



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

(21) BR 102020026632-2 A2



(22) Data do Depósito: 23/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/07/2022

(54) **Título:** PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO

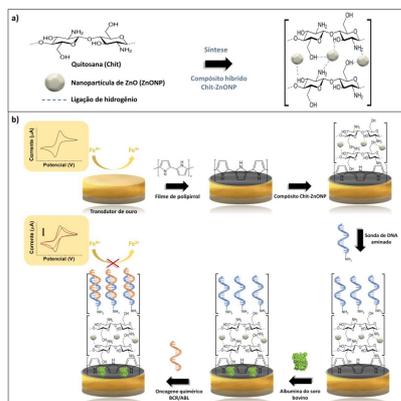
(51) **Int. Cl.:** G01N 27/26; C12Q 1/6886; B82Y 15/00.

(52) **CPC:** G01N 27/26; C12Q 1/6886; B82Y 15/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** KAREN YASMIM PEREIRA DOS SANTOS AVELINO; MARYANA ROGÉRIA DOS SANTOS; NORMA LUCENA CAVALCANTI LICÍNIO DA SILVA; RENAN GARCIA GOMES; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE; MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA.

(57) **Resumo:** PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO Obtida por metodologia simples para fabricação de um dispositivo eletroquímico utilizável na identificação do oncogene quimérico BCR/ABL. Objetivando-se aprimorar o desempenho analítico do sensor biológico, uma plataforma nanoestruturada foi construída sobre a área ativa de um eletrodo metálico e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada no polímero polipirrol (PPy) e compósito híbrido formado por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco (Chit-ZnONP). O PPy pode assumir um caráter intrinsecamente condutor, favorecendo a transferência de carga na interface eletrodo-solução e contribuindo significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodetecção. O compósito híbrido Chit-ZnONP disponibiliza grupos químicos para a ancoragem de biomoléculas, além de apresentar elevada área de contato. O nanocompósito Chit-ZnONP proporciona um microambiente hidrofílico e biocompatível, necessário para a manutenção da conformação molecular de biomoléculas imobilizadas. A fim de tornar a plataforma nanoestruturada aplicável ao diagnóstico de oncogene quimérico BCR/ABL, sequências curtas de oligonucleotídeos (denominadas de sondas de DNA) foram imobilizadas quimicamente sobre os transdutores modificados. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para a caracterização (...).



**PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO  
ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO  
BIOMÉDICO**

Campo técnico

01. O oncogene quimérico BCR/ABL é uma anormalidade genética associada à patogênese da leucemia mieloide crônica (LMC) em adultos. Entretanto, também representa um fator significativo para o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças. A avaliação da presença do oncogene quimérico BCR/ABL possibilita um diagnóstico precoce e o monitoramento da regressão da doença viabiliza a detecção de células leucêmicas residuais, especialmente após o transplante de medula óssea. Atualmente, os métodos de diagnóstico clínico e de prognóstico utilizados para a identificação desta fusão gênica apresentam algumas limitações, como o processo de análise dispendioso e os altos custos para a aquisição de equipamentos. Logo, o desenvolvimento de um ensaio molecular efetivo para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL é de grande interesse para a promoção da saúde de pacientes com leucemia.

02. A presente invenção aplica-se ao campo das ciências biomédicas, especificamente ao setor de diagnósticos clínicos. O invento descrito é aplicável à área de diagnóstico biomédico para detecção de sequências gênicas através do uso de biossensores de DNA. Particularmente, a invenção refere-se a método alternativo para a identificação eletroquímica do oncogene quimérico BCR/ABL.

03. A descoberta relatada concerne a um biossensor baseado na imobilização de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligada quimicamente a um compósito de quitosana (Chit) e nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs). O compósito polimérico foi automontado sobre um filme de polipirrol (PPy) eletrossintetizado na superfície de um eletrodo metálico. A plataforma elaborada tem como função a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL em amostras clínicas de baixas concentrações, através do uso de uma sonda específica de DNA. Desta forma, um biossensor nanoestruturado foi desenvolvido para o diagnóstico de pacientes com LMC através da identificação de um marcador genético para desordens oncológicas.

04. A associação entre polímeros, materiais nanométricos e biomoléculas são de interesse da biotecnologia e nanociências. Em especial, ressalta-se que a conjugação de materiais funcionais, tais como nanopartículas semicondutoras de óxido metálico e polímeros orgânicos melhoram o desempenho analítico de sensores biológicos. Portanto, esta estratégia de construção de sistemas biomoleculares, baseada no uso de elementos que proporcionam funções ou propriedades a biossensores eletroquímicos, vem ganhando notoriedade na área de diagnósticos clínicos.

05. Em geral, os polímeros orgânicos condutores exercem importante papel na elaboração de plataformas para biodeteção, garantindo sensibilidade e versatilidade ao produto. O PPy é um bom representante desse grupo, apresentando diversas características atrativas, como monômero de baixo custo, estabilidade à temperatura ambiente, baixa toxicidade, alta condutividade, elevada taxa de transferência de carga, possibilidade de polimerização por via eletroquímica com aplicação de baixos potenciais de oxidação, espessura do filme polimérico controlada experimentalmente e presença de grupos funcionais para a ancoragem estável de biomoléculas.

06. Em adição, as ZnONPs se destacam entre os óxidos metálicos por possuírem excelentes propriedades para a construção de sistemas biossensíveis. As ZnONPs apresentam características físicas de um material semicondutor que possibilitam um rápido transporte de elétrons do eletrodo para a biomolécula. Além disso, as ZnONPs apresentam elevada razão entre área superficial e volume, alta eficiência catalítica, estabilidade química, biocompatibilidade e ausência de toxicidade.

07. Fundamentalmente, as ZnONPs podem ser incorporadas em biopolímeros, tais como a Chit para a síntese de compósitos poliméricos. A Chit é um polímero natural obtido a partir da carapaça de crustáceos usado para diversos fins biotecnológicos e sustentáveis. O nanocompósito Chit-ZnONP dispõe de grupos químicos reativos (-OH e -NH<sub>2</sub>) que possibilitam a ligação estável de sequências oligonucleotídicas através de reações covalentes específicas. Ademais, por suas propriedades hidrofílicas, o nanocompósito Chit-ZnONP oferece um microambiente adequado para a manutenção da conformação tridimensional das biomoléculas imobilizadas, fator essencial para assegurar sua função biológica e/ou bioatividade.

08. Portanto, o invento descrito provém da aplicação de técnicas eletroquímicas para a síntese do polímero condutor PPy sobre um eletrodo de metálico. Por meio de metodologias de automontagem, o nanocompósito híbrido Chit-ZnONP foi sobreposto ao filme de PPy para a obtenção da plataforma nanoestruturada PPy/Chit-ZnONP. Com a ancoragem de sondas de DNA sobre o substrato modificado, um biossensor com elevada sensibilidade e especificidade foi obtido para o monitoramento do oncogene quimérico BCR/ABL e diagnóstico de LMC.

09. O biodispositivo eletroquímico é um sistema analítico promissor, pois requer pouco tempo de análise, oferecendo um diagnóstico rápido e com baixo custo. Em particular, a engenhosidade do invento pode ser aplicada ao desenvolvimento de outros biossensores, diversificando-se a natureza da molécula de biorreconhecimento.

#### Estado da técnica

10. A LMC é uma neoplasia caracterizada pela proliferação descontrolada e anormal de células da linhagem mieloide. Estas células são originadas na medula óssea e apresentam a função de proteção contra ameaças externas ao organismo. Ressalta-se que a LMC corresponde a aproximadamente 15% de todas as leucemias e afeta principalmente adultos [1]. A ocorrência deste tipo de leucemia frequentemente está relacionada a uma mutação genética caracterizada pela translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22  $t(9;22)(q34; q11)$ . Como resultado, um rearranjo cromossômico específico é obtido, comumente chamado de cromossomo *Philadelphia*. Este cromossomo contém o gene híbrido BCR/ABL (oncogene) que pode expressar três diferentes isoformas da proteína tirosina quinase (p185, p210 e p230), as quais estão associadas à patogênese de diferentes tipos de leucemia [2, 3].

11. As técnicas atuais de diagnóstico clínico para LMC estão voltadas para a detecção do gene de fusão BCR/ABL, considerado um biomarcador oncogênico. Entre os métodos moleculares encontram-se a análise cromossômica, hibridação fluorescente *in situ* (FISH), citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR). Estas ferramentas de análise, embora precisas e específicas, apresentam sensibilidade limitada e demandam

um alto custo experimental, elevada habilidade técnica e longo tempo de experimentação. Como consequências destas desvantagens, pode-se ocorrer um retardo no diagnóstico médico e na implementação de estratégias terapêuticas efetivas [4]. Desta forma, um avanço nas metodologias de pesquisa e detecção do oncogene quimérico BCR/ABL é de grande interesse para saúde dos pacientes com leucemia [5, 6].

12. Nos últimos anos, os avanços da nanociência e o desenvolvimento tecnológico possibilitaram a construção de biodispositivos nanoestruturados, como os biossensores eletroquímicos. Na investigação diagnóstica, estes surgem como ferramentas presuntivas para a detecção precisa e específica de analitos biológicos com alta sensibilidade e rápido tempo de resposta [7]. Em sua estrutura há uma camada biológica, que exerce a função de reconhecimento, ligada a um transdutor, que detecta a interação analito-biocamada, transformando-a em um sinal quantificável. Este sinal é então amplificado por um processador eletrônico e apresentado em forma de gráficos. Biossensor de DNA ou, simplesmente, genossensor, é um tipo de dispositivo que utiliza como material biológico um ácido nucleico de fita simples, como o ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA). O princípio de detecção está baseado no processo de hibridação entre o segmento oligonucleotídico e sua cadeia complementar, que gerará perturbações mensuráveis no sistema. É importante ressaltar que, este tipo de sensor se destaca por sua alta especificidade e estabilidade diante de condições ambientais adversas [8-10].

13. Para um bom desempenho analítico, a imobilização do ácido nucleico sobre o transdutor eletroquímico precisa ser efetiva e estável. Para tal, processos de modificação de superfícies sólidas são amplamente utilizados para a construção de sensores biológicos. Neste cenário, as plataformas nanoestruturadas são consideradas estratégias inovadoras para a modificação de transdutores através da associação racional e direcionada de materiais funcionais [11]. Dentre estes constituintes, pode-se destacar os polímeros orgânicos e as partículas nanométricas.

14. O PPy é um dos polímeros orgânicos mais utilizados em aplicações comerciais e tem possibilitado a construção de biossensores eletroquímicos com novos designs e características aprimoradas. Este material pode assumir um caráter intrinsecamente condutor, favorecendo a transferência de carga na

interface eletrodo-solução. Ademais, exibe biocompatibilidade, estabilidade ambiental, presença de grupos químicos funcionais e elevada cinética de transporte de elétrons, o que contribui significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodeteção. Entre as metodologias de síntese, ressalta-se a eletropolimerização de PPy através da oxidação do monômero pirrol em potenciais relativamente baixos [12]. Por meio deste método, a espessura e a densidade de corrente do filme de PPy podem ser controladas experimentalmente através do número de ciclos de polimerização [13]. Ademais, a síntese eletroquímica de PPy proporciona novas oportunidades para a obtenção de sistemas moleculares reproduzíveis e com baixos limites de detecção e quantificação.

15. No campo dos nanomateriais, as ZnONPs têm sido exploradas como um elemento potencial para biossensibilidade, amplamente utilizadas na fabricação de biodispositivos [14-16]. Esta nanopartícula de óxido metálico apresenta características de um material semiconductor com elevada estabilidade química e forte capacidade de adsorção. As nanoestruturas de ZnO além de possuírem elevada área superficial, eficiência catalítica e baixa toxicidade, apresentam elevada rugosidade, o que coopera para a imobilização biomoléculas sobre sua superfície. Desta forma, a presença de poros nas ZnONPs aumenta significativamente a superfície ativa das nanopartículas e contribui para uma maior sensibilidade nos sistemas analíticos [11, 15].

16. A capacidade das ZnONPs se complexarem com biopolímeros, como a Chit, tem despertado o interesse para obtenção de compósitos poliméricos particulados. A Chit é um biopolímero natural constituído por unidades de glicosamina e N-acetilglicosamina obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, frequentemente presente nas carapaças de crustáceos [17]. Este biomaterial é amplamente utilizado em aplicações tecnológicas devido suas propriedades diferenciadas [18]. Por exemplo, a Chit possui excelente capacidade de formação de filmes, alta permeabilidade, resistência mecânica, estabilidade térmica, ausência de imunogenicidade, biocompatibilidade, atóxica, biodegradabilidade, baixo custo e facilidade de obtenção. Além disso, a Chit possui grupos químicos funcionais que possibilitam a imobilização de biomoléculas e a incorporação de nanoestruturas através de interações específicas. Em adição, a Chit fornece um microambiente hidrofílico que

assegura a estabilidade das biomoléculas ancoradas [19, 20]. Particularmente, o nanocompósito Chit-ZnONP pode ser obtido a partir da dispersão de ZnONPs no interior do retículo polimérico. Estas nanopartículas são estabilizadas através de ligações de hidrogênio entre os grupos amino (-NH<sub>2</sub>) e grupos hidroxila (-OH) da molécula de Chit [21]. É interessante notar que os materiais híbridos apresentam propriedades singulares e sinérgicas entre seus constituintes e exibem promissor uso na área dos biossensores [22].

17. Diversos pesquisadores têm se dedicado ao estudo de metodologias mais eficazes para a detecção de sequências gênicas. Neste intuito, a patente CN101046461A pormenoriza um sensor eletroquímico baseado em nanotubos de carbono de múltiplas paredes, funcionalizados com grupos carboxílicos. Estas nanoestruturas de carbono, imobilizadas sobre um eletrodo de carbono vítreo, foram utilizadas como substrato para a ancoragem de segmentos de oligonucleotídeos específicos para a detecção do gene de fusão BCR/ABL. Além disso, a substância curcumina foi utilizada como indicadora de hibridização. Neste invento, foram verificadas que a elevada área de superfície e a rápida cinética de transferência de elétrons dos nanotubos de carbono contribuem, respectivamente, para uma maior fixação de biomoléculas e aumento de sensibilidade do sistema analítico. Por fim, o sensor eletroquímico usado para a detecção do oncogene apresentou elevada seletividade e limite de detecção de  $2 \times 10^{-10}$  g/mL.

18. A invenção CN101928767A também especifica um biossensor eletroquímico de DNA para detecção do gene de fusão BCR/ABL, baseado em tecnologia de ligação química e hibridização molecular. As sondas de biorreconhecimento foram projetadas com grupos amino ou mercapto 5'-terminal, destinadas à ancoragem sobre eletrodos de diferentes materiais, tais como, ouro, carbono vítreo e eletrodo de pasta de carbono. Em adição, através do uso de substâncias indicativas de hibridização, as respostas de biorreconhecimento para o gene da LMC foram evidenciadas nas formas de sinais de corrente, tensão, condutância ou resistência.

19. A invenção CN105334253A descreve um método de detecção para o oncogene PML/RAR- $\alpha$ , um biomarcador de leucemia promielocítica aguda (LPA), para através de um biossensor eletroquímico baseado em compósito de óxido de grafeno (GO) e quantum dots de carbono (C-dots). As sondas de

captura foram automontadas, por meio de ligações covalentes, sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com o nanocompósito C dots@GO e o processo de hibridização foi evidenciado usando o azul de metileno. O material híbrido demonstrou boa condutividade elétrica e numerosos grupos carboxílicos para a imobilização efetiva de sondas oligonucleotídicas. Ademais, o sistema desenvolvido exibiu elevada seletividade e sensibilidade para a identificação do oncogene PML/RAR- $\alpha$ , contribuindo para o diagnóstico clínico de LPA.

20. O invento CN101705279A fornece um biossensor eletroquímico de DNA para a identificação rápida do gene de fusão PML/RAR- $\alpha$ . O biodispositivo foi projetado sobre um eletrodo de ouro modificado com nanopartículas de ouro, sobre o qual as sondas de biorreconhecimento funcionalizadas com grupos tiol (-SH) foram conjugadas quimicamente. O gene de fusão PML/RAR- $\alpha$  foi detectado através imunoensaio eletroquímico ligado a enzima. A cadeia alvo do gene PML/RAR- $\alpha$  foi marcada com biotina e, após a formação do DNA híbrido, houve a interação com a enzima peroxidase de rábano silvestre marcada com avidina. Como substrato enzimático, foi utilizada a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. O método molecular proposto foi capaz de melhorar significativamente a sensibilidade e especificidade do sistema analítico.

21. Por fim, verifica-se que, com o intuito de aumentar a eficiência no diagnóstico e prevenção de cânceres, muitas metodologias estão sendo elaboradas. Uma delas foi a patente BR 10 2016 003449 3 A2, que se refere à construção de um sensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para a detecção da mutação gênica c.68\_69del. Esta alteração genética, localizada no cromossomo 17, está relacionada à predisposição de indivíduos ao desenvolvimento de cânceres de mama e ovário. O sensor compreende o DNA de captura (HS-ssDNA) depositado em superfície modificada com 2-mercaptoetanol para detecção do oligonucleotídeo tarDNA alvo (sequência alvo) ou ncsDNA (sequência não complementar).

22. O presente invento relata um processo metodológico para a construção de um biossensor eletroquímico livre de marcador utilizado na identificação do gene de fusão BCR/ABL. O sistema de biodetecção foi baseado no uso de eletrodo de ouro, sobre o qual foi estruturada uma nanoplataforma para

amplificação do sinal analítico. Inicialmente, um filme de PPy foi sintetizado eletroquimicamente sobre um substrato de ouro. Em seguida, através de um método de *droap-coating*, o nanocompósito Chit-ZnONP foi adicionado. Com a finalidade de tornar a plataforma PPy/Chit-ZnONP funcional, um segmento de DNA funcionalizado com grupo amino terminal foi imobilizado covalentemente sobre o eletrodo modificado. Assim, um biodispositivo constituído por PPy/Chit-ZnONP/Sonda<sub>DNA</sub> foi desenvolvido para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL. Nota-se que esta nova ferramenta eletroquímica é um método promissor para o diagnóstico de LMC, com elevada sensibilidade, especificidade, baixo custo e rápida análise.

23. Embora os documentos supracitados apresentem semelhanças em relação a patente aqui descrita, as diferenças existentes podem ser observadas na Tabela I.

Tabela I - Comparação entre os componentes característicos de cada invento.

	Presente invento	CN10104646 1A	CN10192876 7A	CN10533425 3A	CN10170527 9A	BR 10 2016 003449 3 A2
<b>Substrato de ouro</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
<b>Polímero polipirrol</b>	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Nanocompósito Chit-ZnONP</b>	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Imobilização covalente das sondas de DNA</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Uso de marcadores eletroquímicos</b>	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
<b>Transdutor eletroquímico</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Detecção do oncogene BCR/ABL</b>	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
<b>Detecção do oncogene PML/RAR-<math>\alpha</math></b>	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não

### Problemas do estado da técnica

24. A principal dificuldade encontrada quanto ao desenvolvimento da ferramenta analítica é alcançar um ótimo limite de detecção do gene de fusão BCR/ABL, ou seja, uma maior eficiência e sensibilidade da sonda para detectar a sequência alvo. Tendo isso em vista, a fim de melhorar a detecção e aumentar a quantidade de DNA híbrido, foi utilizado o polímero condutor PPy e o nanocompósito Chit-ZnONP para modificação eletrodica. Enquanto o PPy é responsável por facilitar a passagem de íons sobre a superfície eletroativa e, conseqüentemente, aumentar a condutividade elétrica, o compósito polimérico particulado disponibiliza grupos químicos para a ancoragem de biomoléculas, além de apresentar elevada área de contato. Outrossim, o nanocompósito Chit-ZnONP proporciona um microambiente hidrofílico e biocompatível, necessário para a manutenção da conformação molecular das sondas de DNA. Portanto, esta estratégia de associação de materiais funcionais possibilitou a estruturação de uma nanoplataforma com propriedades essenciais para o interfaceamento do sinal analítico.

### Objetivos da invenção

25. O principal objetivo da presente invenção é descrever um biossensor de DNA baseado em plataforma nanoestruturada de polímero condutor e compósito híbrido para a detecção eletroquímica do oncogene quimérico BCR/ABL. Especificamente, esta patente visa estabelecer um processo experimental para a construção de uma nova plataforma de interfaceamento composta por PPy e nanocompósito Chit-ZnONP, tendo a finalidade de aprimorar a capacidade de transdução e a performance bioanalítica de sistemas sensores. Além disto, pretende-se delinear o método de imobilização de oligonucleotídeos sobre a plataforma nanoestruturada e analisar sua eficiência de biodetecção.

26. O invento retratado nesta patente também objetiva o desenvolvimento de novos biodispositivos reprodutíveis, sensíveis, específicos, seletivos e com baixo custo operacional. Em particular, ressalta-se que o biossensor de DNA não necessita da utilização de marcadores moleculares, visto que as técnicas eletroquímicas empregadas revelam alterações nas propriedades elétricas da

superfície do eletrodo, tal como resistência e capacitância, gerando uma resposta específica na presença da molécula alvo.

#### Solução do problema

27. A patente dispõe, como ato inventivo, o processo de obtenção de um biossensor de DNA construído a partir da polimerização eletroquímica de PPy sobre um transdutor de ouro, seguido da automontagem do nanocompósito Chit-ZnONP sobre o eletrodo modificado. A posteriori, sondas oligonucleotídicas foram imobilizadas quimicamente, tornando o biodispositivo funcional para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL. Tal feito, ressalta o biossensor de DNA como ferramenta inovadora para a análise e detecção de genes de interesse biomédico, apresentando, especificamente, diversas vantagens em relação aos métodos convencionais para o diagnóstico de LMC.

#### Vantagens da invenção

28. A invenção apresenta um processo metodológico para fabricação de um biossensor de DNA com composição singular e inovadora. Preliminarmente, o ensaio descrito possui uma simplicidade de construção, elevada reprodutibilidade, modelo economicamente viável e passível de miniaturização. Estas propriedades oportunizam a transferência de tecnologia para o desenvolvimento de dispositivos *point of care* e chips bioanalíticos, frequentemente utilizados para o diagnóstico rápido de distintas patologias.

29. Uma das vantagens ressaltadas na presente patente foi a modificação química do transdutor metálico através da construção de uma plataforma nanoestruturada baseada em polímero condutor e material híbrido. Em adição, por meio de ligações covalentes, sondas de DNA foram conjugadas sobre a superfície do eletrodo modificado. Considera-se que a imobilização química de moléculas biológicas sobre substratos sólidos é uma das técnicas predominantes para a obtenção de biossensores efetivos. Destaca-se que, esta forma de ancoragem proporciona uma maior solidez e durabilidade ao sistema sensor, através da redução do processo de lixiviamento da plataforma nanoestruturada e das biomoléculas de reconhecimento.

30. Em vista dos benefícios, os filmes de polímero condutor (PPy) foram depositados diretamente no substrato de trabalho através de polimerização eletroquímica. Esta técnica fundamenta-se na oxidação do monômero pirrol em baixos potenciais e formação de radicais cátions, responsáveis pela reação de polimerização. Logo, através desta estratégia, filmes poliméricos uniformes, com elevada taxa de transferência de elétrons e espessura controlada experimentalmente foram obtidos.

31. O nanocompósito Chit-ZnONP foi capaz de formar uma monocamada automontada sobre toda a superfície do filme polimérico, através de um processo termodinamicamente favorável. Este fato é devido aos grupos hidroxila (-OH) e amino (-NH<sub>2</sub>) presentes na estrutura molecular da Chit que podem realizar ligações de hidrogênio com a amina secundária do polímero PPy. Estes mesmos grupamentos funcionais do nanocompósito híbrido possibilitam a ancoragem química de biomoléculas, como as sondas de DNA. Estes elementos foram imobilizados de maneira previsível sobre a plataforma nanoestruturada, com orientação específica, estabilidade e acessibilidade a sequência alvo. Além disso, a adsorção não-específica foi minimizada e a capacidade de biodeteção da molécula receptora mantida.

32. Nota-se que as sondas de DNA podem discriminar mutações nas sequências alvo na ordem de um único nucleotídeo. Portanto, seu uso como elemento de biorreconhecimento confere aos sistemas de detecção elevada especificidade e seletividade. Além do mais, protocolos metodológicos podem ser utilizados para promover a de-hibridização das sondas de DNA após um ensaio analítico, o que torna os biossensores de DNA reutilizáveis.

33. O biossensor de DNA eletroquímico relatado nesta invenção gera resultados satisfatórios frente a diferentes concentrações de DNA alvo (gene de fusão BCR/ABL), sendo reprodutível e de fácil manuseio. Ademais, as respostas analíticas foram obtidas rapidamente, em um intervalo de 15 minutos, sem marcadores adicionais e com elevada sensibilidade, especificidade e seletividade. Tais características são consideradas vantajosas, pois, pela simplicidade e eficiência, permite sua aplicação não apenas em laboratórios de ensino e pesquisa, mas também em laboratórios de análises clínicas.

A novidade e o efeito técnico alcançado

34. A novidade da presente invenção está relacionada ao processo experimental utilizado para a construção de um dispositivo nanoestruturado aplicável ao diagnóstico clínico do oncogene quimérico BCR/ABL. Através da inventividade, um sistema transdutor modificado com filme de PPy, composto híbrido e sequências de oligonucleotídeos foi desenvolvido com elevada robustez e performance de biossensoriamento. Outrossim, a estratégia inovadora de ancoragem molecular, mediante o uso da plataforma de interfaceamento PPy/Chit-ZnONP, permitiu a imobilização orientada das sondas de DNA e a manutenção de sua capacidade de detecção frente ao oncogene leucêmico. É importante frisar que esta metodologia não foi identificada através da busca de anterioridade.

#### Descrição detalhada

35. Sem o intuito de limitar o escopo da invenção, os exemplos a seguir são utilizados apenas para ilustrar uma entre as inúmeras formas de se realizar a preparação do biossensor eletroquímico ao qual a presente patente se refere.

#### Síntese do nanocompósito Chit-ZnONP

36. Para a síntese do composto polimérico particulado, 50 mg de quitosana foram dissolvidas em 10 mL de ácido acético a 1%. Separadamente, 10 mg de ZnONPs foram dispersas em 10 mL de ácido acético a 1%. Posteriormente, a dispersão de ZnONPs foi acrescentada na solução transparente de Chit em uma proporção de 1:1 (v:v). A mistura final foi mantida por 30 minutos sob agitação magnética a temperatura ambiente, seguida de sonicação com ondas de ultrassom por aproximadamente 1 hora [21].

#### Análises eletroquímicas

37. Em primeiro momento, consegue-se chegar à invenção através do uso das técnicas eletroquímicas de VC e EIE. As medidas eletroanalíticas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N através

de um software de interfaceamento NOVA 1.11 (Metrohm Autolab, The Netherlands). Em associação, foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  (1:1) a 10mM em PBS (pH 7,4), atuando como sonda redox. O eletrodo de ouro foi utilizado como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina foram usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra referência. Os voltamogramas cíclicos para caracterização interfacial foram obtidos em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V e velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Os espectros de impedância foram registrados em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. Todas as análises eletroquímicas foram realizadas em triplicatas, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

#### Estruturação da plataforma biossensível

38. O procedimento subsequente de preparação da plataforma biossensível sobre o transdutor metálico e a análise de sua capacidade de biorreconhecimento são relatados a seguir. Inicialmente, o eletrodo de ouro ( $\varnothing = 2 \text{ mm}$ ) foi cuidadosamente polido em um disco de feltro com uma suspensão de alumina ( $Al_2O_3$ ) com granulometria de  $0,05 \mu\text{m}$ . Em seguida, enxaguado com água ultrapura, submetido a um banho de ultrassom durante 10 minutos para a remoção de partículas residuais e seco ao ar.

39. A primeira etapa de montagem da plataforma consiste na eletropolimerização de pirrol e obtenção do filme polimérico através da técnica de VC, realizando-se seis ciclos voltamétricos em uma faixa de potencial de -0,4 a +1,0 V e velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . O eletrodo de trabalho foi imerso em 20 ml de solução de HCl a 0,5 M contendo pirrol a 30 mM. A segunda etapa refere-se à adsorção do nanocompósito Chit-ZnONP sobre o filme de PPy. Nesta etapa, foram adicionados  $2 \mu\text{L}$  da solução de Chit-ZnONP por 30 minutos. Após obter a plataforma nanoestruturada de PPy/Chit-ZnONP, foi realizada a terceira etapa que se reporta a imobilização química de sondas de DNA para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL. Primeiramente,  $2 \mu\text{L}$  de glutaraldeído a 0,5% foram adicionados sobre a plataforma nanoestruturada por

15 minutos. Posteriormente, 2  $\mu\text{L}$  de uma solução de oligonucleotídeos a 25  $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$  foram acrescentados por 15 minutos para a construção do nanossistema de DNA. O glutaraldeído atuou como um agente reticulante biofuncional, possibilitando a formação de ligações químicas entre os grupos amino do biopolímero Chit e os grupos amino das sondas de DNA. Por fim, a quarta etapa compreende o bloqueio dos sítios inespecíficos do biossensor com moléculas de albumina do soro bovino (BSA). Nesta etapa, foram acrescentados 2  $\mu\text{L}$  de uma solução de BSA a 1% (pH 7,4) sobre a superfície do eletrodo modificado por 30 segundos. Logo, através deste processo metodológico, o biossensor eletroquímico baseado em PPy/Chit-ZnONP/Sonda<sub>DNA</sub>/BSA foi desenvolvido (Figura 1).

#### Estudo de bioatividade

40. A sensibilidade e especificidade do biossensor eletroquímico foram avaliadas através de estudos de hibridização com plasmídeos recombinantes contendo o oncogene quimérico BCR/ABL em variáveis concentrações. Em cada análise, o biossensor foi exposto a 2  $\mu\text{L}$  da amostra a ser testada por 15 min para promover o processo de biorreconhecimento. Ressalta-se que, previamente, as amostras biológicas foram aquecidas a 94 °C para a desnaturação do DNA. Em adição, as diluições das amostras foram preparadas com solução salina de tampão fosfato (PBS; pH 7,4) e mantidas congeladas.

#### Caracterização eletroquímica do biossensor nanoestruturado

41. A Figura 2a apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos durante a polimerização eletroquímica do pirrol. Ao realizar 15 ciclos de varredura, foi constatado que a eletropolimerização atuou aumentando a condutividade da superfície do eletrodo de trabalho até o 6º ciclo (Figura 2a). A partir do 7º ciclo de eletropolimerização, as correntes de pico diminuíram, ocorrendo um decréscimo na resposta amperométrica do sistema. Presume-se que este fato esteja relacionado à superoxidação do filme polimérico e à diminuição da quantidade de monômeros de pirrol que foram consumidos durante a síntese [23]. Logo, ao realizar a análise voltamétrica, pode-se verificar que o 6º ciclo de

polimerização é um parâmetro ideal para a modificação da superfície de trabalho e obtenção do filme polimérico de PPy, devido sua elevada condutividade e reprodutibilidade.

42. As etapas de construção do biossensor de DNA são apresentadas nas Figuras 2b e 2c. Observa-se que o voltamograma cíclico (Figura 2b) e o espectro de impedância (Figura 2c) para o eletrodo de ouro após a eletropolimerização do monômero pirrol apresenta uma elevada densidade de corrente e diminuta resposta impedimétrica ( $R_{CT} = 0,512 \pm 0,004 \text{ k}\Omega$ ). É importante evidenciar que a oxidação do pirrol na superfície eletroativa de ouro leva à formação de um filme polimérico com alta estabilidade química e elevada condutividade elétrica. Devido estas características, o PPy é capaz de aumentar a sensibilidade e seletividade de sistemas sensores [12, 23].

43. Prosseguindo nas etapas de montagem da plataforma nanoestruturada, o compósito híbrido Chit-ZnONP foi adicionado sobre o eletrodo de ouro previamente modificado com PPy. De acordo com as Figuras 2b e 2c, nota-se, respectivamente, um decréscimo nas correntes de pico anódica e catódica e um aumento na resistência interfacial ( $R_{CT} = 8,483 \pm 0,111 \text{ k}\Omega$ ). Estes resultados indicam a ordenação do nanocompósito sobre o filme polimérico, impedindo, de forma moderada, as reações redox na dupla camada elétrica. Destaca-se que, a presença do nanomaterial híbrido é fundamental para aumentar a área superficial e possibilitar a imobilização de um maior número de sondas DNA, o que assegura um efetivo processo de biorreconhecimento.

44. Ao realizar a imobilização química das sondas de DNA sobre o compósito Chit-ZnONP, pode-se observar uma menor resposta condutimétrica com uma taxa reduzida de transferência de elétrons ( $R_{CT} = 10,867 \pm 0,153 \text{ k}\Omega$ ). Este fenômeno está relacionado à uma penetrabilidade reduzida dos eletrólitos no sistema sensor. Isto ocorre devido à repulsão eletrostática entre os grupos fosfato das sondas de DNA e as cargas negativas dos íons  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  /  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , contribuindo assim, para o impedimento parcial das reações de oxido-redução em regiões próximas à superfície do eletrodo [24]. Como presumido, o uso de moléculas BSA para o bloqueio dos sítios inespecíficos do nanossistema de DNA ocasionou uma redução nas correntes voltamétricas e um aumento na resistividade ( $R_{CT} = 12,567 \pm 0,451 \text{ k}\Omega$ ). Portanto, através destas

caracterizações eletroquímicas, foi possível assegurar a apropriada construção do sensor biológico sobre uma superfície metálica.

### Estudo de bioatividade

45. O estudo de detecção do oncogene quimérico BCR/ABL envolve o monitoramento de variações na passagem de corrente entre o eletrodo biomodificado e a camada adjacente de solução eletrolítica. A performance analítica do biossensor de DNA foi avaliada através de hibridização específica com o oncogene quimérico BCR/ABL presente em plasmídeos recombinantes. Como evidenciado na Figura 3a, após a exposição do sistema PPy/Chit-ZnONP/Sonda<sub>DNA</sub>/BSA às amostras plasmidiais, uma redução do sinal amperométrico e uma diminuição das áreas voltamétricas foram constatadas. Verifica-se que, para as maiores concentrações do gene de fusão (de 13,88 pM a 138,80 aM) houve um decréscimo linear das correntes de pico anódicas, como apresentado na Tabela II e Figura 3b.

**Tabela II** - Variação da corrente amperométrica anódica do biossensor após sua exposição a amostras plasmidiais contendo o oncogene quimérico BCR/ABL. As análises foram realizadas em triplicatas e os valores são apresentados como a média  $\pm$  o desvio padrão.

Modificação eletródica	Concentração do alvo biológico	Corrente amperométrica antes da hibridação ( $1/I_b \mu A^{-1}$ )	Corrente amperométrica depois da hibridação ( $1/I_a \mu A^{-1}$ )	$\Delta I$ (%)
PPy	-	34,771 $\pm$ 1,134	-	-
PPy/Chit-ZnONP	-	19,946 $\pm$ 1,145	-	-
PPy/Chit-ZnONP/Sonda <sub>DNA</sub>	-	12,264 $\pm$ 1,209	-	-
PPy/Chit-ZnONP/Sonda <sub>DNA</sub> /BSA	-	8,654 $\pm$ 0,365	-	-
Biossensor	-	8,654 $\pm$ 0,365	-	-
Biossensor/Oncogene <sub>BCR/ABL</sub>	138,800 aM	-	7,498 $\pm$ 0,050	15,418 $\pm$ 0,771

Biossensor/Oncogene <sub>BCR/ABL</sub>	1,388 fM	-	6,346 ± 0,309	36,593 ± 6,702
Biossensor/Oncogene <sub>BCR/ABL</sub>	13,880 fM	-	4,506 ± 0,274	92,555 ± 11,703
Biossensor/Oncogene <sub>BCR/ABL</sub>	138,800 fM	-	2,202 ± 0,282	297,561 ± 53,444
Biossensor/Oncogene <sub>BCR/ABL</sub>	1,388 pM	-	1,260 ± 0,056	587,568 ± 30,831
Biossensor/Oncogene <sub>BCR/ABL</sub>	13,880 pM	-	0,433 ± 0,001	1898,525 ± 3,166

46. Por meio do teste de calibração (Figura 3b), foi obtida uma equação de regressão linear [ $y = 6,202 - 0,605 \ln(x)$ ] com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,99. Onde x corresponde a concentração do DNA alvo e y refere-se ao valor de corrente de pico anódica. Ressalta-se que a linearização do eixo x foi realizada em escala logarítmica da concentração. Os dados analíticos inferem a elevada sensibilidade do biodispositivo nanoestruturado, que apresentou um limite de detecção de 1,2 fM e um limite de quantificação de 3,6 fM. Estes parâmetros foram calculados através das equações descritas abaixo.

$$\text{Limite de detecção} = 3,3 \times \frac{SD}{m} \quad (1)$$

$$\text{Limite de quantificação} = 10 \times \frac{SD}{m} \quad (2)$$

47. Onde, SD é o desvio padrão do branco e m é a inclinação da curva analítica. A capacidade de biorreconhecimento também foi analisada em função da variação percentual da corrente de pico anódica ( $\Delta I$ ) [24], descrita a seguir.

$$\Delta I(\%) = \frac{I_b - I_a}{I_b} \times 100 \quad (3)$$

48. Onde  $I_b$  e  $I_a$  correspondem, respectivamente, a corrente de pico antes e após o processo de hibridização. Na Tabela II, os valores de  $\Delta I$  foram demonstrados para o biossensor após sua exposição à diferentes concentrações do oncogene quimérico BCR/ABL. Pode-se constatar que, com o aumento das concentrações plasmidiais houve um aumento da variação de corrente (de

15,42% a 1898,52%). De acordo com relatos na literatura [25, 26], o fenômeno observado indica a formação de DNA híbrido sobre o biodispositivo, uma vez que as duplas fitas de DNA apresentam caráter dielétrico e dificulta o processo de oxido-redução da sonda redox.

49. Tendo em vista que as técnicas convencionais voltadas para a identificação da LMC apresentam desvantagens, como o diagnóstico tardio e sensibilidade limitada, a elaboração de uma nova ferramenta para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL e o monitoramento da doença residual mínima em LMC é de extrema importância para promoção da saúde do paciente portador da patologia. Todavia, o invento apresentando nesta patente pode ser considerado uma ferramenta promissora para diagnósticos biomédicos, como a detecção molecular do oncogene quimérico BCR/ABL. Através da associação de materiais funcionais e sinergia entre suas propriedades físicas e químicas, uma plataforma nanoestruturada baseada em polímero PPy e compósito híbrido Chit-ZnONP foi obtida, a qual possibilitou uma amplificação da área superficial com eficiente transferência de elétrons. O biossensor de DNA demonstrou ser um dispositivo analítico com elevada sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, baixos limites de detecção e quantificação, sendo assim, um método eletroquímico alternativo para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL e diagnóstico de LMC.

## REFERÊNCIAS

- [1] R. Pallotta, D.F. Lima, F. Cal, M. Almeida, M. Conchon, Treatment of chronic myelogenous leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation with imatinib mesylate: report of three cases, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 28(2006) 157-60.
- [2] S. Faderl, M. Talpaz, Z. Estrov, S. O'Brien, R. Kurzrock, H.M. Kantarjian, The biology of chronic myeloid leukemia, *New England Journal of Medicine*, 341(1999) 164-72.
- [3] A.S. Advani, A.M. Pendergast, Bcr–Abl variants: biological and clinical aspects, *Leukemia Research*, 26(2002) 713-20.
- [4] A. Sharma, C.M. Pandey, G. Sumana, U. Soni, S. Sapra, A.K. Srivastava, et al., Chitosan encapsulated quantum dots platform for leukemia detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 38(2012) 107-13.
- [5] L. Wang, E. Hua, M. Liang, C. Ma, Z. Liu, S. Sheng, et al., Graphene sheets, polyaniline and AuNPs based DNA sensor for electrochemical determination of BCR/ABL fusion gene with functional hairpin probe, *Biosensors and Bioelectronics*, 51(2014) 201-7.
- [6] C.C.S. Yeung, D. Egan, J.P. Radich, Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: present and future, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16(2016) 1083-91.
- [7] K.Y. Avelino, R.R. Silva, A.G. da Silva Junior, M.D. Oliveira, C.A. Andrade, Smart applications of bionanosensors for BCR/ABL fusion gene detection in leukemia, *Journal of King Saud University-Science*, 29(2017) 413-23.
- [8] J. Yang, W. Zhang, Indicator-free impedimetric detection of BCR/ABL fusion gene based on ordered FePt nanoparticle-decorated electrochemically reduced graphene oxide, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 18(2014) 2863-8.
- [9] A. Sassolas, B.D. Leca-Bouvier, L.J. Blum, DNA Biosensors and Microarrays, *Chemical Reviews*, 108(2008) 109-39.
- [10] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, Electrochemical DNA sensors, *Nature biotechnology*, 21(2003) 1192.
- [11] K. Rovina, S. Siddiquee, Electrochemical sensor based rapid determination of melamine using ionic liquid/zinc oxide nanoparticles/chitosan/gold electrode, *Food Control*, 59(2016) 801-8.
- [12] M. Gerard, A. Chaubey, B. Malhotra, Application of conducting polymers to biosensors, *Biosensors and bioelectronics*, 17(2002) 345-59.
- [13] M. Ates, A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers, *Materials Science and Engineering: C*, 33(2013) 1853-9.
- [14] N.P. Shetti, S.D. Bukkitgar, R.R. Kakarla, C. Reddy, T.M. Aminabhavi, ZnO-based nanostructured electrodes for electrochemical sensors and biosensors in biomedical applications, *Biosensors and Bioelectronics*, (2019) 111417.
- [15] S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosensors and Bioelectronics*, 70(2015) 498-503.
- [16] K.Y.P. dos Santos Avelino, I.A.M. Frías, N. Lucena-Silva, C.A.S. de Andrade, M.D.L. de Oliveira, Impedimetric gene assay for BCR/ABL transcripts in plasmids of patients with chronic myeloid leukemia, *Microchimica Acta*, 185(2018) 415.
- [17] B.D. Malhotra, A. Kaushik, Metal oxide–chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor, *Thin Solid Films*, 518(2009) 614-20.

- [18] W. Suginta, P. Khunkaewla, A. Schulte, Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan, *Chemical reviews*, 113(2013) 5458-79.
- [19] M.K. Patel, M.A. Ali, M. Zafaryab, V.V. Agrawal, M.M.A. Rizvi, Z.A. Ansari, et al., Biocompatible nanostructured magnesium oxide-chitosan platform for genosensing application, *Biosensors and Bioelectronics*, 45(2013) 181-8.
- [20] X. Wang, S. Uchiyama, Polymers for biosensors construction, *State of the Art in Biosensors—General Aspects*, 3(2013) 67-84.
- [21] R. Khan, A. Kaushik, P.R. Solanki, A.A. Ansari, M.K. Pandey, B. Malhotra, Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 616(2008) 207-13.
- [22] S. Guo, S. Dong, Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(2009) 96-109.
- [23] M. Mahmoudian, W. Basirun, Y. Alias, A.K. Zak, Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles, *Thin Solid Films*, 520(2011) 258-65.
- [24] K.Y.P.S. Avelino, I.A.M. Frias, N. Lucena-Silva, R.G. Gomes, C.P. de Melo, M.D.L. Oliveira, et al., Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148(2016) 576-84.
- [25] A. Benvidi, A. Dehghani Firouzabadi, M. Dehghan Tezerjani, S.M. Moshtaghiun, M. Mazloum-Ardakani, A. Ansarin, A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 750(2015) 57-64.
- [26] Y. Ye, J. Gao, H. Zhuang, H. Zheng, H. Sun, Y. Ye, et al., Electrochemical gene sensor based on a glassy carbon electrode modified with hemin-functionalized reduced graphene oxide and gold nanoparticle-immobilized probe DNA, *Microchimica Acta*, 184(2017) 245-52.

## REIVINDICAÇÕES

01. PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO caracterizada pela presença dos componentes a seguir: a) eletrodo de trabalho com superfície eletroativa de ouro; b) filme condutor de polipirrol (PPy); c) compósito híbrido de quitosana e nanopartículas de óxido de zinco (Chit-ZnONP); d) agente de acoplamento glutaraldeído; e) sondas de DNA; e f) moléculas de albumina do soro bovino (BSA).

02. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicação 1, caracterizada por eletrodos conectados a um potenciostato/galvanostato com gerador de frequência para mensuração voltamétrica e impedimétrica.

03. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizada por aplicar a técnica de voltametria cíclica com potencial de varredura entre -0,2 e 0,7 V e velocidade de 50 mV s<sup>-1</sup>.

04. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizada por aplicar a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica com uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz e potencial de amplitude alternada de 10 mV.

05. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizada por possuir um sistema de três eletrodos dispostos em uma gaiola de Faraday.

06. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2 e 5, caracterizada por possuir eletrodo de trabalho, eletrodo de referência Ag/AgCl saturado com KCl 3M e contra-eletrodo.

07. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5 e 6, caracterizada por ter os eletrodos imersos em uma solução de 10 mM de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/ [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> em tampão fosfato para a mensuração eletroquímica.

08. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5 e 6 caracterizada por ser sintetizada a partir da imersão do eletrodo de trabalho em solução de ácido clorídrico (HCl) contendo o monômero pirrol, seguido da aplicação de seis ciclos de polimerização voltamétrica em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com uma velocidade de varredura de 10 a 100 mV s<sup>-1</sup>.

09. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6 e 8, caracterizada pela adição do compósito híbrido Chit-ZnONP sobre o eletrodo de trabalho modificado com o filme de PPy, com posterior lavagem em água ultrapura para remoção de moléculas não ligadas.

10. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 9, caracterizada pelo uso do compósito híbrido Chit-ZnONP sintetizado a partir da dissolução de 50 mg de quitosana em 10 mL de ácido acético a 1% e dispersão de 10 mg de ZnONPs em ácido acético a 1%; posteriormente, a dispersão de ZnONPs foi acrescentada na solução transparente de Chit em uma proporção de 1:1 (v:v) e a mistura final foi mantida por 30 minutos sob agitação magnética a temperatura ambiente, seguida de sonicação com ondas de ultrassom por aproximadamente 1 hora.

11. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6, 8 e 9, caracterizada pela adição de glutaraldeído sobre a plataforma nanoestruturada PPy/Chit-ZnONP, com posterior acréscimo de uma solução de oligonucleotídeos para a construção do nanossistema de DNA.

12. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9 e 11, caracterizada pela adição de uma solução de BSA sobre a superfície do eletrodo modificado.

13. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11 e 12, caracterizada por compreender: (a) ensaio de bioatividade; (b) inserção do sistema de biodeteção em célula eletroquímica; (c) mensuração do

comportamento eletroquímico do sistema após sua exposição ao analito-alvo; (d) determinação de mudanças nos valores de correntes de pico anódicas e catódicas, bem como alterações nas áreas voltamétricas; e e) determinação da resistência a transferência de carga através de simulação teórica dos dados experimentais em circuito equivalente de Randles para indicar a presença ou ausência do analito-alvo na amostra teste.

14. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito na reivindicação 13, caracterizado por avaliar o analito-alvo que corresponde a sequência de nucleotídeos do oncogene quimérico BCR/ABL inserido em plasmídeo recombinante.

15. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 13 e 14, caracterizado por apresentar um limite de detecção de 1,2 fM.

16. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 13, 14 e 15, caracterizado por apresentar um limite de quantificação de 3,6 fM.

17. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12 e 13, caracterizado pelo uso de diferentes tipos de substratos eletroativos para a construção da plataforma de biossensoriamento PPy/Chit-ZnONP/Sonda<sub>DNA</sub>/BSA, tais como eletrodos convencionais de prata, carbono vítreo, óxido de índio dopado com estanho (ITO), eletrodos interdigitados e impressos.

18. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13 e 14, caracterizado por ser capaz de reconhecer diferentes sequências oligonucleotídicas de acordo com a natureza da sonda de biorreconhecimento, tais como genótipo humano, viral, bacteriano e fúngico.

Figura 1

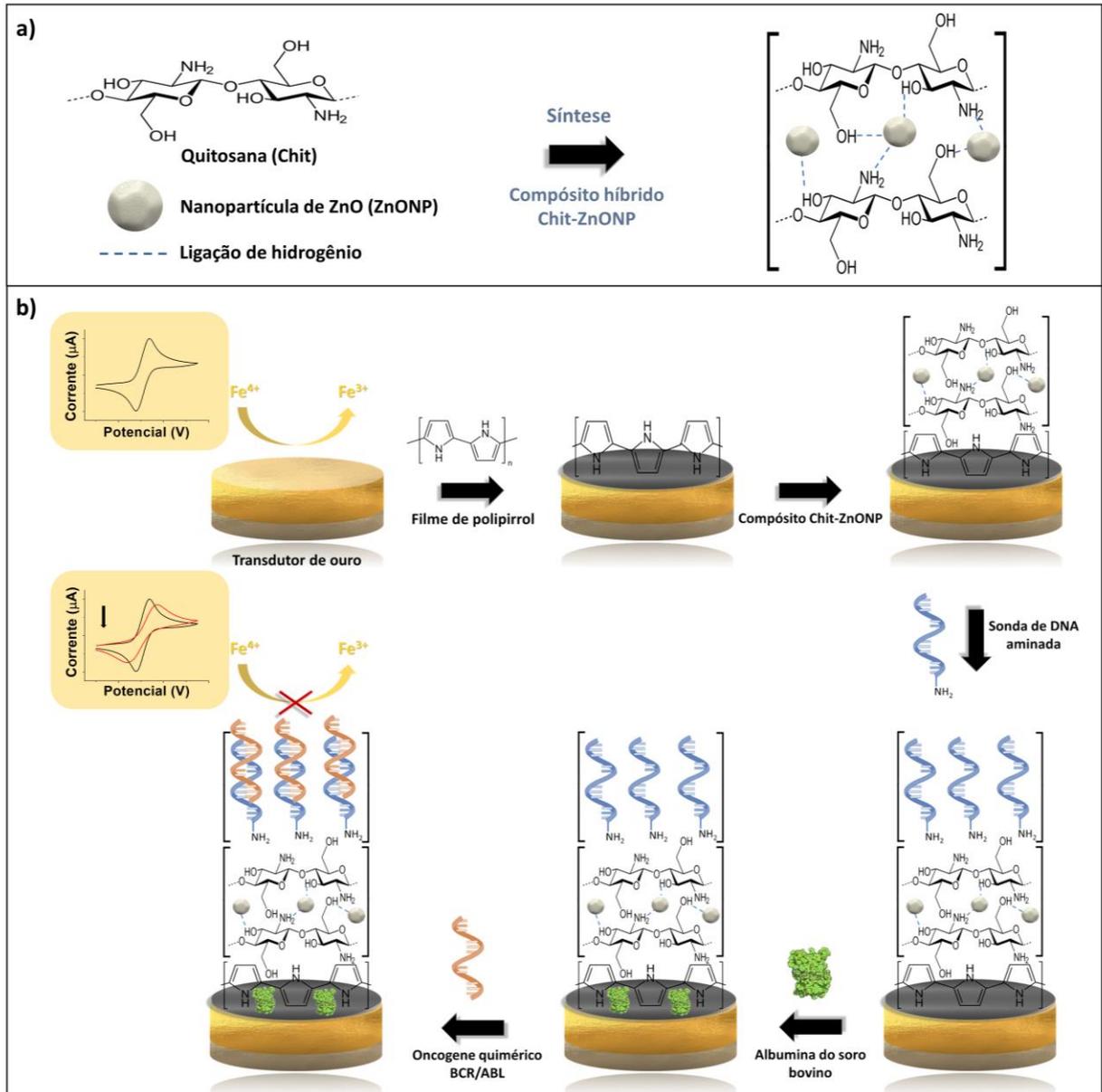


Figura 2

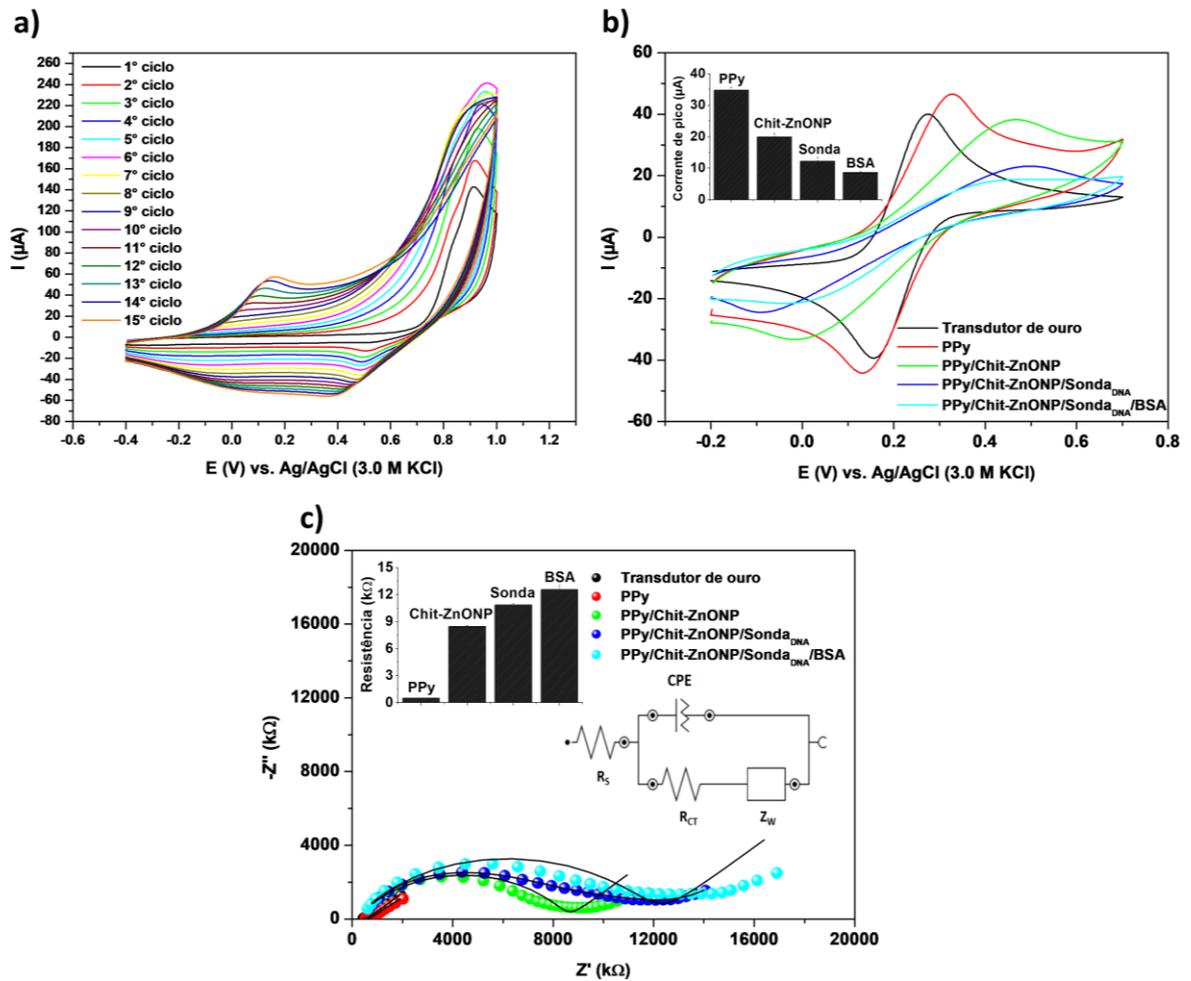
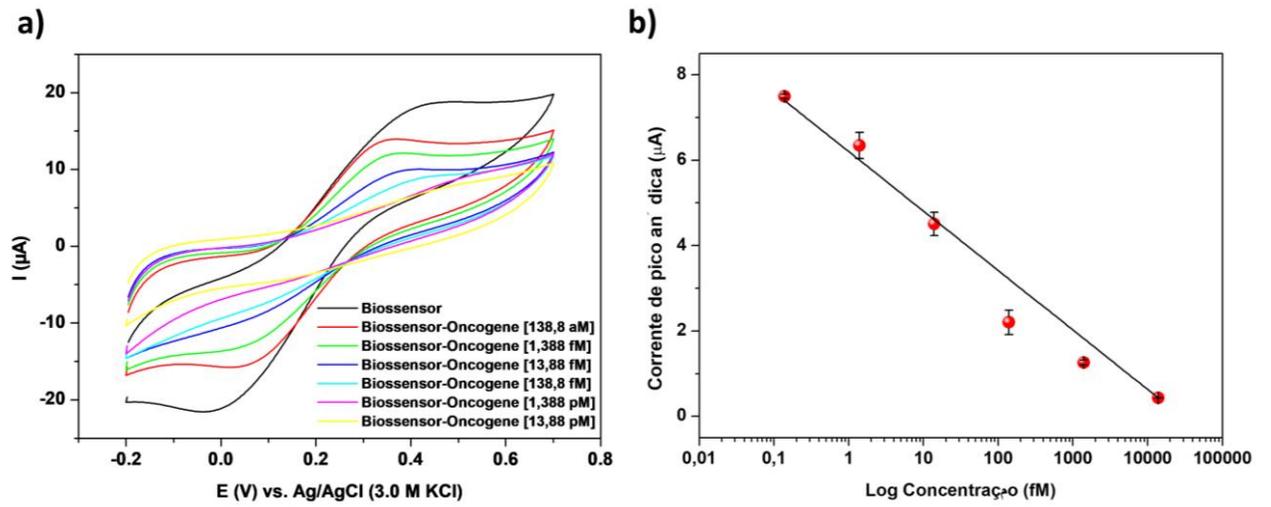


Figura 3



## RESUMO

**PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO** obtida por metodologia simples para fabricação de um dispositivo eletroquímico utilizável na identificação do oncogene quimérico BCR/ABL. Objetivando-se aprimorar o desempenho analítico do sensor biológico, uma plataforma nanoestruturada foi construída sobre a área ativa de um eletrodo metálico e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada no polímero polipirrol (PPy) e compósito híbrido formado por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco (Chit-ZnONP). O PPy pode assumir um caráter intrinsecamente condutor, favorecendo a transferência de carga na interface eletrodo-solução e contribuindo significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodeteção. O compósito híbrido Chit-ZnONP disponibiliza grupos químicos para a ancoragem de biomoléculas, além de apresentar elevada área de contato. O nanocompósito Chit-ZnONP proporciona um microambiente hidrofílico e biocompatível, necessário para a manutenção da conformação molecular de biomoléculas imobilizadas. A fim de tornar a plataforma nanoestruturada aplicável ao diagnóstico de oncogene quimérico BCR/ABL, sequências curtas de oligonucleotídeos (denominadas de sondas de DNA) foram imobilizadas quimicamente sobre os transdutores modificados. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para a caracterização das etapas de modificação do eletrodo de trabalho e o monitoramento da hibridização molecular. O invento ressalta o biossensor de DNA como ferramenta para a análise e detecção de genes de interesse biomédico, apresentando, especificamente, elevada sensibilidade (limite de detecção de 1,2 fM), simplicidade de construção, elevada reprodutibilidade, e passível de miniaturização.