



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 016038 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO DE DETECÇÃO DE DOENÇA VIRAL E KIT DIAGNÓSTICO

Resumo: A presente invenção faz referência a um método de detecção de doença viral, especificamente do vírus da dengue usando nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com anticorpos. O método proposto é baseado em ressonância plasmática de superfície localizada (LSPR) para a detecção rápida e sensível do vírus ou proteínas virais da dengue através da ligação antígeno-anticorpo. A presente invenção ainda prevê um kit diagnóstico para a detecção rápida e sensível da doença, em que a ligação em tempo real do antígeno ao conjugado anticorpo - nanopartículas de ouro permite uma análise instantânea da amostra de interesse e proporciona uma resposta em menos de 3 minutos.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2

Nome: VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA

CPF: 02248923473

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rod. Domingos Sartori Km 1,4

Cidade: Botucatu

Estado: SP

CEP: 18607-621

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 2 de 2

Nome: CAROLINE RODRIGUES BASSO

CPF: 38166963841

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua José Simões, 213 - Jardim Reflorenda

Cidade: Botucatu

Estado: SP

CEP: 18605-315

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU 3 DEPÓSITO 492358.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	FUNDUNESP GRU DEPÓSITO 3.pdf
Procuração	Procuração RPA 2018-07-23.pdf
Documento de Cessão	Termo de Cessão de direitos.pdf
Declaração Negativa CGEN	Declaração Negativa Cgen.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6

DETALHE DO COMPROMISSO

Convênio: 0033-0239-004900019792 **Conta de Débito:** 0239-000430023105

Tipo de Pagamento: BLQ Outros

Código de Barras: 00190000090294091618806492538175175990000007000

No. compromisso banco: 1028079000200004 **No. compromisso cliente:** 492538/DS1 1011

Nome/Razão Social do Beneficiário Original: 000009853INPI - INST. NACIONAL

Nome/Razão Social do Pagador Efetivo: FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENT

CPF/CNPJ do Pagador Efetivo: 57.394.652/0001-75

Valor Nominal: 70,00

Desc./Abat.: 0,00 **Juros:** 0,00

Data de Vencimento: 25/07/2018

Data de Pagamento: 25/07/2018

Situação: Efetivado

No. Lista de Débito: **No. Protocolo:** PGTFORN25072018900130268

Autenticação: 11CBC4EB99B5A1A15D22D72

Valor a Pagar: 70,00[retornar](#)**Central de Atendimento
Santander Empresarial**4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)**SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322**[imprimir](#)

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

Recibo do Pagador

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 06492.538175 1 75990000007000

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215, SAO PAULO -SP CEP:01049010

Sacador/Avalista
Nosso-Número 29409161806492538 Nr. Documento 29409161806492538 Data de Vencimento 28/07/2018 Valor do Documento 70,00 (=) Valor Pago

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37
PRACA MAUA 7 - 14 ANDAR - SALA 1415 , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20081240

Agência/Código do Beneficiário 2234-9 / 333028-1 Autenticação Mecânica

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 06492.538175 1 75990000007000

Local de Pagamento **PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO** Data de Vencimento 28/07/2018

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37 Agência/Código do Beneficiário 2234-9 / 333028-1

Data do Documento 29/06/2018 Nr. Documento 29409161806492538 Espécie DOC DS Aceite N Data do Processamento 29/06/2018 Nosso-Número 29409161806492538

Uso do Banco 29409161806492538 Carteira 17 Espécie R\$ Quantidade xValor (=) Valor do Documento 70,00

Informações de Responsabilidade do Beneficiário
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n o campo Número de Referência na emissão do pagamento.
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

(-) Desconto/Abatimento
(+) Juros/Multa
(=) Valor Cobrado

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215,
SAO PAULO-SP CEP:01049010

Código de Baixa Autenticação Mecânica - Ficha de Compensação

Sacador/Avalista



Ofício nº 203/2018 AUIN

São Paulo, 16 de julho de 2018.

**Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini
Reitor
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP**

Assunto: Designação de procurador junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI

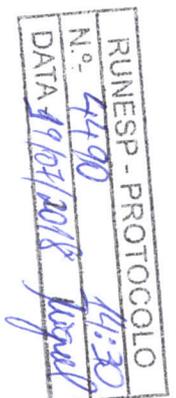
Ilustríssimo Senhor Reitor,

1. A Agência Unesp de Inovação – AUIN, por meio de sua Gerência de Propriedade Intelectual, realiza junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e outras instituições competentes o requerimento e acompanhamento dos direitos de propriedade intelectual de invenções de titularidade da UNESP.
2. Para tal, faz-se necessária a outorga dos poderes da UNESP, como titular dos direitos de propriedade intelectual de suas invenções, para um procurador que a represente legalmente junto ao INPI.
3. Isto posto, vimos por meio deste solicitar a designação do Gerente de Propriedade Intelectual, Renan Padron Almeida, como procurador da UNESP junto ao INPI, mediante assinatura da Procuração anexa a este ofício.
4. Sem mais para o momento, aproveitamos a oportunidade para manifestar a Vossa Senhoria protestos de consideração e apreço.

Respeitosamente,


Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti
Diretor Executivo
Agência Unesp de Inovação

Agência UNESP de Inovação
Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro
CEP: 01049-010, São Paulo - Estado de São Paulo - Brasil
Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br



PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de

invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP. 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

São Paulo, 16 de julho de 2018.



Srg Roberto Nobre

UNESP

pl Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

9.º TABELIÃO DE NOTAS
Rua Marconi, 12 - 1.º ao 6.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3258-2611 - Fax: (11) 2174-6858
www.nopocartorio.com.br

Reconheço a 1 firma com valor econômico por semelhança de SERGIO ROBERTO NOBRE, do que dou fé.

Em tesº da verdade. ANDREI BARRETO DA SILVA -
São Paulo/Capital, 24 de julho de 2018. Valor recebido R\$ 9,25
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba



TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA**, brasileiro, solteiro, professor, inscrito no CPF/MF sob o nº 022.489.234-73, portador do documento de identidade RG nº 1.008.979, SSP/SP, residente em Botucatu (SP), na Rod. Domingos Sartori Km 1,4, CEP 18.607.621; 2. **CAROLINE RODRIGUES BASSO**, brasileira, solteira, aluna, inscrito no CPF/MF sob o nº 381.669.638-41, portador do documento de identidade RG nº 46.223.769-2, SSP/SP, residente em Botucatu (SP), na Rua José Simões, 213, Jardim Reflorenda, CEP 18.605.315.

Cessionária: **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado "**MÉTODO DE DETECÇÃO DE DOENÇA VIRAL E KIT DIAGNÓSTICO**" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

Jaboticabal, 28 de junho de 2018.

Cedentes:


VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA


CAROLINE RODRIGUES BASSO

Cessionária:


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

SANDRO ROBERTO VALENTINI
REITOR

Testemunhas:


1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55


2. Sabrina Paduan
CPF/MF: 389.723.218-93

17ºAUI081

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: MÉTODO DE DETECÇÃO DE DOENÇA VIRAL E KIT DIAGNÓSTICO
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventores: VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA e CAROLINE RODRIGUES BASSO

Nós, inventores abaixo assinados, declaramos que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Botucatu, 28 de junho de 2018.


VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA


CAROLINE RODRIGUES BASSO

MÉTODO DE DETECÇÃO DE DOENÇA VIRAL E KIT DIAGNÓSTICO**Campo da invenção:**

[1] A presente invenção se aplica no campo da saúde humana, de forma mais específica na área de diagnóstico de doenças virais, e faz referência a um método de detecção de doença viral, especificamente do vírus da dengue, usando nanopartículas de ouro modificadas com anticorpos.

[2] O método proposto é baseado em ressonância plasmática de superfície localizada (LSPR) para a detecção rápida e sensível do vírus ou proteínas virais da dengue (quatro sorotipos) através da ligação antígeno - anticorpo.

Fundamentos da invenção:

[3] A dengue é uma doença viral infecciosa causada por um dos quatro sorotipos distintos DENV 1, 2, 3 ou 4. Este é um flavivírus (família de *Flaviviridae*) transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos fêmeas da espécie *Aedes Aegypti* e, em menor frequência, da espécie *Aedes Albopictus*.

[4] Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que a dengue continua sendo um grande problema de saúde nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

[5] O vírus da dengue causa febre alta (40°C), dores de cabeça severas, dores nos olhos, dores musculares e articulares, náuseas, vômitos, inchaço das glândulas ou erupções cutâneas que podem evoluir para casos mais graves, como a febre hemorrágica da dengue (DHF) e síndrome de choque de dengue (DSS). Estes sintomas são relatados cerca de 10 dias após a inoculação do vírus no ser humano (o período de incubação do vírus no hospedeiro varia de 4 a 10 dias).

[6] Após a infecção com um sorotipo específico da doença, o doente torna-se imune ao referido sorotipo, porém não aos outros 3 tipos. Quando a reinfecção ocorre com uma estirpe diferente, os sintomas da doença são potencialmente agravados porque os anticorpos da primeira infecção podem ligar-se ao vírus sem os neutralizarem.

[7] O diagnóstico da dengue é feito, principalmente, por sinais clínicos apresentados pelo paciente, seguido de testes laboratoriais como as imunoglobulinas M e G (IgM e IgG), reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e detecção da proteína não estrutural 1 (NS1). No entanto, cada um destes testes possui suas limitações, como falta de especificidade e sensibilidade.

[8] Dentre as desvantagens, as técnicas citadas não são suficientemente específicas e sensíveis para serem utilizadas como um instrumento de diagnóstico isolado, exigindo exames complementares e tempo para obtenção dos resultados, incluindo alto custo. A infecciosidade humana e seu diagnóstico podem ser influenciados também pela presença de outros arbovírus co-circulantes, principalmente o vírus zika.

[9] Nos últimos anos, as nanopartículas metálicas têm sido amplamente utilizadas no diagnóstico de doenças relacionadas a humanos utilizando biossensores.

[10] Particularmente, os biossensores que compreendem nanopartículas de ouro têm atraído muita atenção e têm sido amplamente utilizados para aparelhos de diagnóstico devido à sua facilidade de síntese, baixo custo, simplicidade, praticidade, tamanho, forma, propriedades ópticas e

funcionalidade da sua superfície com os mais diferentes ligandos (sejam eles anticorpos, enzimas, aptâmeros ou ácidos nucleicos, dentre outros).

[11] O uso de nanopartículas de ouro na produção de imunoenaios difere de outros materiais devido sua alta sensibilidade e oscilação coletiva dos elétrons condutores dos átomos de ouro, chamada de ressonância de plasmônica de superfície localizada (LSPR).

[12] A LSPR é formada por duas bandas de absorção de plasma. A primeira refere-se à banda de plasma longitudinal (PL), responsável pela dispersão e absorção da luz ao longo do eixo longo da partícula, relacionando a região visível à região próxima ao espectro eletromagnético. A segunda banda corresponde ao plasma transversal (PT), responsável pela dispersão e absorção da luz ao longo do eixo curto da partícula, no qual, normalmente, as nanopartículas de ouro na região visível do espectro eletromagnético mostram uma absorção máxima em cerca de 520 nm.

[13] A solução de nanopartículas de ouro apresenta uma cor vermelha intensa quando dispersa, por causa da absorção no verde. Após a bioconjugação, a faixa de extinção se altera a vermelho, produzindo uma solução azul/púrpura, devido à formação de agregados.

[14] A alteração visual na cor vem sendo utilizada no desenvolvimento de vários biossensores colorimétricos para detecção de doenças como Alzheimer, *Mycoplasma pneumonia*, bacteriófagos, detecção de antígeno específico da próstata (PSA), proteína associada ao HIV, *E. coli* e salmonela, vírus da gripe, detecção de analitos de ácidos nucleicos

para moléculas pequenas, atividade da nuclease, imunoglobulinas e DNA.

[15] A detecção destas doenças também pode ser realizada utilizando uma solução de nanopartículas de ouro em medidas quantitativas com um espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-Vis), gerando maior sensibilidade e limites de detecção mais baixos (LOD).

[16] Portanto, ao contrário dos métodos convencionais já citados para a detecção da dengue, a presente invenção se refere a um método de detecção de doenças virais usando nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com anticorpos, mais especificamente, um método colorimétrico para a detecção rápida e sensível dos quatro sorotipos da dengue (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4).

[17] O referido método utiliza a ligação em tempo real do antígeno ao conjugado formado pelo anticorpo e pelas nanopartículas de ouro, com sensibilidade e especificidade comparadas àquelas observadas em técnicas mais modernas, como RT-qPCR.

[18] A invenção ainda prevê um kit diagnóstico, o qual compreende a referida nanopartícula de ouro, que permite uma análise instantânea da amostra de interesse e proporciona uma resposta em menos de 3 minutos.

Estado da técnica:

[19] Alguns documentos do estado da técnica descrevem um método para detecção de doenças virais.

[20] Os documentos CN 205679623, CN 202886382 e CN 101726593 A descrevem métodos e kits para detecção rápida do vírus da dengue, por meio de teste em fita de papel contendo antígenos do vírus.

[21] No documento US 2017/166890, são descritos compostos conjugados de DNazymes e nanopartículas de ouro com capacidade de detecção de ácidos nucleicos, bem como procedimentos para obtenção e uso destes compostos para detecção de material genético de agentes infecciosos, como vírus da dengue e chikungunya.

[22] Em CN 106771123, faz-se referência a um método de detecção de antígenos do vírus da dengue por testes imunológicos e utilização de anticorpos e partículas de ouro e TW 200519371 descreve-se um imunossensor com eletrodo de ouro para detecção de anticorpos contra o vírus da dengue (e não o vírus em si).

[23] Diferentemente, a presente invenção se refere a um método colorimétrico de detecção de doenças virais, mais especificamente, do vírus da dengue, em que o referido método utiliza nanopartículas de ouro modificadas com anticorpos contra o vírus de interesse.

[24] Uma das vantagens desta técnica em relação às técnicas já existentes está no fato de que esta se baseia em análise colorimétrica utilizando nanopartículas de ouro, que têm características únicas em comparação com outros materiais, tais como boa biocompatibilidade e fácil conjugação a proteínas.

[25] Deste modo, nenhum dos documentos do estado da técnica descreve um método de detecção de doenças virais e kit tal como aqui proposto.

Breve descrição da invenção:

[26] Esta invenção faz referência a um método de detecção de doença viral, especificamente do vírus da dengue usando nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com

anticorpos.

[27] O método proposto é baseado em ressonância plasmática de superfície localizada (LSPR) para a detecção rápida e sensível do vírus ou proteínas virais da dengue através da ligação antígeno - anticorpo.

[28] A presente invenção ainda prevê um kit diagnóstico para a detecção rápida e sensível da doença, em que a ligação em tempo real do antígeno ao conjugado anticorpo - nanopartículas de ouro permite uma análise instantânea da amostra de interesse e proporciona uma resposta em menos de 3 minutos.

Breve descrição das figuras:

[29] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[30] A Figura 1 representa graficamente as etapas de modificações na superfície das nanopartículas de ouro pelo espectro de UV-Vis até a detecção do vírus da dengue utilizando a técnica de LSPR.

[31] A Figura 2 representa graficamente o teste com o vírus interferente (zika vírus) com o objetivo de comprovar a especificidade da metodologia.

[32] A Figura 3 representa graficamente a sensibilidade da metodologia na detecção do vírus da dengue em diferentes diluições.

Descrição detalhada da invenção:

[33] A presente invenção se refere a um método de detecção rápida e sensível do vírus ou proteínas virais através da ligação antígeno - anticorpo. O referido método faz uso da técnica de ressonância plasmática de superfície

localizada (LSPR).

[34] O método proposto utiliza nanopartículas de ouro modificadas com anticorpos, também objeto da presente invenção.

[35] Em uma modalidade preferida da invenção, o método detecta a presença do vírus da dengue. No entanto, esta tecnologia pode detectar qualquer doença virótica, desde que o anticorpo utilizado esteja de acordo com a doença virótica investigada.

[36] O método de detecção da invenção compreende as etapas de:

- a) Obtenção de nanopartículas de ouro;
- b) Obtenção da solução de MUA;
- c) Obtenção da solução de EDC/NHS;
- d) Adição do anticorpo monoclonal específico para a doença investigada.

[37] As etapas do método aqui proposto estão mais bem detalhadas a seguir.

A) Obtenção de nanopartículas de ouro:

[38] Na etapa "a", prepara-se uma solução de sal de ouro de 0,001 a 0,10g, preferencialmente 0,004g de HAuCl_4 em 1 a 1000mL, preferencialmente 10 mL de água.

[39] Logo após, prepara-se uma solução de 0,01 a 1,0g, preferencialmente 0,1 g de citrato de sódio dihidratado em 1 a 1000mL, preferencialmente 10 mL de água.

[40] Subsequentemente, 0,1 a 100mL, preferencialmente 10 mL da solução de sal de ouro é colocada em um recipiente sob agitação em que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm, a temperatura que varia de 10 a 500°C, preferencialmente 270°C, durante o período que varia

de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos. Desse modo, adiciona-se de 0,1 a 100mL, preferencialmente 2 mL da solução de citrato de sódio dihidratado, sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm e sob aquecimento que varia de 100 a 1000°C, preferencialmente 270 °C, até a mudança de cor da solução para o vermelho.

[41] Assim, a solução de nanopartículas de ouro obtida na etapa "a" é resfriada a temperatura ambiente sob abrigo de luz e armazenada em geladeira a 5 °C.

[42] Vale ressaltar que a etapa "a" é realizada para modificar as nanopartículas de ouro através da deposição de monocamadas auto-organizadas (SAM) utilizando alcanotióis.

B) Obtenção da solução de MUA:

[43] Na etapa "b", prepara-se uma solução de 1,0 mol L⁻¹ de ácido 11-mercaptoundecánoico (MUA) em etanol.

[44] Em seguida, mistura-se de 0,05 a 2000 µL, preferencialmente 10 µL da solução de MUA obtida, em 0,05 a 200 mL, preferencialmente em 4,00 mL de etanol, resultando, assim, na solução final a ser utilizada na próxima etapa.

C) Obtenção da solução de EDC/NHS:

[45] Na etapa "c", para a obtenção da solução, adiciona-se de 0,05 a 2000 µL, preferencialmente 100 µL da solução obtida na etapa "b" em um microtubo de centrifugação com volume de 0,2 a 10mL, preferencialmente 5 mL juntamente com 0,1 a 100mL, preferencialmente 2 mL da solução de nanopartículas de ouro obtida na etapa "a".

[46] Esse preparo é realizado em temperatura que varia de 5 a 30 °C, preferencialmente 20 °C sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm, entre 40 e 180 minutos, preferencialmente 40 minutos.

[47] Posteriormente, adiciona-se à solução obtida anteriormente, 0,05 a 2000µL, preferencialmente 100 µL da mistura de 1:1 de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) preparado dissolvendo de 0,01 a 1,0 g, preferencialmente 0,38 g em 1,0 a 20 mL, preferencialmente 5,0 mL de água deionizada e N-hidroxisuccinimida, preparado dissolvendo de 0,01 a 1,0 g, preferencialmente 0,057 g em 1,0 a 20 mL, preferencialmente 5,0 mL de água deionizada, em temperatura que varia de 0 a 30 °C, preferencialmente 20 °C sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm, por um período de tempo que varia de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos.

D) Adição do anticorpo:

[48] Na etapa "d", adiciona-se em temperatura que varia de -10 a 10°C, preferencialmente 0°C, de 10 a 1000 µL, preferencialmente 200µL de anticorpo monoclonal contra os quatro sorotipos da dengue, sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm por um período de tempo que varia de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos.

E) Adição do vírus da dengue:

[49] Por fim, uma mistura com 100 µL dos sorotipos DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4, foi adicionada em um recipiente específico e agitado.

[50] Dessa mistura, 200 µL foi adicionado à solução obtida anteriormente, em temperatura que varia de -10 a 30°C, preferencialmente 0°C sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm por um período de tempo que varia de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos.

[51] A solução de nanopartículas de ouro antes e após

cada etapa de modificação (A, B, C, D e E), foi medida utilizando um equipamento de UV-Vis, que forneceu gráficos por meio da técnica de LSPR, indicando a detecção do vírus da dengue através da ligação específica antígeno-anticorpo.

Testes Realizados:

- Resultados do método com amostras:

[52] A detecção de vírus da dengue foi realizada por meio da ligação específica entre o anticorpo e o antígeno.

[53] Todos os passos de modificações de superfície das nanopartículas de ouro foram monitorados usando técnicas de espectroscopia LSPR e os resultados obtidos por meio do equipamento UV-Vis estão demonstrados na figura 1.

[54] Como pode ser observado, nanopartículas de ouro exibiram um pico em 525 nm (linha preta). A etapa seguinte do método (etapa B) conduziu a um deslocamento do pico para 527 nm, indicando a modificação com as monocamadas auto-organizadas (MUA) (linha vermelha).

[55] As MUA consistem em grupo tiol na extremidade da ligação com a nanopartícula contendo um grupo SH ligado a um átomo de carbono, análogos de enxofre de álcoois.

[56] Na sua outra extremidade, está presente um grupo carboxílico que foi ativado com solução de EDC-NHS (etapa C) criando ligações covalentes com as amins dos anticorpos. Após a ativação, houve um deslocamento para 529 nm (linha verde).

[57] Após a conjugação do anticorpo (etapa D), o pico deslocou para 533 nm, indicando que ocorreu a ligação. A técnica LSPR permite detectar alterações no índice de refração da amostra devido a mudanças ocorrida na superfície das nanopartículas (linha azul).

[58] A modificação na superfície das nanopartículas diminui a área de interação com uma luz polarizada da LSPR proporcionando um decaimento contínuo na absorbância, proporcionando uma maior transmitância da luz.

[59] Uma mistura com os quatro sorotipos do vírus da dengue (1, 2, 3 e 4) foi adicionado (etapa E) e a redução no pico da absorbância foi mantido, com deslocamento no comprimento de onda para 549 nm.

[60] O resultado é atribuído a um aumento no índice de refração local em relação à ligação anticorpo-antígeno (linha rosa).

[61] Vale ressaltar que todo experimento durou cerca de 2:60 horas.

- Especificidade e Sensibilidade do método:

[62] Para verificar a especificidade do anticorpo anti-DENV em detectar apenas o vírus da dengue, garantindo, assim, a eficácia do experimento, o vírus zika (ZIKV) foi testado como interferente, uma vez que o mesmo pode fornecer uma resposta falso-positiva e invalidar os resultados obtidos.

[63] O espectro do UV-Vis referente ao ZIKV é demonstrado na figura 2, mostrando todas as etapas de modificação ocorridas na superfície das nanopartículas de ouro com MUA, EDC-NHS, anticorpo anti-DENV e ZIKV (linhas preta, vermelha, verde, azul e laranja, respectivamente).

[64] Comparando os gráficos obtidos em cada etapa do experimento, observa-se que houve deslocamento no comprimento de onda para 533 com redução no pico da absorbância até o anticorpo.

[65] Quando o ZIKV foi adicionado à solução, foi

possível observar um aumento na absorvância e não houve deslocamento do comprimento de onda (526 nm), demonstrando que não houve ligação do vírus com o complexo nanopartículas-anticorpos.

[66] Ainda, a eficiência em detectar o vírus da dengue em diferentes diluições foi testada, confirmando a sensibilidade da metodologia, conforme mostrado na figura 3.

[67] A concentração do vírus utilizada no experimento foi estimada utilizando cálculos de $DICT_{50}/mL$ e a quantidade de vírus encontrada foi de 10^7 vírus/mL.

[68] O teste com diferentes diluições demonstrou alterações na absorvância, indicando que o limite de detecção para o vírus da dengue foi de 1-200 μL em tampão fosfato (PBS, pH 7,4), o que indica que, quanto menos diluída estiver a amostra, menor será sua absorvância.

[69] A inserção do gráfico na figura 3 mostra que o ajustamento linear ao gráfico da absorvância em função do índice de refração proporcionou uma resposta linear $R=0,996$.

[70] Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O desvio padrão relativo (RSD) foi de 6,0%, mostrando uma boa reprodutibilidade da preparação do imunossensor.

- Viabilidade do método:

[71] A viabilidade da metodologia foi validada comparando os resultados obtidos com as metodologias de RT-qPCR e ELISA e os acertos médios positivos estão na faixa de 98,0%.

[72] Esse resultado indica que o método desenvolvido

para produção do imunossensor apresenta alta sensibilidade e especificidade em detectar apenas o vírus da dengue.

[73] Deste modo, a metodologia apresenta resultados confiáveis e rápidos sobre o diagnóstico do vírus da dengue, apresentando-se como uma alternativa para análises demoradas e de alto custo.

[74] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de detecção de doença viral **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

a) Obtenção de nanopartículas de ouro;

b) Obtenção da solução de MUA;

c) Obtenção da solução de EDC / NHS;

d) Adição do anticorpo monoclonal específico para a doença investigada.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa A, as nanopartículas serem obtidas a partir do preparo de uma solução de sal de ouro de 0,001 a 0,10 g, preferencialmente 0,004 g de HAuCl_4 em 1 a 1000 mL, preferencialmente 10 mL de água.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de ser preparada uma solução de 0,01 a 1,0 g, preferencialmente 0,1 g de citrato de sódio dihidratado em 1 a 1000 mL, preferencialmente 10 mL de água.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato de 0,1 a 100 mL, preferencialmente 10 mL da solução de sal de ouro, ser colocada em um recipiente sob agitação em rotação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm e sob temperatura que varia de 10 a 500 °C, preferencialmente 270 °C, por um período de tempo que varia de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos, seguida da adição de 0,1 a 100 mL, preferencialmente 2 mL da solução de citrato de sódio dihidratado, sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm, e sob aquecimento que varia de 100 a 1000 °C, preferencialmente 270°C, sendo a solução de

nanopartículas obtida posteriormente resfriada a temperatura ambiente sob abrigo de luz e armazenada a 5 °C.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "b", de 0,05 a 2000 µL, preferencialmente 10 µL de uma solução de ácido 11-mercaptoundecánoico (MUA) ser adicionada em 0,05 a 200 mL, preferencialmente em 4,0 mL de etanol.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "c", de 0,05 a 2000 µL, preferencialmente 100 µL da solução obtida na etapa "b" ser adicionada a de 0,1 a 100 mL, preferencialmente 2 mL da solução de nanopartículas de ouro obtida na etapa "a" sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm entre 40 e 180 minutos, preferencialmente 40 minutos.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de 0,05 a 2000 µL, preferencialmente 100 µL, da mistura de 1:1 de EDC e de N-hidroxi succinimida ser adicionada à solução obtida anteriormente em temperatura que varia de 0 a 30°C, preferencialmente 20 °C, sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm por um período de tempo de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "d", de 10 a 1000 µL, preferencialmente 200 µL de anticorpo monoclonal ser adicionado em temperatura que varia de -10 a 10°C, preferencialmente 0°C sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm por um período de tempo de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de, na etapa "e", uma mistura com 100 µL dos sorotipos DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4 ser adicionado à solução obtida anteriormente, em temperatura que varia de -10 a 30 °C, preferencialmente 0°C, sob agitação que varia de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200 rpm por um período de tempo de 01 a 60 minutos, preferencialmente 40 minutos.

10. Kit diagnóstico **caracterizado** pelo fato de compreender nanopartículas de ouro modificadas com anticorpos, preferencialmente anticorpos monoclonais específicos para o vírus da dengue.

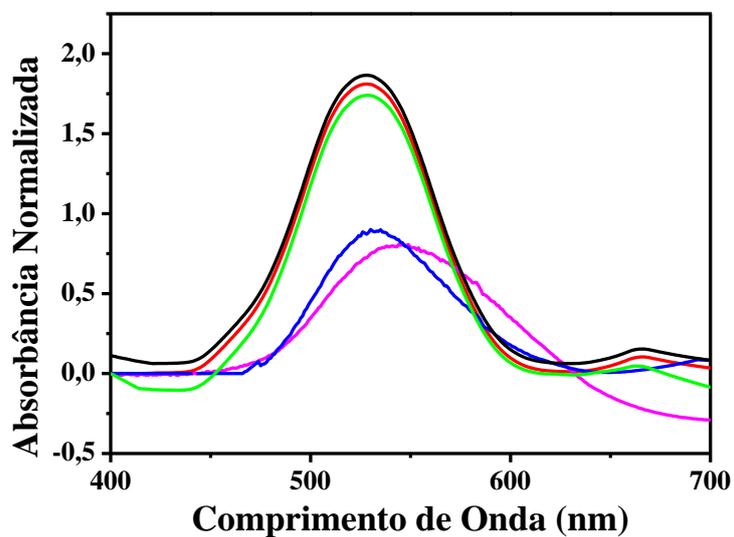


FIGURA 1

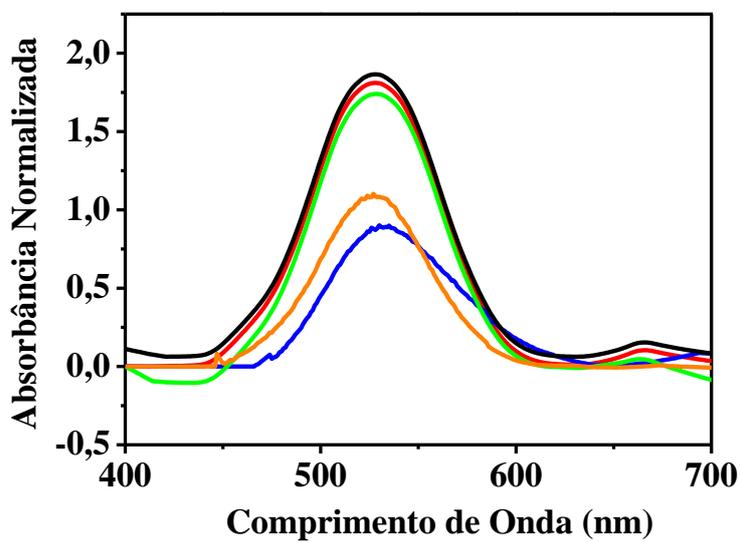


FIGURA 2

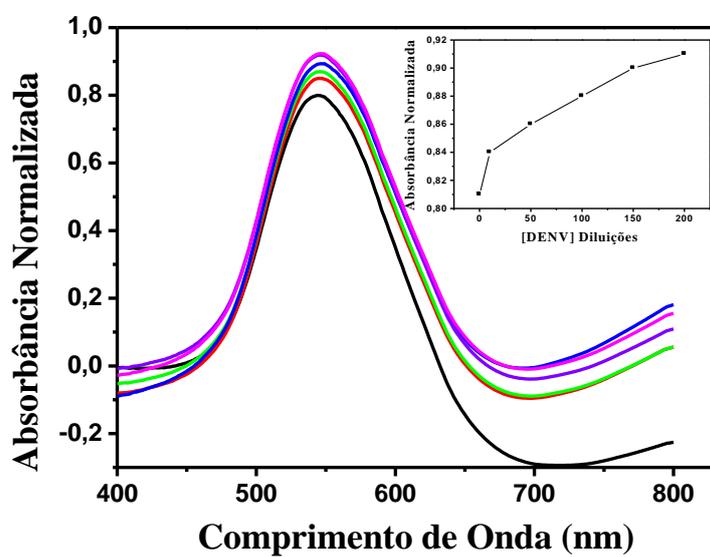


FIGURA 3

Resumo**MÉTODO DE DETECÇÃO DE DOENÇA VIRAL E KIT DIAGNÓSTICO**

A presente invenção faz referência a um método de detecção de doença viral, especificamente do vírus da dengue usando nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com anticorpos.

O método proposto é baseado em ressonância plasmática de superfície localizada (LSPR) para a detecção rápida e sensível do vírus ou proteínas virais da dengue através da ligação antígeno-anticorpo.

A presente invenção ainda prevê um kit diagnóstico para a detecção rápida e sensível da doença, em que a ligação em tempo real do antígeno ao conjugado anticorpo - nanopartículas de ouro permite uma análise instantânea da amostra de interesse e proporciona uma resposta em menos de 3 minutos.