



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

(21) BR 102019021496-1 A2



(22) Data do Depósito: 11/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 20/04/2021

(54) **Título:** BIOSSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

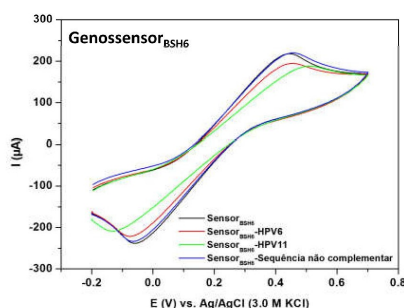
(51) **Int. Cl.:** C12Q 1/68; C12Q 1/70; G01N 27/327.

(52) **CPC:** C12Q 1/68; C12Q 1/70; G01N 27/327.

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

(72) **Inventor(es):** KAREN YASMIM PEREIRA DOS SANTOS AVELINO; LÉONY SOARES DE OLIVEIRA; MAÍRA DE ARRUDA LIMA; NORMA LUCENA CAVALCANTI LICÍNIO DA SILVA; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE; MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA.

(57) **Resumo:** BIOSSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS. é resultado de uma metodologia simples para a fabricação de sistemas utilizáveis na identificação de genótipos de papilomavírus humano (HPV). O método descreve a construção de eletrodos flexíveis baseados em ITO com baixo custo de produção e eficácia transdutora para aplicação em biossensores de DNA. Objetivando-se aprimorar a performance analítica dos eletrodos, uma plataforma nanoestruturada foi elaborada sobre a área ativa do eletrodo flexível e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada em polipirrol (PPy), nanoestruturas de ouro (AuNs) e cisteamina (Cys). Pode-se verificar que os filmes de PPy atuam como substratos ideais para a eletrossíntese de AuNs com reduzido grau de agregação molecular. Por sua vez, as AuNs demonstram biocompatibilidade e elevada área de superfície para a imobilização de biomoléculas receptoras. Assim, constata-se que a associação dos materiais funcionais supracitados é uma estratégia inovadora para a obtenção de sistemas sensores ultrasensíveis. Portanto, a fim de tornar os sistemas transdutores aplicáveis ao diagnóstico de HPV, sequências curtas de DNA (denominadas de sondas de DNA) foram desenhadas para reconhecer estritamente famílias de papilomavírus. Posteriormente, estes oligonucleotídeos de cadeia curta modificados com grupos (...).



BIOSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Campo técnico

01. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres de todo o mundo. De acordo com estudos clínicos e epidemiológicos, a etiologia de aproximadamente 100% dos casos de câncer cervical está relacionada às infecções por papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico. Diante destes dados, verifica-se a importância do desenvolvimento de novos métodos moleculares para o diagnóstico da infecção em fase inicial, contribuindo para a prevenção do câncer e promoção da qualidade de vida dos pacientes.

02. A presente invenção aplica-se ao campo das ciências médicas, especificamente ao setor de diagnósticos clínicos. A invenção aqui descrita refere-se a um grupo de processos inter-relacionados que resultou no desenvolvimento de um protótipo de biossensor eletroquímico aplicável ao diagnóstico clínico e laboratorial de HPV. Particularmente, a invenção faz menção ao uso de técnica eletroquímica como ferramenta para a obtenção de plataformas sensoras, as quais podem ser construídas sobre superfícies transdutoras de eletrodos e/ou chips miniaturizados.

03. Primariamente, a descoberta reporta-se a um protocolo de elaboração de eletrodos de trabalho miniaturizados baseados no uso de tiras flexíveis de óxido de índio dopado com estanho (ITO) modificadas com filmes de polipirrol (PPy), nanoestruturas de ouro (AuNs) e cisteamina (Cys). Em especial, ressalta-se a eletropolimerização de monômeros de pirrol para obtenção de filmes de PPy através da técnica de voltametria cíclica (VC). Estes filmes poliméricos podem ser sintetizados diretamente sobre transdutores eletroquímicos, atribuindo-lhes notáveis propriedades, como o aumento da

condutividade elétrica e biocompatibilidade. Em adição, os filmes de PPy possuem sítios de nucleação que possibilitam a eletrossíntese de AuNs com elevado grau de orientação. As AuNs obtidas por síntese eletroquímica apresentam um baixo grau de agregação e elevada área de contato, que contribui para a imobilização de um maior número de biomoléculas e, portanto, aumento da sensibilidade de sistemas de biodetecção. Logo, estas características tornam os filmes de PPy associados às AuNs substratos ideais para a montagem de nanoplataformas e miniaturização de biossensores.

04. O uso de filmes de PPy associados às AuNs possibilitam a ancoragem de sequências nucleotídicas para o desenvolvimento de biossensores de DNA. Adicionalmente, a invenção descreve o desenvolvimento e a validação de sequências de oligonucleotídeos (sondas de DNA) elaboradas especificamente para distinguir famílias de HPV. Mediante a imobilização covalente destas sondas de DNA sobre a superfície eletroativa dos eletrodos flexíveis, obteve-se um modelo de biossensor funcional cuja metodologia de preparação e uso foram descritas. Destaca-se o emprego de ligações químicas covalentes na ancoragem de biomoléculas por reduzirem o processo de lixiviação da camada sensora e aumentarem a estabilidade do sistema eletroquímico.

05. A associação entre materiais nanométricos, polímeros condutores e biomoléculas é uma estratégia inovadora para a obtenção de biossistemas nanoestruturados. Em particular, os biossensores propostos demonstram elevada performance analítica para a detecção diferencial de genótipos de HPV em baixas concentrações. Além disso, a engenhosidade do invento pode ser empregada para a construção de outros biossensores eletroquímicos com diferentes aplicabilidades, variando-se a especificidade da biomolécula receptora de DNA.

Estado da técnica

06. O progresso da pesquisa biotecnológica contribuiu para o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos aplicáveis ao setor de diagnósticos clínicos. Os dispositivos sensoriais representam uma tendência emergente e tecnológica nas ciências biomédicas, contribuindo para a identificação, quantificação e monitoramento de espécies químicas específicas (ALBAREDA-SIRVENT; MERKOCI; ALEGRET, 2000; HUANG et al., 2017). Em especial, ressaltam-se os biossensores eletroquímicos por serem sistemas de detecção que apresentam como agente de reconhecimento uma molécula biológica imobilizada sobre a superfície de um transdutor eletroquímico. Nestes sistemas, o processo de biorreconhecimento é convertido em um sinal analítico mensurável e proporcional ao alvo detectado (DRUMMOND; HILL; BARTON, 2003).

07. Um fator primordial que influencia a capacidade de detecção dos biossensores é a escolha do material biológico a ser utilizado como biorreceptor. Dentre as inúmeras biomoléculas, segmentos de ácidos nucleicos, comumente chamados de sondas de DNA, são extensivamente utilizados na elaboração de sistemas biossensíveis. Os genossensores ou biossensores de DNA são baseados em sondas de biorreconhecimento para captura de genes específicos através da hibridação molecular. Esta classe de biossensores apresenta amplo potencial de aplicabilidade para o diagnóstico clínico e laboratorial, pois, são ferramentas de biodetecção que permitem uma rápida análise do analito a um baixo custo, com a possibilidade de reusabilidade e miniaturização (WU et al., 2014; ZHU et al., 2014; CHAO et al., 2016).

08. Em particular, destaca-se que estas sondas de DNA podem apresentar grupos químicos funcionais na extremidade 5' ou 3', como grupos amino (-NH₂) e tiol (-SH), que permitem o estabelecimento de ligações covalentes com o substrato. Esta estratégia de ancoragem química tem sido amplamente explorada para o desenvolvimento de novos sistemas moleculares, uma vez que minimiza o processo de lixiviação da camada sensora e permite uma orientação específica das biomoléculas, contribuindo

para o aumento da capacidade de biorreconhecimento (TEENGAM et al., 2017; JAMPASA et al., 2018; RASOULI et al., 2018).

09. Com o advento da nanotecnologia e síntese de novos materiais em nanoescala, foi possível reduzir significativamente as limitações inerentes ao processo de construção dos biossensores de DNA, tais como, perda de estabilidade após ancoragem do biorreceptor e reprodutibilidade do sinal analítico. Entre os nanomateriais, destacam-se as AuNs por possuírem características essenciais e aplicáveis ao desenvolvimento de sistemas biossensíveis. Estas apresentam elevada área de contato, elevada atividade catalítica, compatibilidade biológica, elevada condutividade, não-toxicidade e habilidade de adsorção molecular. Logo, em virtude destas propriedades físicas e químicas, a incorporação de AuNs em sistemas de biodeteção pode aumentar a eficácia analítica e a robustez dos biossensores de DNA (WANG et al., 2016).

10. Os polímeros condutores também são considerados materiais funcionais para a nanoestruturação de plataformas sensoras, viabilizando novas possibilidades tecnológicas no design de biossensores (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Apesar destes polímeros serem substâncias orgânicas, são capazes de assumir um caráter intrinsecamente condutor, sendo por isso, denominados de metais sintéticos. Esses materiais têm ampliado a possibilidade de modificação da superfície de eletrodos para o desenvolvimento de sensores com propriedades eletroquímicas aprimoradas, tais como elevada condutividade elétrica, capacidade de armazenamento de carga e elevada cinética de transporte de elétrons na interface eletrodo/solução. Dentre os polímeros condutores, filmes de PPy têm sido investigados devido ao potencial para a fabricação de sensores bioquímicos ultrasensíveis. Esta aplicação é devido a sua biocompatibilidade, estabilidade ambiental, presença de grupos químicos funcionais e elevada taxa de transferência de elétrons que contribui significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodeteção. Ademais, a síntese eletroquímica do PPy permite a deposição

direta do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo, mediante a oxidação do monômero pirrol em potenciais relativamente baixos (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Sob outra perspectiva, estudos tem demonstrado que o PPy é um excelente material a ser usado como substrato ou matriz para a eletrodeposição de AuNs com redução da agregação molecular e aumento da área de superfície para posterior imobilização de biomoléculas. Logo, a combinação de filmes de PPy com AuNs eletrodepositadas é uma estratégia inovadora para a fabricação de biossensores funcionais com distintas aplicabilidades clínicas, como por exemplo, o diagnóstico de HPV (LI; SHI, 2005).

11. Considerando-se os estudos clínicos e dados epidemiológicos que demonstram os impactos das infecções por HPV na saúde pública, o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico torna-se essencial. O HPV, um vírus de DNA não envelopado, é um agente infeccioso oncogênico responsável por causar infecções nas mucosas e no epitélio anogenital. Este patógeno pode acarretar uma variedade de condições clínicas, incluindo verrugas, causadas por tipos virais de baixo risco oncogênico (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 e 81), e neoplasias, resultantes de alterações citogenéticas ocasionadas por tipos virais de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) (HUTTER; DECKER, 2016). Entre os mais de 200 genótipos de HPV descritos na literatura, os tipos 16 e 18 destacam-se por estarem relacionados a aproximadamente 100% dos casos mundiais de carcinoma cervical (CAMPOS-FERREIRA et al., 2013; HUANG et al., 2015). Estudos também relatam que co-infecções entre os genótipos de HPV16 e/ou 18 com outros tipos virais, como o HPV45 e 31, podem ocasionar quadros clínicos graves, tornando a terapêutica mais difícil e laboriosa (PITTA, 2010). Além disso, pode-se inferir que infecções persistentes por papilomavírus estão intrinsicamente relacionadas com o desenvolvimento de cânceres, como o câncer cervical, peniano, vaginal, vulvar e anal (CIVIT et al., 2012).

12. A identificação do tipo de HPV em amostras clínicas possibilita um melhor prognóstico para o paciente, um diagnóstico de câncer em estágio inicial e a implementação de estratégias terapêuticas dirigidas para a obtenção de resultados mais satisfatórios. Além disso, permite o rastreamento de genótipos virais mais frequentes em uma população (HUTTER; DECKER, 2016). As principais técnicas moleculares utilizadas para a pesquisa de HPV compreendem a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e os ensaios de captura híbrida (CIVIT et al., 2012; HUANG et al., 2015). Apesar de serem específicos, estes métodos apresentam alguns obstáculos que limitam seu amplo uso em áreas hospitalares e laboratoriais, como os altos custos para a aquisição de equipamentos e protocolos experimentais complexos e demorados (CAMPOS-FERREIRA et al., 2016; URREGO et al., 2015). Logo, o desenvolvimento de novos ensaios moleculares para a detecção de HPV com elevada acurácia e performance bioanalítica é de grande interesse para a promoção da saúde de pacientes infectados (FRÍAS et al., 2015).

13. Diversos pesquisadores têm se dedicado ao estudo de metodologias mais eficazes para a detecção de HPV. Neste intuito, a patente PI 1106062-0 A2 se refere à construção de um biossensor eletroquímico para a detecção de genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico. O sistema analítico desenvolvido é constituído por sondas de DNA imobilizadas diretamente sobre um suporte condutor sólido. Neste invento foram utilizados diferentes tipos de sondas de DNA para a detecção de genótipos de HPV através do uso de uma fita teste ou multifita que contém os eletrodos de trabalho, referência e contra referência.

14. A patente CN103602755A descreve a obtenção de sensores eletroquímicos baseados no uso de sequências de DNA ancoradas sobre a superfície de um eletrodo de ouro presente em uma placa de circuito impresso. Em adição, o sinal analítico é detectado através da marcação das sondas de biorreconhecimento com moléculas de ferroceno.

15. A patente PI 2014703411 apresenta um nanobiossensor para a detecção específica dos genótipos de HPV16 e 17. O nanochip foi baseado na imobilização covalente de sondas de oligonucleotídeos sobre um eletrodo interdigitado modificado com camadas de óxido de titânio.

16. O uso da técnica piezoelétrica é descrita na patente PI 2012700858. O invento refere-se a um biossensor construído sobre um eletrodo de ouro modificado com um filme de biotina, que atuou como um sítio de ligação covalente para oligonucleotídeos. Neste estudo, a variação da frequência da microbalança de cristal de quartzo indicou a presença de HPV de alto risco oncogênico nas amostras testadas.

17. O presente invento relata um processo metodológico para a construção de protótipos de biossensores eletroquímicos livres de marcadores utilizados na identificação de genótipos de HPV. Os sistemas de detecção são baseados no uso de tiras flexíveis de ITO, sob as quais são estruturadas nanoplataformas para a amplificação do sinal analítico. A modificação de superfície foi fundamentada em princípios de imobilização química entre os constituintes PPy, AuNs e Cys. Além disso, novas sequências de oligonucleotídeos específicas para o reconhecimento de famílias de papilomavírus são descritas nesta patente. Objetivando-se tornar o sistema protótipo funcional, estas sondas de DNA foram ancoradas covalentemente sob a plataforma nanoestruturada. Ressalta-se que o sistema aqui descrito também pode ser utilizado com outras finalidades além da detecção de HPV, variando-se a natureza do biorreceptor.

18. Apesar dos inventos descritos apresentarem semelhanças em relação a presente patente, as diferenças existentes podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre os componentes característicos de cada invento.

	Presente invento	PI 1106062-0 A2	CN 103602755 A	PI 201470341 1	PI 201270085 8
Substrato de ITO	Sim	Não	Não	Não	Não
Polímero polipirrol	Sim	Não	Não	Não	Não
Nanoestruturas de ouro	Sim	Não	Não	Sim	Não
Imobilização covalente das sondas de DNA	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Uso de marcadores eletroquímicos	Não	Sim	Sim	Não	Não
Transdutor eletroquímico	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Transdutor piezoelétrico	Não	Não	Não	Não	Sim

Problemas do estado da técnica

19. As principais limitações que podem ser identificadas no desenvolvimento da técnica são a construção de eletrodos com a mesma área eletroativa, cuja variabilidade interfere diretamente na reprodutibilidade e acurácia dos biossensores eletroquímicos. Para minimizar esta problemática, moldes com diâmetros específicos foram utilizados para delimitar a superfície de trabalho. Outrossim, o número de segmentos de oligonucleotídeos imobilizados sobre o transdutor eletroquímico e a manutenção da conformação molecular das sondas de DNA são fatores que interferem diretamente na sensibilidade e capacidade de biorreconhecimento dos sistemas de detecção. Desta forma, a fim de aumentar a performance analítica dos biossensores foi empregada a associação de filmes poliméricos de PPy com nanoestruturas

metálicas. Esta estratégia possibilitou a obtenção de plataformas nanoestruturadas com atraentes propriedades eletroquímicas, tais como, elevada área de contato, condutividade elétrica e biocompatibilidade, características estas essenciais para o interfaceamento do sinal analítico.

Objetivo da Invenção

20. A presente invenção tem como objetivo apresentar uma série de inventos interconectados que resultam no desenvolvimento de um protótipo de biossensor eletroquímico aplicável a pesquisa de HPV. O escopo da invenção compreende: a) desenvolver um protocolo metodológico para obtenção de eletrodos miniaturizados baseados no uso de tiras flexíveis de ITO; b) estabelecer um processo experimental para a construção de uma nova plataforma de interfaceamento composta por filme polimérico e nanoestruturas metálicas com a finalidade de aprimorar a capacidade de transdução e a performance bioanalítica dos sistemas sensores; c) construir sondas de DNA com grupos amino funcionais para a adequada imobilização covalente e subsequente reconhecimento específico de famílias de HPV; e d) imobilizar quimicamente estes oligonucleotídeos sobre os transdutores nanoestruturados para análise de sua eficiência de biodeteção.

21. A invenção aqui proposta visa a aplicação dos protótipos de biossensores eletroquímicos no diagnóstico de papilomavírus a partir do requerimento de pequenas quantidades de amostras clínicas (2 μL). Os biossensores são capazes de detectar o analito em um curto intervalo de tempo (15 minutos), com elevada sensibilidade e um limite de detecção de 100 pg/ μL .

22. Ademais, a invenção relatada nesta patente objetiva o desenvolvimento de novos sistemas nanoestruturados com a possibilidade de portabilidade, produção em larga escala e baixo custo operacional. Em particular, ressalta-se que os biossensores evitam e dispensam o uso de

marcadores, uma vez que a técnica eletroquímica é capaz de revelar alterações nas propriedades elétricas de superfície (como a capacitância e resistência à transferência de carga), cujas respostas são representativas da presença do gene alvo.

Solução do problema

23. O invento proposto dispõe, como ato inventivo, um processo de obtenção de eletrodos flexíveis construídos a partir da polimerização eletroquímica de PPy sobre um substrato transdutor de ITO, seguido da eletrossíntese de AuNs e quimissorção de moléculas de Cys. Por intermédio do desenvolvimento de sondas de DNA capazes de reconhecer famílias específicas de HPV e sua posterior imobilização sobre os eletrodos nanoestruturados, foi possível construir novos biossensores para o diagnóstico diferencial de papilomavírus. Tal feito, ressalta os protótipos sensores como biodispositivos inovadores, apresentando diversas vantagens em relação aos métodos convencionais de detecção de HPV. Particularmente, destaca-se a elevada sensibilidade, seletividade, rápido tempo de análise e baixo custo.

Vantagens da invenção

24. A invenção proposta apresenta uma metodologia para fabricação de um protótipo de biossensor com composição singular e inovadora. Primeiramente, o eletrodo miniaturizado descrito nesta patente possui um modelo economicamente viável e uma simplicidade de construção. Estas características viabilizam seu uso no desenvolvimento de dispositivos *point of care* utilizados para o diagnóstico rápido de distintas doenças.

25. Uma das vantagens destacadas na presente patente foi a modificação química da superfície de trabalho dos eletrodos miniaturizados

através de uma série de ligações covalentes entre diferentes materiais funcionais. Sabe-se que a imobilização química de estruturas e biomoléculas sobre suportes sólidos é uma das principais técnicas utilizadas na construção de biossensores. Este tipo de ancoragem reduz o processo de lixiviação da plataforma nanoestruturada e das biomoléculas de reconhecimento, garantindo assim, uma maior estabilidade e reprodutibilidade do sistema sensor.

26. Por meio desta estratégia única, foi possível estruturar com elevada organização molecular uma plataforma baseada em filme de PPy, AuNs e Cys. Os filmes de polímero condutor (PPy) foram depositados diretamente no substrato de trabalho através de polimerização eletroquímica, a qual fundamenta-se na aplicação de baixos potenciais para oxidação do monômero pirrol e subsequente reação de polimerização. Desta forma, foi possível obter filmes poliméricos uniformes, com elevada condutividade elétrica e espessura controlável mediante o número de ciclos voltamétricos aplicados.

27. Os filmes de PPy atuam como matrizes ideais para a eletrossíntese direta de nanoestruturas metálicas, tais como as AuNs. Estes filmes orgânicos fornecem um número significativo de sítios de nucleação para o crescimento de partículas com dimensões nanométricas e baixo grau de agregação. Destaca-se que a incorporação de AuNs em sistemas de biodetecção é capaz de aumentar a sensibilidade analítica dos biossensores, uma vez que estas nanoestruturas elevam a área de superfície e possibilitam um maior número de regiões para imobilização de biomoléculas. Logo, verifica-se que a conjugação entre polímero PPy e AuNs é um método eficaz para o desenvolvimento de biossensores ultrasensíveis e reprodutíveis.

28. Moléculas organossulfuradas, como a Cys, são capazes de formar uma monocamada automontada em toda a superfície do ouro. Esta habilidade é devido ao grupo tiol (-SH) presente na estrutura da Cys, cujo átomo de enxofre liga-se covalentemente a um átomo de ouro por um processo de quimissorção. Nesta reação termodinamicamente favorável, o átomo de

hidrogênio do grupo tiol é liberado na forma de hidrogênio molecular (H_2). Por meio desta modificação de superfície, as moléculas de Cys fornecem grupos químicos funcionais (grupos carboxílicos, $-COOH$; e grupos amino, $-NH_2$) às AuNs. Desta forma, aumenta-se a possibilidade de ligações covalentes entre nanoestruturas e biomoléculas, tais como as sondas de DNA.

29. Como uma regra geral para a construção de biossensores funcionais, as sondas devem ser imobilizadas de maneira previsível, mantendo sua capacidade de biodetecção. Independente da identidade molecular, a adsorção não-específica deve ser minimizada e a estabilidade das biomoléculas ancoradas deve ser preservada. Além disso, a orientação e acessibilidade das sondas de DNA são parâmetros essenciais para assegurar sua afinidade ao alvo HPV e sua eficiência de hibridização. Nestas circunstâncias, a arquitetura do genossensor (fundamentada no uso de PPy, AuNs e Cys) e a estratégia de ancoragem covalente das moléculas de biorreconhecimento garantem um processo de bioanálise eficaz. Ressalta-se que as sondas de DNA podem conferir aos sistemas de biodetecção elevada especificidade e seletividade, uma vez que estas moléculas de biorreconhecimento podem discriminar alterações nas sequências de oligonucleotídeos na ordem de uma única base nitrogenada. Além disso, há possibilidade de reutilização dos biossensores de DNA por intermédio de protocolos experimentais que promovam a de-hibridação das sondas de biorreconhecimento.

30. Os protótipos de biossensores eletroquímicos relatados nesta invenção foram capazes de identificar genótipos de HPV em concentrações mínimas na ordem de picomolar. Além disso, as respostas analíticas foram obtidas rapidamente, em um intervalo de 15 minutos, sem marcadores adicionais e com elevada reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e seletividade. Portanto, verifica-se que os sistemas de detecção apresentam vantagens apreciáveis que permitem seu uso em laboratórios de análises clínicas, de ensino ou pesquisa.

A novidade e o efeito técnico alcançado

31. A novidade da presente invenção está relacionada ao processo metodológico de construção de biossensores nanoestruturados aplicáveis ao diagnóstico clínico de HPV. Por meio da inventividade de eletrodos flexíveis de ITO modificados quimicamente com polímero PPy, AuNs e moléculas de Cys, obteve-se um sistema transdutor miniaturizado com elevada robustez e desempenho analítico. Outrossim, o desenho específico de segmentos de oligonucleotídeos com grupos amino funcionais possibilitou a ancoragem ordenada das sondas de DNA sobre a superfície dos eletrodos de trabalho. Por meio desta estratégia inovadora de imobilização molecular, mediante o uso de uma plataforma de interfaceamento em nanoescala, os biorreceptores de DNA mantiveram sua capacidade de detecção frente a famílias de HPV.

Descrição Detalhada

32. 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 dos protótipos de biossensores aos quais a presente patente se refere.

33. Em primeiro momento, consegue-se chegar à invenção através da construção de eletrodos de trabalho miniaturizados baseados em ITO, que são utilizados como transdutores para os sistemas propostos. O protótipo é baseado em tiras flexíveis de ITO com as dimensões de 3 cm de altura por 8 mm de largura. Para padronizar a área eletroativa, uma folha adesiva de policloreto de vinila (PVC) com um orifício circular (diâmetro de 5 mm) é sobreposta sobre a superfície de ITO. Assim, é possível obter um efeito de blindagem em regiões específicas do substrato de ITO condutor. Como resultado, uma área específica para a montagem do biossensor de DNA (0,2 cm²) e uma área disponível para o contato elétrico (0,8 cm²) são delineadas.

Após a obtenção dos eletrodos flexíveis, o processo de modificação de superfície é executado (Figura 1).

34. O procedimento subsequente de preparação das plataformas nanoestruturadas sobre os eletrodos flexíveis é relatado a seguir. Inicialmente, as plataformas nanoestruturas baseadas PPy, AuNs e Cys são construídas sobre os eletrodos miniaturizados de ITO, que atuam como eletrodos de trabalho. A primeira etapa de montagem consiste na eletropolimerização de pirrol. Para tal, os eletrodos de trabalho são imersos em uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,5 M contendo o monômero pirrol a uma concentração de 30 mM. Através da VC são aplicados seis ciclos de polimerização em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com uma velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. A segunda etapa compreende a síntese e deposição eletroquímica de AuNs sobre o filme de PPy. Utilizando uma solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) a 0,25 mM, são realizados dez ciclos voltamétricos com uma faixa de potencial de +0,2 a -1 V e velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. A terceira etapa refere-se a quimissorção de moléculas de Cys sobre as AuNs. Este processo fundamenta-se em interações covalentes estabelecidas entre os grupos tióis (-SH) das moléculas de Cys e os átomos de ouro das nanoestruturas. Nesta etapa, são adicionados 2 µL de uma solução de Cys a 2 mg/mL (proporção volumétrica de etanol:água igual a 3:1) por 30 minutos. Após obter a plataforma nanoestruturada de PPy-AuNs-Cys, é realizada a quarta etapa que reporta-se a imobilização química de sondas de DNA desenhadas especificamente para a detecção de famílias de HPV. Primeiramente, 2 µL de glutaraldeído a 0,5% são adicionados sobre a plataforma nanoestruturada por 10 minutos. Posteriormente, 2 µL de uma solução de oligonucleotídeos a 10 mM são acrescentados por 15 minutos para a construção dos nanossistemas de DNA. O glutaraldeído atua como um agente reticulante biofuncional, possibilitando a formação de bases de Schiff entre os grupos amino das moléculas de Cys e os grupos amino das sondas de DNA. Por fim, a quinta etapa compreende o bloqueio dos sítios inespecíficos

dos biossensores de DNA com moléculas de BSA. Nesta etapa, são acrescentados 2 µL de uma solução de BSA a 1% (pH 7,4) sobre a superfície dos eletrodos modificados por 30 segundos. Logo, através deste processo metodológico, os biossensores eletroquímicos baseado em PPy-AuNs-Cys-Sonda-BSA são desenvolvidos (Figura 2).

35. As sondas de DNA complementares a sequencias do gene L1 do HPV utilizadas na construção dos protótipos de biossensores e os genótipos de HPV que cada oligonucleotídeo é capaz de reconhecer são descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos tipos de HPV que podem ser identificados por cada sonda de DNA.

Sondas de DNA	Famílias de biorreconhecimento
Sonda BSH06	HPV6, 11, 44 e 55
Sonda BSH16	HPV16, 31, 33, 35, 52 e 58
Sonda BSH18	HPV18, 39, 45, 59 e 68
Sonda BSH26	HPV26, 51 e 82
Sonda BSH53	HPV53, 56 e 66
Sonda BSH61	HPV61, 62, 72, 81, 83, 84, 87 e 89

36. Com a finalidade de avaliar a especificidade, sensibilidade e seletividade dos biossensores de DNA, são realizados estudos de hibridação com a) plasmídeos recombinantes contendo a sequência de nucleotídeos do gene L1 de diferentes tipos de HPV e b) amostra contendo uma mistura de diferentes tipos de plasmídeos contendo a sequência de nucleotídeos do gene L1 de tipos de HPV não pertencentes à família de reconhecimento da sonda (controle negativo). Em cada ensaio, os sistemas de detecção são expostos a 2 µL da amostra a ser testada por 15 minutos para promover o processo de

biorreconhecimento. As diluições de todas as amostras biológicas são preparadas com solução salina de tampão fosfato (PBS; pH 7,4) e mantidas congeladas.

Metodologia de obtenção das sondas de biorreconhecimento

37. A construção das sondas de DNA para diagnóstico e identificação dos tipos de HPV consideraram a classificação do banco de dados “*Human Papillomavirus T cell Antigen Database*” desenvolvido pelo *Bioinformatics Core ar Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute da Harvard University*. As sequencias completas do gene L1 dos diferentes genótipos mostrados no banco de dados foram baixados do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. O número de acesso de cada sequência a ser utilizada nos alinhamentos subsequentes estão listadas na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Sequencias referências do gene L1 dos tipos HPV utilizados na construção de sondas para desenvolvimento do genossensor.

Família	Tipo HPV	Nº Acesso
F16	HPV 16	FJ006723.1
	HPV 31	HQ537668.1
	HPV 33	HQ537694.1
	HPV 35	GQ479039.1 M74117.1
	HPV 52	JN874436.1 HQ537751.1
	HPV 58	EU918765.1
F18	HPV 18	GQ180791.1
	HPV 39	JN104070.1 KC470249.1
	HPV 45	KC470260.1
	HPV 59	X77858.1
	HPV 68	EU918769.1
F26	HPV 26	NC_001583.1

	HPV 51	GQ487711.1
	HPV 82	AB027021.1
F34	HPV 34	NC_001587.1
	HPV 73	X94165.1
	HPV 53	NC_001593.1
F53	HPV 56	EF177180.1
	HPV 66	EF177190.1
	HPV 6	AF092932.1
F6	HPV 11	JQ773412.1
	HPV 44	HE963128.1
	HPV 55	HE963177.1
	HPV 7	NC_001595.1
F7	HPV 40	X74478.1
	HPV 91	AF419318.1
F32	HPV 32	NC_001586.1
	HPV 42	GQ472847.1
F54	HPV 54	U37488.1
	HPV 61	U31793.1
	HPV 72	X94164.1
	HPV 81	AJ620209.1
F61	HPV 83	AF151983.1
	HPV 84	AF293960.1
	HPV 62	AY395706.1
	HPV 87	AJ400628.2
	HPV 89	AF436128.1
F71	HPV 71	AY330623.1
F64	HPV 64	U12495.1
F70	HPV 70	U22461.1
F85	HPV 85	AF131950.1
F86	HPV 86	AF349909.1

38. O alinhamento das sequências do gene L1 dos tipos virais pertencentes a cada família foram realizados utilizando os parâmetros padrão (default) do programa MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>). A partir de blocos de similaridade entre as sequências alinhadas foi inserido degeneração em alguns oligonucleotídeos, visando que a sonda resultante fosse capaz de identificar todos os tipos dentro da família de HPV, de forma específica para a família. Blocos de similaridades de oligonucleotídeos para mais de uma família de HPV foram descartados. As sequências de oligonucleotídeos selecionadas tiveram 22 nucleotídeos de tamanho e, dentro do possível, até 5 posições degeneradas.

As estratégias de desenho dos oligonucleotídeos degenerados para separação de HPV de baixo e alto risco oncogênico são exibidas na Tabela 4. Em adição, as estratégias de desenho dos oligonucleotídeos degenerados para tipos de HPV da família 6, 16, 18, 53, 26 e 61 são apresentadas nas Tabelas 5 a 10. Por fim, as sondas construídas para identificação de família de tipos de HPV, pode identificar o genótipo a partir de uma árvore decisória entre resultados positivos e negativos para diferentes sondas utilizadas de forma simultânea, como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 4. Estratégia de desenho dos iniciadores para separação de HPV de baixo risco (incluindo HPV6, HPV11, HPV44, HPV54, HPV55, HPV61, HPV62, HPV71, HPV72, HPV81, HPV83, HPV84, HPV87, HPV89) e de HPV de alto risco (incluindo HPV16, HPV18, HPV26, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66, HPV68, HPV82).

R = A/G Y = C/T
M = A/C K = G/T
S = C/G W = A/T
B = C/G/T D = A/G/T
H = A/C/T V = A/C/G
N = A/C/G/T I = Inosin

Baixo Risco				Tipos																
Sequência	Início	Fim	Tamanho	Posição	6	11	44	55	61	62	72	81	83	84	87	89	54	71		
GAGGTGGGCAGGGGACAGCCATTAGGT				333	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
				336	G	A	A	G	T	C	T	A	T	A	G	G	T	A		
				339	C	C	T	T	T	C	T	C	T	C	C	C	T	C		
				340	A	A	A	A	A	C	A	C	C	C	C	C	A	C		
				342	G	G	A	A	G	T	G	C	T	C	T	G	G	C		
				345	A	T	A	C	G	G	C	A	T	G	C	T	C	A		
				348	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
				351	A	T	C	C	A	A	C	T	T	T	G	C	A	T		
				352	T	T	T	C	T	C	C	T	C	T	C	T	T	T		
				354	A	A	A	G	G	G	T	G	T	A	C	G	G	A		
GARGTNGGYMNGGNCARCCNYTNGGN	331	357	27	357	T	C	T	T	G	T	T	C	C	C	T	G	T	A		

CCTTTGGGACGCAAGTTTTGTTACAA				1416	T	C	C	C	T	T	T	T	T	C	T	T	C	A
				1417	T	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
				1419	G	T	T	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G
				1422	A	A	T	T	G	G	G	T	C	T	C	T	T	T
				1423	C	C	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
				1425	C	T	A	G	C	T	C	C	T	C	C	C	C	C
				1428	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
				1431	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T
				1432	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	T	T
				1434	G	A	A	A	A	G	G	G	T	A	G	A	A	G
				1435	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	C	C
				1437	A	G	A	G	G	A	A	G	G	G	G	A	A	G
CCHYTDGGDMGNAARTTYTRYTRCAR	1414	1440	27	1440	A	A	A	A	G	A	G	G	A	G	G	A	G	A

Alto Risco				Tipos																	
Sequência	Início	Fim	Tamanho	Posição	18	39	45	59	68	26	51	82	53	56	66	16	31	33	35	52	58
TTACCTGACCCAAATAAATTT	238	258	21	238	T	T	T	T	C	C	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T
				240	A	G	G	A	A	A	A	A	C	G	G	A	A	A	A	G	A
				243	T	C	C	T	T	T	A	T	A	C	T	T	A	A	A	G	T
				246	C	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	T	T	C	T
				249	A	T	T	C	T	T	T	C	T	T	T	C	A	T	T	T	C
				252	T	T	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T	C	T	T	T	T
255				A	A	A	A	A	A	G	A	G	G	G	G	A	A	G	A	A	
YTRCCNGAYCCHAAYAARTTY	238	258	21	258	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	

GGCCGTGGTCAGCCTTAGGT	331	351	21	333	C	C	T	T	T	T	C	T	C	C	C	T	T	T	T	T	T
				334	C	A	C	C	A	A	A	A	C	C	C	C	C	A	C	A	A
				336	T	G	T	G	G	A	A	G	T	C	A	T	C	A	T	G	G
				339	T	C	G	C	G	A	A	T	A	A	T	T	G	G	T	A	A
				342	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
				345	T	A	T	T	A	A	C	G	T	T	T	A	A	A	A	T	A
				346	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
				348	A	G	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G
GGYMGNGGNCARCCNYTDGGB				351	T	T	T	G	T	C	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T
TGTAAATATCCTGATTAT	694	711	18	696	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	C	T	C	C	T	C
				699	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A
				702	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
				705	T	T	A	T	T	T	T	C	T	T	A	A	A	T	A	A	A
				708	T	T	T	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T
TGYAARTAYCCHGAYTAY				711	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
TTTAATAAACCATATTGG	934	951	18	936	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
				939	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
				942	A	G	G	A	G	G	G	G	G	A	A	A	A	G	A	A	G
				945	A	T	A	A	C	A	T	T	A	T	T	A	A	A	A	G	T
TTYAAYAARCCNTAYTGG				948	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T
CTTGGACGTAAATTT	1408	1422	15	1408	C	T	C	T	T	C	T	T	C	C	T	T	C	T	T	T	T
				1410	T	G	T	G	A	A	G	G	T	G	G	A	G	G	G	A	G
				1413	A	A	T	A	A	G	T	T	C	T	T	A	T	A	C	T	A
				1414	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	C	C	C	C	A	C

			1416	T	T	A	T	C	T	A	C	G	A	A	C	C	C	T	A	A
YTDGGNMGNAARTTT			1419	A	A	G	A	A	G	G	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G

Tabela 5. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 16 (incluindo os HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58).

Família do 16	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 16	Tipo 31	Tipo 33	Tipo 35	Tipo 52	Tipo 58	Tamanho
Oligo16A -->	TTAAATAAATTGGATGACACAG	454	475	459	T	T	C	T	C	T	22
				462	A	A	A	A	G	A	
				465	G	T	T	G	T	T	
				471	C	C	C	T	T	C	
	TTAAATAAATTGGATGACACTG			474	A	T	T	T	T	T	
Oligo -->	TGGATTACAAACAAACAATT	533	554	540	C	T	T	T	T	T	22
				543	A	A	A	A	G	A	
				549	A	A	A	A	T	A	
				552	A	A	G	A	G	A	
	TGGATTAYAAACAAACWCARYT			553	T	C	T	T	T	T	
Oligo16B -->	AGGATGGTGTATGGTTCATAC	674	695	675	G	A	G	A	G	G	22
				678	T	T	T	C	T	T	
				681	T	G	T	G	G	T	
				684	T	T	T	C	C	C	
				690	T	T	G	A	A	A	
	AGGATGGTGAATGGTDSAYAC	854	875	691	C	G	G	G	G	G	22
				693	T	T	C	C	T	T	
	TTGTTAGACATTTATTTAATAG			858	T	A	A	T	T	T	22
				861	A	G	A	A	A	A	
				864	T	T	C	T	C	C	22

Oligo -->	TTGT T AG A CA C TTT T TTTAATAG			867	A	T	T	A	T	T	
	TTTT G GAG G ACTGG A ATTTTGG			1290	G	G	A	G	G	G	
				1293	G	A	A	G	G	G	
				1296	C	T	T	T	C	C	
Oligo -->	TTTT G GAG G ACTGG C AATTTTGG	1286	1307	1300	A	A	C	A	C	C	22
	CTGCAGAC C TAGATCA G TTTCC	1460	1481	1302	T	T	A	T	A	A	
				1461	T	T	A	T	T	T	
				1467	C	T	T	C	T	T	
Oligo16C -->	CTGCAGATTTAGATCA G TTTCC			1468	C	T	T	T	T	C	22
Oligo16 -->	GAG G CC A CTGT C TACT T G C CT C	100	121	1476	G	G	G	A	G	G	
				102	G	G	G	A	G	G	
				105	C	T	C	C	C	C	
				108	T	T	A	T	T	T	
				111	C	C	G	C	G	G	
	115	T	T	C	C	C	C				
	117	G	A	G	G	G	G				
	GAR G CYAC W GT S TAC Y TRCC W C			120	T	A	T	T	T	T	22

Tabela 6. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 6 (incluindo os HPV6, HPV11, HPV44, HPV55).

Família do 6	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 6	Tipo 11	Tipo 44	Tipo 55	Tamanho
	GGACAGGATAACAGGGTTAATG	409	430	411	A	T	T	T	22
				417	T	T	T	C	
				420	C	T	C	C	
	GGWCAGGAYAA YAGGGTWAATG			426	T	T	A	A	
Oligo 6 -->	GTGACTGCCCCGCCCTTAGAACT	539	560	540	T	T	G	A	22
				549	G	C	T	T	
				552	C	G	C	C	
				553	T	T	T	C	
Oligo 6A -->	GTGACTGCCCCGCCCTTAGAACT	539	560	555	A	G	G	G	22
Oligo 6B -->	GTGACTGCCCCCCGTTGGAAC			559	C	C	T	T	
Oligo -->	TACGGAAGGAACAAATGTTTGC	740	761	741	A	G	A	A	22
				744	G	A	A	A	
	TRCRGAAGGAACRAATGTTTGC			753	A	A	G	A	
Oligo -->	TTTGTTACTGTGGTAGATACCA	979	1000	990	G	G	T	T	22
	TTTGTTACTGTKGTAGATACYA			999	C	C	T	T	
Oligo -->	CAGGCCATTACCTGTCAAAAGC	1264	1285	1275	C	C	A	A	22
				1281	A	G	A	A	
	CAGGCCATTACMTGTCAARAARC			1284	G	A	G	G	
	GAAAAGTTTTCTAGTGAATTGG			1362	T	A	T	T	22
Oligo -->		1351	1372	1368	A	A	G	G	
	GAAAAGTTTTCWAGTGARTTRG			1371	G	A	G	A	

Tabela 7. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 18 (incluindo os HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68).

Família do 18	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 18	Tipo 39	Tipo 45	Tipo 59	Tipo 68	Tamanho
loop a 0	ACTGTGGTAATCCATATTTTA	313	334	315	T	A	T	A	T	22
				318	T	G	A	T	A	
				321	T	A	C	A	C	
Oligo -->				322	A	C	A	C	C	
loop a 0	AGTTACCTGACCCAATAAATT	413	434	413	A	C	C	A	C	22
				414	G	A	T	G	C	
				415	T	T	T	T	C	
				417	A	G	G	A	A	
				420	T	C	C	T	T	
				423	C	T	T	T	T	
Oligo -->				426	A	T	T	C	T	
loop a 0 grau	AGTGGGCATCCATTTTATAATA	538	559	543	G	A	C	T	G	22
				546	T	C	T	T	T	
Oligo 18A -->	AGTGGSCATCCATTTTATAATA			552	T	A	T	A	A	
	CCTGCTATTGGGAACACTGGG	673	694	675	T	C	T	T	T	22
				678	T	C	T	C	C	
				684	G	G	T	A	G	
(família)				687	A	G	G	A	G	
Oligo 18 -->	CCYGCYATTGGDGARCACTGGR	673	694	694	G	G	G	A	G	22
loop a 0	GATGGTGATATGAGATACTG	775	796	780	T	T	T	T	C	22

Oligo --> loop a 0				787	G	A	G	G	A	
				789	A	T	G	A	T	
				792	T	T	T	C	T	
				795	T	T	A	A	A	
	TTTTTGCTAGGCATTTTTGGAA			951	T	G	G	T	A	
Oligo 18B-->				957	T	A	A	C	T	
	TGTTTGCAGACATTTTTGGAA	950	971	960	G	A	A	A	G	22
	CCCACCATAGGCCCTCGCAAAC			1629	C	T	T	C	C	
Oligo 18C-->				1632	C	T	C	T	T	
				1638	C	T	A	C	C	
				1641	T	C	T	A	C	
				1644	C	A	T	C	T	
	CCYACYATAGGHCCGHAARC	1627	1648	1647	A	G	G	A	A	22

Tabela 8. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 53 (incluindo os HPV53, HPV56, HPV66).

Família do 53	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 53	Tipo 56	Tipo 66	Tamanho
Oligo -->	CAACGGATGCCTATGTAAAACG	173	194	181	G	T	A	22
				183	C	C	A	
Oligo -->	TTGCTTACCGTGGGACATCCTTA	229	250	235	A	G	G	22
				237	C	C	T	
				240	G	A	T	
				243	A	A	C	
				249	T	C	T	
(família)	TGCATTTTCAGTATAGGGTGTTT	300	321	305	T	A	A	22
				309	G	A	G	
				315	G	G	A	
				318	G	A	G	
Oligo 53 -->	TGCATWTCARTATAGRGTRTTT	300	321	318	G	A	G	22
Oligo 53A-->	GACATGGTGGACACAGGTTTTG	697	718	703	G	A	G	22
				705	G	A	G	
				711	A	G	C	
				714	T	A	G	
Oligo -->	AAATGAGTGCAGATGCCTATGG	809	830	814	A	T	T	22
	AAATGTCTGCAGATGCCTATGG			815	G	C	C	
	GATTCTATGTGGTTTTATTAC			849	T	C	C	
Oligo -->		832	853	-	-	-	-	22

Tabela 9. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 26 (incluindo os HPV26, HPV51, HPV82).

Família do 26	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 26	Tipo 51	Tipo 82	Tamanho
Oligo --> (família)	GGTGTGGGCCTGTGTTGGTGT	291	312	299	C	G	G	22
				300	C	T	A	
				306	T	G	T	
				309	T	C	T	
Oligo 26 -->	TTGGCCTTAGTGGACATCC TTT	341	362	354	A	T	T	22
	TTGGCCTTAGTGG W CATCC Y TT			360	T	C	T	
Oligo -->	TTATTGAGGATGGCGATATG	578	599	579	T	C	C	22
				583	G	C	G	
				598	A	A	G	
	TTGGAGCTATGGATTTTACT			615	A	A	G	
Oligo -->		611	630	618	T	T	C	22
				628	A	G	G	
	TGTTTGTTACCTGTGTTGATAC			987	G	T	T	22
Oligo -->		986	1007	991	G	A	A	
				996	C	C	T	
				1005	T	T	C	
	GGAATTTTGGACTAACCTTACC			1219	C	T	T	22
Oligo -->		1208	1229	1224	C	A	A	
				1227	A	A	G	

Tabela 10. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 61 (incluindo os HPV61, HPV84, HPV33, HPV87, HPV89).

Família do 61	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 61	Tipo 72	Tipo 81	Tipo 83	Tipo 84	Tipo 62	Tipo 87	Tipo 89	Tamanho
	CGCACCAACTTATTTATTATG	271	292	273	C	C	C	C	C	C	C	T	22
				280	T	C	C	C	T	C	T	C	
				282	A	C	T	C	A	T	A	G	
				284	T	A	T	T	T	T	T	A	
				285	T	T	T	T	T	T	T	C	
Oligo 61A -->	CGCACCAACTTATTTATTATG	271	292	291	T	T	T	C	T	T	T	T	22
	TTGAGGTTGGTAGGGGCAGCC	509	530	510	T	T	T	T	A	T	A	T	22
				516	T	C	T	A	T	A	G	G	
				519	T	C	T	C	T	C	C	C	
				520	A	C	A	C	C	C	C	C	
				522	G	T	G	C	T	C	T	G	
Oligo 61B-->	TTGAGGTAGGCCGCGRCAGCC	509	530	525	G	G	C	A	T	G	C	T	22
	AGGATGGCGATATGGTGGAAC	779	800	786	C	T	G	C	T	T	C	C	22
				789	T	C	C	C	T	C	C	T	
				795	G	G	G	G	T	A	T	G	
				798	A	A	A	A	G	A	G	A	
				799	A	A	A	A	G	A	G	A	
Oligo 61C -->	AGGATGGYGAYATGGTGGAAC	779	800	799	A	A	A	A	G	A	G	A	22
(família)	TGGATGACTGGAACTTTGGTGT	1394	1415	1395	G	G	G	G	A	A	G	A	22
				1401	C	C	C	T	G	G	G	A	
				1407	C	C	T	T	T	T	T	C	
Oligo 61 -->	TRGATGAN TGGAAYTTTGGBT	1394	1415	1413	T	G	T	T	C	T	G	T	22

Oligo 61R -- >	ATCAGTTTCCTTTGGGCGC	1580	1599	1581	T	C	T	T	T	T	C	C	20
				1584	G	G	G	G	G	G	A	G	
				1586	T	T	T	T	T	A	T	T	
				1587	T	T	T	T	T	T	T	C	
				1590	T	T	T	T	T	C	T	T	
				1593	G	G	A	G	G	G	G	G	
				1596	G	G	G	T	C	T	C	T	
	AYCARTWYCCYTTGGBCGY			1599	C	T	C	C	T	C	C	C	
	RCGVCCYAARGGRWAYTGRT												

Tabela 11. Identificação do tipo viral utilizando árvore decisória.

Primers	16	16A	16B	16C	6	6A	6B	18	18A	18B	26	53	53A	61	61A	61B	61C
Tipos																	
16	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
54	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
61	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
72	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
81	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
83	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
62	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
87	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Caracterização eletroquímica

39. O processo de desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos e sua bioatividade são monitorados por meio da técnica de VC. As medidas voltamétricas são realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N controlado por um computador através de um software de interfaceamento NOVA 1.11 (MetrohmAutolab, The Netherlands). Em adição, é utilizada uma célula eletroquímica convencional contendo 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 protótipo flexível de ITO atuou como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina são usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra-referência. Os voltamogramas cíclicos são registrados em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. Todas as análises eletroquímicas são realizadas em triplicatas, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

Estudo voltamétrico das etapas de montagem dos biossensores de DNA

40. A Figura 3 demonstra a caracterização eletroquímica das etapas de construção da plataforma nanoestruturada. Verifica-se que o voltamograma cíclico para o eletrodo de ITO após a eletropolimerização do monômero pirrol apresenta uma elevada densidade de corrente com uma expressiva resposta amperométrica. É importante ressaltar que o processo de oxidação na superfície do eletrodo de trabalho leva à formação de um filme polimérico estável com elevada condutividade elétrica. Devido estas propriedades, o PPy é capaz de aumentar a sensibilidade e seletividade de sistemas bioanalíticos (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; MAHMOUDIAN, et al., 2011).

41. Verifica-se que após a eletrossíntese das AuNs houve um decréscimo dos picos anódico e catódico. Este resultado está relacionado às condições de síntese eletroquímica e às propriedades do filme de PPy, sobre o qual as AuNs foram depositadas. Em razão do filme polimérico ser aderente à superfície de ITO e possuir uma fina espessura, espera-se que o PPy proporcione um maior número de sítios de nucleação para a formação de nanoestruturas. De acordo com Li e Shi (2005), essas características do filme polimérico conduzem à fabricação de AuNs com dimensões nanométricas reduzidas, presentes em um estado de não-agregação, que ocasiona uma diminuição de sua condutividade e aumento da área superficial.

42. Ao realizar a quimissorção de moléculas de Cys sobre as AuNs pode-se observar uma maior resposta condutimétrica e uma maior taxa de transferência de elétrons. Sabe-se que a molécula de Cys possui grupos funcionais tiol e amino que direcionam a formação de ligações covalentes entre nanoestruturas metálicas e biomoléculas. Em especial, o grupo amino pode ser protonado, passando a apresentar carga elétrica positiva que atrai eletrólitos carregados negativamente, como o ferricianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e ferrocianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Este processo favorece a ocorrência de reações de oxido-redução em regiões adjacentes à superfície do eletrodo. Logo, constata-se que a Cys é um composto orgânico que atua como um espaçador molecular e contribui para o aumento da sensibilidade de sistemas eletroquímicos (WANG et al., 2016).

43. Em seguida, foi observado que a ancoragem das sondas de sobre o eletrodo modificado com PPy-AuNs-Cys causou uma redução do sinal de corrente. Este resultado está relacionado a uma baixa penetração do par redox no sistema sensor. Isto ocorre devido à repulsão eletrostática entre os grupos fosfato das sondas de DNA e as cargas negativas dos eletrólitos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, contribuindo assim, para o bloqueio do processo redox na dupla camada elétrica (AVELINO et al., 2016). Como presumido, o bloqueio dos sítios inespecíficos do nanossistema de DNA com moléculas de BSA resultou em um decréscimo da medida voltamétrica e um aumento da resistividade. Portanto,

através destas caracterizações físico-químicas, foi possível comprovar a adequada montagem do biossensor eletroquímico em superfície de ITO.

Estudo de bioatividade dos biossensores de DNA

44. Como verificado na Figura 4 biossensores eletroquímicos foram construídos a partir da imobilização de sondas de DNA (sonda BSH06, BSH16, BSH18 e BSH53) sobre diferentes eletrodos flexíveis de trabalho. Após a exposição dos sistemas de biodetecção a plasmídeos contendo o gene L1 de HPV pertencente à família de reconhecimento da sonda, houve uma redução da resposta amperométrica e um bloqueio parcial dos processos de oxido-redução na dupla camada elétrica. Desta forma, foi evidenciada a capacidade dos biossensores em identificar tipos específicos de papilomavírus em concentrações mínimas na ordem de picomolar.

45. Além disso, para todos os biossensores eletroquímicos foram realizados ensaios de seletividade com uma amostra contendo uma mistura de diferentes tipos de plasmídeos contendo o gene L1 de tipos de HPV não pertencentes à família de reconhecimento da sonda. Verifica-se que após a exposição dos sistemas à amostra supracitada não houve alterações significativas no perfil voltamétrico de cada nanossistema, indicando assim, a seletividade dos biossensores propostos. Em adição, os biossensores foram testados com DNA extraído de células cervicais de mulheres infectadas por HPV, cujo genótipo foi determinado por sequenciamento utilizando método Sanger do fragmento do gene L1 viral amplificado pelos iniciadores MY9 e MY11 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

46. Portanto, verifica-se que protótipos de biossensores miniaturizados foram desenvolvidos com sucesso para o diagnóstico de diferentes tipos de HPV. A plataforma nanoestruturada baseada no polímero PPy, AuNs e Cys apresenta atraentes propriedades para a construção de sistemas de

biodetecção mais sensíveis, específicos e reprodutíveis. Os biossensores demonstram a capacidade de reconhecer o gene L1 de HPV com elevada seletividade, sensibilidade e um limite de detecção de 100 pg/μL. Em adição, através do uso de sondas de DNA específicas para famílias de HPV, é possível obter um diagnóstico diferencial entre os genótipos de papilomavírus. Logo, os biossensores descritos nesta patente podem ser considerados ferramentas promissoras para a pesquisa laboratorial e clínica de infecções por HPV.

Referências

ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 69, n. 1-2, p. 153-163, 2000.

AVELINO, K. Y. P. S. 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**, v. 148, p. 576-584, 2016.

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 258- 263, 2013.

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 443-450, 2016.

CHAO, J. et al. DNA nanotechnology-enabled biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 68-79, 2016.

CIVIT, L. et al. Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. **Analytica chimica acta**, v. 715, p. 93-98, 2012.

DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1192, 2003.

FRÍAS, I. A. M. et al. Trends in biosensors for HPV: identification and diagnosis. **Journal of Sensors**, v. 2015, 2015.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002

HUANG, H. et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 442-446, 2015.

HUANG, Y. et al. Disease-Related Detection with Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 2375, 2017.

HUTTER, J. N.; DECKER, C. F. Human papillomavirus infection. **Disease-a-Month**, v. 62, n. 8, p. 294-300, 2016.

JAMPASA, S. et al. A new DNA sensor design for the simultaneous detection of HPV type 16 and 18 DNA. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 514-521, 2018.

LI, Y.; SHI, G. Electrochemical growth of two-dimensional gold nanostructures on a thin polypyrrole film modified ITO electrode. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 50, p. 23787-23793, 2005.

MAHMOUDIAN, M. R. et al. Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 520, n. 1, p. 258-265, 2011.

PITTA, D. R. et al. Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 7, p. 315-20, 2010.

RASOULI, E. et al. Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus? **A review. Analytical biochemistry**, v. 556, p. 136-144, 2018.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

URREGO, L. F. et al. Biomicrosystem design and fabrication for the human papilloma virus 16 detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 97-104, 2015.

TEENGAM, P. et al. Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus. **Analytica chimica acta**, v. 952, p. 32-40, 2017.

WANG, N. et al. Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine–mercury–thymine structure. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 320-326, 2016

WU, L. et al. Nanomaterials as signal amplification elements in DNA-based electrochemical sensing. **Nano Today**, v. 9, n. 2, p. 197-211, 2014.

ZHU, C. et al. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 1, p. 230-249, 2014.

REIVINDICAÇÕES

01. BIOSSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS caracterizado pela presença dos componentes a seguir: a) eletrodo de trabalho com superfície eletroativa de óxido de índio dopado com estanho (ITO); b) filmes condutores de polipirrol (PPy); c) nanoestruturas de ouro (AuNs); d) monocamada automontada de cisteamina (Cys); e) agente de acoplamento glutaraldeído; f) sondas de DNA; e g) moléculas de albumina do soro bovino (BSA).
02. BIOSSENSOR, conforme reivindicação 1, caracterizado por eletrodos conectados a um potenciostato para mensuração voltamétrica.
03. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado por possuir um sistema de três eletrodos dispostos em uma gaiola de Faraday.
04. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 3, caracterizado por possuir um eletrodo flexível de ITO, eletrodo de referência Ag/AgCl saturado com KCl 3M e contra-eletrodo.
05. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 3 e 4 caracterizado por ser obtido a partir do uso de substratos de ITO com dimensões na faixa de 1 a 5 cm de altura por 4 a 12 mm de largura; sobrepostos a uma folha adesiva de policloreto de vinila (PVC) com um orifício circular para a obtenção de uma área específica para a montagem do genossensor e uma área disponível para o contato elétrico.
06. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 3, 4 e 5 caracterizado por ser sintetizado a partir da imersão dos eletrodos flexíveis 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⁻¹.

07. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 6, caracterizado pela imersão dos eletrodos flexíveis modificados com filmes de PPy em uma solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), sobre os quais são realizados dez ciclos voltamétricos com uma faixa de potencial de +0,2 a -1 V e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} .

08. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6 e 7, caracterizado pela adição de solução de Cys sobre os eletrodos flexíveis modificados com PPy e AuNs, com posterior lavagem em água ultrapura para remoção de moléculas não ligadas.

09. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6, 7 e 8, caracterizado pela adição de glutaraldeído sobre a plataforma nanoestruturada PPy-AuNs-Cys, com posterior acréscimo de uma solução de oligonucleotídeos para a construção dos nanossistemas de DNA.

10. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6, 7, 8 e 9, caracterizado pela adição de uma solução de BSA sobre a superfície dos eletrodos modificados.

11. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 4, caracterizado por ter os eletrodos imersos em uma solução de 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em tampão fosfato para a mensuração voltamétrica.

12. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, caracterizado por compreender: (a) ensaio de bioatividade; (b) inserção do sistema de biodeteção em célula eletroquímica; (c) mensuração voltamétrica do comportamento eletroquímico do sistema após sua exposição ao analito-alvo; e (d) determinação de mudanças nos valores de correntes de pico anódicas e catódicas, bem como alterações nas áreas voltamétricas, para indicar a presença ou ausência do analito-alvo na amostra teste.

13. USO DE BIOSSENSOR descrito na reivindicação 12, caracterizado por avaliar o analito-alvo que corresponde a sequências de nucleotídeos do gene L1 de diferentes tipos de HPV inseridos em plasmídeos recombinantes.
14. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12 e 13, caracterizado por avaliar os diferentes tipos de HPV: HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 72, 81, 82, 83, 84, 87 e 89.
15. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13 e 14, caracterizado por apresentar um limite de detecção de 100 pg/μL.
16. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14 e 15, caracterizado pelas sequências oligonucleotídicas BSH06, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53 e BSH21.
17. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH06 para o reconhecimento dos genótipos de HPV6, 11, 44 e 55.
18. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH16 para o reconhecimento dos genótipos de HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 e HPV58.
19. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH18 para o reconhecimento dos genótipos de HPV18, 39, 45, 59 e 68.
20. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH26 para o reconhecimento dos genótipos de HPV26, 51 e 82.
21. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH53 para o reconhecimento dos genótipos de HPV53, 56 e 66.

22. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH61 para o reconhecimento dos genótipos de HPV61, 62, 72, 81, 83, 84, 87 e 89.

Figura 1

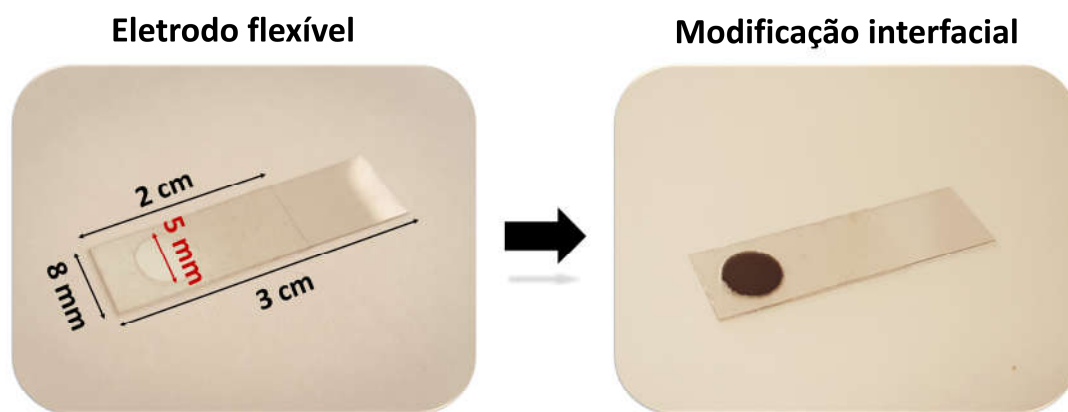


Figura 2

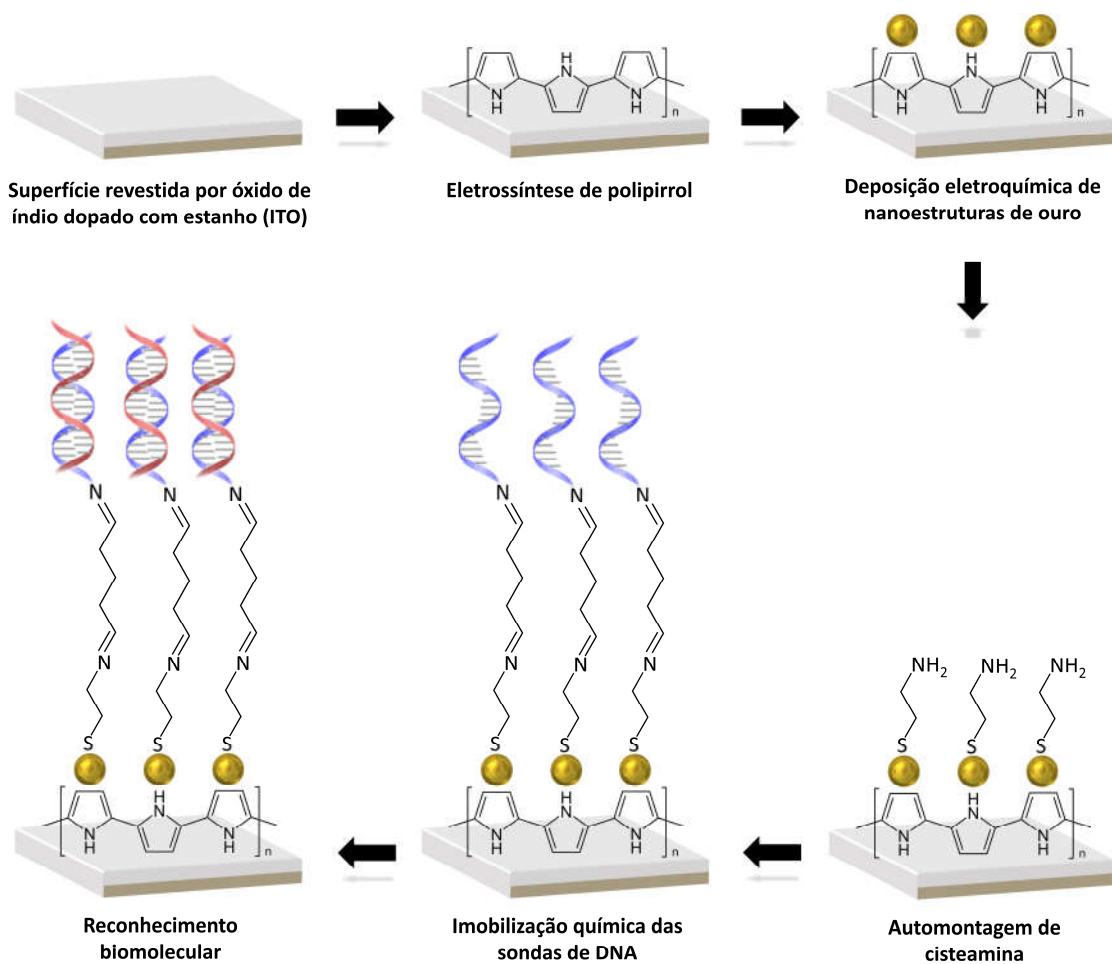


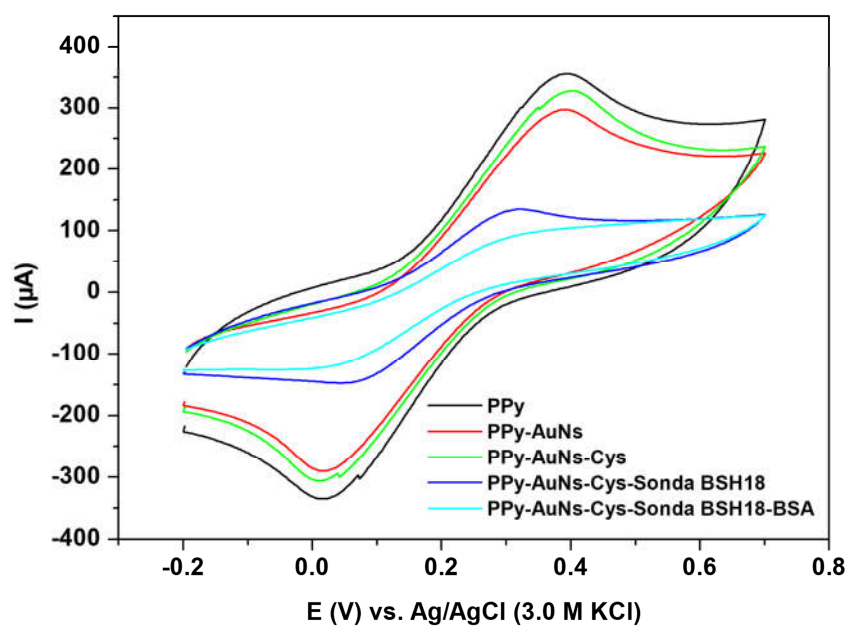
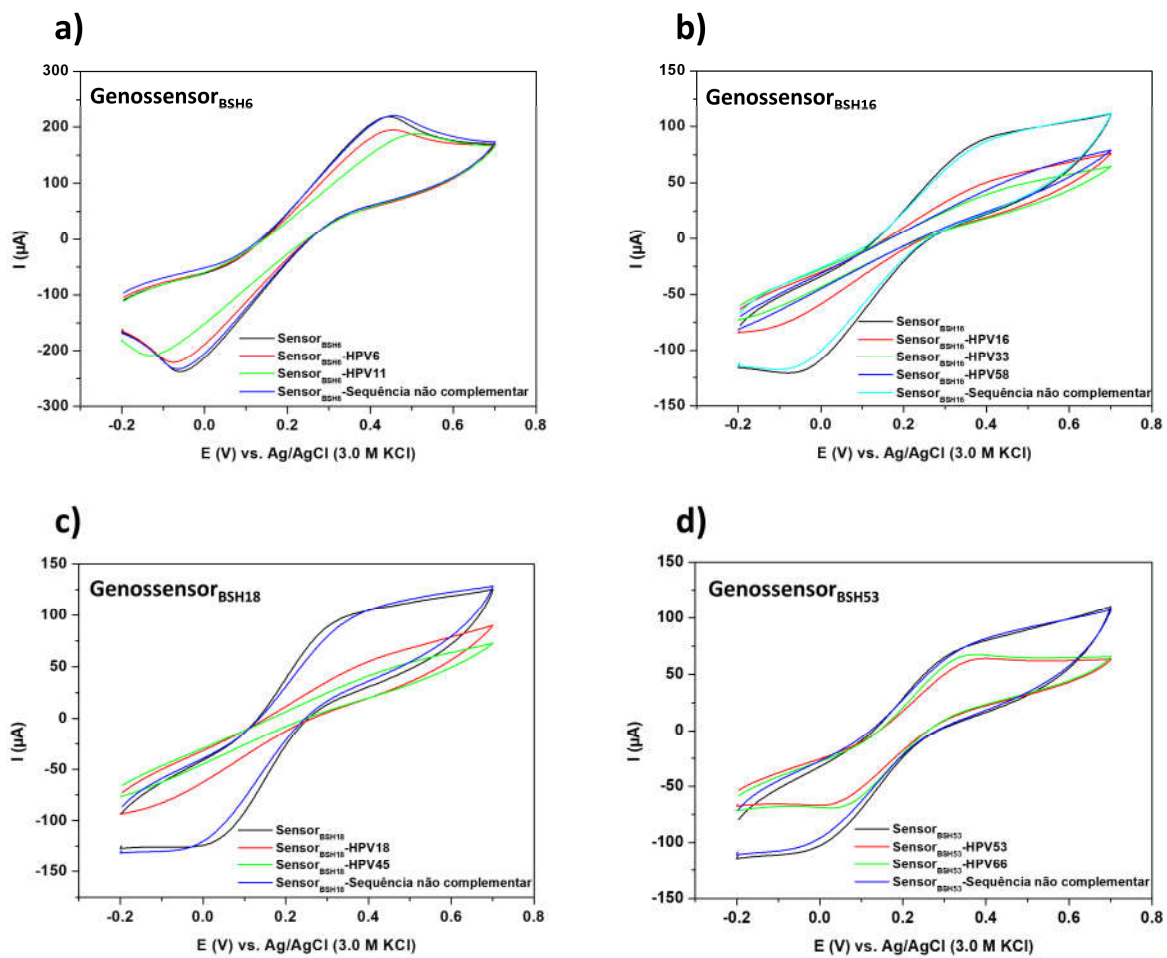
Figura 3

Figura 4



RESUMO

BIOSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS é resultado de uma metodologia simples para a fabricação de sistemas utilizáveis na identificação de genótipos de papilomavírus humano (HPV). O método descreve a construção de eletrodos flexíveis baseados em ITO com baixo custo de produção e eficácia transdutora para aplicação em biossensores de DNA. Objetivando-se aprimorar a performance analítica dos eletrodos, uma plataforma nanoestruturada foi elaborada sobre a área ativa do eletrodo flexível e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada em polipirrol (PPy), nanoestruturas de ouro (AuNs) e cisteamina (Cys). Pode-se verificar que os filmes de PPy atuam como substratos ideais para a eletrossíntese de AuNs com reduzido grau de agregação molecular. Por sua vez, as AuNs demonstram biocompatibilidade e elevada área de superfície para a imobilização de biomoléculas receptoras. Assim, constata-se que a associação dos materiais funcionais supracitados é uma estratégia inovadora para a obtenção de sistemas sensores ultrassensíveis. Portanto, a fim de tornar os sistemas transdutores aplicáveis ao diagnóstico de HPV, sequências curtas de DNA (denominadas de sondas de DNA) foram desenhadas para reconhecer estritamente famílias de papilomavírus. Posteriormente, estes oligonucleotídeos de cadeia curta modificados com grupos amino funcionais foram imobilizados quimicamente sobre os transdutores nanoestruturados. A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para a análise das etapas de modificação dos eletrodos e o monitoramento da hibridação molecular. O sistema sensor proposto nesta patente é capaz de detectar genótipos de HPV com elevada especificidade, seletividade e sensibilidade (na ordem de picograma por microlitro), além de possuir rápida resposta analítica (15 minutos).