

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

(21) PI 1102719-3 A2



* B R P I 1 1 0 2 7 1 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 03/06/2011
(43) Data da Publicação: 18/02/2014
(RPI 2250)

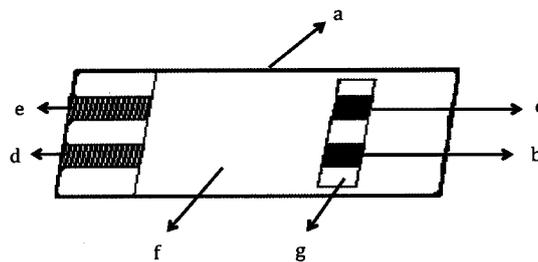
(51) Int.Cl.:
C12Q 1/68

(54) Título: BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

(73) Titular(es): José Luiz de Lima Filho

(72) Inventor(es): Danielly Santos Campos Ferreira, Danyelly Brunaska Gondin Martins, Elaine Virginia Martins de Souza, Gustavo Alves do Nascimento, José Luiz de Lima Filho, Mariana Souza de Arruda

(57) Resumo: BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS. A presente invenção refere-se a um processo eletroquímico para detecção de ácidos nucleicos e um produto na forma de fita teste, incorporados em um biossensor para detecção de DNA e RNA e por conseguinte das doenças correspondentes.



BIOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

RELATÓRIO DESCRITIVO

5 Campo da Invenção

A presente invenção descreve um biossensor eletroquímico para detecção de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas, como por exemplo, fluidos biológicos, células e tecidos biológicos. De forma mais específica, esta invenção descreve biossensores para detecção de ácidos nucleicos, mediante o uso de eletrodos impressos capazes de qualificar e quantificar a presença de substâncias (analito) acima
10 citadas através de resposta elétrica.

Antecedentes da Invenção

A detecção de seqüências específicas de ácidos nucleicos é necessária para
15 diversas áreas, como testes de diagnósticos para mutações e detecção precoce de câncer, análise de seqüências gênicas, investigação forense, avaliação do tratamento médico e agentes biológicos.

Atualmente, há um enorme interesse no desenvolvimento de sistemas bioanalíticos que sejam portáteis, fáceis de usar e de baixo custo para o diagnóstico
20 rápido de doenças genéticas e infecciosas. Biossensores através da hibridização dos ácidos nucleicos se tornaram uma das grandes ferramentas de diagnóstico, principalmente, quando a transdução do sinal do evento da hibridização é proveniente de método eletroquímico.

Os tratamentos de saúdes demandam, por vezes, um resposta rápida para o
25 diagnóstico e prevenção de enfermidades e problemas relacionados à saúde. As formas de detecção no estado da técnica atual nem sempre conseguem dar uma resposta em tempo hábil para estes tratamentos. Isso gera naturalmente uma

demanda pelo desenvolvimento de novas técnicas, como é o caso da presente invenção.

O método óptico, amplamente utilizado, é baseado na medida de mudanças no espectro. A quantificação desses analitos é realizada por medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida ou propriedades fluorescentes das moléculas analisadas. Uma limitação importante dos métodos ópticos é na medição de amostras com alta turbidez, o qual dificulta a passagem dos feixes de luz pelo analito.

Baseada no método ótico, a patente GB20070002681 intitulada “DNA-based biosensor” de 12 de fevereiro de 2007, descreve um biosensor de detecção por método de luminescência. Essa invenção, no entanto, além de não servir para detecção de RNA exige uma condição ambiental controlada e muitas etapas no processo de detecção o que demanda um longo tempo para os resultados e gera um aumento dos custos de diagnóstico, limites importantes do estado da técnica.

A patente 11/427,544 intitulada “DNA biosensor and methods for making and using the same” de 29 de junho de 2006, descreve um sistema para quantificação de ácidos nucléicos e anticorpos, porém a detecção demanda uma amplificação dos ácidos nucléicos o que implica em maior tempo e custos para o processo de diagnóstico. O tipo de técnica demanda ainda o uso de pessoal qualificado onerando o processo de detecção e dificultando sua realização em lugares que não disponham de ambiente controlado e pessoal especializado.

Uma alternativa para o método ótico seria o método eletroquímico, pois este se caracteriza por ser de baixo custo, de simples utilização, rápida detecção, alta sensibilidade e de fácil miniaturização. A patente 12/540,669 intitulada “ Method for detecting biomolecules and use thereof ” de 13 de Agosto de 2009, descreve um sistema para detecção de biomoléculas alvo, através de método eletroquímico. No entanto, esta patente que utiliza uma molécula que deve ser constituída de metais, componentes metálicos, nanopartículas de prata ou anticorpos e que se ligam a biomolécula alvo (target), não tem como comprovar que esta biomolécula se ligou ao target ou a sonda, podendo levar a resultados falso positivos em um diagnóstico. A

utilização destas moléculas constituída de metais, componentes metálicos, nanopartículas de prata ou de anticorpos aumenta também os custos do processo.

A patente 11/619,232 intitulada “Electrochemical detection of nucleic acids sequences” de 3 de Janeiro de 2007, descreve um biossensor para detecção de ácidos nucleicos, porém utiliza o método de PCR para amplificar o número de cópias de ácidos nucleicos e utiliza métodos para amplificação do sinal de hibridização, como: enzimas, anticorpos-conjugados com fluoróforos, podendo utilizar ainda mediadores eletroativos. Isso tudo aumenta o número de etapas, e, por conseguinte as chances de erro, e de tempo no processo de diagnóstico, assim como também aumenta o seu custo. Este tipo de técnica demanda ainda o uso de pessoal qualificado que nem sempre é possível, sobretudo quando o diagnóstico deve ser realizado em regiões desprovidas de estrutura laboratorial adequada.

A patente 10/008,233 intitulada “Electrochemical detection of nucleic acid hybridization” de 6 de Novembro de 2001, descreve um método para detecção de hibridização de ácidos nucleicos em geral. No entanto, esta invenção não considera aspectos importantes na detecção de RNA, em particular aspectos devidos à rápida degradação destes em meio aquoso, células ou tecidos. Outro aspecto a considerar, é o fato de que, nesta invenção após a hibridização, ocorre uma reação ao final da sonda entre uma base pré-selecionada e um metal de transição, levando a uma reação de óxido-redução que gerará um sinal capaz de identificar se houve ou não a hibridização. Essa quantidade de etapas implica, por vezes, em longo tempo para a realização do processo de detecção, incrementando também o seu custo de mercado.

O biossensor proposto na presente invenção pode ser utilizado sem a necessidade de um laboratório bem equipado e sem instrumentos complexos, numa abordagem que reduz o sinal de fundo indesejado, permitindo a identificação rápida das biomoléculas capturadas com alta sensibilidade, especificidade e requerendo o processamento de pequena quantidade de amostra, superando assim os limites atuais do estado da técnica.

Descrição da Invenção

A presente invenção descreve um processo composto por uma fase de imobilização, uma fase de hibridização e uma fase de detecção de ácidos nucléicos. Inicialmente, fase de imobilização, o fluido é colocado no eletrodo de trabalho descrito abaixo onde a sonda é imobilizada por um processo de adsorção (outros processos de imobilização, como ligação covalente, também podem ser usados). Outros eletrodos são deixados sem sonda a fim de obter informação comparativa. Em seguida, fase de hibridização, é realizado um processo de hibridização para detecção de um DNA alvo. Acontecendo a hibridização, essa será detectada, fase de detecção, através de um sinal eletroquímico mensurável que indicará a presença do DNA referente à doença pesquisada. O sinal de detecção pode ser amplificado através do uso de um indicador ou intercalador ou outro processo de amplificação conhecido.

A presente invenção descreve ainda um produto na forma de uma fita teste composta por um ou mais eletrodos de trabalho que recebem uma sonda específica para cada tipo de doença a ser testada, um ou mais eletrodos de referência e um ou mais eletrodos auxiliares. A fita teste é desenvolvida pela impressão de uma tinta e/ou pasta condutora em um suporte constituído de PVC (polyvinyl chloride), podendo também ser PVA (polyvinyl acetate), suporte cerâmico, vítreo ou outro material inerte não condutor. O eletrodo de trabalho é construído com pasta de carbono, mas pode também ser constituído de ouro, nanotubos de carbono, grafeno, entre outros compostos capazes de conduzir corrente elétrica. O eletrodo de referência é impresso com um tinta composta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), mas pode também ser composto por paládio, platina ou outro material condutor. O eletrodo auxiliar pode ser composto de platina ou outro material condutor.

Do ponto de vista de função, o eletrodo de trabalho é responsável pela geração de um sinal elétrico correspondente à realização do processo de hibridização. O eletrodo de referência é responsável pela geração de um sinal elétrico correspondente a uma simples aplicação de uma diferença de potencial. O eletrodo auxiliar tem como função reduzir os ruídos das medidas de corrente geradas a partir dos eletrodos de trabalho e de referência. Em funcionamento, uma diferença de potencial é aplicada na

fita teste gerando uma corrente que passa pelos eletrodos de referencia, trabalho e auxiliar. A passagem dessa corrente determinará a geração de sinais que em função de sua magnitude, identificarão a ocorrência ou não de hibridização no eletrodo de trabalho. A hibridização corresponde à identificação positiva para a doença pesquisada, ou seja, o ácido nucléico da doença investigada é complementar a sonda 5 imobilizada no eletrodo de trabalho.

Em conjunto o processo e produto acima descrito asseguram que no caso positivo para hibridização, sinais diferentes poderão ser lidos nos eletrodos de trabalho e de referência, determinando um processo rápido e simples para detecção 10 de ácidos nucléicos.

A figura 1 descreve uma fita teste (a) tendo um eletrodo de trabalho (b), um eletrodo de referência (c), duas áreas de conato (d) e (e), uma superfície isolante (f) e uma área de reação (g). Numa primeira modalidade preferida, a fita teste será constituída de um ou mais eletrodos de trabalho em carbono, e um eletrodo de 15 referência em prata/cloreto de prata (Ag/AgCl).

Numa segunda modalidade preferida (Figura 2), a fita teste conterà uma área de reação (a) e três eletrodos: um eletrodo de trabalho (b), um eletrodo de referência (c) e um eletrodo auxiliar (d). Os eletrodos de trabalho e de referência são tais como descritos acima, enquanto que o eletrodo auxiliar é feito em platina e tem a função de 20 reduzir ruídos elétricos gerados na reação eletroquímica, permitindo que o eletrodo de referência mantenha um potencial constante.

Numa terceira modalidade preferida (Figura 3), a fita teste é composta por uma área de reação (a), de dois ou mais eletrodos de trabalho (b), um eletrodo de referencia (c) e um eletrodo auxiliar (d). Essa modalidade visa a detecção simultânea 25 de dois ou mais ácidos nucléicos diferentes, a partir do mesmo processo descrito acima.

A Figura 4 mostra a diferença de potencial, normalmente na faixa de 0,5 V a 1,2 V, mas não restrito apenas a esta faixa, sendo aplicada nos eletrodos de trabalho (b) e referência (c) e o fluxo da corrente entre os eletrodos e a área de reação.

A Figura 5 mostra um gráfico dos sinais emitidos pela fita teste onde a curva (a) representa o sinal referente a sonda imobilizada (sem hibridização) e a curva (b) representa o sinal referente a hibridização no eletrodo de trabalho.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo na forma de biossensor para detecção de ácidos nucleicos caracterizado por imobilizar uma fita simples e específica para cada ácido nucleico alvo de DNA ou PNA e detectar sua hibridização com o DNA ou RNA alvo em um eletrodo de trabalho incorporado a uma fita teste.
5
2. Processo na forma de biossensor tal como descrito na reivindicação 1 caracterizado por conter e utilizar um eletrodo auxiliar como forma de reduzir o ruído do sinal gerado a partir do eletrodo de trabalho.
- 10 3. Um produto na forma de fita teste caracterizado por compreender um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar e uma área de reação.
4. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- TGG AAA TCT TTT TTT GAA AGG CTT TGG - 3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do papilomavírus bovino.
15
5. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- CCA AAG CCT TTC AAA AAA AGA TTT CCA - 3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do papilomavírus bovino.
20
6. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5' – CCG CAC ACG GCG TTC ACC CAA CGC AGG TA – 3' obtido através de alinhamento genômico para detecção da febre aftosa.
7. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter
25 uma fita teste com um fragmento genético 5'-
AGGGGAGATTTGTGTGGCTGCAGCCGAGGGAGACCAGGAAGATCTGCATGG -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do câncer de próstata.

8. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- CCC CGA TCC CGC CGA CCC TGT C -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania infantum*.

5 9. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- GTT CCG GCC CCA CGG CAT CAC C -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania sp.*

10. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- ICT TCT CIT TTC ICT TTI AA -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania brasiliensis*.

10 11. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- GTT CCG GCC CCA CGG CAT CAC C -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania brasiliensis*.

Figura 1

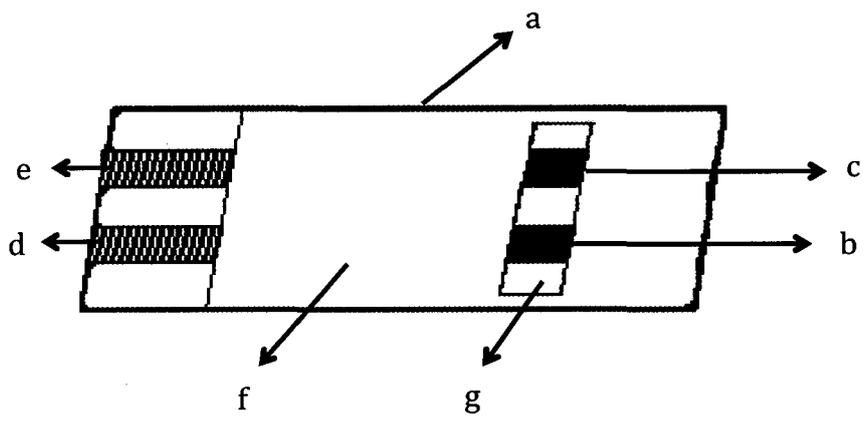


Figura 2

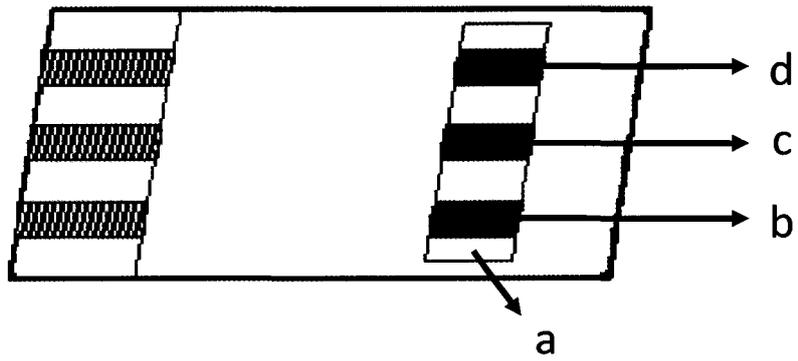


Figura 3

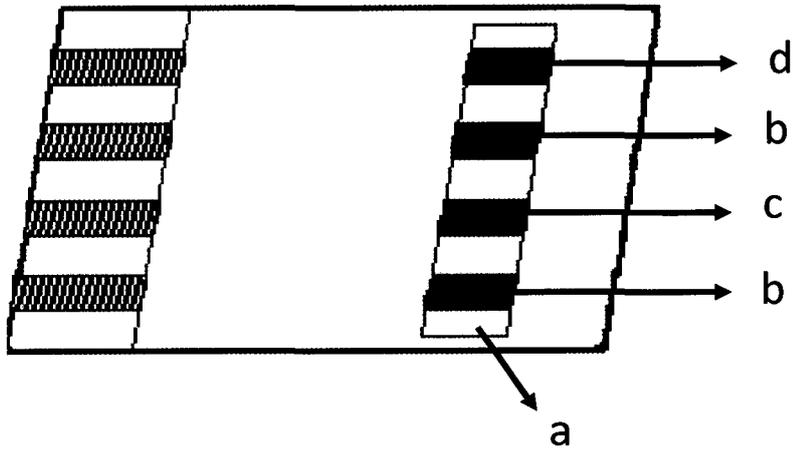


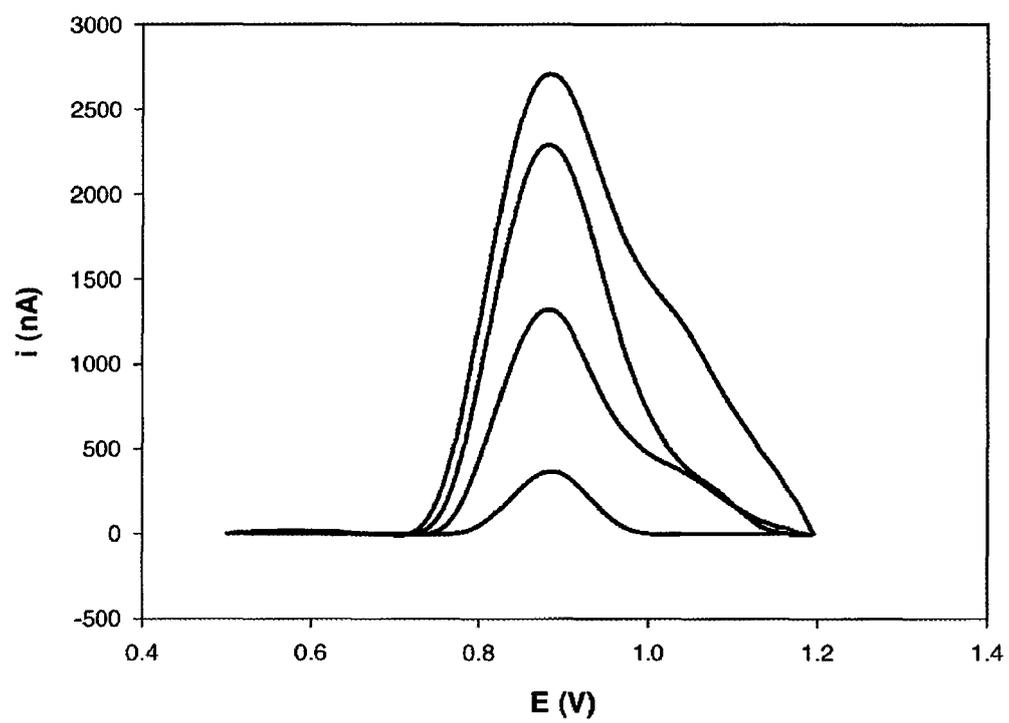
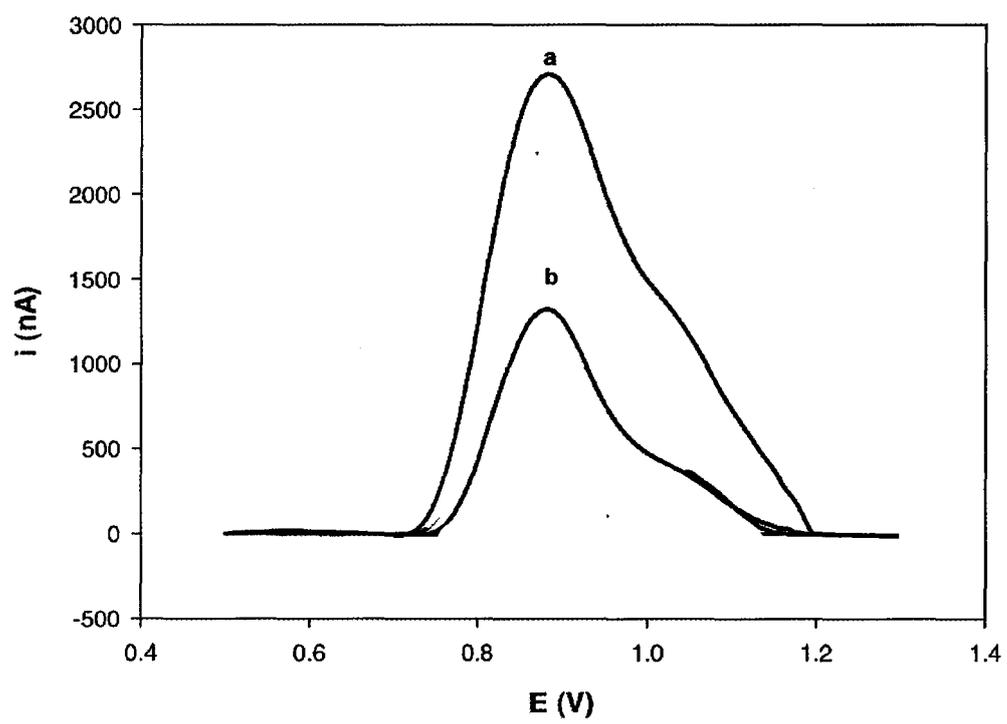
Figura 4

Figura 5

BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

RESUMO

A presente invenção refere-se a um processo eletroquímico para detecção de ácidos nucléicos e um produto na forma de fita teste, incorporados em um biossensor para detecção de DNA e RNA e por conseguinte das doenças correspondentes.

5