

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

(21) **PI0805991-8 A2**



* B R P I 0 8 0 5 9 9 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 24/03/2008
(43) Data da Publicação: 17/11/2009
(RPI 2028)

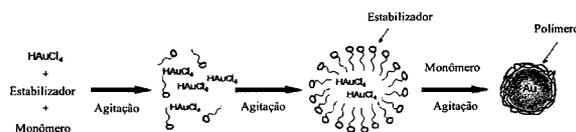
(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/00 (2009.01)
A61B 1/07 (2009.01)

(54) Título: **COMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES EM SI, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS MESMOS, E USO EM SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO COM AFINIDADE A MOLÉCULAS BIOLÓGICAS**

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) Inventor(es): CELSO PINTO DE MELLO, CLÉCIO GOMES DOS SANTOS, CÉSAR AUGUSTO SOUZA ANDRADE

(57) Resumo: COMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES EM SI, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS MESMOS, E USO EM SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO COM AFINIDADE A MOLÉCULAS BIOLÓGICAS. A presente invenção proporciona compósitos de nanopartículas fluorescentes em si, o processo para a preparação desses compósitos, sistemas (como "kits") de diagnóstico rápido contendo tais compostos e usos de tais compósitos. Em uma concretização preferencial, os compósitos da presente invenção têm afinidade por moléculas biológicas, como o DNA. A presente invenção proporciona também: a preparação de sondas contendo material biológico, sobre as quais são adicionados compósitos de nanopartículas fluorescentes, proporcionando o diagnóstico biológico rápido e mais econômico, como no caso de doenças. A presente invenção tem aplicação em diversas áreas, notadamente nas áreas médicas e veterinárias.





Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES EM SI, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS MESMOS, E USO EM SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO COM AFINIDADE A MOLÉCULAS BIOLÓGICAS.

5

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a compósitos de nanopartículas fluorescentes. Mais especificamente, refere-se aos compósitos em si, ao processo de preparação desses compósitos, a sistemas (como "kits") de diagnóstico rápido contendo tais compostos e ao uso de tais compósitos. Em especial, os compósitos da presente invenção proporcionam, entre outras vantagens, a emissão de luz na faixa do azul profundo e/ou no verde, proporcionando vantajoso uso de suas propriedades fluorescentes em dispositivos eletroluminescentes, como LEDs orgânicos, ou para o aumento do rendimento luminoso de lâmpadas fluorescentes. Além disso, os compósitos da presente invenção têm afinidade por moléculas biológicas, como o DNA, proporcionando também aplicações nas áreas médicas e veterinárias e no diagnóstico de doenças causadas por diversos patógenos.

Antecedentes da Invenção

20 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular de doenças e características genéticas é um campo emergente, principalmente na área de análises clínicas. De uma forma geral, ele utiliza técnicas de biologia molecular para o estudo de DNA/RNA, de agentes infecciosos ou de alterações genéticas do próprio organismo, auxiliando no diagnóstico e prognóstico de doenças infecciosas e genéticas.

As técnicas mais comuns de biologia molecular atualmente utilizadas são: amplificação enzimática do DNA (PCR), digestão da fita de DNA genômico ou produto de PCR com enzimas de restrição, separação eletroforética do DNA ou do produto de PCR, hibridização do DNA ou fragmentos de PCR com sondas oligonucleotídicas, DHPLC e métodos citogenéticos. Essas técnicas permitem a rápida genotipagem de marcadores polimórficos, rastreamento de mutações não-caracterizadas. Em especial, os métodos citogenéticos, baseados na observação microscópica de cromossomos normais e anormais permitem a construção de mapas citogenéticos do genoma de muitas espécies. O método citogenético de FISH (hibridização *in situ* fluorescente) é o meio mais direto de localizar marcadores moleculares e genéticos no mapa

citogenético permitindo a integração entre mapas genéticos e moleculares. Sondas são amplamente utilizadas para diagnóstico, como sondas cosmídeo, que são seqüências únicas ligadas em pequenos segmentos de determinados cromossomos, úteis para o estudo de microdeleções. Outras sondas são utilizadas para detectar translocações e seqüências altamente repetitivas. Entretanto, deve-se ressaltar que algumas dessas técnicas ainda possuem limitações, como sinais falso-positivos, que podem levar a um erro de diagnóstico.

Um sistema de diagnóstico molecular bastante conhecido é o teste ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Esse teste imunoenzimático permite a detecção de anticorpos específicos no soro de pacientes, sendo o teste de primeira linha no diagnóstico da infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência adquirida). O método de realização do teste se baseia na interação anticorpo-antígeno, sendo que esse teste também pode ser utilizado para detectar outras substâncias, como hormônios.

A presente invenção refere-se aos compósitos de nanopartículas fluorescentes em si, método de preparo desses compósitos, sistemas (como "kits") de diagnóstico rápido contendo tais compostos e método de funcionamento desses "kits". Em especial, os compósitos da presente invenção têm características próprias de tamanho e fluorescência e possuem afinidade por moléculas biológicas, como o DNA. O modo de preparo desses compostos também é descrito na presente invenção. Adicionalmente, a presente invenção descreve o método de preparo de uma sonda (chamado aqui de suporte) adequada contendo material biológico do organismo que se quer estudar. Sobre esse suporte são adicionados compósitos de nanopartículas fluorescentes e o material genético do paciente, compondo um sistema de diagnóstico, chamado aqui de teste ELINOR (de "Enhanced Luminescence from Inorganic/Organic" nanocomposites), para diagnóstico de doenças causadas por diversos patógenos e/ou doenças genéticas, entre outros. A presente invenção tem aplicação principalmente nas áreas médicas e veterinárias.

A literatura patentária descreve amplamente sondas para diagnósticos de doenças específicas. Entretanto, a maioria dos documentos trata de métodos que utilizam a técnica de biologia molecular PCR, requerendo a amplificação da molécula biológica que se quer estudar para que seja feito o diagnóstico. Podemos exemplificar os métodos de diagnóstico para doenças pelos documentos apresentados a seguir.

O documento US 6,258,570, trata de um método para diagnóstico de meningite viral utilizando PCR, assim como o documento US 7,041,255, que utiliza a mesma

técnica para detectar a infecção pelo vírus da dengue. Da mesma forma, o PCR é utilizado para o diagnóstico de papiloma vírus (HPV), como descreve o documento US 6,027,891 e de *Streptococcus pneumoniae* (US 6,869,767).

5 A presente invenção difere de todos esses documentos por não necessitar de uma etapa de amplificação (como aquela realizada pela técnica de PCR) para a realização do diagnóstico molecular.

A literatura patentária também revela vários exemplos de biossensores fluorescentes contendo ouro, dos quais destacamos os mais relevantes.

10 O documento US 2007/0059693 descreve um biossensor contendo uma superfície fluorescente, moléculas de ácido nucléico e um fluoróforo. A superfície fluorescente pode ser um metal, inclusive ouro. As moléculas de ácido nucléico devem ter uma das pontas ligadas à superfície fluorescente e a segunda ponta ligada a um fluoróforo. Essa molécula de ácido nucléico também pode ter regiões internas de hibridização que, quando hibridizadas, formam um "grampo". Nesses casos, o
15 fluoróforo estará próximo à superfície fluorescente, permitindo que haja fluorescência. A presente invenção difere do referido documento pela superfície de suporte não ser necessariamente fluorescente e nem metálica e não necessitar que as moléculas de ácido nucléico formem um "grampo" para emitir fluorescência.

20 O documento US 2005/0196876 descreve um método de análise do conteúdo de uma amostra biológica através do contato da amostra com um biossensor nanoporoso. Esse biossensor contém sondas que se ligam as amostras formando complexos, que serão ligados a uma segunda sonda. Essa sonda será iluminada a fim de enviar um sinal fluorescente específico. Em uma configuração opcional, esse biossensor pode ter uma camada de ouro. A presente invenção difere do referido documento por se tratar
25 de nanopartículas fluorescentes contendo ouro, não havendo necessidade da ligação a mais que uma sonda.

O documento US 6,773,884 descreve um método para detecção de ácidos nucléicos em que essas moléculas são colocadas em contato com uma ou mais nanopartículas de ouro ligadas a oligonucleotídeos e a moléculas fluorescentes.
30 Quando a hibridização ocorre, a interação dessas moléculas com o oligonucleotídeo sofre alteração detectável, como mudanças de fluorescência. A presente invenção difere do referido documento por se tratar de nanopartículas em que o ouro está recoberto por polímeros e por ser depositado sobre as moléculas biológicas estudadas, não havendo necessidade da presença de oligonucleotídeos ligados à nanopartícula.

35 O documento US 7,083,928 descreve a detecção de polímeros carregados

negativamente usando derivados de politiofeno catiônicos solúveis em água. Os polímeros carregados negativamente compreendem moléculas biológicas como o ácido nucléico. Esse polímero pode estar ligado a um suporte condutor, como uma superfície de ouro. Quando o polímero é detectado, há modificação na carga eletrônica, fluorescência ou cor. A presente invenção difere do referido documento por se tratar de nanopartículas de ouro recoberto por polímeros que interagem com as moléculas biológicas, sendo que o ouro não é parte do suporte adequado que irá imobilizar as moléculas biológicas.

Portanto, não foi encontrado nenhum documento descrevendo, nem tampouco sugerindo, os compósitos de nanopartículas fluorescentes em si, seu modo de preparo, sistemas contendo tais compósitos para uso em "kits" de diagnóstico e método de funcionamento desses sistemas.

Objetos da Invenção

É um dos objetos da presente invenção proporcionar compósitos de nanopartículas fluorescentes em si, compreendendo:

- a) pelo menos um agente oxidante;
- b) pelo menos um estabilizador;
- c) pelo menos um monômero.

Em uma realização preferencial, o agente oxidante é HAuCl_4 .

Em uma realização preferencial, o estabilizador é 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano.

Em uma realização preferencial, o monômero é anilina.

Em uma realização preferencial, os compósitos fluorescentes são constituídos por cadeias de polímero condutor envolvendo nanopartículas metálicas com cerca de 5 nm ou menos.

Em uma realização preferencial, as propriedades dos compósitos podem ser alteradas pelo seu estado de oxidação e/ou seu pH.

É um objeto adicional da presente invenção proporcionar um processo para a preparação de compósitos de nanopartículas fluorescentes compreendendo adicionar, sob agitação, pelo menos um agente oxidante, pelo menos um estabilizador e pelo menos um monômero a pelo menos um álcool ou um solvente polar.

Em uma realização preferencial, a referida agitação ocorre entre 600 a 1.200 rpm.

É um objeto adicional da presente invenção, um sistema para diagnóstico rápido

compreendendo:

- a) pelo menos um compósito fluorescente em si;
- b) pelo menos uma sequência nucleotídica curta;
- c) suporte adequado para imobilização da referida seqüência;
- 5 d) material genético do paciente;

Em uma realização preferencial, a referida sequência nucleotídica é de fita simples de DNA.

Em uma realização preferencial, o referido suporte adequado é uma lâmina de vidro.

10 Em uma realização preferencial, a referida imobilização ocorre pela deposição de cerca de 1µL de uma solução de 100pmol de material biológico no suporte.

Em uma realização preferencial, o material genético do paciente é o "DNA total", obtido após extração simples do DNA.

15 É um objeto adicional da presente invenção proporcionar um melhorado processo de diagnóstico. Em uma concretização preferencial, o processo de diagnóstico da invenção compreende:

a) imobilizar uma sequência nucleotídica curta fita simples do material biológico do organismo a ser investigado em pelo menos um suporte adequado;

20 b) colocar em contato o material imobilizado de a), o material genético do paciente e os compósitos de nanopartículas fluorescentes;

c) verificar a emissão de fluorescência.

Em uma realização preferencial, o material genético de c) é o "DNA total", obtido após extração simples do DNA.

25 É ainda outro objeto da presente invenção proporcionar o uso dos compósitos fluorescentes da invenção na preparação de dispositivos eletroluminescentes, como LEDs orgânicos, ou para o aumento do rendimento de lâmpadas fluorescentes

É ainda outro objeto da presente invenção proporcionar o uso dos compósitos da invenção na preparação de reativos e/ou insumos para diagnóstico.

30 Em uma realização preferencial, a emissão de fluorescência irá indicar a presença ou ausência de material biológico do organismo a ser investigado no material genético do paciente.

Estes e outros objetos da invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

35 **Breve Descrição das Figuras**

A figura 1 mostra uma representação esquemática do modo de preparação dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero).

A figura 2 mostra o espectro de absorção UV-Vis dos nanocompósitos Au/PANi, onde podem ser observadas a banda de plasmons (referente ao ouro reduzido formando nanopartículas metálicas) e a banda de polarons (referente ao processo de oxidação do monômero para formação do polímero).

A figura 3 mostra uma microfotografia de varredura dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero) (aumento de 4.000 X).

A figura 4 mostra uma microfotografia de varredura dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero) (aumento de 10.000 X).

A figura 5 mostra uma imagem de microscopia de transmissão dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero).

A figura 6 mostra uma imagem de microscopia de transmissão em campo escuro dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero). As partes mais claras indicam a presença de nanoagregados do metal envoltos pelas cadeias poliméricas.

A figura 7 mostra uma imagem de microscopia de transmissão dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero) mostrando os agregados metálicos.

A figura 8 mostra uma imagem de microscopia de transmissão de alta resolução dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero).

A figura 9 mostra a difração de raios-X dos compósitos fluorescentes (nanopartículas de Au/polímero).

Descrição Detalhada da Invenção

Os compósitos da invenção são úteis em diversas aplicações, incluindo: a preparação de dispositivos eletroluminescentes, como LEDs orgânicos; o aumento do rendimento luminoso de lâmpadas fluorescentes; a preparação de reativos e/ou insumos para diagnóstico, entre outras aplicações. Os compósitos da presente invenção proporcionam, entre outras vantagens, a emissão de luz na faixa do azul profundo e/ou no verde, proporcionando vantajoso uso de suas propriedades em dispositivos eletroluminescentes, como LEDs orgânicos, ou para o aumento do rendimento de lâmpadas fluorescentes. Neste aspecto, proporcionam uma alternativa aos revestimentos internos de lâmpadas fluorescentes atualmente utilizadas, revestimentos este que são indesejavelmente tóxicos. Os compósitos da invenção podem ser preparados de forma a proporcionarem cores e/ou intensidades diferentes, de acordo com o ajuste da composição.

Os compósitos da presente invenção têm afinidade por moléculas biológicas, como o DNA, proporcionando também aplicações nas áreas médicas e veterinárias e no diagnóstico de doenças causadas por diversos patógenos. Neste contexto, os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção.

Entende-se por “material biológico” o grupo que compreende, mas não se limita a, DNAs, RNAs, proteínas, peptídeos, RNAs não-codificantes e/ou quaisquer outros materiais biológicos que possam se apresentar na forma de fita simples.

Entende-se por “material genético do paciente” o grupo que compreende, mas não se restringe, ao material biológico de qualquer organismo obtido a partir de uma pequena quantidade de sangue ou de um simples esfregaço de células epiteliais ou de mucosas.

Entende-se por “agente oxidante” o grupo que compreende, mas não se restringe a compostos contendo ouro, como HAuCl_4 . Preferencialmente, o ouro está no estado de oxidação 3+. Entretanto, ainda outros sais de metais da família 1B podem ser usados, desde que seu potencial de oxi-redução permita a oxidação do monômero, levando à formação do polímero. Os presentes inventores prepararam outros compostos, à base não apenas de Au, mas também de Ag e Cu, e usando monômeros outros que não o pirrol, como derivados da anilina e do tiofeno. Semelhantemente, os versados na arte entenderão que metais como platina e paládio também podem ser usados.

Entende-se por “monômero” o grupo que compreende, mas não se restringe, à

menor unidade repetitiva, como anilina ($C_6H_5NH_2$), tiofeno (C_4H_4S), pirrol (C_4H_5N), ou moléculas precursoras dos respectivos polímeros, polianilina, PEDOT ((Poli(3,4-etilenedioxitiofeno) poli(estirenosulfonato)) e polipirrol, e/ou mistura das mesmas.

Entende-se por “estabilizador” o grupo que compreende, mas não se restringe a, silanos como (3-mercaptopropil) trimetoxisilano, (3-mercaptopropil) metildimetoxisilano, (3-mercaptopropil) trietoxisilano e (3-mercptoetil) trimetoxisilano e/ou mistura dos mesmos.

Entende-se por “álcool” o grupo que compreende, mas não se restringe a, metanol, etanol, propanol, butanol, glicerol e etileno glicol e/ou misturas dos mesmos.

10

Exemplo 1. Síntese e caracterização das nanopartículas

Exemplo 1.1 Preparação de Nanopartículas

A preparação das nanopartículas foi feita em um balão de fundo redondo contendo etanol (20 mL) e os compostos: Ani- $C_6H_5NH_2$ (0,030 mol/L), 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano (MPS - $C_6H_{16}O_6SSi$) (mol/L) e $H AuCl_4 \cdot xH_2O$ (0,81 mmol/L), que foram
15 subsequenteemente adicionados e mantidos sob vigorosa agitação (1.100 rpm). A Anilina (ANi - $C_6H_5NH_2$), utilizada após destilação em um Aparato Kugelrohr, foi adquirida da Vetec (Brazil). Os outros compostos foram adquiridos da Aldrich Co. (EUA), com pureza de 99 %. As medidas foram feitas até 48 horas após as misturas.

20

Exemplo 1.2 Caracterização de Nanopartículas

Propriedades de fotoluminescência foram verificadas com um espectrofluorímetro PC1 (ISS, USA) a 20 ± 1 °C com uma cubeta de quartzo (1 cm e 5 mL). As amostras (variando os valores de pH) foram monitoradas em duas matrizes de
25 luminescência: (1) excitação de 200 a 360 nm e emissão de 370 a 600 nm e (2) excitação de 270 a 330 nm e emissão de 280 a 600 nm). Análises morfológicas foram realizadas por SEM utilizando um microscópio JSM-5900 (JEOL, Japan). As amostras foram adicionadas em uma superfície de vidro fixada com uma fita de carbono. Após esse processo, as amostras foram recobertas através do processo de *sputtering*
30 (metalizador BalTec SCD 050) com uma camada fina de ouro. Medidas do tamanho das partículas foram realizadas com Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern).

Exemplo 2. Características das nanopartículas

Nanopartículas de ouro com diâmetros da ordem de ~5 nm possuem uma banda
35 de plasmon superficial (PS) em 525 nm do espectro de absorção. Uma análise do

espectro de UV-Vis do nanocompósito é apresentada na Fig. 2 onde podemos observar uma forte banda de PS em torno de 560 nm. Sabemos que o comprimento e a absorção da PS variam de acordo com o tamanho, a forma e o meio dielétrico “interpartícula”. Trabalhos recentes mostraram que a banda PS do ouro muda em função da montagem e do tamanho da mesma, depende também da fração molar (estabilizante)/Au na faixa de 1-2000. [*J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 9906]. Lembramos que a Polianilina (PAn) apresenta duas bandas (324 nm e 625 nm) de absorção características em seu espectro na região do UV-Visível.

Na metodologia empregada, o composto contendo ouro ($\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) atua como agente oxidante, ou seja, como iniciador da polimerização da anilina. Utilizamos ainda um mercaptosilano como co-estabilizante para as nanopartículas metálicas formadas.

Na matriz de fluorescência da amostra PAn-Au, podemos observar que o nanocompósito apresenta propriedades luminescentes na região visível. O compósito, quando excitado com uma fonte de luz com comprimento de onda de 350 nm, apresenta um pico de fotoluminescência em torno de 400 nm. O emprego de nanocompósitos de nanopartículas de ouro e polímeros conjugados em diodos emissores de luz, visando o aumento da estabilidade e do rendimento quântico da eletroluminescência de polímeros emissores, foi objeto de recente artigo [*Chem. Mater.*: 2004, 16, 688-692] no qual se propõe como explicação o aumento da rugosidade da superfície sobre o catodo metálico e o balanço da injeção de carga promovido pelas nanopartículas metálicas. Por outro lado, exemplos de nanopartículas de ouro altamente luminescentes solúveis em água também foram recentemente publicadas [*Physical Review Letters* vol. 93(7) 2004, pp. 77402-1 77402-4] nos quais se atribui a forte luminescência à formação de agregados metálicos, o que levaria a um processo de injeção e transporte de carga através de níveis discretos de energia. Contrastantemente a tais relatos, no presente caso a metodologia utilizada nos permite preparar nanopartículas de ouro com tamanho da ordem de 5 nm (ou menos), envolvidas em uma “casca” (polímero conjugado), cujas propriedades dielétricas podem ser alteradas tanto por meio de seu estado de oxidação, quanto pelo pH. Desta forma, podemos sintonizar, a princípio, o comprimento de onda de emissão do nanocompósito através das propriedades dielétricas do seu exterior. Resultados de medidas de rendimento quântico das primeiras amostras do nanocompósito apresentaram resultados que variam de 1,5 a 7,5%; no entanto, modificações já em

curso na metodologia de preparação nos permitiram aumentos de até uma ordem de grandeza, bem como emissão do mesmo sistema em outros comprimentos de onda.

Na presente invenção, foram obtidas imagens de TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão) em *bright field* (campo claro), onde pode-se observar a presença de aglomerados com diâmetro médio de 50 nm. Claramente, pode-se visualizar no modo de *dark field* (campo escuro), a presença das nanopartículas de ouro no interior da malha polimérica (Fig. 8) apresentando uma distribuição bastante homogênea. É importante salientar que em análises utilizando-se espalhamento de luz foi determinado o tamanho médio dos aglomerados do nanocompósito que varia entre 150 e 300 nm. A fig. 6 demonstra que as nanopartículas apresentam-se em forma monodispersa e, em algumas situações, podemos perceber a formação de partículas geminais, uma característica conhecida de nanopartículas de ouro. Pode-se ainda perceber que tais partículas possuem tamanho que variam entre 2 e 5 nm. A fig. 7 apresenta uma HRTEM (*High Resolution Transmission Electron Microscopy*) do nanocompósito híbrido demonstrando a presença de estruturas cristalinas, bem como sua figura de difração de raios-X (Fig. 8).

Exemplo 3 – Kits de diagnóstico contendo os compósitos nanoestruturados fluorescentes

Pelo fato de ser possível sua adaptação para a produção em larga escala com investimento reduzido, essa nova tecnologia tem como principais vantagens sobre os métodos usualmente empregados no diagnóstico de doenças (de origem viral ou bacteriana), causadas por patógenos diversos, seu baixo custo e rapidez, além da maior generalidade e flexibilidade de aplicação. Podemos ressaltar algumas características da aplicação de compósitos de nanopartículas fluorescentes em “kits” de diagnóstico:

(1) A especificidade para a presença do patógeno a ser investigado é determinada pela natureza do fragmento do material biológico (como DNA) imobilizado na sonda, de modo que a técnica não encontra limitação quanto a este aspecto, podendo ser usada para a identificação de qualquer organismo para o qual uma seqüência específica de material biológico, como DNA, possa ser obtida;

(2) A tecnologia é de uso geral para o diagnóstico de qualquer doença: a) cuja causa possa ser atribuída a um patógeno conhecido, ou b) cuja origem possa ser associada à presença de uma determinada seqüência de material biológico (como

DNA), mesmo que humano (com o que se abre a possibilidade do uso da tecnologia para a investigação não apenas de doenças já em curso, mas também para a análise da propensão genética de pacientes ao futuro desenvolvimento de patologias hereditárias);

5 (3) A quantidade de material biológico a ser imobilizada nas sondas de teste é extremamente pequena (volume de 1µL de uma solução de 100 pmol de material biológico (como DNA));

(4) A preparação das sondas contendo a seqüência do material biológico (como DNA) escolhido é uma etapa que pode ser adaptada para produção em larga escala,
10 mais uma vez a custo reduzido;

(5) O material genético do paciente a ser utilizado nesses “kits” pode dispensar as etapas associadas com separação e multiplicação do DNA de interesse via técnicas de PCR ou similares;

(6) O resultado do diagnóstico tem caráter conclusivo (isto é, positivo/negativo) e
15 pode ser obtido rapidamente, dispensando qualquer tipo de uso de meio de cultura;

(7) O diagnóstico se baseia na observação da presença (ou não) de fluorescência;

(8) No caso da existência de variação genética do patógeno em distintos subtipos (como na dengue, por exemplo), a sonda pode ser preparada de modo a
20 conter material biológico do organismo a ser estudado para cada subtipo, de modo que em um único exame o diagnóstico poderia ser conclusivo para qualquer variedade do patógeno presente no sangue do paciente;

Como essa tecnologia pode ser aplicada a qualquer patógeno, pode-se escolher a natureza do microorganismo a ser investigado em testes apropriados, definidos
25 dentre problemas de possível interesse para a saúde pública brasileira e passíveis de serem beneficiados com a implementação de um kit de diagnóstico rápido do tipo aqui descrito, que não se restringe, mas pode ser aplicado à: i) dengue; ii) tuberculose; iii) hepatite C; iv) identificação rápida (dentro de uma gama pré-determinada de opções) da causa de infecções hospitalares; v) identificação rápida da infecção por
30 meningococos, além vi) da varredura (“*screening*”) genética de doenças de natureza hereditária (como Tay-Sachs, fenilcetonúria, câncer de mama, dentre outras). Alguns exemplos são concretizados a seguir.

Exemplo 3.1 – Diagnóstico da presença de vírus do papiloma humano, HPV

O diagnóstico utiliza uma seqüência curta de fita simples consistindo de 20 bases da variedade 16 do HPV. A qualidade da resposta pode ser atestada pela obtenção de um diagnóstico negativo quando da exposição a uma fita dupla da variedade 18 do HPV com cerca de 500 pares de base e do diagnóstico positivo apenas quando da exposição a uma fita dupla da variedade 16 do HPV, também com cerca de 500 pares de base.

Exemplo 3.2 – Diagnóstico da presença de vírus da dengue

O diagnóstico utiliza uma seqüência curta de fita simples consistindo de 22 bases do subtipo 2 do vírus da dengue. A qualidade da resposta está associada a um diagnóstico negativo para exposição a uma fita dupla não complementar ao *primer* utilizado e diagnóstico positivo para exposição a uma fita dupla contendo 22 pares de base do sub-tipo 2 do vírus da dengue.

Exemplo 3.3 – Diagnóstico da presença de vírus do papiloma humano, HPV e da sensibilidade da resposta à presença de alelos

O diagnóstico utiliza uma seqüência curta de fita simples consistindo de 19 (MBL54mt) e 22 (MBL57mt) bases de diferentes variedades do HPV, algumas delas contendo mutações em posições específicas, que poderiam ou não impedir a hibridização das cadeias do DNA do patógeno presentes no material do paciente. O tipo de resposta (diagnóstico positivo ou negativo) obtida, respectivamente, para pacientes homozigotos e heterozigotos define a sensibilidade da tecnologia como excelente.

Em todos os exemplos referidos acima, um "*primer*" do DNA do patógeno de interesse foi ancorado em uma lâmina de vidro previamente silanizada, e depois uma gota da mistura (nanocompósito da invenção)+(DNA total do paciente) foi adicionada. Em seguida, o sistema foi lavado com água corrente e, após espera de poucos minutos para secagem, a lâmina foi levada ao microscópio de fluorescência. Existindo DNA do patógeno no material genético do paciente, uma fita (longa) desse DNA terá hibridizado com o "*primer*", retendo uma maior quantidade do nanocompósito fluorescente: resposta "positiva". Não tendo ocorrido a hibridização, apenas uma pequena quantidade do nanocompósito terá sido retida pela (curta) cadeia do *primer*, e a fluorescência será mínima (basal): resposta "negativa. É de se notar que em uma das séries de testes" com o HPV, uma das cerca de 20 bases do "*primer*" foi alterada deliberadamente, o que fez com que um resultado originalmente "positivo" passasse a

ser “negativo”, ou seja, a sensibilidade chega a discriminar a alteração de uma única base em 20.

Ainda outras aplicações dos compósitos da presente invenção são imediatamente apreendidas pelos versados na arte, ao tomarem conhecimento dos presentes ensinamentos. Dentre outras destaca-se o uso no diagnóstico rápido *in situ* como, por exemplo: diagnóstico de doenças em campos de batalha; o trabalho biológico de campo, para comparação *in situ* de espécies quanto à presença de características biológicas pré-determinadas e indicação de interesse em coleta (*screening* de campo ou *biobarcode*); e métodos de identificação forense. Neste último aspecto, os compósitos da invenção atuam como “nanoluminol”. Neste contexto, uma recentíssima divulgação da Universidade de San Diego, disponível em <http://www.topnews.in/health/handheld-dna-detector-may-soon-be-reality-21411>, mostra que detectores portáteis de DNA podem proporcionar vantagens substanciais e contornar diversas dificuldades da técnica atual. Embora o revelado em tal referência utilize tecnologia muito mais complexa e custosa (*ion-selective field-effect transistor* - ISFET) que aquela da presente invenção, evidencia claramente o potencial e aplicabilidade do segmento, ressaltando a importância e necessidade de novos desenvolvimentos no setor.

Os versados na arte imediatamente valorizarão os ensinamentos aqui proporcionados e entenderão que variações na forma de executar a invenção ora proposta devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e do escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

COMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES EM SI, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS MESMOS, E USO EM SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO COM AFINIDADE A MOLÉCULAS BIOLÓGICAS.

1. Compósito de nanopartículas fluorescentes em si, caracterizado por compreender:
 - a) pelo menos um agente oxidante;
 - b) pelo menos um estabilizador; e
 - c) pelo menos um monômero.
2. Compósito, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido agente oxidante é selecionado do grupo que compreende sais de metais da família 1B cujo potencial de oxi-redução proporciona a oxidação do monômero, levando à formação do polímero.
3. Compósito, conforme reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido agente oxidante é HAuCl_4 .
4. Compósito, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido estabilizador é 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano.
5. Compósito, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido monômero é anilina.
6. Compósito, conforme reivindicações 1-5, caracterizado pelo fato de que os referidas compósitos fluorescentes compreendem cadeias poliméricas envolvendo nanopartículas metálicas com cerca de 5 nm ou menos.
7. Processo para a preparação de compósitos de nanopartículas fluorescentes, caracterizado por compreender os passos de adicionar, sob agitação, pelo menos um agente oxidante, pelo menos um estabilizador e pelo menos um monômero a pelo menos um álcool ou um solvente polar.
8. Processo, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o ajuste do estado de oxidação do agente oxidante proporciona o ajuste das propriedades dos referidos compósitos.
9. Processo, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o ajuste

do pH do meio reacional proporciona o ajuste das propriedades dos referidos compósitos.

10. Processo, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido agente oxidante é selecionado do grupo que compreende sais de metais da família 1B cujo potencial de oxi-redução proporciona a oxidação do monômero, levando à formação do polímero.

11. Processo, conforme reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido agente oxidante é HAuCl_4 .

12. Processo, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido estabilizador é 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano.

13. Processo conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido monômero é anilina.

14. Processo conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido álcool é etanol.

15. Processo, conforme reivindicações 7-14, caracterizado pelo fato de que a referida agitação ocorre entre 600 a 1.200 rpm.

16. Kit para o diagnóstico biológico rápido, caracterizado por compreender:

a) pelo menos uma sequência nucleotídica curta imobilizada em um suporte;
e

b) pelo menos um compósito fluorescente em si compreendendo pelo menos um agente oxidante, pelo menos um estabilizador e pelo menos um monômero.

17. Kit, conforme reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida sequência nucleotídica é de fita simples de DNA.

18. Kit, conforme reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o referido suporte é uma lâmina de vidro.

19. Processo para diagnóstico biológico rápido, caracterizado por compreender os passos de contatar uma amostra biológica que se deseja diagnosticar com:

a) pelo menos uma seqüência nucleotídica curta imobilizada em um suporte;

b) pelo menos um compósito fluorescente em si compreendendo pelo menos um agente oxidante, pelo menos um estabilizador e pelo menos um

monômero, e verificar a emissão de fluorescência.

20. Uso de um compósito fluorescente em si compreendendo pelo menos um agente oxidante, pelo menos um estabilizador e pelo menos um monômero caracterizado por ser para a preparação de reativos e/ou insumos para diagnóstico.

21. Uso de um compósito fluorescente em si compreendendo pelo menos um agente oxidante, pelo menos um estabilizador e pelo menos um monômero caracterizado por ter caráter conjugado, para a preparação dispositivos eletroluminescentes.

22. Uso, conforme reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o referido dispositivo é um LED orgânico.

23. Uso, conforme reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o referido dispositivo é uma lâmpada fluorescente.

24. Uso de um compósito fluorescente em si compreendendo pelo menos um agente oxidante, pelo menos um estabilizador e pelo menos um monômero caracterizado por ser para a preparação de teste de fluorescência para detecção rápida de ataque de bioterrorismo ou por armas biológicas.

FIGURA 1

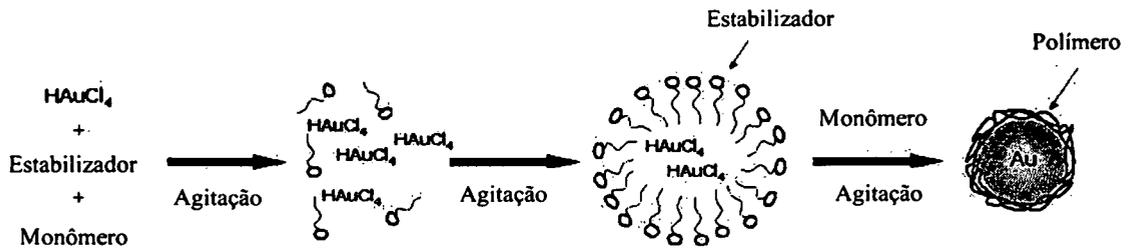


FIGURA 2

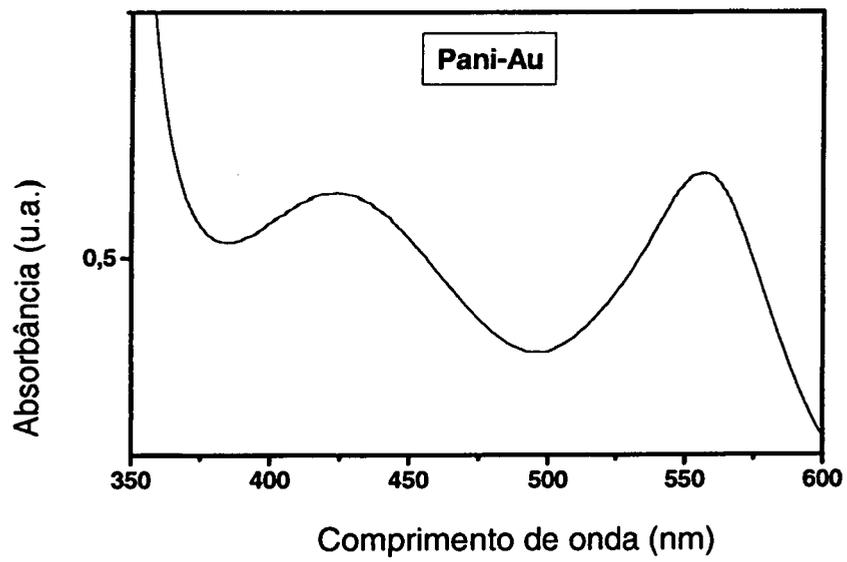


FIGURA 3

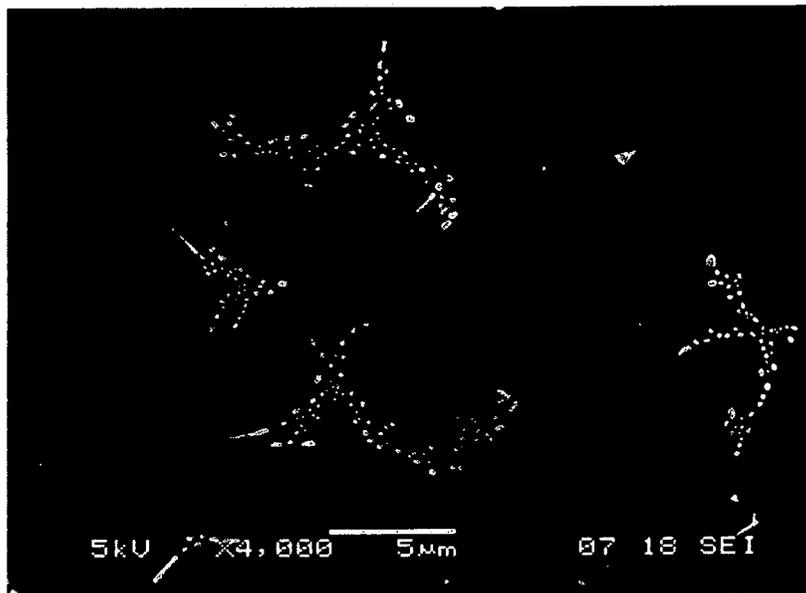


FIGURA 4

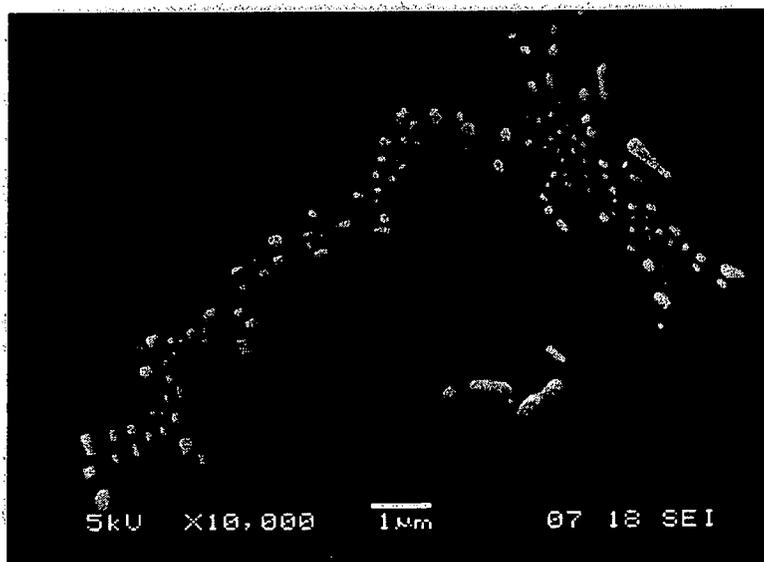


FIGURA 5

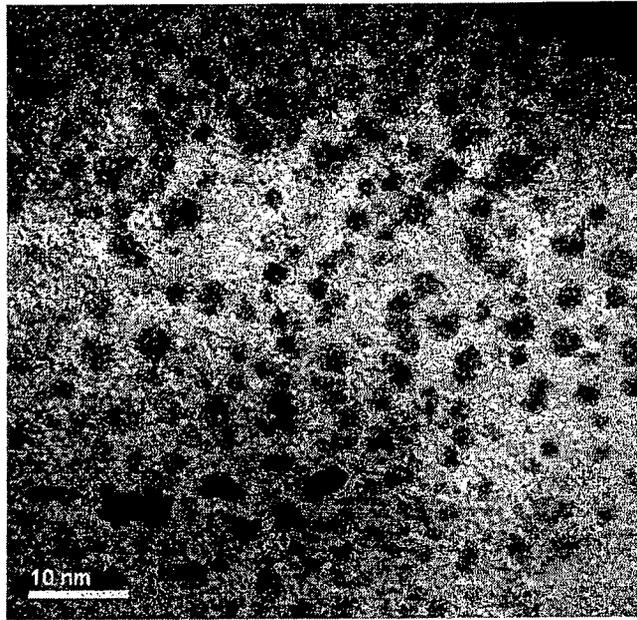


FIGURA 6

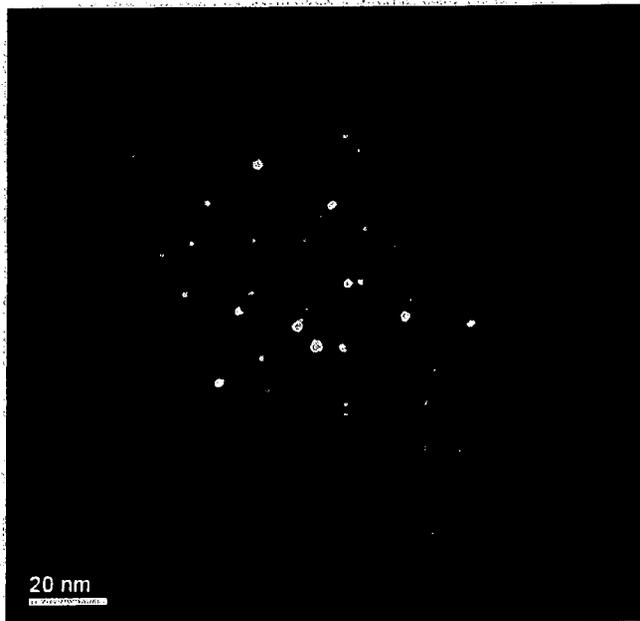


FIGURA 7

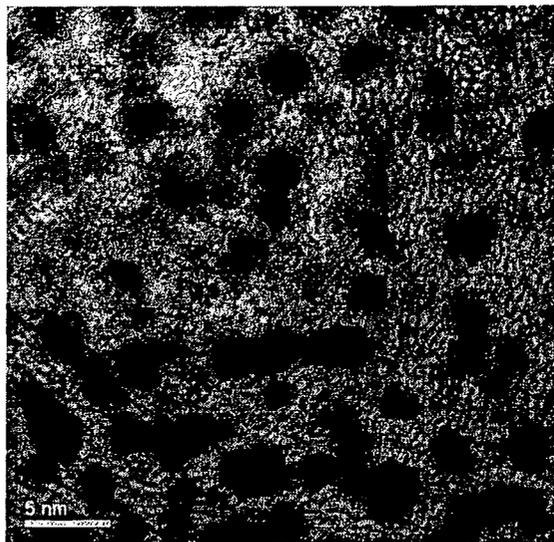


FIGURA 8

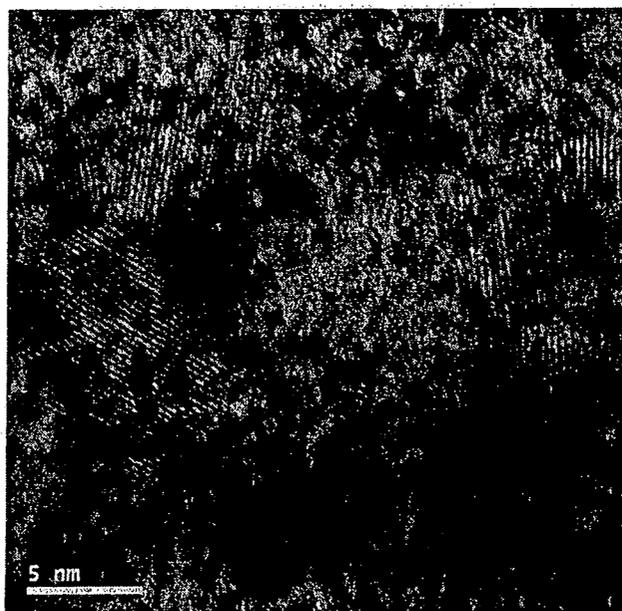


FIGURA 9



Resumo

COMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES EM SI, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS MESMOS, E USO EM SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO COM AFINIDADE A MOLÉCULAS BIOLÓGICAS.

A presente invenção proporciona compósitos de nanopartículas fluorescentes em si, o processo para a preparação desses compósitos, sistemas (como "kits") de diagnóstico rápido contendo tais compostos e usos de tais compósitos. Em uma concretização preferencial, os compósitos da presente invenção têm afinidade por moléculas biológicas, como o DNA. A presente invenção proporciona também: a preparação de sondas contendo material biológico, sobre as quais são adicionados compósitos de nanopartículas fluorescentes, proporcionando o diagnóstico biológico rápido e mais econômico, como no caso de doenças. A presente invenção tem aplicação em diversas áreas, notadamente nas áreas médicas e veterinárias.