



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019014824-1 A2



(22) Data do Depósito: 18/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 26/01/2021

(54) Título: MÉTODO DINÂMICO DE SENSORIAMENTO DE O₂ DISSOLVIDO E SISTEMA PARA MÉTODO

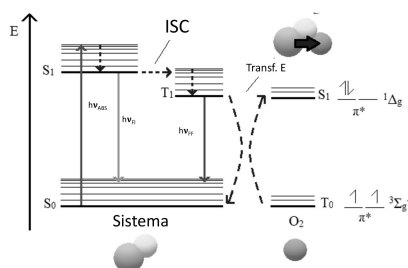
(51) Int. Cl.: G01N 31/22; G01J 3/44; G01N 21/64.

(52) CPC: G01N 31/225; G01J 3/4406; G01N 2021/6417; G01N 21/6408.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

(72) Inventor(es): TATIANA DUQUE MARTINS; GEOVANY ALBINO DE SOUZA.

(57) **Resumo:** A presente invenção trata de um método de sensoriamento sensível a quantidades distintas do gás oxigênio dissolvido em meios distintos, que utiliza um sistema fluorescente composto por nanoestruturas auto-organizadas de peptídeos, preferencialmente derivados da difenilalanina e dopados com um corante fluorescente derivado da cumarina, podendo ser usados em fase líquida ou estar sorvidos em um substrato transparente. O sistema de sensoriamento opera por meio da detecção do tempo de vida de fluorescência do sistema, registrando curvas de decaimento de fluorescência, de modo que o tratamento das curvas revele o tempo de vida de fluorescência na presença do analito. A eficiente interação do analito com o sistema causa uma alteração na resposta dinâmica do sistema que é correlacionada a variações mínimas de concentração de oxigênio. Concentrações da ordem de frações de nanomoles podem ser eficientemente detectadas. A resposta é registrada por espectrofluorímetro com resolução temporal que esteja disponível.



“MÉTODO DINÂMICO DE SENSORIAMENTO DE O₂ DISSOLVIDO E SISTEMA PARA MÉTODO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção trata de um método de sensoriamento sensível a quantidades distintas do gás oxigênio dissolvido em meios variados, que utiliza um sistema fluorescente composto por nanoestruturas auto-organizadas de peptídeos e dopados com um corante fluorescente derivado da cumarina, podendo ser usados em fase líquida ou estar sorvidos em um substrato transparente.

[002] No estado da técnica foram encontradas patentes que relatam sensores construídos a partir de modificações químicas de nanotubos de carbono, filmes poliméricos, clusters inorgânicos ou nanoestruturas metálicas, contendo corantes fluorescentes e até derivados de cumarina. No entanto, não foram encontradas patentes descrevendo sistemas luminescentes que empregassem nanoestruturas de peptídeos combinadas a fluoróforos orgânicos para qualquer uso. Também não foram encontradas patentes que operassem analisando as respostas dinâmicas da fluorescência quando na presença do gás. É sabido que o oxigênio do ar interage com moléculas orgânicas com alta afinidade quando essas se encontram no estado excitado, mas até o momento, as mudanças de comportamento dos estados eletrônicos excitados não foram aproveitadas para sensoriamento, o que consiste na grande inovação dessa invenção e no diferencial desse método. Ainda, esse Sistema tem o diferencial de ser de fácil obtenção, por meio de interação física entre um composto biológico auto-organizado com um corante orgânico, ambos biocompatíveis e que resultam em um material com propriedades fotofísicas distintas, em especial, bastante sensível à presença de oxigênio.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] O uso da fluorescência de diversos tipos de compostos como forma de detecção de uma diversidade de analitos é descrito no estado da técnica. Em

especial, sensores ópticos e fluorescentes de diferentes composições, que tem seu funcionamento baseado na resposta fluorescente fotoestacionária, ou seja, na observação da emissão de luz do sensor e qualquer alteração nela causada pela presença do analito de interesse, são descritos no estado técnica.

[004] Esse é o contexto de funcionamento da patente BR1020150206658, que diz respeito a um sistema orgânico que foi testado para registrar a resposta fluorescente fotoestacionária quando na presença de gás oxigênio. Em outras palavras, esse sensor se baseia na resposta visual, no registro da intensidade da luz verde –azulada emitida pelo sensor e na variação da intensidade dessa luz com a variação da concentração de O_2 no meio (ou seja, se trata de um sensor colorimétrico). Apesar de ela se referir a um sistema também de peptideo contendo cumarina, no entanto, de construção distinta, o tipo de sinal que se obtém é também bastante diferente. No sensor óptico há uma limitação no escopo da aplicação, uma vez que a determinação de O_2 , neste caso, deve ocorrer em água somente e, por se basear apenas na diminuição da intensidade da luz fluorescente, há limitação na sensibilidade do sensor. A presente invenção difere, portanto, dessa mencionada por se basear em técnica bastante distinta das empregadas em um sensor óptico, por ter seu fundamento conceitual também distinto, por analisar formas de interações que não são passíveis de ser acessadas por técnicas de determinação de fluorescência fotoestacionária e por explorar aspectos bastantes singulares das interações moleculares, como os que resultam da alteração do estado eletrônico excitado após interação molecular, devido a isso, por ampliar seu escopo de aplicação, aumentar consideravelmente sua sensibilidade e, portanto, se torna interessante para outros mercados.

[005] Esse sensor usa de técnicas de avaliação dos estados excitados que são mais avançadas e que estão dominando a área da espectroscopia de fluorescência. Foi possível verificar que este sensor é mais eficiente e sensível que sensores ópticos usuais por se basear no monitoramento da resposta dinâmica das alterações que a interação do sistema com o analito causa nas propriedades dos

estados eletrônicos excitados do sistema, ou seja, antes da desativação dos estados excitados do sistema e antes que qualquer emissão luminescente possa ocorrer a partir do sistema, o que permite ter informações sobre os fenômenos que ocorrem no estado eletrônico excitado. Deste modo, o sensor pode ser empregado em processos cuja quantidade de O_2 no meio seja bastante pequena, da ordem de 10^{-6} a 10^{-10} g/g de amostra e isso aumenta o espectro de aplicação do sensor, que pode ser desde o acompanhamento de reações químicas até o acompanhamento de variações de O_2 em processos celulares. Deste modo, esse método de sensoriamento apresenta a novidade de ser construído para ser analisado por espectroscopia de fluorescência com resolução temporal e a aplicação comercial em outros ramos, que os sensores ópticos convencionais não encontravam aplicação.

[006] É conhecido do estado da técnica que o tempo de vida do estado excitado contém informações que podem ser interpretadas em termos das interações de sistemas distintos, podendo ser usados para monitoramentos diversos. Ainda, o desenvolvimento de novas tecnologias é documentado em um grande número de patentes que se utilizam de determinações por meio de técnicas espectroscópicas resolvidas no tempo. Devido a essas características, métodos de acompanhamentos de processos biológicos, em escala molecular, baseados em interações dos estados eletrônicos excitados são bastante difundidos. Exemplos são encontrados na literatura científica e em bases de dados de patentes. Por exemplo, muitos sensores se baseiam na medida de um processo de transferência de energia ressonante, que ocorre envolvendo estados eletrônicos excitados, conhecido como FRET e esse fenômeno é explorado na maioria dos biossensores. Mas, geralmente, os biossensores assim produzidos se baseiam em interações em sítios pré-determinados, objetivando a complexação com targets específicos e são eficientes em certas aplicações, bastante dirigidas, tendo o sistema que ser alterado para ser utilizado para detecção ou em outro meio ou de outro analito. Eles são, portanto, altamente seletivos. Alguns utilizam a combinação de medidas de tempo

de vida e de detecção de luz emitida pelo sensor, como o caso dos documentos 10.4028/www.scientific.net/NHC.19.55 (Pillai, SS, et al. Quantum Dot-Peptide Nanoassembly on Mesoporous Silica Nanoparticle for Biosensing. NANO HYBRIDS AND COMPOSITES, 19, 55-72, 2018), 10.1177/1087057116680151 (Schaaf, TM. Et al. High-Throughput Spectral and Lifetime-Based FRET Screening in Living Cells to Identify Small-Molecule Effectors of SERCA. SLAS DISCOVERY, 22, 262-273, 2017.) e 10.1088/2050-6120/aa9e47 (Goryashchenko, AS. Detection of protease activity by fluorescent protein FRET sensors: from computer simulation to live cells. METHODS AND APPLICATIONS IN FLUORESCENCE 6 (2), 022001, 2018). Nesse último, os pontos quânticos (QDs) são potentes sondas luminescentes para a detecção de moléculas únicas e imagens de células vivas. Quando um QD se associa a um cromóforo ideal, que pode ser uma molécula fluorescente ou não-fluorescente, a luminescência do QD pode ser suprimida pela transferência de energia de ressonância de Forster (FRET) e esse efeito pode ser diferente quando a associação ocorre com diferentes compostos ou em diferentes proporções. Apesar do FRET ocorrer no estado eletrônico excitado, o efeito aqui detectado é de natureza fotoestacionária, ou seja, a diminuição ou aumento da intensidade de luminescência é que dá a medida do processo. Nesse tipo de sensor, o sensoriamento é, portanto, óptico e convencional, não sendo necessário conhecer o FRET e sua natureza para ter o dado quantitativo. Esse não é o caso da presente invenção, em que a curva de decaimento da fluorescência, que dá a medida de seu tempo de vida e, portanto, da duração do estado eletrônico excitado, é o dado a ser medido.

[007] Outro uso de determinação de tempo de vida de fluorescência é exemplificado no documento DE102012019471-A1, em que as características fluorescentes e de tempo de vida de fluorescência de certos compostos presentes em notas monetárias e em cartões são determinadas para identificar as notas e também evitar erros de fabricação. O uso de medidas de tempo de vida de fluorescência como forma de sensoriamento está se desenvolvendo rapidamente

devido ao advento de tecnologias cada vez mais especializadas, com grau de complexidade cada vez mais elevado. Por exemplo, microscopia de imageamento por tempo de vida de fluorescência (FLIM) tem sido aplicada ao imageamento de diversos processos moleculares. Por meio da técnica, é possível obter informações de distâncias de interações entre moléculas distintas e isso pode ser explorado para sensoriamento, como o do documento WO2012002886-A1, em que o FLIM é usado para acompanhamento de interações proteína-proteína e mapear parâmetros de cela, como pH, concentração de íons e de oxigênio. No entanto, o imageamento de tempo de vida, neste pedido de patente, apenas é usado para proporcionar uma análise mais rápida, enquanto executa o imageamento confocal. Valores de tempo de vida não são os dados que são efetivamente utilizados no sensoriamento. Além disso, a técnica do FLIM é uma técnica que não pode estar disponível para qualquer consumidor como empresas, clínicas de análises, hospitais ou instituições de ensino ou mesmo para o pesquisador individual, por ser muito específica e de muito alto custo, enquanto que espectrofluorímetros com resolução temporal tem se tornado mais acessíveis com o desenvolvimento da técnica de time-correlated single photon counting (TCSPC), o que utilizamos na presente invenção. O documento WO2011101628-A1 trata de um sensor para glicose no sangue, em que a detecção se dá por meio de uma técnica importante para análises de tempo de vida de fluorescência, o time-correlated single photon counting (TCSPC), mas ele não tem o funcionamento relacionado com as características do estado eletrônico excitado e sim o tipo de detecção, que se baseia num pulso de corrente que ocorre com a chegada do primeiro fóton emitido pelo sistema. Outro sensor para análise de taxa de glicose no sangue é o descrito no documento WO2011101627-A2. Ele se baseia em um sistema indicador que compreende um receptor para um analito e fluoróforo. O fluoróforo tem um tempo de vida de fluorescência que muda em resposta à presença do analito no receptor. Uma tensão de polarização modula o ganho do detector de fóton único, que é um diodo de avalanche, que gera um sinal com frequência de modulação diferente do da intensidade de luz proveniente da fonte de

excitação. O estado da técnica, portanto, ensina que processos que tem sua natureza explicada com base nos efeitos que exercem sobre o estado eletrônico excitado podem ser usado para sensoramento, mas não apresenta métodos de sensoramento em que o tempo de vida de fluorescência em si é o dado que é obtido do sistema, que é utilizado para dar a magnitude do efeito com relação à quantidade de analito no meio e que ele pode ser aplicado a diversos meios, sendo líquidos, sólidos ou gasosos.

[008] Apesar de nossos estudos sobre o sistema de nanoestrutura de peptídeo/ corante fluorescente já ter evidenciado que há uma interação entre eles que resultam em propriedades surpreendentes do ponto de vista da fluorescência fotoestacionária e que esse efeito teria sua fundamentação na possibilidade da formação de um complexo de carga que cria estados eletrônicos excitados intermediários não observados em seu estado anterior, e que são mais influenciados pelo oxigênio, possibilitando a análise quantitativa por meio da detecção da fluorescência fotoestacionária, como descrito pelo sensor do documento BR BR1020150206658, surpreendentemente, os inventores verificaram que a obtenção das curvas de decaimento de fluorescência desse sistema frente ao analito sobre alterações que são evidentes mesmo quando a quantidade de analito é tão baixa quanto 10^{-10} g/g, o que evidenciou que o dado é também passível de uso para determinação quantitativa, não só para a caracterização da formação de complexos. Dessa forma, um sensor foi construído e testado frente a O_2 dissolvido em meio líquido para que fosse comparado com o sensor óptico da mencionada patente, de modo que o método de detecção de tempo de vida de fluorescência se mostrou ainda mais confiável, bastante reprodutível, independente do tamanho da amostra (não é preciso utilizar volumes ou massas pré-determinadas para que a análise apresente os resultados), e bem mais sensível, tendo um limite de detecção bastante baixo, pelo fato da detecção de fótons únicos conferir essa característica.

[009] Logo, a presente invenção descreve um novo método de sensoriamento dinâmico que se baseia na detecção do tempo de vida de fluorescência do sistema de sensoriamento constituído, de modo que as curvas de decaimento são obtidas na ausência e na presença do analito, em meio líquido, sólido ou gasoso, e as diferenças de comportamento das curvas de decaimento são interpretadas de modo a fornecer os tempos de vida e o comportamento do decaimento, como forma de correlacionar com quantidades de analito, sendo um método de alta sensibilidade. O método é a aplicação em sensoriamento dinâmico do sistema resultante de interação física entre um composto biológico auto-organizado com um corante orgânico, ambos biocompatíveis, em especial, bastante sensível à presença de oxigênio no meio.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[010] A presente invenção trata de um método de sensoriamento dinâmico que se baseia na detecção dos efeitos da presença do analito nos processos do estado eletrônico excitado de um sistema fluorescente constituído de peptídeo auto-organizado contendo um corante fluorescente como aditivo, podendo estar sorvido em substrato transparente ou em solução, destinado principalmente à determinação de quantidades de gás oxigênio dissolvido em meio líquido.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[011] Em um primeiro aspecto, a presente invenção trata de um método de sensoriamento dinâmico que faz uso do efeito que a interação que o analito tem com o sistema fluorescente constituído para o método, que resulta em variações do comportamento dinâmico dos estados eletrônicos excitados do sistema, que podem ser observados por meio da medida do tempo de vida de fluorescência.

[012] Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a um sistema fluorescente constituído de um peptídeo auto-organizado, preferencialmente em formas de nanotubos contendo um corante como aditivo.

[013] Preferencialmente, o presente sistema de nanotubos de peptídeo auto-organizado, que tem adicionados a ele os corantes da presente invenção pode estar

sorvido em um substrato transparente, resultando em um dispositivo para sensoriamento dinâmico, destinado principalmente para a determinação de quantidades de gás oxigênio dissolvido.

[014] O presente método de sensoriamento dinâmico mas detalhadamente, se caracteriza por se basear na medida do tempo de decaimento de fluorescência do sistema formado pelos peptídeos autoorganizados e dopados com o corante fluorescente. Na presença do analito, preferencialmente o oxigênio e com absorção de luz, elétrons de valência do sistema são promovidos a estados eletrônicos excitados de maior energia. O retorno desses estados excitados ao estado eletrônico fundamental, ou seja, aquele em que o sistema se encontra em equilíbrio energético geralmente ocorre com emissão de fluorescência, o que ocorre a tempos bastante bem definidos e que são até empregados em muitas técnicas espectroscópicas, para identificar um certo compost. No entanto, durante o tempo de existência do estado eletrônico excitado, que é geralmente em torno de pico (10^{-12} s) a nanossegundos (10^{-9} s), muitos processos de desativação que ocorrem com transferência de pequenas quantidades de energia, sem resultar em luminescência, podem ocorrer e muitos deles só ocorrem em situações únicas, como quando formam-se complexos de transferência de carga. Quando isso ocorre, divergências na forma de desativação, na energia liberada como fluorescência e no equilíbrio de todos os processos fotofísicos que competem entre si, podem ser detectadas, gerando uma curva de decaimento exponencial de fluorescência, que podem ser monoexponenciais, biexponenciais ou multiexponenciais. De fato, não só a característica da desativação, mas também os valores dos tempos de vida de fluorescência são afetados, de modo reprodutível e dependente da proporção de analito-sistema. O presente sistema, na presença de O_2 , é capaz de sofrer diversas desativações do estado eletrônico excitado, antes que ocorra sua luminescência, em especial devido à característica do O_2 de interagir com sistemas excitados para passar de O_2 tripleto, a molécula na configuração eletrônica comumente encontrada na atmosfera e dissolvida em lagos, rios e oceano, para O_2 singleto, molécula

essencial em diversos processos biológicos, por exemplo. Dependendo da quantidade de O_2 , um determinado processo de desativação não-radiativo (que ocorre sem emissão de luminescência) pode ocorrer preferencialmente, levando a variações do comportamento da desativação do estado eletrônico excitado, sendo revelado por variações nos tempos de vida de fluorescência. Esses processos fotofísicos são bem ilustrados em diagramas de Jablonski, como o apresentado na **figura 1**.

[015] O método da presente invenção envolve a ocorrência de um processo bastante específico de transferência de energia eletrônica entre o complexo que se forma entre os nanotubos e o corante fluorescente e o oxigênio presente em amostras que podem ser de água ou outro meio e seu comportamento pode ser acompanhado em um fluorímetro com detector de fótons únicos (comum em fluorímetros que medem tempo de vida de fluorescência, os fluorímetros com resolução temporal), resultando imediatamente em uma curva de decaimento de fluorescência que, por meio da observação de sua tendência e da sua análise utilizando o método dos mínimos quadrados de Levenberg- Marquardt (Marquardt, D.W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics, 11(2), 431–441. <https://doi.org/10.1137/0111030>), dá a informação de quantitativa do oxigênio que interagiu com o sensor e, portanto, sua proporção no meio. A resposta do dispositivo, portanto, é relacionada à quantidade de O_2 existente na amostra de água por meio do efeito de diminuição do tempo de vida de fluorescência do sistema provocada pela interação com o oxigênio dissolvido na água. O surpreendente desse sistema é que, isoladamente, o corante não apresenta grande sensibilidade ao O_2 , não havendo variação nas curvas de decaimento de fluorescência para soluções do corante, no entanto, a composição com os nanotubos de peptídeos favorece a formação de um complexo de carga que acaba por criar estados eletrônicos excitados intermediários que são mais influenciados pelo O_2 e, por meio de uma eficiente transferência de energia entre os estados eletrônicos excitado do

sistema e fundamental do O_2 , correlaciona-se a alteração na curva com a quantidade de O_2 presente no meio e que está interagindo com o sistema. Esse sensor é muito mais sensível que qualquer outro existente no mercado.

[016] O presente método de sensoriamento utiliza um sistema fluorescente que se caracteriza por ser constituído de um peptídeo auto-organizado selecionado do grupo constituído de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina, triptofano e composições (dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos) com quaisquer aminoácidos essenciais como valina, prolina, leucina, isoleucina, metionina, glicina, alanina, treonina, glutanina, asparagina, cisteína, arginina, serina, lisina, histidina, ácido aspárgico e ácido glutâmico, sortidos ou sequências repetitivas, desde que contenham ao menos um aminoácido aromático. Preferencialmente, o peptídeo é caracterizado por ser a difenilalanina.

[017] O corante fluorescente usado para construir o sistema da presente invenção é selecionado do grupo compreendido por derivados de benzopirona (cumarina). Preferencialmente, utiliza-se aminocumarinas com grupos amino na posição 7 e grupos doadores na posição 3, uma vez que apresentam baixo rendimento de população dos estados eletrônicos triplete, sendo preferencialmente cumarina-6, cumarina-7. Sua estrutura está representada na **figura 2**. Estes corantes, por si só, apresentam baixa sensibilidade ao oxigênio, no entanto, quando aplicados ao presente sistema foi observado um surpreendente aumento desta sensibilidade, de tal modo que o efeito pôde ser aproveitado para o presente método de sensoriamento dinâmico. Para esse fim, um sensor pode ser produzido depositando-se quantidades específicas dos componentes do sistema sobre um substrato transparente, de modo que um tipo de contentor seja confeccionado. Ainda, o sistema da presente invenção responde eficaz e sensivelmente a oxigênio dissolvido quando constituindo tal dispositivo sólido ou quando utilizado em solução, ou seja, mesmo sem a necessidade de ser depositado em substrato transparente.

[018] Portanto, em um terceiro aspecto da presente invenção, um dispositivo é produzido depositando-se, sobre um substrato transparente, uma solução do

peptídeo auto-organizado e, sobre a mesma, uma solução do corante derivado de cumarina. O substrato transparente pode ser rígido ou flexível, de qualquer formato e dimensão, constituído de, porém não limitante a, vidro, quartzo, polissiloxano, politereftalato entre outros e com dimensões adaptadas ao porta-amostras do fluorímetro utilizado para as análises.

[019] Para um substrato de 2cm x 2 cm, a solução do peptídeo pode ser aplicada, preferencialmente, em um volume de 1 a 70 microlitros, sendo o solvente preferencialmente selecionado do grupo constituído de 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol ou ácido trifluoracético. A concentração final da solução do peptídeo é preferencialmente de 0,9 a 10 mg mL⁻¹. A razão volume total de solução por área do substrato, preferencialmente, deve ser mantida na faixa de 10 a 40 microlitros por centímetro quadrado.

[020] Para a concretização do método da presente invenção, um dispositivo foi construído, utilizando-se um substrato de área 4 cm², com a aplicação de um volume entre 1 a 100 microlitros de solução do corante derivado de cumarina produzido em um solvente selecionado do grupo constituído por álcoois e éteres e com concentração final entre 1 x 10⁻¹⁰ a 1x10⁻³ mol L⁻¹. Esse dispositivo é também vantajoso pelo fato de poder ser reutilizado, de ser da fácil produção e de baixo custo.

[021] Os exemplos apresentados a seguir visam à demonstração não limitante da melhor forma de realização da presente invenção, bem como a demonstração de suas propriedades ora mencionadas.

EXEMPLO 1. MÉTODO DE SENSORIAMENTO DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO

[022] Em uma cubeta de quartzo contendo 3,5 mL água deionizada, oxigênio puro foi borbulhado por intervalos de tempo de 0, 80, 960 e 2400 s, sendo imediatamente levada ao porta-amostras do fluorímetro com resolução temporal (Fluoromax 4 com acessórios de TCSPC e Nanoled de excitação pulsada (200 ps de pulso) da HORIBA Instruments) e tendo o tempo de vida de fluorescência

determinados imediatamente. A vazão de borbulhamento de O_2 no frasco de 3,5 mL de capacidade foi de $0,033 \text{ cm}^3/\text{s}$. Apesar de sabermos que esse não é o volume total incorporado ao líquido, pois a maior parte do gás borbulhado se perde devido à tensão superficial da bolha e que essa propriedade muda com o meio em que o gás é borbulhado, por mantermos a vazão constante, a capacidade do líquido em incorporar o gás é constante, até a saturação do meio. Também sabemos que existe uma quantidade de O_2 inicial que não pode ser removida da água deionizada. De modo geral, a solubilidade de O_2 em água é dada pela Lei de Henry e é proporcional à sua pressão parcial e à constante de Henry, portanto varia com a temperatura e a temperatura ambiente vale $8,11 \text{ mg L}^{-1}$. Deste modo, a concentração de O_2 após cada oxigenação, considerando-se oxigenação acumulativa, foi de $8,11 \text{ mg L}^{-1}$ para $t=0$ e que, a vazão constante, a concentração de O_2 em $t=80 \text{ s}$ foi $8,116 \text{ mg L}^{-1}$; em $t=960 \text{ s}$ foi $8,179 \text{ mg L}^{-1}$ e em $t=2400 \text{ s}$ foi de $8,299 \text{ mg L}^{-1}$.

[023] As curvas de decaimento de fluorescência obtidas para as amostras oxigenadas estão apresentadas na **Figura 3**.

[024] A tabela 1 resume as alterações no tempo de vida de fluorescência registrados para esse sistema em situações de distintas oxigenações, conforme obtidos do tratamento das curvas de decaimento.

Tabela 1. Tempos de vida de fluorescência e parâmetro de ajuste χ^2 do sistema NTP/C6 após diversas oxigenações.

t (s)/ λ (nm)	0			80			960			2400		
	τ_1	τ_2	χ^2	τ_1	τ_2	χ^2	τ_1	τ_2	χ^2	τ_1	τ_2	χ^2
385	6,37	1,87	1,0	5,16	1,59	1,1	5,84	1,67	1,0	5,26	1,38	1,2
400	6,65	1,75	1,2	5,97	1,75	1,0	5,76	1,53	1,0	5,67	1,48	1,2
415	6,71	1,84	1,1	6,27	1,81	1,1	5,76	1,53	1,1	6,08	1,68	1,1
430	6,72	1,86	1,1	6,27	1,81	1,1	6,01	1,56	1,1	6,19	1,57	1,1

445	7,05	1,86	1,3	6,25	1,68	1,0	5,85	1,48	1,0	6,51	1,69	1,2
460	6,93	1,77	1,1	6,25	1,68	1,2	5,85	1,48	1,0	6,03	1,52	1,2
475	6,95	1,87	1,2	6,25	1,68	1,1	5,85	1,48	1,2	6,16	1,56	1,1
490	6,54	1,99	1,2	5,35	1,67	1,1	6,09	1,83	1,1	6,04	1,78	1,3
505	6,52	2,06	1,1	6,47	2,05	1,0	5,61	1,85	1,1	6,11	1,97	1,1
520	6,45	2,08	1,2	6,32	2,03	1,1	5,61	1,85	1,1	6,11	1,97	1,2

[025] O experimento realizado mostra o comportamento da curva quando o decaimento é acompanhado em diferentes comprimentos de onda de emissão. Observa-se que o comportamento da destivação é biexponencial e se mantém assim com o aumento da oxigenação. No entanto, observa-se que os tempos de vida τ_1 e τ_2 diminuem progressivamente conforme maior é a oxigenação.

[026] Esse comportamento foi relacionado às concentrações do $O_{2(g)}$ controladas no meio, pela oxigenação. Com eles, constrói-se um gráfico que fornece a relação do efeito com a concentração de O_2 , com a sensibilidade já mencionada. A concentração de O_2 pode, então, ser relacionada à variação do tempo de vida de fluorescência do sistema e, de modo a independender do equipamento de aquisição e tratamento de sinal, elas podem se relacionar obedecendo a uma curva de Stern-Volmer, que é dependente apenas das características de tempo de vida dos componentes do sistema e não mais do equipamento. A curva que relaciona, portanto o tempo de vida de fluorescência e concentração de O_2 para este sistema é apresentada na **figura 4**. O tratamento de Stern-Volmer permite uma análise da cinética de processos fotoquímicos, evidenciando a competição entre os processos radiativos e não-radiativos de desativação dos estados eletrônicos excitados, dando o tempo de vida frente ao supressor. Parâmetros cinéticos são obtidos da equação por esta análise, a partir de dados empíricos de eficiência quântica e tempo de vida de fluorescência.

EXEMPLO 2. PRODUÇÃO DO SISTEMA DO MÉTODO DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO

[027] Uma das realizações da presente invenção é a produção do sistema e sua deposição para a fabricação de um sensor.

[028] O peptídeo se autoorganiza em nanotubos quando em solventes polares como água e álcoois. No entanto, não é solúvel nesses meios. Uma solução deve ser preparada para que as moléculas, assim separadas, possam interagir para a autoorganização. Com isso, solução do peptídeo difenilalanina em 1,1,1,3,3,3-hexafluor-propanol na concentração de 2 mg mL^{-1} foi preparada. Para a formação do complexo de transferência de carga, essa solução é combinada com uma solução do corante fluorescente derivado da cumarina, produzida em etanol, na concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Volumes iguais dessas soluções são misturadas e um volume similar de água deionizada é adicionada à mistura. O processo da autoorganização do peptídeo, contendo as moléculas de solvente uniformemente aderidas à estrutura formada, se inicia. O processo se completa em horas, mas depende da quantidade de material misturado para precisar o tempo necessário. Aproveitando-se da propriedade da autoorganização, um dispositivo foi produzido depositando-se sobre um substrato transparente de vidro 10 microlitros de solução do peptídeo difenilalanina e 10 microlitros de solução do derivado de cumarina, a cumarina-6, em etanol e mais 10 microlitros de água deionizada. O substrato foi mantido em estufa de 30 a 50°C por 48 a 72 horas, para remoção dos solventes. A área de aplicação é delimitada por um degrau de 0,1mm que restringe a área do sensor a um quadrado de 1mm x 1mm. O volume de amostra que pode ser adicionada ao sensor é de $0,01 \text{ mm}^3$, o que evidencia a necessidade de poucas quantidades de amostra e também a alta sensibilidade da técnica.

[029] Adicionalmente, o sistema também tem resposta similar ao oxigênio dissolvido mesmo em solução, sem a necessidade de ser depositado em substrato transparente.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **figura 1** apresenta o diagrama de Jablonski para os processos fotofísicos que ocorrem no sistema na presença de oxigênio.

A **Figura 2** apresenta a estrutura dos derivados de benzopirona (cumarina) com grupos amino na posição 7 e grupos doadores na posição 3 utilizados na presente invenção.

A **Figura 3** apresenta as curvas de decaimento de fluorescência monitoradas em diferentes comprimentos de onda, obtidas para as amostras com as diferentes oxigenações.

A **figura 4** apresenta o gráfico de Stern-Volmer construído a partir dos dados de tempo de vida de fluorescência. A curva relaciona o tempo de vida de fluorescência e concentração de O_2 para este sistema.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de sensoriamento dinâmico caracterizado por operar por meio da detecção do tempo de vida de fluorescência do sistema em que se baseia, relacionando-o à quantidade de analito presente.
2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de ser constituído de peptídeos auto-organizados contendo um corante derivado de cumarina como aditivo.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para detecção de gás oxigênio.
4. Sistema fluorescente caracterizado por ser para a execução do método dinâmico de sensoriamento de acordo com a reivindicação 1.
5. Sistema fluorescente de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato da resposta gerada ser registrada na forma de uma curva de decaimento de fluorescência que fornece tempos de vida de fluorescência que sofrem alterações do previsto, quando na presença de oxigênio.
6. Sistema fluorescente de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de ser constituído por peptídeo auto-organizado apresentado em forma de nanotubos, microtubos, nanofios, microfios, microfitas e/ou nanofitas, contendo um corante fluorescente.
7. Sistema fluorescente de acordo com a reivindicação 4, 5 e 6, caracterizado pelo fato do peptídeo auto-organizado ser selecionado do grupo constituído de difenilalanina, fenilalanina, triptofano ou composições como dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos, com quaisquer aminoácidos essenciais como lisina, alanina, cisteína, arginina, glicina, serina, valina, prolina, leucina, isoleucina, metionina, treonina, glutanina, asparagina, histidina, ácido aspárgico e ácido glutâmico, sortidos ou em sequências repetitivas, contendo ao menos um aminoácido aromático.
8. Sistema fluorescente de acordo com a reivindicação 4, 5, 6 e 7, caracterizado pelo fato do corante derivado de cumarina ser selecionado

do grupo constituído por amino-cumarinas contenham grupos doadores de elétrons na posição 7, como a cumarina-6 e cumarina-7.

9. Uso de sistema fluorescente de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para a construção de sensores dinâmicos para a determinação de quantidades de gás oxigênio dissolvido em amostras líquidas, sólidas ou gasosas.

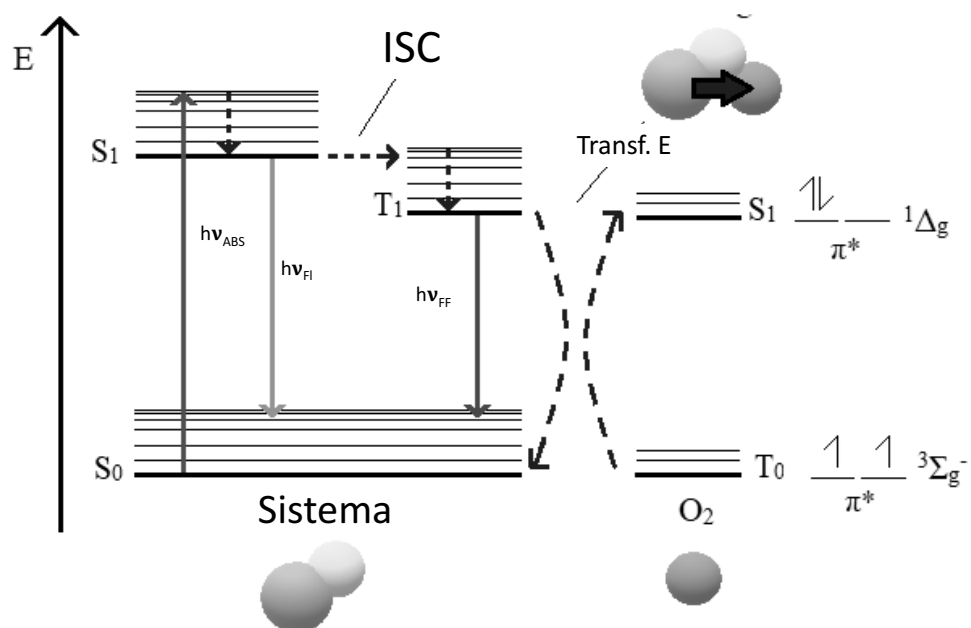


FIG. 1

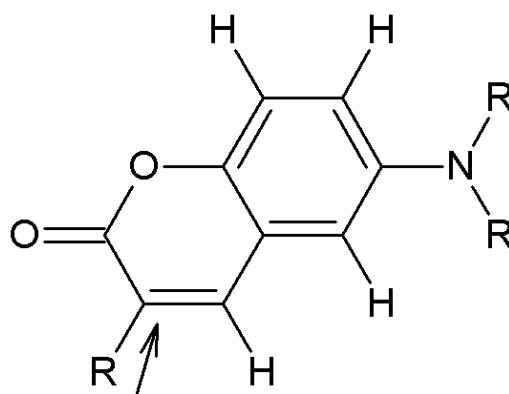


FIG. 2

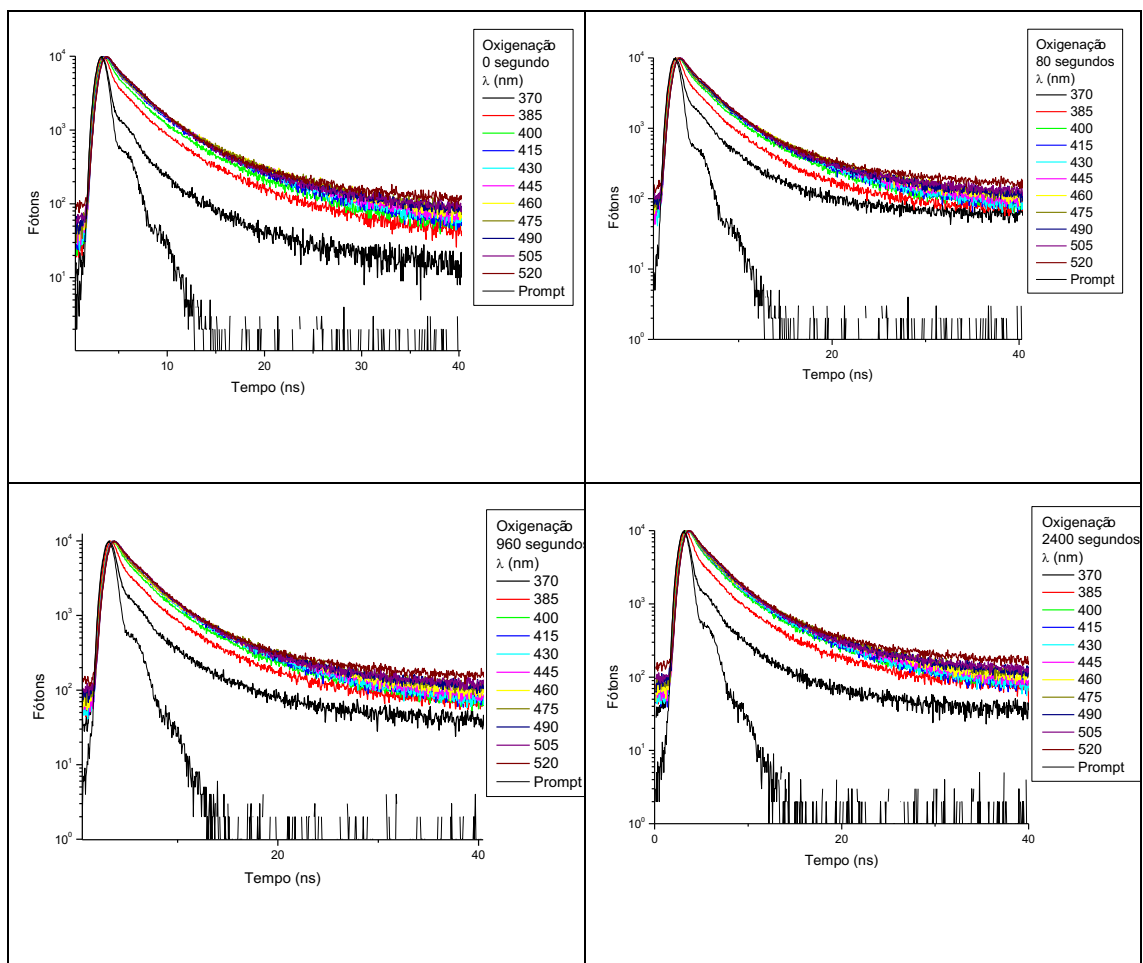


FIG. 3

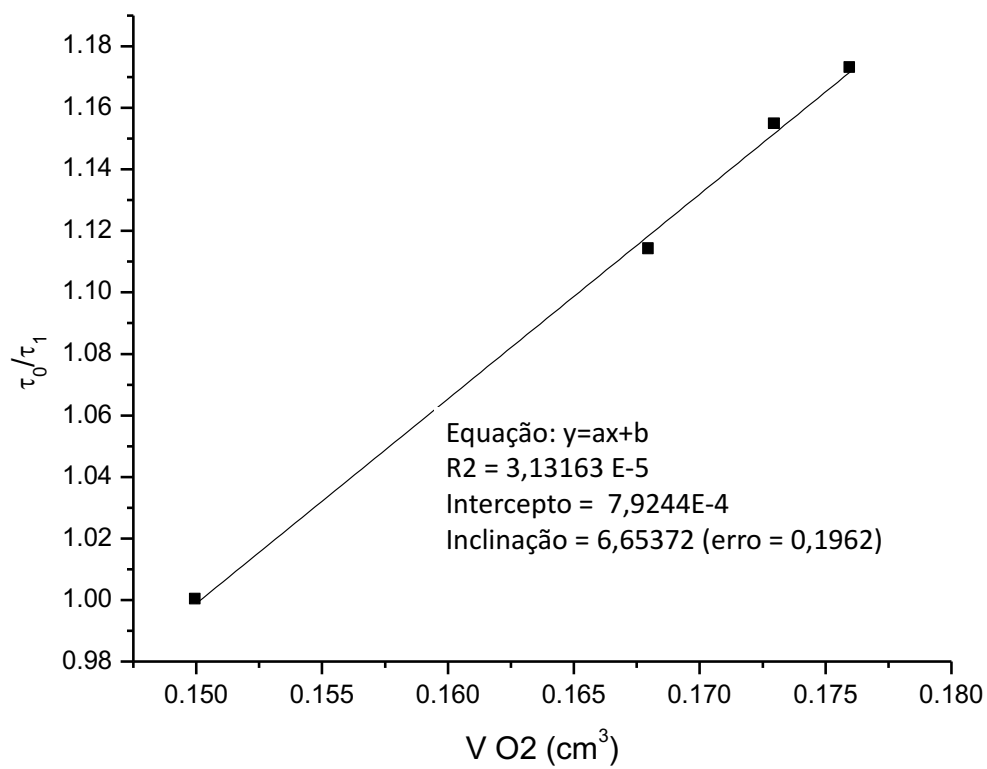


FIG. 4

RESUMO

“METODO DINÂMICO DE SENSORIAMENTO DE O₂ DISSOLVIDO E SISTEMA PARA MÉTODO”

A presente invenção trata de um método de sensoriamento sensível a quantidades distintas do gás oxigênio dissolvido em meios distintos, que utiliza um sistema fluorescente composto por nanoestruturas auto-organizadas de peptídeos, preferencialmente derivados da difenilalanina e dopados com um corante fluorescente derivado da cumarina, podendo ser usados em fase líquida ou estar sorvidos em um substrato transparente. O sistema de sensoriamento opera por meio da detecção do tempo de vida de fluorescência do sistema, registrando curvas de decaimento de fluorescência, de modo que o tratamento das curvas revele o tempo de vida de fluorescência na presença do analito. A eficiente interação do analito com o sistema causa uma alteração na resposta dinâmica do sistema que é correlacionada a variações mínimas de concentração de oxigênio. Concentrações da ordem de frações de nanomoles podem ser eficientemente detectadas. A resposta é registrada por espectrofluorímetro com resolução temporal que esteja disponível.