



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102012003901-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102012003901-0

(22) Data do Depósito: 23/02/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 19/07/2016

(51) Classificação Internacional: G01N 21/76; G01N 21/64; G01N 33/543; G01N 33/68; A61B 5/00.

(52) Classificação CPC: G01N 21/763; G01N 21/6402; G01N 33/543; G01N 33/6848; A61B 5/0075.

(54) Título: DISPOSITIVO ÓPTICO PARA DETECÇÃO DE MARCADOR ESPECÍFICO DE LESÃO CARDÍACA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. CGC/CPF: 25648387000118. Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121, Reitoria, Uberlândia, MG, BRASIL(BR), 38408-100; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG. CGC/CPF: 21949888000183. Endereço: Rua Raul Pompéia,101, São Pedro, Belo Horizonte, MG, BRASIL(BR), 30330-080

(72) Inventor: ANA GRACCI BRITO MADURRO; LUCIANO PEREIRA RODRIGUES; ADAMO FERREIRA GOMES DO MONTE; JAIR PEREIRA DA CUNHA JUNIOR; YARA CRISTINA DE PAIVA MAIA; JOÃO MARCOS MADURRO; LUIZ RICARDO GOULART FILHO; PAULA DE SOUZA SANTOS; LUCAS FERREIRA DE PAULA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 23/02/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 03/03/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

DISPOSITIVO ÓPTICO PARA DETECÇÃO DE MARCADOR ESPECÍFICO DE LESÃO CARDÍACA

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à confecção de um dispositivo óptico
5 capaz de diagnosticar marcador específico de lesão cardíaca. Ele é composto
basicamente de um bioeletrodo formado por anticorpos imobilizados em filme
polimérico derivado de aminofenóis eletrodepositados em uma lâmina vítrea de
óxido de estanho dopado com flúor. O dispositivo da presente invenção
apresenta um sistema versátil de acoplamento permitindo que o antígeno seja
10 reconhecido simultaneamente pelo bioeletrodo e por um anticorpo biotinilado
capaz de se ligar a estreptavidina conjugada a um fluoróforo que emite
luminescência depois de irradiado com laser.

Estado da Técnica

Os gastos com doenças cardiovasculares no Brasil giram em torno de
15 1,74% do PIB e segundo dados do SUS a mortalidade anual no Brasil atinge
cerca de 66.000 pessoas, sendo os EUA o país recordista, com 375.000
mortes/ano, em que aproximadamente 60% dos óbitos por infarto acontecem
nas primeiras horas após o início dos sintomas. O diagnóstico clínico falha em
33% dos casos e o eletrocardiográfico em 50% dos casos, fato este que tem
20 levado a comunidade científica mundial a realizar várias pesquisas para
substituir e ou aperfeiçoar as técnicas convencionais como no caso da patente
UA 61930 que propõe um sistema eletrocardiográfico diferenciado para
determinar a extensão da isquemia. A patente JP 6114059 permite obter
imagens de alta precisão do músculo cardíaco e quantifica também a extensão
25 da lesão através de tomografias que são normalmente muito onerosas.

Macromoléculas como as troponinas T e I são marcadores que indicam
e quantificam a extensão da lesão cardíaca com precisão e podem ser
detectados em amostras de soro sanguíneo, cujo diagnóstico bioquímico
atualmente é centralizado em laboratórios fazendo uso de recursos humanos
30 especializados para a execução da técnica denominada Enzyme Linked

Immunosorbent Assay (ELISA). Esta técnica é muito sensível, todavia apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, o elevado volume de amostra e a demora na entrega dos resultados, cujo tempo médio em um laboratório convencional gira em torno de dois dias. A patente CN 1837822
5 propõe um diagnóstico confiável e específico através de uma técnica semelhante ao ELISA em placas de 96 orifícios para formação do complexo anticorpo-antígeno-enzima de marcação, entretanto esta técnica apresenta basicamente as mesmas desvantagens do ELISA.

Uma alternativa mais viável de diagnóstico precoce, rápida e barata
10 pode ser obtida fazendo uso de biossensores em que um material biológico atua como agente de reconhecimento imobilizado em um transdutor, que converte o sinal biológico em sinal físico e/ou químico. A patente JP 11211725 apresenta detecções do antígeno troponina T via ressonância de plásmons de superfície (SPR) por um chip elaborado por meio da ligação do anticorpo anti-
15 troponina T com uma superfície metálica por intermédio de um agente de acoplamento a base de silício. Todavia assim como as técnicas de imagem via ressonância magnética (tomografia) são de elevado custo.

A detecção óptica em biossensores pode ser viabilizada por meio de fluoróforos como a cianina, a rodamina e o alexa flúor, todavia os pontos
20 quânticos têm se mostrado superiores a todos estes em função de suas propriedades fotofísicas extraordinárias. A patente DE 102006057975 disponibiliza um arranjo que possibilita a detecção de microorganismos por meio do sinal fluorescente dos pontos quânticos. Já a patente CN 101793899 mostra um biossensor óptico de pontos quânticos capaz de detectar peptídeo
25 natriurético cerebral por meio de um sistema complexo de sondas magnéticas. A patente KR 20100137944 propõe um sensor óptico com detecção da luminescência de pontos quânticos, cuja transmissão de luz ocorre por fibra óptica acoplada a um detector.

Transdutores sensoriais são comumente obtidos modificando
30 quimicamente eletrodos com filmes poliméricos, tais como politiofeno, polipirrol e a polianilina, largamente estudados, produzidos por síntese química ou por

eletropolimerização. Poliaminofenóis são originados da anilina substituída com o grupo OH, sendo o estudo destes polímeros mais recente e menos explorado. Quando se utiliza a detecção óptica em biossensores, substratos vítreos contendo materiais tais como óxido de estanho dopado com flúor (FTO) e óxido de estanho dopado com índio (ITO) tornam-se atrativos pelas suas características, tais como, boa condutividade elétrica, alta transparência, inércia química e reprodutibilidade. A presente invenção possibilita a detecção da troponina T por luminescência de pontos quânticos por meio de um bioeletrodo construído através da imobilização do anticorpo anti-troponina T covalentemente ao poli(3-aminofenol) eletropolimerizado em superfície de FTO.

Sumário da invenção

Na presente invenção foi eletropolimerizado em FTO por meio de voltametria cíclica o 3-aminofenol, cujos espectros de ultravioleta na região do visível mostraram absorção em aproximadamente 290 nm tanto para o 3-aminofenol (3AMF) como para o poli(3-aminofenol) (P3AMF) sugerindo que ocorre preservação da aromaticidade no polímero, que além desta absorção apresentou mais duas pequenas bandas em 350 e 500 nm indicando a extensão de conjugação. A análise de troca iônica das sondas redox ferro/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaminrutênio (II) demonstraram que o material tem atração por estruturas catiônicas e repulsão por estruturas aniônicas em pH neutro. Imagens de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG-SEM) e de força atômica (AFM) mostraram recobrimento polimérico rugoso quase total da superfície do FTO, cuja espessura máxima por interferometria a laser foi estimada em 375 ± 75 nm. A caracterização elétrica e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) demonstraram que o material tem um elevado caráter passivante, sendo aplicado como matriz na construção de um bioeletrodo para diagnosticar lesão cardíaca por meio da formação de uma ligação amida estável entre os grupamentos NH_2 do poli(3-aminofenol) e as carboxilas terminais (Fc) do anti-troponina T via 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) / N-hidroxi-

succinimida (NHS). Adicionalmente este anticorpo foi modificado com biotina, sendo sua afinidade a estreptavidina ou avidina, assim como a especificidade entre anticorpo e antígeno explorados no “*design*” deste sistema. A detecção seletiva do troponina T na concentração de 5×10^{-7} mol.L⁻¹ foi realizada por
5 fotoluminescência de pontos quânticos.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção é descrita na FIGURA 1, onde um arranjo óptico foi ajustado com lentes e suportes para obter os melhores sinais de luminescência. O sistema de detecção óptico é constituído de um laser de diodo na faixa entre 400 e 650 nm (1) que por sua vez é incidido no dispositivo composto por um bioeletrodo (2) num ângulo entre 30 e 90° da fenda do espectrômetro acoplado a fotomultiplicadora (3) que amplia o sinal de luminescência. Um filtro passa banda (4) foi colocado entre o bioeletrodo (2) e a fenda espectrométrica para suprimir a emissão do laser no sistema de
10 detecção, cuja luminescência (5) específica do fluoróforo é convertida em sinal por meio de interface a um software específico (6). Todavia antes da detecção, ao bioeletrodo (2) é adicionado consecutivamente a amostra contendo a biomolécula (alvo) indicador da doença, o seu complementar marcado com biotina e por fim o conjugado estreptavidina-fluoróforo.

O bioeletrodo (2) translúcido pode ser obtido em superfícies vítreas ou poliméricas transparentes contendo óxido de estanho (TO), óxido de estanho dopado com flúor (FTO), óxido de estanho dopado com índio (ITO) ou outros compostos semi-condutores ou condutores, modificados quimicamente ou eletroquimicamente por polímeros translúcidos, condutores ou não, capazes de
20 interagir fisicamente ou quimicamente com biomoléculas de captura, tais como, antígenos, anticorpos, oligonucleotídeos, DNAs, RNAs, aptâmeros, enzimas, microorganismos, proteínas em geral e outras macromoléculas de origem natural ou sintética. Biomoléculas alvos normalmente disponíveis nos fluidos corporais como sangue, saliva e outros, podendo ser também antígenos,
25 anticorpos, oligonucleotídeos, DNAs, RNAs, enzimas, microorganismos,
30

proteínas em geral e outras macromoléculas são assim reconhecidos especificamente pelo bioeletrodo (2). Consecutivamente biomoléculas complementares marcadas com biotina são capazes de se ligarem simultaneamente ao alvo e a estreptavidina conjugada aos fluoróforos que podem ser pontos quânticos, cianina, fluoroceína, rodamina, flúor DyLight, flúor alexa, bodipy, cumarinas, azul cascata, amarelo lucifer ou outros, assim como enzimas como a peroxidase ou outras atuando em determinados substratos como as diaminobenzidinas e similares, proporcionando reações cujos compostos são coloridos.

10 A preparação da placa de FTO, ITO, TO ou outros compostos semicondutores ou condutores depositados sobre vidro ou plástico, modificada com filme polimérico podendo ser obtidos quimicamente ou eletroquimicamente comumente por voltametria cíclica. A imobilização das biomoléculas no eletrodo transparente modificado com fina camada de material polimérico translúcido pode ser realizada por adsorção física desde que se promovam condições adequadas, tais como, pH, temperatura, carga líquida do polímero e da biomolécula. Ligações covalentes mais efetivas podem ser realizadas usando sistemas de bioconjugação tais como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), EDC e N-hidroxi-succinimida (NHS), EDC plus N-hidroxiulfosuccinimida (Sulfo-NHS), 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida (CMC), dicitclohexil carbodiimida (DCC), diisopropil carbodiimida (DIC), Woodward's Reagentes K, N,N-carbonildiimidazol, formação de bases Schiff ou redução de amins ou outros. Sistema de ligações cruzadas via glutraldeído ou "entrapment" da biomolécula durante a modificação química ou eletroquímica também podem ser usadas.

25 Biotinilação de biomoléculas podem ser realizadas com sucesso através de várias metodologias (G. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2nd edition, Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA, 2008).

30 Detecções indiretas de biomoléculas por sistemas ópticos por meio de luminescência de fluoróforos ou produtos coloridos por meio de reações

enzimáticas podem ser realizadas por técnicas espectroscópicas como ultravioleta, fluorescência, fotoluminescência, etc, capazes de discriminar qualitativamente a presença ou a ausência da molécula alvo e também quantitativamente relacionando a emissão ou absorção de luz a sua respectiva concentração na amostra. É válido ressaltar uma situação peculiar em que a tecnologia de detecção pode ser minimizada ou totalmente suprimida uma vez que a quantidade de fluoróforos ou substratos enzimáticos podem ser maximizados a ponto de serem visualizados a olho nu depois de irradiados ou após a formação dos produtos coloridos.

10 Exemplos

Exemplo 1: Detecção de marcador específico de lesão cardíaca (troponina T) por método indireto através da luminescência de pontos quânticos.

A FIGURA 2 mostra detalhadamente a produção de um bioeletrodo (2) e o respectivo acoplamento do alvo, passo a passo até a adição do fluoróforo.

15 Preparação da placa de FTO (7) modificada com poli(3-aminofenol) (8): 3-aminofenol (3AMF) $2,5 \times 10^{-1}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ diluído em eletrólito suporte de ácido sulfúrico 0,5 à 2,5 mol.L⁻¹ foram deaeradas em N₂ ultra-seco antes da eletropolimerização que foi realizada por voltametria cíclica numa célula de três compartimentos de 25 mL alimentada por um potenciostato modelo 420A (CH Instruments). O eletrodo de trabalho usado foi de óxido de estanho dopado com flúor 1x2 cm. O eletrodo auxiliar utilizado foi de platina com área geométrica de 2 cm². Os potenciais foram referenciados a um eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl 3M. Foram realizadas de 30 a 100 ciclagens entre os potenciais que podem variar entre -0,2 a 2,3 V com uma velocidade de 5 a 25 100 mV.s⁻¹. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água deionizada por um sistema Millipore Milli-Q (18,2 MΩcm⁻¹).

Preparação do bioeletrodo (2): Três soluções foram adicionadas aos eletrodos de FTO (7) modificados com poli(3AMF) (8), sendo elas: anticorpo de

aptura anti-troponina T ($600 \pm 400 \text{ ng/cm}^2$) (9), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxi-succinimida (NHS), ambos na faixa de $15 \pm 10 \text{ mmol.L}^{-1}$, na proporção 1:1 (v/v) e incubados de $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ "overnight". Para retirada dos anticorpos não ligados foi realizada lavagem em rotação de $250 \pm 150 \text{ rpm}$ por $5 \pm 3 \text{ s}$ em tampão fosfato salino (PBS). Em seguida adicionou-se glicina de $15 \pm 10 \text{ mmol.L}^{-1}$ por 40 ± 20 minutos para desativar os grupos succinimida ainda ativos nos anticorpos. Posteriormente foi realizada nova lavagem em PBS e adição de solução de albumina de soro bovino (BSA) de $3 \pm 2 \%$ por 40 ± 20 minutos para bloqueio de sítios inespecíficos configurando assim o bioeletrodo (2) formado pela imobilização covalente do anti-troponina T (9) ao eletrodo de FTO (7) modificado com poli(3-aminofenol) (8) cuja eficiência desta imobilização foi comprovada por espectroscopia de impedância eletroquímica.

Biotinilação do anticorpo complementar anti-troponina T: A conjugação do anti-troponina T à biotina foi viabilizada baseada no protocolo (E. Harlow, D. Lane, Labeling Antibodies with Biotin, Cold Spring Harb Protoc, doi:10.1101/pdb.prot4286, 2006), onde preparou-se uma solução de N-hidroxissuccinimida-biotina a 10 mg.mL^{-1} em dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida preparou-se uma solução de anticorpo de 1 a 3 mg.mL^{-1} em $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,8. Adicionou-se 25 a $250 \text{ } \mu\text{g}$ do biotina-éster ao anticorpo, sendo que mistura foi incubada por 4 horas, sob agitação lenta, à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se $20 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de NH_4Cl 1 mol.L^{-1} realizando incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Utilizando um sistema de ultra filtração Amicon Millipore (diâmetro médio de 3 KDa) foi removida a biotina não ligada. Aproximadamente $500 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de anticorpo marcado com biotina contra 4 mL de tampão PBS levados a centrifuga 7500 g por 30 minutos, com pelo menos (3 trocas de tampão). O anticorpo modificado com biotina (10) foi dividido em alíquotas e mantido a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ quando em uso ou a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ quando estocado. A eficiência da conjugação da biotina ao anticorpo anti-troponina T foi comprovada por ensaios de "dot blot".

A detecção do antígeno troponina T (900 ng/cm^2) (11) por

fotoluminescência de pontos quânticos após a adição de 60 ± 40 ng do conjugado estreptavidina-ponto quântico CdSe/ZnS (Qdot-525[®]) (12). Lavagens dinâmicas, 250 ± 150 rpm por 5 ± 3 s do bioeletrodo (2) foram realizadas em tampão fosfato (PBS) entre todas as etapas e no final do processo para remoção das espécies inespecíficas, sendo elas: Adição do 5 antígeno troponina T (11), anticorpo anti-troponina T biotilado (10) e conjugado ponto quântico-estreptavidina (12).

Este exemplo ilustra a detecção indireta da troponina T por luminescência dos pontos quânticos em função da engenharia de construção 10 do dispositivo da presente invenção que proporciona um “*design*” de acoplamento exposto na FIGURA 2 em que o bioeletrodo (2) composto por (7, 8 e 9) reconhece seletivamente o alvo específico troponina T (11) indicado indiretamente por anticorpo complementar anti-troponina T modificado com biotina (10) ligado ao conjugado estreptavidina-pontos quânticos core CdSe shell 15 ZnS (Qdot-525[®]) (12) emissores de luminescência verde (525 nm) após irradiados com laser entre 400 nm e 650 nm. Este bioeletrodo (2) é aplicado a detecção óptica de biomoléculas alvos presentes em amostras biológicas através do seu acoplamento as respectivas espécies constituintes fazendo uso de interações específicas, cujas constantes de afinidade são da ordem de 10^4 a 20 10^{12} mol.L⁻¹ e 10^{15} mol.L⁻¹, entre anticorpos-antígenos correspondentes e biotina-estreptavidina, respectivamente. A ausência do alvo específico na amostra faz com que não ocorra o acoplamento do sistema, por que as espécies são removidas durante as etapas das lavagens dinâmicas, onde a ausência de sinal ou um sinal pequeno é esperado. Os espectros de emissão 25 comprovando a eficiência da detecção seletiva da troponina T frente a uma proteína irrelevante (anticorpo anti-troponina I) estão disponíveis na FIGURA 3.

O dispositivo da presente invenção pode ser utilizado para um diagnóstico qualitativo tipo “*screen*”, cujo teste positivo para lesão cardíaca resulta numa coloração verde no bioeletrodo (2), sendo que a ausência de cor 30 ou um pequeno sinal indicaria teste negativo para esta patologia. Adicionalmente os diagnósticos positivos podem ser quantificados, sendo a

extensão da lesão cardíaca proporcional a concentração de Troponina T que por sua vez é proporcional a intensidade da luminescência, podendo ser utilizado ainda para verificar o estágio da necrose cardíaca.

O dispositivo da presente invenção foi utilizado para detecção de troponina T na concentração de $5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ em aproximadamente 2 horas sendo que todo o esquema descrito na FIGURA 1 pode ser adaptado para moldes portáteis de medições "in loco" nas amostras reais em clínicas médicas, postos de saúde, prontos socorros e hospitais por profissionais não especializados. As detecções de Troponina T por ELISA tem sensibilidade de $10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$ em aproximadamente 48 horas em laboratórios centralizados requerendo profissionais qualificados.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo óptico para detecção de marcador específico de lesão cardíaca, utilizando um bioeletrodo contendo pontos quânticos acoplado a um espectrômetro de fluorescência, **caracterizado por** possuir um laser de diodo (1) incidido num bioeletrodo (2) sob um ângulo variando entre 30 e 90° da fenda de um espectrômetro de fluorescência acoplado a uma fotomultiplicadora (3) e um filtro passa banda (4), cuja luminescência (5) é convertida em sinal através de interface a um software específico (6) combinado a um bioeletrodo (2) que possui uma placa vítrea de FTO (7) modificada eletroquimicamente com polímero poli(3-aminofenol) (8) no qual foi imobilizado covalentemente o anticorpo anti-troponina T (9) que reconhece o alvo Troponina T (11) que se liga ao anticorpo anti-troponina T modificado com biotina (10) que acopla ao conjugado estreptavidina-ponto quântico CdSe/ZnS (Qdot-525®) (12).

2. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** estreptavidina do conjugado estreptavidina-ponto quântico CdSe/ZnS (Qdot-525®) (12) poder ser substituída por avidina ou quaisquer outro elemento de bioconjugação.

3. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** conjugado estreptavidina-ponto quântico CdSe/ZnS (Qdot-525®) (12) poder ser substituído por pontos quânticos de mesma composição que emitam luminescência em outros comprimentos de onda, assim como pontos quânticos constituídos de outros semicondutores ou ainda por fluoróforos diversos, tais como, cianina, fluoresceína, rodamina, flúor DyLight, Flúor Alexa, bodipy, cumarinas, azul cascata, amarelo lucifer, assim como substratos capazes de produzir compostos coloridos na presença de enzimas como as diaminobenzidinas em peroxidase que por sua vez possam estar conjugado a estreptavidina, assim como outros elementos de bioconjugação.

4. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) (7) poder ser substituído por óxido de estanho (TO), óxido de estanho dopado com índio (ITO) ou outros

compostos semi-condutores ou condutores, depositados em superfícies transparentes como o vidro ou plásticos.

5. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** polímero poli(3-aminofenol) poder ser substituído por outro material polimérico (derivado de aminas (aromáticas ou alifáticas) e iminas (aromáticas ou alifáticas) ou não de origem sintética ou natural depositado quimicamente, eletroquimicamente, biologicamente ou fisicamente no eletrodo.

6. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** poder ser construído com outras biomoléculas, tais como outros anticorpos, ou ainda antígenos, oligonucleotídeos, DNAs, RNAs, aptâmeros, enzimas, microorganismos, proteínas em geral e outras macromoléculas naturais ou sintéticas ligadas por meio de ligações covalentes via carbodiimidas, tais como EDC, EDC/NHS, EDC plus Sulfo-NHS, CMC, DCC, DIC, Woodward's Reagentes K, N,N-carbonildiimidazol, formação de bases Schiff ou redução de aminas, ou ainda outras técnicas de imobilização como adsorção física, ligação cruzada ou "*entrapment*".

7. Dispositivo definido em qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo** fato de ser utilizado para diagnóstico de outras doenças, cujos marcadores podem ser também anticorpos ou antígenos, ou ainda outras biomoléculas alvo, como oligonucleotídeos, DNAs, RNAs, enzimas, microorganismos, proteínas em geral e outras macromoléculas.

FIGURA 1

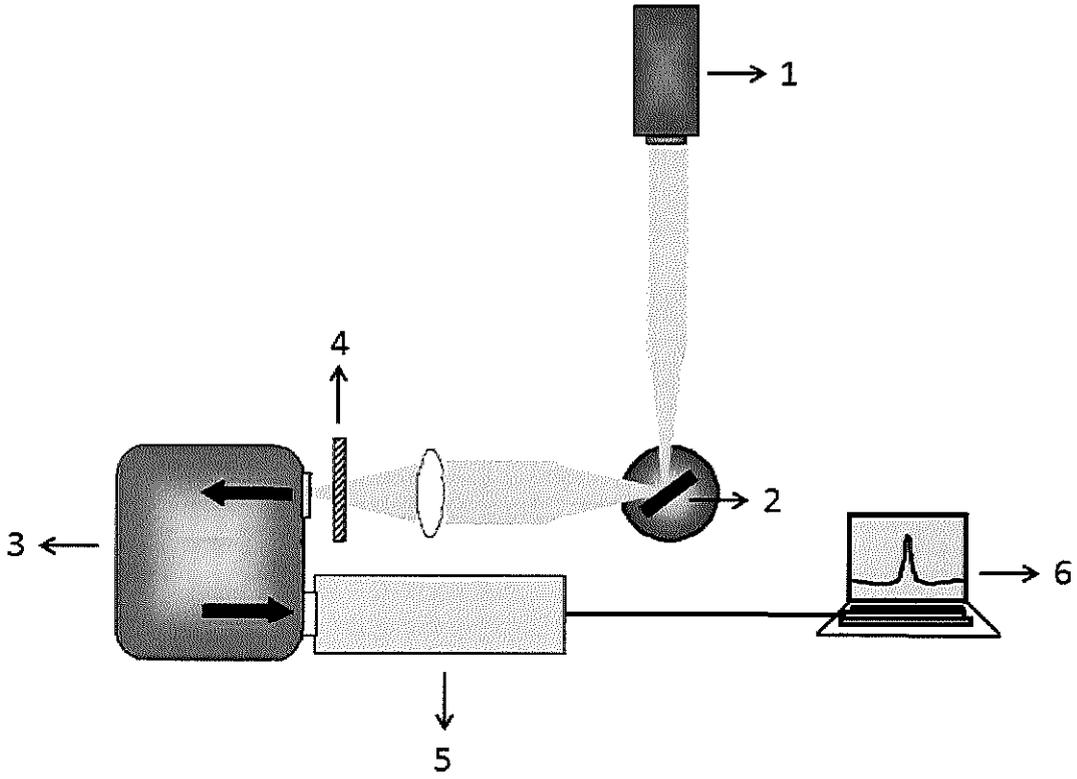


FIGURA 2

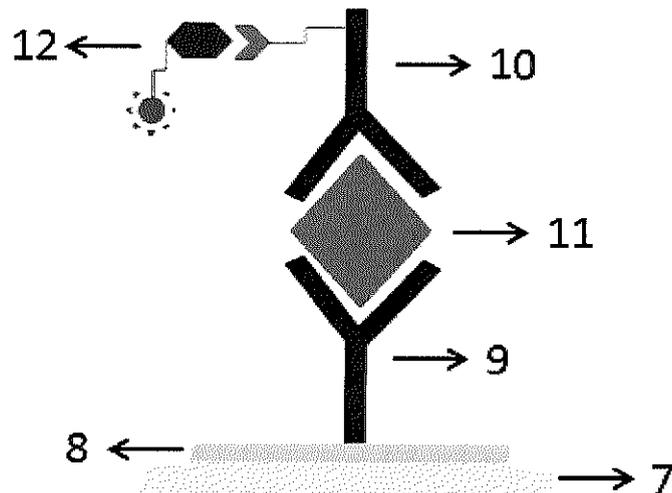


FIGURA 3

