



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

(21) BR 102013024319-1 A2

(22) Data do Depósito: 23/09/2013

(43) Data da Publicação: 23/02/2016
(RPI 2355)



(54) **Título:** MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO VÍRUS DA DENGUE; PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO VÍRUS DA DENGUE; KIT CONTENDO O MESMO E MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DA DENGUE

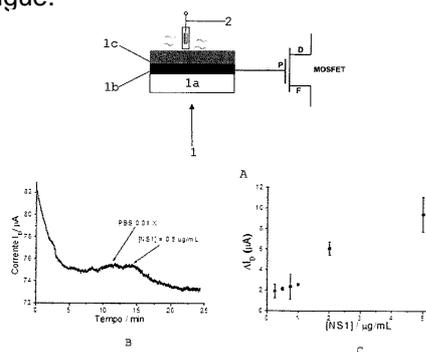
(51) **Int. Cl.:** G01N 33/569; C07K 16/10; G01N 27/00

(73) **Titular(es):** DNAPTA BIOTECNOLOGIA LTDA, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

(72) **Inventor(es):** FRANCISCO EDUARDO GONTIJO GUIMARÃES, VALTENCIR ZUCOLOTTI, ALESSANDRA FIGUEIRO, NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA, HAROLDO ARAKAKI, RODRIGO LEMOS LOVATO, PAULO PEITL JUNIOR, SERGIO MORAES AOKI

(74) **Procurador(es):** MARIA APARECIDA DE SOUZA

(57) **Resumo:** MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO VÍRUS DA DENGUE; PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO VÍRUS DA DENGUE; KIT CONTENDO O MESMO E MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DA DENGUE. A presente invenção trata um microdispositivo detector do vírus da dengue em uma amostra biológica que compreende um substrato inerte (1a); um filme metálico (1b); uma película aderente; e uma molécula receptora; seu processo de produção; kit contendo o mesmo e método de identificação da dengue.



**MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO VÍRUS DA DENGUE;
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO
VÍRUS DA DENGUE; KIT CONTENDO O MESMO E MÉTODO DE
IDENTIFICAÇÃO DA DENGUE**

5 **CAMPO DA INVENÇÃO**

Esta invenção pertence ao campo das medições com finalidade de diagnóstico; especificamente ao campo dos instrumentos e métodos para a detecção de patógenos.

ESTADO DA TÉCNICA

10 A dengue é a enfermidade causada pelo vírus da dengue, um arbovírus do gênero Flavivírus, que inclui quatro tipos imunológicos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4; havendo ainda, a ocorrência de quatro genótipos para tipo DEN-2 e DEN-3 e dois para o DEN-1 e DEN-4, com diversidade máxima de
15 aminoácidos, de aproximadamente 10% para o gene E destes subtipos virais.

A infecção por um deles dá proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três.

20 A dengue tem, como hospedeiro vertebrado, o homem e outros primatas, mas somente o primeiro apresenta manifestação clínica da infecção e período de viremia de aproximadamente sete dias. Nos demais primatas, a viremia é baixa e de curta duração.

25 Atualmente, a dengue é a arbovirose mais comum que atinge o homem, sendo responsável por cerca de 100 milhões de casos/ano em população de risco de 2,5 a 3 bilhões de seres humanos espalhados pela zona tropical do globo.

Entre 1995 e o início de 2001, foram notificados à
30 Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS, por 44 países

das Américas, 2.471.505 casos de dengue, dentre eles, 48.154 da forma hemorrágica e 563 óbitos. O Brasil, o México, a Colômbia, a Venezuela, a Nicarágua e Honduras apresentaram número elevado de notificações, com pequena
5 variação ao longo do período, seguidos por Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Panamá, Porto Rico, Guiana Francesa, Suriname, Jamaica e Trinidad & Tobago. Nota-se a quase ausência de casos nos EUA, que notificaram somente sete, em 1995. A Argentina compareceu a partir de 1998 e o Paraguai,
10 a partir de 1999. Os casos de dengue hemorrágica e óbitos acompanham a distribuição descrita acima, e parece não terem relação com os sorotipos circulantes. No Brasil, os sorotipos mais frequentes são o DEN-1, DEN-2 e DEN-3, com o sorotipo DEN-4 tendo sua frequência aumentada nos últimos
15 anos.

O diagnóstico é feito clinicamente e por meio de exames laboratoriais, por meio de testes sorológicos indiretos ou diretos. O teste indireto ocorre pela detecção de anticorpos IgM (única amostra de soro) ou IgG (aumento
20 de título em amostras pareadas); já o teste direto é realizado isolando o agente etiológico. Este é o método mais específico, mas os dois exames são complementares.

A determinação da presença de proteína viral não estrutural 1 ou NS1 é de fundamental importância para
25 identificar se um indivíduo está infectado por dengue. Sua presença na corrente sanguínea varia de paciente para paciente, em um intervalo de poucos ng.mL^{-1} até o máximo de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nos 6 primeiros dias de infecção. O teste ELISA é o ensaio de rotina mais empregado para detecção de NS1,
30 garantindo boa precisão e baixo limite de detecção.

Outros imunossensores exibem limites de detecção tão baixos quanto o teste ELISA, principalmente imunossensores amperométricos. Porém, algumas desvantagens podem ser apontadas nesses sistemas: a medida não é realizada de forma direta uma vez o anticorpo imobilizado é conjugado com a enzima peroxidase e o sinal medido é a catálise de peróxido de hidrogênio. Os PI 0712079-6 e PI 0709565-1 reivindicam imunoensaios para a detecção da dengue, baseados no método de ELISA e, a patente FR2871888 traz um método de detecção de flavivírus, especialmente o vírus do oeste do Nilo (WNV) pela técnica de ELISA.

O PI 0603590-6 descreve um método de utilização de micro e nanoesferas de látex e/ou poliestireno marcadas com anticorpos que promovem interações antígeno-anticorpo, úteis em testes LISS-Coombs, que podem ser usadas para a detecção de diversas doenças, tais como, tétano, tuberculose, hanseníase, meningites, dengue, AIDS, hepatites, toxoplasmose, leishmaniose, malária, vários tipos de câncer, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras.

Embora eficientes, estes exames somente podem ser realizados com a doença em estágio avançado, entre 5 e 10 dias após a infecção, o que retarda muito o início do tratamento, fato que é indesejado para todas as enfermidades conhecidas.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

Um objetivo da invenção é propor microdispositivos detectores do vírus da dengue em uma amostra biológica.

Um segundo objetivo da presente invenção é propor um processo de produção de microdispositivos detectores do

vírus da dengue.

Outro objetivo da invenção é propor um kit para a detecção da dengue na fase inicial da doença.

O último objetivo da invenção é um método de uso do
5 microdispositivo detector do vírus da dengue.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de um microdispositivo barato e eficiente para a detecção do vírus dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do vírus da dengue, que é capaz
10 de detectar a dengue nas fases iniciais da doença.

O processo de produção deste microdispositivo, um kit contendo o mesmo e seu método de uso são também tratados na presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

15 Para se obter uma total e completa visualização do objeto de patente de invenção, ora em questão, acompanham os desenhos, aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

Figura 1 - (A) apresentação esquemática do
20 microdispositivo (1) conectado a um MOSFET; (B) e (C) são os gráficos das análises realizadas pelo sistema representado em (A).

Figura 2 - (A) esquema elétrico do dispositivo de
25 medição conforme uma modalidade da invenção, (B) e (C) são os gráficos das análises realizadas pelo sistema representado em A.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de microdispositivo (1) detector do vírus da dengue em uma amostra biológica
30 compreendendo um substrato inerte (1a); um filme metálico

(1b); uma película aderente e uma molécula receptora.

O substrato inerte é uma placa ou microplaca de material pertencente ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET), polimetil-metacrilato (PMMA), polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP), poliestireno, e outros. Preferencialmente, o substrato é uma placa ou microplaca de material pertencente ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET) e polimetil-metacrilato (PMMA).

10 Como o substrato inerte é não eletrocondutor, é aplicado sobre ele um filme metálico consistido de partículas de ouro, prata, alumínio, cobre, cromo, platina ou ligas metálicas contendo os mesmos; com espessura que pode variar de 1 nm até 10 μm . Preferencialmente, o filme metálico é consistido de partículas de ouro ou prata.

O filme metálico serve tanto tornar o substrato eletrocondutivo como para favorecer a adesão da película aderente, que é consistida de duas camadas de diferentes compostos orgânicos. A primeira camada que entra em contato direto com o filme metálico é consistida de entre 1 a 20 mM de um tiol e, a segunda camada é consistida de um agente reticulador.

A primeira camada é compreendida de um tiol pertencente ao grupo consistido de: metanotiol, etanotiol, 1-propanotiol, 2-propanotiol, butanotiol, *tert*-butil mercaptano, pentanotióis, coenzima A, glutatona, cisteína, 2-mercaptoetanol, ditiotreititol, ditioeritritol e 2-mercaptoindol.

Preferencialmente, o tiol é pertencente ao grupo consistido de: cisteína, 2-mercaptoetanol e ditiotreititol.

A segunda camada é consistida de entre 0,5 a 4% v/v de um agente reticulador pertencente ao grupo consistido de: glutaraldeído, N-hidroxisulfosuccinimida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ou uma combinação destes.

5 Preferencialmente, a segunda camada é consistida de entre 1,5 a 3,0% v/v de um ou mais agentes reticuladores.

A molécula receptora é um anticorpo capaz de reconhecer os antígenos de SEQ. ID 1 A 4 referentes às proteínas NS1 dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do vírus da dengue. A molécula receptora é um anticorpo IgA, 10 IgG, IgY, IgM, IgD ou IgE comercialmente disponíveis.

Preferencialmente, a molécula receptora é um anticorpo IgG, IgY ou IgM. Mais preferivelmente ainda, a molécula receptora é um anticorpo IgG ou IgY anti-NS1.

15 A camada (1c) contendo a película aderente e a molécula receptora é o local de aplicação da amostra biológica a ser testada.

O microdispositivo (1) detector do vírus da dengue em uma amostra biológica desta invenção é usado para detectar 20 a presença do vírus da dengue em fases iniciais da infecção viral. Mais especificamente, este objeto da invenção é usado na detecção dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do vírus da dengue em uma amostra biológica entre 2 a 8 dias após a infecção viral. Para isto, este 25 microdispositivo (1) é colocado em contato com uma amostra biológica, tal como o sangue e posteriormente posicionado em um dispositivo elétrico, tal como um MOSFET ou um transdutor de sinal elétrico.

O segundo objeto desta invenção trata do processo de 30 produção de microdispositivos detectores do vírus da dengue

que compreende as etapas de obtenção de um substrato metalizado; aplicação de uma película aderente sobre o substrato metalizado e imobilização de uma molécula receptora sobre a película aderente.

5 Na primeira etapa deste processo, um filme metálico consistido de partículas de ouro, prata, alumínio, cobre, cromo, platina ou ligas metálicas contendo os mesmos; com espessura que pode variar de 1 nm até 10 μm , é aplicado sobre um substrato inerte para formar o substrato
10 metalizado.

O substrato inerte compreende uma placa ou microplaca de material pertencente ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET), polimetil-metacrilato (PMMA), polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno
15 (PP), poliestireno e outros. O filme metálico é depositado sobre o substrato por meio de métodos conhecidos pelos versados na área, como, por exemplo, a deposição por evaporação ou sputtering, formando assim o substrato metalizado.

20 Preferencialmente, o filme metálico é consistido de partículas de ouro ou prata e o substrato é uma placa ou microplaca de material pertencente ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET) e polimetil-metacrilato (PMMA).

25 Com o intuito de remover possíveis materiais orgânicos e/ou outros contaminantes presentes na superfície do substrato metalizado, este é limpo com um álcool contendo entre 1 a 4 átomos de carbono, durante 5 a 60 segundos, à temperatura ambiente. Após a limpeza e evaporação do álcool
30 contendo entre 1 a 4 átomos de carbono, o substrato

metalizado encontra-se pronto para a aplicação da película aderente.

A película aderente é aplicada pela imersão do substrato metalizado em uma solução alcóolica contendo
5 entre 1 a 20 mM de um tiol; com subsequente incubação durante 20 a 90 minutos, de uma segunda camada consistida de entre 0,5 a 4% v/v de um agente reticulador.

A solução alcóolica contém um álcool de 1 a 4 átomos de carbono e de entre 0,7 a 12,5 mM de um tiol pertencente
10 ao grupo consistido de: metanotiol, etanoltiol, 1-propanoltiol, 2-propanotiol, butanotiol, *tert*-butil mercaptano, pentanotióis, coenzima A, glutatona, cisteína, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, ditioeritritól e 2-mercaptoindol; durante 1 a 24 horas à temperatura ambiente.
15 O agente reticulador contém entre 1,5 a 3,0% v/v pertencente ao grupo consistido de: glutaraldeído, N-hidroxisulfosuccinimida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ou uma combinação destes.

Preferencialmente, a solução alcóolica é uma solução
20 de etanol consistida de um tiol pertencente ao grupo consistido de: cisteína, 2-mercaptoetanol e ditiotreitól; e, o agente reticulador é consistido de um ou mais agentes reticuladores acima descritos.

Após a incubação do agente reticulador sobre o
25 substrato metalizado, é realizada a imobilização da molécula receptora. Essa imobilização ocorre durante um período de 10 a 50 minutos, a uma temperatura de 4°C à temperatura ambiente, sendo utilizados entre 50 e 400 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de um anticorpo IgA, IgG, IgY, IgM, IgD ou IgE capaz
30 de reconhecer os antígenos de SEQ. ID 1 A 4 referentes às

proteínas NS1 dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do vírus da dengue, sendo assim obtido um microdispositivo (1) detector do vírus da dengue.

Preferencialmente, a molécula receptora incubada é um anticorpo IgG, IgY ou IgM capaz de reconhecer as sequências identificadoras SEQ. ID. 1 a SEQ. ID. 4. Mais preferivelmente ainda, a molécula receptora é um anticorpo IgG ou IgY anti-NS1.

Após a incubação, o excesso de anticorpo é removido pela lavagem do microdispositivo (1) com uma solução tampão, tal como, o tampão fosfato salino (PBS) e, em seguida, é realizado o bloqueio dos sítios de ligação disponíveis no microdispositivo (1) durante um período de 20 a 50 minutos por meios conhecidos daqueles versados na técnica, tal como, o bloqueio com uma solução da proteína albumina sérica bovina (BSA) ou uma solução de monoetanolamina com posterior lavagem com solução tampão.

O microdispositivo (1) assim produzido pode ser armazenado submerso em solução tampão, a uma temperatura entre 2 e 10 °C, até ser usado.

O microdispositivo (1) detector do vírus da dengue em uma amostra biológica, assim produzido é usado na detecção da presença do vírus da dengue em uma amostra biológica, nas fases iniciais da infecção viral. Mais especificamente, este objeto da invenção é usado na detecção dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do vírus da dengue em uma amostra de sangue colhida de um indivíduo com suspeita de dengue entre 2 a 8 dias após a infecção viral.

A amostra biológica é aplicada sobre o microdispositivo (1) e as interações da amostra e do

microdispositivo (1) são medidas, preferencialmente por meio de transdutores de sinal como transistores de efeito de campo (MOSFETs) ou amplificadores, como operacionais ou de instrumentação.

5 Outro objeto da presente invenção é um kit para detecção da dengue na fase inicial da doença que compreende:

(a) Um microdispositivo (1) detector do vírus da dengue; e,

10 (b) Uma solução eletrolítica.

O microdispositivo detector do vírus da dengue compreende um substrato inerte (1a); um filme metálico (1b); uma película aderente e uma molécula receptora.

O substrato inerte é uma placa ou microplaca de 15 material pertencente ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET), polimetil-metacrilato (PMMA), polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP), poliestireno, e outros. Preferencialmente, o substrato é uma placa ou microplaca de material pertencente 20 ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET) e polimetil-metacrilato (PMMA).

O filme metálico é consistido de partículas de ouro, prata, alumínio, cobre, cromo, platina ou ligas metálicas contendo os mesmos; com espessura que pode variar de 1 nm 25 até 10 μm . Preferencialmente, o filme metálico é consistido de partículas de ouro ou prata; e serve tanto tornar o substrato eletrocondutivo como para favorecer a adesão da película aderente, que é consistida de duas camadas de diferentes compostos orgânicos.

30 A primeira camada que entra em contato direto com o

filme metálico é consistida de entre 1 e 20 mM de um tiol e, a segunda camada é consistida de um agente reticulador. A primeira camada tem de entre 7 e 12,5 mM de um tiol pertencente ao grupo consistido de: metanotiol, etanotiol, 5 1-propanotiol, 2-propanotiol, butanotiol, *tert*-butil mercaptano, pentanotióis, coenzima A, glutationa, cisteína, 2-mercaptoetanol, ditiotreititol, ditioeritritol e 2-mercaptoindol. Preferencialmente, o tiol é pertencente ao grupo consistido de: cisteína, 2-mercaptoetanol e 10 ditiotreititol.

A segunda camada é consistida de entre 0,5 e 4% v/v de um agente reticulador pertencente ao grupo consistido de: glutaraldeído, N-hidroxisulfosuccinimida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ou uma combinação destes. 15 Preferencialmente, a segunda camada é consistida de entre 1,5 e 3,0% v/v de um ou mais agentes reticuladores.

A molécula receptora é um anticorpo capaz de reconhecer os antígenos de SEQ. ID 1 A 4 referentes às proteínas NS1 dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do 20 vírus da dengue. A molécula receptora é um anticorpo IgA, IgG, IgY, IgM, IgD ou IgE comercialmente disponíveis.

Preferencialmente, a molécula receptora é um anticorpo IgG, IgY ou IgM. Mais preferivelmente ainda, a molécula receptora é um anticorpo IgG ou IgY anti-NS1.

25 A camada (1c) contendo a película aderente e a molécula receptora é o local de aplicação da amostra biológica a ser testada.

A solução eletrolítica é o tampão fosfato salino (PBS) ou similares, tais como o tampão fosfato, o citrato, o 30 Tris-HCl, o acetato, etc. ou, ainda, uma solução salina

como solução de KCl e NaCl.

De acordo com o método de identificação da dengue que emprega o microdispositivo detector do vírus da invenção, o microdispositivo (1) detector do vírus da dengue, contido
5 no kit para a detecção do vírus da dengue deve ser posicionado em uma célula de medição, que compreende uma solução eletrolítica; e um eletrodo (2) conectado a um dispositivo eletrônico.

A célula de medição é um receptáculo adequado para
10 receber o microdispositivo (1), a solução eletrolítica e o eletrodo de referência, fechando assim o circuito elétrico. A solução eletrolítica é, preferencialmente, uma solução com teor de sais adequados, que possibilita e favorece a passagem de uma corrente elétrica, sem, no entanto, afetar
15 a ligação entre a molécula receptora ao seu antígeno. A solução eletrolítica é conhecida dos versados na área, tal como, por exemplo, o tampão fosfato salino (PBS) ou similares, tais como o tampão fosfato, o citrato, o Tris-HCl, o acetato, etc. ou, ainda, uma solução salina como
20 solução de KCl e NaCl.

O eletrodo (2) é posicionado sobre o microdispositivo (1), sendo preferencialmente um eletrodo Ag/AgCl, porém outros tipos de eletrodo são possíveis como, por exemplo, um pseudo eletrodo composto por platina, prata, ouro, ou
25 calomelano.

Em uma segunda modalidade da invenção, a célula de medição é um sistema MOSFET padrão, com a porta do sistema sendo substituída por um eletrodo (2) de Ag/AgCl, fio de prata, platina ou similares.

30 Essa configuração possibilita que seja aplicada uma

tensão dreno-fonte e uma tensão porta-fonte, em um intervalo de 0 a 2 V, monitorando-se a corrente no dreno-fonte (I_{DS}) no tempo.

5 Deste modo, a tensão aplicada no eletrodo na célula de medição recebe o valor da tensão porta-fonte, sendo um simples medidor ou um dispositivo que mede e informa o resultado da interação antígeno/anticorpo.

10 O microdispositivo (1) de detecção do vírus da dengue é imerso em solução eletrolítica e o eletrodo (2) é posicionado sobre este. A medida é realizada depois de decorrido um tempo entre 7 e 12 min para a estabilização da corrente do MOSFET ou da tensão do amplificador de instrumentação esteja constante no tempo ou podendo ser escolhido um tempo padrão para que, então, uma alíquota
15 conhecida de proteína NS1 ou soro sanguíneo contendo NS1 seja adicionada à célula de medição.

A célula de medição pode ser feita comumente de acrílico ou similar com volume variável. A variação do sinal consistido de uma corrente ou tensão, até o tempo de
20 7 a 12 min para se obter a estabilização da ligação entre a molécula receptora e o antígeno possivelmente presente na amostra, com o resultado da dessa estabilização é então monitorado.

O dispositivo eletrônico compreende preferencialmente
25 um microcontrolador, preferencialmente um PIC, contendo entradas e saídas analógicas e digitais, e memórias voláteis e não voláteis, além de temporizadores. Estes recursos permitem a implementação de conversores analógico/digital e conexão de uma interface eletrônica
30 para a visualização do resultado. A interface eletrônica é

preferencialmente consistida de mostradores alfanuméricos ou gráficos, bem como entradas de chaves ou teclas e controle de LEDs. Os programas de controle do dispositivo eletrônico podem ser desenvolvidos, por exemplo, em
5 linguagem C.

A versatilidade do microcontrolador permite uma fácil e rápida implementação de funções. A alimentação/energia do dispositivo é fornecida por uma fonte ligada na tomada ou alimentada por baterias, oferecendo a mobilidade de um
10 equipamento portátil, e trabalho em campo.

Opcionalmente, pode-se auxiliar o acompanhamento através de LEDs e sinais sonoros, sem o uso de microcontroladores.

Assim, o dispositivo eletrônico é configurado de modo
15 a receber os sinais do microdispositivo (1) e detector do vírus da dengue e informar o resultado da interação antígeno/molécula receptora, positivo ou negativo, seja em um LED, mostrador alfanumérico ou gráfico, elemento sonoro, ou qualquer outro elemento informativo.

20 Obviamente, é também previsto que o dispositivo compreenda amplificadores, para a melhoria dos sinais. Neste caso, um amplificador de instrumentação funciona como circuito de leitura de interações antígeno-anticorpo, configuração semelhante a um potencial de circuito aberto
25 (OCP, *open circuit potential*). Um exemplo de construção deste elemento é composto por resistores e três amplificadores operacionais.

A Figura 1A apresenta esquematicamente o sistema utilizando um MOSFET na transdução do sinal do
30 microdispositivo (1) proposto. Uma curva típica de

detecção, bem como a curva analítica para esse sistema também são mostradas nas figuras 1B e 1C, respectivamente.

A invenção ainda trata de um método de identificação da dengue na fase inicial da doença consistido de: coletar
5 uma amostra de material biológico de um indivíduo com suspeita de dengue; aplicar a amostra de material biológico sobre a superfície do microdispositivo (1) detector do vírus da dengue acima descrito; posicionar o microdispositivo (1) na célula de medição; adicionar a
10 solução eletrolítica; efetuar a alimentação do circuito via uma diferença de potencial; e, obter o resultado por meio da medição da alteração do sinal de saída, como por exemplo, a diferença de corrente ou tensão, do MOSFET ou amplificador usado.

15 Para fins desta invenção, a amostra de material biológico e uma amostra de sangue. A quantidade de sangue necessária para a realização do diagnóstico, de acordo com essa invenção é uma quantidade compreendida entre 30 e 640 μl o que representa, aproximadamente, algo entre 1 e 10
20 gotas de sangue. A amostra de material biológico coletada deve ser espalhada sobre a superfície do microdispositivo (1), de modo a aumentar a área de contato da amostra com o microdispositivo (1), favorecendo a interação entre a molécula receptora presente no microdispositivo (1) e os
25 antígenos possivelmente presentes na amostra coletada.

O microdispositivo (1) contendo a amostra é então posicionado no interior da célula de medição que é um receptáculo adequado para receber o microdispositivo (1) e a solução eletrolítica, além de enviar os sinais tratados
30 ao dispositivo eletrônico.

A solução eletrolítica é adicionada em um volume suficiente para recobrir o microdispositivo (1) e, por exemplo, é o tampão fosfato salino (PBS) ou similares, tais como o tampão fosfato, o citrato, o Tris-HCl, o acetato, etc. ou, ainda, uma solução salina como solução de KCl e NaCl.

Uma alimentação é necessária para o funcionamento do microdispositivo (1) via diferença de potencial efetuada sobre o mesmo. O potencial aplicado pode variar entre 0 e 2 V no caso do MOSFET e entre 5 e 20 V no caso do amplificador operacional, o resultado é obtido por meio de uma interface elétrica.

Devido às moléculas receptoras imobilizadas no microdispositivo (1) da invenção, a presença do vírus da dengue na amostra biológica pode ser obtida em um prazo de tempo compreendido entre 1 e 8 dias após a infecção viral, visto que o limiar de concentração da proteína NS1, das sequências identificadoras SEQ. ID. 1 a SEQ. ID 4 necessária para ser reconhecida pelo microdispositivo (1) é muito baixo.

REIVINDICAÇÕES

1 - Microdispositivo detector do vírus da dengue em uma amostra biológica caracterizado por compreender um substrato inerte (1a); um filme metálico (1b); uma película aderente; e uma molécula receptora.

2 - Microdispositivo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo substrato ser uma placa ou microplaca de material pertencente ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET), polimetil-metacrilato (PMMA), polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP) poliestireno, e outros.

3 - Microdispositivo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo substrato inerte ser não eletrocondutor.

4 - Microdispositivo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser aplicado sobre o substrato inerte um filme metálico consistido de partículas de ouro, prata, alumínio, cobre, cromo, platina ou ligas metálicas contendo os mesmos; com espessura que pode variar de 1 nm até 10 µm.

5 - Microdispositivo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela película aderente ser consistida de duas camadas de diferentes compostos orgânicos; a primeira camada entra em contato direto com o filme metálico é consistida de entre 1 e 20 mM de um tiol e, a segunda camada é consistida de um agente reticulador.

6 - Microdispositivo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela primeira camada ter de entre 7 e 12,5 mM de um tiol pertencente ao grupo consistido de: metanotiol, etanotiol, 1-propanotiol, 2-propanotiol, butanotiol, tert-butil mercaptano, pentanotióis, coenzima A,

glutathiona, cisteína, 2-mercaptoetanol, ditioneitol, ditioeritritol e 2-mercaptoindol; e a segunda camada ser consistida de entre 0,5 e 4% v/v de um agente reticulador pertencente ao grupo consistido de: glutaraldeído, N-
5 hidroxisulfosuccinimida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ou uma combinação destes.

7 - Microdispositivo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pela molécula receptora ser um anticorpo IgA, IgG, IgY, IgM, IgD ou IgE comercialmente disponíveis capaz
10 de reconhecer os antígenos de SEQ. ID 1 A 4 referentes às proteínas NS1 dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do vírus da dengue.

8 - Microdispositivo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pela camada (1c) conter a película aderente e
15 a molécula receptora ser o local de aplicação da amostra biológica a ser testada.

9 - Processo de produção de microdispositivos detectores do vírus da dengue **caracterizado** por compreender as etapas de obtenção de um substrato metalizado; aplicação
20 de uma película aderente sobre o substrato metalizado; imobilização de uma molécula receptora sobre a película aderente.

10 - Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** por, na primeira etapa, um filme metálico
25 consistido de partículas de ouro, prata, alumínio, cobre, cromo, platina ou ligas metálicas contendo os mesmos; com espessura que pode variar de 1 nm até 10 µm, ser aplicado sobre um substrato inerte para formar o substrato metalizado.

30 11 - Processo, de acordo com a reivindicação 9,

caracterizado pelo substrato inerte compreender uma placa ou microplaca de material pertencente ao grupo consistido de: vidro, polietileno tereftalato (PET), polimetilmetacrilato (PMMA), polietileno de alta densidade (PEAD),
5 polipropileno (PP), poliestireno e outros; o filme metálico ser depositado sobre o substrato inerte por deposição por evaporação ou sputtering, formando assim o substrato metalizado.

12 - Processo, de acordo com a reivindicação 9,
10 **caracterizado** por limpar o substrato metalizado com um álcool contendo entre 1 e 4 átomos de carbono, durante 5 a 60 segundos, à temperatura ambiente.

13 - Processo, de acordo com a reivindicação 9,
15 **caracterizado** por aplicar a película aderente por imersão do substrato metalizado em uma solução alcóolica contendo entre 1 e 20 mM de um tiol; com subsequente incubação durante 20 a 90 minutos, de uma segunda camada consistida de entre 0,5 e 4% v/v de um agente reticulador.

14 - Processo, de acordo com a reivindicação 9,
20 **caracterizado** pela solução alcóolica conter um álcool de 1 a 4 átomos de carbono e de entre 7 e 12,5 mM de um tiol pertencente ao grupo consistido de: metanotiol, etanotiol, 1-propanotiol, 2-propanotiol, butanotiol, *tert*-butil mercaptano, pentanotióis, coenzima A, glutatona, cisteína,
25 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, ditioeritritól e 2-mercaptoindol; durante 1 a 24 horas, à temperatura ambiente. O agente reticulador conter entre 1,5 e 3,0% v/v pertencente ao grupo consistido de: glutaraldeído, N-hidroxisulfosuccinimida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)
30 carbodiimida ou uma combinação destes.

posicionado em uma célula de medição compreendendo uma solução eletrolítica; e um eletrodo (2) conectado a um dispositivo eletrônico.

21 - Método, de acordo com a reivindicação 20,
5 **caracterizado** pela solução eletrolítica e o eletrodo de referência fecharem o circuito elétrico; o eletrodo (2) posicionado sobre o microdispositivo (1), ser um eletrodo Ag/AgCl.

22 - Método, de acordo com a reivindicação 20,
10 **caracterizado** pela solução eletrolítica e o eletrodo de referência fecharem o circuito elétrico; o eletrodo (2) posicionado sobre o microdispositivo (1), ser um pseudo eletrodo composto por platina, prata, ouro, ou calomelano.

23 - Método, de acordo com a reivindicação 20,
15 **caracterizado** pela a célula de medição ser um sistema MOSFET padrão, com a porta do sistema sendo substituída por um eletrodo (2) de Ag/AgCl, fio de prata, platina ou similares.

24 - Método, de acordo com a reivindicação 20,
20 **caracterizado** por ser aplicada uma tensão dreno-fonte e uma tensão porta-fonte, em um intervalo de 0 a 2 V, monitorando-se a corrente no dreno-fonte (I_{DS}) no tempo.

25 - Método, de acordo com a reivindicação 20,
caracterizado pela medida ser realizada depois de decorrido um tempo entre 7 e 12 min para a estabilização da corrente do MOSFET ou da tensão do amplificador de instrumentação esteja constante no tempo ou podendo ser escolhido um tempo padrão para que uma alíquota conhecida de proteína NS1 ou soro sanguíneo contendo NS1 seja adicionada à célula de
30 medição.

15 - Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** por imobilizar a molécula receptora durante 10 a 50 minutos, a uma temperatura entre 4°C e a temperatura ambiente, sendo utilizados entre 50 e 400 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de um anticorpo IgA, IgG, IgY, IgM, IgD ou IgE capaz de reconhecer os antígenos de SEQ. ID 1 A 4 referentes às proteínas NS1 dos subtipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 do vírus da dengue.

16 - Processo, de acordo com a reivindicação 9, 10 **caracterizado** por após a incubação, remover o excesso de anticorpo pela lavagem do microdispositivo (1) com uma solução tampão, tal como, o tampão fosfato salino (PBS) e, em seguida, ser realizado o bloqueio dos sítios de ligação disponíveis no microdispositivo (1) durante 20 a 50 15 minutos.

17 - Kit para detecção da dengue na fase inicial da doença **caracterizado** por compreender:

(a) Um microdispositivo (1) detector do vírus da dengue;

20 (b) Uma solução eletrolítica.

18 - Kit, de acordo com a reivindicação **caracterizado** pelo microdispositivo detector do vírus da dengue compreender um substrato inerte (1a); um filme metálico (1b); uma película aderente; e uma molécula receptora.

25 19 - Kit, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pela solução eletrolítica ser o tampão fosfato salino (PBS).

20 - Método de identificação da dengue **caracterizado** pelo microdispositivo (1) detector do vírus da dengue 30 contido no kit para a detecção do vírus da dengue ser

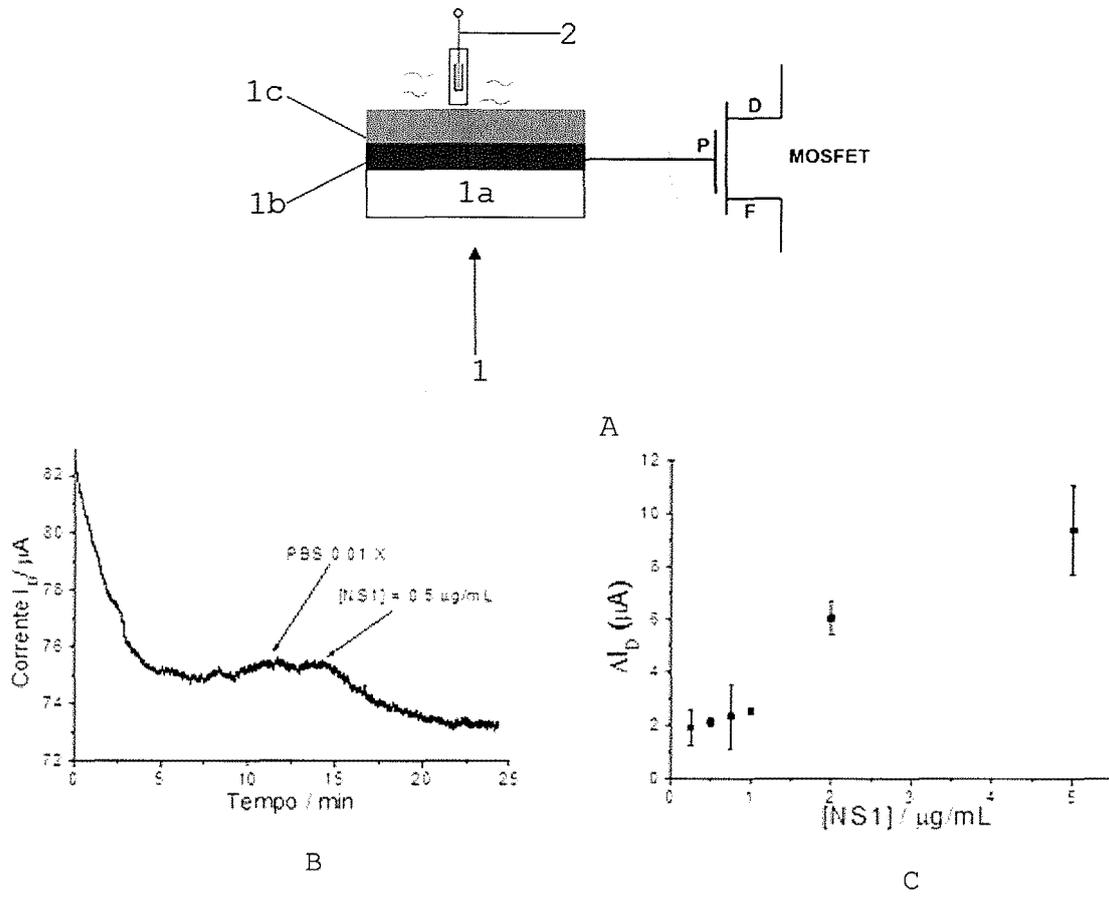


Figura 1

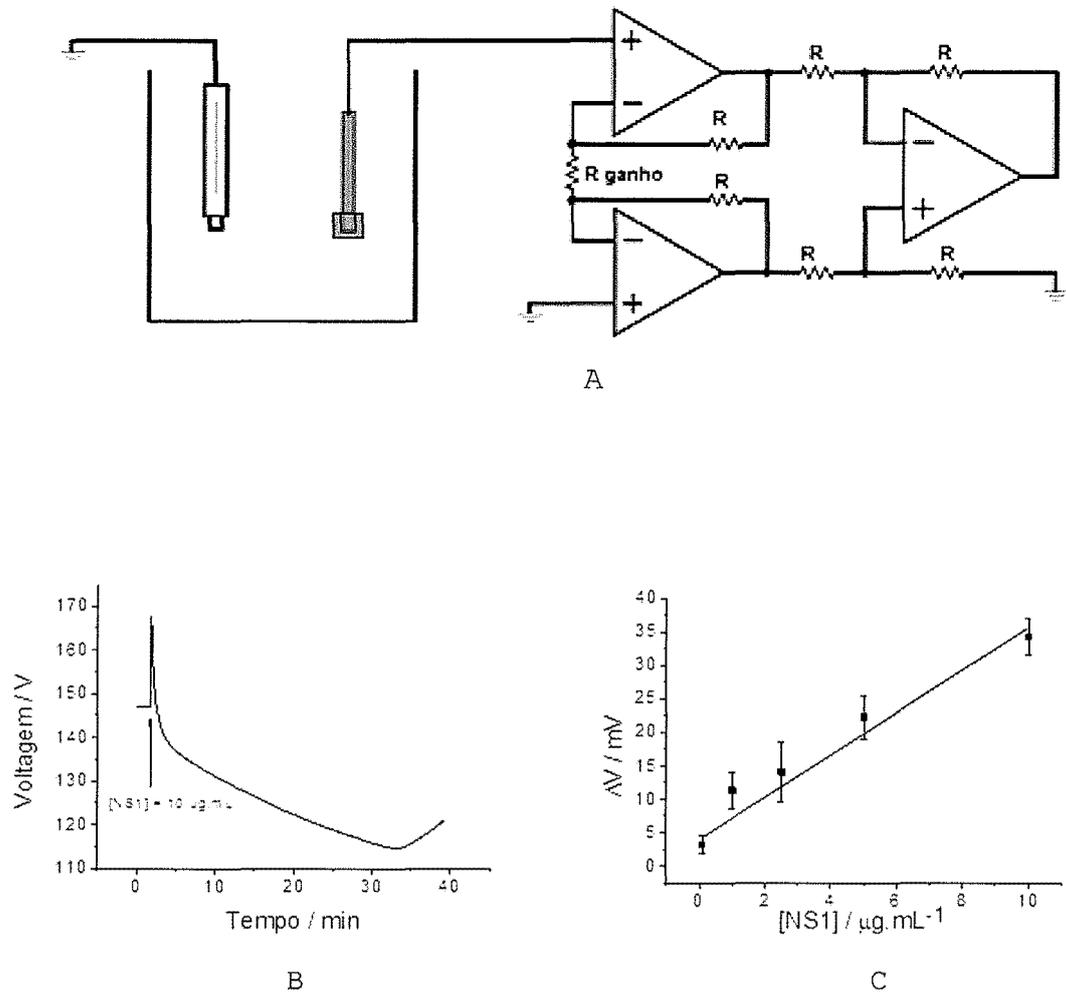


Figura 2

RESUMO

MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO VÍRUS DA DENGUE;
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICRODISPOSITIVOS DETECTORES DO
VÍRUS DA DENGUE; KIT CONTENDO O MESMO E MÉTODO DE
5 IDENTIFICAÇÃO DA DENGUE

A presente invenção trata um microdispositivo detector
do vírus da dengue em uma amostra biológica que compreende
um substrato inerte (1a); um filme metálico (1b); uma
película aderente; e uma molécula receptora; seu processo
10 de produção; kit contendo o mesmo e método de identificação
da dengue.

Met Ile Arg Pro Gln Pro Met Glu His Lys Tyr Ser Trp Lys Ser Trp
 115 120 125

Gly Lys Ala Lys Ile Ile Gly Ala Asp Val Gln Asn Thr Thr Phe Ile
 130 135 140

Ile Asp Gly Pro Asn Thr Pro Glu Cys Pro Asp Asn Gln Arg Ala Trp
 145 150 155 160

Asn Ile Trp Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Ile Phe Thr Thr Asn
 165 170 175

Ile Trp Leu Lys Leu Arg Asp Ser Tyr Thr Gln Val Cys Asp His Arg
 180 185 190

Leu Met Ser Ala Ala Ile Lys Asp Ser Lys Ala Val His Ala Asp Met
 195 200 205

Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Glu Thr Trp Lys Leu Ala Arg
 210 215 220

Ala Ser Phe Ile Glu Val Lys Thr Cys Ile Trp Pro Lys Ser His Thr
 225 230 235 240

Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Ile Ile Pro Lys Ile
 245 250 255

Tyr Gly Gly Pro Ile Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr Phe Thr
 260 265 270

Gln Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp
 275 280 285

Leu Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Val Asp Glu His Cys Gly Asn Arg

85

90

95

Thr Ile Met Thr Gly Asp Ile Lys Gly Ile Met Gln Val Gly Lys Arg
 100 105 110

Ser Leu Arg Pro Gln Pro Thr Glu Leu Arg Tyr Ser Trp Lys Thr Trp
 115 120 125

Gly Lys Ala Lys Met Leu Ser Thr Glu Leu His Asn Gln Thr Phe Leu
 130 135 140

Ile Asp Gly Pro Glu Thr Ala Glu Cys Pro Asn Thr Asn Arg Ala Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Leu Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Val Phe Thr Thr Asn
 165 170 175

Ile Trp Leu Arg Leu Arg Glu Lys Gln Asp Ala Phe Cys Asp Ser Lys
 180 185 190

Leu Met Ser Ala Ala Ile Lys Asp Asn Arg Ala Val His Ala Asp Met
 195 200 205

Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Ala Leu Asn Asp Thr Trp Lys Ile Glu Lys
 210 215 220

Ala Ser Phe Ile Glu Val Lys Ser Cys His Trp Pro Lys Ser His Thr
 225 230 235 240

Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Val Ile Pro Lys Asn
 245 250 255

Phe Ala Gly Pro Val Ser Gln His Asn Asn Arg Pro Gly Tyr His Thr
 260 265 270

Gln Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Met Asp Phe Asp
 275 280 285

Phe Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Val Thr Glu Asp Cys Gly Asn Arg
 290 295 300

Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Ile Thr Glu
 305 310 315 320

Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Arg Gly Glu
 325 330 335

Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Lys Glu Lys Glu
 340 345 350

Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Val Thr Ala
 355 360

<210> 3

<211> 362

<212> PRT

<213> Dengue virus type 3

<400> 3

Met Lys His His His His His His Gln Gln Asp Met Gly Cys Val Ile
 1 5 10 15

Asn Trp Lys Gly Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr
 20 25 30

Asn Glu Val His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Ala Asp Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ala Thr Ala Ile Ala Gly Ala Trp Glu Asn Gly Val
 50 55 60

Leu Ala Gly Pro Ile Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr His Thr
 260 265 270

Gln Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asn
 275 280 285

Tyr Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Ile Thr Glu Ser Cys Gly Thr Arg
 290 295 300

Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Val Ser Gly Lys Leu Ile His Glu
 305 310 315 320

Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Tyr Met Gly Glu
 325 330 335

Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Ile Ser Glu Lys Glu
 340 345 350

Glu Asn Met Val Lys Ser Leu Val Ser Ala
 355 360

<210> 4
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Dengue virus type 4

<400> 4

Met Lys His His His His His His Gln Gln Asp Met Gly Cys Val Val
 1 5 10 15

Ser Trp Asn Gly Lys Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Val Ile
 20 25 30

Asp Asn Val His Thr Arg Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Pro Glu Ser
 35 40 45

Pro Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ile Leu Asn Ala His Lys Asp Gly Val
 50 55 60

Cys Gly Val Arg Ser Thr Thr Arg Leu Glu Asn Val Met Trp Lys Gln
 65 70 75 80

Ile Thr Asn Glu Leu Asn Tyr Val Leu Trp Glu Gly Gly His Asp Leu
 85 90 95

Thr Val Val Ala Gly Asp Val Lys Gly Val Leu Thr Glu Gly Lys Arg
 100 105 110

Ala Leu Thr Pro Pro Val Asn Asp Leu Lys Tyr Ser Trp Lys Thr Trp
 115 120 125

Gly Lys Ala Lys Ile Phe Thr Leu Glu Ala Arg Asn Ser Thr Phe Leu
 130 135 140

Ile Asp Gly Pro Asp Thr Ser Glu Cys Pro Asn Glu Arg Arg Ala Trp
 145 150 155 160

Asn Phe Leu Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Asn
 165 170 175

Ile Trp Met Lys Phe Arg Glu Gly Ser Ser Glu Val Cys Asp His Arg
 180 185 190

Leu Met Ser Ala Ala Ile Lys Asp Gln Lys Ala Val His Ala Asp Met
 195 200 205

Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Ser Lys Asn Gln Thr Trp Gln Ile Glu Lys
 210 215 220

Ala Ser Leu Ile Glu Val Lys Thr Cys Leu Trp Pro Lys Thr His Thr
 225 230 235 240

Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Gln Met Leu Ile Pro Arg Ser
 245 250 255

Tyr Ala Gly Pro Phe Ser Gln His Asn Tyr Arg Gln Gly Tyr Ala Thr
 260 265 270

Gln Thr Met Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Ile Asn Phe Gly
 275 280 285

Glu Cys Pro Gly Thr Thr Val Ala Ile Gln Glu Asp Cys Gly His Arg
 290 295 300

Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Ala Ser Gly Lys Leu Val Thr Gln
 305 310 315 320

Trp Cys Cys Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Leu Arg Phe Leu Gly Glu
 325 330 335

Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Leu Ser Glu Lys Glu
 340 345 350

Glu Asn Met Val Lys Ser Gln Val Thr Ala
 355 360

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



B9A2AD9D032F682C

Campo 2



6F1820A645B2E502

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Sequencias_ST25.txt
- Data de Geração do Código: 23-09-2013
- Hora de Geração do Código: 11:00:07
- Código de Controle:
 - Campo 1: B9A2AD9D032F682C
 - Campo 2: 6F1820A645B2E502