



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

(21) BR 102016003449-3 A2

(22) Data do Depósito: 18/02/2016

(43) Data da Publicação: 22/08/2017



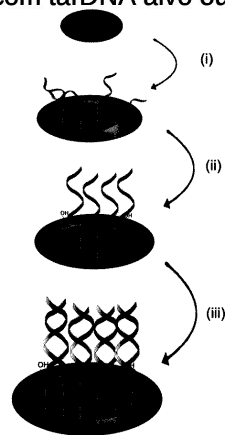
(54) Título: SENSOR ELETROQUÍMICO DE DNA, PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO, E USO DO MESMO

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68; G01N 33/543

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

(72) Inventor(es): VALTENCIR ZUCOLOTTO; BRUNO CAMPOS JANEGITZ; LAÍS RIBOVSKI

(57) Resumo: A presente invenção descreve um sensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para a detecção de mutação c.68_69del relacionada à predisposição aos cânceres de mama e ovário localizada no cromossomo 17. O referido sensor é construído com base em um sistema eletroquímico de três eletrodos: um eletrodo de referência (RE) de Ag/AgCl (3M KCl), um contra-eletrodo (CE) de platina e um eletrodo de trabalho (WE) de barra de ouro. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um processo para a preparação do referido sensor compreendendo três etapas sobre o eletrodo de trabalho: imobilização do DNA de captura (HS-ssDNA), recobrimento da superfície com 2-mercaptoetanol e interação do HS-ssDNA com tarDNA alvo ou ncsDNA.



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

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere nos campos da eletroquímica, genética e biossensores e descreve um sensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para a detecção de mutação c.68_69del relacionada à predisposição aos cânceres de mama e ovário localizada no cromossomo 17.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O desenvolvimento de sensores é motivado por diversas áreas como saúde, ambiente e segurança. Na saúde, são importantes ferramentas de diagnóstico em evolução, principalmente para o uso no local de atendimento ao paciente, os denominados dispositivos *point-of-care*. Para propósitos ambientais têm se construído sensores para detecção de poluentes como pesticidas, compostos fenólicos e metais pesados buscando dispositivos simples, rápidos, portáteis e de baixo custo. No campo da segurança, agentes patogênicos, principalmente ligados a atividades de bioterrorismo como *Bacillus anthracis*, são um grande foco, visando à identificação do agente para controle imediato.

[003] Entre os sensores, os biossensores se destacam cada vez mais devido a sua especificidade, consequência de um material biológico que confere afinidade específica para uma molécula ou grupo de moléculas alvo. Usualmente esse material consiste de enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, receptores ou células. A escolha de um elemento biológico ou outro dependerá do analito de

interesse. A partir dessa combinação, a técnica de detecção e arquitetura do sensor é planejada. Devido à especificidade tem-se uma melhor seletividade e, portanto, uma quantificação mais exata. Além da seletividade, os biossensores também atraem atenção por serem de fácil preparo, custo relativamente baixo, apresentarem boas perspectivas de miniaturização do sistema e, consequente, portabilidade.

[004] Visando melhorar o desempenho dos sensores, tem-se feito amplo uso de nanomateriais na análise eletroquímica. A aplicação de nanomateriais em dispositivos de detecção possibilita novas arquiteturas de sensores cujas características são potencializadas, especialmente seletividade e sensibilidade. Entre os materiais mais utilizados estão nanopartículas (NPs) metálicas, grafeno, nanotubos de carbono (CNT) e *quantum dots*. Em consequência do seu tamanho reduzido, nanomaterias apresentam propriedades mecânicas, ópticas e eletrônicas distintas dos materiais na macroescala (do inglês *bulk materials*) que são favoráveis ao desenvolvimento de novos sensores.

ESTADO DA TÉCNICA

[005] O desenvolvimento e a validação de métodos para detecção de alterações genômicas são cada vez mais interessantes para revelar predisposições ao desenvolvimento de doenças, bem como determinar o perfil genético de cânceres, auxiliando na escolha do tratamento mais adequado. Por exemplo, um dos objetivos da presente invenção é a detecção da mutação c.68_69del (185delAG) localizada no gene BRCA1 (BRCA1, *breast cancer susceptibility gene 1*) e relacionada à predisposição aos

cânceres de mama e ovário, e o desenvolvimento de um sensor eletroquímico de DNA para sua detecção.

[006] Embora exista com frequência significativa em diversas populações, principalmente judeus Ashkenazi, atualmente sua detecção só é realizada utilizando técnicas como sequenciamento e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR, do inglês *real time polymerase chain reaction*), sendo inexistente o desenvolvimento de sensores de DNA para tal mutação.

[007] Por exemplo, no artigo "*Ultrasensitive DNA sensor based on gold nanoparticles/reduced graphene oxide/glassy carbon electrode*", de Benvidi et al, há a descrição de um sensor de DNA para a detecção de mutação 5382insC relacionada à predisposição ao câncer de mama, porém o eletrodo utilizado é de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e óxido de grafeno reduzido. O sensor proposto na presente invenção não inclui modificação do eletrodo. Além disso, na presente invenção o alvo é a mutação c.68_69del (185delAG), enquanto que em tal documento, o alvo é a mutação 5382insC.

[008] No artigo "*A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer*" de Benvidi et al, apesar dos autores descreverem um sensor de DNA semelhante àquele proposto na presente invenção, o alvo também é diferente. A detecção de diferentes sequências requer um novo planejamento e estudo das sequências a serem utilizadas, o que não é trivial. Esse estudo abrange valores termodinâmicos (temperatura de desnaturação, variação da energia de Gibbs), porcentagem de GC, predição de estruturas secundárias (hairpin) e especificidade das

sequências. Ainda, neste estudo é usado outro recurso, além da voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), a voltametria de pulso diferencial (DPV) para a detecção da mutação 5382insC.

[009] Em "*Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis by Capillary and Microchip Electrophoresis: A Fast, Simple Method for Detection of Common Mutations in BRCA1 and BRCA2*", Tian et al descrevem um método para detecção das mutações 185delAG e 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no BRCA1 através de polimorfismo de conformação de filamento único (SSCP, do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*) com o uso de uma rede polimérica em eletroforese capilar após amplificação do DNA por PCR.

[010] Em "*Direct detection of mutations in the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 by PCR-mediated site-directed mutagenesis*" de Rohlf et al, a presença da mutação é determinada por mutação sítio-dirigida mediada por PCR.

[011] Em "*A rapid and sensitive approach to mutation detection using real-time polymerase chain reaction and melting curve analyses, using BRCA1 as an example*", Pals et al reportam o emprego de PCR em tempo real e comparando o perfil das curvas de fusão dos produtos de PCR para a forma *wild* e mutada, sendo que na última observa-se o padrão de heterozigose, ou seja, um pico de temperatura de fusão para a forma *wild* e outro indicando o mutante.

[012] No artigo "*Aptamer-based Electrochemical Sensor for Label-Free Recognition and Detection of Cancer Cells*", de Chunfeng et al., apesar do sensor descrito

utilizar eletrodo de trabalho de ouro, marcador redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ e espectroscopia de impedância eletroquímica, este detecta células de câncer utilizando aptâmeros como elemento biorreceptor. A presente invenção não utiliza tal biorreceptor, nem tampouco detecta células. Este fato não apenas não tem relação com o alvo a ser detectado pelo sensor proposto na presente invenção como utiliza um tipo de biomolécula diferente como elemento de reconhecimento.

[013] O "An Ultrasensitive Electrochemical Impedance Sensor for a Special BRCA1 Breast Cancer Gene Sequence Based on Lambda Exonuclease Assisted Target Recycling Amplification", de Huifeng et al., aborda de uma disparidade de uma única base (*single-base mismatch*) no gene BRCA1, ou seja, apenas a substituição de uma base nitrogenada por outra, enquanto que na presente invenção há a detecção de uma deleção de duas bases nitrogenadas, a mutação 185delAG de altíssima relevância, principalmente em pacientes com histórico de câncer na família.

[014] Adicionalmente, é importante citar alguns documentos de patente relacionados ao objeto da presente invenção, por exemplo:

[015] O documento US 6,391,558 B1, intitulado "*Eletrochemical detection of nucleic acid sequences*" trata de forma generalizada de sensores de DNA utilizando técnicas amperométricas para detectar e quantificar a hibridização. O presente pedido, por sua vez, utiliza espectroscopia de impedância eletroquímica. Essa técnica é capaz de caracterizar detalhadamente a interface eletrodo-solução, diferenciando um eletrodo em que ocorreu hibridização devido à complementariedade entre a fita de

captura e a fita alvo e um em que não houve complementariedade.

[016] O documento US 20080156646 A1, intitulado "*Nanosructure electrochemical biosensor with aptamer as molecular recognition probe*", descreve um biossensor baseado em aptâmeros como elemento de reconhecimento. Entretanto, apesar de aptâmeros serem oligonucleotídeos, eles assumem conformações tridimensionais e, em geral, são selecionados a partir de um conjunto aleatório de sequências, isto é, não são equivalentes às sequências de DNA descritas e aplicadas no sensor de DNA descrito na presente invenção. Ainda, tal documento destaca especificamente o uso dos indicadores redox azul de metileno e fenantrolina Fe (II). Por fim, mas não menos importante, o sensor descrito em tal documento trata-se de um sensor a ser implantado para detecção *in vivo*, que, em se tratando de uma mutação germinativa, não há necessidade ou motivo para detecção contínua *in vivo*.

[017] Assim, a presente invenção surge como uma interessante e inovadora ferramenta analítica para a análise em amostras clínicas, uma vez que comprovou ser capaz de desenvolver um sensor de DNA sobre eletrodo de ouro para mutação no gene BRCA 1 relacionada à predisposição ao câncer de mama, a c.68_69del, historicamente conhecida como 185delAG, provando ser possível distinguir duas sequências de DNA cuja diferença consiste da deleção de um par de bases nitrogenadas.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção tem por objetivo desenvolver um sensor eletroquímico de DNA, mostrando a

capacidade de distinguir uma mutação específica relacionada ao câncer de mama de uma sequência sem a mutação, monitorando a hibridização entre sequências complementares de DNA. Além disso, é também um objetivo da presente invenção propor um processo para a preparação do referido sensor eletroquímico de DNA.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[019] A FIG. 1 apresenta uma representação do processo de construção do sensor de DNA para a mutação c.68_69del;

[020] A FIG. 2 apresenta a curva analítica do sensor de DNA com coeficiente de correlação $R^2 = 0,995$ ($n=3$), R_p vs. [tarDNA].

[021] A FIG. 3 apresenta diagramas de Nyquist para concentrações de tarDNA: 1,0, 10,0, 50,0, 100,0, 150,0 e 200 nmol L⁻¹; e

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[022] A presente invenção refere-se a um sensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para a detecção de mutação c.68_69del relacionada à predisposição aos cânceres de mama e ovário localizada no cromossomo 17.

[023] O referido sensor é construído com base em um sistema eletroquímico de três eletrodos: um eletrodo de referência (RE) de Ag/AgCl (3M KCl), um contra-eletrodo (CE) de platina e um eletrodo de trabalho (WE) de barra de ouro.

[024] Embora preferencialmente seja utilizado o eletrodo de barra de ouro como eletrodo de trabalho (WE),

outros eletrodos de ouro em geral também podem ser usados, como eletrodos impressos de ouro (*screen-printed gold electrode*), eletrodos de ouro estampados (*stamped gold electrodes*), eletrodos de barra de ouro de diversos diâmetros, eletrodos comerciais e não-comerciais. Adicionalmente, eletrodos de outro material também podem ser utilizados, como eletrodos de carbono vítreo, pasta de carbono, diamante dopado com boro e platina, recobertos com ouro ou nanomaterial de ouro (nanopátículas de ouro, nanobastões de ouro).

[025] Sobre o eletrodo de ouro foram imobilizadas as sequências sintéticas de DNA planejadas e adquiridas comercialmente. Três oligonucleotídeos com diferentes sequências foram utilizados: uma sequência de captura (HS-ssDNA) [SEQ. ID. 1], uma sequência alvo (tarDNA) [SEQ. ID. 2] complementar à sequência de captura, e uma sequência não-complementar (ncsDNA) [SEQ. ID. 3]. A sequência alvo é equivalente à sequência que apresenta a mutação, isto é, a deleção de um par timina (T) e citosina (C), bem como a sequência alvo, mas com a deleção das bases complementares adenina (A) e guanina (G). A sequência não-complementar, por sua vez, representa a sequência não-mutada e foi usada para testar a especificidade do sensor.

[026] Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um processo para a preparação do referido sensor, representado pela FIG. 1, dividido em três etapas, todas sobre o eletrodo de ouro:

a) Imobilização do DNA de captura (HS-ssDNA)

[027] A imobilização do HS-ssDNA ocorre através da ligação entre o enxofre do grupo sulfidril (SH) no tiol e o

ouro do eletrodo de trabalho. Para tal, a sequência de captura foi modificada na extremidade 5' a fim de adicionar um grupo contendo enxofre para a ligação com o ouro. A imobilização foi feita imergindo a superfície do eletrodo em 5 a 30,0 μL de solução de HS-ssDNA de concentração de 10 nmol L^{-1} a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preferencialmente 100,0 nmol L^{-1}) por 20 minutos a 20 horas e, em seguida, enxaguando o eletrodo com tampão fosfato de 0,01 a 1 mol L^{-1} , preferencialmente 0,1 mol L^{-1} , e pH de 6 a 12, (pH 7,0) para remover as moléculas não adsorvidas, e secar com fluxo brando de nitrogênio (N_2).

b) Recobrimento da superfície com 2-mercaptoetanol

[028] Nesta etapa, o eletrodo é imerso por 5 minutos a 20 horas, preferencialmente 1 hora, em excesso de 2-mercaptoetanol (2-ME) 0,1 a 10,0 mmol L^{-1} , preferencialmente 1,0 mmol L^{-1} para rearranjar as moléculas de DNA removendo as que não tenham adsorvido especificamente na superfície do eletrodo, alinhando as cadeias carbônicas devido à formação de interações de Van de Waals entre as cadeias. Passada 1h o eletrodo foi novamente enxaguado com tampão fosfato 0,01 a 1 mol L^{-1} , preferencialmente 0,1 mol L^{-1} e pH de 6 a 12, preferencialmente 7,0 e seco com fluxo brando de nitrogênio (N_2). Note que não apenas 2-ME pode ser usado como agente de recobrimento do eletrodo, mas qualquer molécula com uma extremidade tiol e cadeia carbônica que não interaja com o DNA de forma a afetar o sensor.

c) Interação do HS-ssDNA com tarDNA alvo ou ncsDNA

[029] O eletrodo, já modificado com a camada HS-ssDNA+2-ME é imerso em um volume de 5,0 a 100,0 μL ,

preferencialmente 30,0 μL de tarDNA ou de 5,0 μL a 30,0 μL de ncsDNA, ambos por 5 minutos a 20 horas, preferencialmente 12 horas, com concentrações diversas de 0 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Caracterização do sensor de DNA

[030] A caracterização do sensor foi feita pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) utilizando um potenciostato/galvanostato adequado e célula eletroquímica de vidro Pyrex de 15 mL. A variação das propriedades eletroquímicas na interface do eletrodo foram verificadas utilizando EIS e solução de ferri/ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ 0,5 a 20 mmol L^{-1} , preferencialmente 5,0 mmol L^{-1} preparada em tampão fosfato 0,01 a 1 mol L^{-1} , preferencialmente 0,1 mol L^{-1} e pH de 6 a 12, preferencialmente 7,0. Entretanto outros marcadores eletroquímicos podem ser utilizados, por exemplo, naftoquinonassulfonato ou hexacianoferrato de óxido de rutênio.

[031] Para efeitos de calibração do sistema foi necessário determinar a correlação entre a resistência de transferência de carga (R_p) e a concentração de DNA [tarDNA]. A R_p foi determinada para seis diferentes concentrações de tarDNA a partir de diagramas de Nyquist, conforme observado na FIG. 2 e a curva analítica foi obtida por regressão linear relacionando esses valores com as concentrações de DNA, conforme observado na FIG. 3.

[032] A equação de correlação é $R_p \text{ (k}\Omega\cdot\text{cm}^2) = 1082 + 8,145 [\text{tarDNA}] \text{ (nmol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação R^2 igual a 0,995 ($n=3$). Com isso é possível definir a faixa linear, de 1,00 a 200,00 nmol L^{-1} , e o limite de detecção

(LD), 0,14 nmol L⁻¹, desse sensor, sendo LD determinado pela relação:

$$LD = 3 x \frac{SD}{m}$$

[033] onde *SD* é o desvio padrão do branco e *m* é a inclinação da curva analítica.

Funcionamento do Sensor

[034] A detecção eletroquímica envolve o monitoramento de variações de resistência à passagem de elétrons da solução para o eletrodo ou de respostas de corrente. Uma vez que a hibridização ocorra, a resistência varia, enquanto não ocorrendo hibridização não há variação significativa da resistência de transferência de carga. Assim, o sensor dá uma simples resposta de sim ou não, indicando a presença ou ausência da mutação.

[035] 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. Sensor eletroquímico de DNA **caracterizado** pelo fato de compreender:

- eletrodo de referência (RE);
- contra-eletrodo (CE);
- eletrodo de trabalho (WE);

em que sobre o eletrodo de trabalho são imobilizadas as sequências sintéticas de DNA de captura (HS-ssDNA), sequência alvo (tarDNA) complementar a sequência de captura, e uma sequência não-complementar (ncsDNA).

2. Sensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a sequência de captura (HS-ssDNA) ser representada pela SEQ. ID 1.

3. Sensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a sequência alvo (tarDNA) ser representada pela SEQ. ID. 2.

4. Sensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a sequência não-complementar (ncsDNA) ser representada pela SEQ. ID. 3.

5. Sensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o eletrodo de referência ser de Ag/AgCl (3M KCl).

6. Sensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o contra-eletrodo ser de platina.

7. Sensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o eletrodo de trabalho ser de barra de ouro.

8. Sensor, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de o sensor de trabalho ser

opcionalmente de outros eletrodos de ouro em geral, como eletrodos impressos de ouro (*screen-printed gold electrode*), eletrodos de ouro estampados (*stamped gold electrodes*), eletrodos de barra de ouro de diversos diâmetros, eletrodos comerciais e não-comerciais; e eletrodos de outro material, como eletrodos de carbono vítreo, pasta de carbono, diamante dopado com boro e platina, recobertos com ouro ou nanomaterial de ouro (nanopátículas de ouro, nanobastões de ouro).

9. Processo para a preparação do sensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- a) imobilização do DNA de captura (HS-ssDNA);
- b) recobrimento da superfície com 2-mercaptoetanol; e
- c) interação do HS-ssDNA com tarDNA alvo ou ncsDNA.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de a imobilização do HS-ssDNA ocorrer através da ligação entre o enxofre do grupo sulfidril (SH) no tiol e o ouro do eletrodo de trabalho.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de na etapa a) ocorrer a imersão da superfície do eletrodo em 5 a 30,0 μL de solução de HS-ssDNA de concentração de 10 nmol L^{-1} a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preferencialmente 100,0 nmol L^{-1} por 20 minutos a 20 horas e, em seguida, enxaguando o eletrodo com tampão fosfato de 0,01 a 1 mol L^{-1} , preferencialmente 0,1 mol L^{-1} e pH de 6 a 12, preferencialmente 7,0, e secando com fluxo brando de nitrogênio (N_2).

12. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de na etapa b) ocorrer a imersão do

eletrodo por 5 a 20 horas, preferencialmente 1 hora, em excesso de 2-mercaptoetanol (2-ME) 0,1 a 10,0 mmol L⁻¹, preferencialmente 1,0 mmol L⁻¹, enxaguando com tampão fosfato 0,01 a 1 mol L⁻¹, preferencialmente 0,1 mol L⁻¹ e pH de 6 a 12, preferencialmente 7,0, e secando com fluxo brando de nitrogênio (N₂).

13. Processo, de acordo a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de na etapa c) ocorrer a imersão do eletrodo modificado com a camada HS-ssDNA+2-ME em um volume de 5,0 a 100,0 µL, preferencialmente 30,0 µL de tarDNA ou de 5,0 µL a 30,0 µL de ncsDNA, ambos por 5 minutos a 20 horas, preferencialmente 12 horas, com concentrações diversas de 0 a 10 µmol L⁻¹.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 13, **caracterizado** pelo fato de ocorrer sobre o eletrodo de ouro.

15. Uso do sensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de ser para a detecção de mutação c.68_69del relacionada à predisposição aos cânceres de mama e ovário localizada no cromossomo 17.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de a detecção ser baseada nas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de utilizar solução de ferri/ferrocianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]), [Fe(CN)₆]^{-3/-4} 0,5 a 20 mmol L⁻¹, preferencialmente 5,0 mmol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,01 a 1 mol L⁻¹,

preferencialmente $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH de 6 a 12, preferencialmente 7,0, na espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de utilizar alternativamente naftoquinonassulfonato ou hexacianoferrato de óxido de rutênio como marcadores eletroquímicos na espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

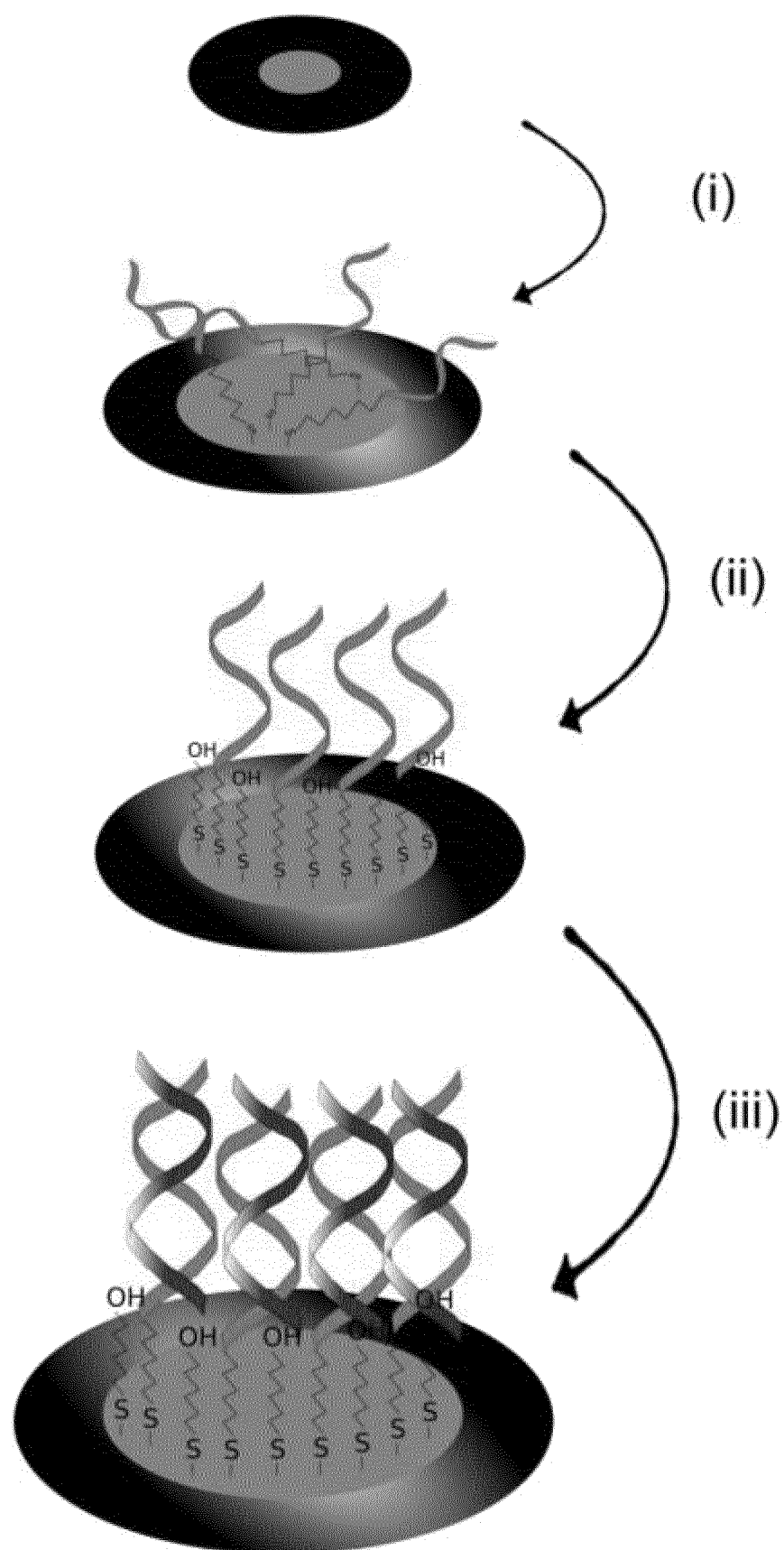


FIG. 1

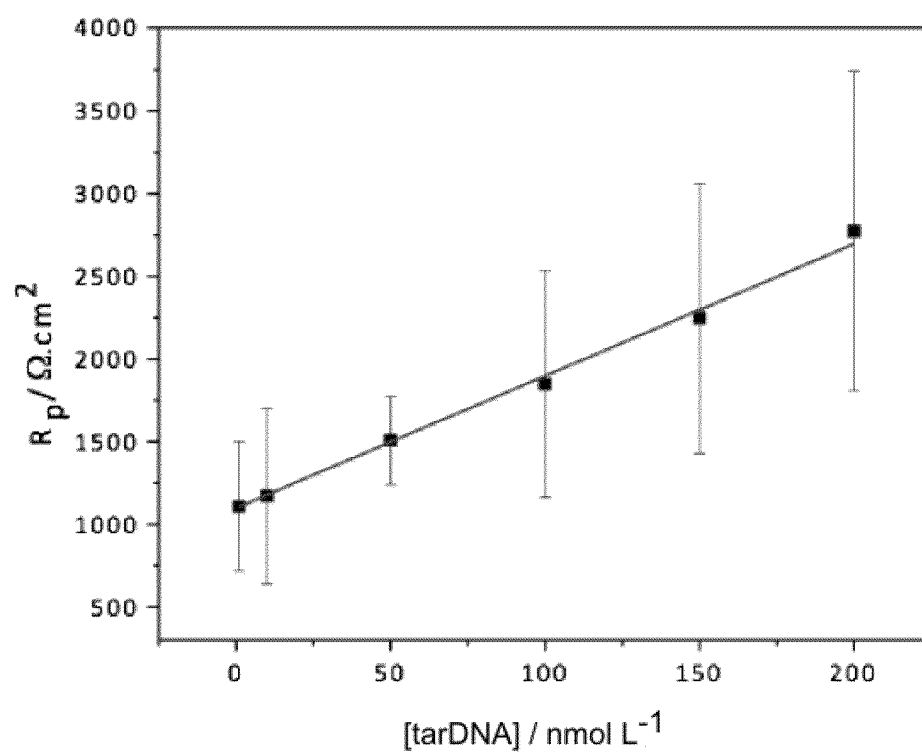


FIG. 2

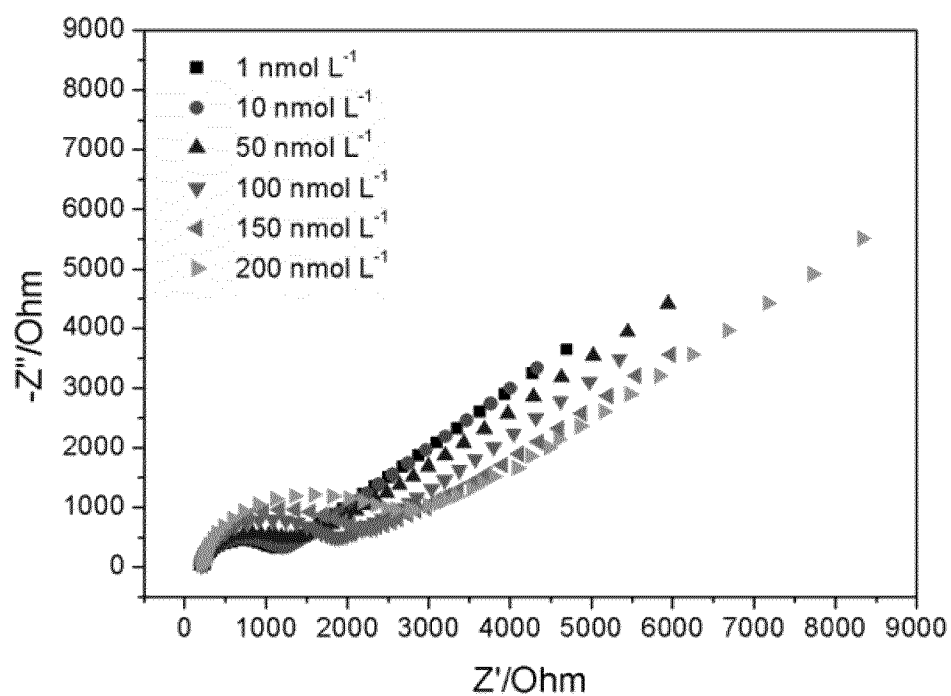


FIG. 3

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

A presente invenção descreve um sensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para a detecção de mutação c.68_69del relacionada à predisposição aos cânceres de mama e ovário localizada no cromossomo 17. O referido sensor é construído com base em um sistema eletroquímico de três eletrodos: um eletrodo de referência (RE) de Ag/AgCl (3M KCl), um contra-eletrodo (CE) de platina e um eletrodo de trabalho (WE) de barra de ouro. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um processo para a preparação do referido sensor compreendendo três etapas sobre o eletrodo de trabalho: imobilização do DNA de captura (HS-ssDNA), recobrimento da superfície com 2-mercaptoetanol e interação do HS-ssDNA com tarDNA alvo ou ncsDNA.