



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014028423-0 A2



(22) Data do Depósito: 14/11/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 06/03/2019

(54) **Título:** NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/ (ÓXIDO DE FERRO) PARA A EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

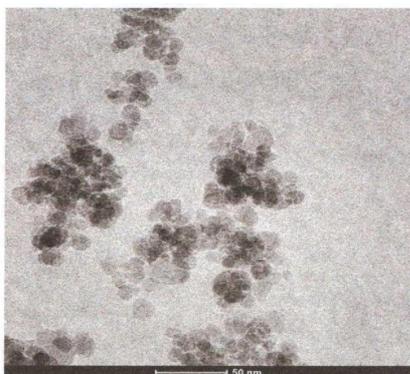
(51) **Int. Cl.:** C12N 15/10; B01D 15/38; B03C 1/01; B82B 3/00; B01J 20/02; (...).

(52) **CPC:** C12N 15/1013; B01D 15/38; B03C 1/01; B82B 3/00; B01J 20/0229; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE.

(72) **Inventor(es):** CELSO PINTO DE MELO; JUAN CARLOS MEDINA LLAMAS; ALICIA ELIZABETH CHÁVEZ GUAJARDO; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE; KLEBER GONÇALVES BEZERRA ALVES.

(57) **Resumo:** NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO) PARA A EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS. A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético (NCM), sob a forma de kits, contendo um conjunto de materiais, e uma sequência de métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos, a partir de sistemas biológicos, ou quando dissolvidos em meios aquosos, sendo tais processos amplamente utilizados nas mais diversas áreas, tais como Biologia, Medicina, Química, entre outras. O NCM consiste de um núcleo magnético revestido pelas cadeias do polímero condutor, as quais, através de interações eletrostáticas, podem se associar, de forma não específica, com ácidos nucleicos, proteínas ou qualquer molécula biológica que possua carga superficial negativa. O complexo NCM/biomolécula pode ser removido do meio líquido através da aplicação de um campo magnético externo, e, subsequentemente, as biomoléculas podem ser separadas do NCM através de mudanças controladas das condições físico-químicas do meio (tal como o valor de seu pH). Posteriormente, após sua concentração e purificação, o ácido nucleico, ou molécula biológica de interesse, pode ser identificado, quantificado e utilizado em diversos processos e protocolos biotecnológicos, tais como diagnóstico de doenças infecciosas ou de origem genética, provas de paternidade, entre (...).



# **NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO) PARA A EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

## **RELATÓRIO DESCRITIVO**

### **Resumo**

[001] A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético (NCM) sob a forma de kits contendo um conjunto de materiais e uma sequência de métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas biológicos ou quando dissolvidos em meios aquosos. O NCM consiste de um núcleo magnético revestido pelas cadeias do polímero condutor, as quais, através de interações eletrostáticas, podem se associar de forma não específica com ácidos nucleicos, proteínas ou qualquer molécula biológica que possua carga superficial negativa. O complexo NCM/biomolécula pode ser removido do meio líquido através da aplicação de um campo magnético externo e, subsequentemente, as biomoléculas podem ser separadas do NCM através de mudanças controladas das condições físico-químicas do meio (tal como o valor de seu pH). Posteriormente, após sua concentração e purificação, o ácido nucleico ou molécula biológica de interesse pode ser identificado, quantificado e utilizado em diversos processos e protocolos biotecnológicos, tais como diagnóstico de doenças infecciosas ou de origem genética, provas de paternidade, entre outras práticas clínicas e de pesquisa científica.

### **Campo de invenção**

[002] Na presente invenção é descrito o uso de um NCM que pode ser utilizado sob a forma de kits ou métodos de extração, separação, concentração e purificação de várias biomoléculas (proteínas, DNA, RNA, entre outras), sendo tais processos amplamente utilizados nas mais diversas áreas, tais como biologia, medicina, química, entre outras. Destaca-se que o invento em tela é imprescindível como etapa preparatória inicial da amostra a ser analisada e destinada ao diagnóstico de patologias, desordens genéticas, além do uso em provas de paternidade, outras práticas clínicas e de pesquisa científica.

### **Antecedentes da invenção**

[003] Atualmente, existem diversos métodos para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos. No entanto, em sua maioria tais métodos apresentam alguns inconvenientes; assim, por exemplo, a sua implementação pode requerer a execução de várias etapas e, portanto, consumir muito tempo. Algumas dessas etapas podem ser a precipitação, centrifugação, filtração e separações cromatográficas. Além disso, vários desses métodos fazem uso de solventes tóxicos para o usuário e o ecossistema, de que é exemplo o método baseado no uso de fenol-clorofórmio.

[004] Por esta razão, em anos recentes a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos através do uso de partículas magnéticas funcionalizadas têm encontrado uso crescente como uma técnica que apresenta várias vantagens em relação aos métodos convencionais. Além de ser um processo mais econômico e que, na maioria dos casos, não faz uso de solventes tóxicos, o presente método tem como vantagens adicionais sua simplicidade e rapidez.

[005] As partículas magnéticas mais utilizadas em bioseparação são a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), devido a sua alta magnetização de saturação, baixa toxicidade e compatibilidade biológica. No entanto, outras ferritas também são utilizadas, tais como hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ),  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ .

[006] Normalmente, a superfície das partículas magnéticas é funcionalizada com compostos que possam interagir de forma específica, ou não, com moléculas de interesse. A seguir são mencionadas algumas patentes que fazem uso de partículas magnéticas e que foram empregadas em kits ou métodos para extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas. Além disso, também são mencionados os compostos que essas patentes utilizaram para modificar a superfície das partículas magnéticas (na Tabela 1 os pontos mencionados acima são sumarizados).

[007] A patente (CN 102888397 A) descreve o uso de um kit para extração de DNA genômico a partir de sangue total, fazendo uso de uma suspensão de pérolas magnéticas modificadas com silicato de sódio.

[008] Brahmasandra e col. (US 20100009351 A1) descreveram o uso de micropartículas magnéticas modificadas com polietilenimina para extração de DNA de diferentes amostras biológicas.

[009] Bruce e col. (WO 1994011103 A1) descreveram o uso de micropartículas magnéticas revestidas com agarose, contendo diferentes ligantes de grupos amino, para separação e purificação de DNA e RNA.

[010] Halaka e col. (US 20010041795 A1) descreveram o uso de um material magnético modificado com diferentes grupos funcionais contidos nos compostos piridina, quinolina, imidazol, pirimidina, dextran, agarose, ciclodextrina e grupos funcionais carboxílicos e fenólicos, para purificação de polieletrólitos tais como ácidos nucleicos e proteínas.

[011] Marcheassault e col. (US 2005001975 A1) prepararam um material que consiste numa matriz de polissacarídeo com partículas encapsuladas de óxido de ferro com características superparamagnéticas, que pode ser utilizado para a separação, identificação e/ou purificação de materiais biológicos; em particular, nessa patente o material foi utilizado para purificar proteínas.

[012] Josephson (US 4672040) reportou o uso de micropartículas magnéticas para separação de ácidos nucleicos. As micropartículas consistiam de óxido de ferro revestido com uma camada de silano, à qual um primer de ácido nucleico (sequência curta de oligonucleotídeos) estava ligado covalentemente. Esse complexo foi adicionado a uma solução contendo uma sequência de DNA complementar ao primer e, uma vez ocorrida a hibridação, o complexo partícula/(ácido nucleico) foi separado magneticamente.

[013] Hawkins (US 005705628 A) descreveu o uso de micropartículas magnéticas revestidas com grupos carboxila para separação e purificação de polinucleotídeos. A interação desses micropartículas com as biomoléculas é não específica e é reversível.

[014] Brevnov e col. (WO 2009143499 A1) reportaram métodos de extração e separação de ácidos nucleicos a partir de diferentes amostras biológicas. Esses métodos fazem uso de partículas de magnetita revestidas com diferentes polímeros polissacarídeos, tais como dextran, celulose, polietilenoglicol, heparina, glicogeno, amido, dextrina e celodextrina.

[015] Por outro lado, já existem no mercado alguns kits de bio-separação magnética de biomoléculas tais como MagJET (Thermo SCIENTIFIC), Dynal MyOne

Bead (Life Technologies), geneMAG (Chemicell), Ampure Beads (Agencourt), MagPurix (ZINEXTS) e MagneSil (Promega).

[016] A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético (NCM) composto exclusivamente de Polianilina/óxido de ferro (Pani/óxido de ferro) que não necessita da inserção de outro polímero e/ou outro composto para a ligação com as biomoléculas. Destaca-se que não há precedentes da sua utilização em kits ou métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas aquosos ou biológicos.

[017] O NCM descrito nesta invenção tem uma interação não específica com ácidos nucleicos ou outras biomoléculas. Além disso, devido à sua propriedade magnética, o complexo NCM/(ácidos nucleicos) pode ser separado do meio biológico através da aplicação de um campo magnético externo; como essa interação é reversível, as biomoléculas podem ser facilmente eluídas da superfície do NCM.

[018] Deve ser destacado que a maioria das patentes e kits comerciais para bio-separação magnética acima mencionadas utilizam partículas magnéticas modificadas que possuem dimensões na escala micrométrica, na faixa de tamanhos entre 0,5  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). No entanto, destacamos que na presente invenção os tamanhos das partículas utilizadas (mesmo após serem recobertas pelas cadeias poliméricas) têm dimensões nanométricas, na faixa entre (50-130) nm numa de suas realizações típicas, o que possibilita que, relativamente a seu volume, o NCM tenha uma maior área superficial disponível para interagir com as biomoléculas.

[019] A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético (NCM) composto exclusivamente de Polianilina/óxido de ferro (Pani/óxido de ferro) que não necessita da inserção de outro polímero e/ou outro composto para a ligação com as biomoléculas. Destaca-se que não há precedentes da sua utilização em kits ou métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas aquosos ou biológicos.

[020] O NCM descrito nesta invenção tem uma interação não específica com ácidos nucleicos ou outras biomoléculas. Além disso, devido à sua propriedade magnética, o complexo NCM/(ácidos nucleicos) pode ser separado do meio biológico através da aplicação de um campo magnético externo; como essa interação é reversível, as biomoléculas podem ser facilmente eluídas da superfície do NCM.

[021] Deve ser destacado que a maioria das patentes e kits comerciais para bio-separação magnética acima mencionadas utilizam partículas magnéticas modificadas

que possuem dimensões na escala micrométrica, na faixa de tamanhos entre 0,5  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). No entanto, destacamos que na presente invenção os tamanhos das partículas utilizadas (mesmo após serem recobertas pelas cadeias poliméricas) têm dimensões nanométricas, na faixa entre (50-130) nm numa de suas realizações típicas, o que possibilita que, relativamente a seu volume, o NCM tenha uma maior área superficial disponível para interagir com as biomoléculas.

[022] Tabela 1. Comparação entre as patentes que fazem uso de partículas magnéticas em kits ou métodos para extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas.

PATENTE	Material utilizado para modificação da partícula magnética	Tamanho do composto magnético ( $\mu\text{m}$ )	Meio de extração	Tipo de biomolécula
CN 102888397 A	Silicato de sódio	1-5	Sangue total	DNA
US 20100009351 A1	Polietilenimina	0,5-3	Diferentes amostras biológicas	DNA
WO 1994011103 A1	Agarose com ligantes de grupos amino	20-150	Células	DNA e RNA
US 20010041795 A1	Compostos com membros de grupos funcionais > Piridina > Quinolina > Imidazol > Pirimidina > Dextran > Agarose > Ciclodextrina Grupos funcionais > Carboxílicos > Fenólicos	-	-	Polieletrólitos
US 20050019755 A1	Polissacárideo	-	Diferentes	Proteína

			amostras biológicas	
<b>US 4672040</b>	Silano	0,5-0,8	Células, bactérias e vírus	Ácidos nucleicos
<b>US 005705628 A</b>	Grupos carboxílicos	1	Diferentes meios	DNA e RNA
<b>WO 2009143499 A1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Dextran</li> <li>➤ Celulose</li> <li>➤ Polietilenoglicol</li> <li>➤ Heparina</li> <li>➤ Glicogeno</li> <li>➤ Amido</li> <li>➤ Dextrina</li> <li>➤ Celodextrina</li> </ul>	-	Diferentes amostras biológicas	Ácidos nucleicos
<b>PRESENTE INVENÇÃO</b>	Polianilina	0,087	Soluções aquosas e sangue total	Ácidos nucleicos

### Sumário

[023] A presente invenção detalha um método novo, rápido, simples e de baixo custo para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos diretamente a partir de sistemas biológicos, ou quando dissolvidos em meios aquosos. Esta invenção faz uso de um NCM que consiste de um núcleo de óxido de ferro revestido por uma camada de Pani.

[024] Num primeiro aspecto, a invenção descreve as metodologias usadas para a obtenção e caracterização do NCM. Para isso, inicialmente foram sintetizadas nanopartículas (NPs) de óxido de ferro, a partir do método de co-precipitação química, utilizando cloreto ferroso ( $\text{FeCl}_2$ ) e cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) como fontes de ferro, e hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) como precipitador. Subsequentemente, o NCM é sintetizado através do método de polimerização em emulsão da anilina numa solução de HCl contendo as NPs de óxido de ferro e um surfactante. A morfologia, a composição, o tamanho e as propriedades magnéticas das NPs e NCMs foram obtidos a partir de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), espalhamento dinâmico da luz, e curvas de magnetização.

[025] O NCM obtido se caracteriza por conter NPs de óxido de ferro revestidas por uma matriz de Pani. Nosso interesse na utilização da Pani é pelo fato da sua propriedade de protonação/desprotonação ser dependente do pH do sistema. Por exemplo, quando a Pani está em meio ácido, ela possui cargas positivas na sua superfície, e pode ser desprotonada só por mudanças no pH do sistema (pH neutro ou básicos). Essa propriedade torna a Pani uma plataforma ideal para a interação com biomoléculas. Por exemplo, a Pani pode interagir com ácidos nucleicos através de uma interação eletrostática entre suas cargas positivas e as cargas negativas dos grupos fosfato dos ácidos nucleicos.

[026] Em segundo lugar, a invenção proporciona um NCM de Pani/(óxido de ferro), para o qual não existem precedentes de sua utilização em kits ou métodos de extração, separação, concentração e purificação de moléculas biológicas. A isso se acresce o fato de que, por conta das propriedades magnéticas do NCM, o complexo NCM/biomolécula pode ser recuperado do meio mediante a aplicação de um campo magnético externo. A biomolécula de interesse pode ser obtida a partir de células, vírus e bactérias. Algumas das biomoléculas são proteínas, peptídeos, carboidratos, glicopeptídeos, glicoproteínas e ácidos nucleicos, entre outros.

[027] Em uma exemplificação desta patente, o NCM foi utilizado para separar e concentrar de DNA de esperma de salmão a partir de soluções aquosas. Em outra, o NCM foi utilizado para extrair, concentrar e purificar DNA genômico a partir de sangue total de humanos. Nesse sentido, a invenção apresenta métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos e, em algumas de suas exemplificações, o método compreende: (i) a ruptura da membrana celular, (ii) a adição do NCM à solução que contém as células com suas membranas rompidas, (iii) a mistura e interação do NCM e o material biológico de interesse, (iv) a separação magnética do complexo NCM/ácido nucleico através da aplicação um campo magnético externo, (v) o descarte do sobrenadante e subsequente lavado do complexo NCM/ácido nucleico através de um tampão de lavado, e (vi) a liberação do ácido nucleico a partir do NCM através do uso de um tampão de eluição.

[028] Pelo termo "*polianilina*" entenda-se o polímero condutor obtido a partir da polimerização da anilina em meio ácido. Esse polímero possui interessantes características e propriedades, tais como baixo custo de síntese, biocompatibilidade, propriedades elétricas e óticas especiais, excelente estabilidade ambiental e uma

química simples de protonação/desprotonação. Em particular, essa última propriedade permite à Pani, a depender do pH do sistema, ter ou não cargas positivas em sua superfície.

[029] Pelo termo “*óxido de ferro*” entenda-se compostos formados por ferro (Fe), oxigênio (O) ou grupos hidroxila (OH). Existem 16 óxidos de ferro, os quais estão classificados em óxidos, hidróxidos ou óxido-hidróxidos. Os dois óxidos de ferro mais usados são a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), devido a suas excelentes propriedades magnéticas, que fazem com que sejam de grande interesse em diferentes áreas da ciência. Em particular, estes óxidos têm atraído muito atenção em sua forma nanoestruturada. Na presente patente foram utilizadas NPs de maghemita.

[030] Pelo termo “*nanocompósito*” entenda-se material que possui pelo menos dois componentes ou duas fases, e onde pelo menos um dos componentes tem dimensões na escala nanométrica. As propriedades físicas e químicas dos componentes individuais são distintas, porém, quando são misturados, o nanocompósito adquire as características de ambos.

[031] Pelo termo “*interação não específica*” entenda-se uma interação não covalente. Mais especificamente, na presente patente nos referimos à interação elétrica entre as cargas positivas do polímero e os grupos carregados negativamente dos ácidos nucleicos.

[032] Pelo termo “*biomolécula*” entenda-se qualquer molécula que é produzida por organismos vivos, tais como proteínas, peptídeos, glicopeptídeos, glicoproteínas, ácidos nucleicos, entre outros.

[033] Pelo termo “*ácidos nucleicos*” entenda-se biomoléculas ou macromoléculas poliméricas formadas por nucleotídeos unidos numa cadeia por meio de ligações fosfodiéster. Existem dois tipos de ácidos nucleicos; o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA).

[034] Pelo termo “*extração*” entenda-se a separação de biomoléculas de interesse (ácidos nucleicos, proteínas, entre outros) de amostras biológicas, após a ruptura da membrana celular.

[035] Pelo termo “*separação*” entenda-se o confinamento de biomoléculas de interesse (ácidos nucleicos, proteínas, entre outros) a partir de soluções aquosas ou biológicas.

[036] Pelo termo “*concentração*” entenda-se o aumento na quantidade de alguma biomolécula de interesse (ácidos nucleicos, proteínas, entre outros) em um dado volume.

[037] Pelo termo “*purificação*” entenda-se remover os contaminantes das biomoléculas de interesse.

### **Problemas e limitações do estado da técnica**

[038] A extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos são procedimentos amplamente utilizados em vários campos da medicina, sendo uma das primeiras etapas para o diagnóstico de diferentes doenças, identificação de novos genes, estudos de microrganismos, sequenciamento, manipulação genética, dentre outras áreas de ciência biológica e biomédica. Na verdade, muitas metodologias e protocolos têm sido utilizados para extrair, separar, concentrar ou purificar os ácidos nucleicos, no entanto, a maioria deles requer muitas etapas para a sua implementação, tais como precipitação, centrifugação, filtração ou separação cromatográfica e, portanto, consomem muito tempo. Além disso, alguns desses métodos fazem uso de solventes tóxicos para o usuário e o ecossistema, como é um exemplo o método baseado no uso de Fenol-Clorofórmio.

[039] Portanto, na presente invenção destacamos o uso de um NCM que tem a capacidade de interagir com ácidos nucleicos de forma não específica e que pode ser utilizado em kits e métodos de extração, separação, concentração e purificação. A metodologia usando esse NCM é simples, rápida, de baixo custo e não requer do uso de solventes químicos tóxicos.

### **Vantagens da invenção**

[040] As principais vantagens do uso deste NCM em kits ou métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas biológicos ou meios aquosos são; (i) não requer do uso de solventes químicos tóxicos, (ii) a metodologia utilizada é simples e de baixo custo e não requer o uso de equipamentos sofisticados, (iii) não necessita de pessoal altamente qualificado ou treinado para sua execução (iv) o tempo necessário para completar todas as etapas é bem mais curto, quando comparado com os métodos de convencionais, (v) o fato do material ser magnético faz possível que o NCM possa ser retirado do meio pela aplicação de um campo magnético externo, (vi) o NCM apresentado nesta invenção tem um percentual de dessorção alto (~100 %) em um curto período de tempo (< 2 min) e (vii) o NCM como um todo (partícula magnética e camada polimérica) possui dimensões na escala nanométrica, tendo assim uma maior área superficial disponível para interagir com as biomoléculas.

#### **A novidade e o efeito técnico alcançado**

[041] Até o momento, nenhuma instituição de pesquisa, ensino ou indústria utilizou um NCM de Pani/óxido de ferro em kits ou métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas biológicos ou meios aquosos.

#### **Breve descrição das Figuras**

[042] A **Fig. 1** apresenta uma micrografia MET das NPs  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

[043] A **Fig. 2** apresenta uma micrografia MET dos NCMs Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

[044] A **Fig. 3** apresenta as curvas de magnetização à temperatura ambiente das NPs  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**a**) e do NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**b**).

[045] A **Fig. 4** apresenta os espectros de absorção no infravermelho do NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**a**), Pani (**b**), e as NPs  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**c**).

[046] A **Fig. 5** apresenta os espectros de absorção UV-Vis da solução de DNA antes e depois da interação com o NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, além do espectro da solução após da liberação do DNA a partir do NCM.

[047] A **Fig. 6** apresenta o efeito do tempo de interação sobre a recuperação de DNA pelo NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Para 1 mg (**a**), 2 mg (**b**), 3 mg (**c**) e 4 mg (**d**) de NCM adicionadas em 10 mL de uma solução de 50 mg/L de DNA.

[048] A **Fig. 7** apresenta o processo de eluição de DNA pelo NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como uma função do pH. Para 4 mg de NCM adicionadas em 10 mL de uma solução de 50 mg/L de DNA.

[049] A **Fig. 8** apresenta o espectro de absorção UV-Vis da solução do DNA genômico extraído a partir de sangue total.

[050] O **Esquema 1** apresenta um diagrama geral das diferentes etapas envolvidas no procedimento usado na recuperação e eluição de DNA pelo NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a partir de soluções aquosas. Inicialmente temos uma solução de DNA (**a**); posteriormente, é adicionado o NCM e permitida a interação por alguns minutos (**b**); após isso, o complexo DNA/NCM é confinado magneticamente e o sobrenadante descartado (**c**); por último, o DNA recuperado é eluído do NCM e o mesmo retirado da solução (**d**).

### **Descrição detalhada da invenção**

#### **Síntese das NPs de $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

[051] As NPs de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram obtidas através do método de co-precipitação química descrito na Ref. [1] com leves modificações. O processo pode ser detalhado na seguinte forma: foram preparadas duas soluções de 25 mL cada uma, a primeira contendo FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1 M), e a segunda FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (2 M). As duas soluções foram misturadas em um balão de fundo redondo de 250 mL sob agitação vigorosa. Depois disso, foram adicionados rapidamente 125 mL de uma solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH (50 % vol); a solução resultante foi mantida sob agitação durante um determinado tempo e, uma vez formadas as NPs, elas foram decantadas com ajuda de um imã. Subsequentemente, as NPs foram lavadas com água deionizada, e o imã foi utilizado mais uma vez para decantar as NPs de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; este processo foi repetido quatro vezes para minimizar a contaminação de impurezas não magnéticas. Por último, as NPs foram

secas em um forno e posteriormente pulverizadas em um almofariz, resultando em um pó de cor marrom.

### **Síntese dos NCMs de Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

[052] Os NCMs de Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram sintetizados usando o método de polimerização em emulsão da anilina [2], com a polimerização realizada em um balão de fundo redondo de 250 mL, onde foram adicionados 100 mL de uma solução de HCl (0,1 M), dodecilsulfato de sódio (SDS, 60,7 mM), NPs de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e anilina (1,5 mM). Essa solução foi agitada e, posteriormente, foram adicionados ao balão 20 mL de HCl (0,1M) contendo 1,5 mM de persulfato de amônio (APS). Todo o processo de polimerização foi mantido sob agitação. A solução resultante foi lavada várias vezes com metanol e água deionizada, e durante essas lavagens foi utilizado um ímã para confinar magneticamente o produto no fundo do recipiente. Em seguida, o produto foi lavado com HCl (0,1M), secado em um forno e macerado, resultando em um pó verde escuro.

### **Métodos de caracterização das NPs e NCMs**

[053] As NPs e NCMs foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), e medidas magnéticas. As micrografias MET foram obtidas usando um microscópio Tecnai20 (FEI, EUA) operando a uma tensão de aceleração de 200 kV. Os espectros IV das amostras de interesse foram obtidos na faixa de 4000–400 cm<sup>-1</sup> por usar pastilhas de KBr num espectrofotômetro IFS-66 (Bruker, EUA). As curvas de magnetização foram obtidas usando um magnetômetro de amostra vibrante EV7 (MicroSense, EUA). O tamanho hidrodinâmico do NCM foi obtido a partir de um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido), com base no espalhamento dinâmico de luz (DLS).

### **Características das NPs e NCMs**

[054] O método de síntese de partículas de óxido de ferro utilizado nesta invenção fez uso de sais de ferro divalente ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ), e como precipitador utilizou-se uma solução básica de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A partir desse método foi obtido um pó de cor marrom; ao analisá-lo através de MET, se encontrou que as partículas de óxido de ferro têm tamanhos manométricos, com morfologias quase esféricas (**Fig. 1**). A distribuição de tamanhos foi de 5,5-28,0 nm com diâmetros médios de  $(14,0 \pm 7,5)$  nm.

[055] Por outro lado, os NCMs de Pani/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  foram sintetizados pela polimerização química da anilina utilizando SDS como estabilizador e APS como agente oxidante. O produto foi obtido através deste método em forma de um pó verde escuro, a partir de microscopias MET se observou que os compósitos consistem de uma ou várias NPs de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  revestidas por uma camada de Pani; o compósito apresentou tamanhos na escala nanométrica (**Fig. 2**). A partir do DLS, se encontrou que o diâmetro médio dos NCMs Pani/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  foi na faixa de 50 nm a 142 nm, com um diâmetro médio de  $(87 \pm 32)$  nm, resultado consistente com o observado por MET.

[056] As propriedades magnéticas das NPs  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e NCMs Pani/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (**Fig. 3**) foram estudadas através de curvas de magnetização à temperatura ambiente. A curva de magnetização para as NPs  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  exibe um comportamento superparamagnético, com uma magnetização de saturação ( $M_s$ ) de 60 emu/g (**curva a**); por outro lado, o valor de  $M_s$  para o NCM Pani/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  foi de 30 emu/g (**curva b**). Esse último valor indica que, mesmo depois de serem as NPs  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  revestidas com a Pani, os NCMs ainda apresentam uma resposta magnética satisfatória na presença de um campo magnético externo.

[057] Espectroscopia no IV foi utilizada para determinar a composição dos NCMs Pani/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (**Fig. 4**). O espectro do NCM Pani/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (**curva a**) apresentou os mesmos picos característicos observados nos espectros para a Pani pura (**curva b**) e para as NPs  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (**curva c**). Esses resultados sugerem a presença das duas espécies (Pani e óxido de ferro) no NCM. As principais bandas características são (i) o pico em  $3420\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibração de estiramento N-H da Pani, (ii) as bandas em  $2919\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídos ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos  $-\text{CH}_2-$ , respetivamente, (iii) os picos em  $1566\text{ cm}^{-1}$  e  $1482\text{ cm}^{-1}$  são devidos ao estiramento C=C dos anéis quinóide e benzenóide, respectivamente, enquanto o pico em

800  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído a C-H fora do plano de deformação no anel benzenóide, (iv) os picos em 1295  $\text{cm}^{-1}$  e 1242  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionados à vibração de estiramento do anel benzenóide, e, finalmente, (v) os picos a 636  $\text{cm}^{-1}$  e 585  $\text{cm}^{-1}$  são devido a vibrações Fe-O.

### Extração, separação, concentração e purificação de DNA

#### Exemplo 1

#### Separação e concentração de DNA a partir de soluções aquosas

[058] Para realizar os experimentos de separação de DNA foram colocados 10 mL de uma solução de DNA de esperma de salmão (50 mg/L) dentro de um frasco de vidro. O pH da solução foi ajustado para um valor de 3,8. Posteriormente, foram adicionados 4 mg do NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, e se permitiu a interação sob agitação durante 2 h. Após desse tempo, o NCM foi decantado magneticamente através da utilização de um ímã e se tomou uma alíquota do sobrenadante para calcular através de espectroscopia UV Vis (absorbância em 260 nm) a concentração de DNA na solução, após a interação com o NCM. Na **Fig. 5** podemos observar os espectros de absorção UV-Vis da solução de DNA antes e depois da interação com o NCM Pani/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, onde pode ser visto que o pico característico do DNA em 260 nm diminui depois da interação com o NCM, indicando que o DNA está sendo capturado pelo NCM. O espectrofotômetro UV-Vis utilizado foi um FEMTO 80 MB (Cirrus, Brasil).

[059] Em uma exemplificação se estudou a capacidade do NCM para remover DNA de esperma de salmão como uma função do tempo de interação (5, 10, 30, 60, 120, 180 e 240 min) e doses de NCM (1 mg, 2 mg, 3mg e 4 mg) (**Fig. 6**). Para isso foram utilizados 10 mL de uma solução aquosa de DNA de 50 mg/L, onde o pH dessa solução foi ajustado para um valor de 3,8. Nesse gráfico se observou que para todos os casos, à medida que o tempo de interação aumentou, o percentual de DNA removido também aumenta, até alcançar um máximo, o qual indica que o NCM se saturou completamente de DNA e não pode remover mais DNA da solução. Também, se observou que quando foram adicionadas doses maiores (3 e 4 mg, **curva c e d**, respectivamente) do NCM à solução de DNA, a adsorção do DNA foi mais rápida quando comparado com doses menores (1 e 2 mg, **curva a e b**, respectivamente); em ambos os casos só foram necessários 10 min para que o NCM alcançasse a sua máxima capacidade de remoção 60 % e 64 %, para 3 mg e 4 mg, respectivamente.

[060] Em outra exemplificação foi investigado o processo de dessorção de DNA a partir do NCM através de mudanças de pH da solução (**Fig. 7**). Para isso foram adicionados 4 mg do NCM a um frasco contendo 10 mL de uma solução de DNA (pH de 3,8). Depois de 10 min de interação foi estimada a quantidade de DNA capturada pelo NCM. Subsequentemente, foi aumentado o pH da solução pela adição de pequenos volumes de NaOH. Neste estudo, depois de cada adição foi medida a absorbância em 260 nm, quando se encontrou que, conforme aumentamos o pH da solução, também aumenta o percentual de DNA dessorvido do NCM, alcançando percentuais de dessorção próximos ao 100 % quando o pH da solução atingiu um valor de 7,0. A interação entre o NCM e o DNA pode ser explicada da seguinte forma; quando a Pani está em um meio ácido, a sua cadeia tem vários sítios ativos carregados positivamente, os quais podem interagir com os grupos fosfatos negativos das cadeias de DNA. Após cada adição de NaOH, esses sítios são desprotonados, levando a uma redução drástica no número de sítios ativos no NCM que podem interagir com as moléculas de DNA. Como um todo, o processo de dessorção provou ser simples e rápido: demorou cerca de 2 min para que tudo o DNA fosse dessorvido do NCM.

[061] Na **Fig. 5** pode ser observado o espectro de absorção da solução depois da eluição do DNA a partir do NCM.

[062] No Esquema 1 mostramos um procedimento geral da separação e concentração de DNA a partir do uso do NCM.

## **Exemplo 2**

### **Extração, concentração e purificação de DNA a partir de sangue total de humanos**

[063] A presente invenção compreende o uso de um NCM que pode ser utilizado em kits ou métodos de extração, separação, concentração, purificação e detecção de biomoléculas, onde as biomoléculas podem compreender (mas não estão limitadas a) ácidos nucleicos, oligonucleotídeos e proteínas.

[064] A presente invenção compreende métodos de extração, separação, concentração, e purificação de ácidos nucleicos. Em algumas exemplificações, o método compreende: (i) a ruptura da membrana celular através de um tampão de lise celular e aumento da temperatura, (ii) a adição do NCM à solução que contém as células lisadas, (iii) a mistura do NCM e o material biológico de interesse e a interação deles por um determinado tempo, (iv) a separação magnética do complexo NCM/ácido

nucléico através da aplicação de um campo magnético externo, (v) o descarte do sobrenadante e subsequente lavado do conjunto NCM/(ácido nucléico) através de uma solução tampão de lavado, e (vi) a liberação da molécula de interesse a partir do NCM através do uso de uma solução tampão de eluição.

[065] Em algumas exemplificações, o tampão de lise celular pode fazer o uso de um composto regulador do pH, um surfactante, um agente quelante, um agente caotrópico, uma enzima protease e uma nuclease (RNase ou DNase).

[066] Em algumas exemplificações, o tampão de lise celular pode fazer uso de compostos reguladores do pH tal como Tris(hidroximetil)aminometano (Tris).

[067] Em algumas exemplificações, o tampão de lise celular pode fazer uso de um surfactante selecionado a partir dodecil sulfato de sódio (SDS), 4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol) (triton X-100), brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB), polioxietileno monolaurato de sorbitano (Tween 20) e lauril éter sulfato de sódio.

[068] Em algumas exemplificações, o tampão de lise celular pode fazer uso de um agente quelante como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

[069] Em algumas exemplificações, o tampão de lise celular pode fazer uso de compostos caotrópicos selecionados a partir de sais de guanidina, ureia e sais de isotiocianato.

[070] Em algumas exemplificações, o tampão de lise celular pode fazer uso de enzimas tal como a proteinase k.

[071] Em uma exemplificação baseada no uso do NCM para extração, concentração e purificação de DNA a partir de sangue total o seguinte processo foi implementado: (i) em um tubo eppendorf foram colocados 100  $\mu$ L de sangue e 900  $\mu$ L de uma solução tampão de lises (pH 4), (ii) a amostra foi incubada por alguns minutos a 56 °C e misturada num vortex em determinados faixas de tempo, (iii) se adicionou o NCM e se permitiu a interação a temperatura ambiente, (iv) o complexo NCM/DNA foi separado magneticamente e o sobrenadante foi descartado, (v) o complexo NCM/DNA foi lavado com 900  $\mu$ L de uma solução tampão (pH 4), (vi) o DNA foi eluído do NCM através do uso de uma solução tampão de eluição (pH 8), e finalmente (vi) o NCM é confinado na parede do eppendorf e o sobrenadante contendo o DNA é transferido a um novo tubo eppendorf. Através de um espectrofotômetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific, EUA) foi determinada a concentração de DNA na solução, como

correspondendo a valores na faixa de 200 a 350 ng/ $\mu$ L. Na **Fig. 8** é mostrado um dos espectros de absorção obtidos, no qual é possível apreciar um pico bem definido em 260 nm correspondente ao DNA. Além da espectroscopia UV-vis, também se realizou eletroforese em gel de agarose, onde se observa uma banda bem definida indicando a presença e integridade do DNA.

### Referências

1. Apesteguy, J. and S. Jacobo, *Synthesis of a soluble polyaniline–ferrite composite: magnetic and electric properties*. *Journal of Materials Science*, 2007. **42**(17): p. 7062-7068.
2. Medina-Llamas, J.C., et al., *Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014. **434**(0): p. 167-174.

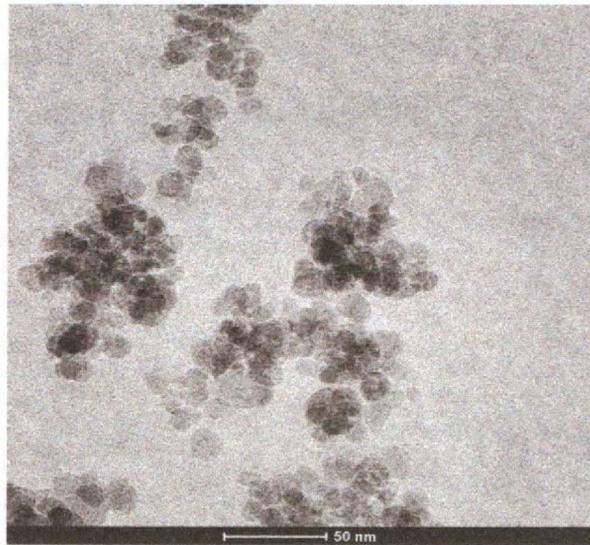
# **NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/ (ÓXIDO DE FERRO) PARA A EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

## **Reivindicações**

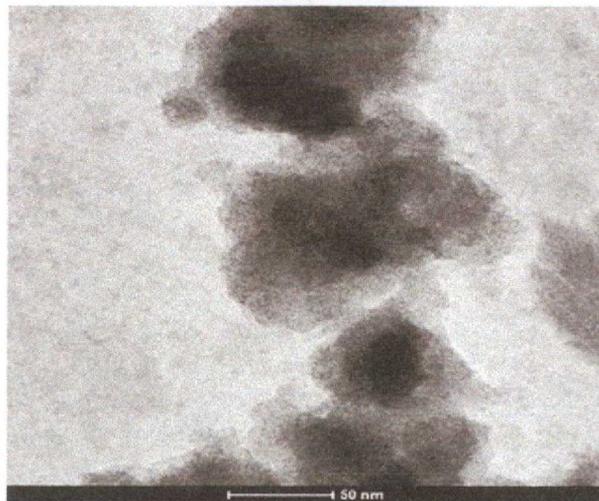
1. NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), caracterizado por ser obtido através do método de polimerização em emulsão da anilina numa solução de HCl contendo as NPs de óxido de ferro e um surfactante, sendo que o referido nanocompósito pode ser utilizado em kits ou métodos de extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas de interesse a partir de sistemas biológicos ou meios aquosos.
2. NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido nanocompósito consiste de uma ou várias partículas magnéticas envolvidas por polianilina.
3. NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as partículas magnéticas podem ser óxidos de ferro tais como magnetita, maghemita, hematita, e/ou qualquer ferrita metálica.
4. NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme reivindicações 2 e 3, caracterizado pelo fato de que a partícula magnética pode ter tamanhos na escala nanométrica ou micrométrica.
5. NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o conjunto da partícula magnética polímero/(óxido de ferro) pode ter tamanhos na escala nanométrica ou micrométrica.
6. NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o nanocompósito magnético contém na sua superfície grupos funcionais carregados positivamente que podem interagir com biomoléculas de interesse de forma não específica através de interação eletrostática.
7. NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que os grupos funcionais são imina e/ou amina.
8. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as biomoléculas de interesse podem ser derivadas a partir de células, vírus ou bactérias.

9. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme reivindicações 1 e 8, caracterizado pelo fato de que a biomolécula de interesse pode ser obtida a partir de amostras biológicas tais como sangue, saliva, sêmen, tecidos, urina, células bucais, de plantas e de microorganismos.
10. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme reivindicações 1, 8 e 9, caracterizado pelo fato de que a biomolécula de interesse pode ser derivada, em particular, a partir de amostras de sangue total.
11. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme reivindicações 1, 8-10, caracterizado pelo fato de que as biomoléculas de interesse podem ser ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas.
12. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que as biomoléculas de interesse podem ser, em particular, mas não limitado a, ácidos nucleicos.
13. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico pode ser o ácido desoxirribonucleico (DNA).
14. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico pode ser o ácido ribonucleico (RNA).
15. USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/(ÓXIDO DE FERRO), conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o nanocompósito pode ser usado para o aumento da concentração de moléculas biológicas, podendo com isso servir o intervalo de aplicabilidade de diferentes testes de diagnóstico e/ou de identificação dessas moléculas.
16. PROCESSO, conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a biomolécula de interesse pode ser eluída da superfície do nanocompósito magnético através de mudanças do pH do sistema.
17. PROCESSO, conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas do complexo formado pelo nanocompósito magnético com a biomolécula de interesse podem ser removidas do sistema biológico ou meio aquoso através da aplicação de um campo magnético.

**FIGURAS**



**Fig. 1**



**Fig. 2**

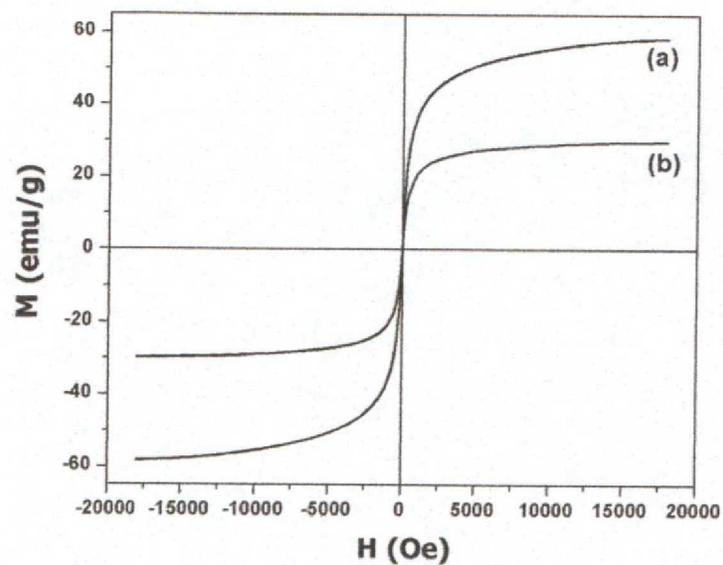


Fig. 3

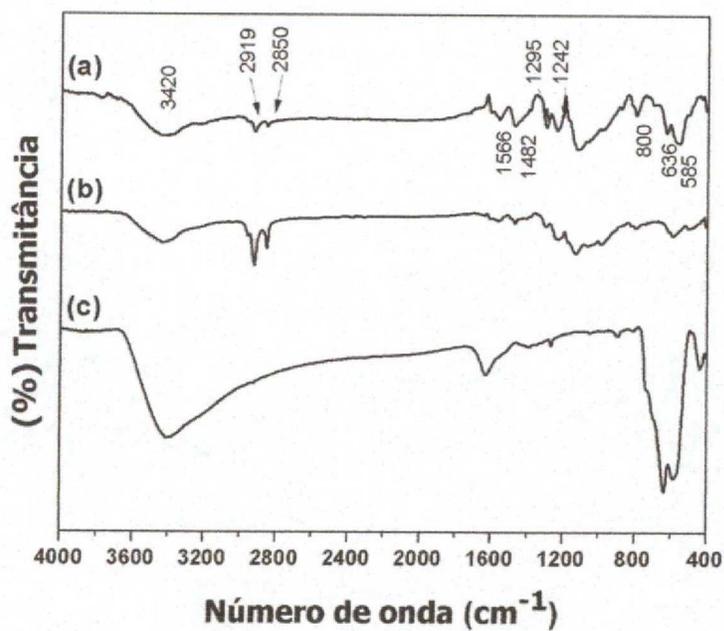


Fig. 4

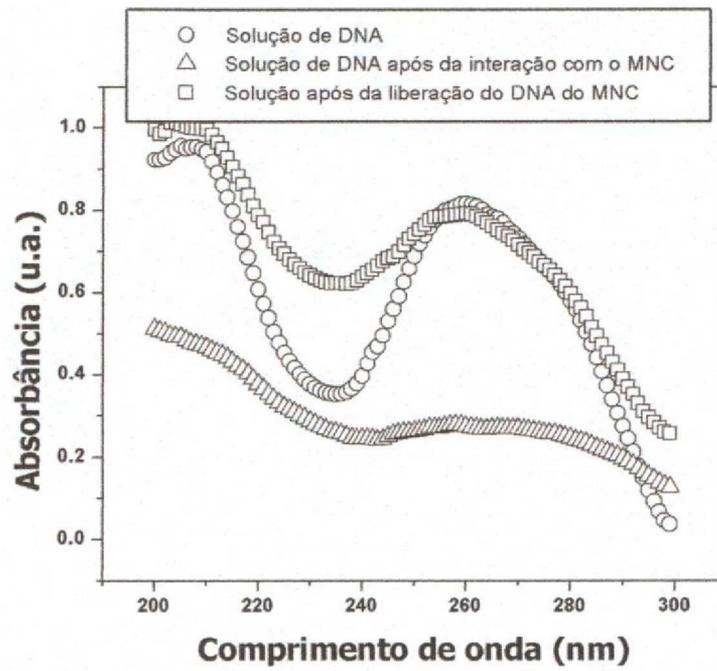


Fig. 5

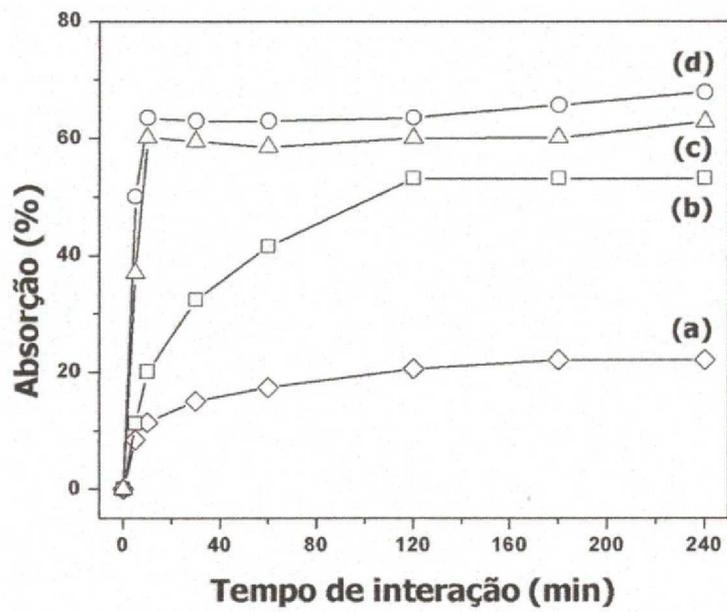


Fig. 6

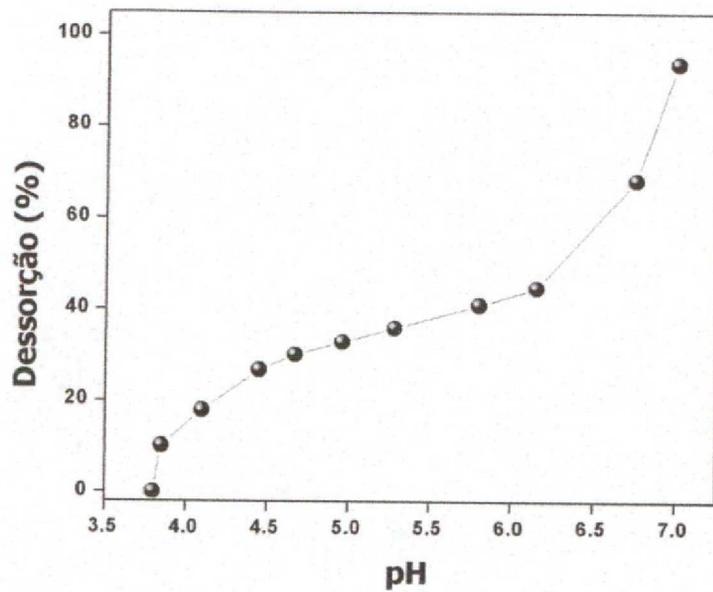


Fig. 7

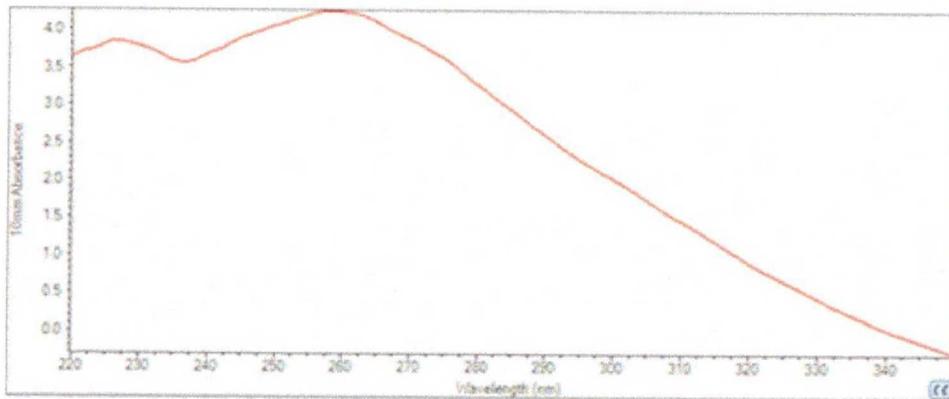
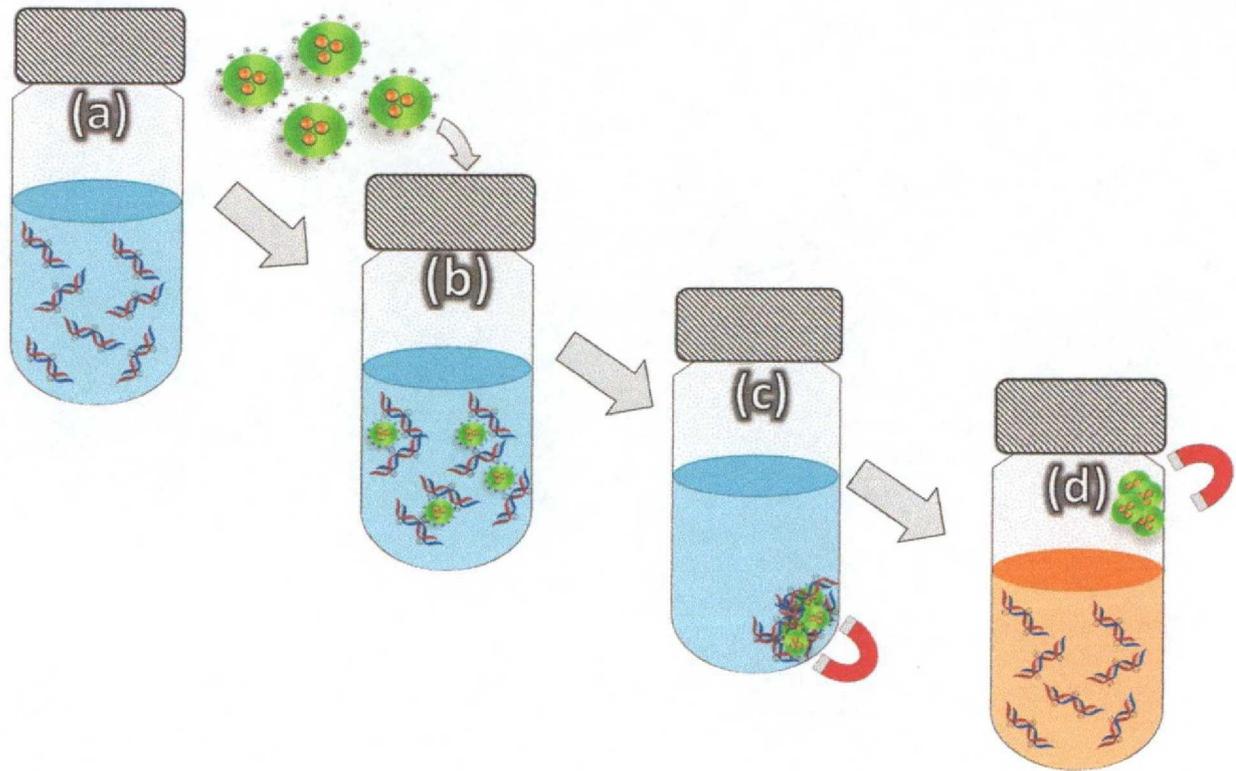


Fig. 8



Esquema 1

# **NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO POLIANILINA/ (ÓXIDO DE FERRO) PARA A EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

## **Resumo**

Atualmente, existem diversos métodos para a extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas (mais especificamente, ácidos nucleicos). No entanto, em sua maioria tais métodos apresentam alguns inconvenientes. Por exemplo, a sua implementação pode requerer a execução de várias etapas, como precipitação, centrifugação, filtração e separações cromatográficas, e assim, portanto, consumir muito tempo. Além disso, vários desses métodos fazem uso de solventes tóxicos para o usuário e o ecossistema. Em anos recentes, a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos através do uso de partículas magnéticas funcionalizadas têm encontrado uso crescente como uma técnica que apresenta várias vantagens em relação aos métodos convencionais. Além de ser um processo mais econômico e que, na maioria dos casos, não faz uso de solventes tóxicos, tais métodos têm como vantagens adicionais sua simplicidade e rapidez.

A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético (NCM) sob a forma de kits contendo um conjunto de materiais e uma sequência de métodos de extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas biológicos ou quando dissolvidos em meios aquosos, sendo tais processos amplamente utilizados nas mais diversas áreas, tais como biologia, medicina, química, entre outras. O NCM consiste de um núcleo magnético revestido pelas cadeias do polímero condutor, as quais, através de interações eletrostáticas, podem se associar de forma não específica com ácidos nucleicos, proteínas ou qualquer molécula biológica que possua carga superficial negativa. O complexo NCM/biomolécula pode ser removido do meio líquido através da aplicação de um campo magnético externo e, subsequentemente, as biomoléculas podem ser separadas do NCM através de mudanças controladas das condições físico-químicas do meio (tal como o valor de seu pH). Posteriormente, após sua concentração e purificação, o ácido nucleico ou molécula biológica de interesse pode ser identificado, quantificado e utilizado em diversos processos e protocolos biotecnológicos, tais como diagnóstico de doenças infecciosas ou de origem genética, provas de paternidade, entre outras práticas clínicas e de pesquisa científica.