



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



(21) BR 102024000029-3 A2

(22) Data do Depósito: 02/01/2024

(43) Data da Publicação Nacional:
15/07/2025

(54) Título: MÉTODO E DISPOSITIVO DE DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO SEQUENCIAL DE RNA UTILIZANDO CAPACITÂNCIA DIFERENCIAL NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68; C12Q 1/6809; C12Q 1/6825; G01N 27/22; B01L 3/00.

(52) CPC: C12Q 1/68; C12Q 1/6809; C12Q 1/6825; G01N 27/22; B01L 3/502715.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): STEFFANE QUARESMA NASCIMENTO; FRANK NELSON CRESPILO.

(57) Resumo: MÉTODO E DISPOSITIVO DE DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO SEQUENCIAL DE RNA UTILIZANDO CAPACITÂNCIA DIFERENCIAL NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA. A presente invenção se refere a um método para detectar amplificação sequencial de RNA utilizando Capacitância Diferencial no Domínio de Frequência (CDDF). O método emprega um dispositivo com dois eletrodos condutores separados para selecionar frequências que criam um diagrama diferencial que representa a variação da capacitância diferencial em função do tempo em cada frequência. O método de detecção de replicação é sensível, específico e direta, e tem uma ampla gama de aplicações, incluindo doenças infecciosas diagnósticos, identificação de patógenos e monitoramento ambiental. Especificamente, uma enzima transcriptase reversa é usada para sintetizar uma fita complementar de DNA a partir do RNA, e quatro primers específicos são adicionados à mistura de reação para iniciar a amplificação de cópias repetidas do DNA alvo por meio de um mecanismo de amplificação de loop, no qual as regiões alvo são amplificadas em rodadas sucessivas de amplificação, resultando em estruturas de DNA em forma de funil.

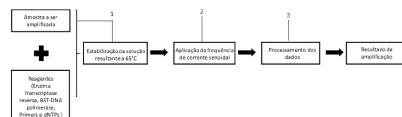


Figura 1

MÉTODO E DISPOSITIVO DE DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO SEQUENCIAL DE RNA UTILIZANDO CAPACITÂNCIA DIFERENCIAL NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

CAMPO DA INVENÇÃO

[01] A presente invenção se insere no campo de eletroquímica e de técnicas de diagnóstico genético. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada às técnicas para detecção e amplificação de RNA em condição isotérmica mediada por loop (LAMP) utilizando a espectroscopia de capacidade diferencial no domínio da frequência (CDDF).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[02] A presente invenção se refere a um método e dispositivo para detectar a amplificação de RNA em condição isotérmica mediada por loop (LAMP) usando espectroscopia de capacidade diferencial no domínio da frequência (CDDF).

[03] De maneira geral, com o advento da pandemia da COVID-19, a detecção de amplificação de RNA tornou-se uma ferramenta crítica para o diagnóstico de doenças, especialmente no contexto de infecções virais.

[04] É sabido que a amplificação de RNA é uma técnica usada para aumentar a quantidade de uma sequência específica de RNA, tornando-a mais detectável e quantificável. Duas técnicas comuns de amplificação de RNA são a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e a Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR, do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Essas técnicas são amplamente utilizadas em biologia molecular para estudar genes, diagnóstico de doenças e outras aplicações. No entanto, tais técnicas dependem de sistemas complexos com detecção óptica e controle rigoroso de temperatura, tornando essas técnicas demoradas, além de exigir mão de obra altamente especializada.

[05] Nesse contexto, é especificamente conhecida a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP, do inglês *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) que é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos que permite amplificar DNA ou RNA

de maneira rápida e eficaz a temperaturas constantes. A LAMP é conhecida por sua capacidade de amplificar alvos específicos com alta sensibilidade e é frequentemente usada em diagnósticos moleculares, pesquisa em biologia molecular e detecção de patógenos.

[06] A técnica de LAMP se diferencia do PCR tradicional na forma que os experimentos são conduzidos, enquanto o PCR precisa de ciclos alternados de aquecimento e resfriamento, o LAMP ocorre em uma única etapa à temperatura constante, geralmente entre 60°C e 65°C. Isso elimina a necessidade de um termociclador sofisticado, tornando a técnica mais acessível. Especificamente, a reação de RT-LAMP é normalmente identificada pela mudança de coloração da reação, o que o torna um método qualitativo, ou seja, ele indica que ocorreu a reações e que tem o RNA alvo. Já a presente invenção é baseada em um sistema eletroquímico que a partir dos gráficos, além de detectar a presença do RNA alvo e sua amplificação, também possibilita a quantificação desse RNA amplificado, o que torna o método eletroquímico mais sofisticado que o método tradicional colorimétrico.

[07] Em vista do cenário supracitado, o método da presente invenção propõe uma abordagem para monitorar a amplificação de LAMP usando medições de Capacitância Diferencial no Domínio da Frequência (CDDF), focando no uso de sistemas de detecção eletroquímica para amplificação de RNA. Tal método é baseado na medição da interferência da interface eletrodo-eletrólito na onda senoidal da capacitância diferencial, fornecendo um tipo sistema de monitoramento (baseado em medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica através da CDDF) que detecta e quantifica a amplificação do RNA em tempo real através dos espectros de CDDF, o que traz mais informações que somente a reação de LAMP convencional. Especificamente, o sistema de monitoramento é a forma como o resultado da técnica será obtido, processado e apresentado. Na presente invenção, o sistema de monitoramento se baseia em métodos eletroquímicos através de medidas de CDDF.

[08] O CDDF pode ser usado para medir eventos que resultam em mudanças na interface da solução ou nos materiais do eletrodo. Isso destaca o potencial da espectroscopia de capacitância derivada de impedância como um método executável

a partir do dispositivo da presente invenção para adquirir informações críticas sobre as propriedades elétricas de diferentes sistemas. Esta técnica oferece várias vantagens, incluindo sua simplicidade e a capacidade de detectar a amplificação do RNA em tempo real sem a necessidade de ciclagem de temperatura, facilidade operacional, baixo tempo de análise, possibilidade de miniaturização, fácil montagem e obtenção, apesar da necessidade de um potenciómetro para a aplicação de uma série de frequências de corrente senoidal aos eletrodos.

ESTADO DA TÉCNICA

[09] O pedido de patente WO2022032364A1 publicado em 17/02/2022, intitulado “DISPOSITIVO E MÉTODO DE ENSAIOS LAMP QUE PROMOVE A AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DE RNA/DNA APLICADA A IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS”, revela um dispositivo de ensaios LAMP que promove a amplificação isotérmica de RNA/DNA aplicada a identificação de patógenos, compreendendo: uma câmara de ensaios (1) LAMP; um gabinete (4) de eletrônica, um meio de alimentação de energia (7); e uma tampa superior (2) para fechar a câmara de ensaios (1) LAMP, em que internamente o dispositivo compreende: um termobloco (8) cilíndrico metálico compreendendo aberturas (80) para posicionar microtubos (81); uma placa de controle com processamento central (14); uma placa eletrônica de potência (13); pelo menos um elemento aquecedor (10) em contato com o termobloco (8) e adaptado para aquecer o termobloco (8) por indução; um sensor de temperatura (9) adaptado para medir a temperatura do termobloco (8); uma pluralidade de LEDs RGB (12) posicionados inferiormente ao termobloco (8) e adaptados para excitar cada microtubo posicionado no termobloco (8); e uma câmera (11) posicionada inferiormente ao termobloco (8) e adaptada para captar imagens de cada um dos microtubos (81) posicionados no termobloco (8). Em adição a invenção provê um método para de identificação de patógenos a partir de um dispositivo de ensaios LAMP.

[010] A técnica descrita no documento WO2022032364A1 se diferencia da presente invenção, pois aquela compreende métodos atuais para detectar a amplificação de RNA que dependem de sistemas de detecção óptica que medem as mudanças de fluorescência. Consequentemente, esses métodos não aplicam a

técnica de espectroscopia diferencial de capacidade no domínio da frequência (CDDF), que mede a interferência da interface eletrodo-eletrolito na onda senoidal de capacidade, diferencial da presente invenção.

[011] O pedido de patente WO2021144374A1 publicado em 22/07/2021, intitulado “DISPOSITIVO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM DNA ALVO E/OU PELO MENOS UM RNA ALVO EM UMA AMOSTRA, EM PARTICULAR EM UMA AMOSTRA LÍQUIDA”, refere-se a um dispositivo e um método para detectar a presença de pelo menos um DNA alvo e/ou pelo menos um RNA alvo em uma amostra, em particular em uma amostra líquida.

[012] Especificamente, WO2021144374A1 faz menção a reagentes que permitem realizar uma amplificação de RNA/DNA e eletrodos dispostos para estar em contato com a referida amostra, no entanto, o dispositivo proposto naquele documento não realiza a amplificação de RNA usando CDDF.

[013] A patente de invenção publicada em 10/01/2017, US9540683B2 intitulada “MATRIZ DE BIOSSENSORES FORMADA POR JUNÇÕES DE ELETRODOS FUNCIONALIZADOS”, descreve um dispositivo de matriz de sensores para a medição de misturas de compostos orgânicos compreendendo um conjunto de meios-elementos sensores que foram funcionalizados por meio de compostos sensores antes da montagem. Cada sensor individual da matriz contém dois compostos de sensor que são ligados em meio-elementos de sensor opostos. O reconhecimento molecular é bifuncional. Enquanto a quantidade de compostos do sensor aumenta linearmente, os sensores individuais aumentam com a segunda potência.

[014] Entretanto, no biosensor descrito em US9540683B2, a impedância ou capacidade é determinada por medições de ponto final ou usando medição em tempo real. Medições em tempo real são capazes de caracterizar o comportamento temporal das propriedades elétricas dos sensores durante as reações de reconhecimento molecular. O tempo real, portanto, permite acompanhar a cinética de hibridização e as taxas de amplificação durante a termociclagem, dependendo do tipo de experimento. A relação entre a concentração de DNA e a capacidade é determinada

por meio de uma curva de calibração. No entanto, o arranjo de sensor do US9540683B2 não soluciona o mesmo problema técnico que a presente invenção, pois está direcionado à configuração do dispositivo e o sistema de monitoramento também se difere, pois a presente invenção utiliza CDDF o que torna o sistema mais sensível à amplificação do RNA, não dependendo assim de funcionalização dos eletrodos tornando o método mais simples e prático, porém robusto o suficiente para detectar e quantificar essa amplificação.

[015] O pedido de patente US20190232282A1 publicado em 11/10/2022, intitulado “MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DETECTAR ANALITOS”, refere-se a sistemas, métodos e dispositivos para diagnóstico para detecção e/ou identificação de patógenos, materiais genômicos, proteínas e/ou outras pequenas moléculas ou biomarcadores. Em algumas implementações, um dispositivo pequeno e de baixo custo fornece detecção e identificação rápidas e robustas. Tal dispositivo pode utilizar microfluídica, bioquímica e eletrônica para detectar um ou mais alvos ao mesmo tempo no campo e mais perto ou no ponto de atendimento.

[016] Diferente da presente invenção, o US20190232282A1 se refere a um sistema e um método de detecção de um agente alvo, em que a reatância pode surgir do efeito da indutância no fluido de teste, da capacitância no fluido de teste ou ambos; este efeito pode fazer com que o fluido retenha a corrente temporariamente. Em uma modalidade é ignorada a capacitância parasita na análise. A capacitância é principalmente uma função da área do eletrodo, do dielétrico usado para a camada de passivação e da espessura da camada de passivação. Em outra modalidade, a constante de célula e a capacitância são estimadas e uma frequência de excitação é escolhida de forma que a condutividade correspondente à não linearidade na saída do detector seja um valor aproximado. Existe uma ferramenta no US20190232282A1 para estimar rapidamente a condutância e a capacitância da parede, viabilizando ignorar os efeitos da condutividade e capacitância da superfície, além dos efeitos dos campos marginais. No entanto, tal anterioridade não apresenta nenhuma característica técnica semelhante à presente invenção que utiliza espectroscopia de capacitância diferencial em um domínio da frequência.

[017] Traçando um comparativo com o estado da técnica, a presente invenção se difere do RT-LAMP convencional na forma da detecção, que é normalmente identificado pela mudança de coloração da reação. Já o pedido em tela se baseia em espectroscopia de impedância com a obtenção da CDDF o que torna o método qualitativo, ou seja, capaz de identificar e quantificar a presença do RNA alvo, tornando a presente invenção mais robusta e trazendo mais informações que o método tradicional colorimétrico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção propõe um método de detecção de amplificação sequencial de RNA por meio da CDDF compreendendo as etapas de: (1) preparar ensaios, que compreendem o preparo da solução que contém o RNA a ser amplificado e os reagentes necessários para a sua amplificação (Enzima Transcriptase reversa, BST-DNA polimerase, Primers e dNTPs), ou seja, nos quais o dispositivo (4) é submerso em uma solução; (2) aplicar uma série de frequências de corrente senoidal a eletrodos, gerando um conjunto de capacidades diferenciais em um eixo imaginário de um espectro C' versus C"; (3) realizar um processamento de dados através de um tratamento em um software de análise de dados, com uma diferença na CDDF realizando uma distinção entre amostras em que o RNA foi amplificado ou não. Em que na etapa (1) é usada uma enzima transcriptase reversa sintetizando uma cadeia de DNA complementar a partir do RNA, seguido pela adição de quatro primers específicos que reconhecem seis regiões diferentes de um DNA alvo. Ademais, na etapa (1), dois primers produzem primeiras sequências de DNA com estruturas em loop nas extremidades, por meio de: anelamento FIB (*forward inner primer*), BIP (*backward inner primer*), F3 e B3 guiando uma DNA polimerase, sendo que os primers F3 e B3 guiam a DNA polimerase e deslocam a fita; em que os ditos primers anelam-se novamente em regiões específicas de sequências de DNA em loop já produzidas anteriormente, de forma que os primers F3 e B3 já não são mais necessários, ocorrendo assim uma amplificação através da DNA polimerase. Em que durante um processo LAMP, uma enzima DNA polimerase é utilizada a uma temperatura constante de 65°C, permitindo que uma reação ocorra de forma

isotérmica e o RNA alvo seja amplificado. Além disso, na etapa (3) uma segunda derivada da capacidade imaginária representa uma variação da capacidade imaginária em relação a uma frequência angular, sendo que por meio da variação é feita análise da amplificação do RNA. Adicionalmente, na etapa (3) uma análise da derivada da capacidade imaginária indicando uma reação de amplificação no tempo, uma diferença entre amostras positivas e negativas para a presença do RNA viral tendo como exemplo uma diferença entre amostras positivas e negativas para um vírus. O método compreendendo ainda ser baseado em espectroscopia de impedância com a obtenção da CDDF, identificando e quantificando a presença do RNA alvo. Por fim, o método utiliza um potencial de espectroscopia de capacidade derivada de impedância adquirindo informações críticas sobre propriedades elétricas de diferentes sistemas, medindo assim eventos que resultam em mudanças na interface da solução ou nos materiais do eletrodo.

[019] Ademais, a presente invenção se refere a um dispositivo (4) para executar um método conforme definido anteriormente, composto por: dois eletrodos condutores de 0,05 cm² de área, espaçados por 1 mm; duas camadas de resina de nitrocelulose; duas camadas de fibra de carbono flexível; e uma camada de substrato de ABS. O qual é submerso em uma solução contendo reagentes necessários para uma amplificação do RNA medida por Loop.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[020] A presente invenção passará a ser descrita a seguir com referência às concretizações típicas da mesma e com referência às figuras apensas, nas quais:

[021] A figura 1 é uma representação de um fluxograma do método da presente invenção, compreendendo as etapas (1), (2) e (3), desde a preparação da análise até a obtenção dos resultados.

[022] A figura 2 é uma representação de um modelo 3D do dispositivo (4) da invenção, composto por resina de nitrocelulose, fibra de carbono flexível e ABS, de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[023] A figura 3 é uma representação de vistas em perspectiva do dispositivo (4) da invenção composto por duas camadas de resina de nitrocelulose, duas

camadas de fibra de carbono flexível e uma camada de substrato de ABS, de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[024] A figura 4 é uma representação do dispositivo (4) em aplicação e os respectivos constituintes da solução para a amplificação do RNA, de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[025] A figura 5 é uma representação do dispositivo (4) da invenção imerso na solução para reação de RT-LAMP, de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[026] A figura 6 é uma representação de espectros de capacitância obtidos por meio de medidas eletroquímica em um potenciómetro convencional, de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[027] A figura 7 é uma representação de um diagrama “ombro” (C) que se refere ao intervalo de frequência onde ocorre o fenômeno monitorado e um diagrama de segunda derivada de C’ (D), de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[028] A figura 8 é uma representação de um gráfico A de estudo de tempo de reação de amplificação do material genético e um gráfico B da diferença entre amostras positivas (que contém o RNA para ser amplificado) e negativas (que não possuem o RNA), de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[029] A figura 9 é uma representação de um diagrama ombro (DO) após a amplificação sequencial de RNA utilizando capacitância diferencial no domínio da frequência (CDDF), de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

[030] A figura 10 é uma representação do dispositivo (4) da invenção, de acordo com uma concretização preferencial da presente invenção.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[031] Modalidades específicas da presente divulgação são descritas abaixo. Em um esforço para fornecer uma descrição concisa dessas modalidades, alguns

recursos de uma implementação real do método e dispositivo (4) da presente invenção serão descritos a seguir.

[032] Inicialmente, para aplicação do método para detectar a amplificação de RNA em condição isotérmica mediada por loop (LAMP) usando espectroscopia de capacidade diferencial no domínio da frequência (CDDF), uma série de ondas de corrente senoidal em baixas frequências é aplicada a um dispositivo (4) com dois eletrodos condutores de tamanho $0,05\text{ cm}^2$ e espaçados de 1 mm, como pode ser observado nas Figuras 2, 3 e 10. Isso produz um conjunto de capacidades diferenciais no eixo imaginário de um espectro. Os espectros diferenciais são utilizados para monitorar a amplificação de RNA em tempo real e diferenciar várias cópias de uma única sequência de RNA em circunstâncias isotérmicas.

[033] Em outras palavras, o método da presente invenção, usa o dispositivo (4) para selecionar frequências que geram um diagrama diferencial dC" que reflete em cada frequência a variação diferencial de capacidade, que muda em função do tempo. O dispositivo (4) é imerso em uma solução do tipo LAMP, que permite gerar múltiplas cópias de um trecho específico de RNA em condições isotérmicas. O método de detecção de replicação da invenção é sensível, específico e simples, e pode ser amplamente utilizado em várias aplicações, incluindo diagnóstico de doenças infecciosas, detecção de patógenos e monitoramento ambiental. Além disso, a CDDF pode ser realizada em equipamentos simples, como banhos termostáticos, e os resultados podem ser obtidos em tempo real através do diagrama diferencial dC". O método utiliza uma enzima transcriptase reversa para sintetizar uma cadeia complementar de DNA a partir do RNA, e quatro primers específicos são adicionados à mistura de reação para iniciar a amplificação de múltiplas cópias do DNA-alvo através de um mecanismo de amplificação em *loop*, no qual as regiões alvo são amplificadas em sucessivas rodadas de amplificação, formando estruturas de DNA em forma de ampola. Especificamente, dois primers são responsáveis por produzir as primeiras sequências de DNA com as estruturas em loop nas extremidades. Isso ocorre por meio do anelamento FIB (*forward inner primer*), BIP (*backward inner primer*), F3 e B3 que vão guiar a DNA polimerase. Como não há etapa de

desnaturação da fita de DNA a 95°C, como ocorre na PCR, os primers F3 e B3 fazem esse papel guiando a DNA polimerase que também tem a atividade de deslocamento de fita. Os primers anelam-se novamente nas regiões específicas das sequências de DNA em loop já produzidas anteriormente. Aqui, os primers F3 e B3 já não são mais necessários. E assim ocorre a amplificação através da DNA polimerase.

[034] Em outros termos, o método é baseado na seleção de frequências de onda senoidal de corrente em dois eletrodos condutores, como visto nas Figuras 2 e 3. As frequências selecionadas geram um conjunto de capacitâncias no eixo imaginário em um diagrama C' versus C''. Um algoritmo aplica a primeira derivada para cada frequência selecionada, gerando um diagrama diferencial dC''. Este diagrama reflete em cada frequência a variação diferencial de capacitância, que muda em função do tempo, ou seja, $dC''=dC''(t)$. Esta operação resulta em um diagrama, que devido ao seu formato denominou-se Diagrama Ombro (DO), como visto na Figura 8.

[035] Especificamente, o método da presente invenção executa três etapas para a utilização do CDDF, conforme observado na Figura 1. Na etapa (1), preparar os ensaios, que compreendem o preparo da solução que contém o RNA a ser amplificado e os reagentes necessários para a sua amplificação (Enzima Transcriptase reversa, BST-DNA polimerase, Primers e dNTPs) nos quais o dispositivo (4) é submerso nessa solução e essa solução é então submetida a temperatura de 65°C de forma isotérmica, ou seja, na qual o dispositivo (4) é submerso em uma solução contendo os reagentes necessários para a amplificação do RNA medida por Loop, como observado na Figura 5. A etapa (1) envolve o uso da enzima transcriptase reversa para sintetizar uma cadeia de DNA complementar a partir do RNA, seguido pela adição de quatro primers específicos que reconhecem seis regiões diferentes do DNA alvo. Durante o processo LAMP, a enzima DNA polimerase é utilizada a uma temperatura constante de 65°C, permitindo que a reação ocorra de forma isotérmica e o RNA seja amplificado

[036] Em seguida, na etapa (2) ocorre a aplicação de uma série de frequências de corrente senoidal aos eletrodos, o que gera um conjunto de capacitâncias

diferenciais no eixo imaginário de um espectro C' versus C'' . Em que na etapa (1) é usada enzima transcriptase reversa a qual sintetiza uma cadeia de DNA complementar a partir do RNA, seguido pela adição de quatro primers específicos que reconhecem seis regiões diferentes do DNA alvo. De forma que, durante o processo LAMP, a enzima DNA polimerase é utilizada a uma temperatura constante de 65°C, permitindo que a reação ocorra de forma isotérmica e o RNA seja amplificado. Na etapa (2) uma segunda derivada da capacitância imaginária representa uma variação da capacitância imaginária em relação à frequência angular, em que por meio da variação se analisa como a impedância capacitativa muda com a frequência angular. Ademais, na etapa (2) a análise da derivada da capacitância imaginária indica como ocorre a reação de amplificação no tempo, bem como a diferença entre amostras positivas e negativas para a presença do RNA viral tendo como exemplo a diferença entre amostras positivas e negativas para um vírus.

[037] Posteriormente, na etapa (3), é realizado o processamento dos dados e é feita a distinção entre as amostras que o RNA foi amplificado ou não. Para esse fim, a etapa (3) envolve a análise dos resultados através do diagrama de capacitância convencional, na qual o eixo horizontal representa a capacitância (C') e o eixo vertical representa a capacitância imaginária (C''). O diagrama C' versus C'' . A relação entre capacitância (C), capacitância imaginária (C'') e frequência (f) pode ser descrita pela equação (1) abaixo. Utilizando a primeira derivada em cada frequência selecionada, um diagrama diferencial dC' versus C'' é obtido o que resulta em um diagrama de ombro, visto na Figura 6.

$$C = C' - jC'' \quad (1)$$

onde "j" = unidade imaginária, a raiz quadrada de -1;

$Z_C = -j/(ω C)$ = impedância capacitativa, que pode ser expressa em termos de capacitância C e frequência angular $ω$.

[038] A segunda derivada da capacitância imaginária (vide Figura 6), representa a variação da capacitância imaginária em relação à frequência angular. Essa variação é usada para analisar como a impedância capacitativa muda com a frequência angular. Em termos práticos, a análise da derivada da capacitância

imaginária indica como ocorre a reação de amplificação no tempo (vide gráfico A da Figura 8), bem como a diferença entre amostras positivas e negativas para a presença do RNA viral tendo como exemplo a diferença entre amostras positivas e negativas para o vírus SARS-CoV-2 (vide gráfico B da Figura 8).

[039] Observou-se que a derivada é diretamente proporcional a $1/w^2$, o que significa que quanto maior a frequência angular, menor será a variação da impedância capacitiva. Isso ocorre porque a impedância capacitiva é inversamente proporcional à frequência angular, ou seja, ela diminui à medida que a frequência aumenta.

[040] Consequentemente, a amplificação da etapa (3) pode ser visualizada em tempo real através do DO, devido à $dC''=dC''(t)$. O método de detecção de replicação da invenção apresenta várias vantagens em relação à PCR convencional, incluindo a sua sensibilidade, especificidade e simplicidade.

Exemplo de concretização/ Testes/ Resultados

[041] A presente invenção é uma tecnologia simples e eficiente para a substituição dos métodos convencionais de detecção de amplificação de RNA. Para validação da invenção, um estudo foi conduzido em amostras de pacientes infectados por COVID-19, na qual foi demonstrado o seu potencial para a identificação rápida e precisa de infecções virais. Nesse estudo, amostras positivas (que continham o material genético do vírus) e negativas (que não continham) foram submetidas a aplicação de uma série de frequências de corrente senoidal aos eletrodos, o que gera um conjunto de capacitâncias diferenciais no eixo imaginário de um espectro C' versus C.

[042] Na análise do resultado do estudo conduzido, constatou-se que a derivada da capacitância imaginária representa a variação da capacitância imaginária em relação à frequência angular. Essa variação pode ser usada para analisar como a impedância capacitativa muda com a frequência angular. Em outras palavras, a derivada da capacitância imaginária é uma medida da taxa de mudança da impedância capacitativa com a frequência angular. Em termos práticos, a análise da derivada da capacitância imaginária pode ajudar a identificar as condições ideais de amplificação sequencial de RNA usando Capacitância Diferencial no Domínio da

Frequência (CDDF). Como visto na Figura 8, a CDDF se mostrou uma ferramenta promissora na detecção do vírus da COVID-19 em amostras de saliva. Demonstramos que a CDDF conseguiu diferenciar amostras de saliva de pacientes com COVID-19 (DO, vide Figura 9, positivo) das amostras de indivíduos saudáveis (DO, vide Figura 9, positivo). A CDDF resultou em diferentes digramas ombro para amostra de saliva. De forma que, as amostras de saliva de pacientes com COVID-19 apresentaram um padrão de derivada de capacidade.

[043] Ao diferenciar com precisão várias cópias de uma única sequência de RNA, a invenção oferece uma ferramenta valiosa na luta contra doenças infecciosas. Além disso, sua simplicidade a torna adequada para ampla implementação na saúde pública, uma vez que o diagrama resultado da execução do método da invenção permitiu diferenciar à amplificação de RNA, ou seja, múltiplas cópias de um trecho específico de RNA em condições isotérmicas, sem a necessidade de ciclos de temperatura como na técnica de PCR convencional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[044] AUGUSTINE, Robin et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. **Biology**, v. 9, n. 8, p. 182, 2020.

[045] Orazem, MarkE., and Tribollet, Bernard. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**. Alemanha, Wiley, 2011.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de detecção de amplificação sequencial de RNA por meio da CDDF **caracterizado** por compreender as etapas de:

(1) preparar ensaios compreendendo uma solução com um RNA a ser amplificado e reagentes para a sua amplificação, tal como enzima transcriptase reversa, BST-DNA polimerase, primers e dNTPs, nos quais um dispositivo (4) é submerso na dita solução e a dita solução é então submetida a uma temperatura de 65°C de forma isotérmica;

(2) aplicar uma série de frequências de corrente senoidal a eletrodos, gerando um conjunto de capacidades diferenciais em um eixo imaginário de um espectro C' versus C"; e

(3) realizar um processamento de dados através de um tratamento em um conjunto de instruções de análise de dados, com uma diferença na CDDF realizando uma distinção entre amostras que o RNA foi amplificado ou não.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa (1) é usada uma enzima transcriptase reversa sintetizando uma cadeia de DNA complementar a partir do RNA, seguido pela adição de quatro primers específicos que reconhecem seis regiões diferentes de um DNA alvo.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que na etapa (1), dois primers produzem primeiras sequências de DNA com estruturas em loop nas extremidades, por meio de:

anelamento FIB (*forward inner primer*), BIP (*backward inner primer*), F3 e B3 guiando uma DNA polimerase, sendo que os primers F3 e B3 guiam a DNA polimerase e deslocam a fita;

em que os ditos primers anelam-se novamente em regiões específicas de sequências de DNA em loop já produzidas anteriormente, de forma que os primers F3 e B3 já não são mais necessários.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que durante um processo LAMP, uma enzima DNA polimerase é utilizada a uma

temperatura constante de 65°C, permitindo que uma reação ocorra de forma isotérmica e o RNA alvo seja amplificado.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (3) uma segunda derivada da capacidade imaginária representa uma variação da capacidade imaginária em relação a uma frequência angular, sendo que por meio da variação é feita análise da amplificação do RNA.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que na etapa (3) uma análise da derivada da capacidade imaginária indica uma reação de amplificação no tempo, uma diferença entre amostras positivas e negativas para a presença do RNA viral.

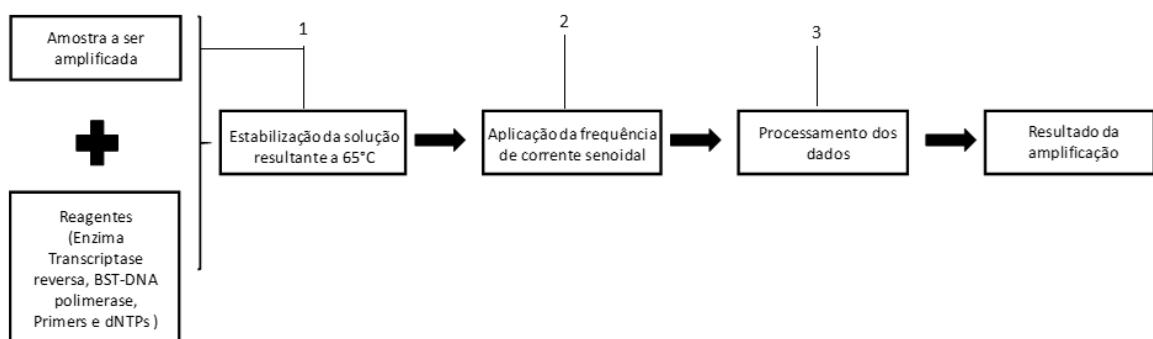
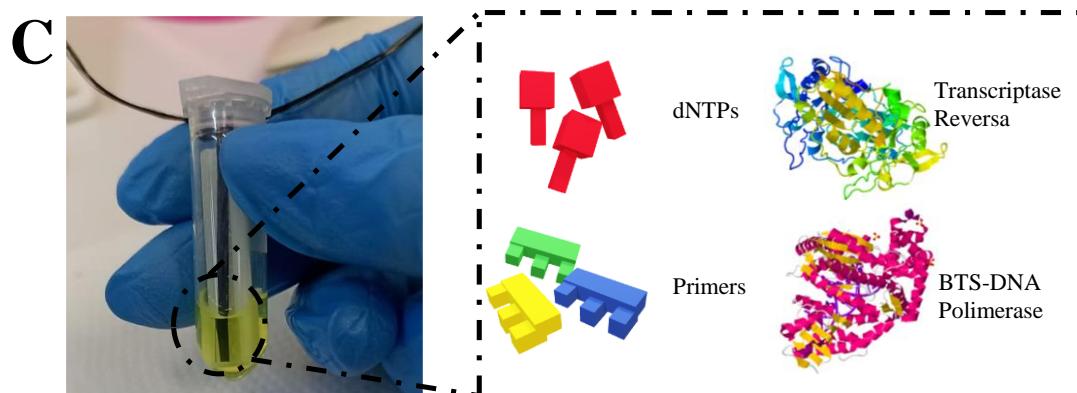
7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser baseado em espectroscopia de impedância com a obtenção da CDDF, identificando e quantificando a presença do RNA alvo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que utiliza um potencial de espectroscopia de capacidade derivada de impedância adquirindo informações críticas sobre propriedades elétricas de diferentes sistemas, medindo assim eventos que resultam em mudanças na interface da solução ou nos materiais do eletrodo.

9. Dispositivo (4) para executar um método conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é composto por:

dois eletrodos condutores de 0,05 cm² de área, espaçados por 1 mm;
duas camadas de resina de nitrocelulose (1);
duas camadas de fibra de carbono flexível (2); e
uma camada de substrato de ABS (3).

10. Dispositivo (4), de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que é submerso em uma solução contendo reagentes necessários para uma amplificação do RNA medida por Loop.

**Figura 1****Figura 2**

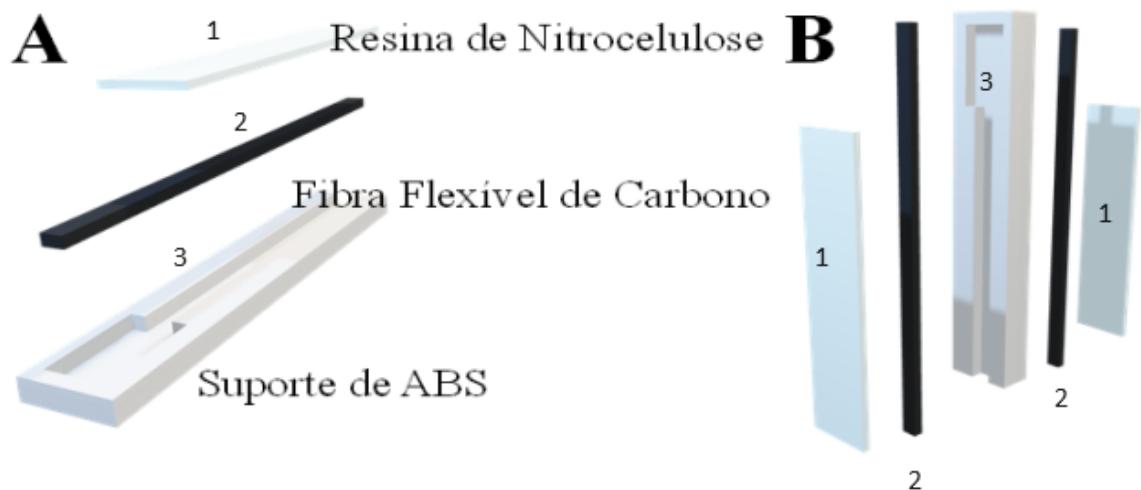


Figura 3

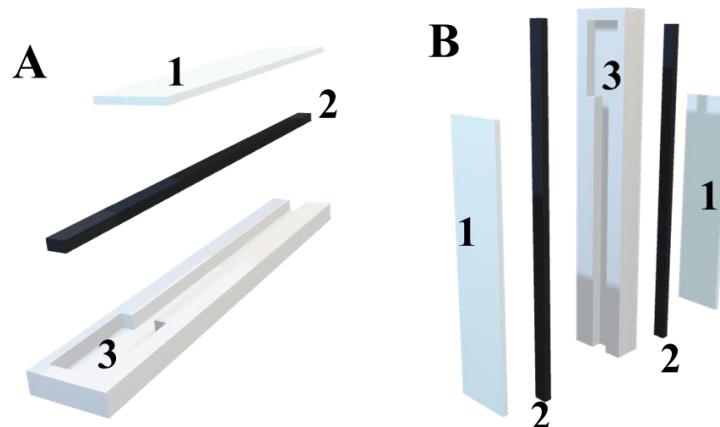


Figura 4

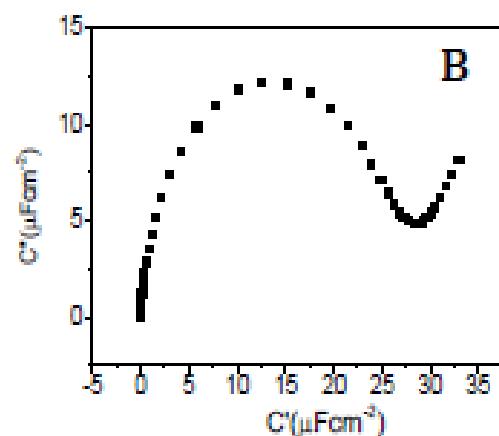


Figura 5

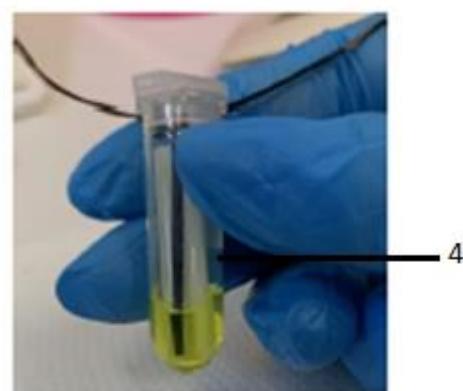
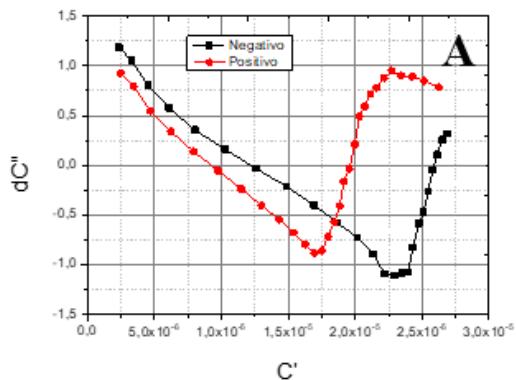
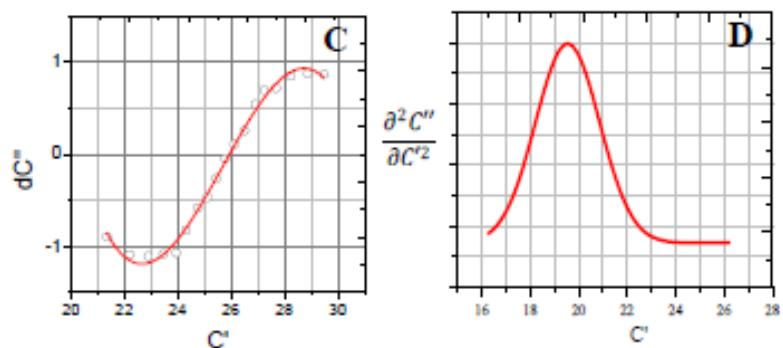


Figura 6

**Figura 7****Figura 8**

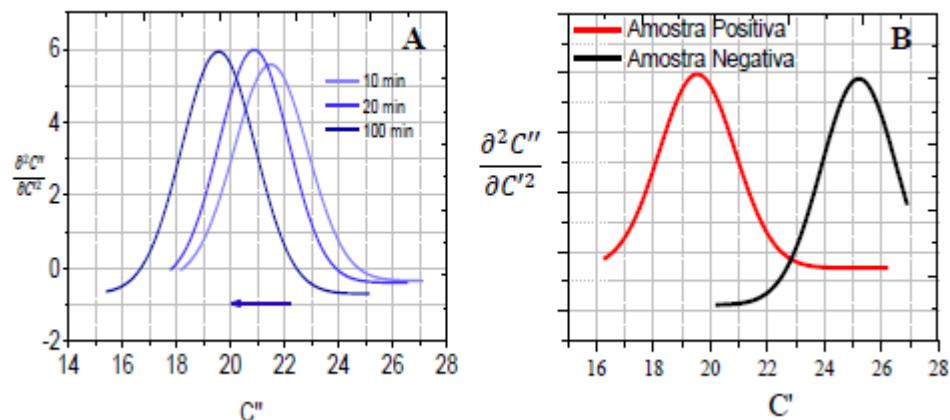


Figura 9

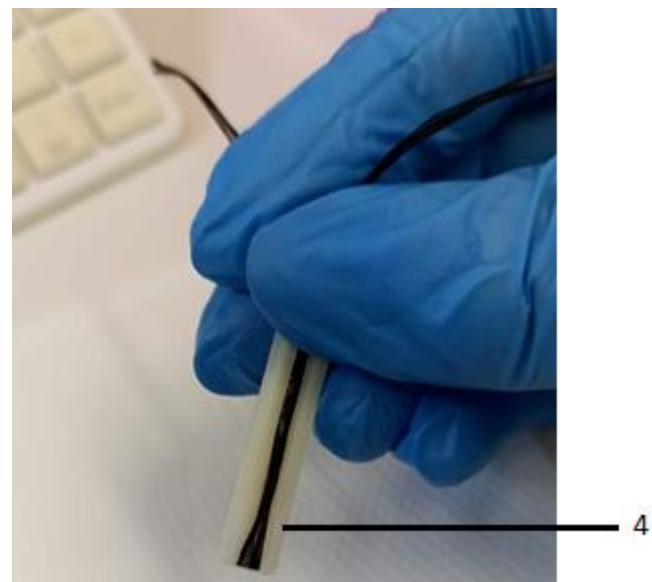


Figura 10

RESUMO**MÉTODO E DISPOSITIVO DE DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO SEQUENCIAL DE RNA UTILIZANDO CAPACITÂNCIA DIFERENCIAL NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA**

A presente invenção se refere a um método para detectar amplificação sequencial de RNA utilizando Capacitância Diferencial no Domínio de Frequência (CDDF). O método emprega um dispositivo com dois eletrodos condutores separados para selecionar frequências que criam um diagrama diferencial que representa a variação da capacitância diferencial em função do tempo em cada frequência. O método de detecção de replicação é sensível, específico e direta, e tem uma ampla gama de aplicações, incluindo doenças infecciosas diagnósticos, identificação de patógenos e monitoramento ambiental. Especificamente, uma enzima transcriptase reversa é usada para sintetizar uma fita complementar de DNA a partir do RNA, e quatro primers específicos são adicionados à mistura de reação para iniciar a amplificação de cópias repetidas do DNA alvo por meio de um mecanismo de amplificação de loop, no qual as regiões alvo são amplificadas em rodadas sucessivas de amplificação, resultando em estruturas de DNA em forma de funil.