



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

(21) **BR 102016022344-0 A2**

(22) **Data do Depósito:** 27/09/2016

(43) **Data da Publicação:** 02/05/2018



\* B R 1 0 2 0 1 6 0 2 2 3 4 4 A

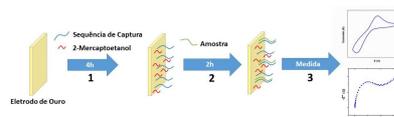
**(54) Título:** BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE DNA, PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO E USO DO MESMO

**(51) Int. Cl.:** G01N 27/26; C12Q 1/68

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

**(72) Inventor(es):** VALTENCIR ZUCOLOTTO; BRUNO CAMPOS JANEGITZ; CAMILA BARBOSA BRAMORSKI; JULIANA CANCINO BERNARDI; LAÍS CANNIATTI BRAZACA

**(57) Resumo:** A presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e/ou voltametria cíclica (VC) para a determinação simples, rápida e de baixo custo de traços genéticos da anemia falciforme, sendo capaz de auxiliar no aconselhamento genético. O referido biossensor é construído de três eletrodos independentes: um eletrodo de trabalho de ouro modificado, um contra-eletrodo de placa de platina e um eletrodo de referência de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl, com solução interna KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>). Além disso, presente invenção refere-se a um processo para a preparação do referido biossensor eletroquímico de DNA, bem como seu uso.



**BIOSENSOR ELETROQUÍMICO DE DNA, PROCESSO PARA SUA  
PREPARAÇÃO E USO DO MESMO**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se insere no campo da eletroquímica e descreve um biossensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para a determinação de traços genéticos da anemia falciforme, bem como um processo para a preparação do mesmo e seu uso.

[002] O dispositivo proposto permite a determinação precisa da anemia falciforme de uma forma simples e de baixo custo, permitindo, assim, um maior número de diagnósticos, bem como o aconselhamento genético de um maior número de pacientes.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[003] A anemia falciforme é uma doença genética recessiva na qual os glóbulos vermelhos produzem uma forma anormal da hemoglobina - HbS - ao invés da forma normal - HbA. A desoxigenação da HbS leva à sua polimerização, fazendo com que os eritrócitos assumam formato de foice. Apesar de, ao ser oxigenada, a proteína retornar à sua forma solúvel, este ciclo danifica a membrana da célula, fazendo com que o tempo de vida dessas diminua acentuadamente, causando a anemia. A doença causa grande desconforto aos seus portadores, promovendo dores, danos à órgãos, além de favorecer a vaso-oclusão e o enrijecimento dos glóbulos vermelhos.

[004] A anemia falciforme é causada pela substituição de uma única base nitrogenada na posição seis

no gene da globina beta (adenina por timina, GAG → GTG), codificando valina ao invés de glutamina. Somente homozigotos são afetados agressivamente pela doença, enquanto heterozigotos são usualmente portadores assintomáticos do traço genético - produzindo tanto HbS quanto HbA. Estima-se que, no Brasil, a anemia falciforme seja a doença hereditária mais comum, com aproximadamente 6 a 10% dos negros ou 1% da população total sendo portadores de seu traço. Em algumas regiões da África, o quadro é ainda mais preocupante, com uma estimativa de até 40% da população possuindo o traço genético. Considerando que pais heterozigotos possuem uma chance de 25% de gerar uma criança homozigótica e que a doença pode ser fatal, apresentando possibilidades de cura e tratamentos limitados, o aconselhamento genético é uma ferramenta muito visada para o controle da anemia falciforme.

[005] Para que o aconselhamento genético seja realizado, são indispensáveis ferramentas de determinação do traço precisas e acessíveis. Além disso, apesar de recém-nascidos serem comumente testados, o diagnóstico rápido e preciso da anemia falciforme ainda é um desafio devido à baixa concentração de HbS na corrente sanguínea. Atualmente, o diagnóstico dos portadores é realizado principalmente através da técnica de eletroforese. Esta exige profissionais e equipamentos especializados além de demandar muito tempo para execução. Sendo assim, para que o aconselhamento genético seja oferecido de maneira mais eficiente e para uma maior parcela da população, ferramentas de diagnóstico precisas que sejam portáteis, simples e de baixo custo são de extrema importância. Neste

contexto, genossensores eletroquímicos são uma ferramenta de grande interesse.

[006] Genossensores eletroquímicos são biossensores baseados em ácidos nucleicos, tanto DNA quanto RNA. Esses vêm sendo muito usados na detecção de sequências de ácidos nucleicos específicas, sendo capazes de realizar o diagnóstico de doenças genéticas e quantificar organismos geneticamente modificados de maneira precisa e simples. Atualmente, aptâmetros - fragmentos de ácidos nucleicos de tipicamente 70-100 bases capazes de se ligar de maneira específica a vários tipos de moléculas alvo - vêm sendo explorados no desenvolvimento de sensores devido principalmente ao seu baixo preço, se comparado a anticorpos, e altíssima especificidade.

[007] Os genossensores eletroquímicos, em específico, baseiam seu mecanismo de detecção em mudanças de propriedades elétricas devido à interação de ácidos nucleicos com moléculas alvo. Por exemplo, diferentes taxas de interação de uma proteína com um aptâmetro immobilizado na superfície de um eletrodo podem levar à sua quantificação de maneira simples. Esses dispositivos são de altíssimo interesse principalmente devido à sua versatilidade, simplicidade, alto potencial de miniaturização e baixo custo. Além disso, as técnicas eletroquímicas são vantajosas por não danificarem o sensor. As medidas podem ser realizadas em um mesmo eletrodo nas diferentes etapas - desde a montagem até as medidas de detecção. Duas categorias de técnicas amplamente utilizadas são as voltamétricas e as impedimétricas. Técnicas voltamétricas mostram a resposta do sistema em um gráfico de corrente em

função da diferença de potencial aplicada, sendo este potencial limitado a uma janela. Dentre essas, a voltametria cíclica (VC) é uma das técnicas mais comumente utilizadas. Nessa, o potencial é varrido de maneira cíclica, sendo possível observar tanto a oxidação como a redução de compostos de interesse em uma única medida. Nas medidas impedimétricas o método mais utilizado é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), que é capaz de medir a permissividade de elétrons em um sistema ao longo de uma ampla faixa de frequências, que vai tipicamente de  $10^4$  a  $10^{-3}$  Hz. Uma das maneiras mais comuns de observar os resultados da técnica EIS é através do diagrama de Nyquist, um gráfico composto de eixos correspondentes às componentes imaginária ( $-Z''$ ) e real ( $Z'$ ) da impedância, e no qual cada ponto representa uma frequência distinta. A partir dos dados obtidos é possível desenhar um circuito equivalente através de softwares especializados e coletar informações sobre o que diz respeito à caracterização do eletrodo funcionalizado com biomateriais, transformações biocatalíticas na sua superfície e transdução de efeitos de sensoriamento.

[008] A construção dos eletrodos pode ser realizada por técnicas muito simples, tais como a de monocamadas automontadas (SAM) ou *layer-by-layer*. Estas se baseiam no alto controle de formação de camadas homogêneas, frequentemente de espessura nanométrica, na superfície do eletrodo. A deposição destas influencia amplamente na resposta elétrica do sistema, alterando principalmente a sensibilidade e especificidade dos sensores.

[009] A técnica de SAM se destaca principalmente

pela praticidade, pois não necessita de equipamentos especializados e pode ser aplicada em superfícies de diversos tamanhos e composições, sendo um sistema flexível, rápido e bastante simples. Através deste é possível adequar as propriedades interfaciais de metais, óxidos e semicondutores com compostos orgânicos, de maneira que os mesmos adsorvam de maneira espontânea sobre a superfície sólida do eletrodo. Para que este fenômeno ocorra, o grupo que se deseja adsorver deve estar funcionalizado através da adição de um grupo reativo na extremidade da cadeia, que tipicamente são grupos funcionais -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH ou SH. O protocolo mais comum na preparação de SAM em superfícies metálicas faz uso de soluções contendo a molécula de interesse e tióis como grupo reativo, na presença de solventes do grupo funcional álcool, como etanol. Essa ligação normalmente se completa após 12h, em temperatura ambiente, e se deve à grande afinidade do enxofre com os metais e principalmente os metais nobres, como o ouro.

#### **ESTADO DA TÉCNICA**

[010] O documento CN101078026 descreve um tipo de sensor eletroquímico de DNA, o qual compreende um polo de ouro, DNA complementar, nano-partículas de ouro e indicador eletroquímico. Apesar de tal documento descrever uma técnica para detecção e quantificação de sequências específicas de DNA, é bastante distinta da utilizada na presente invenção. Neste caso, são aplicadas nanopartículas de ouro como ferramenta para amplificação do sinal e um ensaio do tipo sanduíche - que utiliza mais de uma sequência padrão de DNA para obtenção da resposta analítica. Na presente invenção, não é utilizado nenhum

elemento para amplificação do sinal e o ensaio é baseado em detecção direta da hibridização - sendo assim, é mais simples e requer menos materiais e etapas do que o método descrito. Por fim, o indicador eletroquímico utilizado possui características distintas do utilizado na presente invenção. Em tal documento é utilizado rutênio (3+), enquanto na presente invenção utiliza-se o marcador ferricianeto de potássio (4-/3-). Por fim, as técnicas eletroquímicas utilizadas no presente pedido são voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, que não, são ao menos, citadas em tal documento.

[011] O documento US5312527 refere-se a um sensor voltamétrico sequência-seletivo para polinucleotídeos alvo compreendendo essencialmente: uma sonda de polinucleotídeos imobilizada possuindo uma extremidade ligada de forma covalente a um eletrodo. Entretanto, tal documento não apresenta conflito com a presente invenção, primeiramente pelo fato de o método de imobilização das sequências de DNA no eletrodo ser distinto. Enquanto a presente invenção utiliza a interação ouro-tiol, o referido documento utiliza grupamentos ácido carboxílico presentes na superfície do eletrodo. Além disso, tal documento faz o uso de compostos adicionais para garantir a imobilização adequada do DNA chamados de cross-linkers, os quais não foram utilizados na presente invenção, já que a interação é realizada de forma direta com a superfície do eletrodo. Adicionalmente, os indicadores eletroquímicos utilizados no documento são diferentes e têm ação distinta do proposto no presente pedido. Enquanto tal documento se baseia na concentração de

marcadores sobre o eletrodo, que ocorre devido à interação diferenciada com o DNA dupla e simples fita, a presente invenção se baseia somente na dificuldade que os íons marcadores têm de atravessar a barreira física gerada pelo filme biossensor. Por fim, a técnica de detecção idealizada no documento não permite o uso da técnica de espectroscopia de impedância, uma das técnicas fundamentais do presente pedido.

[012] O documento US 6391558 descreve um sistema de detecção eletroquímica que detecta especificamente segmentos selecionados de ácidos nucleicos. Apesar deste descrever uma série de sensores eletroquímicos para detecção de sequências de DNA específicas, estes não são semelhantes aos sensores propostos na presente invenção. Primeiramente, nenhuma das técnicas de detecção utilizada no presente pedido (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica) é citada no documento, sendo que este utiliza outras técnicas voltamétricas, tais como a de pulso diferencial. Além disso, o documento não descreve nenhuma técnica de imobilização de DNA e se baseia na utilização de marcadores enzimáticos ou que se liguem ao DNA dupla-fita, que possuem mecanismo de ação distinto do proposto na presente invenção, que somente se baseia na presença de barreiras físicas e eletrostáticas à sua passagem para a superfície do eletrodo.

[013] O documento US 8283936 descreve um método para detecção de mutações de única base em sequências de DNA. Porém, o método de detecção e de imobilização das sequências é completamente distinto do proposto na presente invenção. Enquanto a imobilização no documento é baseada na

interação silano-amina, a presente invenção baseia-se na interação ouro-tiol. Além disso, são utilizados loops de DNA ou partículas metálicas conjugadas à oligonucleotídeos para realizar a quantificação das sequências, método totalmente distinto do utilizado no presente pedido, que se baseia na resistência que um íon padrão possui para chegar ao eletrodo. Por fim, no documento, o sinal analítico provém de um tipo de eletrodo interdigitado, e o eletrodo que mede as interações entre o DNA é distinto da plataforma onde o DNA está imobilizado (composta de SiO<sub>2</sub> ou silanos). Tanto a estratégia utilizada quanto a plataforma onde o DNA se encontra imobilizado são distintos do proposto na presente invenção.

[014] Assim, a presente invenção surge como uma ferramenta inovadora de baixo custo e precisa para a realização da determinação do traço da anemia falciforme, uma vez que o biossensor eletroquímico desenvolvido permitiu a identificação da presença ou ausência da mutação relacionada à doença através da análise da taxa de hibridização entre o DNA da amostra e a sequência imobilizada.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[015] A presente invenção tem por objetivo propor um biossensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e/ou voltametria cíclica (VC) para a determinação de traços genéticos da anemia falciforme.

[016] Além disso, é também um objetivo da presente invenção propor um processo para a preparação do referido biossensor eletroquímico de DNA e seu uso.

**BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[017] As FIGs. 1A e 1B apresentam um esquema e um fluxograma, respectivamente, que ilustram as etapas de montagem do biossensor proposto;

[018] A FIG. 2 apresenta graficamente o estudo da montagem do biossensor utilizando EIS. Foram realizadas medidas em cada uma das etapas de montagem do dispositivo proposto;

[019] A FIG. 3 apresenta graficamente o estudo da montagem do biossensor utilizando VC. Foram realizadas medidas em cada uma das etapas de montagem do dispositivo proposto;

[020] A FIG. 4 apresenta graficamente a calibração do biossensor com o digrama de Nyquist para diferentes concentrações da sequência doente.

[021] A FIG. 5 apresenta graficamente a curva de calibração do biossensor proposto.  $R_{tc}$  cresce linearmente ( $R^2 = 0,927$ ) com a concentração da sequência doente na faixa de 0,01 a 7,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[022] A presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para a determinação de traços genéticos da anemia falciforme.

[023] O referido biossensor compreende três eletrodos independentes: um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo e um eletrodo de referência.

[024] A fim de identificar a doença com precisão, o eletrodo de trabalho é revestido - através da técnica de

monocamadas automontadas - com fitas ssDNA correspondentes à sequência de um paciente com anemia falciforme em conjunto com 2-mercaptoetanol, em uma única etapa. Estas sequências ssDNA são as responsáveis pela identificação da mutação que leva à doença.

[025] Após colocar o eletrodo modificado em contato com a amostra a ser analisada, o sinal eletroquímico resultante é verificado - permitindo a identificação da presença ou ausência da mutação relacionada à doença através da análise da taxa de hibridização entre o DNA da amostra e a sequência imobilizada.

[026] Os eletrodos de ouro modificados (ou seja, contendo uma fita ssDNA complementar à sequência doente imobilizada através da técnica de automontagem) são usados como eletrodo de trabalho (diâmetro de 2 mm), enquanto uma placa de platina (0,5 x 1cm) e um eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl, com solução interna KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) são utilizados como contra-eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente.

[027] Para que as sequências se posicionem de forma adequada no eletrodo de trabalho e, assim, interagir com a amostra, 2-mercaptoetanol é utilizado.

[028] Os dispositivos desenvolvidos foram capazes de diferenciar adequadamente as sequências de DNA saudáveis e doentes (1 µmol L<sup>-1</sup>). Além disso, o biossensor apresentou ampla faixa linear (0,01 a 7,5 µmol L<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0,927) com um limite de detecção de 7 nmol L<sup>-1</sup>.

[029] Adicionalmente, a presente invenção refere-se ao processo para a preparação do referido biossensor,

compreendendo as seguintes etapas:

a) lavar os substratos de ouro utilizando uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), na razão de volume de 1:1 a 10:1, preferencialmente 3:1 (solução piranha);

b) submeter os eletrodos ao processo de voltametria cíclica em ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) na concentração de 0,01 a 1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ , preferencialmente 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , seguida de lavagem e secagem;

c) modificar os eletrodos de trabalho em uma única etapa pela imobilização do ssDNA complementar à sequência doente e 2-mercaptoetanol utilizando a técnica SAM;

d) imergir o dispositivo na amostra por 0,5 a 24h, preferencialmente por 2 h, (tampão fosfato, 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0), para que esta interaja com o DNA imobilizado no biossensor.

[030] Na referida etapa (b), são realizados de 15 a 100 ciclos, preferencialmente 50 ciclos de voltametria, de -2,0 a 2,0V (preferencialmente de 0 a 1,5V) a 200 a 500  $\text{mV s}^{-1}$  (preferencialmente 300  $\text{mV s}^{-1}$ ) e, posteriormente, de 50 a 150  $\text{mV s}^{-1}$  (preferencialmente 100  $\text{mV s}^{-1}$ ).

[031] Os substratos são, em seguida, lavados em água ultrapura e secos sob um fluxo de  $\text{N}_2$ . O procedimento de limpeza (etapas (a) e (b)) pode ser substituído por qualquer processo que remova eficientemente todos os resíduos orgânicos e inorgânicos da superfície do ouro, por exemplo, o método RCA. Esta consiste na imersão dos eletrodos em uma solução de água ultrapura,  $\text{NH}_4\text{OH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tipicamente na proporção de 5:1:1, à 80°C, por cerca de 10 minutos.

[032] Na etapa (c), os eletrodos de ouro são mergulhados de 3 a 24 h, preferencialmente 4 h, em uma solução contendo 0,05 a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, preferencialmente 0,12 mmol L<sup>-1</sup>, de 2-mercaptoetanol e de 0,1 a 5 µmol L<sup>-1</sup>, preferencialmente 1,0 µmol L<sup>-1</sup>, da sequência de captura funcionalizada com tiol na extremidade 5' (tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0), a qual está definida na SEQ. ID. n° 1.

[033] É importante ressaltar que a sequência de captura não apresenta espaçadores na extremidade 5' ou qualquer outra modificação em sua estrutura, como pode ser observado na SEQ. ID. n° 1, e que o 2-mercaptoetanol pode ser substituído por outros agentes estruturantes de cadeia curta que possuam extremidade tiol e que não interajam significativamente com o DNA.

[034] Após cada etapa, os eletrodos são cuidadosamente lavados em água ultrapura e secos sob um fluxo de gás inerte, tal como N<sub>2</sub>. Todos os experimentos são realizados em temperatura ambiente (10 a 40 °C, preferencialmente 25 °C). O tampão fosfato preferencialmente utilizado nos experimentos pode ser substituído por outros tampões de pH neutro, tal como Tris-HCl e tampão fosfato salino.

#### **Caracterização do Biossensor e da sua Montagem**

[035] As medidas eletroquímicas são realizadas utilizando um potenciostato / galvanostato em uma cela de três eletrodos convencional. Os eletrodos de ouro modificados são usados como eletrodo de trabalho (diâmetro de 2 mm), enquanto uma placa de platina (0,5 x 1cm) e um eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl, com solução

interna KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) são utilizados como contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente.

[036] O contra-eletrodo, no entanto, pode ser composto de qualquer material inerte que permita a conexão elétrica de forma que possa ser aplicado um potencial ao eletrodo de trabalho - como metais nobres, carbono e grafite.

[037] O eletrodo de referência pode ser substituído por qualquer um que ofereça um potencial constante, tais como eletrodo de calomelano saturado ou de hidrogênio.

[038] As medidas são feitas em 5 a 20 mL (preferencialmente 10 mL) de tampão fosfato, 0,1 a 25 mmol L<sup>-1</sup> (preferencialmente 4,0 mmol L<sup>-1</sup>) de ferricianeto de potássio, à temperatura ambiente (de 10 a 40°C, preferencialmente 25 °C). O marcador ferricianeto de potássio pode ser alterado a outros marcadores eletroquímicos que permitam a medida de resistência do filme biossensor.

[039] Antes de cada medida de impedância eletroquímica, uma medida de VC deve ser feita a fim de ativar o sensor (preferencialmente -0,2 a 0,8 V, 100 mV s<sup>-1</sup>, 2 ciclos - podendo variar entre -2,0 a 2,0 V, 25 mV s<sup>-1</sup> a 300 mV s<sup>-1</sup>, 2 a 5 ciclos), podendo ser também utilizada para detecção da mutação da anemia falciforme.

[040] Os experimentos de EIS são feitos em potencial de circuito aberto, em frequências preferencialmente de 10 kHz a 100 mHz, podendo variar de 100 kHz a 1 mHz. Antes de cada experimento, a solução é suavemente agitada para garantir sua homogeneidade.

[041] Um digrama ilustrativo e um fluxograma mostrando as etapas de montagem e medida do biossensor podem ser visualizados nas Figs. 1A e 1B.

### **Resultados:**

[042] O tempo de imersão do eletrodo em cada uma das etapas, assim como a concentração de cada um dos componentes do filme e a temperatura de hibridização das fitas de DNA foram cuidadosamente testados e otimizados, visando o melhor funcionamento do dispositivo.

[043] A caracterização da montagem do dispositivo foi realizada através das técnicas de VC e EIS. Para isso, após a adição de cada um dos materiais ao filme foi realizada uma medida. Como esperado, ouro limpo apresenta uma resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ) praticamente nula, sendo possível observar somente a curva relacionada à difusão dos íons ferricianeto em solução.

[044] Após a adição da sequência de captura e do 2-mercaptoetanol, observa-se um aumento na  $R_{tc}$  de aproximadamente 9 k $\Omega$  - determinada pelo diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist indicado na Fig. 2. Após a adição de uma amostra contendo a sequência doente (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , SEQ. ID. n° 2), a  $R_{tc}$  aumentou mais do que o dobro, para 22 k $\Omega$ , indicando a completa hibridização entre a sequência imobilizada e a amostra.

[045] Ao utilizar como amostra uma solução contendo a sequência de DNA saudável (SEQ. ID. n° 3), foi observado uma  $R_{tc}$  de aproximadamente 10 k $\Omega$ , muito distinta da obtida pela sequência doente. Esse fato é esperado devido à diminuição na taxa de hibridização devido à diferença em uma das bases das sequências. Os resultados de

VC corroboram com os obtidos com a espectroscopia de impedância eletroquímica (Fig. 3). Nesse caso, foi observada a diminuição da magnitude do pico de oxidação do marcador redox ferricianeto de potássio com o aumento da  $R_{tc}$ .

[046] A construção de uma curva de calibração utilizando EIS mostra que, como esperado, o aumento na concentração das sequências alvo leva a um aumento na  $R_{tc}$  (Figs. 4 e 5). Observamos uma relação linear entre  $R_{tc}$  e a concentração da sequência alvo (SEQ. ID. n° 2) no intervalo de 0,01 à 7,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com um coeficiente de linearidade  $R^2$  de 0,927 e sensibilidade de  $1,216 \times 10^3 \text{ ohm L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ . O limite de detecção de 7 nm foi calculado através do primeiro sinal detectável.

[047] O dispositivo apresentou boa estabilidade, apresentando um decaimento no pico de oxidação do ferricianeto de potássio de 29,22% após 50 ciclos de voltametria cíclica. Além disso, a construção de 3 dispositivos paralelos mostrou boa reprodutibilidade, apresentando uma variação de 10,42% no sinal na presença de 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  da sequência alvo em medidas de EIS.

#### **Funcionamento do Biossensor**

[048] A fim de identificar a doença com precisão, o eletrodo de trabalho é revestido - através da técnica de monocamadas automontadas - com fitas ssDNA correspondentes à sequência de um paciente com anemia falciforme.

[049] Após colocar o eletrodo modificado em contato com a amostra a ser analisada, é verificado o sinal eletroquímico resultante - permitindo a identificação da presença ou ausência da mutação relacionada à doença

através da análise da taxa de hibridização entre o DNA da amostra e a sequência imobilizada.

[050] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

### REIVINDICAÇÕES

1. Biossensor eletroquímico de DNA **caracterizado** pelo fato de compreender três eletrodos independentes, em que:

- o eletrodo de trabalho consiste em um eletrodo de ouro modificado com uma fita ssDNA complementar imobilizada em conjunto com 2-mercaptoetanol através da técnica de automontagem,

- o contra-eletrodo é uma placa de platina, e

- o eletrodo de referência é um eletrodo de prata-cloreto de prata com solução interna KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>.

2. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que apresenta ampla faixa linear (0,01 a 7,5 µmol L<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0,927) com um limite de detecção de 7 nmol L<sup>-1</sup>.

3. Processo para a preparação do biossensor conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por compreender as etapas de:

a) lavar os substratos de ouro utilizando uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), na razão de volume de 1:1 a 10:1, preferencialmente 3:1 (solução piranha);

b) submeter os eletrodos ao processo de voltametria cíclica em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na concentração de 0,01 a 1 mol L<sup>-1</sup>, preferencialmente 0,1 mol L<sup>-1</sup>, seguida de lavagem e secagem;

c) modificar os eletrodos de trabalho em uma única etapa pela imobilização do ssDNA de captura (SEQ. ID. n° 1) utilizando a técnica SAM (monocamadas automontadas);

d) interagir o dispositivo imerso na amostra por 0,5

a 24h, preferencialmente por 2 h, (tampão fosfato, 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0), com o DNA imobilizado no biossensor.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa (b), são realizados de 15 a 100 ciclos, preferencialmente 50 ciclos de voltametria, de -2,0 a 2,0 V, preferencialmente de 0 a 1,5 V, a 200 a 500 mV s<sup>-1</sup>, preferencialmente 300 mV s<sup>-1</sup>, e posteriormente, de 50 a 150 mV s<sup>-1</sup>, preferencialmente 100 mV s<sup>-1</sup>.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa (c), os eletrodos de ouro são mergulhados de 3 a 24 h, preferencialmente 4 h, em uma solução contendo 0,05 a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, preferencialmente 0,12 mmol L<sup>-1</sup>, de 2-mercaptoetanol e de 0,1 a 5 µmol L<sup>-1</sup>, preferencialmente 1,0 µmol L<sup>-1</sup>, da sequência de captura funcionalizada com tiol na extremidade 5', em que a referida sequência está definida na SEQ. ID. n° 1.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que, após cada etapa, os eletrodos são cuidadosamente lavados em água ultrapura e secos sob um fluxo de gás inerte, tal como N<sub>2</sub>.

7. Uso do biossensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelo fato de ser para a determinação de traços genéticos da anemia falciforme.

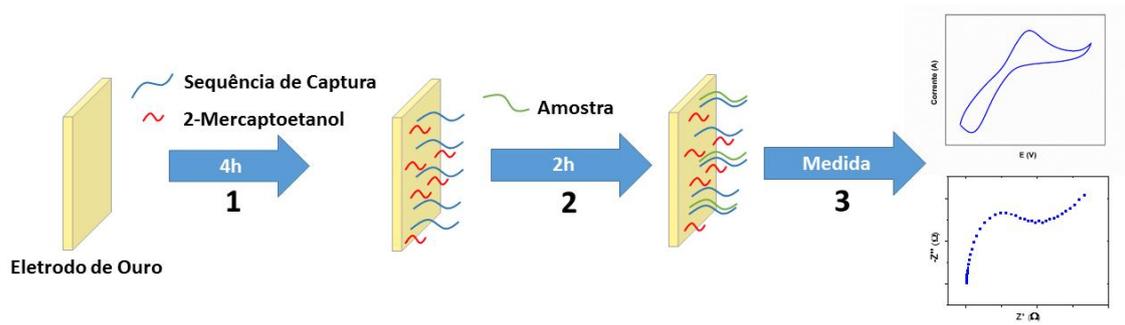


FIG. 1A

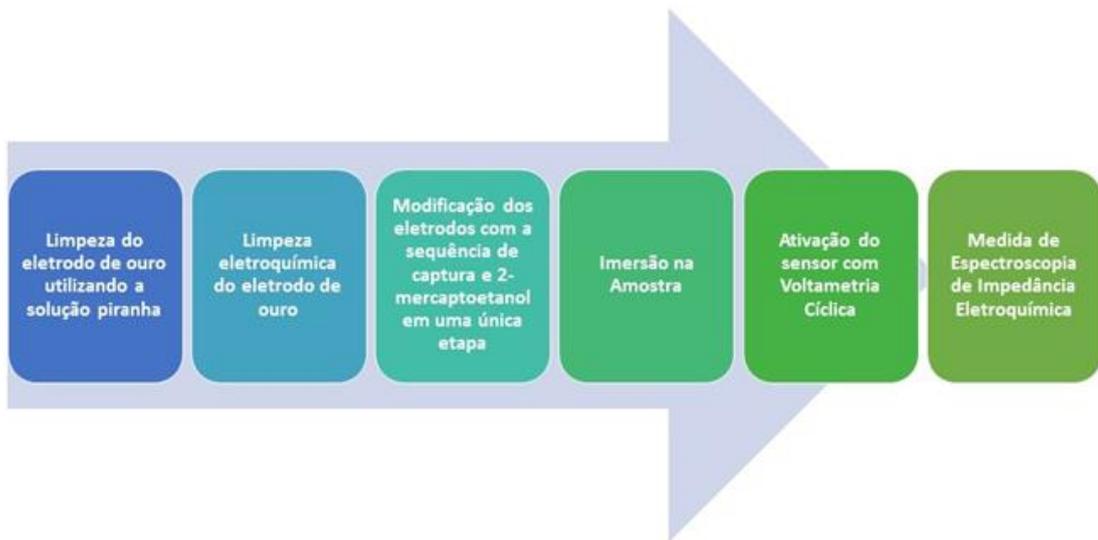


FIG. 1B

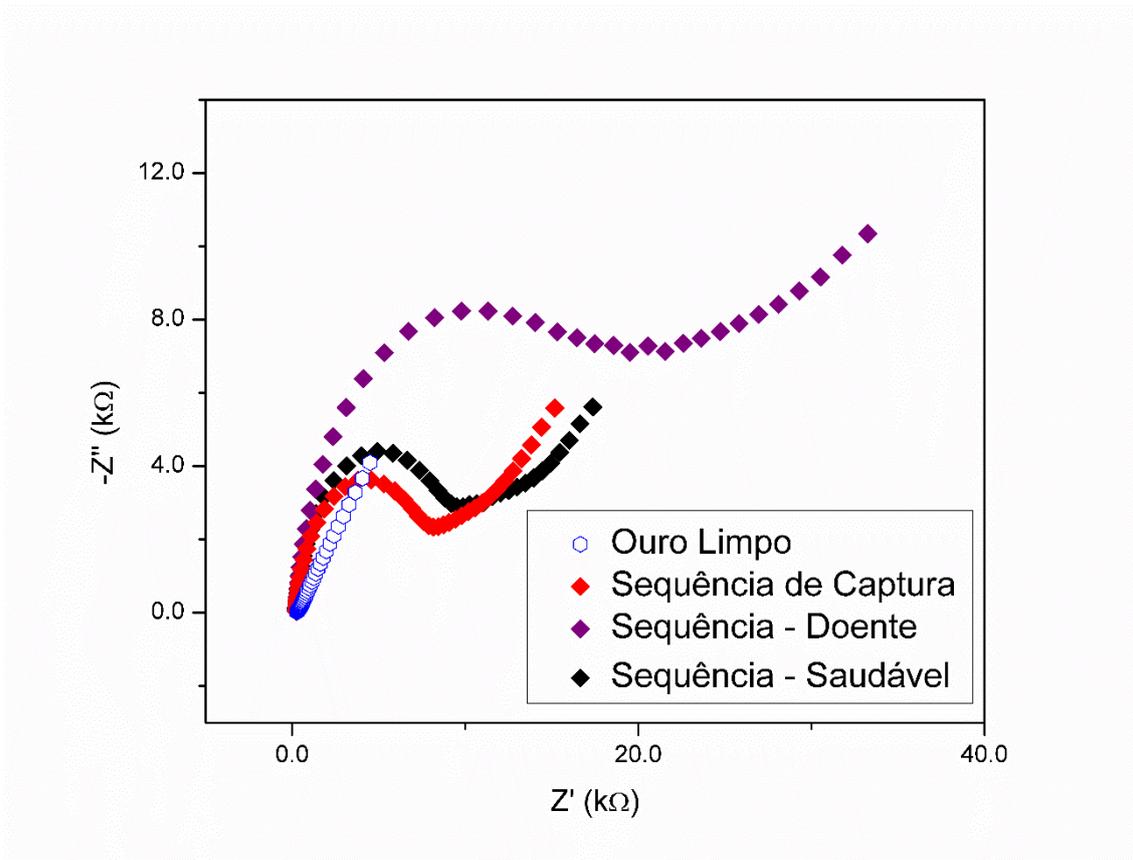


FIG. 2

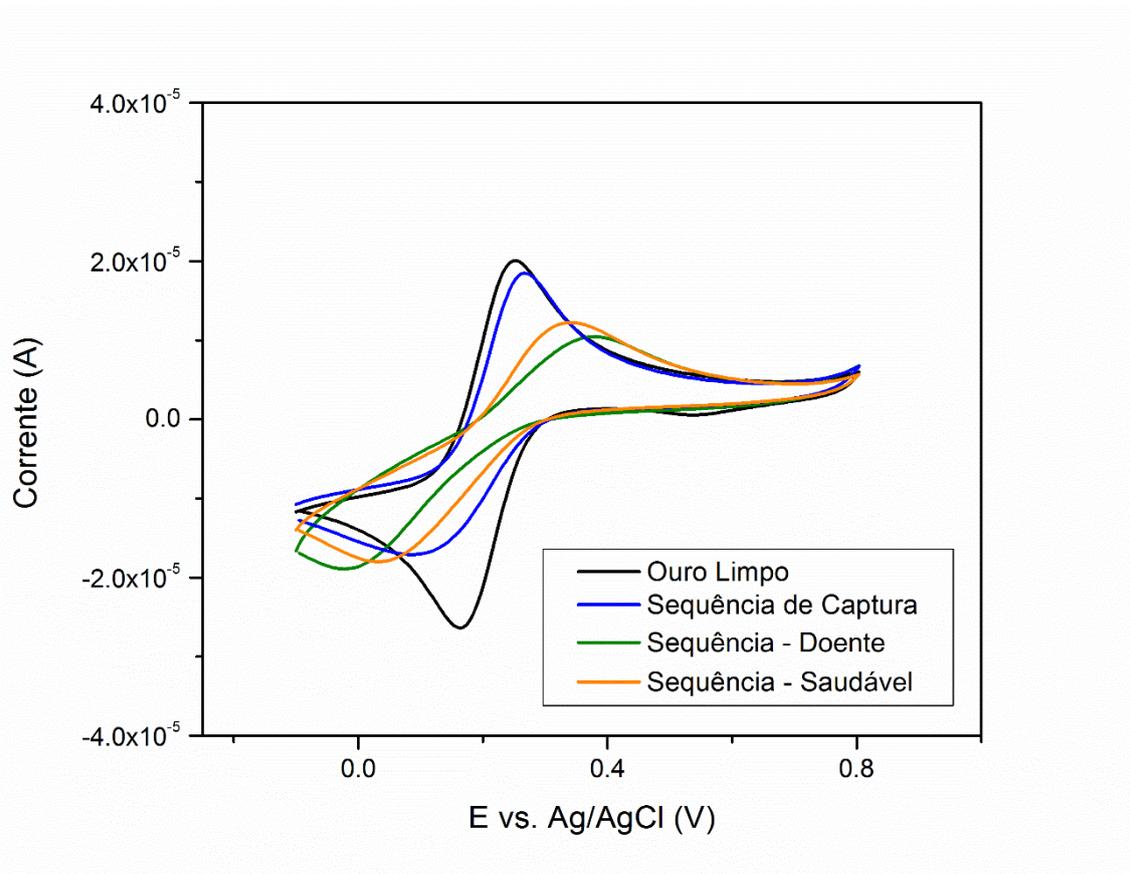


FIG. 3

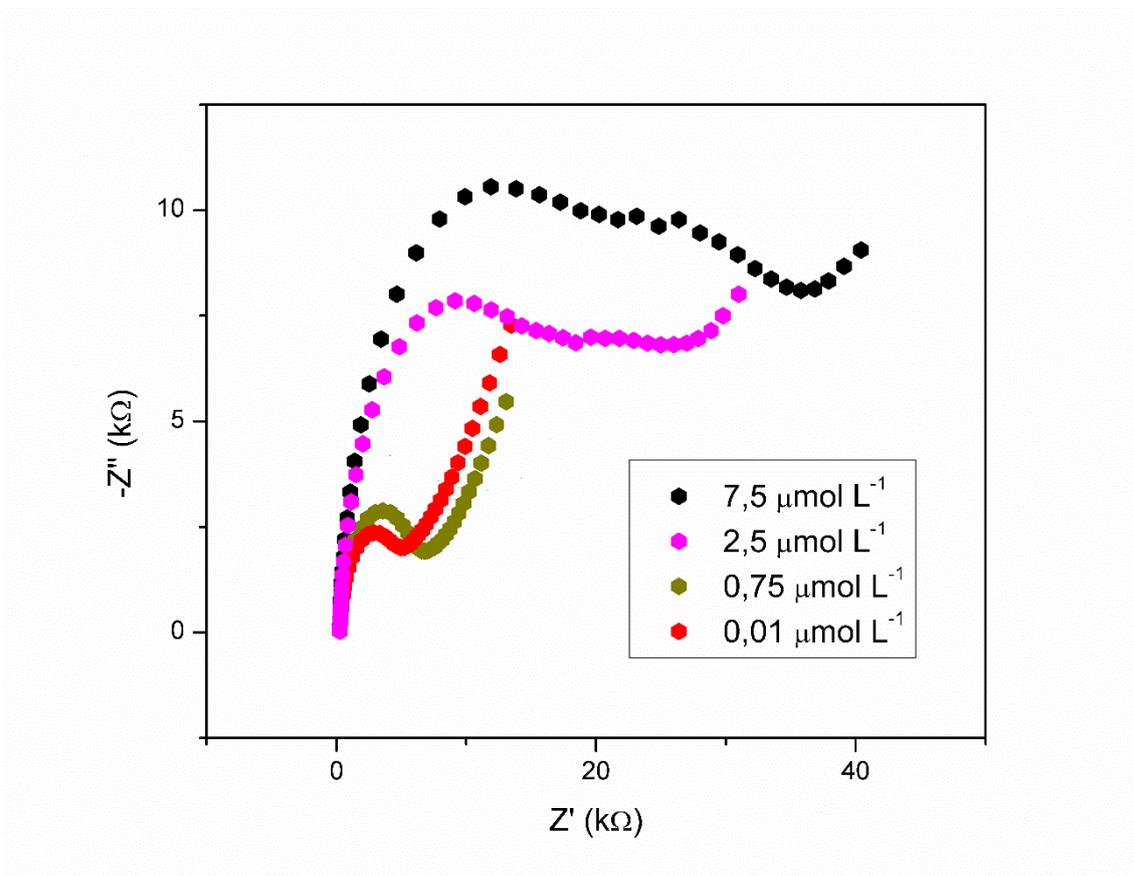
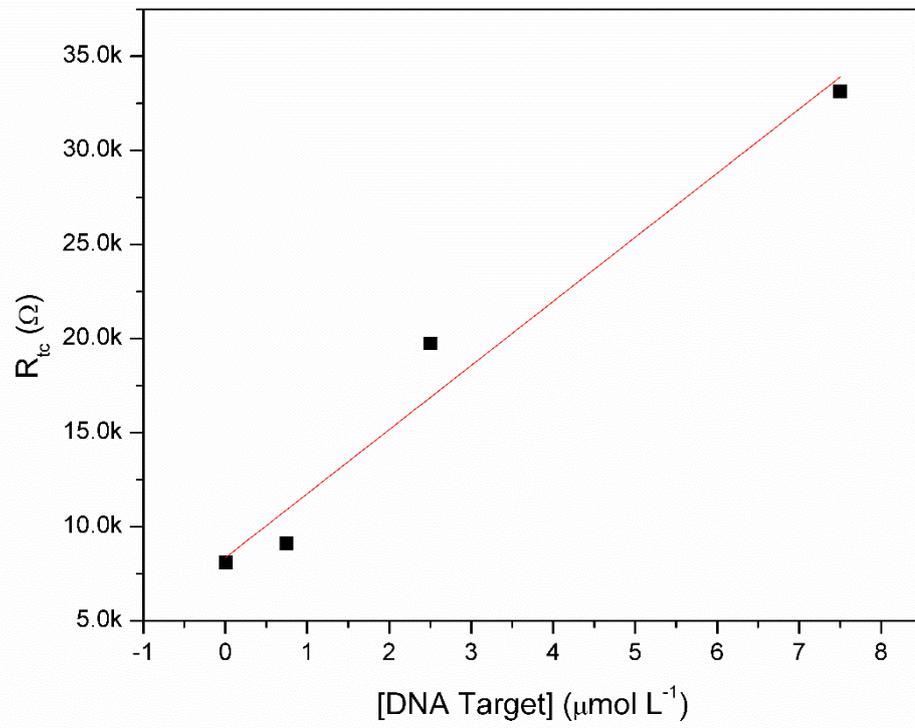


FIG. 4

**FIG. 5**

**RESUMO****BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE DNA, PROCESSO PARA SUA  
PREPARAÇÃO, E USO DO MESMO**

A presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e/ou voltametria cíclica (VC) para a determinação simples, rápida e de baixo custo de traços genéticos da anemia falciforme, sendo capaz de auxiliar no aconselhamento genético. O referido biossensor é construído de três eletrodos independentes: um eletrodo de trabalho de ouro modificado, um contra-eletrodo de placa de platina e um eletrodo de referência de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl, com solução interna KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>). Além disso, presente invenção refere-se a um processo para a preparação do referido biossensor eletroquímico de DNA, bem como seu uso.

## SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

<120> BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE DNA, PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO, E USO DO MESMO

<130> Anemia Falciforme -16

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<400> 1  
shgtaacggc agacttctcc acagg 25

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<400> 2  
cctgtggaga agtctgccgt tac 23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<400> 3  
cctgaggaga agtctgccgt tac 23