



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

(11) BR 102015032226-7 B1



(22) Data do Depósito: 22/12/2015

(45) Data de Concessão: 01/02/2022

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

(51) Int.Cl.: B01J 37/03; B01J 23/745; B82B 3/00; B82Y 5/00.

(52) CPC: B01J 37/03; B01J 23/745; B82B 3/00; B82Y 5/00.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE.

(72) Inventor(es): PABYTON GONÇALVES CADENA; THIAGO VÉRAS CAVALCANTI FIRMINO; LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR.

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS. A presente invenção refere-se a um processo de produção de nanopartículas magnéticas de ferro funcionalizadas com polianilina e ativada com glutaraldeído para a imobilização de lectinas. Estas lectinas são proteínas de origem não imunológica com a capacidade de ligar-se reversivelmente a glicoproteínas permitindo a purificação destas últimas. Adicionalmente, a presente invenção também descreve um método de purificação de (beta)-galactosidade de fonte microbiana utilizando as lectinas imobilizadas em nanopartículas magnéticas.

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE
BIOMOLÉCULAS”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um processo de síntese e imobilização covalente de concanavalina-A em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com polianilina e ativada com glutaraldeído. Adicionalmente, a concanavalina-A imobilizada nas nanopartículas magnéticas pode ser utilizada como ferramenta para purificação de glicoproteínas, como, por exemplo, a enzima β -galactosidase. De acordo com os aspectos da invenção, a síntese de nanopartículas magnéticas ocorre pelo método de co-precipitação.

Antecedentes da Invenção

[002] O processo de imobilização de biomoléculas, principalmente proteínas, em matrizes insolúveis em água, agrega maior estabilidade à molécula que sua forma natural. Diversas técnicas de imobilização como a adsorção, o enclausuramento e a ligação covalente têm se mostrado uma ferramenta importante para a biotecnologia, pois proporciona à biomolécula a capacidade de ser separada do meio de reação, possibilitando assim, a reutilização da biomolécula e produção de produtos livres de contaminação (Neri et al., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 70, 74-80 2011). Dentre as matrizes insolúveis em água, as nanopartículas magnéticas, devido ao tamanho diminuto, apresentam maior área superficial o que pode favorecer reações químicas. Adicionalmente, o fato de serem magnetizadas permite uma manipulação por campo magnético o que pode melhorar a recuperação do derivado imobilizado.

[003] Nanoestruturas emergiram como alternativa aos suportes convencionais. O interesse em cima desses materiais é atribuído por suas propriedades como, elevada área de superfície, maior tolerância a temperatura, elevada interação com biomoléculas e reatividade química (Yong et al., *Process Biochemistry*, 43, 1179-1185, 2008).

[004] A Magnetita (Fe_3O_4) é um dos minérios de ferro responsável pelas propriedades magnéticas das rochas, porém alguns organismos desenvolvem esse mineral para auxiliar na orientação geográfica. É um material ferrimagnético contendo ferro com estado de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} e sua estrutura é do tipo espinélio inverso. O esqueleto da magnetita Fe_3O_4 é constituído por 32 íons de O^{2-} distribuídos e organizados formando uma célula unitária cúbica compacta de face centrada. Na estrutura espinélio inversa, os 8 sítios tetraédricos são ocupados por Fe^{3+} e os 16 sítios octaédricos são ocupados por íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (Cornell et al., Weinheim: Wiley-VCH, 2006).

[005] Uma grande variedade de métodos têm sido utilizados para a síntese de nanopartículas magnéticas, como o método de sonicação, pirólise e sol-gel, técnica hidrotermal, decomposição térmica redutiva e liga mecânica. Adicionalmente, o método de co-precipitação é o mais difundido e de baixo custo, devido à sua simplicidade e eficiência química para a preparação de vários materiais sólidos. A presença de grupos hidroxila, tais como Fe-OH , sobre a superfície de nanopartículas magnéticas permitem a ligação de compostos funcionais (Jaramillo-Tabares et al., *Materials Chemistry and Physics*, 132, 529-533, 2012).

[006] As nanopartículas magnéticas sem revestimento de um agente funcionalizador apresentam a característica de uma grande área de superfície em relação ao volume com superfícies hidrofóbicas, e dessa forma, uma tendência a se aglomerar (Lu et al., *Angewandte Chemie International Edition in English*, 46, 1222-1244, 2007). Nanopartículas de óxido ferro, quando revestidas e funcionalizadas adequadamente se tornam mais estáveis e permanecem dispersas dentro de fluidos homogêneos. Diversos grupos de

materiais funcionalizantes podem ser utilizados para o revestimento, assim modificando a superfície química das nanopartículas magnéticas.

[007] Várias biomoléculas podem ser imobilizadas em nanopartículas magnéticas, dentre estas, as lectinas, que permitem uma ligação reversível com a molécula a ser purificada permitindo a posterior separação do derivado imobilizado e da molécula purificada. As lectinas são uma classe de proteínas, de origem não imunológica, que são capazes de se ligar não covalentemente e reversivelmente a carboidratos (Andrade et al., *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4623–4629, 2013). Essas ligações podem ser por meio de pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas ou ligações hidrofóbicas. As lectinas são comuns na natureza, estando presente desde bactérias até mamíferos. As lectinas podem ser usadas como ferramentas na detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, sendo renomeada de tradutoras da expressão de carboidratos.

[008] Documentos de patentes descrevem processos de produção de nanopartículas conforme descrito a seguir:

[009] Muitos documentos de patente descrevem a produção de nanopartículas como em BR 11 2014 027834 2, BR 11 2014 023859 6, BR 11 2014 016562 9, BR 11 2014 014730 2, BR 11 2014 009753 4, BR 11 2014 006596 9, BR 10 2012 022036 9, BR 10 2012 021728 7, BR 11 2013 021731 6, BR 11 2013 032971 8, BR 11 2013 021731 6, BR 11 2013 000267 0, US 2015152324 A1. Estes documentos diferem da presente invenção por não utilizarem nanopartículas magnetizadas.

[010] Outros documentos, como a patente BR 10 2012 029535 0 A2 descreve uma metodologia para estabilizar nanopartículas de prata, gerada por qualquer método, sem a necessidade de agente de transferência de fase. Ou a patente CN102360909 (A) que descreve um método de preparação de nanopartículas magnéticas de fluoretos. Os documentos diferem da presente invenção por não apresentarem funcionalização com glutaraldeído o que permite imobilização de biomoléculas por ligação covalente.

[011] A patente US 20120315480 A1 descreve uma metodologia de síntese de nanopartículas de cobre e sua utilização no campo da biomedicina como suporte para o transporte de substâncias ativas, no tratamento de diversos tipos de câncer utilizando a hipertermia, agente de contraste em ressonância magnética. O documento difere da presente invenção por não utilizar íons de ferro e sim de cobre para a síntese da nanopartículas magnéticas além de não possuir revestimento de polianilina.

[012] A patente WO 2011012735 A1 refere-se a síntese de nanopartículas ferromagnéticas ou superparamagnéticas para diversas aplicações na biomedicina. Os inventores prepararam nanopartículas à base de cobre, com propriedades magnéticas. O documento de patente difere da presente invenção pelas nanopartículas serem sintetizadas com nitrato de cobre e suas aplicações serem voltadas para o ramo biomédico.

[013] Em relação à literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando os ensinamentos descritos neste relatório descritivo. Portanto a invenção possui novidade frente ao estado da técnica.

Descrição da Invenção

[014] Para os fins desta invenção, concanavalina-A é um lectina, sendo assim uma proteína de origem não imunológica que se liga reversivelmente a carboidratos. Para os fins desta invenção, glicoproteínas são proteínas que apresentam carboidratos ligados covalentemente às suas estruturas peptídica.

[015] Para os fins desta invenção, "suporte" é qualquer material sólido insolúvel em água onde uma enzima pode ser ligada (confinada – imobilizada). "Derivado imobilizado" é o produto formado pela biomolécula ligada ao suporte. A imobilização é a técnica de confinamento de uma biomolécula em uma determinada região do espaço retendo sua atividade natural.

[016] Para os fins desta invenção, nanopartículas magnéticas são um óxido de ferro (Fe_3O_4) contendo a presença de grupos hidroxila, tais como Fe-OH, sobre sua superfície que permite ligações a compostos funcionais,

proporcionando então a possibilidade de uso como um suporte para imobilização de biomoléculas.

[017] Para os fins desta invenção, polianilina (PANI) é um polímero condutor com propriedades eletrônica e óptica, excelente estabilidade ambiental, fácil polimerização por síntese química, eletroquímica, fotoquímica e baixo custo do monômero. A PANI é um dos agentes funcionalizadores da superfície das nanopartículas magnéticas tornando-as quimicamente reagíveis com substâncias orgânicas.

[018] Para os fins desta invenção, glutaraldeído é um dialdeído saturado utilizado para reação com os grupamentos amino primários no processo de imobilização da biomolécula com o suporte.

[019] Os inventores desta invenção têm identificado um processo para a purificação de glicoproteínas com aplicação em indústrias alimentícias, farmacêuticas e comerciais. Na presente invenção, são consideradas concanavalina-A imobilizada covalentemente a nanopartículas magnéticas possuindo a capacidade de purificar glicoproteínas.

[020] Seguem abaixo descrições da invenção, em algumas de suas modalidades preferidas, em relação às figuras de 1 e 2.

[021] Figura 1: Magnetita funcionalizada com polianilina e concanavalina-A imobilizada covalente (1) sendo atraída por um ímã (2).

[022] Figura 2: Gel de eletroforese do extrato de β -galactosidase produzida pelo *Penicillium islandicum* URM5073 corado com nitrato de prata. Proteínas padrão – A, Extrato – B, Solução purificada – C.

[023] Figura 3: Gel de eletroforese da β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich®) contaminada com albumina (Sigma-Aldrich®) e caseína (Sigma-Aldrich®) corado com nitrato de prata. Proteínas padrão – A, Extrato – B, Solução purificada – C.

[024] Na primeira modalidade preferida é descrito o processo de produção de nanopartículas magnéticas. As soluções de FeCl_3 e FeCl_2 , preferencialmente na proporção em mol de 1,1:0,6 foram adicionadas a água,

sob agitação magnética, seguido de alcalinização com NaOH preferencialmente a 5,0 M até pH 10 quando as nanopartículas começaram a precipitar. A mistura foi aquecida preferencialmente a 50 °C durante 30 min com agitação vigorosa. As nanopartículas magnéticas foram cuidadosamente lavadas com água até a neutralização do pH. O material foi então seco. As nanopartículas magnéticas foram tratadas com uma solução de KMnO_4 preferencialmente a 0,1 M durante 1 hora a 25 °C e lavadas com água. Depois disso imersas em uma solução de 0,5 M de anilina preparada em 1 M de HNO_3 . Preferencialmente, a reação deve ocorrer durante 1 hora a 4 °C e após isso, as nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina (PANI) foram preferencialmente lavadas sucessivamente com água, ácido cítrico 0,1 M e novamente lavadas com água. O material foi seco a 50 °C e armazenado a 25 °C.

[025] Na segunda modalidade preferida é descrito o método de imobilização covalente de uma lectina, preferencialmente a concanavalina-A no suporte magnético revestido com polianilina pelo seguinte método: a magnetita funcionalizada com polianilina foi submetida à ativação com glutaraldeído preferencialmente a 2,5% durante, preferencialmente 1 hora a baixa temperatura, preferencialmente a 4 °C sob homogeneização constante. Posteriormente aplicou-se um campo magnético e a solução de glutaraldeído foi desprezada, realizando então lavagens com água e lavagens com tampão PBS (Tampão Fosfato-Salino) preferencialmente a 0,01 M e pH 7,2. Após o processo de lavagem, concanavalina-A (Con-A) foi incubada, preferencialmente por 1 hora, ao suporte magnético revestido e ativado para que ocorresse a imobilização da biomolécula. O derivado imobilizado foi submetido a lavagens com NaCl 1 M. Posteriormente, o derivado imobilizado foi incubado com solução de glicina 0,1 M para a inativação do glutaraldeído livre.

[026] Na terceira modalidade preferida é descrito o processo de purificação de biomoléculas pela nanopartícula contendo concanavalina-A imobilizada. Diversas soluções de *pool* de biomoléculas foram incubadas com

concanavalina-A conjugada a magnetita-Polianilina (magnetita-PANI) durante 3 horas. Após o período de incubação as amostras foram submetidas a lavagens preferencialmente com 0,1 M de NaCl. Em seguida, foram realizadas lavagens com solução de glicose preferencialmente a 0,3 M para desfazer a afinidade da glicoproteína à lectina imobilizada. Para completar o processo, as partículas foram lavadas com 1 M de NaCl.

Exemplo

Purificação de β -Galactosidase

[027] A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) conhecida como lactase ou β -D-galactosídeo galactohidrolase, pertence ao grupo das enzimas hidrolíticas. Seu papel fisiológico é a hidrólise de β -galactosídeos redutores de oligossacarídeos, polissacarídeos ramificados como galactomananas e da fração polissacarídica de glicoproteínas (Prieto et al., *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 26-29, 2014). O interesse pelo uso da β -galactosidase existe por motivos de suas funções biológicas, bem como o interesse pelo seu uso rotineiro em diagnóstico molecular, como marcador gênico (Mettenleiter et al., *Journal of virological methods*, 30, 55-65, 1990), como modelo de estudos de catálise enzimática (Wei et al., *Food chemistry*, 141, 3085–3092 2013) e de evolução molecular (Figuereido et al., *Journal of experimental botany*, 62, 2691–2703 2011), sendo também sua elevada aplicação na tecnologia de alimentos como a industrialização de laticínios e seus derivados (Vieira et al., *Biochemical Engineering Journal*, 81, 54-64 2013) e o tratamento de efluentes (Rosenberg et al., *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 47-54 2006). β -galactosidases podem ser obtidas através de diferentes fontes como os microrganismos, plantas e animais, portando propriedades distintas de acordo com sua origem (Budriene et al., *Central European Journal of Chemistry*, 3, 95-105, 2005). A escolha da fonte da β -galactosidase é de relevante importância, pois é dessa escolha que depende suas propriedades e consequentemente de suas aplicações (Grosová et al., *Journal Food Science*, 6, 1-14, 2003). O estímulo pela aplicação tecnológica

rotineira da enzima acarretou vários laboratórios a busca de técnicas e estratégias para sua purificação. Para enzimas de uso comercial o grau de pureza é um fator de elevada importância.

[028] Para a purificação da β -galactosidase produzida pelo *Penicillium islandicum* URM5073, 2 mL do extrato foi incubado por três horas com as nanopartículas magnéticas contendo concanavalina-A imobilizada sob homogeneização suave à 4 °C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi recolhido e o conjugado glicoproteína-lectina-magnetita-PANI foi submetido a três lavagens de 2 mL com 0,1 M de NaCl, em seguida, foram feitas quinze lavagens, cada uma contendo 2 mL de solução 0,3 M de glicose para separar a afinidade entre a glicoproteína e a lectina imobilizada. Para completar o processo foram realizados cinco lavagens de 2 mL com 1 M de NaCl. Todos os sobrenadantes foram realizados dosagem para proteína pelo método de Lowry et al. (The Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275, 1951).

[029] Para a determinação da atividade enzimática, 500 μ L do extrato fúngico foram incubados com 500 μ L de solução de o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) a 37 °C. Após 10 minutos uma alíquota de 500 μ L foi retirada e a ela adicionada 500 μ L de solução de tetraborato de sódio 10 mM. Uma unidade enzimática foi determina como a quantidade necessária para produzir 1 μ mol do produto (o-nitrofenol) por minuto de reação nas condições ensaiadas.

[030] Para determinação da eficiência do método de purificação foi realizado uma eletroforese. A eletroforese do extrato por *Penicillium islandicum* URM5073 e da solução purificada foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). SDS-PAGE foi realizada com um gel de corrida de 15% e de concentração de 4%. As proteínas foram coradas com nitrato de prata.

[031] A atividade específica é a relação da atividade enzimática sob a quantidade de proteína da amostra. Como resultado da purificação, a atividade específica da β -galactosidase no extrato fúngico foi de 0,53 U/mg, alcançando

após a purificação, a atividade de 3,23 U/mg. Tendo um estado de purificação 6 vezes mais em relação ao extrato bruto.

[032] Para a purificação da β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich®) contaminada com albumina (Sigma-Aldrich®) e caseína (Sigma-Aldrich®), 2 mL do extrato contaminado foi incubado por três horas com as nanopartículas magnéticas contendo concanavalina-A imobilizada sob homogeneização suave à 4 °C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi recolhido e o conjugado glicoproteína-lectina-magnetita-PANI foi submetido a três lavagens de 2 mL com 0,1 M de NaCl, em seguida, foram feitas quinze lavagens, cada uma contendo 2 mL de solução 0,3 M de glicose para separar a afinidade entre a glicoproteína e a lectina imobilizada. Para completar o processo foram realizadas cinco lavagens de 2 mL com 1 M de NaCl. Todos os sobrenadantes foram realizados dosagem para proteína pelo método de Lowry et al., The Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275 (1951).

[033] Para a determinação da atividade enzimática, 500 μ L do extrato contaminado foram incubados com 500 μ L de solução de o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) a 37 °C. Após 10 minutos uma alíquota de 500 μ L foi retirada e a ela adicionada 500 μ L de solução de tetraborato de sódio 10 mM. Uma unidade enzimática foi determina como a quantidade necessária para produzir 1 μ mol do produto (o-nitrofenol) por minuto de reação nas condições ensaiadas.

[034] Para determinação da eficiência do método de purificação foi realizado uma eletroforese. A eletroforese do extrato contaminado contendo β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich®), albumina (Sigma-Aldrich®) e caseína (Sigma-Aldrich®), e da solução purificada foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). SDS-PAGE foi realizada com um gel de corrida de 15% e de concentração de 4%. As proteínas foram coradas com nitrato de prata.

[035] A atividade específica é a relação da atividade enzimática sob a quantidade de proteína da amostra. Como resultado da purificação, a atividade

específica da β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich®), albumina (Sigma-Aldrich®) e caseína (Sigma-Aldrich®), foi de 0,002 U/mg, alcançando após a purificação, a atividade de 11,02 U/mg. Atingindo dessa forma um estado de purificação 5510 vezes mais em relação ao extrato bruto.

[036] A eletroforese revela o peso molecular das proteínas de cada amostra. β -galactosidase apresentou peso molecular aproximado de 100 kDa.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS caracterizado pelo suporte ser uma nanopartícula magnética (Fe_3O_4) revestida por polianilina (PANI), funcionalizada com glutaraldeído.
2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, segundo reivindicação 1, caracterizado pela biomolécula a ser imobilizada ser uma lectina.
3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, segundo reivindicação 1, caracterizado pelo derivado imobilizado ligar-se reversivelmente a glicoproteínas que podem ser purificadas.

Figura 1

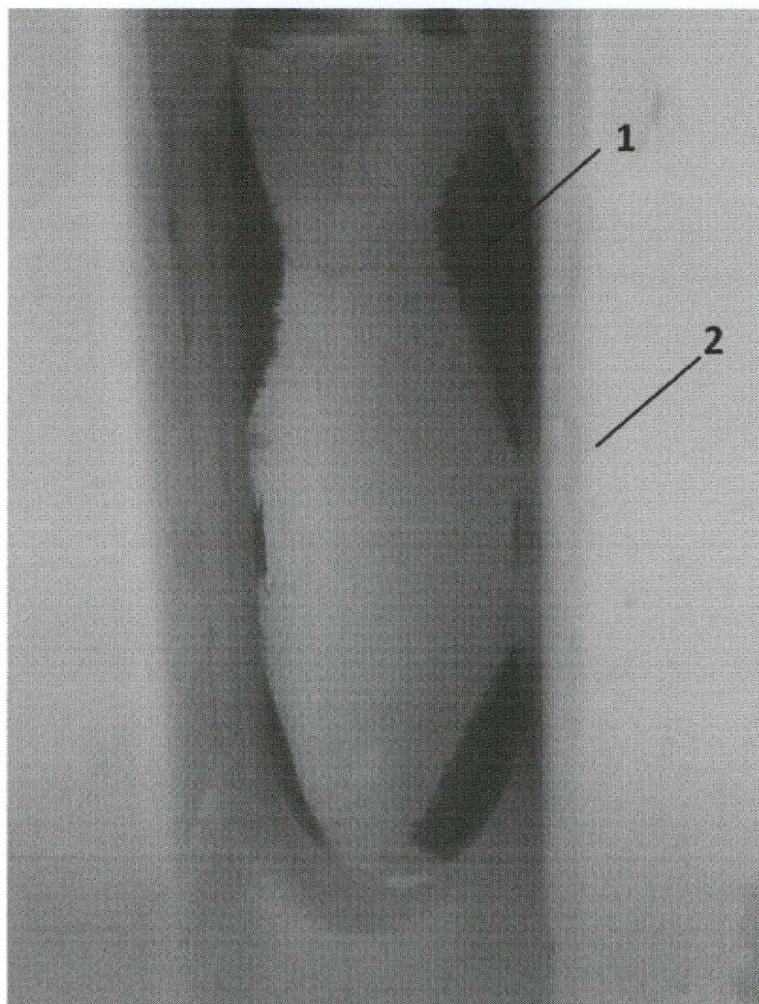


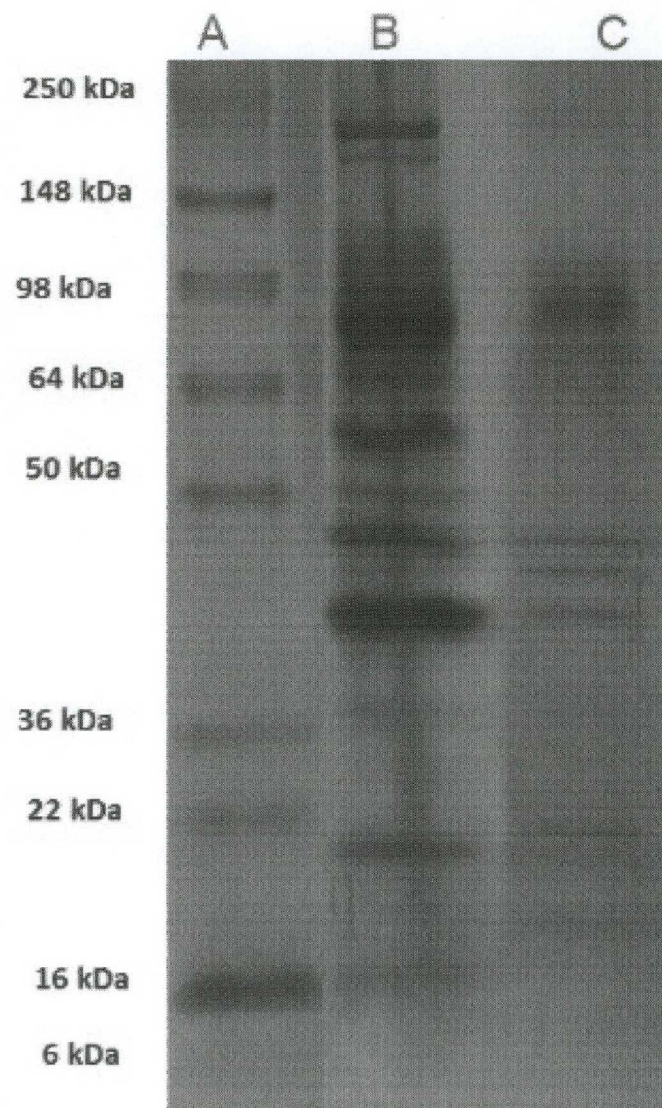
Figura 2

Figura 3