, silicone, cerâmica, poliestireno, membrana de celulose, membrana de nitrato de celulose ou membrana de acetato de celulose.

Um quinto aspeto da presente invenção refere-se à utilização de um biossensor de acordo com o primeiro aspeto da invenção para a deteção visual de um analito que compreende:

- a. Adicionar a amostra sempre que o analito a ser determinado está presente num suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) imobilizada neste;
- b. Incubação do suporte do passo a) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com a segunda molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de deteção);  
e
- c. Irradiação do suporte do passo b) com a fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração

experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Um sexto aspeto da invenção refere-se à utilização de um biossensor para deteção visual de um analito como definido no segundo aspeto da invenção, para a deteção de um analito que compreende:

- a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) imobilizado nesta;
- b. Incubação do suporte do passo a) com a segunda molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de deteção) opcionalmente marcada com uma marca;
- c. Incubação do suporte do passo b) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com uma biomolécula que reconhece especificamente a biomolécula de deteção ou a marca com que a biomolécula de deteção foi modificada; e
- d. Irradiação do suporte do passo c) com a fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Uma forma de realização preferida do sexto aspeto da invenção refere-se à utilização de um biossensor para a deteção de um analito que compreende:

- a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) aí imobilizada;
- b. Incubação do suporte do passo a) com uma segunda molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de deteção) marcada com pelo menos uma molécula de biotina;
- c. Incubação do suporte do passo b) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com estreptavidina; e
- d. Irradiação do suporte do passo c) com a fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" entende-se como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Outra forma de realização preferida do sexto aspeto da invenção refere-se à utilização de um biossensor para a deteção de um analito que compreende:

- a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) aí imobilizada;
- b. Incubação do suporte do passo a) com uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) que será um anticorpo;
- c. Incubação do suporte do passo b) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com um anticorpo anti-Fc; e
- d. Irradiação do suporte do passo c) com a fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Um sétimo aspeto da invenção refere-se à utilização de um biossensor como definido no primeiro aspeto da invenção para a deteção de um analito que compreende:

- a. A adição a uma amostra na qual o analito a ser determinado está presente nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície

funcionalizada com a segunda molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de deteção);

b. Extração do analito ligado às nanopartículas a partir da amostra do passo a) preferencialmente através de um processo de centrifugação;

c. Adição da extração do passo b) a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) aí immobilizada;

d. Irradiação do suporte do passo c) com a fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Um oitavo aspeto da presente invenção refere-se à utilização de um biossensor de acordo com qualquer dos aspectos ou formas de realização anteriores para a deteção de aditivos, fármacos, microrganismos patogénicos, componentes alimentares, pesticidas, compostos tóxicos ou na análise da necessidade bioquímica de oxigénio.

### **Breve Descrição das Figuras**

**Figura 1** mostra o diagrama do sistema de reconhecimento da presente invenção.

**Figura 2:** Figura 2a mostra reconhecimento de nanoprismas CEA + anticorpo anti-CEA 3C6. Figura 2b mostra o reconhecimento de nanoprismas de anticorpo anti-CEA-biotina 3C6 + estreptavidina.

**Figura 3:** Figura 3a mostra anticorpo anti-CEA 3C1 + reconhecimento de nanoprismas CEA + anticorpo anti-CEA 3C6. Figura 3b mostra o reconhecimento de nanoprismas de anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA+ de anticorpo anti-CEA-biotina 3C6 + estreptavidina.

**Figura 4** mostra o reconhecimento de nanopartículas de ouro anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA+ anticorpo anti-CEA 3C6.

**Figura 5** mostra o reconhecimento de nanoprismas de anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA + anticorpo anti-CEA 3C6-ouro com diferentes tempos de irradiação e diferentes distâncias entre a superfície e o laser. A Figura 5a mostra o tempo de irradiação de 10 segundos a uma maior distância. A Figura 5b mostra o tempo de tempo de irradiação de 2 segundos a uma distância mais curta.

**Figura 6:** mostra anticorpo anti-CEA 3C1 + reconhecimento de nanoprismas CEA + anticorpo anti-CEA 3C6 (em tampão PBS e amostras de plasma sanguíneo).

**Figura 7** mostra o reconhecimento do anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA + anticorpo anti-CEA 3C6-nanoprismas de ouro em amostras de plasma sanguíneo e detecção através de câmara de infravermelhos.

**Figura 8** mostra os três diagramas do esquema do biossensor descrito na Exemplo 5.

### Descrição da Invenção

A presente invenção refere-se a um biossensor compreendendo (i) uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo; (ii) um suporte com uma superfície sensível ao calor; (iii) uma fonte de luz externa; (iv) uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de detecção) capaz de reconhecer o analito alvo e (v) uma nanopartícula de metal possuindo a banda de plasmão de superfície, caracterizada por o analito ser visualmente detetado pela alteração de cor nas áreas do suporte onde o analito está presente, produzido como um resultado do calor gerado pelas nanopartículas de metal quando estas são irradiadas com a fonte de luz externa.

O biossensor da presente invenção utiliza as propriedades de conversão de luz em calor das nanopartículas de metal como um sistema de transdução de sinal. A base para utilizar este sistema como uma etiqueta em biossensores é devido à presença da banda de absorção de superfície de plasmão. Estas bandas de absorção são produzidas quando a frequência da luz que atinge a nanopartícula está em ressonância com a frequência de oscilação colectiva dos electrões na banda de condução de partícula, que causa excitação. Este fenómeno é conhecido como "ressonância de plasmão de superfície localizada" (LSPR). A posição no espectro da banda de ressonância depende grandemente da forma da partícula, do tamanho e da estrutura (oco ou sólido), assim como no meio dieléctrico em que a partícula se encontra. A LSPR leva a coeficientes de extinção molar elevados ( $\sim 3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), com uma eficiência equivalente a 106 moléculas de fluoróforo e um aumento significativo no campo eléctrico local próximo da nanopartícula.

As nanopartículas de metal tais como nanopartículas de ouro, prata ou cobre têm este efeito de ressonância de plasmão de superfície. Quando irradiado com uma elevada intensidade de fonte de luz externa com uma frequência adequada, tal como um laser, estas partículas são capazes de libertar parte da energia absorvida na forma de calor, causando um aumento localizado da temperatura na sua superfície.

Esta produção de calor controlada é a base do novo sistema de deteção que foi desenvolvido. Este calor produzido causa uma alteração perceptível numa superfície adequadamente selecionada sensível ao calor. Neste sentido, os inventores da presente invenção descobriram que, surpreendentemente, um limite de deteção da ordem dos picogramas é obtido nas experiências conduzidas utilizando a alteração de cor nas áreas de suporte em que o analito está presente, produzida pelas nanopartículas de metal quando estas são irradiadas com a fonte de luz externa como meio de deteção. Deste modo, o Exemplo 4 da presente invenção ilustra como um limite de deteção foi obtido utilizando a deteção visual da presente invenção, possuindo o referido limite uma ordem inferior, e deste modo uma maior sensibilidade, do que a conseguida nas experiências conduzidas utilizando uma câmara de infravermelhos como meio de deteção. Este surpreendente resultado levou ao desenvolvimento de um biossensor possuindo as seguintes características : (i) elevada sensibilidade, (ii) elevada seletividade ou especificidade, uma vez que o biossensor interage exclusivamente com o analito de interesse e não com outros analitos possuindo propriedades semelhantes; (iii) elevada fiabilidade uma vez que não existirão problemas de ruído no sistema de transdução devido à amostra a ser analisada; (iv) baixo custo de produção; (v) tempo de análise curto que permite realizar acções se



necessário; (vi) o pré-tratamento da amostra é desnecessário, que leva à poupança de tempo, material e reagentes; (vii) a simples manipulação de modo a que não seja necessário pessoal qualificado para utilizar o biossensor; (viii) capacidade para realizar as análises em tempo real, e (ix) portátil para permitir a realização de análises *in situ*.

Deste modo, um primeiro aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para deteção visual de um analito compreendendo:

- a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo, imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;
- b. Uma fonte de luz externa; e
- c. Uma nanopartícula de metal possuindo a banda de plasmão de superfície funcionalizada com a segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) capaz de reconhecer o analito alvo;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Deve ser dada ênfase ao facto de que no contexto da presente invenção a deteção visual se entende como qualquer deteção que pode ser distinguida a olho nu sem necessidade de utilizar

qualquer tipo de instrumentação para detecção tal como uma câmara de infravermelho.

No contexto da presente invenção, a fonte de luz externa entende-se como qualquer fonte de radiação eletromagnética com energia entre 380 nm e 1100 nm, com a capacidade de causar excitação da banda LSPR das partículas de metal com base nas de ouro, prata, cobre ou qualquer das suas ligas ou estados oxidados, preferencialmente no intervalo do infravermelho próximo (entre 750 e 1100 nm) porque a absorção de energia pelas biomoléculas interferentes presentes na amostra que absorvem no intervalo do espectro visível (hemoglobina, etc.) não ocorre nesse intervalo de energia. A fonte de luz externa pode ser uma fonte de luz monocromática ou policromática, preferencialmente uma fonte de luz monocromática.

No contexto da presente invenção, nanopartícula de metal possuindo a banda de plasmão de superfície entende-se como qualquer agrupamento mono- ou policristalino de átomos de metal em qualquer dos seus estados de oxidação, ou qualquer das suas ligas, possuindo todos dimensões geométricas entre 1 e 1000 nm, preferencialmente entre 1 e 200 nm. Numa forma de realização preferida da invenção, os referidos átomos de metal são metais nobres. Numa forma de realização mais preferida da invenção, os referidos átomos de metal são átomos de ouro, prata ou cobre. Ainda numa forma de realização mais preferida da invenção, estes são átomos tubulares ou triangulares de ouro ou prata.

No contexto da presente invenção, a molécula de reconhecimento ou biomolécula de captura entende-se como qualquer

molécula capaz de reconhecer especificamente um analito específico em qualquer tipo de interacção química ou biológica.

No contexto da presente invenção, a segunda molécula de reconhecimento ou biomolécula de deteção entende-se como qualquer molécula capaz de reconhecer especificamente um analito específico em qualquer tipo de interacção química ou biológica.

As moléculas utilizadas como elementos de reconhecimento nos biossensores da presente invenção devem ter uma afinidade suficientemente selectiva para reconhecer um analito específico na presença de outros compostos, em adição a serem estáveis ao longo do tempo e conservarem a sua estrutura e a sua atividade biológica uma vez immobilizados no suporte e na superfície das nanopartículas.

Anticorpos, péptidos, enzimas, proteínas, polissacáridos, ácidos nucleicos (DNAs), aptâmeros ou péptidos ácidos nucleicos (PNAs) podem ser utilizados como moléculas de reconhecimento no sistema desenvolvido.

Na maioria dos casos, os biorrecetores mais amplamente utilizados são ácidos nucleicos, anticorpos ou fragmentos de anticorpo, sendo os anticorpos ou fragmentos de anticorpo que levaram ao maior número de técnicas úteis em diagnóstico. A razão reside na flexibilidade do sistema imunitário produzir uma quantidade virtualmente ilimitada de anticorpos com diferentes seletividades e uma elevada afinidade para o seu antigénio correspondente. Atualmente, é possível obter anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpo de virtualmente qualquer molécula independentemente do tamanho. Por outro lado, uma das vantagens oferecidas pelos anticorpos é a homogeneidade estrutural

destas proteínas, que é independente da sua especificidade. Isto permite padronizar métodos relacionados com a utilização destes como reagentes imunoquímicos, tais como a sua conservação ou imobilização à superfície do transdutor. Os fragmentos de anticorpo (Fab ou fragmento Fv de cadeia única) que preservam a sua estrutura e a capacidade de reconhecimento do seu antigénio, assim como anticorpos recombinantes, tais como a segunda geração de anticorpos monoclonais ou minicorpos, podem ser preparados como moléculas de reconhecimento através da utilização de técnicas de biologia molecular.

Por outro lado, os aptâmeros são moléculas que podem substituir anticorpos em certas aplicações devido ao seu pequeno tamanho e baixa imunogenicidade. Os aptâmeros são ácidos nucleicos de cadeia simples possuindo formas tridimensionais bem definidas que lhes permitem a ligação à molécula alvo de uma maneira semelhante à dos anticorpos. Os aptâmeros combinam as características óptimas de pequenas moléculas (baixa imunogenicidade, elevada difusão, etc.) e de anticorpos (elevada especificidade e afinidade, e estabilidade química). Outra vantagem no que respeita aos anticorpos monoclonais é que estes são quimicamente sintetizados em vez de serem biologicamente expressos.

Os ácidos nucleicos são capazes de detetar variações numa base única numa sequência complementar de DNA. Estes podem ser utilizados em processos de sequenciação de genes, análise de expressão de genes e na deteção de mutações de DNA e alterações associadas com doenças específicas, uma vez que é possível construir sinteticamente sequências de nucleótidos correspondentes à estrutura dos genes previamente identificados. Actualmente, a

sua utilização está a ser substituída por cadeias de PNA porque estas têm uma maior estabilidade biológica (contra a degradação por várias enzimas) e estabilidade química (mais resistente a variações no pH ou força iónica). Além disso, uma vez que ao contrário do DNA estes não contêm unidades de 2'-desoxi-D-ribose nem ligações fosfodiéster, têm uma estrutura neutral que reduz a repulsa electrostática durante a hibridação, estabelecendo ligações mais fortes; possuindo adicionalmente uma adsorção não específica.

O elemento de reconhecimento (biomolécula de captura) do sensor será normalmente imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor por retenção física dentro de uma matriz (captura), adsorção física na matriz através de interacções iónicas ou hidrofóbicas, ou ligação através de ligação covalente.

Neste sentido, no contexto da presente invenção, suporte com uma superfície sensível ao calor entende-se como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem. O papel térmico que leva ao desenvolvimento de sinal após estar sujeito a um aumento de temperatura devido à sua sensibilidade ao calor, será preferencialmente utilizado como a superfície sensível ao calor. O papel térmico é considerado como qualquer papel possuindo uma camada térmica que incorpora um corante, um sensibilizador e um agente de desenvolvimento de cor (independentemente dos componentes químicos com que foi preparado) capazes de reagir uns com os outros produzindo uma imagem após ter sido sujeito a um aumento de temperatura. Em outras formas de realização preferidas, qualquer polímero smart que, após estar sujeito a um estímulo externos tal como mudança de temperatura, leva a uma resposta nas

propriedades do polímero tais como: contração, curva, alteração de cor, alteração de estado, luminescência, etc., será utilizado como a superfície sensível ao calor. Os tipos de polímeros sensíveis à temperatura incluem: PNIPAM, poli(N-isopropilacrilamida), poli(N-vinilpiperidina) ou poli(N-vinilcaprolactama).

Num forma de realização da invenção, o suporte com uma superfície sensível ao calor do sistema compreende pelo menos um suporte sensível ao calor em que o reconhecimento molecular ocorre, tal como uma membrana feita de celulose ou seus derivados (nitrato de celulose, acetato de celulose, etc) ou papel sensível ao calor.

Em outra forma de realização da invenção, o suporte com uma superfície sensível ao calor do sistema compreende dois suportes. Um primeiro suporte em que a biomolécula de captura será imobilizada, e o referido suporte é uma membrana feita de celulose ou seus derivados (nitrato de celulose, acetato de celulose, etc), ou outros materiais tais como poliestireno, cerâmica, sílica ou vidro. Um segundo suporte consistindo numa superfície sensível ao calor que levará ao desenvolvimento de sinal depois de estar sujeito a um aumento de temperatura vai aderir a este primeiro suporte.

Um segundo aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para deteção visual de um analito compreendendo:

- a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;

- b. Uma fonte de luz externa;
- c. Uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) capaz de reconhecer o analito alvo, opcionalmente ligado a uma molécula marca; e
- d. Nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com biomoléculas que reconhecem especificamente a biomolécula de deteção ou a molécula marca com que a biomolécula de deteção foi modificada;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem. Note-se de novo que a deteção visual se entende como qualquer deteção que pode ser distinguido a olho nu sem necessidade de utilizar qualquer tipo de instrumentação para deteção tal como uma câmara de infravermelhos. Deste modo, o biossensor do segundo aspeto da invenção não compreende qualquer tipo de instrumentação capaz de detetar luz para conversão por calor das nanopartículas de metal quando estas são irradiadas com a fonte de luz externa.

No contexto da presente invenção as moléculas marca são entendidas como as moléculas que são reconhecidas por afinidade para um tipo de interação ligando-proteína ou para reconhecimento molecular por hibridação entre as cadeias de ácido nucleico. No primeiro caso, entende-se que a biomolécula de deteção é modificada com um antigénio, hormona, vitamina, tag poli-histidina, ou domínios de lectina, entre outros. É deste modo entendido que os

NPs são funcionalizados com anticorpos, aptâmeros, recetores, proteínas de ligação, ácidos tricarbóxicos modificados com iões de metal divalente, ou açúcares capazes de interagir especificamente com a marca da biomolécula de deteção, respetivamente. No segundo caso entende-se que a biomolécula de deteção e as NP de ouro são funcionalizadas com cadeias complementares de ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente (ácido desoxirribonucleico ou DNA, ácido ribonucleico ou RNA) ou ácidos nucleicos artificiais (péptido ácido nucleico ou PNA, morfólinas, etc.) ou combinações destes (DNA-DNA, PNA-DNA, DNA-PNA, PNA-PNA, etc).

Um terceiro aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para deteção visual de um analito como definido no segundo aspeto da invenção, compreendendo:

- a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;
- b. Uma fonte de luz externa;
- c. Uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) capaz de reconhecer o analito alvo, ligados a uma ou várias moléculas de biotina; e
- d. Nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com moléculas de estreptavidina, moléculas de avidina ou



semelhantes, que reconhecem especificamente as moléculas de biotina;

em que o termo "superfície sensível ao calor" entende-se como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

Um quarto aspeto da presente invenção refere-se a um biossensor para deteção visual de um analito como definido no segundo aspeto da invenção, compreendendo:

- a. Uma molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) capaz de reconhecer o analito alvo imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;
- b. Uma fonte de luz externa;
- c. Uma segunda molécula de reconhecimento em que a molécula é um anticorpo (anticorpo de deteção) capaz de reconhecer o analito alvo; e
- d. Nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com ligação de anticorpos anti-Fc ao anticorpo de deteção;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

O dispositivo proposto é um sistema de reconhecimento tipo "sanduiche", entre uma molécula de "reconhecimento", biomolécula de captura (se for uma proteína tal como um anticorpo, uma sonda de DNA, sonda PNA, etc.), immobilizados no suporte em que o reconhecimento do analito ocorre, e uma segunda molécula de deteção, biomolécula de deteção, (um segunda anticorpo, ou uma sonda complementar de DNA) ligada à superfície da nanopartícula de metal, direta ou indirectamente através do leitor de proteína e/ou da marca. Ao funcionalizar os suportes e as nanopartículas com as correspondentes moléculas de reconhecimento, vários analitos podem ser detetados seguindo a mesma estratégia.

Adicionalmente, do segundo ao quarto aspectos, a presente invenção refere-se especificamente a um sistema de deteção universal. De facto, de acordo com o terceiro aspeto da invenção verifica-se como utilizando a deteção de biomoléculas marcadas com biotina e funcionalizando as nanopartículas de metal com estreptavidina, as mesmas nanopartículas conjugadas com esta proteína podem ser utilizadas para diferente reconhecimento do analito com base na interação avidina-biotina, evitando deste modo ter de preparar o conjugado de deteção nanopartícula-biomolécula para cada analito a ser determinado. Outros exemplos serão o quarto aspeto da invenção, em que um sistema de deteção com base na funcionalização das nanopartículas de metal com um anticorpo anti-Fc capaz de reconhecer a região Fc de quaisquer outros anticorpos pode utilizar as mesmas nanopartículas para diferente reconhecimento de analito, desde que a biomolécula de deteção deste sistema seja um anticorpo.

Deste modo, o dispositivo da presente invenção permite a análise múltipla de amostras num único ensaio com um limite de sensibilidade na ordem dos picogramas.

Numa forma de realização da presente invenção meramente ilustrativa, a deteção de um analito numa amostra específica pode ser efectuada por imobilização da molécula de reconhecimento (biomolécula de captura) num primeiro passo num suporte, por exemplo numa membrana de nitrato de celulose. Depois, é efetuado um segundo passo por adição da amostra na qual o analito a ser determinado está presente ao suporte, deixando tempo suficiente para que ocorra o reconhecimento antigénio-anticorpo. Finalmente, num terceiro passo, o suporte é incubado com as nanopartículas funcionalizadas com a segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção). Após reconhecimento molecular, o suporte é colocado numa superfície sensível ao calor, desde que o suporte não tenha já uma superfície sensível ao calor, para ser irradiado com a fonte de luz externa, por exemplo um laser que emite no infravermelho próximo, sendo assim o analito detetado.

No caso do segundo ao quarto aspeto da presente invenção, o ensaio consiste num passo adicional. Por exemplo, no caso de utilização do dispositivo como definido no terceiro aspeto da invenção, no terceiro passo o suporte é incubado com uma solução da molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção), por exemplo um anticorpo secundário marcado com biotina. Após realizar as lavagens correspondentes, é realizado um quarto passo de incubação com as nanopartículas funcionalizadas com estreptavidina, para finalmente irradiar o suporte com o laser emissor uma vez, as nanopartículas em excesso são removidas por lavagem do referido suporte.

No caso do quarto aspeto da invenção em que a nanopartícula foi funcionalizada com anticorpos anti-Fc após o passo de incubação com a amostra, para capturar o analito a ser determinado, é realizado um terceiro passo de incubação com um anticorpo como uma biomolécula de deteção. Após realizar as correspondentes lavagens, num quarto passo as nanopartículas funcionalizadas com o anticorpo anti-Fc são adicionadas, para finalmente irradiar o suporte com o laser emissor uma vez, o referido suporte é lavado.

Uma possibilidade para melhorar o limite de deteção do biossensor da presente invenção consiste em realizar primeiro o reconhecimento do reconhecimento do analito na amostra por adição das nanopartículas funcionalizadas directamente na amostra. Deste modo, quando ocorre o reconhecimento antigénio-anticorpo, o analito com as nanopartículas pode ser extraído através de centrifugação. Este passo permite a concentração do analito independentemente do volume de amostra e permite extrair o analito dos restantes componentes da amostra em que se encontra. O resto do método será realizado da mesma maneira descrita acima, assim que as nanopartículas com o analito são recuperadas, estas são incubadas com a superfície sensível onde a molécula de reconhecimento foi imobilizada.

Deste modo, com biossensor descrito com base nas propriedades das nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície como o sistema de transdução (no efeito da ressonância de plasmão à superfície), é possível detetar vários analitos directamente numa amostra rapidamente e selectivamente em muito baixas concentrações, na ordem dos picogramas.

Adicionalmente, os últimos dois aspetos da presente invenção referem-se especificamente a um sistema de deteção universal. De facto, de acordo com estes aspetos da invenção pode ser verificado como utilizando biomoléculas de deteção marcadas com biotina e funcionalizando as nanopartículas de metal com estreptavidina, as mesmas nanopartículas conjugadas com esta proteína podem ser utilizadas para reconhecimento de diferentes analitos com base na interacção avidina-biotina, evitando assim ter de preparar o conjugado nanopartícula-biomolécula de deteção para cada analito a ser determinado. O sistema de deteção com base na funcionalização das nanopartículas de metal com um anticorpo anti-Fc capaz de reconhecer a região Fc de qualquer dos outros anticorpos pode utilizar as mesmas nanopartículas para reconhecimento de diferentes analitos, desde que a biomolécula de deteção deste sistema é um anticorpo.

Além disso, a presente invenção refere-se aos seguintes métodos de deteção de analito.

(1) Método para a deteção de um analito que compreende:

a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) aí immobilizada;

b. Incubação do suporte do passo a) com nanopartículas de metal com uma banda de

plasmão de superfície funcionalizada com uma segunda molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de detecção);

c. Irradiação do suporte do passo b) ou c) com a fonte de luz externa; e

e. Detecção do analito utilizando um termófilo capaz de detetar conversão de luz em calor das nanopartículas de metal quando estas são irradiadas com a fonte de luz externa.

(2) Método para a detecção de um analito que compreende:

a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) aí imobilizada;

b. Incubação do suporte do passo a) com uma segunda molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de detecção) ligada a pelo menos uma molécula marca;

c. Incubação do suporte do passo b) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com pelo menos uma molécula que se liga especificamente à marca;

d. Irradiação do suporte do passo c) ou d) com a fonte de luz externa; e

e. Detecção do analito utilizando um termófilo capaz de detetar conversão de luz em calor das nanopartículas de metal quando estas são irradiadas com a fonte de luz externa.

Numa forma de realização preferida do método indicado acima, a molécula marca é biotina e a molécula que se liga especificamente à marca é avidina ou estreptavidina ou a molécula marca é avidina ou estreptavidina e a molécula que se liga especificamente à marca é biotina.

(3) Método para a deteção de um analito que compreende:

- a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) aí immobilizada;
- b. Incubação do suporte do passo a) com uma segunda molécula de reconhecimento (biomolécula de deteção) que é a anticorpo de deteção;
- c. Incubação do suporte do passo b) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão

de superfície funcionalizada com anticorpos anti-Fc;

d. Irradiação do suporte do passo c) com a fonte de luz externa e

e. Detecção do analito utilizando um termófilo capaz de detetar conversão de luz em calor das nanopartículas de metal quando estas são irradiadas com a fonte de luz externa.

(4) Método para a deteção de um analito que compreende:

a. A adição a uma amostra na qual o analito a ser determinado está presente, de nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com a segunda molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de deteção);

b. Extração do analito com as nanopartículas a partir da amostra do passo a);

c. Adição da extração do passo b a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito (biomolécula de captura) aí imobilizada;

e. Irradiação do suporte do passo c) com a fonte de luz externa; e

f. Detecção do analito utilizando um termófilo capaz de detetar conversão de luz em calor das nanopartículas de metal quando estas são irradiadas com a fonte de luz externa.



Os biossensores da presente invenção podem ser utilizados mas sem qualquer limitação para a deteção de aditivos, fármacos, microrganismos patogénicos, componentes alimentares, pesticidas, compostos tóxicos ou na análise da necessidade bioquímica de oxigénio. Os biossensores da presente invenção podem ser utilizados para a deteção de qualquer tipo de analito qualitativamente e quantitativamente.

Os exemplos que se seguem servem para meramente ilustrar a presente invenção.

### **Exemplos**

#### **Exemplo 1: Síntese de nanopartículas de metal**

- Síntese de nanopartículas de ouro: A síntese de nanopartículas de ouro foi efectuada seguindo o método descrito por Turkevich *et al.* "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold", *Discussions of the Faraday Society* 1951, 11, 55-75. De acordo com este método, 200 mL de uma solução de ácido tetracloroáurico a 0,01% em água é aquecido a 100°C sob agitação, e 5 ml de um citrato de trissódico a 1% são subsequentemente adicionadas como um agente de redução. Quando se formam as nanopartículas, a solução corada de vermelho é deixada sob agitação atingindo a temperatura ambiente. São obtidas as nanopartículas de ouro esféricas possuindo um diâmetro de 14-16 nm com uma banda de plasmão de superfície a 519 nm.

- Síntese de nanoprismas triangulares de ouro:

A síntese de nanoprismas triangulares de ouro foi efetuada seguindo o método descrito por Pelaz *et al.* "Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications", *Langmuir* 2012, 28, 8965-70. De acordo com este método, 100 ml de uma solução de ácido tetracloroáurico a 2 mM é misturada com 120 ml de uma solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 0,5 mM, deixando-a em agitação durante 9 minutos, depois foi efectuada a segunda adição de um volume entre 20-50 ml da solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 0,5 mM. São obtidos nanotriângulos de ouro possuindo um tamanho compreendido entre 100-160 nm com a banda de plasmão de superfície entre 750-1075 nm. Antes de os conjugar com diferentes biomoléculas, os nanoprismas devem ser passivados através da ligação com polietilenoglicol (HS-PEG-COOH, 5000 g/mol). Para esse fim, 10 ml da solução de nanoprisma são incubados com 1 mg de PEG numa solução de NaOH, pH 12, durante a noite. Finalmente, estes nanoprismas são centrifugados durante 15 minutos a 10 000 rpm para remover os reagentes em excesso.

- Síntese de nanoprismas triangulares de prata:

A síntese foi efetuada seguindo o método descrito por Zhang, Q *et al.*, "A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a "Magic" reagent?", *Journal of the American Chemical Society* 2011, 133 (46), 18931-18939. De acordo com este método, 24,14 mL de água Milli Q são adicionados a uma solução aquosa de nitrato de prata (0,05 M, 50 uL), citrato trissódico (75 mM, 0,5 mL), e peróxido de hidrogénio (30% pt, 60 uL) e são misturados por agitação vigorosa à temperatura ambiente. Finalmente, uma solução de boro-hidreto (NaBH<sub>4</sub>, 100 mM, 250 uL) é rapidamente adicionado

para formar estes nanoprismas. Após cerca de 3 minutos, a solução coloidal muda de uma cor amarelo escuro devido à formação de pequenas partículas de prata para uma cor azulada produzida pelos nanoprismas finais. São obtidos nanotriângulos de prata de 70 nm possuindo a banda de plasmão de superfície a 700 nm.

- Síntese de nanocubos de cobre: A síntese foi efetuada seguindo o método descrito por Murphy *et al.* "Solution-phase synthesis of Cu<sub>2</sub>O nanocubes", *Nano Letters* 2002, 3 (2), 231-234. De acordo com este método, 0,25 mL de uma solução aquosa de CuSO<sub>4</sub> são adicionadas a 9 mL de uma solução aquosa de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) com uma concentração variável de 0,01-0,1 M. A seguir, 0,5 mL de uma solução de ascorbato de sódio a 0,1 M são adicionados à solução Cu(II)-CTAB. As soluções foram aquecidas durante 5 minutos a 55 °C. uma vez passado este tempo, 0,2 mL de hidróxido de sódio a 0,5 M são adicionados, causando o aparecimento imediato de uma cor amarela na solução. As soluções são mantidas a 55 °C durante 10 minutos e são deixadas arrefecer à temperatura ambiente. Após 30 minutos, as soluções viram para uma cor castanho avermelhado, amarelo claro ou amarelo escuro dependendo da concentração de CTAB utilizada. As partículas são centrifugadas a 6000 rpm durante 15 minutos e são depois ressuspensas em água. Este processo é repetido duas vezes para remover o tensioativo. Nesta altura os nanocubos em solução têm uma cor vermelho tijolo em todos os casos. São obtidos nanocubos de cobre com um tamanho de cerca de 420 nm, com diferentes alterações na sua geometria de acordo com a quantidade do tensioativo CTAB utilizado na síntese.

### **Exemplo 2: Funcionalização de nanopartículas de metal**

Diferentes tipos de nanopartículas sintetizadas com vários elementos de reconhecimento tais como anticorpos, DNA ou PNA foram funcionalizados para pôr a presente invenção em prática. Alguns exemplos de funcionalização são descritos a seguir.

- Funcionalização de nanoprismas triangulares de ouro com anticorpos: A funcionalização foi efetuada imobilizando o anticorpo nos grupos carboxilos presentes à superfície da nanopartícula através da química carbodiimida. Primeiro 0,5 mg de nanopartículas são ativadas com 1,5  $\mu$ moles de EDC e 3,5  $\mu$ moles de sulfo-NHS num volume final de 1 ml de 10 mM de MES, pH 6, durante 30 minutos a 37 °C. Os reagentes em excesso podem ser removidos por centrifugação a 6000 rpm durante 5 minutos, após os quais as partículas são suspensas em 10 mM de MES, pH 6, ou através da utilização de colunas de filtração em gel. Quando os grupos carboxilo das nanopartículas são ativados, estes são incubados com 2,5  $\mu$ g de anticorpo num volume final de 1 ml de 10 mM de MES, pH 6, durante 1 hora a 37 °C. Após a ligação do anticorpo, a superfície da nanopartícula é bloqueada com 50 mM de PEG aminado de 750 Da ( $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -aminopoli(etilenoglicol)). Finalmente, as nanopartículas são purificadas após vários ciclos de centrifugação a 6000 rpm durante 5 minutos.

- Funcionalização de nanoprismas triangulares de ouro com estreptavidina: A funcionalização foi efetuada imobilizando as moléculas de estreptavidina nos grupos

carboxilo presentes à superfície da nanopartícula através da química das carbodiimidas. Primeiro 0,5 mg de nanopartículas são ativadas com 1,5 umoles de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e 3,5 umoles de sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisuccinimida) num volume final de 1 ml de 10 mM de MES, pH 6, durante 30 minutos a 37 °C. Os reagentes em excesso podem ser removidos por centrifugação a 6000 rpm durante 5 minutos, depois das partículas serem suspensas em 10 mM de MES, pH 6, ou através da utilização de uma coluna de filtração em gel. Quando os grupos carboxilo das nanopartículas são ativados, estes são incubados com 1,25 µg de estreptavidina num volume final de 1 mL de 10 mM de MES, pH 6, durante 1 hora a 37 °C. Após a ligação da proteína, a superfície da nanopartícula é bloqueada com 50 mM de 750 Da PEG aminado ( $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -aminopolietilenoglicol). Finalmente, as nanopartículas são purificadas após vários ciclos de centrifugação a 6000 rpm durante 5 minutos.

**Exemplo 3: Detecção do marcador CEA numa amostra utilizando o biossensor da presente invenção.**

Quando os nanoprismas de ouro são sintetizados e caracterizados (ambos por microscopia electrónica de varrimento por transmissão e por espectroscopia ultravioleta-visível), estes foram funcionalizados com anticorpo monoclonal anti-CEAs, Ab3C6 (Monoclonal de murganho anti- antigénio carcinoembrionário 4CA30-3C6, HyTest) e também com a proteína estreptavidina. Para verificar que as moléculas imobilizadas nos nanoprismas mantinham a sua atividade biológica, a biomolécula correspondente foi imobilizada em diferentes concentrações (o marcador CEA ou o anticorpo conjugado com biotina) numa membrana de nitrocelulose; após

incubar com as nanopartículas funcionalizadas as membranas depositadas à superfície sensível ao calor foram irradiadas com o laser.

O reconhecimento de nanoprismas CEA + anticorpo 3C6 anti-CEA é ilustrada na Figura 2a. O reconhecimento do anticorpo anti-CEA 3C6-Biotina + Estreptavidina-nanoprismas é ilustrado na Figura 2b.

Quando o reconhecimento molecular ocorre, os nanoprismas de ouro são localizados na membrana, e após serem irradiados com o laser, a energia absorvida pelas nanopartículas é libertada na forma de calor, sendo registado um sinal na superfície sensível ao calor (ver Figuras 2a e 2b). Em ambos os casos, os sinais obtidos após irradiação das amostras com o laser indicaram que o reconhecimento antigénio-anticorpo ou estreptavidina-biotina ocorreu, e deste modo as biomoléculas conjugadas com nanoprismas mantiveram a sua atividade. Por outro lado, ambas as superfícies nas quais ocorreu o reconhecimento e a superfície da nanopartícula tinham sido passivadas de modo a que as interações não específicas não ocorrem quando não existe proteína imobilizada na membrana de nitrocelulose, como pode ser observado na amostra 0.

O elemento de reconhecimento do sensor, neste caso, o anticorpo anti-CEA Ab3C1, Monoclonal de murganho anti-antigénio carcinoembrionário 4CA30-3C1, HyTest, foi imobilizado na superfície sensora seguindo várias metodologias. Ligaram-se a superfícies de vidro através de ligações covalentes assim como através de adsorção física em diferentes membranas de celulose e de nitrocelulose. Os resultados obtidos utilizando membranas de

nitrocelulose com o anticorpo adsorvido à superfície são a seguir apresentados. As duas estratégias acima descritas foram testadas; os nanoprismas funcionalizados diretamente com o anticorpo foram utilizados e os nanoprismas funcionalizados com estreptavidina após adição do anticorpo anti-CEA 3C6 conjugado com biotina foram utilizados. Diferentes amostras com uma concentração decrescente do marcador de tumor CEA diluído em PBS foram analisadas. Após realizar os passos de reconhecimento descrito no método experimental e depois das membranas secarem, estas foram depositadas à superfície sensível ao calor, neste caso em papel térmico, a ser irradiado durante alguns segundos com um laser que emite no infravermelho próximo (com um comprimento de onda de 1000 nm).

O reconhecimento do anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA + anticorpo anti-CEA 3C6-Nanoprismas está ilustrado na Figura 3a. O reconhecimento do anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA + anticorpo anti-CEA 3C6-Biotina + Estreptavidina-Nanoprismas está ilustrado na Figura 3b.

Como pode ser observado nas figuras anteriores, o sinal produzido na superfície sensível ao calor produzido por irradiação dos nanoprismas quando o reconhecimento do analito ocorre é mais intenso para o sistema de anticorpo 3C1-CEA-Ab3C6-nanoprisma do que para o sistema do anticorpo 3C1-CEA-Ab3C6 Biotina-Streptavidina-nanoprisma de ouro. No entanto, uma concentração de 0,5 ng de CEA/ml é detectada em ambos os casos. Por outro lado, como um controlo negativo, verificou-se que quando a mesma experiência é realizada utilizando nanopartículas de ouro esféricas de 16 nm de diâmetro funcionalizadas com anticorpo anti-CEA 3C6 (que não tem uma banda de absorção no comprimento de onda

de emissão do laser utilizado), não foi obtido sinal, como apresentado na Figura 4 (ver Figura 4 em que o reconhecimento do anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA+ anticorpo anti-CEA 3C6-nanopartículas de ouro é apresentado, em que foram utilizadas as nanopartículas de ouro esféricas de 16 nm de diâmetro que não têm uma banda de absorção no comprimento de onda de emissão do laser utilizado).

Para melhorar a sensibilidade do método, diferentes parâmetros tais como o tempo de irradiação da amostra com o laser e a distância do referido laser da superfície sensora, pode ser variada. A Figura 5 mostra como para uma distância mais pequena entre o laser e a superfície, menos tempo de irradiação é necessário e é obtido um sinal mais intenso.

A Figura 5 ilustra o reconhecimento do anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA + anti-CEA Ab 3C6-nanoprismas de ouro com diferentes tempos de irradiação e diferentes distâncias entre a superfície e o laser. Um tempo de irradiação de 10 segundos a uma distância de 0,5 cm é utilizado na Figura 5a; um tempo de irradiação de 2 segundos a 0,1 cm é utilizado na Figura 5b.

Finalmente, a mesma experiência do tipo "sanduíche" (Ab3C1 + CEA + Ab3C6-nanoprismas de ouro) foi efetuada para detetar o marcador de tumor CEA em amostras de plasma de sangue para verificar a especificidade do sistema assim como o limite de deteção do analito numa amostra complexa. Foi comparada com os resultados obtidos para a determinação de CEA dissolvido em tampão PBS. Um limite de deteção de 10 pg de CEA/ml foi obtido em ambos os casos, como pode ser observado na Figura 6. Além disso, não foi



obtido nenhum tipo de interação não específica no controlo ou na amostra de plasma sem CEA.

**Exemplo 4. Exemplo comparativo utilizando uma câmara de infravermelhos como meio de deteção**

As mesmas amostras preparadas para o Exemplo 3 foram utilizadas para esta experiência. O elemento de reconhecimento do sensor, neste caso, o anticorpo anti-CEA Ab3C1, foi imobilizado através de adsorção física numa membrana de nitrocelulose. Diferentes amostras com uma concentração decrescente de marcador de tumor CEA diluído em plasma sanguíneo foram então analisadas. Após realizar os passos de reconhecimento através das nanopartículas funcionalizada com o anticorpo anti-CEA Ab3C6 descrito no método experimental e quando as amostras foram secas, estas foram depositadas em papel térmico.

Um laser que emite no infravermelho próximo a um comprimento de onda de 1000 nm foi utilizado para irradiação das nanopartículas. Uma câmara de imagem térmica de infravermelhos (câmara IR), capaz de transformar o calor produzido pelas nanopartículas irradiadas numa medição quantificável foi utilizada como um sistema para detetar o calor produzido pelas nanopartículas após terem sido irradiadas com o laser.

O aumento de temperatura foi verificado com a câmara IR após irradiação das amostras preparadas para detecção de diferentes concentrações do antigénio CEA de plasma do sangue. Após ter sido irradiado durante alguns segundos com o laser, a câmara IR registou um aumento de temperatura de 2-3°C para a amostra de 0,05 ng CEA/ml, mas não foi obtido sinal no caso da

amostra de 0,01 ng CEA/ml. Para estas mesmas concentrações de analito foi detetado um sinal no caso do papel térmico depois das amostras terem sido irradiadas com o laser.

Foi obtido um limite de detecção inferior através de detecção visual utilizando o suporte com superfície sensível ao calor tal como o papel térmico do que quando se utilizou a câmara de infravermelhos como meio de detecção.

A Figura 7 compara o reconhecimento do anticorpo anti-CEA 3C1 + CEA + anti-CEA Ab 3C6-nanoprismas de ouro da detecção visual através de papel térmico (Figura 7a) e da câmara IR como o sistema de detecção (Figura 7b).

#### **Exemplo 5. Experiências de detecção com termófilos:**

Neste caso, o calor produzido pelas nanopartículas após terem sido irradiadas pelo laser foi medida através de um termófilo capaz de transformar o aumento de temperatura produzido numa área específica à volta deste num sinal elétrico quantificável.

Com o esquema descrito na Figura 8, (co uma potência de 350 mW) ambas as amostras concentradas e diluídas foram irradiadas com o laser na membrana e na lamela de vidro. O primeiro problema que foi encontrado é que se o laser atinge diretamente a pilha, é obtido um sinal de ruído muito elevado (de modo que foi necessário aumentar a temperatura até ser distinguível do sinal do ruído).

Uma resposta é também obtida se apenas a membrana ou a lamela sem nanopartículas é irradiada (o vidro produz um sinal

mais elevado do que a membrana de nitrocelulose). Uma resposta semelhante à do controlo foi obtida com a amostra diluída, embora o aumento de temperatura possa ser perfeitamente medido com a amostra concentrada. Deve ser tido em conta que neste esquema a amostra estava a 3-4 cm de distância do laser, de modo que a sensibilidade vai diminuir mais do que se for directamente em contacto com o laser.

A calibração com diferentes concentrações de nanopartículas depositadas na membrana de nitrocelulose para os esquemas apresentados na Figura 8, os diagramas 2 e 3, foi tentada. No caso do diagrama 2, os resultados não foram obtidos porque a amostra não podia ser irradiado numa forma reprodutível com o laser nessa posição. A experiência foi efetuada com o esquema indicado no diagrama 3.

Três soluções de 140 µg/ml, 14 µg/ml e 1,4 µg/ml de NNs foram preparadas e 1 µl de cada foi depositada em membranas de nitrocelulose (140 ng, 14 ng e 1,4 ng de NNs →  $6 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^8$  e  $6 \times 10^7$  nanopartículas). Estas foram irradiadas com o laser durante alguns segundos e a leitura foi realizada com o termófilo antes e depois de colocar a amostra. O sinal de ruído foi recuperado entre amostras. Um sinal que foi de algum modo superior ao sinal de ruído foi registado para a solução mais diluída (1,4 ng de NNs); um claramente distinguível foi obtido com a amostra de 14 ng; a amostra mais concentrada produziu um sinal muito elevado. Para uma calibração que encaixa num intervalo linear, uma série de soluções de baixa concentração tinham de ser utilizadas porque após um certo valor de concentração, um aumento de temperatura exponencial é obtido com a concentração de nanopartículas.

Lisboa, 25 de julho de 2017

## Reivindicações

1. Biossensor para deteção visual compreendendo:

a. Uma molécula de reconhecimento capaz de reconhecer o analito alvo, imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;

b. Uma fonte de luz externa; e

d. Uma nanopartícula de metal possuindo a banda de plasmão de superfície funcionalizada com a segunda molécula de reconhecimento capaz de reconhecer o analito alvo;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

2. Biossensor para deteção visual compreendendo:

a. Uma molécula de reconhecimento capaz de reconhecer o analito alvo imobilizado num suporte com uma superfície sensível ao calor;

b. Uma fonte de luz externa;

c. Uma segunda molécula de reconhecimento capaz de reconhecer o analito alvo, opcionalmente ligado a uma molécula marca; e

e. Nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com biomoléculas que reconhecem especificamente a biomolécula de deteção ou a marca com que a biomolécula de deteção foi modificada;

em que o termo "superfície sensível ao calor" entende-se como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

3. Biossensor de acordo com a reivindicação 2, em que a molécula marca é biotina e a molécula que se liga especificamente à marca é avidina ou estreptavidina ou em que a molécula marca é avidina ou estreptavidina e a molécula de ligação à marca é biotina.

4. Biossensor de acordo com a reivindicação 2, em que a segunda molécula de reconhecimento é um anticorpo e a nanopartícula de metal possuindo a banda de plasmão de superfície é funcionalizada com um anticorpo anti-Fc capaz de reconhecer a região Fc da segunda molécula de reconhecimento.

5. Biossensor de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que as moléculas de reconhecimento são selecionadas a partir da lista consistindo em anticorpos, péptidos, enzimas, polissacáridos, ácidos nucleicos (DNAs), aptâmeros ou péptidos ácidos nucleicos (PNAs).

6. Biossensor de acordo com reivindicação 5, em que as moléculas de reconhecimento são anticorpos, DNAs ou PNAs.

7. Biossensor de acordo com as reivindicações 1-6, em que a fonte de luz externa é uma luz monocromática.

8. Biossensor de acordo com as reivindicações 1-7, em que a nanopartícula de metal é selecionada a partir da lista consistindo em:

- a. Nanopartículas de Ouro
- b. Nanopartículas de prata; ou
- c. Nanopartículas de cobre.

9. Biossensor de acordo com a reivindicação 8, em que a nanopartícula de metal é um nanoprisma triangular de ouro.

10. Biossensor de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que a superfície sensível ao calor do suporte é um papel sensível ao calor.

11. Biossensor de acordo com a reivindicação 10, em que papel sensível ao calor é combinado com um suporte selecionado a partir da lista consistindo em vidro, sílica, cerâmica, poliestireno, membrana de celulose, membrana de nitrato de celulose ou membrana de acetato de celulose.

12. Método para a deteção de um analito que compreende:

a. Adicionar a amostra em que o analito a ser determinado está presente, a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito aí imobilizada;

b. Incubar o suporte do passo a) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com a segunda molécula de reconhecimento do analito; e

c. Irradiação do suporte do passo b) com uma fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar uma alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

13. Método para a detecção de um analito que compreende:

a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito aí imobilizada;

b. Incubação do suporte do passo a) com uma segunda molécula de reconhecimento do analito ligado a pelo menos uma molécula marca;

c. Incubação do suporte do passo b) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com pelo menos uma molécula que se liga especificamente à marca; e



d. Irradiação do suporte do passo c) com uma fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

14. Método de acordo com reivindicação 13, em que a molécula marca é biotina e a molécula que se liga especificamente à marca é avidina ou estreptavidina ou em que a molécula marca é avidina ou estreptavidina e a molécula que se liga especificamente à marca é biotina.

15. Método para a deteção de um analito, que compreende:

a. Adicionar a amostra na qual o analito a ser determinado está presente a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito aí imobilizada;

b. Incubação do suporte do passo a) com uma segunda molécula de reconhecimento que é um anticorpo de deteção;

c. Incubação do suporte do passo b) com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com anticorpos anti-Fc; e

e. Irradiação do suporte do passo c) com uma fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

16. Método para a deteção de um analito, que compreende:

a. Uma adição a uma amostra na qual o analito a ser determinado está presente com nanopartículas de metal com uma banda de plasmão de superfície funcionalizada com a segunda molécula de reconhecimento do analito;

b. Extração do analito com as nanopartículas a partir da amostra do passo a);

c. Adição da extração do passo b) a um suporte com uma superfície sensível ao calor com a molécula de reconhecimento do analito aí imobilizada;

d. Irradiação do suporte do passo c) com a fonte de luz externa;

em que o termo "superfície sensível ao calor" se entende como qualquer superfície capaz de experimentar a alteração experimental quando aquecida, resultando em desenvolvimento de imagem.

17. Utilização de um biossensor de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 11 para a deteção de aditivos, fármacos, microrganismos patogénicos, componentes alimentares, pesticidas,

compostos tóxicos ou na análise da necessidade bioquímica de oxigénio.

Lisboa, 25 de julho de 2017

Figura 1

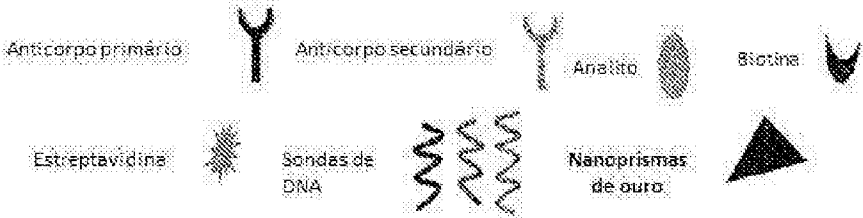
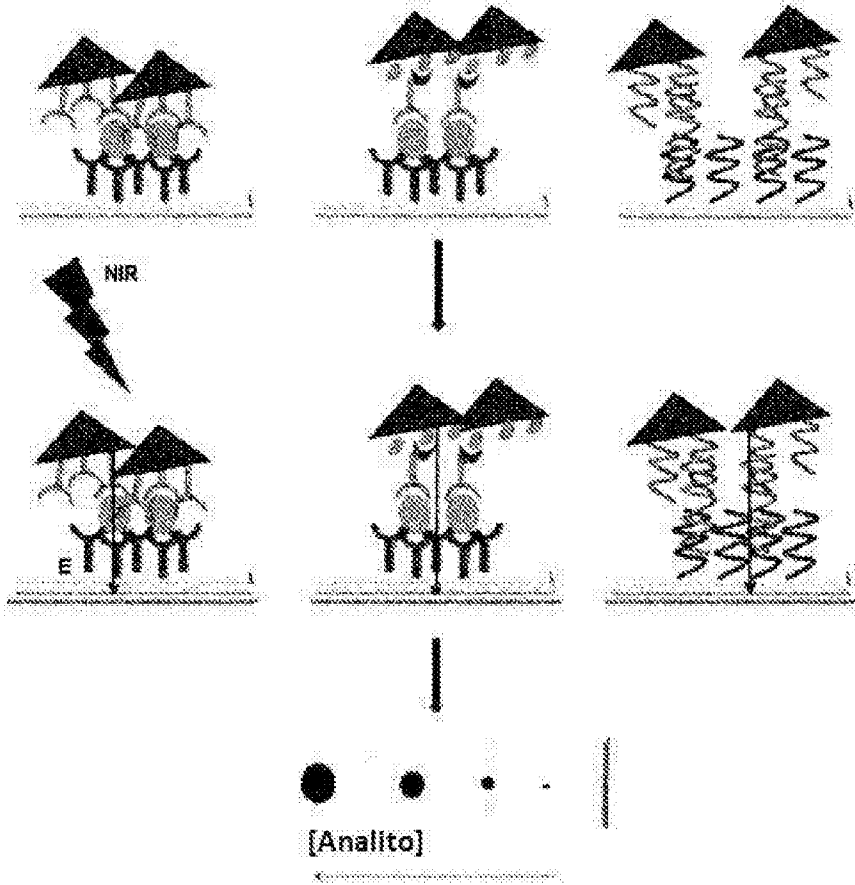


Figura 2

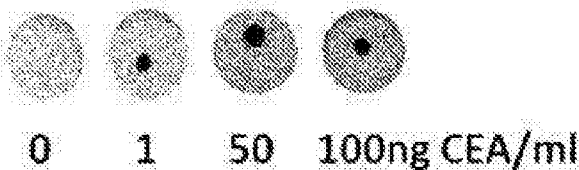


Figura 2a

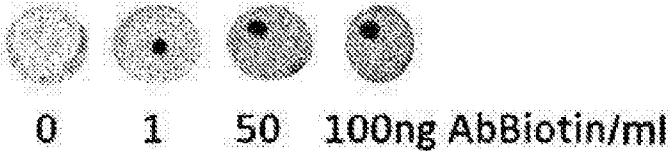


Figura 2b

Figura 3

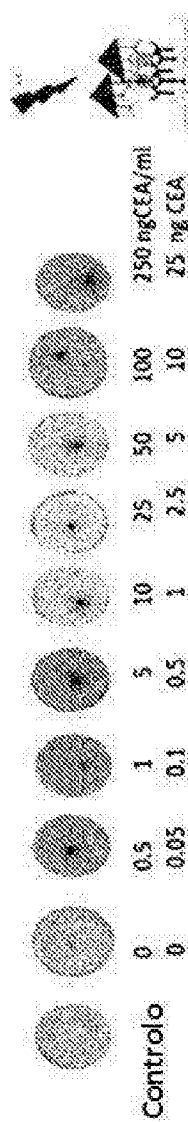


Figura 3a

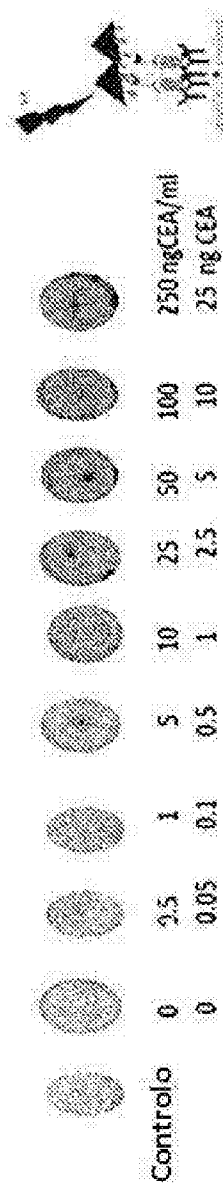


Figura 3b

Figura 4

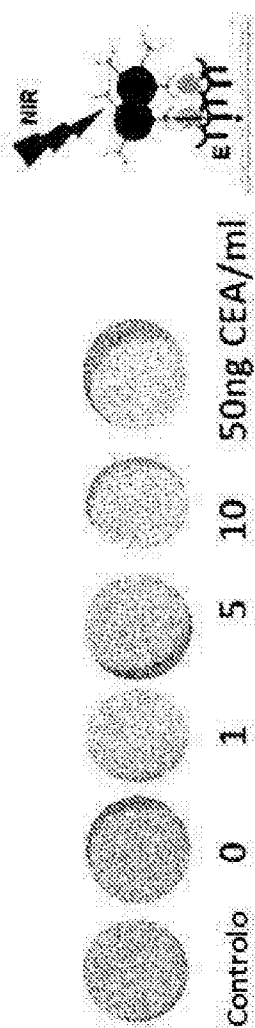




Figura 5

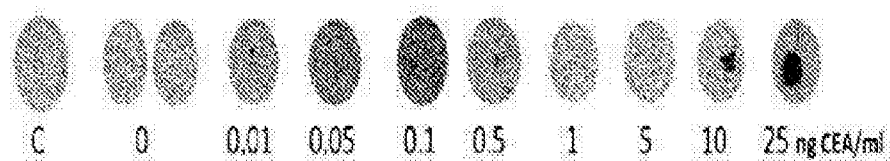


Figura 5a

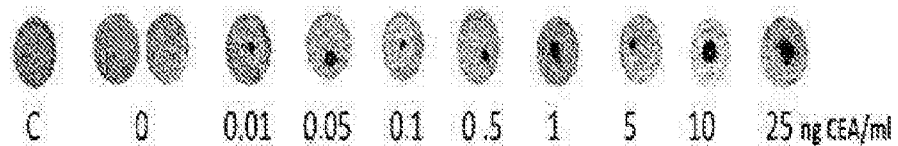


Figura 5b

Figura 6

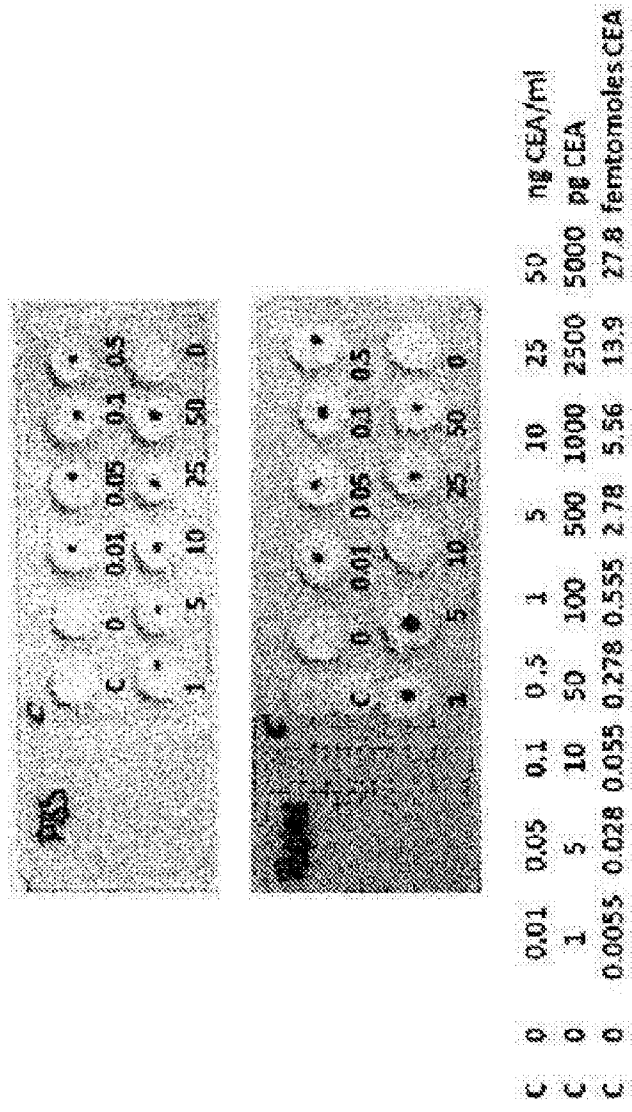


Figura 7

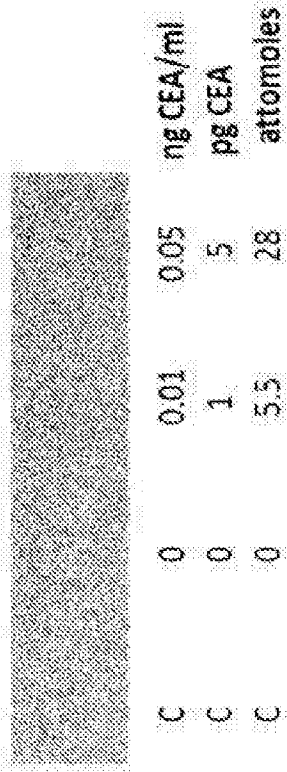
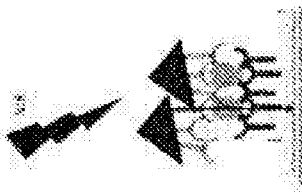


Figura 7a

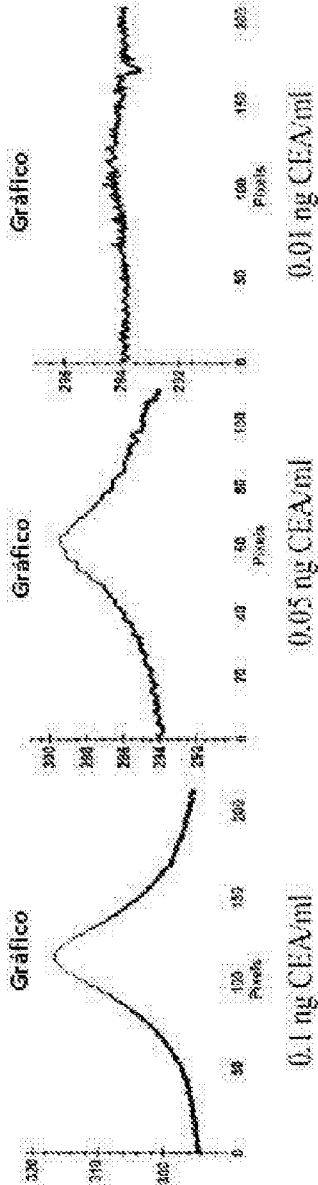
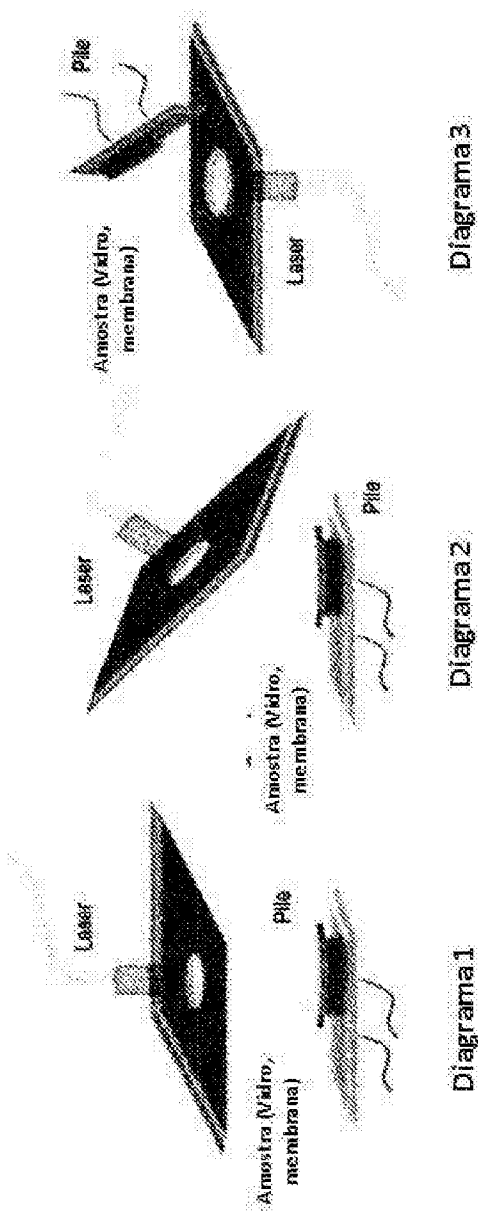


Figura 7b

Figure 8



**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Literatura de não patentes citada na Descrição**

**HAES AJ et al.** Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, vol. 127 (7), 2264-2271

**TURKEVICH et al.** A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 1951, vol. 11, 55-75

**PELAZ et al.** Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications. *Langmuir*, 2012, vol. 28, 8965-70

**ZHANG, Q et al.** A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: Is citrate a "Magic" reagent?. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol.133 (46), 18931-18939

**MURPHY et al.** Solution-phase synthesis of Cu<sub>2</sub>O nanocubes. *Nano Letters*, 2002, vol. 3 (2), 231-234