



* B R 1 0 2 0 2 2 0 1 8 1 5 9 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022018159-4 A2

(22) Data do Depósito: 12/09/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
26/03/2024

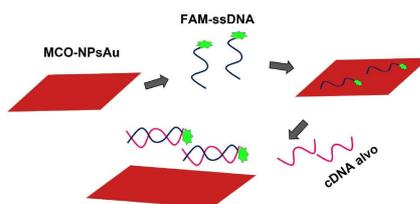
(54) **Título:** USO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO BIOPLATAFORMA SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

(51) **Int. Cl.:** C12Q 1/6825; C12Q 1/6837; B01J 20/32; C12R 1/01.

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

(72) **Inventor(es):** CELSO PINTO DE MELO; WINNIE QUEIROZ BRANDÃO; GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI; ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA; LIZETH CAROLINA MOJICA SANCHEZ; BRUNA GOMES MACIEL; HÉRICA DIAS DA ROCHA.

(57) **Resumo:** USO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO BIOPLATAFORMA SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS. A presente invenção descreve o uso de membranas da casca do ovo de galinha (MCO) modificadas pela deposição de nanopartículas de ouro (NPsAu) como uma bioplataforma sustentável para a imobilização e subsequente detecção de sequências de DNA de patógenos, como a *Leptospira interrogans*. O princípio de detecção se baseia na imobilização direta das cadeias de fita simples de DNA marcadas com um fluoróforo (FAM-ssDNA) através de interações entre as nucleobases do ssDNA e as nanopartículas de ouro, de forma esférica. A hibridização ocorre após o sistema (MCO-NPsAu/FAM-ssDNA) entrar em contato a sequência de DNA alvo complementar (cDNA), quando a interação é então enfraquecida e ocorre a dessorção do dsDNA (cadeias de fita dupla de DNA), o que leva ao aparecimento de um forte sinal de fluorescência. Este tipo de biossensores pode vir a se tornar uma excelente alternativa de dispositivos simples, eficientes e sensíveis para o diagnóstico precoce de doenças, o que facilitaria a tomada de decisões médicas rápidas pelos profissionais de saúde e, consequentemente, o tratamento da doença em seu estágio inicial. Adicionalmente, essa metodologia (...).



**USO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM
NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO BIOPLATAFORMA SUSTENTÁVEL
PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

[001] A presente invenção descreve o uso de membranas da casca do ovo de galinha (MCO) modificadas pela deposição de nanopartículas de ouro (NPsAu) como uma bioplataforma sustentável para a imobilização e subsequente detecção de sequências de DNA de patógenos, como a *Leptospira interrogans*. O princípio de detecção se baseia na imobilização direta das cadeias de fita simples de DNA marcadas com um fluoróforo (FAM-ssDNA) através de interações entre as nucleobases do ssDNA e as nanopartículas de ouro, de forma esférica. A hibridização ocorre após o sistema (MCO-NPsAu/FAM-ssDNA) entrar em contato a sequência de DNA alvo complementar (cDNA), quando a interação é então enfraquecida e ocorre a dessorção do dsDNA (cadeias de fita dupla de DNA), o que leva ao aparecimento de um forte sinal de fluorescência. Este tipo de biossensores pode vir a se tornar uma excelente alternativa de dispositivos simples, eficientes e sensíveis para o diagnóstico precoce de doenças, o que facilitaria a tomada de decisões médicas rápidas pelos profissionais de saúde e, conseqüentemente, o tratamento da doença em seu estágio inicial. Adicionalmente, essa metodologia de rápida identificação de patógenos pode ser de grande valor para a diminuição de custos na agricultura e nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

Antecedentes da invenção

[002] Tem sido crescente a busca pelo desenvolvimento de novos biossensores¹ que sejam simples, econômicos, eficientes e de fácil operação e portabilidade para a detecção de ácidos nucleicos. Tais dispositivos, que têm despertado um grande interesse no campo científico e tecnológico, são de grande significância para o diagnóstico de agentes patogênicos em áreas como análises clínicas ou ambientais e nas indústrias alimentícias.

[003] O DNA é uma biomolécula que tem a capacidade de automontagem, formando uma hélice dupla de cadeias complementares. Esse fenômeno tem sido utilizado como princípio para a construção de dispositivos baseados em ácidos nucleicos que permitam a detecção altamente

¹ Biossensores: São sistemas capazes de fornecer informações analíticas quantitativas específicas que combinam um elemento de reconhecimento biológico com um transdutor físico.

específica de sequências de DNA. A depender do dispositivo, um sinal – que, entre outros, poderá ser óptico, eletroquímico, ou térmico - irá ser detectado quando ocorrer a hibridização. Para realizar o processo de reconhecimento do alvo, alguns desses métodos de detecção exigem metodologias complicadas, além do uso de reagentes de alto custo, o que torna mais difícil, por exemplo, a utilização de dispositivos desse tipo por centros de atendimento primário de diagnóstico. Por essa razão, ao longo dos últimos anos tem sido bastante explorado o desenvolvimento de biossensores baseados em nanomateriais, como nanopartículas de ouro, que apresentam propriedades ópticas únicas, além de ótima sensibilidade e especificidade na detecção de biomoléculas.

[004] Dessa forma, tem se tornado crescente a busca pela construção de novos biossensores fluorescentes simples, que sejam econômicos, eficientes e de fácil operação e portabilidade para a detecção de ácidos nucleicos. Essas características vantajosas são de grande importância, por exemplo, para o diagnóstico precoce de doenças infecciosas, ao permitir um mais rápido início do tratamento. Basicamente, neste tipo de sistema na maioria das vezes são utilizados nanomateriais que permitem a imobilização de sondas de ssDNA (cadeias de fita simples de DNA) marcadas com um fluoróforo, um processo que causa a extinção da fluorescência. Quando esse sistema (nanomaterial/fluoróforo-ssDNA) entra em contato com as fitas alvo complementar, ocorre a hibridização da sonda com o seu alvo, o que promove a liberação da sonda marcada e, conseqüentemente, a recuperação do sinal de fluorescência. Na **Tabela 1**, são listados exemplos de artigos e patentes que relatam o uso de alguns materiais (como filmes nanoestruturados, membranas funcionalizadas, nanopartículas etc.) usados em sensoriamento de ácidos nucleicos.

TABELA 1. PATENTES E ARTIGOS DE DIFERENTES PLATAFORMAS PARA A DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

ARTIGO/PATENTE	Plataforma	Meio de detecção	Tipo de biomolécula
US6613528B2	Filmes de celulose	Soluções aquosas ou biológicas	Ácidos nucleicos
PEDRO et al. (2019)	Filmes PET/ PAni ou PPI	Soluções aquosas e complexas	DNA
NASCIMENTO et al. (2021)	Filmes PET/PAni-PPI ou PPI-PAni	Soluções aquosas	DNA
YANG et al. (2015)	MOF	Soluções aquosas	DNA-RNA

SONG et al. (2015)	NPs α -Fe ₂ O ₃	Soluções aquosas	DNA-miRNA
CN104263833A	Membranas de Nylon	Soluções aquosas	DNA
BÜLBÜL et al. (2018)	Nanocéria	Soluções aquosas	DNA
LOO et al. (2016)	cCQD quantum dots	Soluções aquosas	DNA
LU et al. (2009)	Óxido de Grafeno	Soluções aquosas	DNA
ZHU et al. (2013)	Nanofolha MoS ₂	Soluções aquosas	DNA
RAY; ROY (2016)	MCO modificada com ácido/acetato	Soluções aquosas	DNA

PET: Polietileno tereftalato; **cCQD:** pontos quânticos de carbono carboxílico; **PAni:** Polianilina; **PPi:** Polipirrol; **MCO:** Membrana da casca do ovo; **MoS₂:** Dissulfeto de molibdênio

[005] A patente (US6613528B2) [1] apresenta o uso de filmes de celulose para a triagem de um composto biológico ou sequências de ácidos nucleicos que o codificam a partir de sistemas aquosos ou biológicos.

[006] A patente (BR102019020805A2) [2] e o artigo de Nascimento e col. [3] descrevem o uso de substratos flexíveis de polietileno tereftalato (PET) modificadas com polímeros condutores (PAni ou PPi) e seu uso como uma plataforma para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos de agentes infecciosos, como o parasita *Leishmania infantum* e o vírus da Zika.

[007] YANG e col. [4] reportaram dois sistemas usando o carboxilato zwitteriônico de cobre (II) - MOF como plataformas eficazes de sensoriamento fluorescente para a detecção seletiva de sequências de dsDNA de HIV e RNA SUDV.

[008] SONG e col. [5] apresentaram o uso de NPs α -Fe₂O₃, como plataforma de detecção fluorescente “turn-on” para detecção de ácidos nucleicos.

[009] A patente (CN104263833A) [6] relata o uso de membranas de nylon com sondas de ácidos nucleicos imobilizadas na superfície para a identificação de espécies de *Cândida* e a detecção de mutações genéticas da *Candida albicans*.

[010] BÜLBÜL e col. [7] demonstraram em seu trabalho o uso de partículas de nanoceria como nanoquenchers de oligonucleotídeos fluorescentes para a detecção rápida e sensível de sequências de DNA e eventos de hibridização.

[011] LOO e col. [8] relataram o emprego dos pontos quânticos de carbono carboxílico como nanoquenchers e plataforma de sensoriamento de fluorescência para a detecção de ácidos nucleicos.

[012] LU e col. [9] descreveram a capacidade do óxido de grafeno solúvel em água (GO) de atuar como uma plataforma para a detecção sensível e seletiva de DNA (HIV1).

[013] ZHU e col. [10] abordaram o uso de uma nanofolha de MoS₂ que exibe alta capacidade de extinção de fluorescência e afinidade diferente para ssDNA versus dsDNA. Como prova de conceito, a nanofolha MoS₂ foi usada com sucesso como plataforma para a detecção de DNA e pequenas moléculas.

[014] RAY e ROY [11] relataram o uso da membrana da casca de ovo quimicamente modificadas com ácido acético ou acetato de *n*-butila para a imobilização de sondas de captura aminadas e subsequente detecção de moléculas de DNA alvo marcadas com fluoróforo².

Sumário da invenção

[015] A presente invenção relata um método fácil de detecção de cadeias de ácidos nucleicos usando uma bioplataforma modificada por nanoestruturas de ouro (Au). A metodologia é baseada na imobilização de sequências específicas de um agente patogênico que hibridizam com seu alvo complementar provocando a dessorção da dupla fita de DNA.

[016] Em um primeiro aspecto, a invenção relata a preparação e caracterização da membrana da casca do ovo e das nanopartículas de ouro, o que é seguido pelo processo de recobrimento da membrana com as NPsAu. Para isso, inicialmente separamos a membrana da casca do ovo por meio de um tratamento em meio ácido, fazendo em seguida a síntese das NPsAu esféricas de acordo com o método de Turkevich [12]. Posteriormente, um banho ultrassônico foi utilizado para modificar a superfície da membrana. A caracterização da composição e morfologia

² Fluoróforo: pode ser definido como uma molécula orgânica com a capacidade de absorver luz em um determinado comprimento de onda e depois emití-la em um comprimento de onda maior.

da bioplataforma foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia na região do ultravioleta- visível (UV-Vis) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), além da caracterização por análises térmicas.

[017] A membrana extraída da casca do ovo é um material bastante abundante, à base de proteínas, que exhibe naturalmente uma estrutura de rede fibrosa e uma boa flexibilidade em solução aquosa [13]. Exploramos essas características para integrar as nanoestruturas de Au na superfície das fibras da membrana, de modo a usar o sistema obtido em aplicações para o biosensoriamento molecular. As nanopartículas de ouro foram utilizadas por permitir a adsorção de ssDNA através das nucleobases (A, G, C, T)³ e a superfície do ouro, mas não apenas esse. As NPsAu também permitem a imobilização de sondas de ssDNA modificadas com grupos tiol, formando uma ligação covalente do tipo Au-S.

[018] Em um segundo aspecto, a presente invenção apresenta uma metodologia do uso da MCO-NPsAu, para as quais não existem precedentes para sua aplicação como bioplataforma para o sensoriamento de ácidos nucleicos. A utilização de um substrato sólido funcionalizado facilita o manuseio e a portabilidade do dispositivo, o que torna mais simples seu uso em laboratórios de rastreamento de doenças infecciosas e em pontos primários de atendimento.

[019] Em um terceiro aspecto, as cadeias dos ácidos nucleicos de interesse passíveis de serem detectados pelo uso da bioplataforma podem ser de outros agentes patogênicos, como parasitas, fungos, vírus, ou bactérias, entre outros.

[020] Em um outro aspecto, o método de detecção do ácido nucleico com a bioplataforma envolve uma resposta espectroscópica, através do monitoramento da intensidade de fluorescência das sondas de ssDNA marcadas com fluoróforos.

[021] Em um último aspecto, embora a presente invenção descreva a aplicação da MCO-NPsAu para a detecção de ácidos nucleicos, essa bioplataforma também pode encontrar outros usos, como, por exemplo, no reconhecimento de íons de metais pesados, como o mercúrio. É sabido que íons mercúrio se ligam especificamente à base timina presente nas cadeias de DNA. Dessa forma, sequências de aptâmeros ssDNA fluorescentes ricos em timina (T) são imobilizados nas NPsAu de modo que, ao ocorrer a detecção do alvo, haja uma mudança conformacional da

³ A: Adenina, G: Guanina, C: Citosina, T: Timina. As bases nitrogenadas que compõem a estrutura do DNA.

biomolécula, fazendo com que se forme uma ligação específica entre a timina e os íons de mercúrio, o que leva à recuperação do sinal de fluorescência [14].

[022] Nas exemplificações descritas nesta invenção, usamos uma bioplataforma à base da membrana natural da casca do ovo de galinha e modificada pela incorporação de nanopartículas de ouro. Esse sistema foi usado em experimentos de biosensoriamento fluorescente de cadeias de ácidos nucleicos específicas do patógeno *Leptospira interrogans* [15]. Na exemplificação, a invenção utiliza especificamente, mas não se limitando a ela, uma metodologia de biosensoriamento que envolve os seguintes passos: (I) a imobilização de sequências de fitas simples de ácidos nucleicos marcadas com fluoróforo, (II) a lavagem da bioplataforma com as sondas imobilizadas para a remoção de moléculas não ligadas, (III) a imersão da bioplataforma com as sondas imobilizadas em amostras contendo a sequência de ácidos nucleicos complementar ou não, (IV) a retirada da bioplataforma do meio de interação, e (V) a detecção do retorno da fluorescência a partir de medidas das amostras no espectrofotômetro fluorímetro.

[023] O termo “*bioplataforma*” significa um substrato sólido natural facilmente modificado por nanoestruturas distribuídas uniformemente em sua superfície para a imobilização direta de biomoléculas.

[024] O termo “*Nanopartículas de ouro*” compreende pequenas partículas de ouro que exibem diferentes tamanhos na faixa entre 1 nm e 100 nm, e que, quando dispersas em água, são denominadas de solução de ouro coloidal [14]. Essas nanopartículas são utilizadas em diversas áreas, incluindo a nanotecnologia e biomedicina. Elas são facilmente funcionalizadas para o reconhecimento de várias biomoléculas como, por exemplo, proteínas, DNA, antígenos e anticorpos, etc. [16].

[025] Conforme usado nesta invenção, o termo “biosensoriamento” compreende o potencial que os biossensores possuem em reconhecer biomoléculas e converter esse reconhecimento em sinais físicos mensuráveis, como os de natureza óptica, elétrica ou térmica.

[026] O termo “*ácidos nucleicos*” se refere a uma importante classe de macromoléculas biológicas que desempenham importantes funções em todos os organismos vivos. Os ácidos nucleicos, como o DNA e o RNA, são considerados biopolímeros, por serem compostos por polinucleotídeos, com a unidade repetitiva sendo constituída por quatro subunidades distintas, denominadas nucleotídeos.

[027] Pelo termo “*interação nucleobases*” compreende-se a interação não covalente, que ocorre devido à capacidade que as cadeias ssDNA têm de se desenrolar e expor suas bases, de modo a serem facilmente adsorvidos na superfície do ouro.

[028] Pelo termo “*hibridização*” compreende-se um evento relacionado com a capacidade de que as fitas simples de ácidos nucleicos têm que se emparelhar com suas bases perfeitamente complementares através da formação de ponte de hidrogênio. Atualmente esse fenômeno tem sido utilizado como a principal base de funcionamento de dispositivos de sensoriamento.

Problemas e limitações do estado da técnica

[029] Nos últimos anos, há uma busca crescente pelo desenvolvimento de biossensores que permitam um diagnóstico rápido e preciso de sequências específicas de ácidos nucleicos [17]. Além disso, tem havido um grande esforço da comunidade científica em construir novos dispositivos de detecção que sejam não apenas de manuseio simples e econômico, mas também miniaturizados e portáteis, tendo em vista a urgente necessidade da implementação desses sistemas em locais de acesso mais remoto, de modo a fazer o diagnóstico rápido de doenças infecciosas, além de auxiliar no rastreamento de patógenos capazes de afetar a produtividade dos setores alimentícios [18-20]. Neste sentido, existem atualmente diferentes tipos de biossensores de ácidos nucleicos baseados em vários mecanismos de amplificação de sinais, como os eletroquímicos [21-23] e os ópticos [24, 25]. Alguns desses métodos são não apenas trabalhosos e demorados, como também necessitam a utilização de equipamentos especializados, o que na prática limita sua implementação como um método de diagnóstico econômico e eficiente [26].

[030] Desse modo, a invenção relatada na presente patente propõe a utilização de uma bioplataforma constituída por uma membrana natural revestida com nanopartículas de ouro para o reconhecimento de sequências específicas de ácidos nucleico, com a detecção baseada no retorno do sinal de fluorescência após a hibridização. Apesar da necessidade do uso de equipamentos específicos para a detecção da resposta fluorescente, atualmente no mercado se encontram disponíveis fluorímetros de pequeno porte, como o QuantiFluor™ (Promega, EUA), que podem ser acoplados ao sistema de detecção a ser implementado em ambientes com recursos limitados [27, 28].

Vantagens da invenção

[031] A utilização da presente invenção como bioplataforma de reconhecimento de sequências específicas baseados na imobilização direta de cadeias simples de DNA marcadas por um fluoróforo (FAM⁴), e sua dessorção após a hibridização com seu alvo complementar, provocando assim o retorno da fluorescência, trazem como vantagens essenciais;

- 1) Uso de uma plataforma sólida como dispositivo de biosensoriamento que facilita o manuseio e portabilidade.
- 2) A metodologia apresentada pode ser utilizada como uma bioplataforma de detecção de ácidos nucleicos baseada na imobilização de uma sequência específica da biomolécula alvo de interesse.
- 3) Relativamente curto tempo de detecção, de aproximadamente 120 min, para que seja completado o ensaio.
- 4) A bioplataforma é capaz de diferenciar a molécula alvo complementar daquelas com uma ou duas bases erradas, demonstrando a seletividade do sistema.
- 5) A obtenção de uma boa relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração do DNA alvo.
- 6) Excelente limite de detecção, estimado entre 10^{-9} M e 10^{-12} M.

A novidade e o efeito técnico alcançado

[032] Até o momento, não houve registro do uso da membrana da casca do ovo revestida com nanopartículas de ouro como plataforma para ensaios de detecção fluorescente de ácidos nucleicos.

Breve descrição das Figuras

[033] Na **Fig. 1** são mostradas as etapas de preparação (a) da MCO, (b) das nanopartículas de ouro e, (c) o revestimento da MCO com as NPsAu.

[034] Na **Fig. 2** são apresentadas as micrografias de MEV da MCO (50 kx) (a), e da MCO - NPsAu (50 kx) (b), (120 kx) (c).

⁴ FAM: 5 (6) – carboxifluoresceína é um corante tradicionalmente usado para marcação de biomoléculas. O pico máximo de excitação do FAM corresponde à linha espectral de 488 nm do laser de íons de argônio.

[035] Na **Fig. 3** são apresentados os espectros de UV-Vis MCO (a), e da NPsAu (b) e MCO-NPsAu (c).

[036] Na **Fig. 4** são mostradas as análises termogravimétricas para MCO (a) e MCO - NPsAu (b).

[037] Na **Fig. 5** é mostrado o esquema que representa o mecanismo de detecção de fluorescência de ácidos nucleicos com o uso da bioplataforma MCO-NPsAu.

[038] Na **Fig. 6** são mostradas as etapas de imobilização da sonda FAM-ssDNA e detecção das sequências alvo (cDNA).

[039] Na **Fig. 7** são apresentados: a) Os espectros de emissão de fluorescência (I) solução de FAM-ssDNA, (II) após interação a MCO-NPsAu. b) A porcentagem de recuperação de fluorescência após a interação do MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com uma solução de cDNA, ncDNA e o branco.

[040] Na **Fig. 8** é apresentada a cinética de imobilização da sonda FAM-ssDNA na MCO-NPsAu (a) e de recuperação da fluorescência do FAM-ssDNA (b) após interação dos sistemas MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com o cDNA.

[041] Na **Fig. 9** é apresentado o gráfico da resposta da intensidade de fluorescência normalizada após a interação do cDNA na faixa de concentração de (2–200) nM. Em detalhe, o espectro de emissão de fluorescência. Resposta linear dos ensaios (b).

[042] Na **Fig. 10** é mostrada a seletividade do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA para a detecção de cDNA alvo complementar e com (B1) uma base incompatível, (B2) duas bases incompatíveis e (ncDNA) alvo não complementar.

[043] Na **Fig. 11** é apresentado o gráfico de barras com a intensidade de fluorescência normalizada em função dos dias de análise do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA armazenado quando interage com o cDNA.

Descrição detalhada da invenção

Exemplo 1. Preparação e caracterização da bioplataforma de membrana da casca do ovo revestida com nanopartículas de ouro

Exemplo 1.1. Obtenção da membrana da casca de ovo

[044] Para a separação da membrana da casca do ovo de galinha (**Fig. 1a**), fizemos inicialmente um pequeno furo na ponta mais estreita da casca do ovo, por onde foram descartadas a clara e a gema. Em seguida, as cascas foram lavadas com água deionizada, até a completa remoção dos resíduos da gema e da clara. Posteriormente, colocamos as cascas inteiras em um béquer e adicionamos uma solução de HCl 1 M, até que a parte interna ficasse totalmente molhada, e deixamos o sistema em repouso por 30 minutos. Finalmente, removemos facilmente a membrana que reveste a parte interna da casca do ovo, e a lavamos várias vezes com água deionizada para a retirada do excesso de ácido, até o pH neutro ser atingido. Em seguida, as membranas foram cortadas em quadrados com dimensões 2 cm x 2 cm e guardadas na geladeira para uso posterior.

Exemplo 1.2. Síntese das NPsAu

[045] As NPsAu foram sintetizadas usando o método Turkevich, descrito na Ref. [29], com pequenas modificações (**Fig. 1b**). Resumidamente, em um erlenmeyer de 150 mL (previamente limpo com água régia), adicionamos 50 mL de água deionizada e 85 µL de cloreto de ouro III trihidrato (concentração ~ 0,15 M) e, usando uma placa agitadora, aquecemos o sistema até a ebulição. Posteriormente, adicionamos à reação 2,5 mL de uma solução de citrato de sódio tribásico (1 %), aquecida previamente. A interação foi deixada ocorrer com o sistema em agitação e, após haver uma mudança de cor para um vermelho intenso, o erlenmeyer foi colocado em agitação por um tempo adicional de 15 minutos à temperatura ambiente.

Exemplo 1.3. Revestimento da MCO com NPsAu

[046] Uma vez preparadas as nanopartículas de ouro, iniciamos sua incorporação nas membranas (**Fig. 1c**). Para isso, em um béquer de 50 mL, adicionamos 15 mL da solução coloidal de NPsAu, imergindo em seguida 12 pequenos pedaços da membrana (0,5 cm x 0,66 cm, cortadas com auxílio de um molde), sendo a interação deixada ocorrer por aproximadamente 90 min em um banho ultrassônico. Em seguida, descartamos a solução, e adicionamos mais 15 mL de NPsAu, sendo deixado no banho ultrassônico por cerca de 60 min adicionais. As membranas, agora completamente revestidas pelas NPsAu, foram guardadas na geladeira até uso posterior.

Exemplo 1.4. Métodos de caracterização da MCO e MCO/NPsAu

[047] O microscópio eletrônico de varredura MIRA 3 (TESCAN, República Tcheca) foi usado para a avaliação da morfologia das membranas preparadas e modificadas conforme descrito nos **Exemplos 1.1 e 1.3**. A análise termogravimétrica da MCO e MCO-NPsAu foi realizada em um analisador térmico (TGA-60H, Shimadzu), sob atmosfera de nitrogênio (100 mL/min) com taxa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 1000 °C. Para identificar a banda de ressonância plasmônica das nanopartículas de ouro presente na membrana MCO-NPsAu, os espectros UV-Vis das membranas foram coletados usando um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão) no modo de refletância. A concentração das soluções estoque de ssDNA foi determinada pelo uso de um espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific, EUA). Todas as medições de fluorescência foram realizadas usando um espectrofluorímetro FluoroLog-3 (Horiba, EUA). O comprimento de onda de excitação foi fixado em 480 nm, com os espectros de emissão registrados na faixa de 490 nm a 650 nm.

[048] Na **Fig. 2a**, temos uma imagem da membrana antes do revestimento, que apresenta uma cor branca, e após o revestimento, quando ocorre a mudança na coloração para um vermelho intenso. De modo a examinar a morfologia das membranas de ovo antes e depois do revestimento com as nanopartículas de ouro, fizemos sua caracterização por microscopia eletrônica de varredura. Na **Fig. 2b** é mostrada a micrografia da membrana da casca do ovo antes do revestimento: como pode ser visto, a membrana é bastante porosa, sendo composta por estruturas fibrilares orgânicas [30, 31]. Por sua vez, as fibras da membrana após o revestimento com as NPsAu são mostradas na **Fig. 2c**. Como pode ser visto, a distribuição das nanopartículas na superfície das fibras é uniforme. Na **Fig. 2d** mostramos uma maior ampliação da superfície das fibras revestidas.

[049] As nanopartículas de ouro exibem propriedades ópticas peculiares (como, por exemplo, o fenômeno da ressonância plasmônica de superfície localizada) [32, 33], o que nos permitiu usar a caracterização por espectroscopia na região do ultravioleta visível para confirmar que de fato conseguimos obter essas NPsAu. Na **Fig. 3** é mostrado o espectro de absorção da MCO (curva a), que apresenta dois picos entre 240 nm e 280 nm, associados às proteínas colágenos e aos grupos aromáticos de proteínas que compõem a membrana, respectivamente [34]. Na curva b, é mostrado o espectro de absorção da solução coloidal das nanopartículas de ouro, onde podemos

observar a presença da banda de ressonância de plásmon de superfície do metal, em 518 nm. Por sua vez, o revestimento da membrana com as NPsAu (curva c) é comprovado tanto pelo deslocamento para a direita da banda de ressonância (que passa agora para 530 nm) quanto pelo aumento observado da intensidade de absorção, além da presença do pico característico da MCO.

[050] A análise termogravimétrica para as amostras MCO e MCO - NPsAu pode ser vista na **Fig. 4**. A perda de peso abaixo de 100 °C para as duas amostras (MCO (curva a) e MCO – NPsAu (curva b)) se deve à evaporação das moléculas de água absorvidas. Pode ser observado também uma grande perda de massa nas duas curvas entre 170° C e 350° C, que é atribuída à decomposição da MCO. Com o aumento da temperatura, enquanto houve a decomposição quase completa da MCO, sobrando uma pequena porcentagem de 1,73%, por outro lado, da MCO-NPsAu restou uma porcentagem maior (27,2%), um resultado que indica que nanopartículas de ouro permaneceram nos resíduos [35].

Exemplo 2. Biosensoriamento fluorescente de sequências de DNA usando a membrana da casca de ovo revestidas com nanopartículas de ouro.

[051] A presente invenção explora o uso da membrana da casca do ovo revestida com nanopartículas de ouro, mas não somente esta, como bioplataforma universal baseada em ácidos nucleicos para o biosensoriamento fluorescente de sequências de DNA de agentes patogênicos.

[052] A MCO-NPsAu relatada na presente invenção possui afinidade não específica por cadeias simples de ácidos nucleicos, com a interação ocorrendo através das nucleobases com a superfície do ouro incorporado nas fibras da membrana. Esse tipo de interação permite a imobilização tanto de cadeias de ssDNA quanto de RNA, sendo que os ácidos nucleicos utilizados podem estar modificados com fluoróforos, ou não. Nesta invenção, analisamos o decaimento e o retorno da fluorescência da sonda FAM-ssDNA após a imobilização na bioplataforma e detecção (cDNA), respectivamente. Nas próximas seções serão relatadas algumas exemplificações de uso da MCO-NPsAu. Dessa forma, deixa-se previamente entendido que a presente invenção não se limita às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos apresentados.

[053] O uso da MCO-NPsAu como uma bioplataforma para a detecção de ácidos nucleicos envolve inicialmente a imobilização de sequências de DNA de fita simples marcadas com um fluoróforo (FAM-ssDNA). Quando o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA é colocado em contato

com a solução de DNA alvo (cDNA), ocorre a hibridização e as cadeias de DNA de fita dupla (dsDNA) assim formadas retornam ao meio líquido, do que resulta a restauração da fluorescência do fluoróforo (FAM). A forma simplificada de imobilização e reconhecimento da sequência alvo é mostrada na **Fig. 5**.

Exemplo 3. Ensaio de biosensoriamento por fluorescência de DNA do patógeno *Leptospira interrogans* baseado no uso da membrana da casca do ovo revestida com nanopartículas de ouro

[054] Como uma exemplificação de uso da presente invenção, investigamos sua capacidade de biosensoriamento. Para isso, utilizamos como sistema modelo sondas de DNA marcadas com o fluoróforo FAM associadas ao patógeno *Leptospira interrogans*. A metodologia utilizada consistiu inicialmente na preparação da sonda de FAM-ssDNA em meio tamponado de Tris-HCl/MgCl₂. Em seguida, 1 mL dessa solução foi colocada para interagir com a MCO-NPsAu (cortadas nas dimensões 0,25 cm x 0,33 cm, com o auxílio de um molde) durante um período de 15 min a 360 min e sob agitação constante (300 rpm). Após isso, a membrana foi removida quando então o sobrenadante foi analisado em um fluorímetro FluoroLog-3 (Horiba, EUA). Devido à modificação das sondas de ssDNA com o fluoróforo (FAM), as amostras foram excitadas em $\lambda = 480$ nm. Em seguida, o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA foi submetido a lavagens consecutivas com o tampão Tris-HCl/MgCl₂ (pH 7,4). Para a realização do processo de reconhecimento, o sistema foi posteriormente colocado em contato com o DNA alvo complementar (cDNA) durante um intervalo de tempo entre 5 min e 180 min. Finalmente, o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA foi removido da solução contendo o cDNA, com a intensidade de fluorescência do sobrenadante sendo então medida no fluorímetro. A metodologia seguida nesta invenção está representada na **Fig. 6**. Deve ser lembrado que a invenção descrita não se limita às condições específicas aqui relatadas.

[055] À medida que as fitas de ssDNA modificadas com o fluoróforo FAM são imobilizadas na superfície da membrana, a intensidade de fluorescência do meio deve ser diminuída. Esse fato foi comprovado através da análise dos espectros de emissão do fluoróforo apresentados na **Fig. 7a**. Na curva I é mostrada uma intensa emissão da fluorescência da solução inicial das cadeias de FAM-ssDNA, enquanto que, por outro lado, a diminuição na intensidade da fluorescência pode ser vista na curva II, o que indica que a membrana foi capaz de adsorver as

fitas de DNA, em aproximadamente 50,6%. Após a imobilização, o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA foi imerso em uma solução do DNA alvo (fita simples complementar (cDNA)). Como observado na **Fig. 7b**, foi obtida uma porcentagem maior de recuperação da fluorescência quando analisado o sobrenadante de cDNA alvo (86,6%). Por outro lado, quando colocamos o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA para interagir com a sonda não complementar a resposta da recuperação de fluorescência foi bem inferior, passando a ser cerca de 23%. Esse resultado mostrou que o material proposto para em biosensoriamento é capaz de ser aplicado para a identificação de sequências específicas de interesse. Ainda na **Fig. 7b**, o branco significa a resposta de recuperação da fluorescência após a interação da MCO-NPsAu/FAM-ssDNA apenas com tampão Tris-HCl/MgCl₂ (pH 7,4), um parâmetro que é essencial para o cálculo do limite de detecção do biossensor.

[056] Na **Fig. 8a**, é mostrado o resultado da avaliação da cinética de imobilização do FAM-ssDNA na bioplateforma. Como pode ser visto, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência do sobrenadante ao longo do tempo, até que em 240 min o sistema entra em equilíbrio e as sondas não são mais adsorvidas na membrana. Na **Fig. 8b**, apresentamos a cinética de recuperação da fluorescência após o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA entrar em contato com as sondas complementares (cDNA). Nos primeiros 60 min, ocorre uma rápida resposta da fluorescência, com o equilíbrio sendo alcançado em 120 min. Dessa forma, o tempo ótimo escolhido para os próximos experimentos de imobilização e dessorção da sonda FAM-ssDNA pela MCO-NPsAu foram de 240 min e 120 min, respectivamente.

Exemplo 3.1. Ensaios de sensibilidade e seletividade da detecção de DNA de *Leptospira interrogans*

[057] Definido o tempo de imobilização (240 min) e hibridização (120 min), o próximo parâmetro avaliado foi o limite de detecção. Para isso, usando a metodologia apresentada em [054], analisamos diferentes concentrações do cDNA alvo (na faixa (2-200) nM). O resultado da recuperação da fluorescência para o cDNA na faixa de 2 nM a 200 nM é mostrado na **Fig. 9a**. Observamos que, com o incremento da concentração, ocorre uma maior dessorção da sonda no meio, e conseqüentemente um aumento na recuperação da fluorescência, o que mostra a ocorrência de uma maior formação de dsDNA no meio. No detalhe da **Fig. 9a** é possível acompanhar esse resultado através dos espectros de emissão de fluorescência, quando o sistema é colocado em

contato com diferentes concentrações de cDNA alvo (na faixa (2-200) nM) [a-j]). A partir desses dados, foi possível obter uma relação linear (**Fig. 9b**), com coeficiente de determinação (R^2) em torno de 0,997, entre a intensidade de fluorescência a 518 nm (F) e a concentração do DNA alvo (cDNA), na forma $\log F = 6,13 + 0,250 \log \text{cDNA}$. Dessa forma, usando a relação $3\sigma/S$ (onde σ = desvio padrão da amostra branco, e S a inclinação da curva de calibração) [2] conseguimos estimar o valor de 0,24 nM para o limite de detecção da membrana MCO-NPsAu.

[058] A seletividade é um parâmetro de grande importância no processo de detecção de uma molécula alvo específica. Para investigar esse parâmetro, comparamos a resposta da recuperação da fluorescência, quando o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA foi colocado para interagir com diferentes cadeias de ssDNA alvo, mantendo a concentração fixa: i) ssDNA perfeitamente complementar (cDNA), ii) com uma única (B1) ou iii) duas bases nitrogenadas incompatíveis (B2) e iv) ssDNA não complementar (ncDNA). Para isso, seguimos as etapas apresentadas em [054] e [056]. Nesse exemplo, foi possível constatar que após entrar em contato com as sequências B1 e B2, a resposta de recuperação da fluorescência foi de aproximadamente 52,8% e 32,6%, respectivamente, em relação ao observado para o caso da sequência de DNA perfeitamente complementar, onde obtivemos um retorno de 86,6% (**ver Fig. 10**). A capacidade de distinção entre as sequências alvo complementares e incompatíveis mostrou que o material proposto é uma bioplataforma promissora para uso em protocolos de diagnósticos molecular.

[059] Analisamos também a estabilidade da detecção do DNA alvo, após a bioplataforma funcionalizada com FAM-ssDNA ser armazenada por vários dias a uma baixa temperatura ($\sim 10^\circ\text{C}$). O resultado apresentado na **Fig. 11** mostra que a resposta de fluorescência apresentou estabilidade durante os primeiros dias de análise, sofrendo uma pequena diminuição a partir do quinto dia e permanecendo sem grandes variações após um período de 30 dias de armazenamento.

[060] Referências

1. Helbert, W., et al., *Cellulose films for screening*. 2003, Google Patents.
2. Pedro, G.C., et al., *A novel nucleic acid fluorescent sensing platform based on nanostructured films of intrinsically conducting polymers*. *Analytica Chimica Acta*, 2019. **1047**: p. 214-224.

3. do Nascimento, K.T., et al., *Intrinsically conductive polymers hybrid bilayer films for the fluorescence molecular diagnosis of the Zika virus*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021. **208**: p. 112120.
4. Yang, S.-P., et al., *Platforms formed from a three-dimensional Cu-based zwitterionic metal–organic framework and probe ss-DNA: Selective fluorescent biosensors for human immunodeficiency virus 1 ds-DNA and Sudan virus RNA sequences*. Analytical chemistry, 2015. **87**(24): p. 12206-12214.
5. Song, C., G.-Y. Wang, and D.-M. Kong, *A facile fluorescence method for versatile biomolecular detection based on pristine α -Fe₂O₃ nanoparticle-induced fluorescence quenching*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **68**: p. 239-244.
6. Huiliang, Q., et al., *Nucleic acid film strip and kit for identification of candida species and detection of gene mutation*, in *Google Patents*. 2014.
7. Bülbül, G., et al., *DNA assay based on nanoceria as fluorescence quenchers (NanoCeraCQ DNA assay)*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 1-9.
8. Loo, A.H., et al., *Carboxylic carbon quantum dots as a fluorescent sensing platform for DNA detection*. ACS applied materials & interfaces, 2016. **8**(3): p. 1951-1957.
9. Lu, C.H., et al., *A graphene platform for sensing biomolecules*. Angewandte Chemie, 2009. **121**(26): p. 4879-4881.
10. Zhu, C., et al., *Single-layer MoS₂-based nanoprobe for homogeneous detection of biomolecules*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(16): p. 5998-6001.
11. Ray, P.G. and S. Roy, *Eggshell membrane: A natural substrate for immobilization and detection of DNA*. Materials Science and Engineering: C, 2016. **59**: p. 404-410.
12. Kimling, J., et al., *Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(32): p. 15700-15707.
13. Silva, G.A.O.d., C.R.M. Araújo, and A.d.A. Gonsalves, *Evaluation of eggshell membrane as an alternative biopolymeric matrix for delivery of nimesulide*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 2021. **50**(2): p. 550-570.
14. SeokáKim, Y., *Gold nanoparticle-based homogeneous fluorescent aptasensor for multiplex detection*. Analyst, 2011. **136**(18): p. 3720-3724.

15. Nagraik, R., et al., *Nanofabricated versatile electrochemical sensor for Leptospira interrogans detection*. Journal of bioscience and bioengineering, 2020. **129**(4): p. 441-446.
16. Tiwari, P.M., et al., *Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications*. Nanomaterials, 2011. **1**(1): p. 31-63.
17. Kavita, V., *DNA biosensors-a review*. J. Bioeng. Biomed. Sci, 2017. **7**(2): p. 222.
18. Srinivasan, B. and S. Tung, *Development and applications of portable biosensors*. Journal of laboratory automation, 2015. **20**(4): p. 365-389.
19. Oluwaseun, A.C., P. Phazang, and N.B. Sarin, *Biosensors: a fast-growing technology for pathogen detection in agriculture and food sector*. Biosensing technologies for the detection of pathogens-a prospective way for rapid analysis, 1st edn. INTECH, 2018: p. 37-52.
20. McConnell, E.M., J. Nguyen, and Y. Li, *Aptamer-based biosensors for environmental monitoring*. Frontiers in chemistry, 2020. **8**: p. 434.
21. Yola, M.L., T. Eren, and N. Atar, *A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@Au nanoparticles decorated graphene oxide*. Electrochimica Acta, 2014. **125**: p. 38-47.
22. Du, P., et al., *Electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA hybridization with the amplification of Au nanoparticles and CdS nanoparticles*. Bioelectrochemistry, 2009. **75**(1): p. 37-43.
23. Rana, K., et al., *Graphene Based Electrochemical DNA Biosensor for Detection of False Smut of Rice (Ustilaginoidea virens)*. The plant pathology journal, 2021. **37**(3): p. 291.
24. Wei, Q., et al., *A fluorescence biosensor based on single-stranded DNA and carbon quantum dots for acrylamide detection*. Food Chemistry, 2021. **356**: p. 129668.
25. Zhou, Y., et al., *An ultrasensitive fluorescence detection template of pathogenic bacteria based on dual catalytic hairpin DNA Walker@ Gold nanoparticles enzyme-free amplification*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2022. **277**: p. 121259.
26. Dyussebayev, K., et al., *Biosensor technologies for early detection and quantification of plant pathogens*. Frontiers in Chemistry, 2021. **9**: p. 144.

27. Sharma, T., J. Bruno, and W. Cho, *The point behind translation of aptamers for point of care diagnostics*. *Aptamers and Synthetic Antibodies*, 2016. **2**(2): p. 36-42.
28. Dhiman, A., et al., *Aptamer-based point-of-care diagnostic platforms*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **246**: p. 535-553.
29. Melo Jr, M.A., et al., *Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino*. *Química nova*, 2012. **35**: p. 1872-1878.
30. Mopoung, S. and K. Jitchaijaroenkul, *Characterization of activated carbon from eggshell membranes prepared using sodium acetate and zinc metal activation*. *Am J Appl Sci*, 2017. **14**: p. 737-747.
31. Torres, F.G., et al., *Structure–property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane*. *Acta biomaterialia*, 2010. **6**(9): p. 3687-3693.
32. Samsuri, N.D., et al. *Synthesis methods of gold nanoparticles for Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) sensor applications*. in *EPJ Web of Conferences*. 2017. EDP Sciences.
33. Li, X., et al., *Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2009. **332**(2-3): p. 172-179.
34. Huang, M., L. Du, and J.-X. Feng, *Photochemical synthesis of silver nanoparticles/eggshell membrane composite, its characterization and antibacterial activity*. *Science of Advanced Materials*, 2016. **8**(8): p. 1641-1647.
35. Wang, L., et al., *Sunlight-Driven Photothermal Effect of Composite Eggshell Membrane Coated with Graphene Oxide and Gold Nanoparticles*. *Applied Sciences*, 2019. **9**(20): p. 4384.

REIVINDICAÇÕES

1. O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, caracterizada por poder ser usada como uma bioplataforma para a imobilização direta de sondas de agentes patogênicos, de modo a permitir a detecção de sequências-alvo complementares.
2. O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da detecção ser em um processo que envolve preferencialmente, mas não apenas, a hibridização da sonda com o alvo.
3. O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da sonda a ser usada para o bioreconhecimento ser uma cadeia de fita simples de ácidos nucleicos com sequência específica correspondente ao patógeno de interesse.
4. O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a incorporação das nanopartículas metálicas na membrana, mas não somente isso, a torna capaz de interagir com fitas simples de ácidos nucleicos, através de interações de caráter não específico com as nucleobases.
5. O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da sonda usada para o bioreconhecimento ser marcada preferencialmente, mas não somente, com uma molécula, ou qualquer outro composto, fluorescente.
6. O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do composto fluorescente usado ser uma molécula marcadora de ácidos nucleicos disponível comercialmente, ou um material compósito híbrido de polímero condutor-nanopartículas metálicas.

- 7.** O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do reconhecimento do ácido nucleico do patógeno alvo ser feito preferencialmente, mas não apenas, pelo retorno da intensidade de fluorescência das sondas liberadas da bioplataforma, o que demonstra ter havido o processo de hibridização.
- 8.** O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato dos patógenos de interesse poderem ser bactérias, protozoários, vírus, ou qualquer outro organismo cuja sequência de ácidos nucleicos seja bem conhecida.
- 9.** O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do ácido nucleico alvo de detecção poder ser o ácido desoxirribonucleico (DNA).
- 10.** O uso da membrana da casca do ovo recoberta com nanopartículas de ouro para detecção de ácidos nucleicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do ácido nucleico alvo de detecção poder ser o ácido ribonucleico (RNA).

FIGURAS

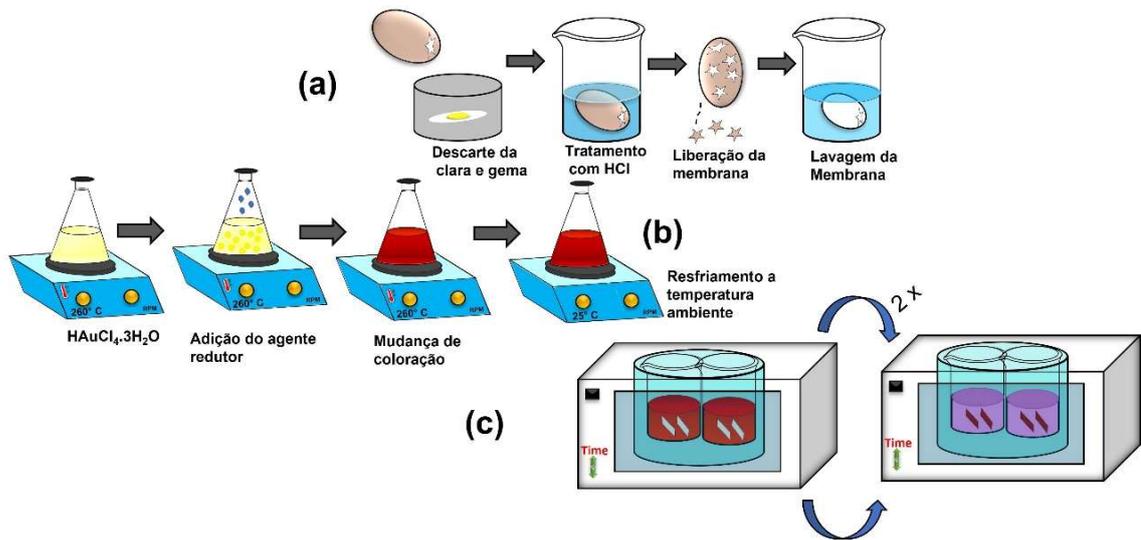


Fig. 1

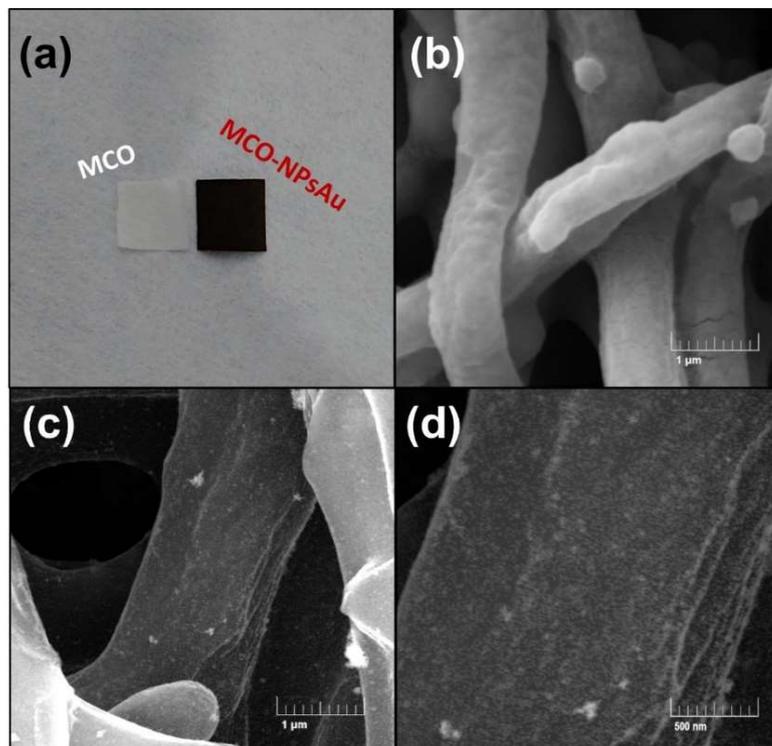


Fig. 2

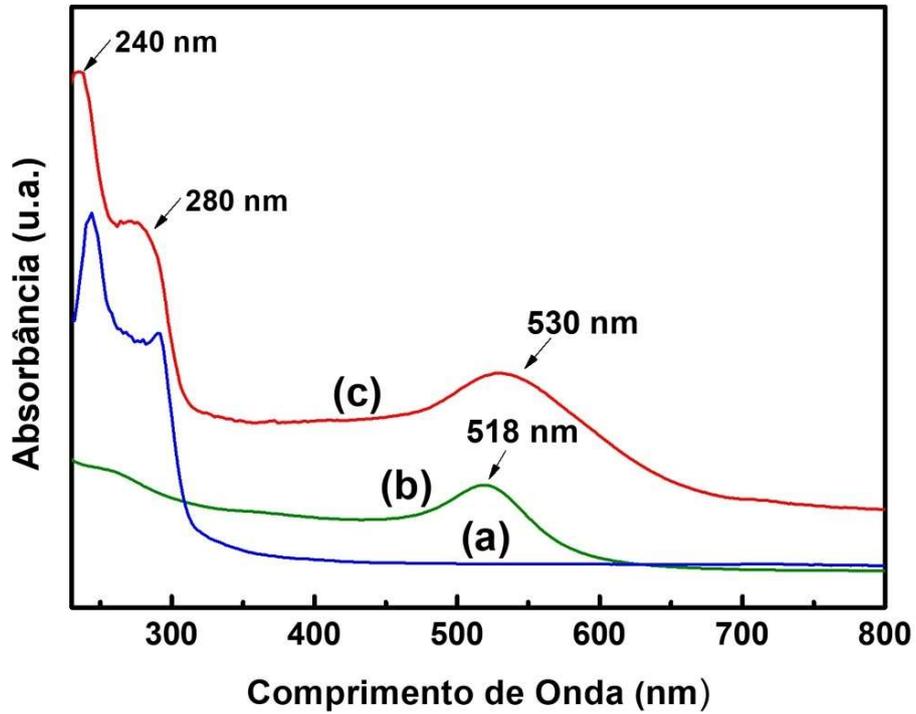


Fig. 3

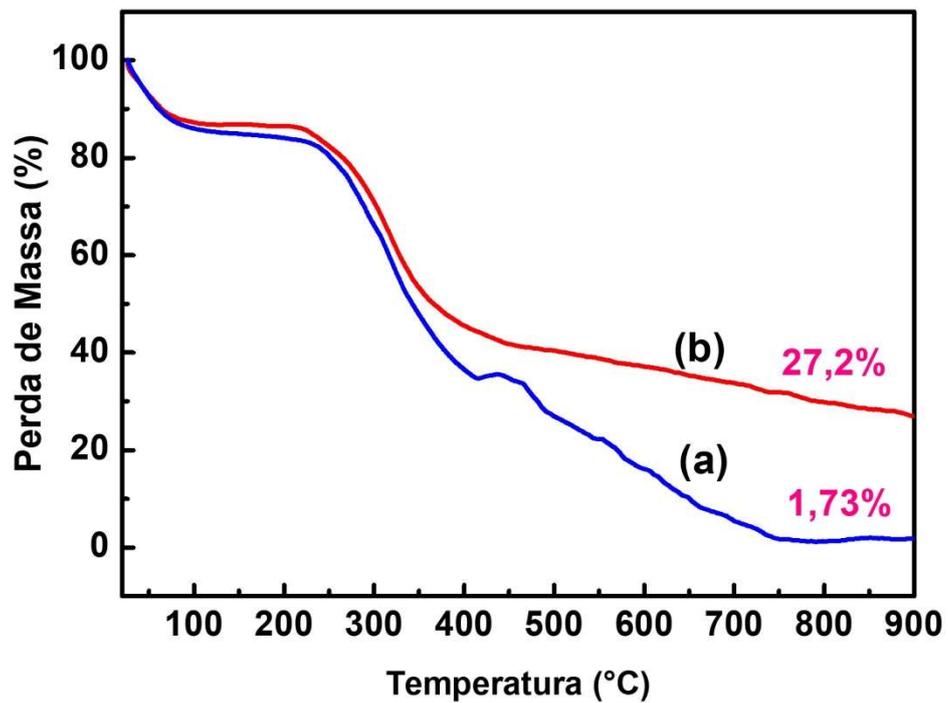


Fig. 4

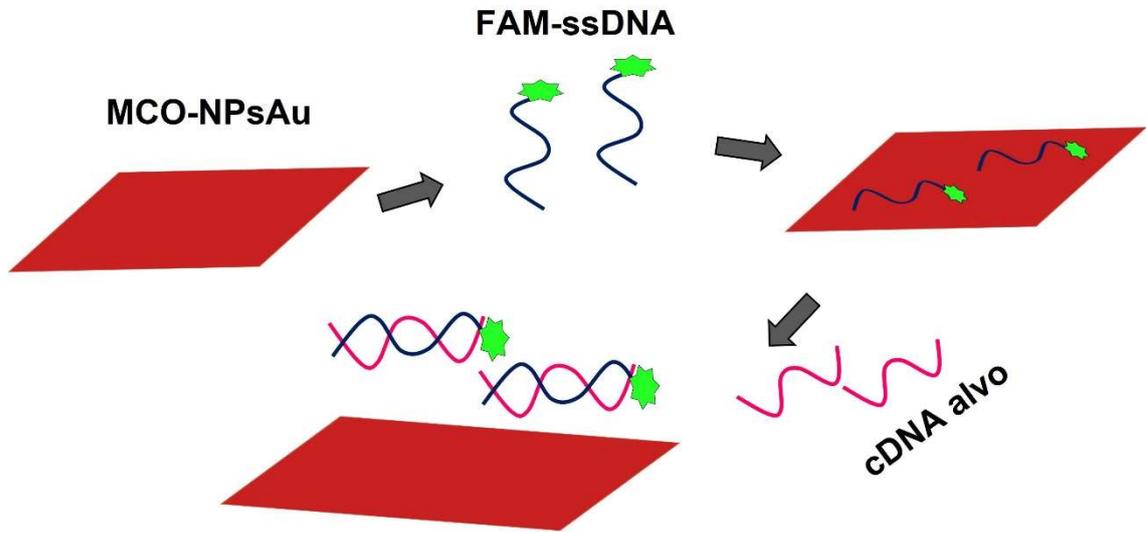


Fig. 5

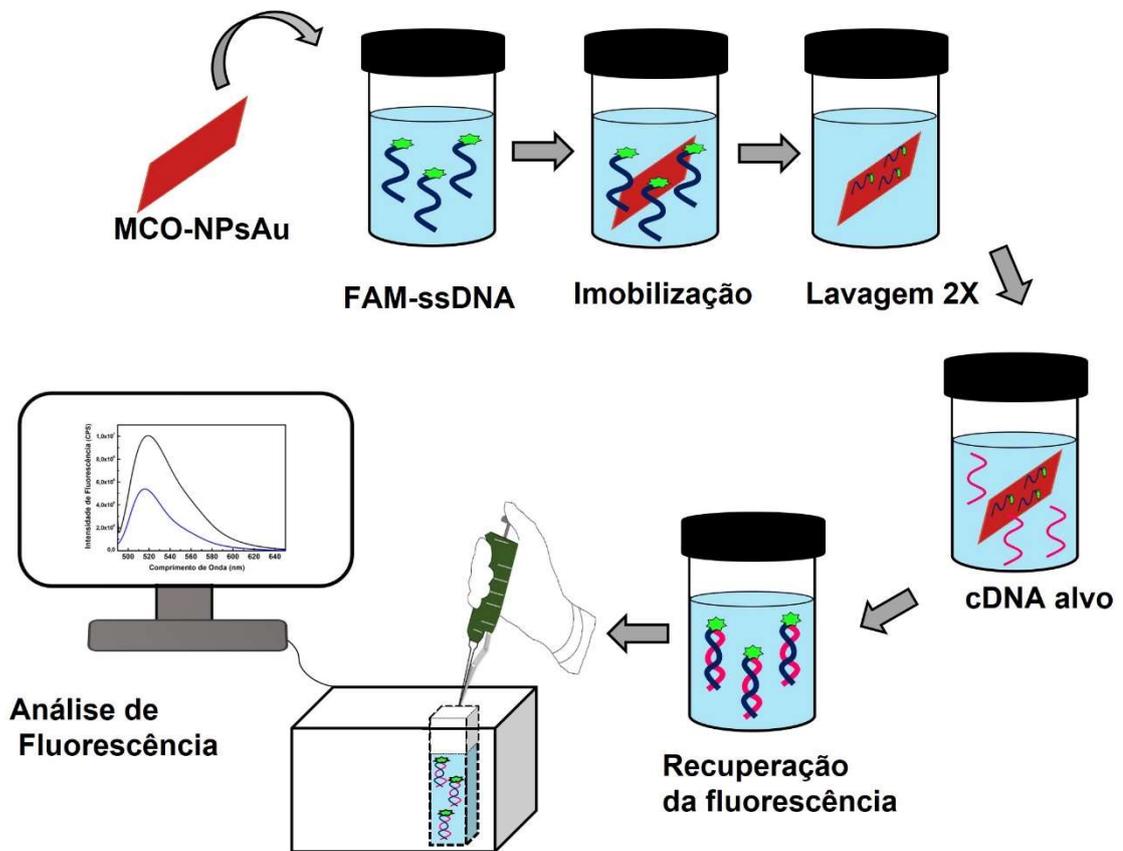


Fig. 6

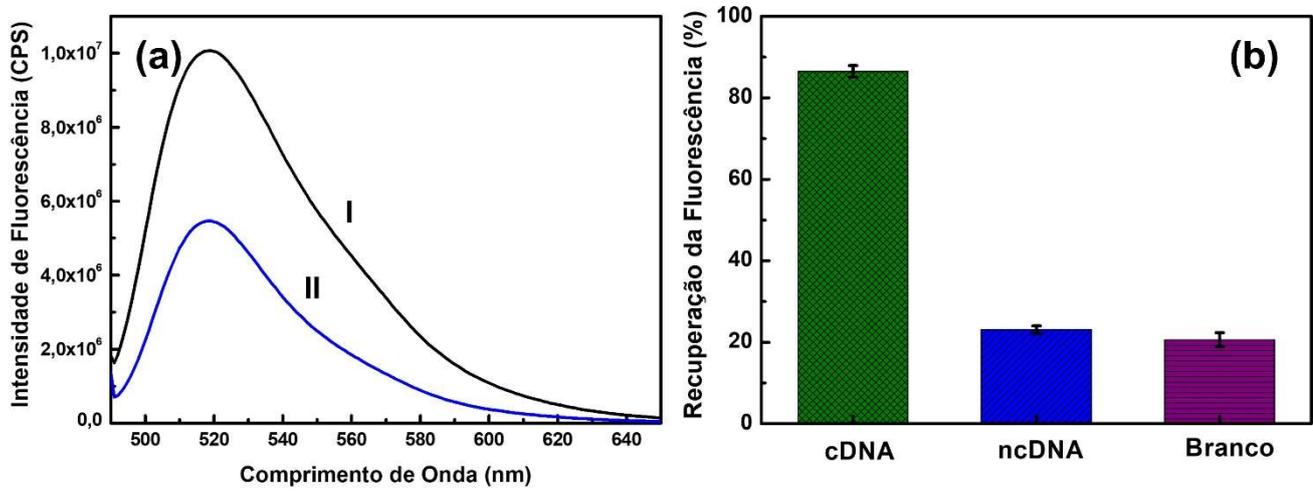


Fig. 7

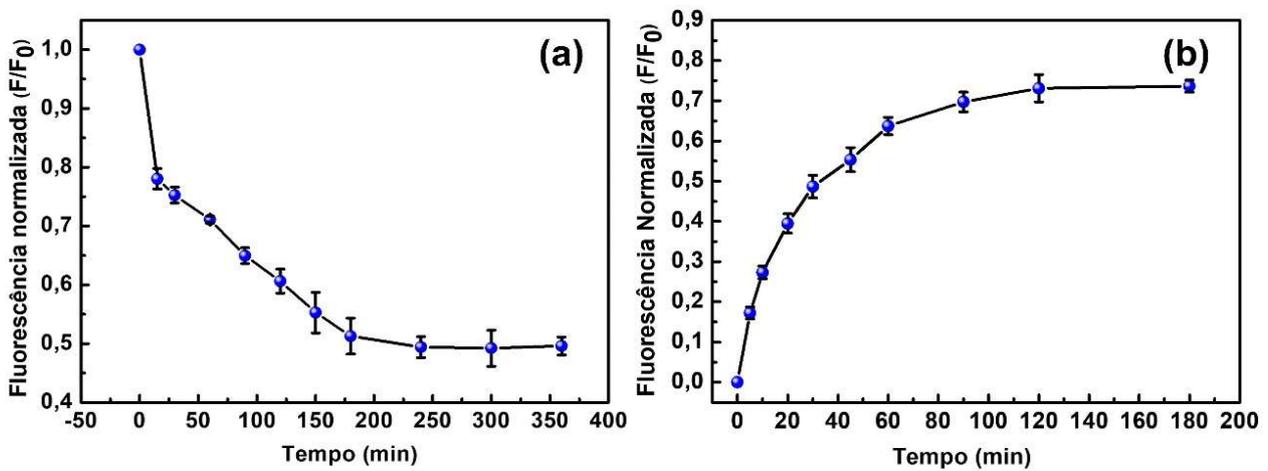


Fig. 8

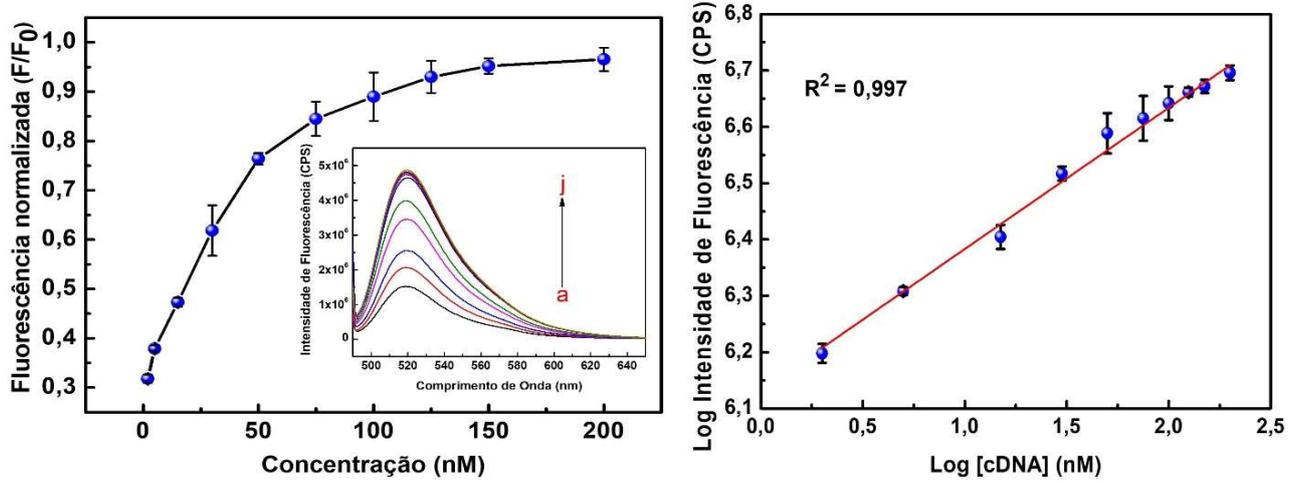


Fig. 9

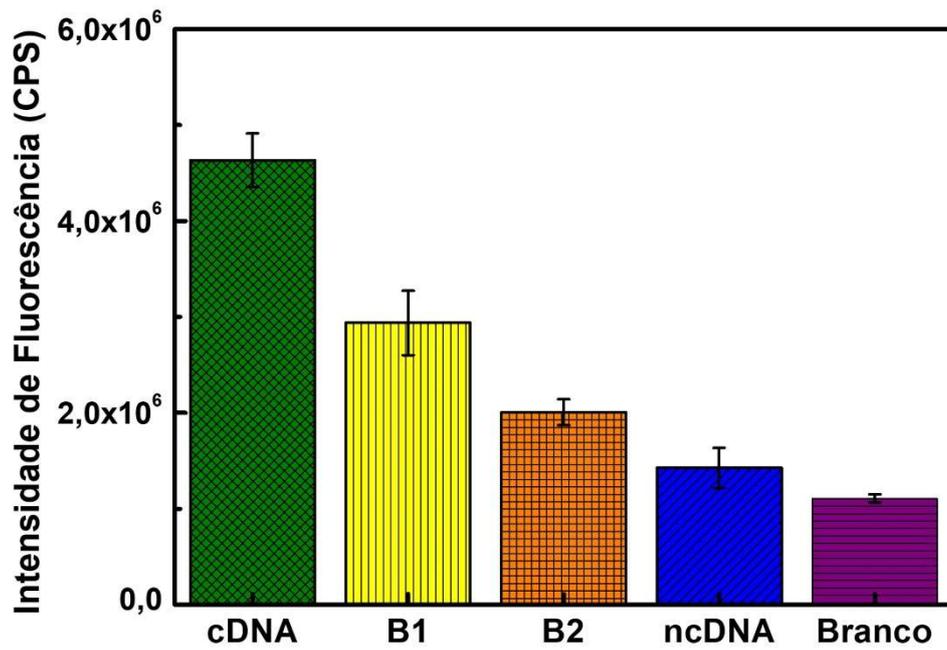


Fig. 10

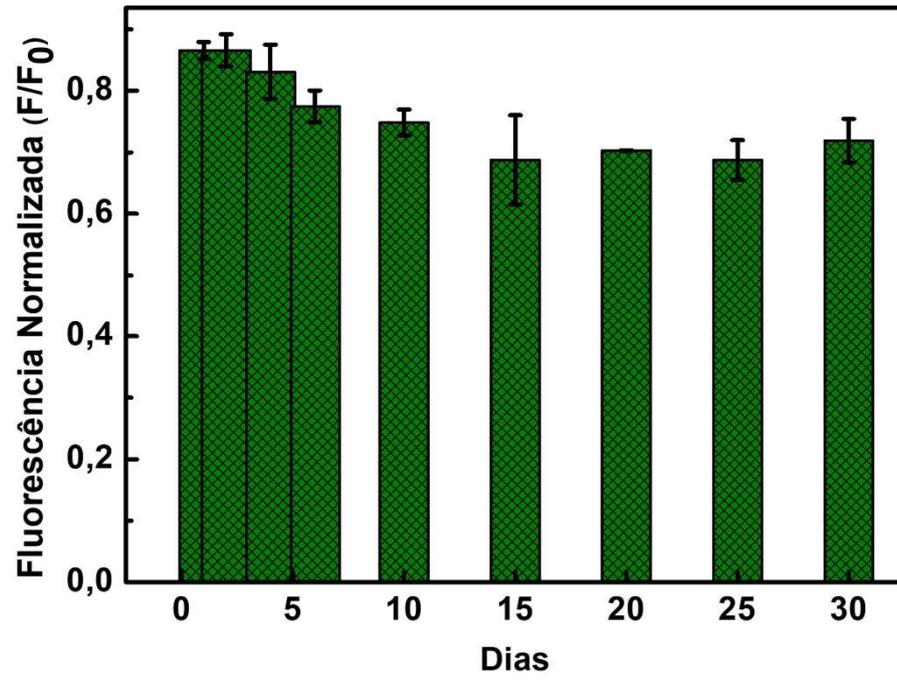


Fig. 11

RESUMO

USO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO BIOPLATAFORMA SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A presente invenção descreve o uso de membranas da casca do ovo de galinha (MCO) modificadas pela deposição de nanopartículas de ouro (NPsAu) como uma bioplataforma sustentável para a imobilização e subsequente detecção de sequências de DNA de patógenos, como a *Leptospira interrogans*. O princípio de detecção se baseia na imobilização direta das cadeias de fita simples de DNA marcadas com um fluoróforo (FAM-ssDNA) através de interações entre as nucleobases do ssDNA e as nanopartículas de ouro, de forma esférica. A hibridização ocorre após o sistema (MCO-NPsAu/FAM-ssDNA) entrar em contato a sequência de DNA alvo complementar (cDNA), quando a interação é então enfraquecida e ocorre a dessorção do dsDNA (cadeias de fita dupla de DNA), o que leva ao aparecimento de um forte sinal de fluorescência. Este tipo de biossensores pode vir a se tornar uma excelente alternativa de dispositivos simples, eficientes e sensíveis para o diagnóstico precoce de doenças, o que facilitaria a tomada de decisões médicas rápidas pelos profissionais de saúde e, conseqüentemente, o tratamento da doença em seu estágio inicial. Adicionalmente, essa metodologia de rápida identificação de patógenos pode ser de grande valor para a diminuição de custos na agricultura e nas indústrias farmacêutica e de alimentos.