



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

**(21) BR 102015024226-3 A2**

**(22) Data do Depósito:** 21/09/2015

**(43) Data da Publicação:** 28/03/2017



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

**(54) Título:** REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA

**(51) Int. Cl.:** G01N 33/50; C12Q 1/00

**(73) Titular(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**(72) Inventor(es):** LÍLIAN VANESSA ROSSA BELTRAMI; CÉLIA DE FRAGA Malfatti; ELIENA JONKO BIRRIEL; FRANK PATRICK MISSELL

**(57) Resumo:** REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA. A presente invenção descreve um revestimento híbrido formado por precursores alcoóxidos à silanos destinado a ser utilizado em biossensores para detecção de bactérias em meios líquidos, como soro fisiológico, leite, sucos, etc. A aplicação do revestimento sobre a superfície magnetoelástica forma um sistema protegido contra corrosão. O invento tem ampla utilização na área da saúde, biomédica, laboratorial e farmacêutica, bem como na área ambiental, para controle de microrganismos em solos, água e efluentes.

REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOSENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA

**Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve um revestimento híbrido formado por precursores alcoóxidos (silanos) destinado a ser utilizado em biossensores para detecção de bactérias em meios líquidos, como soro fisiológico, leite, sucos, etc. A aplicação do revestimento sobre a superfície magnetoelástica forma um sistema protegido contra corrosão. O invento tem ampla utilização na área da saúde, biomédica, laboratorial e farmacêutica, bem como na área ambiental, para controle de microrganismos em solos, água e efluentes.

**Antecedentes da Invenção**

**[0002]** Ligas magnetoelásticas, compostas por FeNiMoB, são amplamente utilizadas como plataforma para biossensores de carregamento de massa para detecção de microrganismos. Esta liga é extremamente suscetível à corrosão, necessitando de um recobrimento que a proteja, normalmente camadas de cromo e de ouro. São aqui revelados revestimentos híbridos a base de precursores silanos que protegem esta liga do meio corrosivo, substituindo as camadas metálicas convencionalmente utilizadas. Os revestimentos híbridos são obtidos facilmente pelo método sol-gel e são aplicados sobre a superfície da liga através do processo *dip-coating*, que garante o recobrimento completo do substrato por uma camada homogênea e compacta.

**[0003]** Os biossensores são empregados para substituir métodos convencionais, como coleta e cultivo de culturas, permitindo uma avaliação mais rápida e remota.

**[0004]** O princípio de funcionamento do biossensor, se baseia na alteração de massa devido a presença de microrganismos aderidos na superfície do mesmo quando o meio líquido está contaminado. Esta alteração na massa do sistema provoca uma variação na frequência de ressonância que

é detectada remotamente por um equipamento indicando que o meio líquido testado está contaminado.

**[0005]** Para a manutenção dos biossensores no meio líquido por longos períodos de tempo, se propõe o uso do revestimento híbrido de precursores alcoóxidos à base de silanos objeto do presente invento, que é produzido e aplicado em condições normais de temperatura e pressão, de forma rápida e com baixo custo, além de não ser tóxico nem potencialmente poluente.

**[0006]** Os revestimentos atualmente utilizados são formados por finas camadas de cromo e de ouro, aplicadas pelo método de *sputtering*. O método *sputtering* além de ser um processo que exige infraestrutura relativamente complexa e de custo de instalação elevado, também não possibilita a aplicação simultânea do revestimento nas duas faces da fita magnetoelástica, aumentando, dessa forma, o tempo para o processo de produção do biossensor.

**[0007]** Além disso, o processo de *sputtering* não garante o recobrimento das laterais da fita, comprometendo dessa forma a resistência à corrosão do biossensor quando em contato com meio agressivo, já que a liga magnetoelástica empregada, composta por Fe, Ni, Mo e B, não oferece resistência apreciável à corrosão. Dessa forma, quando o biossensor é colocado em contato com o meio de ensaio (normalmente com potencial corrosivo ao substrato), a face da fita sem proteção é rapidamente atacada e iniciando um processo corrosivo irreversível. Esse processo corrosivo compromete a vida útil do biossensor e os resultados obtidos, uma vez o produto de corrosão produzido pode interferir nos resultados obtidos.

**[0008]** No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes, que estão descritos a seguir, mas sem antecipar a presente invenção.

**[0009]** Pedido de patente ES2208121 A1, 29/11/2002, "Anticuerpos y antígenos inmovilizados sobre partículas magnéticas de sílice como biossensores". Esta patente indica a utilização de partículas de ferro em pó, enquanto que no presente invento utiliza-se como plataforma uma liga magnetoelástica a base de ferro, níquel, molibdênio e boro. Outra diferença é

que nesta patente as partículas de ferro são tratadas com  $\gamma$ -aminopropiltriethoxissilano dissolvido em tolueno e acetona. No presente trabalho sugere-se a utilização de dois silanos (tetraethoxissilano e 1,2-Bi(triethoxissilil)etano) dissolvidos em etanol e água.

**[0010]** Pedido US2002/0068157 A1, 06/06/2002, "PRODUCTS WITH BIOFUNCTIONAL COATING". Esta patente descreve um revestimento biofuncional a partir de um hidrogel formado por um polímero hidrófilo sintético, de preferência um selecionado a partir do grupo de poli (álcool vinílico), poli (hidroxietilacrilato), poli (hidroxietil-metacrilato), poli[Tris (hidroximetil) metilacrilamida], poli (etileno-óxido), poli (1-vinil-2-pirrolidona) e poli (dimetilacrilamida), ou os seus copolímeros. O presente invento propõe a utilização de revestimentos a partir de sol-gel formados por silanos (tetraethoxissilano e 1,2-Bi(triethoxissilil)etano) a fim de proteger a liga magnetoelástica e ancorar o elemento de bio-reconhecimento em um biossensor.

**[0011]** Pedido de patente US2011/0140208 A1, 16/06/2011, "FABRICATION PROCESS OF A BIOSENSOR ON A SEMICONDUCTOR SUBSTRATE". Esta patente apresenta um biossensor à base de um óxido metálico semiconductor complementar (CMOS) revestido com 3-Aminopropiltriethoxissilane. O presente invento propõe a utilização de revestimentos a partir de sol-gel formados por silanos (tetraethoxissilano e 1,2-Bi(triethoxissilil)etano) a fim de proteger a liga magnetoelástica, a base de ferro, níquel, molibdênio e boro, e ancorar o elemento de bio-reconhecimento em um biossensor.

**[0012]** Pedido de patente US2011/0237464 A1, 24/09/2011, "GUIDED MODE RESONANT FILTER BIOSENSOR USING A LINEAR GRATING SURFACE STRUCTURE". O biossensor proposto nesta patente é composto por um material de baixo índice de refração (vidro, plástico, polímero, ou epóxi) revestido por um material de alto índice de refração (sulfureto de zinco, dióxido de titânio, óxido de índio e estanho, óxido de tântalo, e nitreto de silício). Ele funciona a partir de um sistema de detecção que compreende um biossensor,

uma fonte de luz que dirige a luz para o biossensor, e um detector, que detecta a luz refletida a partir do biossensor. O presente invento propõe a utilização de revestimentos a partir de sol-gel formados por silanos (tetraetoxissilano e 1,2-Bi(trietoxissilil)etano) a fim de proteger a liga magnetoelástica, a base de ferro, níquel, molibdênio e boro, e ancorar o elemento de bio-reconhecimento em um biossensor. O funcionamento do biossensor proposto neste trabalho é baseado na exposição do biossensor a um campo magnético oscilante produzido por uma bobina excitadora. Este campo faz com que o a plataforma magnetoelástica do biossensor produza vibrações longitudinais elásticas. Com isso, o biossensor produz um fluxo magnético resultante, com uma frequência de ressonância específica, que pode ser detectada remotamente.

**[0013]** Pedido de patente WO2004/048603 A2, 10/06/2004, "Coatings". Esta patente apresenta um dispositivo formado por um substrato condutor elétrico recoberto por um revestimento desenvolvido pelo método sol-gel com materiais biológicos. O revestimento é aplicado sobre o substrato utilizando-se o método de variação de potencial elétrico. O presente trabalho propõe um revestimento desenvolvido pelo método sol-gel, porém aplicado sobre o substrato pelo método *dip-coating*. Além disso, o substrato utilizado neste invento é uma liga magnetoelástica (amorfa). O biossensor desenvolvido com estes elementos um método de detecção remoto, baseado na variação da frequência de ressonância do biossensor, não necessitando de contato e conexões elétricas.

**[0014]** Pedido WO2007/115541 A2, 18/10/2007, "Method for producing surface structures and element having a surface structure for use in biosensors or for the production of cell guiding structures". Esta patente apresenta o processo para produção de uma superfície específica para ancoragem de macromoléculas para utilização em biossensores. O revestimento proposto é composto por carbono amorfo, bombardeado por íons, por meio de laser ou feixe de elétrons. O presente invento propõe um revestimento desenvolvido pelo método sol-gel, a base de silanos (tetraetoxissilano e 1,2-

Bi(trietoxissilil)etano), aplicado sobre o substrato metálico pelo método *dip-coating*.

**[0015]** Pedido de patente PI0518455-0 A2, 05/10/2005, “Biossensores para medição de produto de análise em fluido e respectivos métodos de medição da concentração do produto de análise”. Esta patente apresenta o desenvolvimento de biossensores para medição de produto de análise em fluidos e respectivos métodos de medição da concentração do produto de análise. Os biossensores compreendem pelo menos um eletrodo que compreende material de carbono de filme fino, semicondutor ou condutor, e um mediador de elétrons, que compreende um mediador de elétrons que contém rutênio ou um material de ferricianeto ou ácido carboxílico ferroceno.

O presente invento propõe a utilização de revestimentos a partir de sol-gel formados por silanos (tetraetoxissilano e 1,2-Bi(trietoxissilil)etano) a fim de proteger a liga magnetoelástica, a base de ferro, níquel, molibdênio e boro, e ancorar o elemento de bio-reconhecimento em um biossensor. O funcionamento do biossensor proposto neste trabalho é baseado na exposição do biossensor a um campo magnético oscilante produzido por uma bobina excitadora. Este campo faz com que a plataforma magnetoelástica do biossensor produza vibrações longitudinais elásticas. Com isso, o biossensor produz um fluxo magnético resultante, com uma frequência de ressonância específica, que pode ser detectada remotamente.

**[0016]** Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos apresentados na presente invenção, em sua simplicidade e disposição inovadora, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

**[0017]** A presente invenção compreende um revestimento híbrido desenvolvido a partir de precursores alcoóxidos à base de silanos

tetraetoxissilano (TEOS) ou 1,2-Bi(trietoxissilil)etano (BTSE), obtidos a partir do processo sol-gel.

**[0018]** Em um aspecto, os precursores alcoóxidos à base de silanos foram hidrolisados com etanol e água e permaneceram em descanso por um período (1 a 48 horas) para promover todas as reações de hidrólise.

**[0019]** Em outro aspecto, o revestimento híbrido é utilizado para revestir biossensores de carregamento de massa.

**[0020]** É um objeto da presente invenção um revestimento híbrido para uso como filme barreira protetivo sobre ligas magnetoelásticas.

**[0021]** Em uma concretização, os silanos utilizados são o tetraetoxissilano (TEOS) ou 1,2-Bi(trietoxissilil)etano (BTSE).

**[0022]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução a seguir.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0023]** A novidade apresentada é a substituição da camada de cromo e ouro, convencionalmente utilizada em biossensores de carregamento de massa, por um revestimento híbrido obtido a partir de precursores alcoóxidos a base de silanos. O revestimento híbrido foi desenvolvido a partir de precursores alcoóxidos à base dos silanos tetraetoxissilano (TEOS) ou 1,2-Bi(trietoxissilil)etano (BTSE), obtidos a partir do processo sol-gel. Este método consiste na preparação de um sol (solução) do precursor silano com etanol e água, a temperatura e pressão ambiente. Após um curto período de hidrólise (de 1 a 48 horas), o sol está pronto para ser aplicado sobre a liga magnetoelástica. Após depositar o filme sobre o substrato, através de técnicas apropriadas, este fica exposto ao ar (de 1 a 10 horas), dando início às reações de hidrólise e condensação. Após a secagem (cura) em estufa (60 a 200° C) por alguns minutos (de 30 a 180 min), forma-se uma rede (gel) sobre o substrato, sendo que esta rede formada é híbrida (orgânica e inorgânica). O

revestimento híbrido de precursores alcoóxicos à silanos aqui revelado é produzido e aplicado em condições normais de temperatura e pressão, de forma rápida e com baixo, além de não ser tóxico nem potencialmente poluente. Esses revestimentos têm por finalidade melhorar a resistência à corrosão de biossensores para detecção de microrganismos em meios líquidos. As vantagens dos revestimentos híbridos propostos em relação aos demais são a garantida proteção contra a corrosão e a facilidade e rapidez da aplicação destes sobre o substrato metálico.

**[0024]** Os revestimentos atualmente utilizados são formados por finas camadas de cromo e de ouro, aplicadas pelo método de *sputtering*, que além de exigir um alto valor agregado e tecnologia específica, não garante o recobrimento completo do substrato. Já os revestimentos híbridos propostos são aplicados utilizando-se um processo chamado de *dip-coating*. Este processo é conduzido à temperatura e pressão ambientes, com um equipamento simples e garante o recobrimento completo do substrato.

**[0025]** Os biossensores são empregados para substituir métodos convencionais, como coleta e cultivo de culturas, permitindo uma avaliação mais rápida e remota.

**[0026]** O princípio de funcionamento do biossensor, se baseia na alteração de massa devido a presença de microrganismos aderidos na superfície do mesmo quando o meio líquido está contaminado. Esta alteração na massa do sistema provoca uma variação na frequência de ressonância que é detectada remotamente por um equipamento indicando que o meio líquido testado está contaminado.

**[0027]** Esses biossensores são constituídos por uma fita magnetoelástica de uma liga de Fe, Ni, Mo e B e são inseridos em meios líquidos que podem ocasionar a corrosão dessa liga, considerando que a mesma não apresenta resistência à corrosão apreciável. A novidade descrita relata a aplicação de um revestimento híbrido sobre esses biossensores visando aumentar a vida útil dos mesmos e evitar o comprometimento dos resultados devido à corrosão da fita.



**[0028]** O revestimento híbrido revelado foi desenvolvido a partir de precursores alcoóxicos à base de silanos tetraetoxissilano (TEOS) ou 1,2-Bi(trietoxissilil)etano (BTSE), obtidos a partir do processo sol-gel. Para cada revestimento, o precursor alcoóxico à base de silano foi hidrolisado com etanol e água nas seguintes proporções mássicas: 10/15/15/60 para o revestimento TEOS/MAP/ÁGUA/ETANOL; e 5/40/55 para o revestimento BTSE/ÁGUA/ETANOL. No revestimento a base de TEOS é utilizado o 3-(Trimetoxissilil)propilmetacrilato (MAP) para melhorar as propriedades do filme formado. Os sols permanecem em descanso por um período (1 a 48 horas) para promover todas as reações de hidrólise. Após este período foi realizada a aplicação do sol sobre a superfície da liga magnetoelástica.

**[0029]** As amostras de liga magnetoelástica foram previamente limpas em uma solução de água e etanol (50/50) com aplicação de ultrassom (10 a 30 min) e, posteriormente, foram imersas em solução alcalina de hidróxido de sódio (0,01 M), a fim de promover a formação de hidroxilas livres em sua superfície.

**[0030]** Com as amostras devidamente preparadas, o sol foi aplicado utilizando-se o método de *dip-coating*. Utilizando o equipamento de *dip-coating*, aplicou-se uma camada do sol, com velocidades de entrada e retirada idênticas e constantes (5 a 30 mm/min) e com tempo de imersão da amostra específico para garantir a formação do filme (1 a 30 minutos). Após a aplicação do sol, as amostras permaneceram expostas ao ar (1 a 10 horas), em temperatura ambiente, para promover a secagem e a condensação do filme sobre o substrato. Em seguida, as amostras foram levadas à estufa (60° C a 200° C) para o processo de cura (30 a 180 min).

**[0031]** Ensaios de corrosão, como polarização potencioestática e espectroscopia de impedância eletroquímica, comprovaram que este revestimento híbrido aumenta a vida útil da amostra de liga magnetoelástica em meio potencialmente corrosivo, quando compara a amostra sem revestimento.

**[0032]** Em um aspecto, o revestimento híbrido de precursores alcoóxicos à base de silanos é produzido pelo método sol-gel. Este método consiste na preparação de um sol (solução) do precursor silano com etanol e água, a temperatura e pressão ambiente. Após um curto período de hidrólise (de 1 a 48 horas), o sol está pronto para ser aplicado sobre a liga magnetoelástica. Outra vantagem deste revestimento é o processo de aplicação, chamado de *dip-coating*.

**[0033]** Este processo necessita de um equipamento simples, igualmente chamado de *dip-coating*. Este processo também é conduzido à temperatura e pressão ambientes. A amostra da liga magnetoelástica é presa em uma haste do equipamento. Ao ser acionado, o equipamento baixa esta haste, com uma velocidade constante, e mergulha perpendicularmente a amostra na solução contendo os precursores silanos hidrolisados. Após um determinado tempo de imersão, a amostra é retirada com velocidade constante da solução. Este procedimento garante a formação de uma camada homogênea que recobre de forma eficiente e em uma única etapa as duas faces da amostra, assegurando uma proteção completa da amostra contra a corrosão.

**[0034]** Ensaios de corrosão comprovaram que este revestimento híbrido aumenta a vida útil da amostra de liga magnetoelástica em meios potencialmente corrosivos. Logo, o método de aplicação do revestimento híbrido é de transferência tecnológica mais fácil com simplificação da infraestrutura necessária comparativamente ao processo atualmente empregado.

**[0035]** Além disso, o revestimento híbrido a base de precursores silanos possui viabilidade microbiológica, pois não é tóxico e não impede o crescimento e proliferação dos microrganismos, uma vez que é necessário que os microrganismos (bactérias) se desenvolvam em sua superfície.

**[0036]** Todas estas características citadas demonstram que o revestimento híbrido proposto agrega um aumento na resistência a corrosão e garante a utilização do biossensor por tempos prolongados sem que haja qualquer dano ou comprometimento do sistema e dos resultados requeridos.

**[0037]** Em outro aspecto o revestimento híbrido pode ser utilizado como filmes barreira protetivo sobre a liga magnetoelástica, com o intuito principal de utilizá-la como plataforma para biossensor de carregamento de massa. Estes biossensores são utilizados para a detecção de microrganismos (bactérias) em meios sólidos e líquidos, tais como soro fisiológico, leite, sucos, etc.

**[0038]** Frente a isso, o invento proposto descreve a aplicação de um revestimento híbrido visando melhorar a resistência à corrosão e facilitar o processo de revestimento desses biossensores.

### Reivindicações

- 1) REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA, **caracterizado por** consistir essencialmente de um revestimento híbrido obtido a partir de precursores alcóxidos obtidos a partir do processo sol gel
- 2) REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** seu processo de obtenção compreender as seguintes etapas:
  - i) preparação de um sol do precursor silano com etanol e água a temperatura e pressão ambiente
  - ii) aguardar o período de hidrólise (de 1 a 48 horas)
  - iii) deposição do filme sobre o substrato por *dip-coating*
  - iv) após depositar o filme sobre o substrato, através de técnicas apropriadas, este fica exposto ao ar de 1 a 10 horas
  - v) secagem (cura) em estufa (60 a 200° C) por alguns minutos (de 30 a 180 min)
- 3) REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelo** seu processo de obtenção compreender amostras de liga magnetoelástica previamente limpas em etanol com aplicação de ultrassom e posteriormente, imersas em solução alcalina de hidróxido de sódio
- 4) REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA de acordo com as reivindicações 1 - 3, **caracterizado pelo** seu processo de obtenção compreender o sol ser aplicado utilizando-se o método de *dip-coating*, aplicando-se uma camada do sol, com velocidades de entrada e retirada idênticas e constantes e com tempo de

imersão da amostra específico para garantir a formação do filme (1 a 30 minutos)

5) REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA de acordo com as reivindicações 1 - 4, **caracterizado pelo** seu processo de obtenção compreender após a aplicação do sol, as amostras permaneceram expostas ao ar (1 a 10 horas), em temperatura ambiente, em seguida, levadas à estufa (60° C a 200° C) para o processo de cura (30 a 180 min)

6) REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOCENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA, **caracterizado por** ser obtido pelo método descrito nas reivindicações 1-5

### **Resumo**

REVESTIMENTO HÍBRIDO A BASE DE PRECURSORES SILANOS APLICADO SOBRE UMA LIGA MAGNETOELÁSTICA UTILIZADA COMO PLATAFORMA PARA BIOSSENSORES DE CARREGAMENTO DE MASSA

A presente invenção descreve um revestimento híbrido formado por precursores alcoóxidos à silanos destinado a ser utilizado em biossensores para detecção de bactérias em meios líquidos, como soro fisiológico, leite, sucos, etc. A aplicação do revestimento sobre a superfície magnetoelástica forma um sistema protegido contra corrosão. O invento tem ampla utilização na área da saúde, biomédica, laboratorial e farmacêutica, bem como na área ambiental, para controle de microrganismos em solos, água e efluentes.