



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

(21) **BR 10 2013 019075-6 A2**



(22) **Data de Depósito:** 25/07/2013

(43) **Data da Publicação:** 25/08/2015
(RPI 2329)

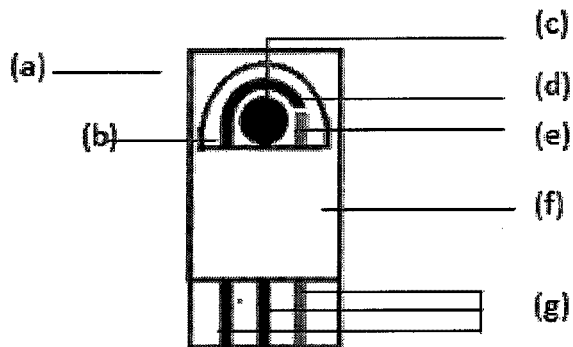
(54) **Título:** PLATAFORMA TRANSDUTORA
MODIFICADA COM NANOCOMPÓSITO CONDUTOR
PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

(51) **Int.Cl.:** G01N33/50; C12Q1/68; C12Q1/25;
G01N33/68; G01N33/543; G01N27/30; C12N15/11

(73) **Titular(es):** JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO

(72) **Inventor(es):** JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO

(57) **Resumo:** PLATAFORMA TRANSDUTORA
MODIFICADA COM NANOCOMPÓSITO CONDUTOR
PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS. O presente
invento refere-se a uma plataforma transdutora como
parte integrante de dispositivos analíticos para detecção
de diversos tipos de biomoléculas, incluindo os vírus
papilomavírus humano de alto e baixo risco.



PLATAFORMA TRANSDUTORA MODIFICADA COM NANOCOMPÓSITO CONDUTOR PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

RELATÓRIO DESCRITIVO

5

Campo da Invenção

A presente invenção descreve uma plataforma transdutora eletroquímica modificada com nanocompósito condutor, visando seu uso como parte integrante de dispositivos analíticos como os biossensores. Mais especificamente, este invento
10 descreve modelos de plataforma transdutora eletroquímica, composta por eletrodos impressos modificados, capazes de detectarem sequências gênicas específicas para vários tipos de papilomavírus humano (HPV) de alto risco e baixo risco, como também outras biomoléculas de interesse biotecnológico

Antecedentes da Invenção

15 O papilomavírus humano (HPV) é um vírus, transmitido principalmente por via sexual, responsável pelo acometimento desde verrugas anogenitais, como também por câncer de colo de útero (cervical), câncer de pênis, ânus e esôfago. Atualmente o HPV é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns, com cerca de 300 milhões de pessoas contaminadas mundialmente por ano.

20 As taxas de cura dos cânceres causados pelo HPV são bastante elevadas quando o diagnóstico precoce é estabelecido. Comumente são utilizados exames como: citopatológico ou Papanicolaou (câncer cervical), anoscopia e proctoscopia (câncer anal) endoscopia digestiva (câncer de esôfago) e avaliação clínica de tumorações penianas (câncer de pênis). Entretanto para a confirmação da presença do câncer é necessário o
25 exame de biópsia, procedimento cirúrgico no qual se recolhe amostra do tecido afetado para análise das células do tecido. Este exame possui algumas desvantagens tais como ser bastante invasivo e diagnosticar a doença quando o tecido afetado já está em estágios avançados da doença.

No entanto, a detecção precoce do vírus HPV ao invés da análise tecidual (biopsia), torna o tratamento mais eficaz e eleva as chances de cura dos pacientes. Isso é devido à constatação da presença do agente agressor antes da modificação tecidual causada pelo mesmo, ou seja, antes do estabelecimento do câncer propriamente dito.

5 Os testes sorológicos e as técnicas de biologia molecular têm sido utilizados como ferramentas para detecção do vírus. Técnicas como PCR (reação em cadeia polimerase), captura híbrida, e, os sistemas bioanalíticos Biossensores que permitem de uma forma específica a detecção do vírus através do uso de sondas de DNA e/ou RNA.

10 Os biossensores são dispositivos analíticos que possuem um material biológico associado ou integrado a um transdutor, que é responsável por produzir um sinal mensurável proporcional à quantidade do analito em estudo. De acordo com a energia envolvida na transdução do sinal, o transdutor pode ser classificado em ópticos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos ou eletroquímicos. As técnicas
15 eletroquímicas são mais atraentes devido a sua alta sensibilidade, baixo custo, e pela possibilidade de micro fabricação com a tecnologia disponível.

Para o biossensoriamento eletroquímico são utilizados diversos tipos de eletrodos. Estes componentes são responsáveis pela realização da transdução eficiente do evento de bioreconhecimento, por proporcionar seletividade, especificidade e
20 melhoria do tempo de resposta, e por fim, a biocompatibilidade do biossensor desenvolvido com as matrizes biológicas. Dentre estes, podemos destacar os eletrodos impressos que possuem vantagens tais como miniaturização, baixo custo, e possibilita sua utilização como teste de “point-of-care” (teste realizado fora do laboratório e/ou hospital).

25 Para alcançar uma alta sensibilidade e seletividade é preciso que o eletrodo possua um mecanismo de transdução extremamente sensível e que possa fornecer uma alta relação sinal/ruído. Por esta razão, a modificação na superfície dos eletrodos é cada vez mais utilizada. As vantagens na modificação dos transdutores advêm de características como aumento da condutividade, aumento da estabilidade e

sensibilidade do biossensor e também melhoramento da imobilização do elemento de reconhecimento biológico a matriz transdutora. Essas modificações nos transdutores permitem a formação de complexos com biomoléculas, até mesmo de cargas opostas como nucleotídeos e proteínas. Estes complexos podem ser formados através de

5 interações eletrostáticas fortes, ligações covalentes, ligação cruzada, eletrodeposição, polimerização, entre outras.

Almejando o aperfeiçoamento de eletrodos, nanomateriais e compósitos muitas vezes são utilizados para facilitar as interações entre o transdutor e o analito, e promover a amplificação do sinal redox. Dentre essas substâncias estão os alótropos

10 de carbono (Nanotubos de carbono, grafeno entre outros), os polímeros (polianilina, polipirrol, poli-L-lisina e etc), as nanopartículas de metais, e também os óxidos de metais.

É possível verificar um exemplo de utilização de alótropos do carbono no melhoramento de eletrodos na patente PCT/US2010/061303 intitulada “Carbon-based

15 electrodes with graphene modification” de 21 de dezembro de 2010. A patente em questão descreve eletrodos modificados com grafeno visando o aperfeiçoamento da transdução de elétrons de um processo eletroquímico de sensoriamento.

Já a patente PCT/US2010/032329 intitulada “Functionalized polymer biosensor” de 24 de outubro de 2011, descreve outra forma de aperfeiçoamento de

20 eletrodos, utilizando diferentes polímeros tais como polianilina, polipirrol, politiofeno entre outros, conjugado com nanopartículas para a detecção de oligonucleotídeos, enzimas, anticorpos, entre outros.

A patente US 13/768,794 intitulada “Detection of HPV” de 15 de fevereiro de 2013, descreve um kit com utilização de sequências específicas para e enzimas

25 nucleases de clivagem para a detecção de HPV através do método de microscopia de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). O kit apresenta uma desvantagem relacionada ao alto custo proporcionado pela técnica FRET.

Com relação à detecção viral podemos citar a patente PCT/US2010/056404 intitulada "Cervical cancer screening by molecular detection of human papillomavirus-induced neoplasia" de 11 de novembro de 2010, que descreve um biossensor que utiliza o sistema de ligação antígeno/anticorpo para o reconhecimento de câncer cervical ocasionado pelo HPV.

O presente invento propõe uma plataforma transdutora eletroquímica baseado em nanocompósito condutor composto de nanofibras de polianilina, grafeno e nanopartículas para a detecção de biomoléculas, incluindo o vírus HPV de alto e baixo risco. A plataforma transdutora é composta por um sistema eletroquímico de detecção, que mediante a utilização de eletrodos impressos de trabalho modificados com nanocompósito condutor, eletrodos de referência e auxiliares, são capazes de quantificar e qualificar dez sondas de DNA específicas para vinte e oito tipos de HPVs de alto risco e baixo risco. O invento utiliza apenas a variação do sinal eletroquímico gerado pela diferença de condutividade entre as sondas específicas de fita simples imobilizadas e pelo processo de hibridização com as sequências alvo presentes na amostra. A detecção é realizada de forma livre e direta da sequência de DNA específica, sem a necessidade de nenhuma técnica de amplificação tais como PCR, RT-PCR, PCR em tempo real, e/ou auxílio de outras técnicas de detecção como a eletroforese. Devido à simplicidade, o invento pode ser portátil, ser miniaturizado, e também não ser afetado pela da turbidez da amostra para a viabilidade dos testes.

Descrição da Invenção

A presente invenção descreve uma plataforma transdutora composta por fitas testes, para a utilização em biossensores de DNA eletroquímico baseado, em nanocompósito condutor de nanofibras de polianilina, grafeno e nanopartículas para detecção biomoléculas incluindo o vírus HPV. Este sistema é composto por três etapas: (i) síntese do nanocompósito condutor (ii) imobilização de sequências específicas de DNA (capazes de detectar vários tipos de HPV) no nanocompósito (iii) modificação do eletrodo de trabalho com o híbrido de DNA e nanocompósito condutor (iv) hibridização de sequências de DNA presente nas amostras biológicas ou

oligonucleotídeos sintéticos, e (v) leitura do sinal eletroquímico gerado a partir da hibridização.

O presente invento descreve um produto na forma de fita teste ou multifita teste desenvolvida pela impressão de uma tinta e/ou pasta condutora sob um suporte constituído em Poliestireno, PVC (polyvinyl Chloride), PVA (polyvinyl acetate), suporte cerâmico, vítreo ou outro material sólido e/ou flexível inerte não condutor. Nesta fita está presente ainda um ou mais eletrodos de trabalho, um ou mais eletrodos de referência e um ou mais eletrodos auxiliares.

Os eletrodos de trabalho são responsáveis pela geração do sinal elétrico correspondente a qualquer processo eletroquímico de detecção gerado em sua superfície. Estes eletrodos podem ser constituídos de pasta de carbono, grafite, paládio, nanotubos de carbono, grafeno, ouro, entre outras fontes de materiais condutores de eletricidade. Os de referência são responsáveis pela geração de sinais elétricos correspondentes a aplicação de uma diferença de potencial e podem ser constituídos de prata, prata/cloreto de prata, carbono, ouro, entre outros. E também os eletrodos auxiliares que tem como função diminuir os ruídos do sistema e podem ser compostos de carbono, prata, ouro, paládio e etc.

A fase inicial do processo corresponde à síntese do nanocompósito condutor. Neste invento foram utilizadas nanofibras de polianilina dopadas com ácido sulfônico, não restringindo-se apenas a este ácido, que possuem a característica de suportar pH neutros e relativamente básicos sem alteração na condutividade, e possuem maior solubilidade em água, entretanto também é possível a utilização apenas das nanofibras de polianilina.

Foram utilizadas também nanopartículas de prata com a finalidade de aumentar a condutividade do sistema, mas estas também podem ser substituídas por nanopartículas de outros metais como ouro, zinco, ferro entre outros, para obtenção do mesmo propósito. Ao final, é adicionado grafeno oxidado ao nanocompósito, isto se deve às propriedades deste alótropo tais como alta condutividade elétrica, térmica e grande área de superfície, no entanto pode-se também utilizar outros alótropos de

carbono tais como grafeno, nanotubos de carbono e nanorribbons de carbono para atingir as mesmas propriedades.

A síntese do nanocompósito condutor na presente invenção começa a partir da síntese das nanofibras de polianilina dopadas com ácido sulfônico em meio surfactante conjuntamente com a síntese de nanopartículas de prata. Neste invento foram utilizados de 0,11 g de brometo de hexadeciltrimetilamônio, como surfactante, podendo também ser utilizado dodecil sulfato de sódio; como provedor de grupamentos sulfônicos para a dopagem foi utilizado 0,43 g de ácido 3-aminobenzenossulfônico; dissolvidos em 40 mL de ácido clorídrico (0,15M). Subsequentemente, 224 µL de anilina (11M), para a formação das nanopartículas de prata, foram adicionadas também 20 mL de nitrato de prata (0,01M). Ao final, 20 ml de persulfato de amônio foram adicionados à mistura que permaneceu a 4 °C por 12 h. A mistura é então centrifugada e lavada com água destilada e etanol severas vezes e ao precipitado final, são adicionadas 30 ml de água ultrapura. Em adição, a formulação acima não se restringe apenas as condições descritas, podendo ser alterados os volumes, concentrações, massas, temperatura, tempo e reagentes.

Para finalizar a síntese do nanocompósito foi então realizada a ancoragem do grafeno oxidado (O qual pode ser substituído por grafeno, nanotubos de carbono e entre outros alótropos de carbono condutores). Portanto, a 10 mL de solução de nanofibras e nanopartículas são adicionados 100 mg de grafeno oxidado perfazendo uma concentração de 10 mg/mL, podendo ser utilizada também com concentrações variando de 50 a 1 mg/mL. A solução permanece em forte agitação por 1h para a realização do processo de ancoragem. Este processo também pode ser realizado com um período de tempo de no mínimo 30 minutos e no máximo 2h. Em adição, a formulação acima não se restringe apenas as condições descritas, podendo ser alterados os volumes, concentrações, massas, temperatura, tempo e reagentes.

Após o processo de síntese, segue a segunda etapa que é o processo de imobilização das sequências específicas de fita simples no nanocompósito recém-sintetizado. As sondas específicas de DNA, RNA, PNA e outras biomoléculas são imobilizadas através de processos de adsorção, mas outros processos de imobilização

também podem ser utilizados como imobilização por complexação (com avidina ou estreptavidina-biotina), por ligações covalentes, entre outros processos que viabilizem a imobilização de ácidos nucleicos. O nanocompósito condutor apresenta carga elétrica final negativa, devido à presença de grupamentos carboxilas, hidroxilas e epoxy. Como os oligonucleotídeos também apresentam carga negativa, para que a imobilização por adsorção ocorra é necessário à utilização de um intermediador ou cross-link positivo. A intermediação foi realizada utilizando uma partícula metálica de carga elétrica positiva neste caso o nitrato de alumínio (0,1 M) com proporção de 1 para 2 de nanocompósito, no entanto também é possível a utilização de concentrações de 0,1 M a 0,5 M de nitrato de alumínio, e também a utilização de outros intermediários metálicos e não-metálicos.

No processo de imobilização são utilizadas dez sondas específicas que estão descritas na figura 1. Cada sonda deve ser imobilizada de forma separada, e analisada em diferentes eletrodos de trabalho. As sondas apresentam capacidade específica de detecção para 28 tipos de HPVs. Dentre eles, 25 são classificados como de alto risco patogênico, e 3 de baixo risco. As sondas são numeradas de 1 a 10, possuem entre 34 a 55 bases. Com esse conjunto de sequências é possível detectar os tipos de HPV de alto risco 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85 e 97; e os tipos de baixo risco 6, 11 e 28. Para a imobilização da sonda específica de DNA, RNA, PNA e outras biomoléculas utiliza-se uma proporção de 1 para 1 de nanocompósito condutor e solução de 1 μ M de sonda ou biomoléculas, e sob agitação preferencial de 300 rpm por 30 minutos, mas é possível também utilizar variações de tempo. Em adição, a imobilização da sonda e de outras biomoléculas não se restringe as condições citadas acima.

A terceira etapa é a modificação do eletrodo de trabalho com o complexo sonda-nanocompósito ou biomoléculas-nanocompósito. Nesse caso, foi utilizada a técnica drop-by-drop (gotejamento) de uma quantidade de complexo suficiente para cobrir a área de trabalho do eletrodo de trabalho, que no presente invento foi de 5 μ L, podendo variar de 2 a 20 μ L. O eletrodo modificado é então levado a estufa/câmara

com temperatura de 50 °C até a secagem do híbrido, podendo ser usado outros meios e condições para secagem do material adicionado sob o eletrodo de trabalho

Subsequentemente a tira teste está pronta para a quarta etapa (processo de hibridização) na qual a amostra fluídica contendo a sequência alvo é colocada no eletrodo de trabalho, e submetida à temperatura de anelamento correspondente ao tamanho da sequência. A hibridização corresponde à identificação positiva para o tipo de HPV pesquisado ou de outro alvo de interesse. Em geral, o ácido nucléico da doença investigada é complementar a sonda imobilizada no eletrodo de trabalho.

O nanocompósito apresenta alta condutividade, ao adicionar outros elementos a sua matriz, a condutividade progressivamente irá diminuir. Portanto a medição da condutividade do eletrodo de trabalho modificado apenas com o nanocompósito é alta, com a modificação com o híbrido de DNA fita simples, já ocorre um decréscimo de condutividade.

A hibridização é detectada a partir da diminuição da condutividade do eletrodo de trabalho devido ao acúmulo de DNA hibridizado no eletrodo. Na análise de condutividade do híbrido de DNA fita simples, existe além da produção de corrente gerada pelo nanocompósito condutor, também há corrente gerada pelo processo de oxidação das bases de guanina, que como não estão pareadas, estão propensas a oxidação. Após a hibridização com alvo complementar, as guaninas não estão mais propensas a oxidar, o que ocasiona uma diminuição na corrente gerada. Então através desse sinal é possível detectar a presença ou não da hibridização entre a sonda imobilizada e o alvo.

Caso o biorreceptor imobilizado seja outra biomolécula como proteína, enzima, aptâmeros, antígeno, anticorpo, entre outros, a detecção do alvo de interesse ocorrerá através de uma ligação específica entre biorreceptor-alvo. Esta ligação poderá promover uma reação redox ou alterar o sinal elétrico característico do eletrodo de trabalho sem modificação. No último caso, é possível a comparação dos sinais gerados antes e depois da modificação no eletrodo de trabalho.

A figura 2 representa uma primeira modalidade preferida na qual descreve uma fita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (g). Nesta modalidade o eletrodo de trabalho e auxiliar serão compostos de carbono, o eletrodo de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante .

A figura 3 representa uma segunda modalidade preferida na qual descreve uma multifita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), numeração referente à sequência específica a ser imobilizada no respectivo eletrodo de trabalho (f) conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (h). Nesta modalidade os eletrodos de trabalho e auxiliares serão compostos de carbono, os eletrodos de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante.

A figura 4 representa uma terceira modalidade preferida na qual descreve uma fita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (g). Nesta modalidade o eletrodo de trabalho e auxiliar serão compostos de carbono, o eletrodo de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante.

A figura 5 representa uma quarta modalidade preferida na qual descreve uma multifita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo de auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), numeração referente à sequência específica a ser imobilizada no respectivo eletrodo de trabalho (f) conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (h). Nesta modalidade os eletrodos de trabalho e auxiliares serão compostos de carbono, os eletrodos de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante.

A figura 6 representa um gráfico gerado pela técnica de voltametria de pulso diferencial após o processo de detecção em que a curva (a) representa o sinal gerado pelo eletrodo branco, a curva (b) representa o sinal gerado pelo eletrodo após o processo de hibridização com o alvo complementar, a curva (c) representa o sinal gerado pelo eletrodo após a modificação apenas com o nanocompósito condutor, já a curva (d) é a representação do sinal obtido pelo híbrido do nanocompósito condutor e a sonda de DNA específica para os HPVs desejados. A curva (b) representa a positividade no diagnóstico de HPV a partir do sistema proposto na presente invenção.

A figura 7 representa um gráfico gerado pela técnica de voltametria cíclica após o processo de detecção com amostras complementares e não complementares para HPV. A curva (a) representa o processo de hibridização com amostra complementar (ou seja, específica para todos HPVs testados), a curva (b) representa uma mistura de amostra complementar e não-complementar (ou seja, não específica); a curva (c) representa o processo de hibridização com amostra não-complementar apenas, e por último a curva (d) representa o sinal obtido por apenas o híbrido de nanocompósito condutor e sonda específica de DNA. O gráfico comprova que o biossensor proposto é específico apenas para amostras complementares, visto que o sinal obtido por amostras não específicas estão semelhantes ao sinal gerado apenas pelo eletrodo

modificado com o híbrido, e o sinal obtido por misturas de amostras específicas e não específicas tem curva semelhante à curva do hibridizado com sequências específicas.

REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Produto na forma de plataforma transdutora modificada com nanocompósito condutor formulado, caracterizado por fita teste composta por eletrodos impressos de trabalho, referência e auxiliar.
2. Produto na forma de plataforma transdutora tal como descrito na reivindicação 1, caracterizado por incorporar biorreceptores correspondentes a ácidos nucleicos ou enzimas ou antígenos ou anticorpos ou proteínas sob os eletrodos de trabalho.
- 10 3. Processo na forma de eletrodos impressos tal como descrito nas reivindicações 1 e 2 caracterizado por conter eletrodos de trabalho modificados com nanocompósito condutor composto de nanofibras de polianilina, nanopartículas de prata, grafeno e intermediadores metálicos e não-metálicos de imobilização.
- 15 4. Processo na forma de eletrodos impressos tal como descrito nas reivindicações 1 e 2 caracterizado por conter eletrodos de trabalho modificados com nanocompósito condutor composto por nanofibras de polianilina dopadas com ácido sulfônico, nanopartículas de prata, grafeno oxidado e intermediadores metálicos e não-metálicos de imobilização.
- 20 5. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender uma fita teste contendo um eletrodo de trabalho de área circular, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.
- 25 6. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender dez fitas testes contendo cada uma delas um eletrodo de trabalho de área circular, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.

7. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender uma fita teste contendo um eletrodo de trabalho de área quadrada, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.
- 5 8. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender dez fitas testes contendo cada uma delas um eletrodo de trabalho de área quadrada, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.
- 10 9. Produto na forma de plataforma transdutora tal como descrito nas reivindicações 3, 4, 5, 6, 7 e 8 caracterizado por conter o fragmento genético 5'-
TTC CCT ATT TTC TTG CAG ATG GCG GTG TGG CGG CCT AGT GA -3' específico
para detecção dos papilomavírus humano tipos 18, 30, 45, 53, 56, 58, 66 e 67 ;
ou 5'- CCG GAC AGC GGG TAT GGC TAT ACT GAA GTG GAA ACT CTT ACG CC-3'
específico para detecção dos papilomavírus humano tipos 26 e 69; ou 5'- CGT
15 TTA AAT GTG TGC CAG GAG AAA ATA CTA GAC TGT TAT GAA CTG GAC AGT -3'
específico para detecção dos papilomavírus humano tipos 51 e 82; ou 5'- CAA
GCG GTG CCA AGC CTT GCA GTA TCA CGA TCC AAA GGG -3' específico para
detecção dos papilomavírus humano tipos 34 e 73; ou 5'- TGG AAA TCC TTT TTC
TCA AGG ACG TGG TGC AGA TTA AAT TTG CAC GAG GAA GAG G -3' específico
20 para detecção dos papilomavírus humano tipos 16, 31, 35 e 52, ou 5'- TGG ACA
TTG TTC GTT TAC ATA GGC CTG CCT TAA C-3' específico para detecção dos
papilomavírus humano tipos 28, 68, 70, 85 e 97, ou 5'- GAA AGT TTG CCG CAT
GTT CAC AAA GTG CTG CGG AGG ACG TTG -3' específico para detecção do
papilomavírus humano tipo 33; ou 5'- GGG GAT ACG CCA GAA TGG ATA CAA
25 CGA TTA ACT GTT ATA CAA C -3' específico para detecção dos papilomavírus
humano tipos 39 e 59; ou 5'- AGG AGG GAC CGA AAA CGG TTC AAC CGA AAA
CGG TT-3' específico para detecção dos papilomavírus humano tipos 6 e 11; ou
5'- CGA CGA CTG CAC TGC ATA GCT GGC TAC TGG AGA GGG AG-3' específico
para detecção do papilomavírus humano tipo 28.

Figura 1

- 1: 5'- TTCCCTATTTTCTTGCAGATGGCGGTGTGGCGGCCTAGTGA -3'
- 2: 5'- CCGGACAGCGGGTATGGCTATACTGAAGTGGAACTCTTACGCC-3'
- 3: 5'-CGTTTAAATGTGTGCCAGGAGAAAATACTAGACTGTTATGAACTGGACAG T-3'
- 4: 5'- CAAGCGGTGCCAAGCCTTGCAGTATCACGATCCAAAGGG -3'
- 5: 5'- TGGAAATCCTTTTTCTCAAGGACGTGGTGCAGATTAAATTTGCACGAGGAAGAGG -3'
- 6: 5'- TGGACATTGTTCGTTTACATAGGCCTGCCTTAAC-3'
- 7: 5'- GAAAGTTTGCCGCATGTTCAAAAAGTGCTGCGGAGGACGTTG -3'
- 8: 5'- GGGGATACGCCAGAATGGATACAACGATTAACTGTTATACAAC -3'
- 9: 5'- AGGAGGGACCGAAAACGGTTCAACCGAAAACGGTT-3'
- 10: 5' – CGACGACTGCACTGCATAGCTGGCTACTGGAGAGGGAG -3'

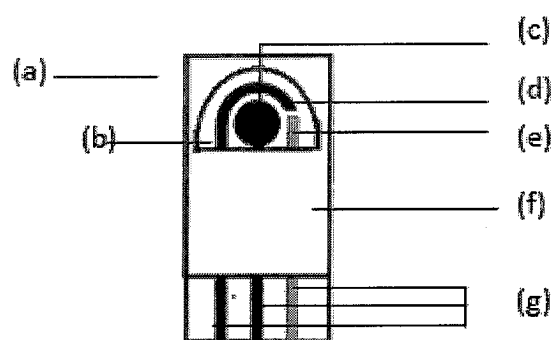
Figura 2

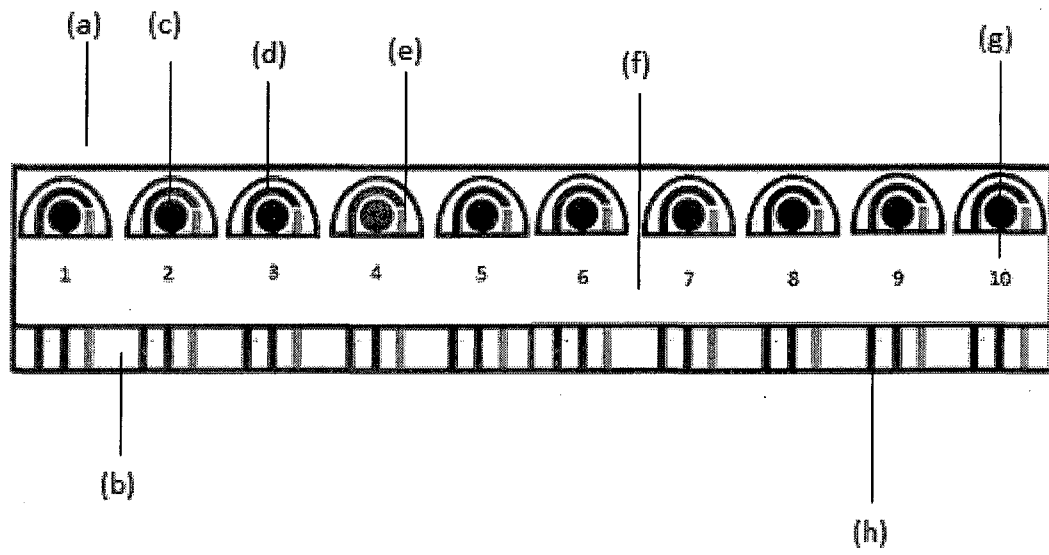
Figura 3

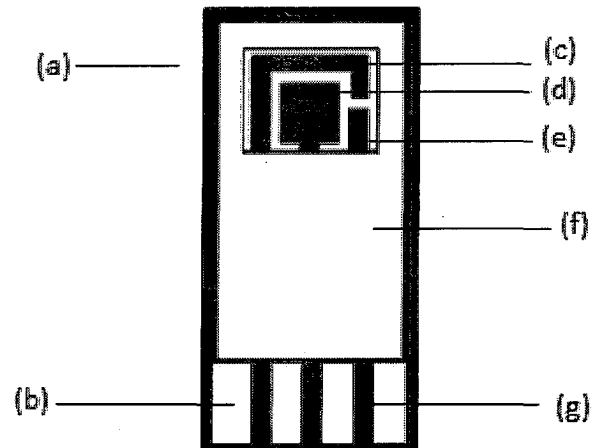
Figura 4

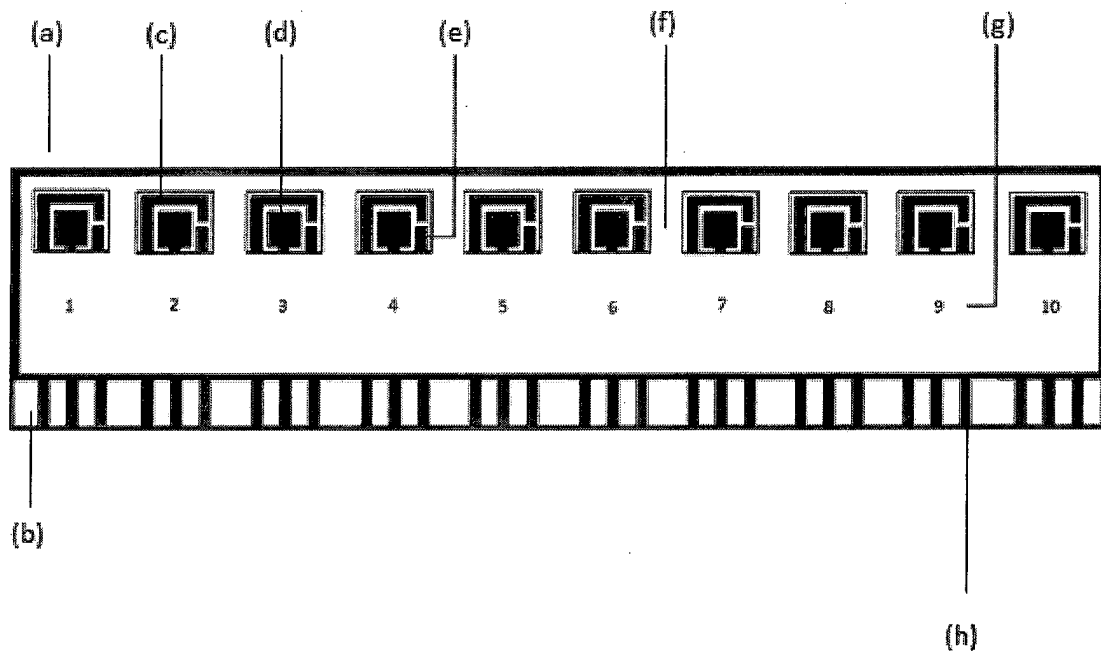
Figura 5

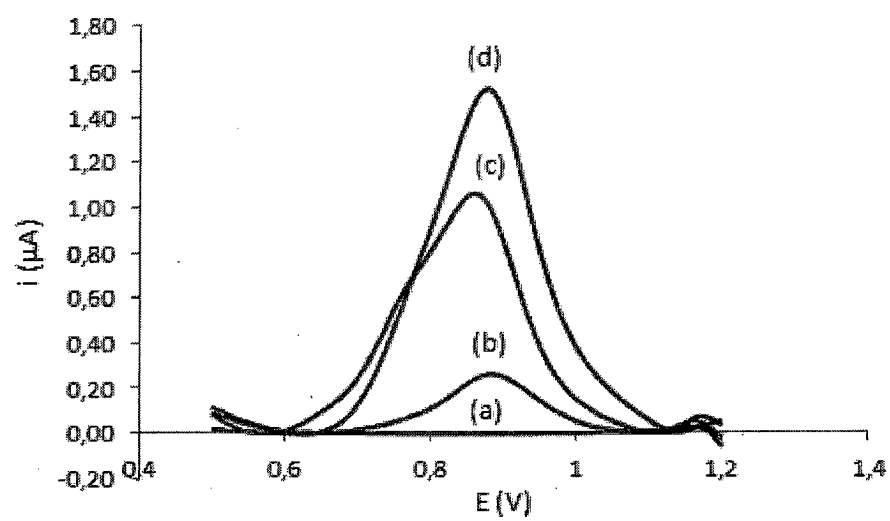
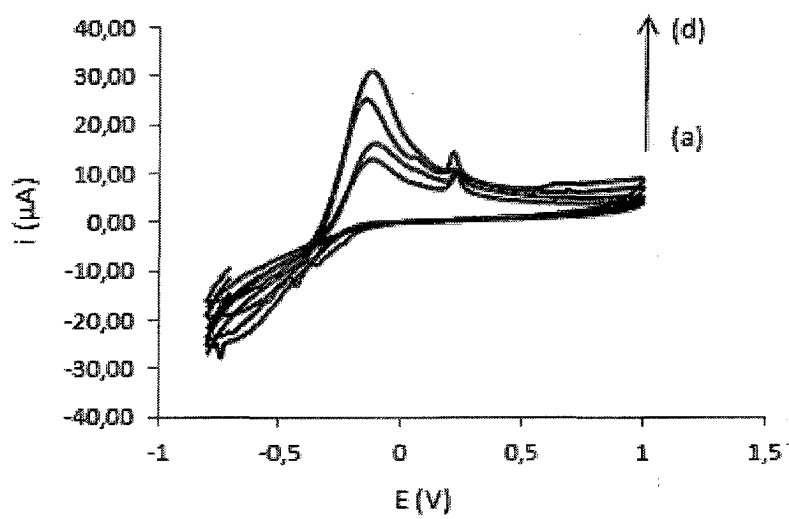
Figura 6

Figura 7

PLATAFORMA TRANSDUTORA MODIFICADA COM NANOCOMPÓSITO CONDUTOR PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

RELATÓRIO DESCRITIVO

5

Campo da Invenção

A presente invenção descreve uma plataforma transdutora eletroquímica modificada com nanocompósito condutor, visando seu uso como parte integrante de dispositivos analíticos como os biossensores. Mais especificamente, este invento
10 descreve modelos de plataforma transdutora eletroquímica, composta por eletrodos impressos modificados, capazes de detectarem sequências gênicas específicas para vários tipos de papilomavírus humano (HPV) de alto risco e baixo risco, como também outras biomoléculas de interesse biotecnológico

Antecedentes da Invenção

15 O papilomavírus humano (HPV) é um vírus, transmitido principalmente por via sexual, responsável pelo acometimento desde verrugas anogenitais, como também por câncer de colo de útero (cervical), câncer de pênis, ânus e esôfago. Atualmente o HPV é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns, com cerca de 300 milhões de pessoas contaminadas mundialmente por ano.

20 As taxas de cura dos cânceres causados pelo HPV são bastante elevadas quando o diagnóstico precoce é estabelecido. Comumente são utilizados exames como: citopatológico ou Papanicolaou (câncer cervical), anoscopia e proctoscopia (câncer anal) endoscopia digestiva (câncer de esôfago) e avaliação clínica de tumorações penianas (câncer de pênis). Entretanto para a confirmação da presença do câncer é necessário o
25 exame de biópsia, procedimento cirúrgico no qual se recolhe amostra do tecido afetado para análise das células do tecido. Este exame possui algumas desvantagens tais como ser bastante invasivo e diagnosticar a doença quando o tecido afetado já está em estágios avançados da doença.

No entanto, a detecção precoce do vírus HPV ao invés da análise tecidual (biopsia), torna o tratamento mais eficaz e eleva as chances de cura dos pacientes. Isso é devido à constatação da presença do agente agressor antes da modificação tecidual causada pelo mesmo, ou seja, antes do estabelecimento do câncer propriamente dito.

5 Os testes sorológicos e as técnicas de biologia molecular têm sido utilizados como ferramentas para detecção do vírus. Técnicas como PCR (reação em cadeia polimerase), captura híbrida, e, os sistemas bioanalíticos Biossensores que permitem de uma forma específica a detecção do vírus através do uso de sondas de DNA e/ou RNA.

10 Os biossensores são dispositivos analíticos que possuem um material biológico associado ou integrado a um transdutor, que é responsável por produzir um sinal mensurável proporcional à quantidade do analito em estudo. De acordo com a energia envolvida na transdução do sinal, o transdutor pode ser classificado em ópticos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos ou eletroquímicos. As técnicas
15 eletroquímicas são mais atraentes devido a sua alta sensibilidade, baixo custo, e pela possibilidade de micro fabricação com a tecnologia disponível.

Para o biossensoriamento eletroquímico são utilizados diversos tipos de eletrodos. Estes componentes são responsáveis pela realização da transdução eficiente do evento de bioreconhecimento, por proporcionar seletividade, especificidade e
20 melhoria do tempo de resposta, e por fim, a biocompatibilidade do biossensor desenvolvido com as matrizes biológicas. Dentre estes, podemos destacar os eletrodos impressos que possuem vantagens tais como miniaturização, baixo custo, e possibilita sua utilização como teste de “point-of-care” (teste realizado fora do laboratório e/ou hospital).

25 Para alcançar uma alta sensibilidade e seletividade é preciso que o eletrodo possua um mecanismo de transdução extremamente sensível e que possa fornecer uma alta relação sinal/ruído. Por esta razão, a modificação na superfície dos eletrodos é cada vez mais utilizada. As vantagens na modificação dos transdutores advêm de características como aumento da condutividade, aumento da estabilidade e

sensibilidade do biossensor e também melhoramento da imobilização do elemento de reconhecimento biológico a matriz transdutora. Essas modificações nos transdutores permitem a formação de complexos com biomoléculas, até mesmo de cargas opostas como nucleotídeos e proteínas. Estes complexos podem ser formados através de

5 interações eletrostáticas fortes, ligações covalentes, ligação cruzada, eletrodeposição, polimerização, entre outras.

Almejando o aperfeiçoamento de eletrodos, nanomateriais e compósitos muitas vezes são utilizados para facilitar as interações entre o transdutor e o analito, e promover a amplificação do sinal redox. Dentre essas substâncias estão os alótropos

10 de carbono (Nanotubos de carbono, grafeno entre outros), os polímeros (polianilina, polipirrol, poli-L-lisina e etc), as nanopartículas de metais, e também os óxidos de metais.

É possível verificar um exemplo de utilização de alótropos do carbono no melhoramento de eletrodos na patente PCT/US2010/061303 intitulada “Carbon-based

15 electrodes with graphene modification” de 21 de dezembro de 2010. A patente em questão descreve eletrodos modificados com grafeno visando o aperfeiçoamento da transdução de elétrons de um processo eletroquímico de sensoriamento.

Já a patente PCT/US2010/032329 intitulada “Functionalized polymer biosensor” de 24 de outubro de 2011, descreve outra forma de aperfeiçoamento de

20 eletrodos, utilizando diferentes polímeros tais como polianilina, polipirrol, politiofeno entre outros, conjugado com nanopartículas para a detecção de oligonucleotídeos, enzimas, anticorpos, entre outros.

A patente US 13/768,794 intitulada “Detection of HPV” de 15 de fevereiro de 2013, descreve um kit com utilização de sequências específicas para e enzimas

25 nucleases de clivagem para a detecção de HPV através do método de microscopia de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). O kit apresenta uma desvantagem relacionada ao alto custo proporcionado pela técnica FRET.

Com relação à detecção viral podemos citar a patente PCT/US2010/056404 intitulada "Cervical cancer screening by molecular detection of human papillomavirus-induced neoplasia" de 11 de novembro de 2010, que descreve um biossensor que utiliza o sistema de ligação antígeno/anticorpo para o reconhecimento de câncer cervical ocasionado pelo HPV.

O presente invento propõe uma plataforma transdutora eletroquímica baseado em nanocompósito condutor composto de nanofibras de polianilina, grafeno e nanopartículas para a detecção de biomoléculas, incluindo o vírus HPV de alto e baixo risco. A plataforma transdutora é composta por um sistema eletroquímico de detecção, que mediante a utilização de eletrodos impressos de trabalho modificados com nanocompósito condutor, eletrodos de referência e auxiliares, são capazes de quantificar e qualificar dez sondas de DNA específicas para vinte e oito tipos de HPVs de alto risco e baixo risco. O invento utiliza apenas a variação do sinal eletroquímico gerado pela diferença de condutividade entre as sondas específicas de fita simples imobilizadas e pelo processo de hibridização com as sequências alvo presentes na amostra. A detecção é realizada de forma livre e direta da sequência de DNA específica, sem a necessidade de nenhuma técnica de amplificação tais como PCR, RT-PCR, PCR em tempo real, e/ou auxílio de outras técnicas de detecção como a eletroforese. Devido à simplicidade, o invento pode ser portátil, ser miniaturizado, e também não ser afetado pela da turbidez da amostra para a viabilidade dos testes.

Descrição da Invenção

A presente invenção descreve uma plataforma transdutora composta por fitas testes, para a utilização em biossensores de DNA eletroquímico baseado, em nanocompósito condutor de nanofibras de polianilina, grafeno e nanopartículas para detecção biomoléculas incluindo o vírus HPV. Este sistema é composto por três etapas: (i) síntese do nanocompósito condutor (ii) imobilização de sequências específicas de DNA (capazes de detectar vários tipos de HPV) no nanocompósito (iii) modificação do eletrodo de trabalho com o híbrido de DNA e nanocompósito condutor (iv) hibridização de sequências de DNA presente nas amostras biológicas ou

oligonucleotídeos sintéticos, e (v) leitura do sinal eletroquímico gerado a partir da hibridização.

O presente invento descreve um produto na forma de fita teste ou multifita teste desenvolvida pela impressão de uma tinta e/ou pasta condutora sob um suporte constituído em Poliestireno, PVC (polyvinyl Chloride), PVA (polyvinyl acetate), suporte cerâmico, vítreo ou outro material sólido e/ou flexível inerte não condutor. Nesta fita está presente ainda um ou mais eletrodos de trabalho, um ou mais eletrodos de referência e um ou mais eletrodos auxiliares.

Os eletrodos de trabalho são responsáveis pela geração do sinal elétrico correspondente a qualquer processo eletroquímico de detecção gerado em sua superfície. Estes eletrodos podem ser constituídos de pasta de carbono, grafite, paládio, nanotubos de carbono, grafeno, ouro, entre outras fontes de materiais condutores de eletricidade. Os de referência são responsáveis pela geração de sinais elétricos correspondentes a aplicação de uma diferença de potencial e podem ser constituídos de prata, prata/cloreto de prata, carbono, ouro, entre outros. E também os eletrodos auxiliares que tem como função diminuir os ruídos do sistema e podem ser compostos de carbono, prata, ouro, paládio e etc.

A fase inicial do processo corresponde à síntese do nanocompósito condutor. Neste invento foram utilizadas nanofibras de polianilina dopadas com ácido sulfônico, não restringindo-se apenas a este ácido, que possuem a característica de suportar pH neutros e relativamente básicos sem alteração na condutividade, e possuem maior solubilidade em água, entretanto também é possível a utilização apenas das nanofibras de polianilina.

Foram utilizadas também nanopartículas de prata com a finalidade de aumentar a condutividade do sistema, mas estas também podem ser substituídas por nanopartículas de outros metais como ouro, zinco, ferro entre outros, para obtenção do mesmo propósito. Ao final, é adicionado grafeno oxidado ao nanocompósito, isto se deve às propriedades deste alótropo tais como alta condutividade elétrica, térmica e grande área de superfície, no entanto pode-se também utilizar outros alótropos de

carbono tais como grafeno, nanotubos de carbono e nanorribbons de carbono para atingir as mesmas propriedades.

A síntese do nanocompósito condutor na presente invenção começa a partir da síntese das nanofibras de polianilina dopadas com ácido sulfônico em meio surfactante conjuntamente com a síntese de nanopartículas de prata. Neste invento foram utilizados de 0,11 g de brometo de hexadeciltrimetilamônio, como surfactante, podendo também ser utilizado dodecil sulfato de sódio; como provedor de grupamentos sulfônicos para a dopagem foi utilizado 0,43 g de ácido 3-aminobenzenossulfônico; dissolvidos em 40 mL de ácido clorídrico (0,15M). Subsequentemente, 224 µL de anilina (11M), para a formação das nanopartículas de prata, foram adicionadas também 20 mL de nitrato de prata (0,01M). Ao final, 20 ml de persulfato de amônio foram adicionados à mistura que permaneceu a 4 °C por 12 h. A mistura é então centrifugada e lavada com água destilada e etanol severas vezes e ao precipitado final, são adicionadas 30 ml de água ultrapura. Em adição, a formulação acima não se restringe apenas as condições descritas, podendo ser alterados os volumes, concentrações, massas, temperatura, tempo e reagentes.

Para finalizar a síntese do nanocompósito foi então realizada a ancoragem do grafeno oxidado (O qual pode ser substituído por grafeno, nanotubos de carbono e entre outros alótropos de carbono condutores). Portanto, a 10 mL de solução de nanofibras e nanopartículas são adicionados 100 mg de grafeno oxidado perfazendo uma concentração de 10 mg/mL, podendo ser utilizada também com concentrações variando de 50 a 1 mg/mL. A solução permanece em forte agitação por 1h para a realização do processo de ancoragem. Este processo também pode ser realizado com um período de tempo de no mínimo 30 minutos e no máximo 2h. Em adição, a formulação acima não se restringe apenas as condições descritas, podendo ser alterados os volumes, concentrações, massas, temperatura, tempo e reagentes.

Após o processo de síntese, segue a segunda etapa que é o processo de imobilização das sequências específicas de fita simples no nanocompósito recém-sintetizado. As sondas específicas de DNA, RNA, PNA e outras biomoléculas são imobilizadas através de processos de adsorção, mas outros processos de imobilização

também podem ser utilizados como imobilização por complexação (com avidina ou estreptavidina-biotina), por ligações covalentes, entre outros processos que viabilizem a imobilização de ácidos nucleicos. O nanocompósito condutor apresenta carga elétrica final negativa, devido à presença de grupamentos carboxilas, hidroxilas e epoxy. Como os oligonucleotídeos também apresentam carga negativa, para que a imobilização por adsorção ocorra é necessário à utilização de um intermediador ou cross-link positivo. A intermediação foi realizada utilizando uma partícula metálica de carga elétrica positiva neste caso o nitrato de alumínio (0,1 M) com proporção de 1 para 2 de nanocompósito, no entanto também é possível a utilização de concentrações de 0,1 M a 0,5 M de nitrato de alumínio, e também a utilização de outros intermediários metálicos e não-metálicos.

No processo de imobilização são utilizadas dez sondas específicas que estão descritas na figura 1. Cada sonda deve ser imobilizada de forma separada, e analisada em diferentes eletrodos de trabalho. As sondas apresentam capacidade específica de detecção para 28 tipos de HPVs. Dentre eles, 25 são classificados como de alto risco patogênico, e 3 de baixo risco. As sondas são numeradas de 1 a 10, possuem entre 34 a 55 bases. Com esse conjunto de sequências é possível detectar os tipos de HPV de alto risco 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85 e 97; e os tipos de baixo risco 6, 11 e 28. Para a imobilização da sonda específica de DNA, RNA, PNA e outras biomoléculas utiliza-se uma proporção de 1 para 1 de nanocompósito condutor e solução de 1 μ M de sonda ou biomoléculas, e sob agitação preferencial de 300 rpm por 30 minutos, mas é possível também utilizar variações de tempo. Em adição, a imobilização da sonda e de outras biomoléculas não se restringe as condições citadas acima.

A terceira etapa é a modificação do eletrodo de trabalho com o complexo sonda-nanocompósito ou biomoléculas-nanocompósito. Nesse caso, foi utilizada a técnica drop-by-drop (gotejamento) de uma quantidade de complexo suficiente para cobrir a área de trabalho do eletrodo de trabalho, que no presente invento foi de 5 μ L, podendo variar de 2 a 20 μ L. O eletrodo modificado é então levado a estufa/câmara

com temperatura de 50 °C até a secagem do híbrido, podendo ser usado outros meios e condições para secagem do material adicionado sob o eletrodo de trabalho

Subsequentemente a tira teste está pronta para a quarta etapa (processo de hibridização) na qual a amostra fluídica contendo a sequência alvo é colocada no eletrodo de trabalho, e submetida à temperatura de anelamento correspondente ao tamanho da sequência. A hibridização corresponde à identificação positiva para o tipo de HPV pesquisado ou de outro alvo de interesse. Em geral, o ácido nucléico da doença investigada é complementar a sonda imobilizada no eletrodo de trabalho.

O nanocompósito apresenta alta condutividade, ao adicionar outros elementos a sua matriz, a condutividade progressivamente irá diminuir. Portanto a medição da condutividade do eletrodo de trabalho modificado apenas com o nanocompósito é alta, com a modificação com o híbrido de DNA fita simples, já ocorre um decréscimo de condutividade.

A hibridização é detectada a partir da diminuição da condutividade do eletrodo de trabalho devido ao acúmulo de DNA hibridizado no eletrodo. Na análise de condutividade do híbrido de DNA fita simples, existe além da produção de corrente gerada pelo nanocompósito condutor, também há corrente gerada pelo processo de oxidação das bases de guanina, que como não estão pareadas, estão propensas a oxidação. Após a hibridização com alvo complementar, as guaninas não estão mais propensas a oxidar, o que ocasiona uma diminuição na corrente gerada. Então através desse sinal é possível detectar a presença ou não da hibridização entre a sonda imobilizada e o alvo.

Caso o biorreceptor imobilizado seja outra biomolécula como proteína, enzima, aptâmeros, antígeno, anticorpo, entre outros, a detecção do alvo de interesse ocorrerá através de uma ligação específica entre biorreceptor-alvo. Esta ligação poderá promover uma reação redox ou alterar o sinal elétrico característico do eletrodo de trabalho sem modificação. No último caso, é possível a comparação dos sinais gerados antes e depois da modificação no eletrodo de trabalho.

A figura 2 representa uma primeira modalidade preferida na qual descreve uma fita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (g). Nesta modalidade o eletrodo de trabalho e auxiliar serão compostos de carbono, o eletrodo de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante .

A figura 3 representa uma segunda modalidade preferida na qual descreve uma multifita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), numeração referente à sequência específica a ser imobilizada no respectivo eletrodo de trabalho (f) conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (h). Nesta modalidade os eletrodos de trabalho e auxiliares serão compostos de carbono, os eletrodos de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante.

A figura 4 representa uma terceira modalidade preferida na qual descreve uma fita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (g). Nesta modalidade o eletrodo de trabalho e auxiliar serão compostos de carbono, o eletrodo de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante.

A figura 5 representa uma quarta modalidade preferida na qual descreve uma multifita teste representada por (a), uma superfície isolante (b), eletrodo de trabalho (c), eletrodo de auxiliar (d), eletrodo de referência (e), Capa isolante para delimitação da área de trabalho (f), numeração referente à sequência específica a ser imobilizada no respectivo eletrodo de trabalho (f) conector para eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (h). Nesta modalidade os eletrodos de trabalho e auxiliares serão compostos de carbono, os eletrodos de referência de prata, e os conectores de ouro. Porém esses eletrodos e conectores também podem ser compostos por outros materiais condutores. A capa isolante para delimitação da área de trabalho será composta de adesivo isolante, podendo também ser de tinta dielétrica ou outro material isolante.

A figura 6 representa um gráfico gerado pela técnica de voltametria de pulso diferencial após o processo de detecção em que a curva (a) representa o sinal gerado pelo eletrodo branco, a curva (b) representa o sinal gerado pelo eletrodo após o processo de hibridização com o alvo complementar, a curva (c) representa o sinal gerado pelo eletrodo após a modificação apenas com o nanocompósito condutor, já a curva (d) é a representação do sinal obtido pelo híbrido do nanocompósito condutor e a sonda de DNA específica para os HPVs desejados. A curva (b) representa a positividade no diagnóstico de HPV a partir do sistema proposto na presente invenção.

A figura 7 representa um gráfico gerado pela técnica de voltametria cíclica após o processo de detecção com amostras complementares e não complementares para HPV. A curva (a) representa o processo de hibridização com amostra complementar (ou seja, específica para todos HPVs testados), a curva (b) representa uma mistura de amostra complementar e não-complementar (ou seja, não específica); a curva (c) representa o processo de hibridização com amostra não-complementar apenas, e por último a curva (d) representa o sinal obtido por apenas o híbrido de nanocompósito condutor e sonda específica de DNA. O gráfico comprova que o biossensor proposto é específico apenas para amostras complementares, visto que o sinal obtido por amostras não específicas estão semelhantes ao sinal gerado apenas pelo eletrodo

modificado com o híbrido, e o sinal obtido por misturas de amostras específicas e não específicas tem curva semelhante à curva do hibridizado com sequências específicas.

REIVINDICAÇÕES

1. Produto na forma de plataforma transdutora modificada com nanocompósito condutor formulado, caracterizado por fita teste composta por eletrodos impressos de trabalho, referência e auxiliar.
5
2. Produto na forma de plataforma transdutora tal como descrito na reivindicação 1, caracterizado por incorporar biorreceptores correspondentes a ácidos nucleicos ou enzimas ou antígenos ou anticorpos ou proteínas sob os eletrodos de trabalho.
3. Processo na forma de eletrodos impressos tal como descrito nas reivindicações 1 e 2 caracterizado por conter eletrodos de trabalho modificados com nanocompósito condutor composto de nanofibras de polianilina, nanopartículas de prata, grafeno e intermediadores metálicos e não-metálicos de imobilização.
10
4. Processo na forma de eletrodos impressos tal como descrito nas reivindicações 1 e 2 caracterizado por conter eletrodos de trabalho modificados com nanocompósito condutor composto por nanofibras de polianilina dopadas com ácido sulfônico, nanopartículas de prata, grafeno oxidado e intermediadores metálicos e não-metálicos de imobilização.
15
5. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender uma fita teste contendo um eletrodo de trabalho de área circular, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.
20
6. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender dez fitas testes contendo cada uma delas um eletrodo de trabalho de área circular, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.
25

7. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender uma fita teste contendo um eletrodo de trabalho de área quadrada, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.
- 5 8. Produto na forma de plataforma transdutora como descrito nas reivindicações 3 e 4 caracterizado por compreender dez fitas testes contendo cada uma delas um eletrodo de trabalho de área quadrada, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar, uma capa isolante e uma área de reação.
- 10 9. Produto na forma de plataforma transdutora tal como descrito nas reivindicações 3, 4, 5, 6, 7 e 8 caracterizado por conter o fragmento genético 5'-
TTC CCT ATT TTC TTG CAG ATG GCG GTG TGG CGG CCT AGT GA -3' específico
para detecção dos papilomavírus humano tipos 18, 30, 45, 53, 56, 58, 66 e 67 ;
ou 5'- CCG GAC AGC GGG TAT GGC TAT ACT GAA GTG GAA ACT CTT ACG CC-3'
específico para detecção dos papilomavírus humano tipos 26 e 69; ou 5'- CGT
15 TTA AAT GTG TGC CAG GAG AAA ATA CTA GAC TGT TAT GAA CTG GAC AGT -3'
específico para detecção dos papilomavírus humano tipos 51 e 82; ou 5'- CAA
GCG GTG CCA AGC CTT GCA GTA TCA CGA TCC AAA GGG -3' específico para
detecção dos papilomavírus humano tipos 34 e 73; ou 5'- TGG AAA TCC TTT TTC
TCA AGG ACG TGG TGC AGA TTA AAT TTG CAC GAG GAA GAG G -3' específico
20 para detecção dos papilomavírus humano tipos 16, 31, 35 e 52, ou 5'- TGG ACA
TTG TTC GTT TAC ATA GGC CTG CCT TAA C-3' específico para detecção dos
papilomavírus humano tipos 28, 68, 70, 85 e 97, ou 5'- GAA AGT TTG CCG CAT
GTT CAC AAA GTG CTG CGG AGG ACG TTG -3' específico para detecção do
papilomavírus humano tipo 33; ou 5'- GGG GAT ACG CCA GAA TGG ATA CAA
25 CGA TTA ACT GTT ATA CAA C -3' específico para detecção dos papilomavírus
humano tipos 39 e 59; ou 5'- AGG AGG GAC CGA AAA CGG TTC AAC CGA AAA
CGG TT-3' específico para detecção dos papilomavírus humano tipos 6 e 11; ou
5'- CGA CGA CTG CAC TGC ATA GCT GGC TAC TGG AGA GGG AG-3' específico
para detecção do papilomavírus humano tipo 28.

PLATAFORMA TRANSDUTORA MODIFICADA COM NANOCOMPÓSITO
CONDUTOR PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

RESUMO

O presente invento refere-se a uma plataforma transdutora como parte integrante
5 de dispositivos analíticos para detecção de diversos tipos de biomoléculas, incluindo os
vírus papilomavírus humano de alto e baixo risco.

Figura 1

- 1: 5'- TTCCCTATTTTCTTGCAGATGGCGGTGTGGCGGCCTAGTGA -3'
- 2: 5'- CCGGACAGCGGGTATGGCTATACTGAAGTGGAAACTCTTACGCC-3'
- 3: 5'-CGTTTAAATGTGTGCCAGGAGAAAATACTAGACTGTTATGAACTGGACAG T-3'
- 4: 5'- CAAGCGGTGCCAAGCCTTGCAGTATCACGATCCAAAGGG -3'
- 5: 5'- TGGAAATCCTTTTTCTCAAGGACGTGGTGCAGATTAAATTTGCACGAGGAAGAGG -3'
- 6: 5'- TGGACATTGTTCGTTTACATAGGCCTGCCTTAAC-3'
- 7: 5'- GAAAGTTTGCCGCATGTTCAAAAAGTGCTGCGGAGGACGTTG -3'
- 8: 5'- GGGGATACGCCAGAATGGATACAACGATTAACTGTTATACAAC -3'
- 9: 5'- AGGAGGGACCGAAAACGGTTCAACCGAAAACGGTT-3'
- 10: 5' – CGACGACTGCACTGCATAGCTGGCTACTGGAGAGGGAG -3'

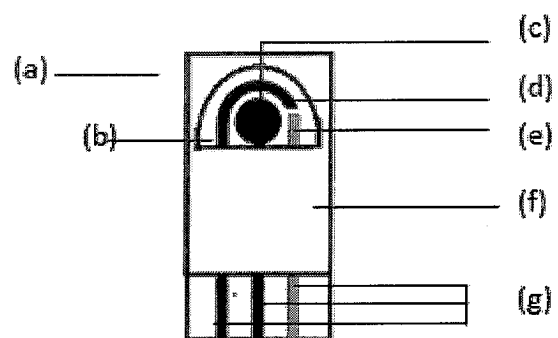
Figura 2

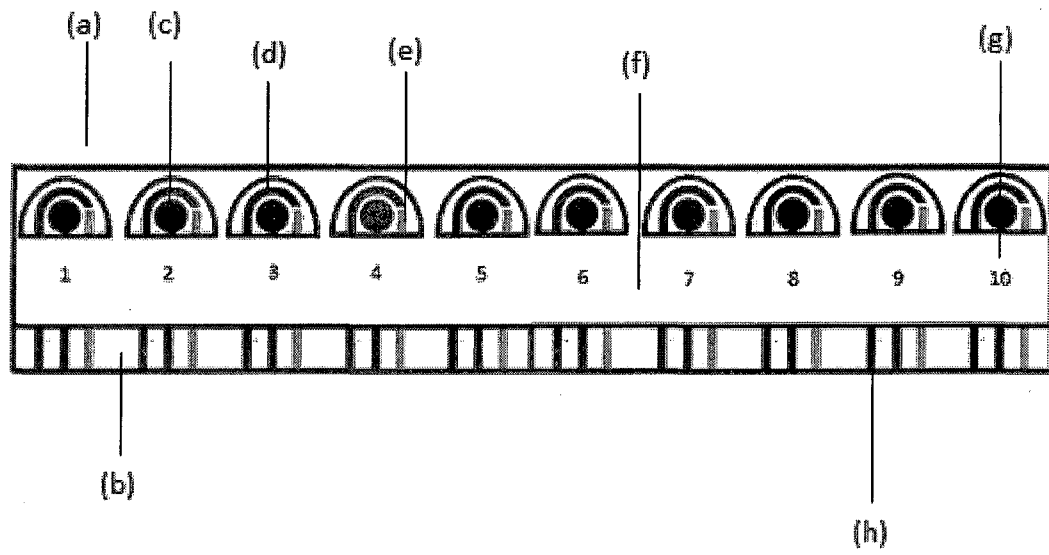
Figura 3

Figura 4

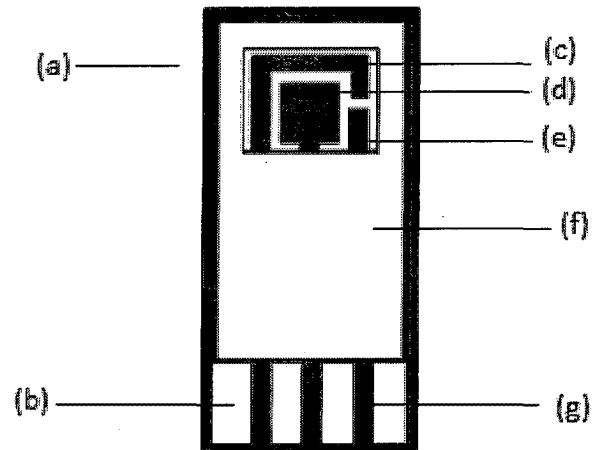


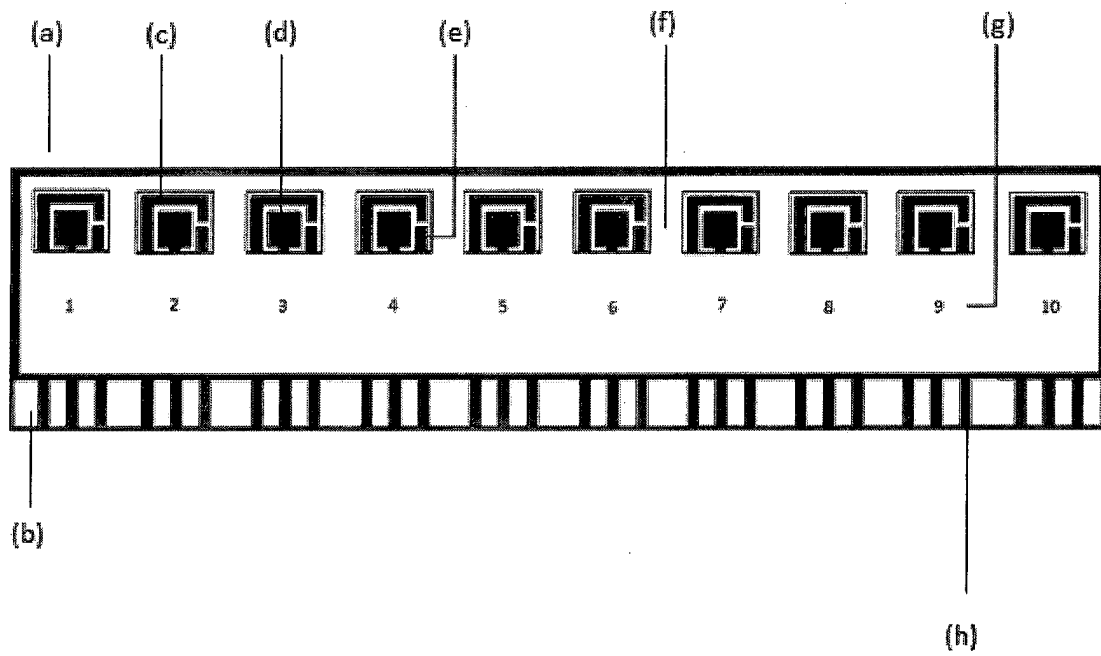
Figura 5

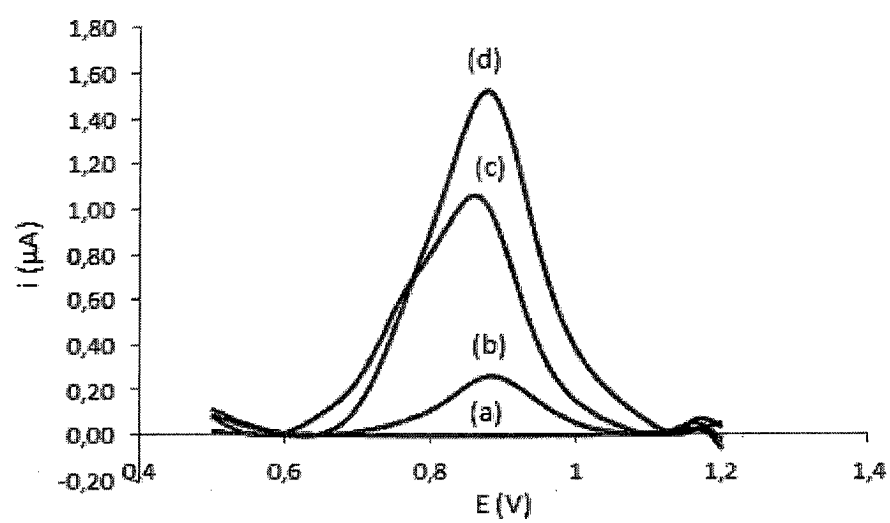
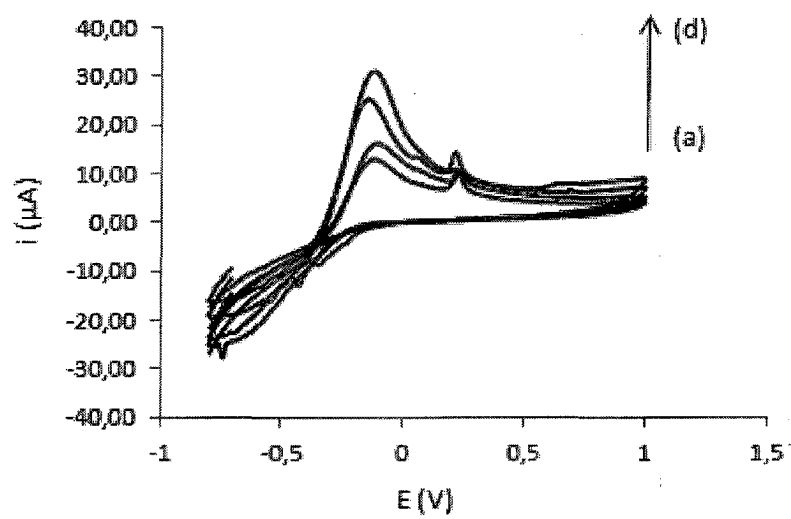
Figura 6

Figura 7

PLATAFORMA TRANSDUTORA MODIFICADA COM NANOCOMPÓSITO
CONDUTOR PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

RESUMO

O presente invento refere-se a uma plataforma transdutora como parte integrante
5 de dispositivos analíticos para detecção de diversos tipos de biomoléculas, incluindo os
vírus papilomavírus humano de alto e baixo risco.