



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



\* B R 1 1 2 0 2 4 0 1 4 9 2 2 A 2 \*

(21) BR 112024014922-6 A2

(22) Data do Depósito: 20/01/2023

(43) Data da Publicação Nacional:  
29/04/2025

(54) Título: BIOSSENSORES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE NEMATOIDES

(51) Int. Cl.: G01N 33/53; G01N 33/543.

(30) Prioridade Unionista: 30/03/2022 EP 22165283.7.

(71) Depositante(es): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

(72) Inventor(es): VALTENCIR ZUCOLOTTI; DIRCEU FERREIRA JUNIOR; ISABELLA SAMPAIO DO NASCIMENTO.

(86) Pedido PCT: PCT EP2023051450 de 20/01/2023

(87) Publicação PCT: WO 2023/186363 de 05/10/2023

(85) Data da Fase Nacional: 19/07/2024

(57) Resumo: BIOSSENSORES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE NEMATOIDES. A presente invenção fornece um sistema biossensor compreendendo um ou mais eletrodos capazes de converter um sinal físico-químico transduzido de uma camada de biorreconhecimento em um sinal eletrônico; uma camada de biorreconhecimento compreendendo biomoléculas imobilizadas em um ou mais eletrodos capazes de se ligar ao analito específico da espécie de nematoide, bem como um método para detectar simultaneamente mais de uma espécie de nematoide.

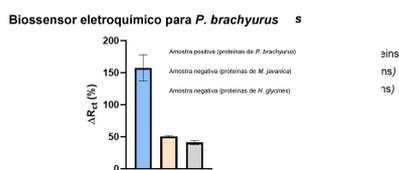


Figura 2 – Gráfico de barras mostrando a variação percentual na impedância do biossensor construído para a espécie *P. brachyurus*. O biossensor foi testado com uma amostra positiva (contendo as proteínas alvo) e duas amostras negativas (contendo proteínas das espécies *M. javanica* ou *H. glycines*).

## “BIOSSENSORES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE NEMATOIDES”

### Introdução

[001] Nematoides parasitas de plantas (do inglês, *Plant-parasitic nematodes*, PPN) são parasitas que em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, utilizam as raízes das plantas para adquirir nutrientes. O parasitismo pode causar o crescimento atrofiado das plantas, necrose das raízes e descoloração das folhas. Estima-se que a perda global na agricultura causada por nematoides parasitas de plantas seja de 157 bilhões de dólares por ano, impactando significativamente a economia mundial.

[002] As plantações infectadas são tratadas majoritariamente com a rotação de cultura, onde é feita a plantação de uma cultura resistente a nematoides, e com o uso de nematicidas. No entanto, essas estratégias não são direcionadas ao tratamento de uma única espécie e podem ser ineficazes quando a espécie de nematoides presente no solo é resistente à estratégia adotada. Além disso, o uso extensivo de nematicidas pode não só tornar os nematoides resistentes, como também acarretar diversos problemas de saúde para a população. Assim, a identificação e quantificação das espécies dos nematoides são essenciais para que a melhor estratégia seja adotada e para que o controle seja feito quando a densidade populacional dos nematoides ainda não está alta, evitando o uso de altas dosagens de nematicidas.

[003] Atualmente, a identificação dos nematoides é feita por meio de técnicas de microscopia, em que a diferenciação das espécies se baseia nas características morfométricas dos exemplares, ou pela análise molecular utilizando PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) para a amplificação do DNA e eletroforese para a identificação das sequências amplificadas. Essas técnicas utilizam aparelhos sofisticados que demandam pessoas especializadas para operá-los e etapas minuciosas que conferem um tempo maior para a obtenção dos resultados. Nesse sentido, dispositivos *point-of-care*, como é o caso de biossensores, surgem como uma nova ferramenta

para a detecção de pragas agrícolas, uma vez que a análise da amostra pode ser feita de maneira mais simples e rápida.

[004] Biossensores são plataformas em que moléculas biológicas, como enzimas, proteínas e DNA, formam uma camada de biorreconhecimento capaz de se ligar seletivamente a molécula que se deseja detectar. A interação entre as moléculas complementares causa mudanças físico-químicas que são convertidas a um sinal mensurável por um transdutor, como um eletrodo. O sinal é processado e convertido a um parâmetro físico, por exemplo, corrente elétrica, capacitância ou impedância. Os biossensores podem ser classificados de acordo com a técnica analítica utilizada para monitorar as interações. Como exemplos, há biossensores eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos e elétricos. Os biossensores elétricos e eletroquímicos são interessantes porque fornecem resultados rápidos, são custo-efetivos e podem ser miniaturizados para detecção *point-of-care*. Tais dispositivos têm sido empregados em diversas áreas, por exemplo, na detecção de doenças, pesticidas e alimentos transgênicos.

#### Descrição da Invenção

[005] A presente invenção fornece um sistema biossensor compreendendo um ou mais eletrodos capazes de converter um sinal físico-químico transduzido de uma camada de biorreconhecimento em um sinal eletrônico; uma camada de biorreconhecimento compreendendo biomoléculas imobilizadas em um ou mais eletrodos capazes de se ligar ao analito específico da espécie de nematoide. A camada de biorreconhecimento pode ser formada por biomoléculas imobilizadas capazes de se ligar seletivamente ao analito nos eletrodos. Podem ser utilizados métodos de imobilização covalente e não covalente. Para a imobilização covalente de proteínas e anticorpos em superfícies de ouro, são comumente utilizadas moléculas tioladas, como o ácido mercaptopropiônico (MPA) e o ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA). Moléculas de reticulação, como carbodiimida (EDC) e N-Hidroxisuccinimida (NHS), também podem ser utilizadas para ativar grupos funcionais. Para monitorar os eventos de

biorreconhecimento, foram selecionadas medidas impedimétricas e capacitivas.

Biossensores que utilizam detecção por capacitância elétrica

[006] Para as medidas capacitivas, é utilizada a técnica de espectroscopia de impedância não-Faradaica. Esta técnica consiste na aplicação de uma diferença de potencial entre duas placas metálicas (eletrodos), formando um capacitor. Biossensores operados por essa técnica também são denominados de biossensores capacitivos. O método não-Faradaico é realizado utilizando apenas uma solução eletrolítica como KCl e PBS, descartando mediadores redox. Em biossensores capacitivos, os eventos que acontecem na camada de reconhecimento causam alterações na constante dielétrica do meio ( $\epsilon$ ) que impactam diretamente no valor da capacitância do sistema, como descrito na seguinte equação:

$$C = \epsilon \epsilon_0 A / d$$

onde  $\epsilon_0$  é a constante dielétrica no vácuo (dada pelo valor 8.85419 pF/m),  $A$  é a área das placas e  $d$  é a distância entre elas. Além disso, a geometria dos eletrodos reflete na capacidade de detecção desses dispositivos, uma vez que quanto maior for o fator  $\epsilon_0 A / d$ , maior será a alteração na capacitância. Assim, para a detecção de biomoléculas, é importante que o eletrodo apresente placas paralelas muito próximas e com grande área geométrica. Nesse sentido, eletrodos interdigitados (do inglês, *interdigitated electrode* - IDE) são os mais utilizados para biossensores capacitivos. Na configuração típica de um IDE, inúmeras placas metálicas denominadas de *fingers* são colocadas em paralelo, cada par formando um capacitor. Com essa configuração, os capacitores são associados em paralelo, de tal forma que a capacitância total do sistema ( $C_t$ ) é dada pela soma das capacitâncias individuais ( $C_1, C_2, \dots$ ) conforme descrito pela seguinte equação:

$$C_t = C_1 + C_2 + \dots$$

[007] Um biossensor capacitivo compreende um ou mais (preferencialmente dois) eletrodos metálicos que formam o capacitor. Em uma forma de concretização,

os eletrodos são interdigitados. Nesta configuração, inúmeras placas metálicas denominadas de *fingers* são colocadas em paralelo, cada par formando um capacitor.

[008] O biossensor capacitivo compreende eletrodos interdigitados contendo pelo menos 10 *fingers*. Os *fingers* são separados por uma distância de 1 a 100  $\mu\text{m}$ .

[009] O sinal eletrônico, que pode ser uma corrente elétrica, impedância ou capacitância, é analisado pelo dispositivo de processamento de dados e fornecido ao usuário em uma representação numérica ou gráfica, como em gráficos ou tabelas. A fim de identificar a espécie de nematoide, podem ser empregados métodos estatísticos multivariados, como análise multivariada de variância, análise multivariada de covariância, regressão multivariada, análise de componentes principais, análise fatorial, análise discriminante linear, redes neurais artificiais. Os resultados dos referidos métodos podem ser apresentados como gráficos de *score*.

Biossensores que utilizam detecção por impedância eletroquímica

[010] A técnica analítica utilizada para esta configuração de medidas é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), que fornece informações sobre as propriedades elétricas na superfície do eletrodo ao variar a frequência de uma onda senoidal de baixa amplitude. Em medidas impedimétricas, um potencial fixo é aplicado e a impedância do sistema é medida.

[011] Em uma forma de concretização preferida, o biossensor eletroquímico compreende três eletrodos, sendo um contra-eletrodo, um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência. O biorreconhecimento ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, sendo este responsável pela transdução da reação bioquímica. A corrente gerada pelo sistema flui entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. Para monitorar o potencial do eletrodo de trabalho, utiliza-se, então, o eletrodo de referência, que deve ser mantido a um potencial fixo conhecido. O biossensor eletroquímico pode compreender mais de um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo e eletrodos de referência.

[012] A impedância é dependente dos eventos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho e, por esse motivo, pode ser monitorada para determinar a presença da molécula alvo na amostra.

[013] A onda de excitação pode ser tanto um potencial alternado quanto uma corrente alternada, de maneira que um dos parâmetros seja controlado e o outro medido. Então, em sistemas pseudo-lineares, como é o caso de uma célula eletroquímica, a aplicação de um potencial senoidal resulta em uma corrente senoidal que oscila na mesma frequência. Os componentes do sistema eletroquímico causam um deslocamento de fase e de amplitude entre essas duas ondas. A impedância do sistema, ou seja, a resistência em um sistema de corrente alternada, é calculada como sendo a razão entre o potencial senoidal e a corrente resposta. No método Faradaico, as medidas são realizadas utilizando mediadores redox, de maneira que as reações de oxirredução entre eles sejam monitoradas. O par redox ferricianeto de potássio ( $K_3Fe(CN)_6$ ) e ferrocianeto de potássio ( $K_4Fe(CN)_6$ ) é o mais utilizado para essa finalidade. Esse método de EIS é assim denominado porque a corrente gerada pelas reações eletroquímicas obedece a lei de Ohm, ou seja, é diretamente proporcional ao número de elétrons envolvidos na reação redox ( $n$ ), à constante de Faraday ( $F$ ), à área superficial do eletrodo ( $A$ ) e ao fluxo das moléculas eletroativas ( $j$ ):

$$I = nFAj$$

[014] As medidas de impedância eletroquímica podem ser representadas pelo diagrama de Bode, em que os valores absolutos da impedância ou do ângulo de fase são plotados em função da frequência, ou pelo diagrama de Nyquist, onde os valores reais da impedância são dados em função de seus respectivos valores imaginários em um plano complexo. A análise dos diagramas de Nyquist permite que se obtenha informações sobre os componentes do sistema eletroquímico, como a capacitância da dupla camada ( $C_{dl}$ ), a resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ), a resistência da solução ( $R_{\Omega}$ ) e a impedância de Warburg ( $Z_w$ ). Todos esses componentes formam um

circuito elétrico no sistema eletroquímico que pode ser determinado através de modelos teóricos. Um circuito equivalente é comumente encontrado em biossensores eletroquímicos e modelado por John Randles. Para essa configuração, o gráfico de Nyquist é dividido em três regiões, conforme a frequência da onda de excitação. Em altas frequências, a impedância do capacitor é ínfima, de maneira que o sistema pode ser aproximado como sendo um circuito aberto, cuja impedância é dada apenas pela resistência da solução. Na região de frequências intermediárias, processos de transferência de cargas são predominantes. Dessa forma, observa-se um semicírculo cujo diâmetro ( $R_{ct}$ ) corresponde a resistência à transferência de cargas entre o eletrólito e o eletrodo. Este parâmetro é dependente da configuração da camada de biorreconhecimento e, por esse motivo, é bastante utilizado para descrever os processos que nela ocorrem. Por fim, em regiões de baixa frequência, a impedância do sistema é governada pela difusão das espécies eletroativas ( $Z_w$ ) e pela capacitância da dupla camada ( $C_{dl}$ ), cujo comportamento é representado no espectro por uma reta inclinada.

[015] Portanto, a invenção ainda fornece um kit diagnóstico que compreende (a) um biossensor e (b) um dispositivo de processamento de dados que compreende meios para receber o sinal eletrônico, analisando o sinal eletrônico e gerando uma saída do sinal eletrônico para um usuário.

[016] Em outra forma de concretização, é fornecido um método para detectar simultaneamente mais de uma espécie de nematoide que compreende as seguintes etapas:

- (a) incubação de um analito compreendido em uma amostra de solo na camada de biorreconhecimento do biossensor;
- (b) aplicação de corrente elétrica a um ou mais eletrodos do biossensor;
- (c) variação da frequência da corrente;
- (d) medição do parâmetro físico-químico com um dispositivo de processamento de dados.

[017] Em uma forma de concretização, diferentes espécies de nematoides podem ser detectadas simultaneamente.

[018] Em outra forma de concretização, um método para a preparação de um analito adequado para uso no método para detectar simultaneamente mais de uma espécie de nematoide que compreende:

(a) uma separação física do nematoide e ovos de nematoides com o uso de peneiras, a fim de concentrar os nematoides e ovos de nematoides da amostra de solo e eliminar o solo e matéria orgânica da amostra de solo.

(b) extração das proteínas dos nematoides e ovos de nematoides isolados na etapa (a) por homogeneização.

(c) incubação do extrato de proteínas de nematoides com os eletrodos da reivindicação 1 por 5 a 60 minutos.

(d) realização das medidas de impedância elétrica ou eletroquímica pela aplicação de um sinal elétrico alternado ao eletrodo.

(e) identificação da espécie de nematoide com base nos valores de capacitância em comparação com um sinal de referência, empregando um método estatístico multivariado ou pela análise da variação percentual no sinal de impedância eletroquímica a partir do eletrodo do biossensor.

[019] Em uma forma de concretização, o método para preparação de um analito adequado para uso no biossensor é executado em um campo agrícola ou estufa.

#### Figuras

[020] Figura 1 – Gráfico de score da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem período de incubação. Para cada grupo de amostras é mostrada a elipse de confiança 95%

[021] Figura 2 – Gráfico de barras mostrando a variação percentual na impedância do biossensor construído para a espécie *P. brachyurus*. O biossensor foi

testado com uma amostra positiva (contendo as proteínas alvo) e duas amostras negativas (contendo proteínas das espécies *M. javanica* ou *H. glycines*).

[022] Figura 3 – Dependência linear entre a variação percentual da impedância eletroquímica e do log da concentração de proteínas (espécie *M. incognita*) – Curva de calibração obtida por regressão linear com ajuste  $R^2= 0,999$ .

[023] Um biossensor é um dispositivo que permite a identificação e quantificação de uma molécula de interesse, o analito. O biossensor é compreendido por uma camada de biorreconhecimento que contém biomoléculas, como DNA, enzimas, proteínas e/ou anticorpos que são adequados para se ligarem seletivamente ao analito.

[024] O biossensor ainda compreende um transdutor, sendo um ou mais eletrodos, que é capaz de converter a alteração físico-química que ocorre na camada de biorreconhecimento pela ligação a um sinal eletrônico.

[025] Um biossensor capacitivo compreende um ou mais, preferencialmente dois, eletrodos metálicos que formam o capacitor. Em uma forma de concretização, os eletrodos são interdigitados. Nesta configuração, inúmeros eletrodos metálicos denominados de *fingers* são colocados em paralelo, cada par formando um capacitor.

[026] Em uma forma de concretização preferida, o biossensor compreende três ou mais eletrodos. Em uma forma de concretização preferida, o biossensor compreende dois ou mais eletrodos.

[027] Eletrodos, particularmente os eletrodos interdigitados, são normalmente fabricados com o uso de litografia e de técnicas de deposição, por exemplo, *sputtering*, em que metais são depositados na configuração que se deseja em substratos isolantes como o vidro e o silício.

[028] Os eletrodos podem ser eletrodos de ouro descartáveis em substratos de vidro. Tais eletrodos podem ser fabricados por fotolitografia.

[029] A microscopia de força atômica pode ser utilizada para a caracterização morfológica dos eletrodos de trabalho. A técnica de espectroscopia de fotoelétrons

excitados por raios X pode ser utilizada para analisar a composição química dos eletrodos e para avaliar a eficiência da limpeza eletroquímica.

[030] Em uma forma de concretização preferida, o biossensor compreende três eletrodos, sendo um contra-eletrodo, um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência. O biorreconhecimento ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, sendo este, portanto, responsável pela transdução da reação bioquímica. A corrente gerada pelo sistema flui entre o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, que deve apresentar uma elevada área superficial. Para monitorar o potencial do eletrodo de trabalho, utiliza-se, então, o eletrodo de referência, que deve ser mantido a um potencial fixo conhecido.

[031] A camada de biorreconhecimento pode ser formada por biomoléculas imobilizadas capazes de se ligar seletivamente ao analito nos eletrodos. Exemplos dessas biomoléculas são fragmentos de DNA ou RNA, anticorpos, proteínas, fragmentos de proteínas, metabólitos secundários ou sacarídeos.

[032] A ligação entre as Proteínas A e G são exemplos de imobilização não-covalente.

[033] A imobilização covalente utiliza substratos funcionais, como moléculas de carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) ou ácido mercaptopropiônico (MPA) e ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA). APTES (3-Aminopropiltriétoxissilano) pode ser utilizado para eletrodos de ITO (do inglês, *Iridium Tin Oxide*).

[034] O sinal eletrônico, que pode ser uma corrente elétrica, impedância ou capacitância, é analisado pelo dispositivo de processamento de dados e fornecido ao usuário em uma representação numérica ou gráfica, como em gráficos ou tabelas. Esses gráficos mostram, muitas vezes, a capacitância em relação ao logaritmo da frequência.

[035] A fim de identificar a espécie de nematoide, podem ser empregados métodos estatísticos multivariados, como análise multivariada de variância, análise

multivariada de covariância, regressão multivariada, análise de componentes principais, análise fatorial, análise discriminante linear, redes neurais artificiais. Os resultados dos referidos métodos podem ser apresentados como gráficos de *score*.

[036] O analito se trata de uma ou mais biomoléculas, como fragmentos de DNA, fragmentos de DNA ou RNA, proteínas, fragmentos de proteínas, metabólitos secundários ou sacarídeos que são detectados pelas biomoléculas imobilizadas na camada de biorreconhecimento. Em uma forma de concretização preferida, o analito são proteínas específicas para a espécie de nematoide.

[037] O biossensor compreende um eletrodo capaz de converter um sinal físico-químico transduzido de uma camada de biorreconhecimento em um sinal eletrônico. O biossensor pode compreender mais de um eletrodo, preferencialmente um contra-eletrodo, um eletrodo de trabalho e dois eletrodos de referência. O biossensor também pode compreender eletrodos interdigitados e eletrodos contendo pelo menos 10, preferencialmente 20, mais preferencialmente 50, ainda mais preferencialmente 100 e ainda mais preferencialmente 150 *fingers*. Os *fingers* são separados por uma distância de 1 a 100  $\mu\text{m}$ , preferencialmente 2 a 80 microns, mais preferencialmente 5 a 50 microns, ainda mais preferencialmente 10 a 25 microns ou ainda mais preferencialmente 10  $\mu\text{m}$ . Os eletrodos interdigitados são fabricados pela técnica de fotolitografia com metalização por *sputtering*.

[038] Os biossensores ainda compreendem uma camada de biorreconhecimento que compreende biomoléculas imobilizadas no eletrodo capazes de ligar um componente de um analito específico para uma espécie de nematoide. As biomoléculas podem ser um ácido nucleico, como DNA ou RNA, ou anticorpos, como anticorpos policlonais ou monoclonais.

[039] O reconhecimento do analito na camada de biorreconhecimento ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, sendo este, portanto, responsável pela transdução da reação bioquímica. A corrente gerada pelo sistema flui entre os eletrodos, por

exemplo, o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, que deve apresentar uma elevada área superficial. Para monitorar o potencial do eletrodo de trabalho, utiliza-se, então, o eletrodo de referência, que deve ser mantido a um potencial fixo conhecido.

[040] Existem diversas técnicas eletroanalíticas com princípios de funcionamento distintos. Destacam-se as medidas amperométricas, voltamétricas, potenciométricas e impedimétricas. Em medidas amperométricas, aplica-se um potencial fixo no eletrodo de referência e mede-se a corrente gerada pela reação de oxirredução das espécies eletroativas entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. Quando a corrente é medida durante variações controladas do potencial, a técnica é denominada de voltametria. Já nas medidas potenciométricas, mede-se a diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência, resultante do acúmulo de cargas na superfície do eletrodo de trabalho. Por fim, as impedimétricas consistem na aplicação de um potencial fixo e na medida da impedância do sistema.

[041] Os parâmetros obtidos por essas técnicas são dependentes dos eventos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho e, por esse motivo, permitem determinar a presença da molécula alvo na amostra.

[042] Medidas voltamétricas consistem na aplicação de um potencial que varia com o tempo. A maneira como ocorre a variação do potencial no eletrodo de trabalho em relação ao potencial fixo do eletrodo de referência define o tipo de voltametria. Voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica são alguns exemplos de técnicas voltamétricas.

[043] A voltametria cíclica fornece informações sobre o potencial redox das espécies eletroativas e a corrente gerada por reações eletroquímicas. Para isso, aplica-se uma onda triangular que varre linearmente uma faixa de potencial. Ao atingir um potencial estipulado, o sentido de varredura é invertido, variando o potencial até que se complete o ciclo. Durante a varredura em direção ao potencial mais positivo, a espécie eletroativa é oxidada em um potencial  $E_{pa}$ , com corrente anódica  $I_{pa}$ . No

sentido inverso, a espécie é reduzida em um potencial  $E_{pc}$ , com corrente catódica  $I_{pc}$ . O gráfico gerado pelas medidas de voltametria é denominado de voltamograma.

[044] Em sistemas reversíveis, as correntes de oxirredução ( $I_p$ ) são proporcionais à velocidade de varredura do potencial ( $v$ ), área eletroativa do eletrodo ( $A$ ), número de elétrons envolvidos na reação ( $n$ ), concentração das espécies eletroativas ( $C$ ) e coeficiente de difusão ( $D$ ), como descrito pela equação de Randles-Sevcik:

$$I_p = (2.69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2}$$

[045] A variação do potencial redox e da corrente gerada podem ser indicativos da presença do analito e de sua concentração, fazendo com que essa técnica possa ser utilizada tanto como método qualitativo quanto quantitativo.

[046] Os exemplos destinam-se a ilustrar a invenção e não são, de nenhuma forma, limitantes.

#### Exemplos

[047] Exemplo 1. Extração de proteínas dos nematoides e produção de anticorpos

[048] Amostras das três espécies selecionadas contendo ovos e juvenis foram coletadas de solos. Amostras em solução aquosa foram centrifugadas em uma primeira etapa por 10 min a 2000 rpm, de maneira que os nematoides e os resíduos de solo ficassem depositados no fundo do tubo de centrifugação. Os sobrenadantes foram retirados e adicionou-se uma solução de sacarose 40 g/75 mL; as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 min a 650 g de rotação. Após essa segunda centrifugação, os nematoides (ovos e juvenis) ficaram em suspensão no sobrenadante enquanto os resíduos formaram precipitados, em razão da densidade da sacarose ser superior à densidade dos nematoides. Os sobrenadantes contendo os nematoides foram coletados e filtrados em uma peneira granulométrica de 500 mesh (abertura da malha de 0,025 mm). Nesse procedimento os nematoides ficam retidos na malha e para serem coletados, a peneira foi invertida e enxaguada com volume apropriado de

água. Por fim, as soluções foram analisadas em microscópio ótico com lente de aumento de 40X para conferir se as amostras finais continham uma quantidade significativa de nematoides e se os resíduos de solo tinham sido removidos.

[049] Após a remoção de resíduos, realizou-se a extração das proteínas. As amostras contendo nematoides foram processadas em um homogeneizador do tipo Turrax por 15 s, três vezes. Em seguida, para romper as membranas celulares e extrair as proteínas, as amostras foram sonicadas em sonicador de ponta por 1 h com 20% de amplitude. Como durante esse processo ocorre o aquecimento da amostra, elas foram imersas em gelo, que era trocado a cada 20 min de sonicação.

[050] As proteínas contidas no homogenato foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford, que faz uso do corante Coomassie brilliant blue BG-250. Amostras das proteínas extraídas foram utilizadas para imunizar coelhos visando a produção de anticorpos policlonais.

[051] O soro imunizado contendo os anticorpos foi utilizado para a construção da camada de biorreconhecimento dos imunossensores. As proteínas extraídas foram utilizadas como controles positivos e negativos na etapa de detecção.

[052] Exemplo 2. Fabricação de eletrodos interdigitados e eletroquímicos

[053] Os eletrodos eletroquímicos e interdigitados foram fabricados pela técnica de fotolitografia com metalização por *sputtering*. Na primeira etapa do processo, os substratos (vidro BK7) foram modificados com um filme fotossensível, chamado de fotorresiste, pela técnica de *spin coating* e deixados por 10 min em chapa aquecedora a 90°C para a cura do fotorresiste. Na etapa seguinte, os substratos foram expostos a luz ultravioleta através de uma máscara óptica contendo a configuração desejada para o dispositivo. Nesse caso, foi usado fotorresiste positivo, em que as regiões expostas a luz foram removidas pela solução química reveladora (solução aquosa de hidróxido de potássio). Após a etapa de fotolitografia, os substratos foram submetidos a limpeza com plasma de oxigênio para a remoção de resíduos orgânicos.

[054] A metalização foi conduzida em uma câmara de vácuo e a espessura medida por cristal de quartzo. Para os eletrodos interdigitados, primeiro depositou-se uma camada de cromo de 15 nm para adesão no substrato, depois foi depositada uma camada de ouro com 120 nm de espessura. Para o biossensor eletroquímico, um filme de titânio de 15 nm foi utilizado como camada de adesão.

[055] Exemplo 3. Procedimentos de limpeza dos eletrodos

[056] Existem dois processos de limpeza para o eletrodo interdigitado. No primeiro, nomeado de KOH, os eletrodos eram imersos na solução de KOH 2% (m/V) e deixados em banho de ultrassom por 5 min. Em seguida, era realizado o mesmo procedimento imergindo os eletrodos em etanol e depois em Milli-Q. No segundo procedimento, nomeado de etOH, os eletrodos eram limpos apenas em etanol e Milli-Q, também por 5 min em banho de ultrassom.

[057] Os eletrodos eletroquímicos foram limpos com plasma de O<sub>2</sub> com potência de 35 W e vazão de gás de 5 sccm (cm<sup>3</sup>/min).

[058] Exemplo 4. Caracterização morfológica dos eletrodos interdigitados

[059] Eletrodos interdigitados e eletroquímicos, após a limpeza descrita no exemplo 3, foram caracterizados quanto à sua morfologia, por microscopia de força atômica. A rugosidade foi determinada em 4 eletrodos distintos para analisar a reprodutibilidade. Para os eletrodos interdigitados, os valores médios encontrados para a rugosidade por área e rugosidade média quadrática foram de  $1,24 \pm 0,04$  nm e  $1,58 \pm 0,05$  nm, respectivamente. Além disso, os resultados revelaram que os eletrodos fabricados por esta metodologia apresentam valores de rugosidade semelhantes, como um desvio padrão de cerca de 3%. Essa característica é fundamental para a organização da monocamada automontada e para que as análises de condutividade elétrica sejam reprodutíveis.

[060] Exemplo 5. Funcionalização dos eletrodos

[061] O biossensor capacitivo foi construído através da formação de camada automontada: inicialmente, eletrodos interdigitados limpos foram modificados com ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) 1 mmol/L em temperatura ambiente e atmosfera úmida por 15 h; após esse período, os eletrodos foram lavados com água Milli-Q e incubados por 1 h com uma solução aquosa contendo 2 nM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e 5 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) para ativação do grupo carboxílico presente nas moléculas de MPA. Em etapa posterior, os eletrodos foram modificados com o soro imunizado por 4 h em atmosfera úmida e temperatura de 4°C. A etapa de bloqueio dos sítios ativos remanescentes com albumina de soro bovino (BSA), por exemplo, não foi adotada nesse protocolo uma vez que o soro imunizado já contém proteínas.

[062] Exemplo 6. Medidas de capacitância – reprodutibilidade e escolha de frequência

[063] Eletrodos interdigitados modificados foram submetidos a 20 medidas consecutivas de capacitância elétrica para avaliar a reprodutibilidade das mesmas na faixa de frequência de  $10^2$  Hz a  $10^6$  Hz. Os valores de capacitância se mostraram reprodutíveis para quase todas as frequências, com uma variação muito pequena para a faixa  $0,6 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  Hz.

[064] Para escolher uma frequência fixa para avaliar a variação percentual da capacitância e realizar a análise estatística multivariada, eletrodos modificados com soro imunizado da espécie *M. incognita* foram incubados em solução contendo 30 µg/mL da proteína da espécie *M. javanica* (negativa) por 1 h e em solução contendo a mesma concentração da proteína da espécie *M. incognita* (positiva) também por 1 h. Espectros de impedância elétrica foram coletados antes e após as incubações descritas. As medidas foram realizadas em solução tampão e adotou-se 5 min de espera (*delay*) antes do início delas para a organização da dupla camada elétrica. Uma variação significativa na capacitância após as incubações foi observada para frequências

entre  $10^4$  e  $10^6$  Hz, apontando essa região como a que melhor discrimina as amostras. Considerando que há uma pequena variação na reprodutibilidade das medidas para frequências acima de  $6 \times 10^5$  Hz, escolheu-se  $10^5$  Hz como frequência fixa para as análises subsequentes. Pelos espectros de capacitância obtidos para os eletrodos modificados com soro imunizado da espécie *M. incognita*, as amostras contendo apenas tampão fosfato (10 mM PBS) ou 30  $\mu\text{g/mL}$  de proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) ou 30  $\mu\text{g/mL}$  de proteínas da espécie *M. incognita* (positivo) puderam ser distinguidas claramente.

[065] Exemplo 7. Influência da limpeza dos eletrodos na seletividade do biosensor elétrico

[066] Como descrito no exemplo 3, foram testados dois protocolos de limpeza nomeados de KOH e etOH. Para avaliar se as limpezas influenciam na capacidade de discriminação das amostras e selecionar a mais adequada, dois conjuntos de eletrodos - cada um submetido a um método de limpeza - foram modificados com o soro imunizado *M. incognita* (Mi) e caracterizados por medidas de capacitância antes da incubação e após as incubações com as proteínas negativas (Mj) e positivas (Mi) a 30  $\mu\text{g/mL}$ . Realizou-se a análise de componentes principais utilizando a matriz de covariância para os valores obtidos na frequência de  $10^5$  Hz.

[067] A influência das variáveis – neste caso, os dois protocolos de limpeza - é analisada a partir do gráfico de *loading*, em que cada variável é mostrada como um vetor cuja intensidade e direção determinam a sua influência nas componentes principais 1 e 2. Observa-se que os eletrodos submetidos a limpeza com KOH apresentam uma intensidade pequena na direção y e uma intensidade grande na direção x, indicando que essa variável exerce maior influência na componente principal 1 (PC1). Por outro lado, o vetor que representa os eletrodos limpos com etOH possui uma intensidade pequena no eixo x e uma intensidade grande no eixo y, dessa forma, sua maior influência recai na PC2. Uma vez que PC1 é o componente que mais discrimina as

amostras, o protocolo de limpeza utilizando KOH foi escolhido para realizar os outros estudos.

[068] Exemplo 8. Combinação de diferentes unidades sensoriais

[069] Como forma de determinar se as variações na capacitância são de fato resultantes da interação seletiva antígeno-anticorpo, foram avaliados três conjuntos sensoriais: eletrodos limpos sem modificações, eletrodos modificados com filme orgânico sem a adição do soro imunizado e eletrodos com a SAM contendo o soro imunizado da espécie *M.incognita*, como descrito anteriormente. Para o filme orgânico, os eletrodos foram incubados por 15 h com solução de MPA 1 mM, em seguida por 1 h com EDC/NHS a 2 mM/5 mM e, por último, realizou-se o bloqueio dos grupos carboxílicos com solução de BSA 0,5% (m/V) por 30 min. Para cada conjunto, foram coletados os valores de capacitância antes da incubação, após a incubação com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) a 30 µg/mL e após a incubação com as proteínas alvo (positivo) também a 30 µg/mL. O gráfico de score da análise de componentes principais obtida pela combinação de três conjuntos sensoriais – eletrodos limpos, eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – mostrou a discriminação de três amostras aplicando um intervalo de confiança de 95%.

[070] O gráfico de *loading* para esse conjunto de variáveis mostra que há uma contribuição ínfima dos conjuntos de eletrodos limpos e com filme orgânico (FO) para a PC1, responsável pela diferenciação majoritária das amostras. Conclui-se que a discriminação das amostras é decorrente da interação específica entre os anticorpos presentes na SAM e suas proteínas alvo.

[071] Visto que os eletrodos limpos pouco contribuem para o PC1 e PC2, realizou-se a análise combinando apenas os conjuntos sensoriais FO e AC. Verifica-se no gráfico de score gerado que ao excluir os eletrodos limpos, o PC1 aumentou e foi capaz de discriminar 98,7% das amostras. Para esse caso, somando os scores das componentes principais 1 e 2, obtém-se o valor de 100%. A combinação desses dois

conjuntos sensoriais será utilizada para os demais estudos. Este resultado mostra que o biossensor capacitivo foi capaz de identificar espécies de nematoides parasitas de plantas.

[072] Exemplo 9. Detecção elétrica sem incubação

[073] O biossensor aqui desenvolvido tem como objetivo a detecção de nematoides parasitas de plantas de maneira simples e rápida, podendo ser realizada até mesmo em campo. Assim, a possibilidade de detecção sem que haja período de incubação com a amostra foi estudada. Para isso, eletrodos FO e AC foram submetidos a medidas de capacitância em solução tampão, após a espera de 10 min para a organização da dupla camada elétrica. Em etapa posterior, foi adicionado aos eletrodos uma solução contendo proteínas não-específicas (amostras negativas) a 30 µg/mL; após 10 min de espera necessários para a interação da amostra com a unidade sensorial e para a organização da dupla camada elétrica, realizou-se as medidas de impedância elétrica na mesma solução contendo as proteínas. Em seguida, repetiu-se o procedimento, dessa vez, em solução contendo as proteínas alvo (positivas) a 30 µg/mL. Os valores de capacitância foram submetidos a análise de componentes principais para avaliar se a detecção realizada sem tempo de incubação também é capaz de discriminar as amostras. O gráfico de score obtido, apresentado na Figura 1, demonstra não só a capacidade do biossensor em diferenciar as amostras a partir de medidas realizadas sem o período de incubação, como também exibe um score maior de PC1 se comparado com os resultados dos experimentos realizados com 1 h de incubação. Somando as componentes principais 1 e 2 obtém-se a discriminação de 100% das amostras.

[074] Para a detecção sem incubação, o gráfico de *loading* obtido pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos sem SAM – também mostrou que a PC1 depende quase que exclusivamente dos eletrodos que possuem anticorpos, enquanto o PC2 é dominado pelos valores gerados a partir

dos eletrodos modificados com filme orgânico. Para a análise estatística multivariada é necessário que se possua ao menos dois conjuntos sensoriais, ou seja, duas variáveis distintas. Assim, o modelo ideal identificado nesse estudo é a combinação das medidas de capacitância em eletrodos FO e AC que juntos são capazes de identificar todas as amostras.

[075] Exemplo 10. Detecção eletroquímica

[076] Medidas eletroquímicas são realizadas em um dispositivo eletrônico miniaturizado. Uma solução de eletrólitos contendo 5 mM de Ferri/ferro em 0,1 M de KCl é adicionada ao eletrodo, cobrindo toda a superfície. Inicialmente, os eletrodos são submetidos a medida por voltametria cíclica no intervalo de potencial de -0,5 a 0,6 V, a uma velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. Esta etapa é realizada apenas para pré-ativar os eletrodos. Em seguida, medidas de impedância eletroquímica são realizadas em potencial de circuito aberto na janela de frequência de 10<sup>-1</sup> Hz a 10<sup>3</sup> Hz, com amplitude AC de 10 mV. Para os testes de detecção, tais medidas foram realizadas antes após a incubação com a amostra por 30 min. A variação percentual na R<sub>ct</sub> resultante da incubação foi calculada para todas as amostras testadas. Os resultados mostraram uma variação muito maior para as amostras positivas (contendo as proteínas alvo), como mostrado na Figura 2, indicando a seletividade do biossensor.

[077] Exemplo 11. Resposta de impedância eletroquímica em função da concentração do analito

[078] A resposta de impedância eletroquímica para diferentes concentrações das proteínas alvo foi investigada. Identificou-se um aumento gradual da R<sub>ct</sub> em função da concentração das proteínas alvo. Uma relação linear entre o  $\Delta R_{ct}$  (%), calculado como variação percentual na R<sub>ct</sub> após a incubação da amostra e o logaritmo da concentração de proteínas foi atingida, conforme mostrado na Figura 3.

## REIVINDICAÇÕES

1. Biossensor **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende
  - (a) um ou mais eletrodos capazes de converter um sinal físico-químico transduzido de uma camada de biorreconhecimento em um sinal eletrônico/eletroquímico;
  - (b) a camada de biorreconhecimento que compreende biomoléculas imobilizadas em um ou mais eletrodos capazes de ligar um componente de um analito específico para uma espécie de nematoide;
2. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as biomoléculas são anticorpos ou qualquer outra molécula receptora capaz de se ligar especificamente a proteínas de certas espécies de nematoides
3. Biossensor, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os anticorpos são ligados à camada de biorreconhecimento de modo covalente.
4. Biossensor, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os anticorpos são ligados à camada de biorreconhecimento de modo não-covalente.
5. Biossensor, de acordo com as reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o biossensor é capaz de analisar mais de um analito simultaneamente.
6. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sinal físico-químico é eletroquímico ou elétrico.
7. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sinal eletrônico é selecionado do grupo de corrente elétrica, impedância ou capacitância.
8. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sinal é óptico.

9. Biossensor, de acordo com as reivindicações 1 a 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o biossensor é um biossensor capacitivo ou impedimétrico.

10. Biossensor, de acordo com as reivindicações 1 a 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o biossensor compreende eletrodos interdigitados ou eletroquímicos.

11. Kit diagnóstico **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende (a) o biossensor como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e

(b) um dispositivo de processamento de dados que compreende meios para receber o sinal eletrônico, analisando o sinal eletrônico, gerando uma saída do sinal eletrônico para um usuário.

12. Kit, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o parâmetro físico-químico é selecionado do grupo de corrente elétrica, impedância ou capacitância.

13. Método para detectar simultaneamente mais de uma espécie de nematode **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende

(a) incubação de um analito compreendido em uma amostra de solo na camada de biorreconhecimento do biossensor como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8;

(b) aplicação de corrente elétrica a um ou mais eletrodos do biossensor como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8;

(c) variação da frequência da corrente;

(d) medição do parâmetro físico-químico com um dispositivo de processamento de dados como definido na reivindicação 11.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a variação percentual do parâmetro físico-químico medido é calculada ou seus valores são analisados com o uso de um método estatístico multivariado.

15. Método para preparação de um analito adequado para uso no método como definido na reivindicação 13 **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende

(a) uma separação física do nematoide e ovos de nematoides com o uso de peneiras, a fim de concentrar os nematoides e ovos de nematoides da amostra de solo e eliminar o solo e matéria orgânica da amostra de solo;

(b) extração das proteínas dos nematoides e ovos de nematoides isolados na etapa (a) por homogeneização;

(c) incubação do extrato de proteínas de nematoides com os eletrodos como definidos na reivindicação 1;

(d) realização das medidas de impedância elétrica ou eletroquímica pela aplicação de um sinal elétrico alternado ao eletrodo.

(e) identificação da espécie de nematoide com base nos valores de impedância em comparação com um sinal de referência, empregando um método estatístico multivariado.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método é executado em um campo agrícola ou estufa.

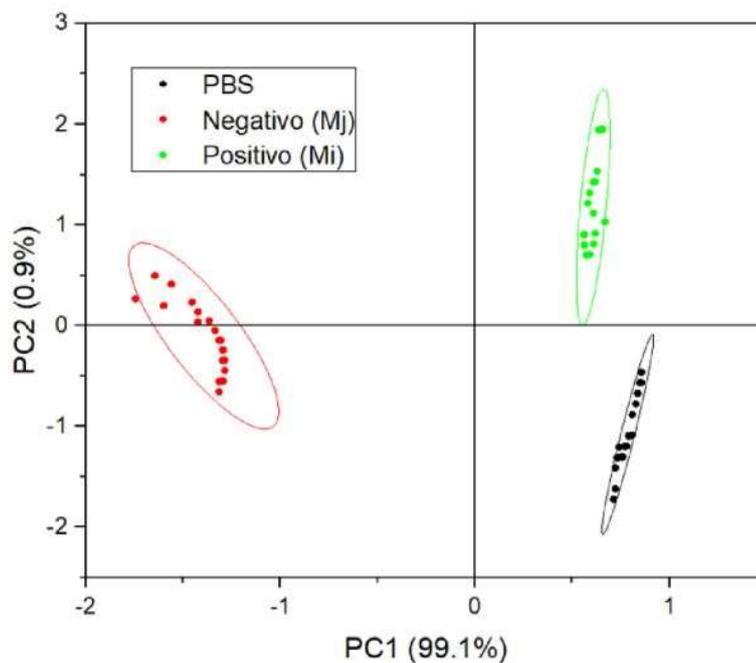
Figura 1

Figura 1 – Gráfico de score da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem período de incubação. Para cada grupo de amostras é mostrada a elipse de confiança 95%

Figura 2

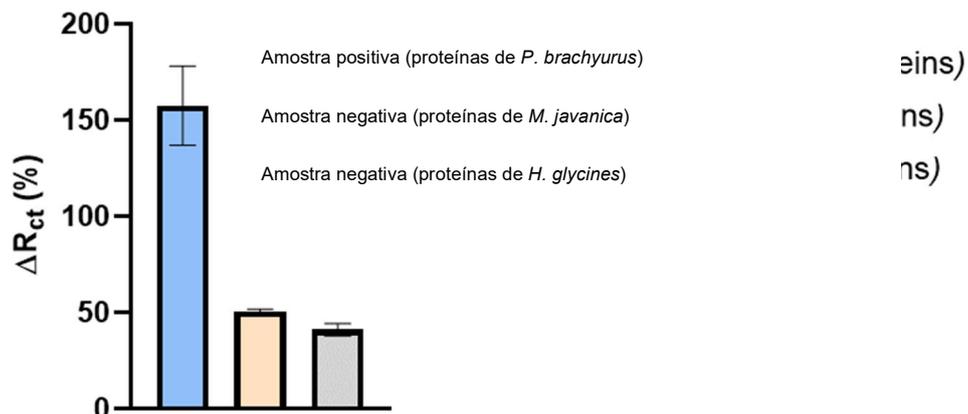
**Biossensor eletroquímico para *P. brachyurus***

Figura 2 – Gráfico de barras mostrando a variação percentual na impedância do biossensor construído para a espécie *P. brachyurus*. O biossensor foi testado com uma amostra positiva (contendo as proteínas alvo) e duas amostras negativas (contendo proteínas das espécies *M. javanica* ou *H. glycines*).

Figura 3

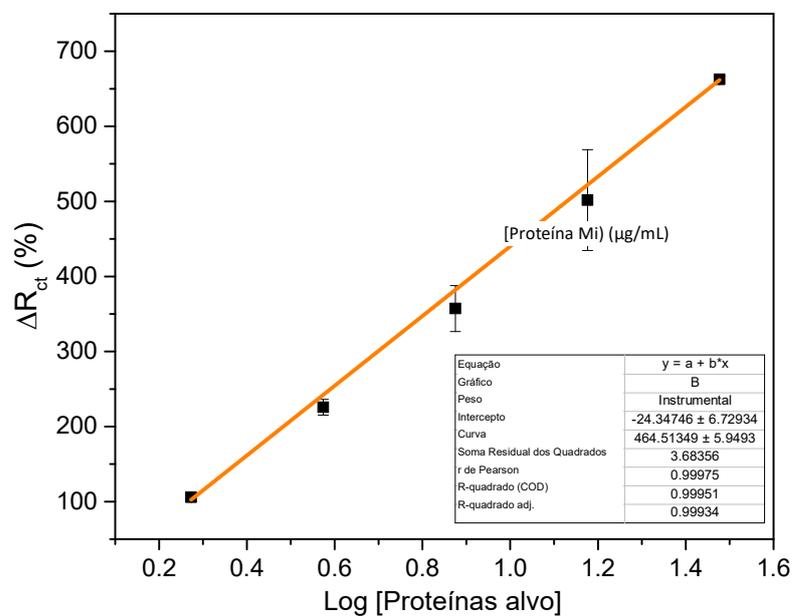


Figura 3 – Dependência linear entre a variação percentual da impedância e do log da concentração de proteínas (espécie *M. incognita*) – Curva de calibração obtida por regressão linear com ajuste  $R^2 = 0,999$ .

RESUMO

“BIOSSENSORES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE NEMATOIDES”

A presente invenção fornece um sistema biossensor compreendendo um ou mais eletrodos capazes de converter um sinal físico-químico transduzido de uma camada de biorreconhecimento em um sinal eletrônico; uma camada de biorreconhecimento compreendendo biomoléculas imobilizadas em um ou mais eletrodos capazes de se ligar ao analito específico da espécie de nematoide, bem como um método para detectar simultaneamente mais de uma espécie de nematoide.