



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

(21) BR 102018073701-5 A2



(22) Data do Depósito: 16/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 02/06/2020

(54) **Título:** NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE ÓXIDO DE FERRO E POLITIOFENO E SEUS DERIVADOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS

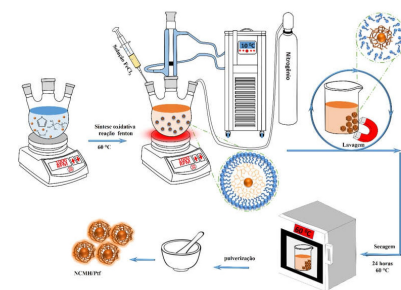
(51) **Int. Cl.:** C08G 61/12; C08K 3/22; B01J 20/02; B01J 20/28; C12N 15/10; (...).

(52) **CPC:** C08G 61/126; C08G 2261/3223; C08K 3/22; C08K 2003/2265; B01J 20/0229; (...).

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

(72) **Inventor(es):** CELSO PINTO DE MELO; ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA; GRACIELA DA COSTA PEDRO; FILIPE DIONE SOUZA GORZA; BRUNA GOMES MAÇIEL; GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI; JUAN CARLOS MEDINA LLAMAS; ALICIA ELIZABETH CHÁVEZ GUAJARDO; JOSÉ JARIB ALCARAZ ESPINOZA.

(57) **Resumo:** NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE ÓXIDO DE FERRO E POLITIOFENO E SEUS DERIVADOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético híbrido (NCMH) composto por partículas magnéticas revestidas pelo polímero condutor politiofeno (Ptf), ou algum de seus derivados, como material adsorvente de fase sólida em uma série de metodologias para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas presentes em amostras biológicas ou em meios aquosos. O NCMH adsorve as biomoléculas de interesse a partir de um mecanismo de interação eletrostática, no qual as cargas positivas dispersas ao longo das cadeias poliméricas do NCMH atraem as cargas superficiais negativas dos ácidos nucleicos e de outras biomoléculas carregadas negativamente. Uma vez que as biomoléculas tenham sido adsorvidas no nanocompósito, as propriedades magnéticas do mesmo possibilitam seu confinamento e separação do meio por intermédio da utilização de um ímã, quando, em seguida, a biomolécula capturada na superfície do NCMH pode ser dessorvida por meio da alteração dos parâmetros físico-químicos do meio, como por exemplo, pH ou concentração iônica, ou pela variação de temperatura das soluções. Após a aplicação dos protocolos, os ácidos nucleicos ou as biomoléculas em geral podem ser identificadas.(...).



NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE ÓXIDO DE FERRO E POLITIOFENO E SEUS DERIVADOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS

[001] A presente invenção estende-se ao uso de um composto de óxido de ferro e o polímero politiofeno, ou seus derivados, como material adsorvente em protocolos de extração, separação, concentração, e purificação de biomoléculas de interesse, como proteínas, ácidos nucleicos, entre outras, a partir de uma variedade de sistemas biológicos complexos (sangue, saliva, urina, células animais, vegetais, de algas ou fungos, cultura de bactérias ou vírus, etc) ou meios aquosos. Sendo ainda o método capaz de ser ampliado para a extração, separação, concentração, e purificação de quaisquer outros tipos de moléculas que venham a exibir afinidade eletrostática com o referido nanocompósito. Particularmente, estes processos são extensivamente utilizados em diversas áreas do conhecimento, tais como biologia, medicina, química, biotecnologia, engenharia genética, entre outras, como parte fundamental na preparação de amostras destinadas ao diagnóstico de patologias, práticas clínicas, estudos genéticos, e atividades de pesquisa científica.

Antecedentes da invenção

[002] Os ácidos nucleicos (DNA, RNA) são essenciais para a manutenção de todos os organismos vivos. O ácido desoxirribonucleico (DNA) é o responsável principal pela transmissão das informações genéticas, enquanto o ácido ribonucleico (RNA) pode ter funções distintas, como mensageiro, transportador e ribossomal (isto é, responsável pela síntese de proteínas). Para os procedimentos adotados para a extração e purificação de ácidos nucleicos, quatro etapas são necessárias: (I) ruptura da membrana celular, (II) extração do material alvo, (III) remoção de contaminantes e, por fim, (IV) a eluição do material adsorvido. Assim, a etapa de extração é determinante para a qualidade da amostra, sendo o ponto de partida para aplicações tão diversas como na área forense, na indústria farmacêutica, em biologia (principalmente em diagnóstico molecular), epidemiologia, e sequenciamento genético. Deve ser lembrado que para ocorrer a extração de biomoléculas é necessário que grupos catiônicos (aminos, enxofre) possam

interagir com grupos aniônicos, como, por exemplo, o fosfato presente nos ácidos nucleicos.

[003] Existem dois métodos de extração consolidados para a extração de ácidos nucleicos, a extração líquido-líquido e aquela em fase sólida. A extração em fase líquida requer etapas adicionais de centrifugação, filtração, como também faz uso de solventes orgânicos tóxicos, como fenol ou clorofórmio, e assim requer maior atenção do operador, pois o descarte desses materiais pode prejudicar o meio ambiente. Na extração em fase sólida foram inicialmente bastante usados materiais à base de sílica, seja na forma de membranas, isto é, em colunas de centrifugação, ou partículas revestidas com biopolímeros, como quitosana, celulose ou com polímeros condutores, como a polianilina e o polipirrol. Nos últimos anos, tem adquirido destaque dentro da extração em fase sólida o uso de nanopartículas magnéticas, por permitirem o uso de menor número de equipamentos e uma maior agilidade do processo, pois através do uso de um ímã é possível separar o adsorvente (ou seja, o nanocompósito utilizado) do sobrenadante, isto é, da solução que contém a molécula alvo. Mesmo assim, a depender do adsorvente utilizado, pode-se fazer necessário o uso de solventes tóxicos, como por exemplo, o tiocionato de guanidina. Exemplos dos materiais citados, e alguns outros, são listados na Tabela 1.

[004] A patente (US005705628 A) [1] descreve o uso de micropartículas magnéticas modificadas com grupos funcionais carboxílicos para a extração e purificação de polinucleotídeos. O autor demonstrou que os polinucleotídeos se ligam de forma reversível e não específica às superfícies das micropartículas.

[005] A patente (BR 102014028423-0) [2] descreve o uso de um nanocompósito magnético (NCM) de polianilina/óxido de ferro, para a extração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas aquosos ou biológicos.

[006] Maciel e col. [3] descreveram em seu trabalho o uso do nanocompósito magnético híbrido de óxido de ferro/quitosana/polianilina ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Qui@Pani}$) para a purificação de DNA de amostras biológicas complexas.

[007] Gai e col. [4] reportaram em seu trabalho o uso de micropartículas magnéticas revestidas com polianilina e polipirrol para a separação de DNA; em

particular, nesse trabalho, o material foi utilizado para purificar o DNA genômico de células do fungo *Aspergillus niger*.

[008] A patente (CN10217419 B) [5] descreve o uso de diferentes partículas magnéticas para a separação e purificação do DNA. Estas partículas consistem de ferritas (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, MFe_2O_4 ; M = Ferro (Fe), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Manganês (Mn) e semelhantes), nano ou microesferas ou quase esféricas, com sua superfície revestida com polianilina ou polipirrol.

[009] Prodelalová e col. [6], em seu trabalho, descreveram o uso de nanopartículas de ferrita de cobalto, modificadas em sua superfície, ou não, através do uso de reagentes contendo grupos aminoetil e aminofenil fracamente básicos, ou ácido algínico. Nesse trabalho, o material foi utilizado para purificar o DNA a partir de células bacterianas e eritrócitos de frango, bem como foi feita a comparação do uso das partículas magnéticas com o de partículas de sílica.

[010] Rahnama e col. [7], em seu trabalho, reportaram a comparação de nanopartículas magnéticas, com superfícies funcionalizadas por camadas de óxido de silício e/ou óxido de titânio, para a extração e purificação de DNA plasmídico a partir de células bacterianas.

[011] A patente (US 20100009351 A1) [8] e os trabalhos de Ching e col. [9] e Hu e col. [10] descrevem o uso de nanopartículas magnéticas revestidas por um agente catiônico multivalente, a polietilenoimina (PEI), para a extração e purificação de DNA de diferentes amostras biológicas.

[012] Saraji e col. [11] descreveram em seu trabalho o uso de um nanocompósito magnético de zircônia para a separação e a purificação de ácidos nucleicos; em particular, nesse trabalho o material foi utilizado para purificar DNA plasmidial de células bacterianas.

[013] Em seus trabalhos, Li e col. [12], Sheng e col. [13], e Hikosaka [14] reportaram métodos para a extração e separação de DNA. Esses métodos fazem uso de nanopartículas de sílicas mesoporosa (MSN) e nanopartículas magnéticas revestidas com MSN (M-MSN), com superfície modificadas por grupos aminos a partir de sistemas aquosos.

TABELA 1. COMPARAÇÃO ENTRE PATENTES E ARTIGOS QUE UTILIZAM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA A EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.

PATENTE	Matriz (tipo)	Material utilizado para a modificação da matriz	Meio de Extração	Tipo de biomolécula
BR102014028423-0 & MEDINA-LLAMAS ET AL. (2014)	Nanopartículas magnéticas de γ -Fe ₂ O ₃	Polianilina	Soluções aquosas e sangue total	Ácidos nucleicos
CN102174195B	Partículas magnéticas	Polianilina ou polipirrol	Bactérias	DNA
GAI ET AL. (2013)	Microesferas magnéticas de γ -Fe ₂ O ₃	Polianilina ou polipirrol	Células de fungo <i>Aspergillus niger</i>	DNA
MACIEL ET AL. (2018)	Nanopartículas magnéticas de γ -Fe ₂ O ₃	Quitosana e polianilina	Soluções aquosas e sangue total	DNA
US005705628A	Micropartículas Magnéticas de γ -Fe ₂ O ₃	Grupos Carboxílicos	Diferentes meios	DNA, RNA e PNAs
RAHNAMA. (2016)	Nanopartículas magnéticas de γ -Fe ₂ O ₃	Óxido de silício e óxido de titânio	Bactérias	DNA
CHIANG ET AL. (2005) E HU ET AL. (2015)	Nanopartículas magnéticas de γ -Fe ₂ O ₃	Polietilenoimina (PEI)	Bactérias Soluções aquosas	DNA DNA
US 2010009351 A1	Micropartículas Magnéticas	Polietilenoimina	Diferentes amostras biológicas	DNA
SARAJI ET AL. (2017)	Nanocompósito magnético de Zircônia	-	Soluções aquosas e bactérias	DNA

LI ET AL.(2011)	Nanopartículas magnéticas de sílica mesoporosa	-	Soluções aquosas	DNA
SHENG ET AL. (2016)	Nanopartículas magnéticas de sílica mesoporosa	Grupos aminos	Soluções aquosas	DNA
HIKOSAKA ET AL. (2016)	Nanopartículas de sílica mesoporosa	Grupos aminos	Soluções aquosas	DNA
PRODELALOVÁ ET AL. (2004)	Partículas de sílica e ferrita de cobalto	Grupos aminos	Bactérias e eutrófitos do frango	DNA
PRESENTE TRABALHO	Nanopartículas magnéticas de γ -Fe ₂ O ₃	Politiofeno e seus derivados	Soluções aquosas e sangue total	Ácidos nucleicos

[014] Diante do apresentado, verificamos a disponibilidade de kits comerciais para a extração de DNA genômico, que fazem uso ou de membranas, como Reliaprep (Promega) e QIAamp (Qiagen), ou de partículas magnéticas, como, por exemplo, Magazorb (Promega) e MagAttract (Qiagen). Quando o uso dos materiais por nós sintetizados (nanopartículas magnéticas de γ -Fe₂O₃ revestidas por politiofeno ou seus derivados) foi comparado com a performance desses kits, obtivemos resultados promissores. Deve ser ainda ressaltado que até o momento não foi descrita na literatura a utilização dos NCMHs γ -Fe₂O₃/Ptf e γ -Fe₂O₃/Pedot para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos presentes em amostras de sistemas aquosos ou biológicos.

Sumário

[015] A presente invenção apresenta um novo método, simples e de baixo custo, para a extração, separação, concentração, e purificação de ácidos nucleicos encontrados em meios aquosos ou presentes em amostras biológicas complexas, através do uso de um

nanocompósito híbrido formado por um núcleo magnético de óxido de ferro recoberto por uma camada do polímero politiofeno ou de seus derivados.

[016] Em um primeiro aspecto, a invenção descreve os métodos utilizados para a síntese e caracterização do NCMH. Para esse fim, primeiramente foi realizada a síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPMs), através de uma rota química de co-precipitação, onde o cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e o cloreto de ferro (II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foram usados como precursores, e o hidróxido de amônia (NH_4OH) como agente de precipitação. Posteriormente, é realizado o revestimento das nanopartículas com o polímero politiofeno ou seus derivados (como, por exemplo, o poli(3,4-etilenodioxítiofeno) PEDOT) através da rota química de polimerização em emulsão sob atmosfera inerte, ou via a exposição das nanopartículas ao vapor de monômero do polímero. A caracterização da composição e morfologia tanto das NPMs como do NCMH foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e medidas de curva de magnetização.

[017] Os NCMHs obtidos são estruturalmente compostos por um núcleo magnético de NPs recoberto por um invólucro polimérico de politiofeno ou um de seus derivados. A utilização dos politiofenos como revestimento das NPMs se deve à propriedade dos mesmos apresentarem cargas positivas ao longo das cadeias poliméricas em acordo com as características (pH, concentração iônica, entre outras) do meio físico-químico em que se encontram e, ainda, do fato que a alteração das condições físico-químicas pode ocasionar a perda de tais cargas. Essa propriedade de aquisição e perda de cargas positivas possibilita a interação do NCMH com moléculas e biomoléculas que apresentem cargas negativas superficiais. Por exemplo, o politiofeno é capaz de interagir eletrostaticamente com os grupos fosfato negativos das cadeias de ácidos nucleicos.

[018] Em um segundo aspecto, a atual invenção descreve nanocompósitos de (óxido de ferro)/Ptf, os quais não apresentam precedentes de seu uso como material adsorvente em protocolos de extração, separação, concentração, e purificação de biomoléculas. A isso se acrescenta o fato de que, devido às propriedades magnéticas do núcleo das NPMs que compõem o NCMH, se torna possível que as moléculas biológicas

adsorvidas na superfície do NCMH possam ser separadas e recuperadas facilmente do meio em que se encontram, pela aplicação de um campo magnético externo.

[019] Em um último aspecto, as moléculas biológicas de interesse podem ser provenientes de tecido celular animal, vegetal, de algas, fungos, de vírus, e de bactérias. Por sua vez, algumas dessas moléculas biológicas podem vir a ser proteínas, peptídeos, e preferencialmente, mas não apenas, ácidos nucleicos.

[020] Nas exemplificações demonstradas desta invenção, utilizamos dois NCMHs. O primeiro com o revestimento do polímero politiofeno e que foi usado para separar DNA de esperma de salmão dissolvido em meio aquoso, como um sistema modelo. E um outro revestido com o poli(3,4-etilenodioxítiofeno) (PEDOT), um derivado do politiofeno, que foi usado para extrair, concentrar e purificar DNA de amostras de sangue total de humanos, como um sistema mais realista. Deste modo, para a última exemplificação a invenção utiliza de métodos de extração, separação, e purificação de DNA que envolvem as seguintes etapas: (i) a lise celular para expor o material genético (DNA, RNA) e os demais componentes celulares (proteínas, citoplasma, organelas, entre outros), (ii) a inclusão do NCMH na solução com as células lisadas, (iii) a mistura e interação do NCMH com a biomolécula alvo, ou seja, no caso da exemplificação, o DNA, (iv) a separação do NCMH e da biomolécula adsorvida em sua superfície por meio do uso de um campo magnético aplicado por um ímã, (v) o descarte da solução sobrenadante, (vi) a lavagem do material confinado magneticamente com um solução tampão, e (vii) a ressuspensão da biomolécula em uma solução tampão de eluição capaz de desfazer sua interação com o NCMH.

[021] Pelos termos “*politiofeno*”, “*PEDOT*”, e “*derivados*” compreende-se os polímeros condutores obtidos através da polimerização dos monômeros de composto orgânico pentagonal cíclico possuindo como heteroátomo o enxofre, que podem ou não possuir diferentes grupos funcionais ligados ao anel cíclico. Essa família de polímeros exibe muitas características e propriedades relevantes, como, por exemplo, sínteses simples e de baixo custo, boa estabilidade química, propriedades elétricas e óticas particulares, e a adição de cargas ao longo da estrutura polimérica através de dopagem e/ou protonação.

[022] Pelo termo “*óxido de ferro*” compreende-se os compostos formados por ferro (Fe), oxigênio (O) e/ou grupos hidroxila (OH). Tais compostos estão classificados em óxidos e hidróxidos, sendo a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) os óxidos mais amplamente utilizados em muitos campos da ciência, por causa de suas notáveis propriedades, como alta magnetização de saturação, biocompatibilidade, e processabilidade, entre outros. Nessa invenção foram utilizadas partículas de maghemita com dimensões nanométricas.

[023] Pelo termo “*nanocompósito*” compreende-se um material que possui dois ou mais componentes ou fases, no qual ao menos um deles possui dimensões na escala nanométrica. Geralmente, os compósitos apresentam as propriedades físicas e químicas dos materiais que os compõem, mesmo que os materiais que formam o compósito apresentem propriedades distintas entre si.

[024] Pelo termo “*interação eletrostática*” compreende-se uma interação não covalente, caracterizada pela interação entre dipolos e/ou íons de cargas opostas. Particularmente, na presente invenção nos atentamos à interação entre as cargas positivas das cadeias poliméricas e os grupos fosfatos carregados negativamente dos ácidos nucleicos e outras biomoléculas.

[025] Pelo termo “*biomolécula*” compreende-se qualquer molécula que seja sintetizada por organismos vivos, como por exemplo proteínas, peptídeos, glicopeptídeos, glicoproteínas, aminoácidos, enzimas, carboidratos, ácidos nucleicos, dentre outras.

[026] Pelo termo “*ácidos nucleicos*” compreende-se macromoléculas biológicas poliméricas constituídas por nucleotídeos ligados entre si através de ligações fosfodiéster. Os ácidos nucleicos são de dois tipos; o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), que se diferenciam por seus grupos sacarídeos, bases nitrogenadas, estrutura, e as funções desempenhadas no organismo.

Problemas e limitações do estado da técnica

[027] Como apresentado anteriormente, existem inúmeros materiais e protocolos para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos. Esses métodos são utilizados principalmente nas áreas biomédicas e biológicas, sendo uma das principais etapas prévias aos procedimentos finais de diagnósticos moleculares de doenças,

sequenciamento e manipulação genética. Contudo, a maioria destes protocolos atuais são onerosos no tocante ao número de etapas necessárias, como, por exemplo, precipitação, filtração, separação de fase, centrifugação, ou cromatografia, o que conseqüentemente, acaba por ocasionar uma grande demanda de tempo. Outro ponto a se mencionar é o fato de que muitos desses protocolos requerem o uso de solventes orgânicos tóxicos, como os compostos fenólicos e o tiocianato de guanidina.

[028] À vista disso, a invenção descrita na presente patente propõe a utilização de um nanocompósito magnético híbrido capaz de adsorver ácidos nucleicos e outras biomoléculas através de interação eletrostática como sendo um método simples, rápido, e sem uso de solventes tóxicos para a extração, separação, concentração, e purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas.

Vantagens da invenção

[029] A utilização da presente invenção como material adsorvente de fase sólida para a extração, separação, concentração, e purificação de ácidos nucleicos traz como vantagens essenciais;

- 1) Não utilizar solventes orgânicos tóxicos devido a seu mecanismo de interação eletrostática entre as cadeias poliméricas e os ácidos nucleicos.
- 2) Apresentar um protocolo simples, rápido, e não requerer a utilização de equipamentos sofisticados.
- 3) A não obrigatoriedade de que apenas indivíduos com treinamento especializado possam vir a fazer sua utilização.
- 4) O tempo consumido para realizar todo o protocolo ser menor ao de muitos protocolos atualmente disponíveis.
- 5) O fácil confinamento e separação do NCMH e, conseqüentemente, da biomolécula adsorvida, de soluções ao se aplicar um campo magnético.
- 6) O nanocompósito usado apresentar uma grande área superficial devido a suas dimensões nanométricas, o que possibilita uma maior interação com as biomoléculas de interesse.

A novidade e o efeito técnico alcançado

[030] O avanço alcançado com essa invenção consiste no fato de que até o presente momento nenhuma instituição de pesquisa, ensino ou setor privado empregou um nanocompósito magnético híbrido de (óxido de ferro)/Ptf como um adsorvente de fase sólida para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas presentes em amostras biológicas ou em meio aquoso.

Breve descrição das Figuras

[031] A **Fig. 1** apresenta as principais etapas da síntese do NCMH/Ptf a partir da polimerização por emulsão do monômero de tiofeno.

[032] A **Fig. 2** apresenta as principais etapas da síntese do NCMH/Pedot a partir da polimerização via fase vapor do monômero edot.

[033] A **Fig. 3** apresenta os histograma da distribuição de tamanho das partículas (a) NPMs γ -Fe₂O₃ e dos (b) NCMH/Ptf e (c) NCMH/Pedot.

[034] A **Fig. 4** apresenta as curvas de magnetização das (a) NPMs γ -Fe₂O₃, do (b) NCMH/Pedot e do (c) NCMH/Ptf à temperatura ambiente.

[035] A **Fig. 5** apresenta os espectros de absorção no infravermelho das (a) NPMs γ -Fe₂O₃ e dos NCMH de (b) politiofeno e (c) Pedot.

[036] A **Fig. 6** apresenta uma representação esquemática das principais etapas empregadas nos procedimentos experimentais para a adsorção de DNA de esperma salmão em meio aquoso pelo NCMH.

[037] A **Fig. 7** apresenta os espectros de absorção UV-Vis de uma solução de DNA antes e após sua interação com o NCMH, bem como o espectro da solução de eluição após realizados os procedimentos de liberação do DNA a partir do uso do NCMH.

[038] A **Fig. 8** apresenta uma representação esquemática das diferentes etapas empregadas nos procedimentos para a extração, separação, purificação e concentração de moléculas de DNA pelo NCMH a partir de amostras de sangue total.

[039] A **Fig. 9** apresenta o espectro de absorção UV-Vis de uma solução de DNA purificada com o NCMH a partir de uma amostra de sangue total.

[040] A **Fig. 10** mostra a eletroforese em gel de agarose de duas amostras de DNA purificadas com o uso do NCMH: **(a)** eletroforese das amostras de DNA após o procedimento de purificação e **(b)** após serem amplificadas através da técnica de PCR.

[041] A **Fig. 11** mostra uma curva da amplificação por PCR (em tempo real) de uma amostra de DNA purificada a partir de sangue total humano empregando o NCMH.

Descrição detalhada da invenção

Exemplo 1. Preparação e caracterização das formas de realização preferidas do NCMH

Exemplo 1.1. Preparação das NPMs γ -Fe₂O₃

[042] A rota adotada para se produzir as NPMs de óxido de ferro foi a de coprecipitação química relatada na referência [15], com a realização de adaptações simples. A síntese pode ser descrita do seguinte modo: em um balão de fundo redondo são adicionados 50 mL de duas fontes de ferro; FeCl₂•4H₂O e FeCl₃•6H₂O, com razão de 1:2. Esta mistura é mantida sob forte agitação magnética, sendo em seguida, adicionados 125 mL de uma solução aquosa de NH₄OH. A reação é deixada ocorrer por um intervalo de tempo de 4 a 8 horas, e após isso as nanopartículas são decantadas com o auxílio de um ímã, sendo então seguido um ciclo de várias lavagens com água ultrapura para a retirada de quaisquer impurezas e/ou reagentes em excesso. O produto é seco a 50 °C em estufa por 48 horas e pulverizado com almofariz de ágata, obtendo-se ao final um pó fino de cor marrom escuro.

Exemplo 1.2. Preparação do NCMH de γ -Fe₂O₃/Politiofeno (NCMH/Ptf) via polimerização química em fase aquosa.

[043] A obtenção do NCMH através do revestimento das NPMs pode ser feita mediante polimerização por emulsão em atmosfera inerte do monômero, tiofeno ou seus derivados. Como exemplo, preparou-se um NCMH utilizando o monômero tiofeno. Essa síntese, adaptada da referência [16], foi realizada do seguinte modo: em um balão de 250 mL são adicionados 120 mL de água ultrapura e de 100 – 200 mg de CTAB (do inglês,

hexadecyltrimethylammonium bromide). Em seguida, adicionou-se uma quantidade de NPMs na faixa de 100 a 300 mg, e no entorno de 50 mmol do monômero tiofeno. Essa mistura foi deixada em agitação magnética por alguns minutos, quando foram então acrescidos aproximadamente 8 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente o sistema foi colocado em refluxo, a atmosfera oxidante foi retirada com um fluxo de nitrogênio, e a temperatura ajustada entre 50 - 80 °C em banho de óleo. Após isso, com o auxílio de uma seringa foram injetados 5 mL de solução metálica de $FeCl_3$ na reação, e a polimerização deixada ocorrer por algumas horas. Depois, o NCMH/Ptf obtido foi lavado com metanol e com água deionizada. Em cada etapa de lavagem, as NPMs revestidas com politiofeno foram separadas magneticamente com um ímã e o sobrenadante descartado. Por fim, o NCMH/Ptf produzido foi seco a 60 °C por 24 h e pulverizado, obtendo-se um pó fino de cor marrom escuro. Um esquema ilustrativo das principais etapas da síntese por emulsão do NCMH/Ptf é mostrado na **Fig. 1**.

Exemplo 1.3. Preparação do NCMH de γ - Fe_2O_3 /Pedot (NCMH/Pedot) via polimerização em fase vapor

[044] A preparação do NCMH também pode ser realizada a partir do revestimento das NPMs via polimerização em fase vapor do monômero tiofeno ou de seus derivados. Como uma exemplificação, preparou-se um NCMH a partir do monômero 3,4-etilenodioxítiofeno (Edot). Para isso, inicialmente uma massa de 50 a 200 mg de NPMs foi diluída em uma solução metálica de $FeCl_3$ e deixada secar sobre uma placa petri por algumas horas em temperatura ambiente. Em seguida, as NPMs impregnadas com $FeCl_3$ foram transferidas para um dessecador contendo Edot em seu interior. O dessecador foi então fechado e aquecido por algumas horas para permitir a exposição das NPMs impregnadas com $FeCl_3$ ao vapor de Edot. Depois, o NCMH/Pedot obtido foi deixado secar por 24 h sob fluxo de ar, lavado com metanol e com água deionizada. Em cada etapa de lavagem, as NPMs revestidas com Pedot foram separadas magneticamente com um ímã e o sobrenadante descartado. Finalmente, o NCMH/Pedot produzido foi seco a 60 °C por 24 h e pulverizado, obtendo-se um pó fino de cor azul escuro. Na **Fig. 2** são

apresentadas de forma esquemática as principais etapas da síntese por fase vapor do NCMH/Pedot.

Exemplo 1.4. Métodos de caracterização e as características do NCMH

[045] Para investigar a composição tanto das NPMs de óxido de ferro, quanto dos NCMHs produzidos conforme os procedimentos descritos nos **Exemplos 1.1, 1.2 e 1.3**, análises de FTIR foram realizadas (no intervalo de 2000–400 cm^{-1}) em um espectrômetro IR Tracer-100 (Shimadzu, Japão). As características morfológicas tanto das NPMs como dos NCMH foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio Mira3-LM FEG (TESCAN, República Tcheca). As distribuições de tamanho foram estimadas através da medida de 300 partículas a partir das microscopias de MEV utilizando o software imageJ. Para avaliar a resposta magnética, medidas de magnetização foram obtidas em um magnetômetro de amostra vibrante EV7 (MicroSense, EUA).

[046] Na **Fig. 3** apresenta os histogramas, que foram obtidos através da análise de várias micrografias MEV, verificou-se que as NPMs (**Fig. 3a**) apresentam tamanhos entre 15 e 25 nm, com um diâmetro médio de $(19,5 \pm 1,4)$ nm, enquanto que para o NCMH/Ptf (**Fig. 3b**) essa distribuição de tamanhos varia entre 35 e 48 nm, com um diâmetro médio de $(40,3 \pm 2,3)$ nm. Já para o NCMH/Pedot (**Fig. 3c**), obtido por polimerização química a vapor, o diâmetro médio foi estimado em $(24,8 \pm 1,6)$ nm, com a distribuição de tamanhos variando de 20 a 30 nm.

[047] Quanto às propriedades magnéticas, tanto as NPMs quanto os NCMHs apresentam comportamento superparamagnético em temperatura ambiente, conforme podemos ver na **Fig. 4**. A magnetização de saturação (M_s) para as NPMs de óxido de ferro pura (**curva a**) foi encontrada como sendo igual a 50 emu.g^{-1} , enquanto que para os NCMH/Pedot (**curva b**) e NCMH/Ptf (**curva c**) esse valor é reduzido a 33 emu.g^{-1} e 15 emu.g^{-1} , respectivamente. Embora haja uma redução, os NCMH mantêm um forte nível de magnetização, com a redução observada estando relacionada ao fato da fração de polímero incorporada às NPMs não contribuir para a M_s , que depende da massa total do material.

[048] A fim de confirmar a formação das NPMs de óxido de ferro e dos NCMH/Ptf e NCMH/Pedot produzidos e verificar sua composição, análises por espectroscopia de FTIR foram realizadas (**Fig. 5**). No espectro das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (**curva a**), duas bandas de absorção típicas correspondentes à vibração de alongamento Fe–O são observadas em 632 e 586 cm^{-1} . Já no espectro correspondente ao NCMH/Ptf (**curva b**), é observada uma combinação das vibrações típicas do politiofeno com aquelas apresentadas pelas NPMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. As bandas observadas em 794 e 896 cm^{-1} são referentes ao alongamento C–S–C do anel característico do tiofeno; já aqueles em 1035 e 1207 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento e à deformação no plano do C–H, respectivamente. O pico em 1695 cm^{-1} é relativo ao alongamento assimétrico da C=C do polímero. Por fim, como esperado, a presença dos picos em 632 e 586 cm^{-1} comprova a presença das NPMs. Em relação ao NCMH/Pedot (**curva c**), também observa-se uma combinação das vibrações típicas do Pedot e das NPMs: as bandas correspondentes ao revestimento das NPMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pelo Pedot são exibidas em 1520 cm^{-1} e 1344 cm^{-1} e podem ser atribuídas ao modo de alongamento assimétrico C=C e ao modo de alongamento inter-anel da ligação C–C, respectivamente; aquelas em 1203 cm^{-1} , 1146 cm^{-1} e 1089 cm^{-1} correspondem às vibrações de alongamento da ligação C–O–C no anel etilenodioxí; e as que aparecem em 983 cm^{-1} , 922 cm^{-1} , 843 cm^{-1} e 691 cm^{-1} são características das vibrações de alongamento da ligação C–S–C no anel tiofeno.

Extração, separação, purificação e concentração de moléculas de DNA usando o NCMH

[049] A presente invenção compreende a produção de NCMH à base de tiofeno (ou seus derivados) e seu uso em kits ou métodos para a extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas, preferencialmente de ácidos nucleicos.

[050] O NCMH descrito na presente invenção possui afinidade não específica por ácidos nucleicos, o que possibilita sua utilização em aplicações de extração, separação, concentração e purificação dessas biomoléculas. O polímero condutor que reveste o NCMH pode ser dopado e, portanto, possuir cargas positivas em sua cadeia. Assim, o NCMH pode interagir com moléculas de ácidos nucleicos através de interações eletrostáticas entre os grupos ativos do NCMH (cargas positivas) e os grupos fosfatos

presentes na estrutura dos ácidos nucleicos (carregados negativamente). Nas seções a seguir serão descritas algumas exemplificações de uso do NCMH, com o objetivo apenas de ilustrar algumas das diferentes possibilidades de aplicação da invenção. Assim, deixa-se compreendido, desde já, que a presente invenção não se limita às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos.

Exemplo 2. Captura, separação e eluição de DNA a partir de meios aquosos usando o NCMH

[051] Como uma exemplificação de uso da presente invenção, avaliou-se a capacidade do NCMH capturar moléculas de DNA a partir de meios aquosos. Para isso, primeiramente preparou-se uma solução estoque de DNA de esperma de salmão com concentração de 200 µg/mL. Depois, em um frasco contendo 4 mg do NCMH adicionou-se 500 µL de uma solução tampão de glicina/HCl (pH 2,8) e 500 µL da solução estoque de DNA e a mistura foi mantida sob agitação constante por alguns minutos (alternando com breve agitação em vórtex por alguns segundos). Por fim, após decorrido o período de interação, o NCMH com as moléculas de DNA capturadas foi confinado magneticamente na parede do frasco utilizando um ímã, sendo então a concentração de DNA na solução sobrenadante determinada por espectroscopia no UV-Vis. As concentrações de DNA nas soluções foram determinadas medindo sua absorbância em 260 nm (que corresponde à absorção característica do DNA) por meio de um espectrômetro UV-Vis Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA). Na **Fig. 6** são apresentados de modo esquemático os principais estágios do procedimento de captura de DNA em meio aquoso.

[052] Na **Fig. 7** são mostrados os espectros de absorção no UV-Vis da solução de DNA antes e após sua interação com o NCMH. Pode-se observar que ocorre uma diminuição de aproximadamente 96% do pico de absorbância característico do DNA (em 260 nm) após a interação com o NCMH, indicando que, de fato, o DNA foi capturado pelo NCMH.

[053] Também na **Fig. 7** pode-se notar que é possível realizar a eluição do DNA adsorvido no NCMH através do uso de uma solução alcalina. Como um exemplo, o complexo NCMH-DNA obtido após terem sido realizados os procedimentos descritos em

[051] foi colocado para interagir com uma solução tampão de glicina/NaOH (pH 8,8) por alguns minutos sob agitação constante (alternando com breve agitação em vórtex por alguns segundos), sendo obtida a liberação de aproximadamente 90% do DNA capturado.

Exemplo 3. Uso do NCMH para extração, separação, concentração e purificação de DNA a partir de sangue total de humanos

[054] Em uma exemplificação baseada no uso do NCMH para extração, separação, concentração e purificação de DNA a partir de sangue total, foi implementado um procedimento que consiste de quatro etapas principais, que envolvem (i) lise celular, (ii) captura do DNA, (iii) lavagem do sistema DNA-NCMH e (iv) eluição do DNA, conforme descrição a seguir:

(i) **Lise celular:** na etapa de lise 100 µL de sangue e 500 µL de uma solução de lise foram misturados em um microtubo e incubados à 65 °C por alguns minutos. A incubação da amostra foi alternada com agitação em vórtex por alguns segundos a cada 5 min.

(ii) **Captura do DNA:** após a lise, adicionou-se alguns miligramas do NCMH e 1200 µL de uma solução tampão de ligação (com pH inferior a 7,0) ao microtubo contendo a solução lisada e permitiu-se a interação por alguns minutos à temperatura ambiente.

(iii) **Lavagem do NCMH:** o NCMH com as moléculas de DNA capturadas foi confinado magneticamente no interior do microtubo utilizando um ímã e a solução sobrenadante descartada. Então, o complexo NCMH-DNA foi lavado três vezes com 900 µL de uma solução tampão de lavagem. Nas três etapas de lavagem, após breve agitação em vórtex, o complexo NCMH-DNA foi confinado magneticamente e as soluções de lavagem foram descartadas.

(iv) **Eluição do DNA:** finalizado o passo (iii), o DNA foi eluído através do uso de uma solução tampão de eluição (com pH superior a 7,0) e, finalmente, o NCMH foi novamente confinado magneticamente, sendo a solução de eluição contendo o DNA transferida para outro microtubo para armazenagem e/ou aplicações posteriores.

[055] Em cada uma das etapas empregadas nos procedimentos descritos em [054] faz-se necessário a utilização de diferentes soluções tampão. Como uma exemplificação destas soluções, foram utilizadas:

- (i) como solução tampão de lise: uma solução de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol) (Triton X-100) a 1%, contendo 0,5 mg da enzima proteinase K por mL de solução;
- (ii) como solução tampão de ligação: uma solução tampão de glicina/HCl/NaCl (pH 3,2);
- (iii) como solução tampão de lavagem: uma solução de Tris/acetato de potássio/HCl (pH 8,4);
- (iv) como solução de eluição: uma solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,8).

[056] Na **Fig. 8** mostramos uma esquematização geral dos procedimentos empregados para a extração, separação, concentração e purificação de DNA a partir de sangue total de humanos utilizando o NCMH.

[057] Após realizados os procedimentos descritos em [054], a concentração de DNA na solução de eluição foi determinada através da espectroscopia no UV-Vis como correspondendo a valores que variam de 5 a 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a depender do volume da solução tampão de eluição utilizado. Na **Fig. 9** é mostrado o espectro de absorção no UV-Vis de uma das soluções de DNA purificado obtida, no qual pode ser observada a banda de absorção característica do DNA, que possui um máximo de absorção centrado em 260 nm. Já na **Fig. 10a** é exibida a imagem correspondente à eletroforese em gel de agarose de duas amostras diferentes de DNA, na qual é possível visualizar duas bandas bem definidas e sem a presença de rastros, indicando a boa qualidade e integridade do DNA purificado.

[058] Amostras de DNA obtidas a partir do protocolo desta exemplificação foram também submetidas a um procedimento de amplificação através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Como pode ser visto na **Fig. 11**, ao se utilizar um conjunto de *primers* (segmentos de ácidos nucleicos que atuam como iniciadores) para a região β -actina do DNA humano, a amplificação do DNA extraído ocorreu durante o procedimento de PCR, confirmando a boa qualidade e a integridade do DNA que foi obtido utilizando o NCMH. A amplificação também pôde ser verificada através da eletroforese em gel de agarose dos amplicons produzidos no decorrer da PCR (**Fig. 10b**).

REIVINDICAÇÕES

1. Nanocompósito magnético híbrido caracterizado por ser obtido através do revestimento de nanopartículas de óxido de ferro com o polímero condutor politiofeno e seus derivados, a partir da rota de síntese química de polimerização por emulsão e fase-vapor.
2. Nanocompósito magnético híbrido de óxido de ferro e politiofeno, e seus derivados, conforme reivindicação 1, caracterizado por apresentar diâmetros entre 20 nm e 300 nm.
3. Nanocompósito magnético híbrido, conforme reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que, o polímero condutor trata-se preferencialmente do politiofeno (Ptf) e seus derivados, como o Poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (Pedot), Poli (3-tiofeno ácido acético) (Ptaa), entre outros.
4. Nanocompósito magnético híbrido, de acordo com a reivindicações 1, caracterizado pelo fato do referido nanocompósito de ser formado por óxidos de ferro, tais como magnetita, maghemita, hematita, ou ferritas, do que são exemplos as ferritas de cobalto, níquel, ou manganês, porém não limitado a estes.
5. Processo para obtenção do nanocompósito magnético híbrido, definido nas reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo nanocompósito ser obtido através da síntese química de polimerização por emulsão do polímero condutor sobre a superfície das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para obtenção das propriedades desejadas.
6. Processo para obtenção de nanocompósito magnético híbrido, definido nas reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato do referido nanocompósito ser produzido através da síntese química de polimerização por fase vapor do polímero condutor sobre a superfície de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para obtenção das propriedades desejadas.
7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 e 6, caracterizado pelo fato do referido nanocompósito ser funcionalizado por polimerização de um

monômero da família dos tiofenos, tal como tiofeno, edot, 2-Acetiltiofeno e/ou a combinação desses que possa ser polimerizado através da ação de agentes oxidantes.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 e 6, caracterizado pelo fato do referido nanocompósito ser funcionalizado por polimerização, em uma síntese que emprega um agente oxidante que pode ser FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$, CuBr_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuSO}_4\text{CuCl}_2$, ou CuSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, ou a combinação desses ou de qualquer outra molécula ou composto com potencial de redução superior ao do monômero.
9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 e 6, caracterizado pelo fato do referido nanocompósito ser funcionalizado por polimerização, com o dopante da nanocompósito a ser adicionado ao meio reacional podendo ser um ácido inorgânico, tal como HCl , HNO_3 , H_3PO_4 , H_2SO_4 e/ou surfactante, mas, preferencialmente HCl , cujo dopante é o Cl^- .
10. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado por ser usado como material adsorvente em protocolos de extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas de interesse, a partir de sistemas biológicos ou meios aquosos.
11. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, com as biomoléculas de interesse podendo ser originárias de células de animais, vegetais, algas, fungos, vírus ou bactérias.
12. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, tais biomoléculas de interesse podendo ser provenientes de amostras biológicas complexas, tais como sangue, plasma, urina, saliva, células mucosas de animais ou vegetais, algas, fungos ou de microrganismos como bactérias ou vírus.
13. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação,

e purificação de biomoléculas, as biomoléculas de interesse podendo compreender ácidos nucleicos, proteínas ou peptídeos.

14. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, as biomoléculas de relevância podendo ser derivadas, em especial, de amostras de sangue total, e que sejam de preferência, mas não apenas, ácidos nucleicos, tais como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA).
15. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, o ácido nucleico pode ser o ácido desoxirribonucleico (DNA).
16. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, o ácido nucleico pode ser o ácido ribonucleico (RNA).
17. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, sendo que devido ao revestimento polimérico o nanocompósito magnético híbrido pode vir a conter em sua superfície grupos funcionais carregados capazes de interagir com, mas não somente com ácidos nucleicos através de interações eletrostáticas, de caráter não específico.
18. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, sendo que tanto a adsorção quanto a dessorção dos ácidos nucleicos na superfície do nanocompósito magnético híbrido podendo ocorrer por meio de mudanças físico-químicas do sistema, tal como o pH do meio, ou alterações de temperatura.
19. Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, sendo que o material adsorvido na superfície do

nanocompósito magnético híbrido é passível de ser separado do sistema biológico ou do meio aquoso através da aplicação do campo magnético devido a um ímã.

- 20.** Uso do nanocompósito magnético híbrido, definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo uso em processos de extração, separação, e purificação de biomoléculas, sendo que o nanocompósito magnético pode ser utilizado em protocolos para o aumento da concentração de moléculas biológicas, de modo a possibilitar elevá-la até a faixa de sensibilidade de diferentes técnicas de diagnóstico e/ou identificação molecular.

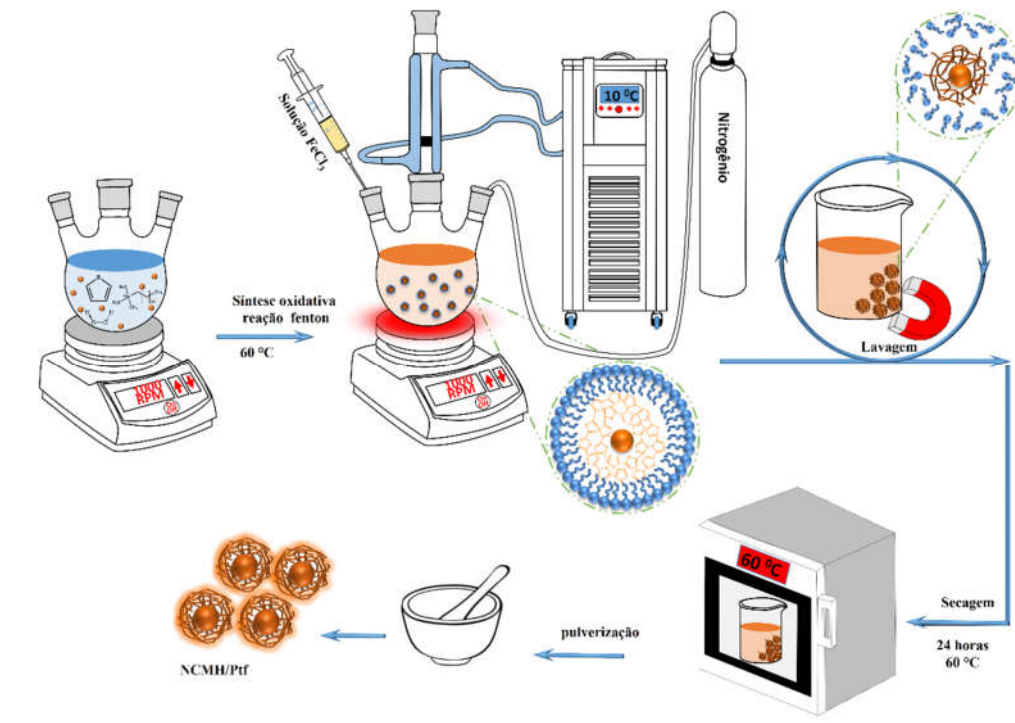
FIGURAS

Fig. 1

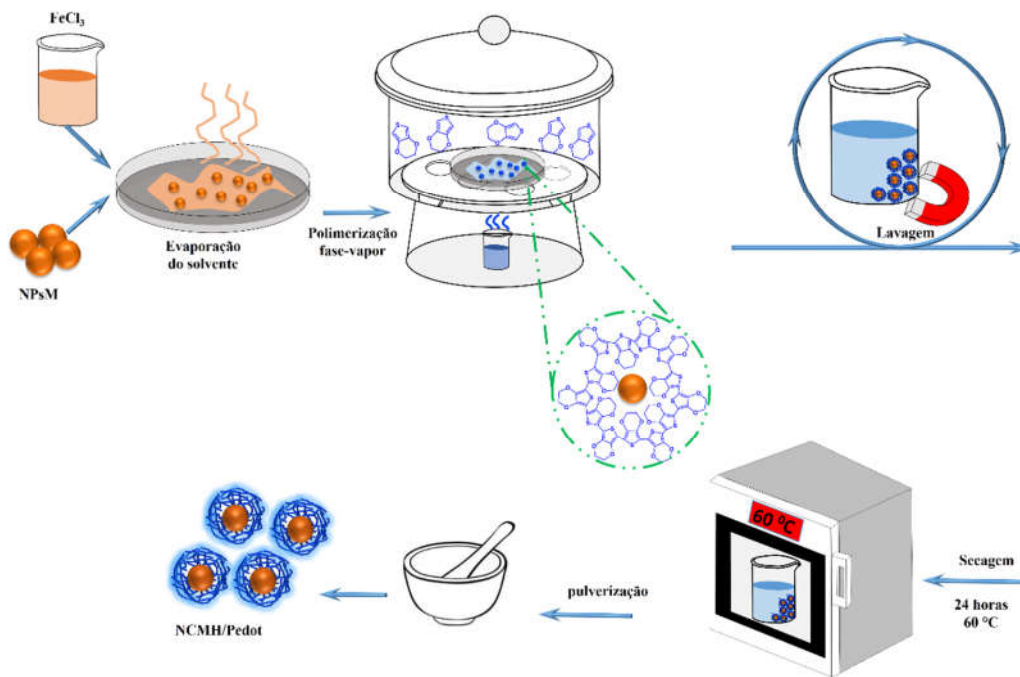


Fig. 2

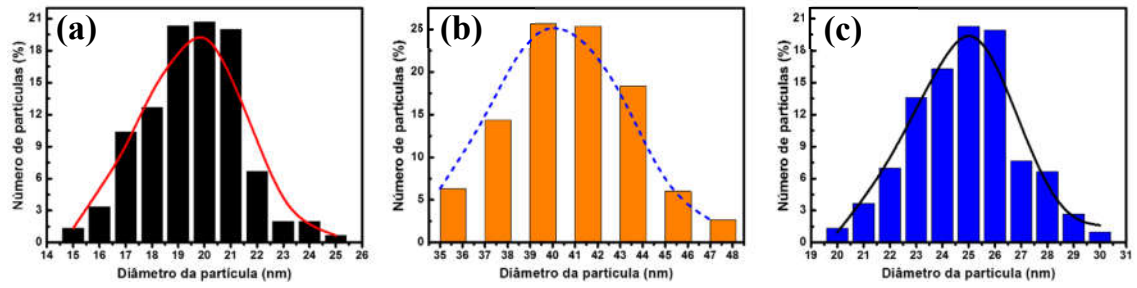


Fig. 3

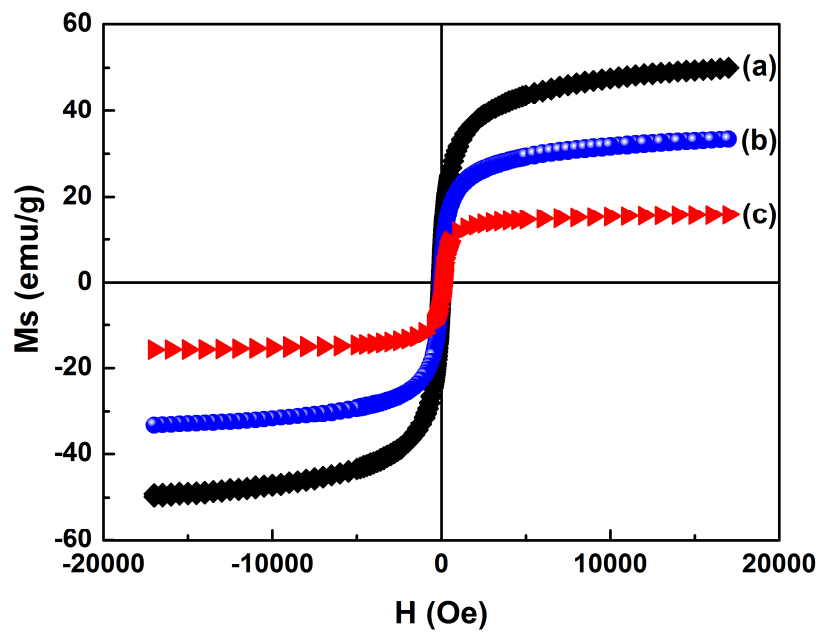


Fig. 4

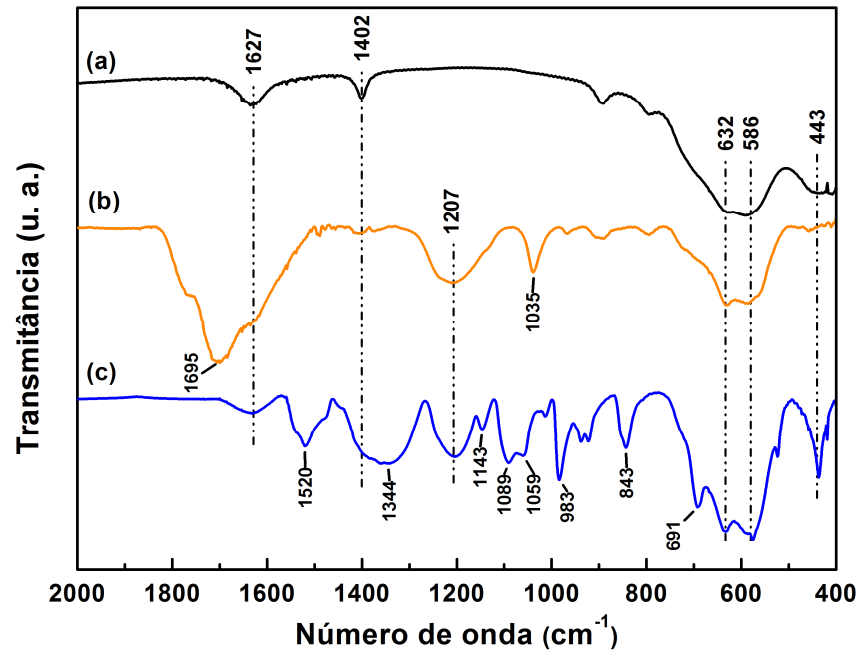


Fig. 5

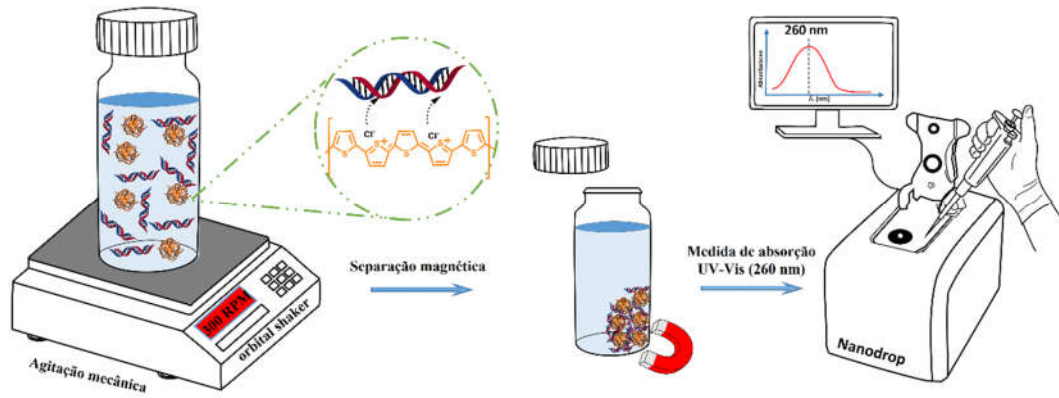


Fig. 6

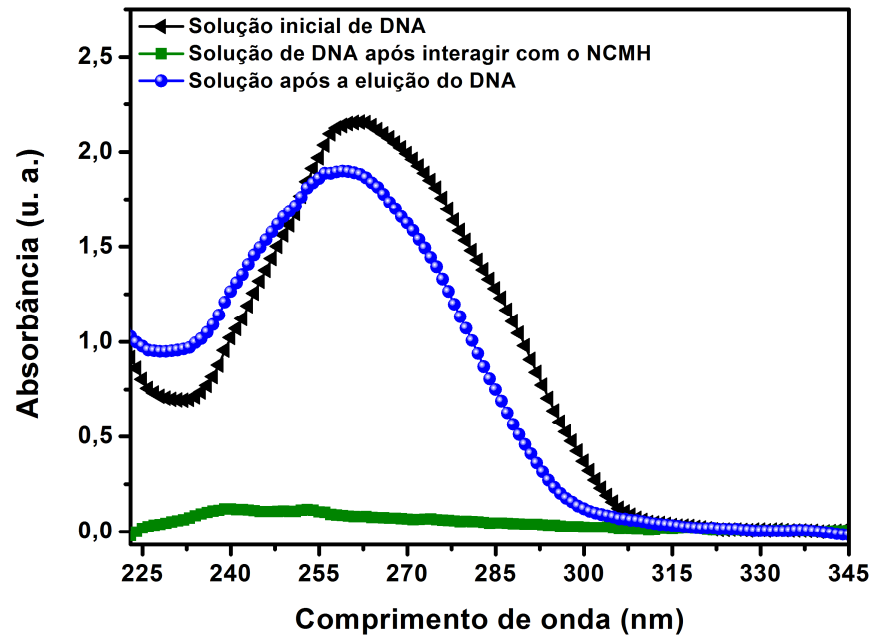


Fig. 7

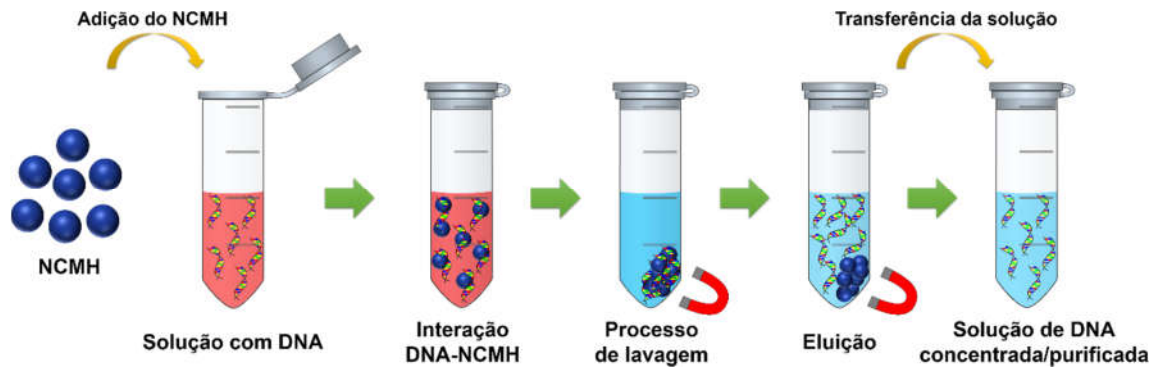


Fig. 8

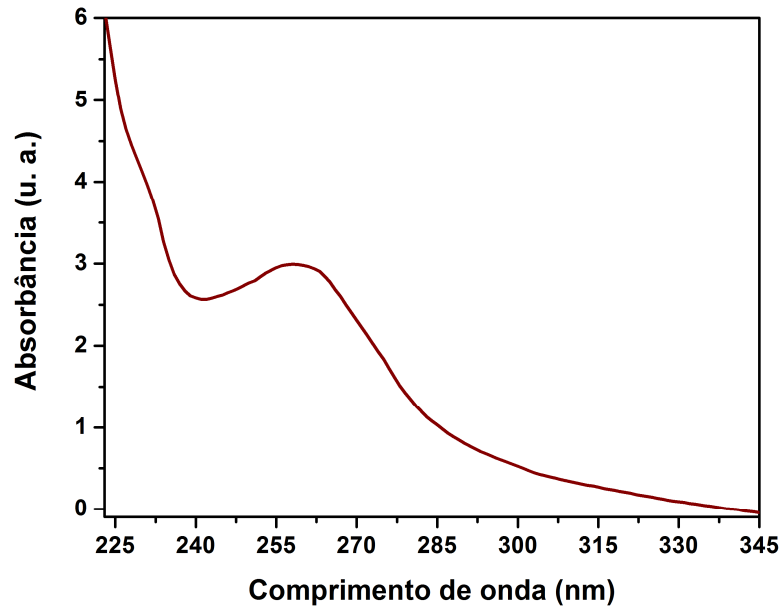


Fig. 9

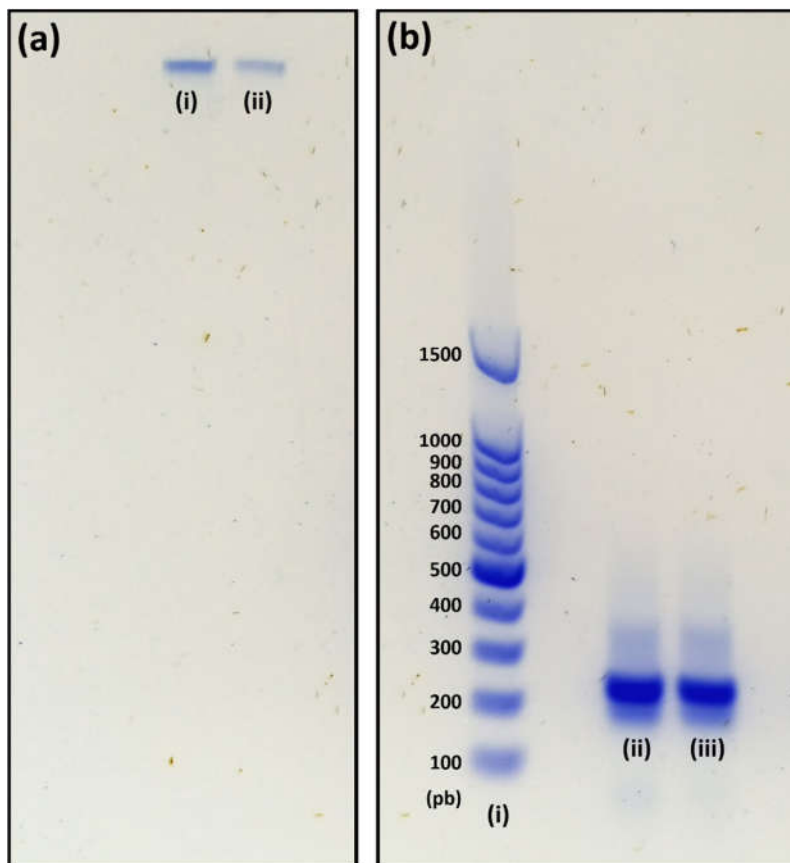


Fig. 10

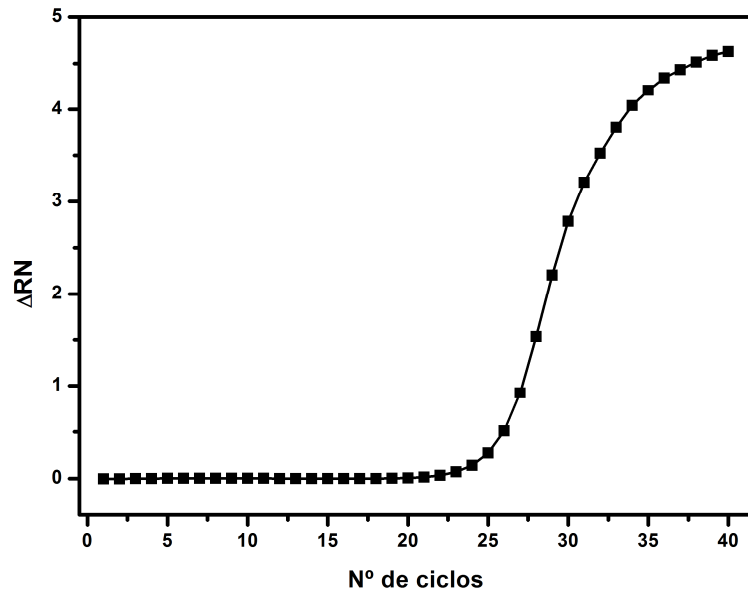


Fig. 11

RESUMO

NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE ÓXIDO DE FERRO E POLITIOFENO E SEUS DERIVADOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS

A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético híbrido (NCMH) composto por partículas magnéticas revestidas pelo polímero condutor politiofeno (Ptf), ou algum de seus derivados, como material adsorvente de fase sólida em uma série de metodologias para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas presentes em amostras biológicas ou em meios aquosos. O NCMH adsorve as biomoléculas de interesse a partir de um mecanismo de interação eletrostática, no qual as cargas positivas dispersas ao longo das cadeias poliméricas do NCMH atraem as cargas superficiais negativas dos ácidos nucleicos e de outras biomoléculas carregadas negativamente. Uma vez que as biomoléculas tenham sido adsorvidas no nanocompósito, as propriedades magnéticas do mesmo possibilitam seu confinamento e separação do meio por intermédio da utilização de um ímã, quando, em seguida, a biomolécula capturada na superfície do NCMH pode ser dessorvida por meio da alteração dos parâmetros físico-químicos do meio, como por exemplo, pH ou concentração iônica, ou pela variação de temperatura das soluções. Após a aplicação dos protocolos, os ácidos nucleicos ou as biomoléculas em geral podem ser identificadas, quantificadas, e usados em técnicas biomoleculares diversas para diferentes finalidades, como o diagnóstico de doenças, teste de paternidade, estudos genéticos, entre outras.