



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

(21) BR 102018067992-9 A2



(22) Data do Depósito: 06/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/03/2020

(54) **Título:** MEMBRANA COMPÓSITA POROSA DE POLIMETILMETACRILATO/QUITOSANA/POLIANILINA - PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E SEU USO PARA A EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

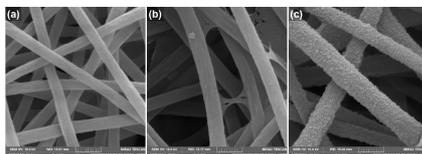
(51) **Int. Cl.:** C12N 15/10; A61K 31/722; B01D 67/00; B01D 69/00; B01D 69/02; (...).

(52) **CPC:** C12N 15/10; A61K 31/722; B01D 67/00; B01D 69/00; B01D 69/02; (...).

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

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

(57) **Resumo:** MEMBRANA COMPÓSITA POROSA DE POLIMETILMETACRILATO/QUITOSANA/POLIANILINA - PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E SEU USO PARA A EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS A extração e purificação de biomoléculas são etapas-chave em vários protocolos de biologia molecular. Em particular, a concentração de ácidos nucleicos de boa qualidade e alta produtividade é cada vez mais necessária em procedimentos envolvendo sequenciamento genético, diagnóstico de doenças e criminologia forense, entre outras aplicações. Neste contexto, na presente invenção, é relatada a preparação de uma nova membrana compósita porosa e seu uso em kits ou protocolos para extração, purificação e concentração de biomoléculas. A membrana compósita consiste de uma membrana de polímero não-condutor produzida através da técnica de eletrofição, que, posteriormente, é funcionalizada com o uso de um polissacarídeo catiônico e, em seguida, por um polímero condutor. No relatório descritivo, é demonstrada a produção da membrana em sua forma preferencial, a qual é composta por polimetilmetacrilato/quitosana/polianilina, e seu uso efetivo, como material ativo, em procedimentos para a obtenção de ácidos nucleicos de boa qualidade a partir de amostras dissolvidas em meios aquosos ou de sangue total de humanos. A membrana de PMMA/Qui/PANI possui carga superficial positiva, que pode ser modulada (...).



**MEMBRANA COMPÓSITA POROSA DE  
POLIMETILMETACRILATO/QUITOSANA/POLIANILINA -  
PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E SEU USO PARA A EXTRAÇÃO,  
PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

**Campo de invenção**

[01] A presente invenção refere-se à preparação de uma membrana compósita porosa, produzida através da técnica de eletrofição e sua posterior funcionalização por um polissacarídeo catiônico e um polímero condutor, para uso em métodos ou kits para extração, purificação, separação e concentração de ácidos nucleicos a partir de soluções aquosas ou amostras biológicas de composição complexa, tais como sangue, plasma, urina, saliva, entre outras. Podendo, ainda, o método ser estendido para a extração, purificação, separação e concentração de outras biomoléculas ou moléculas que apresentem cargas negativas disponíveis para realizar troca iônica com a referida membrana.

**Antecedentes da invenção**

[02] O ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) é uma biomolécula de importância fundamental para todos os organismos por, entre muitas outras funções, desempenhar papel essencial na manutenção dos processos vitais e na preservação das informações genéticas da espécie. Com os avanços alcançados nas últimas décadas na área de biologia molecular, é crescente a demanda por metodologias e protocolos para a obtenção de ácidos nucleicos com boa qualidade e alto rendimento. De fato, tanto a extração quanto a purificação de ácidos nucleicos se constituem em etapas fundamentais para diversos procedimentos em diferentes áreas, tais como sequenciamento genético, diagnóstico de doenças, criminologia forense e aplicações nas áreas de farmacologia, ciências agrícolas e alimentares, entre outras.

[03] Diversos métodos são atualmente empregados para a extração e purificação de DNA. Aqueles mais tradicionais, baseados em extração líquido-

líquido para o isolamento do DNA, envolvem o uso de solventes orgânicos tóxicos e, geralmente, requerem muitas etapas de precipitação e centrifugação, como no método de extração usando Fenol/Clorofórmio. Outros, como os métodos baseados na extração em fase sólida, envolvem o uso de esferas, partículas magnéticas ou colunas revestidas ou modificadas com materiais inorgânicos (tais como sílica, zircônia e nanotubos de carbono), membranas de celulose ou resinas. Porém, estes métodos também não estão livres de inconvenientes, como a necessidade de uso de solventes caotrópicos, ter de requerer várias etapas para a sua implementação e, portanto, consumir muito tempo, ou a necessidade de pessoal altamente qualificado ou treinado para sua execução.

[04] Para contornar estas dificuldades, e evitar o uso em larga escala de solventes orgânicos ou caotrópicos, mais recentemente sistemas nanoestruturados com melhores afinidades com as cadeias de DNA vêm sendo desenvolvidos, como por exemplo, o uso de partículas magnéticas ou membranas revestidas com polímeros orgânicos, tais como a polianilina (PANI), polidopamina, polietilenoamina, entre outros, que permitem a adsorção e dessorção de ácidos nucleicos simplesmente por ajustes no pH do meio. Dentro deste contexto, a presente invenção relata a preparação de uma membrana compósita porosa composta por polimetilmetacrilato/quitosana/polianilina (PMMA/Qui/PANI) e o seu uso para a extração, purificação e concentração de ácidos nucleicos, que, além de ser de fácil preparação e de baixo-custo, não necessita de agentes caotrópicos ou outros compostos para que ocorra sua ligação com ácidos nucleicos.

[05] A seguir são mencionadas algumas patentes/trabalhos que fazem uso de membranas e/ou substratos e/ou matrizes que contenham PMMA e/ou quitosana e/ou PANI em sua formulação e que foram empregados em sistemas ou métodos para a extração, purificação e concentração de biomoléculas.

[06] O PMMA é um polímero não-condutor atrativo para uso como matriz ou substrato em sistemas de extração e purificação de ácidos nucleicos devido a

ser um material quimicamente inerte e biocompatível, exibir facilidade para o processamento, ser economicamente viável, de baixo peso molecular e elevada resistência. As patentes EP3141298 A1, CN101016510 A e KR20090099256 A e o trabalho de Reedy et al. (2011) já descreveram o uso de PMMA como substrato inerte em sistemas de extração e purificação de ácidos nucleicos em dispositivos microfluídicos. Nestes, o PMMA ou é funcionalizado por tratamento a plasma para obtenção de grupos COOH, ou por esferas de silicato ou zircônio, ou gel de óxido de silício, ou ainda por quitosana para obtenção de grupos funcionais ligantes de afinidade com moléculas de ácidos nucleicos.

[07] Já o biopolímero quitosana, uma forma parcialmente desacetilada da quitina, se mostra como um material de revestimento muito promissor na área de desenvolvimento de novos sistemas/métodos de extração e purificação de ácidos nucleicos, devido ao mesmo se ligar a moléculas de ácidos nucleicos de maneira dependente do pH do meio. De fato, as patentes US20170015992 A1 e US20090215124 A1, bem como os trabalhos de Cao et al. (2006), Hagan et al. (2009), Reedy et al. (2011), Kendall et al. (2014), Parton et al. (2012), Jiang et al. (2012) e Tiwari et al. (2015) já descreveram o uso da quitosana como material de revestimento de partículas magnéticas, de sílica e de dispositivos microfluídicos para posterior aplicação em procedimentos de extração e purificação de ácidos nucleicos a partir de sistemas complexos como sangue total e células biológicas. Nestes, a quitosana é o material ativo que se liga ao DNA quando protonada em meios ácidos e que, quando em meios alcalinos, é neutralizada, permitindo a libertação do DNA.

[08] Por sua vez, também é crescente o uso de polímeros condutores como adsorventes em diferentes áreas de aplicação, como, por exemplo, remediação ambiental (remoção de corantes, metais pesados e outros) e extração de biomoléculas. Na extração e purificação de ácidos nucleicos, a polianilina se destaca devido a sua rica química de dopagem/desdopagem, que lhe confere cargas positivas moduláveis (a depender do pH/estado de oxidação). Tanto as patentes RU2631934C1, US7018538 B2, CN102174195B, BR102015007423-9 e

BR102014028423-0, quanto os trabalhos de Kapustin et al. (2003), Gai et al. (2013), Medina-Llamas et al. (2014), Brandão et al. (2016) e Maciel et al. (2018), já descreveram o uso de PANI como material de revestimento de membranas e partículas para separação e extração de ácidos nucleicos a partir de meios aquosos e/ou sangue total. Nestes, o material ativo é a PANI, que, assim como a quitosana, se liga aos ácidos nucleicos de maneira dependente do pH do meio.

[09] No entanto, conforme descrito acima, embora já existam trabalhos que descrevem o uso de PMMA e/ou quitosana e/ou PANI em protocolos ou métodos para extração e purificação de ácidos nucleicos, ainda não se tem relatado na literatura a produção de uma membrana porosa de PMMA/Qui/PANI, numa configuração que leva em conta o uso dos três materiais (PMMA, Qui e PANI) que, juntos, formam uma membrana compósita que apresenta alta afinidade com moléculas de ácidos nucleicos, favorecendo a sua adsorção devido a um efeito sinérgico entre a porosidade da membrana de PMMA (matriz) e a atividade química dos revestimentos de quitosana e de nanoestruturas de polianilina. Assim, conforme será demonstrado na descrição detalhada da invenção, este novo material se mostra conveniente para uso em novos protocolos que se apresentam como alternativas vantajosas e confiáveis aos atuais métodos de extração de DNA baseados em matrizes sólidas. As principais diferenças entre a membrana compósita aqui descrita e patentes/trabalhos similares podem ser melhor apreciadas na Figura 13.

### **Sumário da invenção**

[10] Um dos objetivos da presente invenção é apresentar um método para a produção de uma membrana porosa composta por polímero não-condutor/polissacarídeo/polímero condutor, a partir da combinação das técnicas de eletrofiação, adsorção e polimerização química. A composição da membrana compósita compreende diferentes elementos, dos quais podemos citar: (a) uma membrana de polímero não-condutor (PnC), de origem biológica ou sintética, preparada pela técnica de eletrofiação. Preferencialmente, a membrana de PnC é

formada por fibras uniformes de PMMA com diâmetro entre 50 nm e 20  $\mu\text{m}$ ; (b) um polissacarídeo catiônico, preferencialmente sendo a quitosana; (c) um monômero, preferencialmente sendo a anilina.

[11] O componente polímero condutor é obtido a partir de uma reação de polimerização do monômero em meio aquoso, na presença de, pelo menos, um dopante e um oxidante. Para o uso do monômero anilina, preferencialmente o agente dopante é o  $\text{Cl}^-$  e o agente oxidante é o persulfato de amônio (APS).

[12] Num primeiro aspecto, a invenção descreve, como exemplo, as metodologias empregadas para a obtenção da forma de realização preferencial da membrana compósita e sua caracterização. Para isso, inicialmente foram preparadas membranas de PMMA, a partir da técnica de eletrofição sucedida por um tratamento térmico-mecânico. Em seguida, as fibras da membrana de PMMA são funcionalizadas com um polissacarídeo (quitosana) e, subsequentemente, nanoestruturas de polianilina são aderidas à sua superfície via polimerização química da anilina. As características da membrana PMMA/Qui/PANI (preparada pela forma de preparação preferencial) como morfologia, composição e molhabilidade foram determinadas a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopias de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) e no infravermelho (IV) e por medidas de ângulo de contato.

[13] Num outro aspecto, a presente invenção descreve alguns métodos para a aplicação da membrana compósita porosa para a extração, purificação e concentração de ácidos nucleicos presentes em soluções aquosas ou diretamente de sistemas biológicos. Em algumas exemplificações, relatadas na descrição detalhada da invenção, é demonstrada a efetividade do uso de membranas de PMMA/Qui/PANI na captura de DNA de espermatozoides de salmão dissolvido em uma solução aquosa, bem como na extração, purificação e concentração de DNA a partir de sangue total de humanos. Também é exemplificado o uso desta membrana via inserção direta na solução de DNA (adicionando a membrana ao

recipiente) ou via processo de centrifugação (através de colunas de centrifugação contendo a membrana compósita).

[14] Nos procedimentos exemplificados nesta invenção, a captura do DNA pela membrana envolve, principalmente, interações eletrostáticas entre o DNA (que possui cargas negativas, provenientes dos grupos fosfatos presentes em sua cadeia) e as cargas positivas da membrana compósita (presentes nas cadeias de Qui e PANI quando em meios ácidos), além de processos de troca iônica entre o DNA e a PANI.

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

[15] Como já mencionado anteriormente, diversas metodologias (e materiais) já são utilizados atualmente para a extração, purificação e concentração de ácidos nucleicos. Entretanto, comumente as técnicas laboratoriais mais convencionais envolvem o uso de solventes orgânicos (muitas vezes tóxicos, seja para o usuário, seja para o meio ambiente), além de, em geral, requererem muitas etapas para sua implementação (consumindo muito tempo) e a necessidade de pessoal altamente qualificado para sua execução. Mais recentemente, no intuito de contornar estas dificuldades, sistemas nanoestruturados envolvendo o uso de partículas revestidas com polímeros orgânicos, como a PANI, vêm sendo desenvolvidos. Porém, um uso mais amplo destes sistemas é limitado pela tendência das nanoestruturas poliméricas formarem agregados, o que diminui sua eficiência.

### **Vantagens da invenção**

[16] Uma das vantagens proporcionada pela presente invenção está na facilidade de síntese e preparação da membrana compósita porosa de PMMA/Qui/PANI, bem como nas suas propriedades morfológicas e a química de sua superfície. No processo de obtenção da membrana compósita, uma membrana de PMMA com fibras uniformes é produzida através da técnica de eletrofiação e utilizada como um suporte poroso para a adesão da quitosana e

posterior imobilização das nanoestruturas de PANI. Ao imobilizar as nanoestruturas sobre as fibras de PMMA/Qui, obtém-se um aumento da área de superfície ativa e minimiza-se o grau de aglomeração das nanoestruturas. Essa configuração dos elementos compósitos favorece a adsorção do DNA por um efeito sinérgico da porosidade da membrana e da atividade química da quitosana e polianilina nanoestruturada. Além disso, o risco de contaminação da amostra/meio por liberação inapropriada ou mesmo perda da nanoestrutura na solução, durante o seu uso, é reduzido.

[17] Outras vantagens inerentes à membrana compósita são relacionadas ao seu uso em protocolos ou métodos para a extração, purificação e concentração de biomoléculas, em que:

- (a) a sua implementação é simples e de baixo-custo, não necessitando de equipamentos sofisticados ou pessoal altamente treinado;
- (b) não requer o uso de solventes orgânicos tóxicos, pois a adsorção e a dessorção das biomoléculas na membrana compósita se dão através da interação entre a carga superficial das biomoléculas e as cargas da membrana (cujo número pode ser modulado com a mudança de pH do meio);
- (c) a membrana compósita pode ser implementada para uso em diferentes metodologias: a membrana pode ser adicionada diretamente da solução contendo a biomolécula de interesse ou ser adaptada em colunas de centrifugação, por exemplo. No caso de adição direta na solução, a membrana pode ser facilmente removida do meio.

[18] Uma vantagem adicional da presente invenção é a rica química de dopagem/desdopagem tanto da quitosana quanto da PANI, o que confere cargas positivas à membrana compósita, permitindo também sua aplicação como material adsorvente para aplicações na área de remediação ambiental, com a remoção de contaminantes de meios aquosos ou efluentes como, por exemplo, corantes e íons de metais pesados.

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

[19] A novidade e o efeito técnico da presente invenção consiste no desenvolvimento de uma membrana compósita porosa de PMMA/Qui/PANI, bem como a sua utilização em kits ou métodos de extração, purificação e concentração de ácidos nucleicos a partir de meios aquosos ou sistemas biológicos. Até o momento, tanto o método de produção quanto a aplicação da membrana aqui descrita não foram ainda reportados por nenhuma outra instituição de pesquisa, ensino ou indústria, ou mesmo descritos de alguma forma na literatura.

### **Breve descrição das Figuras**

[20] A Figura 1 apresenta as micrografias MEV das membranas de (a) PMMA, (b) PMMA/Qui e (c) PMMA/Qui/PANI.

[21] A Figura 2 apresenta o ângulo de contato para as membranas de (a) PMMA, (b) PMMA/Qui e (c) PMMA/Qui/PANI.

[22] A Figura 3 apresenta os espectros de absorção no infravermelho das membranas de (a) PMMA, (b) PMMA/Qui e (c) PMMA/Qui/PANI. A curva (d) corresponde ao espectro da quitosana pura.

[23] A Figura 4 apresenta os espectros de absorção no UV-Vis das membranas de (a) PMMA, (b) PMMA/Qui e (c) PMMA/Qui/PANI.

[24] A Figura 5 apresenta os espectros de absorção UV-Vis da solução de DNA antes e após a interação com a membrana PMMA/Qui/PANI, bem como o espectro da solução de eluição após o procedimento de dessorção do DNA a partir da membrana.

[25] A Figura 6 apresenta o efeito da variação do pH da solução de ligação sobre a capacidade de adsorção de DNA pela membrana PMMA/Qui/PANI. (Utilizando uma solução de DNA 250 mg/L).

[26] A Figura 7 apresenta o efeito do tempo de interação sobre a capacidade de adsorção de DNA pela membrana PMMA/Qui/PANI. (Utilizando uma solução de DNA 250 mg/L).

[27] A Figura 8 apresenta uma representação esquemática dos diferentes passos empregados nos procedimentos para a (a) adsorção e (b) eluição de DNA pela membrana PMMA/Qui/PANI a partir de soluções aquosas.

[28] A Figura 9 apresenta o espectro de absorção UV-Vis de uma solução de DNA genômico extraído com a membrana PMMA/Qui/PANI a partir de uma amostra de sangue total.

[29] A Figura 10 apresenta uma ilustração de uma forma de montagem de membranas de (a) PMMA e (b) PMMA/Qui/PANI na forma de coluna de centrifugação.

[30] A Figura 11 apresenta o espectro de absorção UV-Vis de uma solução de DNA genômico extraído a partir de uma amostra de sangue utilizando a membrana PMMA/Qui/PANI na forma de coluna de centrifugação.

[31] A Figura 12 mostra as curvas em tempo real da amplificação por PCR de amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano utilizando a membrana PMMA/Qui/PANI.

[32] A Figura 13 mostra uma comparação entre as patentes/trabalhos que fazem uso de membranas/matrizes/substratos compostas por PMMA e/ou Quitosana e/ou PANI em kits ou métodos para extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas.

### **Descrição detalhada da invenção**

[33] A presente invenção compreende, além de um método para a produção de uma nova membrana compósita – constituída de um polímero não-condutor, um polissacarídeo e um polímero condutor, o uso destas em kits ou métodos para a extração, purificação e concentração de biomoléculas, preferencialmente de ácidos nucleicos. A seguir serão detalhados a forma preferencial de preparação da membrana compósita e alguns exemplos de seu uso (como material ativo) para extração, purificação e concentração de DNA a partir de soluções aquosas e de amostras de sangue total de humanos. Deixa-se compreendido que a presente invenção não se limita aos detalhes ou condições

específicas descritas nos exemplos, que apenas têm o objetivo de ilustrar a forma de preparação preferencial da membrana compósita e algumas das diferentes formas de aplicação da invenção.

### **Exemplo 1. Preparação e caracterização da forma de realização preferida da membrana compósita**

#### **Exemplo 1.1. Preparação de membrana de PMMA por eletrofiação**

[34] Membranas de PMMA foram produzidas através da técnica de eletrofiação. Inicialmente, soluções do polímero com concentrações de 5% a 30% m/v foram preparadas dissolvendo-o em solvente ou mistura de solventes apropriados, sob constante agitação magnética ou mecânica. Depois disso, a solução polimérica foi carregada em uma seringa e submetida a um processo de eletrofiação sob uma tensão elétrica entre 5 kV e 50 kV e uma velocidade de fluxo de ejeção da solução ajustada entre 0,1 e 5,0 mL/h. As fibras foram eletrofiadas à temperatura ambiente, sob umidade relativa na faixa de 30 a 65%, e coletadas na forma de membrana em uma folha de alumínio anexada a um coletor aterrado, localizado a uma distância entre 7 e 20 cm da ponta do capilar (agulha).

[35] Após o processo de eletrofiação, a membrana obtida foi retirada do coletor e seca à temperatura ambiente durante pelo menos 12 h para permitir a evaporação do solvente residual ainda presente. Depois, a membrana coletada na etapa anterior foi submetida a um processo de tratamento térmico-mecânico; para isso a membrana (ainda sobre a folha de alumínio) foi coberta com outra folha de alumínio e posicionada em um forno a uma temperatura abaixo da transição vítrea do polímero empregado (até 105°C para o caso do PMMA) e comprimidas mecanicamente por 24 h.

[36] Depois do tratamento térmico-mecânico, a membrana produzida é cortada nos tamanhos e formas geométricas desejadas.

**Exemplo 1.2. Preparação das membranas compósitas de PMMA/Qui/PANI**

[37] Membranas compósitas de PMMA/Qui/PANI foram preparadas em duas etapas diferentes, onde inicialmente as fibras da membrana de PMMA foram funcionalizadas com o biopolímero quitosana e, subsequentemente, um procedimento químico *in situ* foi usado para permitir o crescimento do polímero condutor PANI sobre as fibras de PMMA/Qui.

[38] Na primeira etapa, a membrana de PMMA, preparada pelo método descrito no Exemplo 1.1, foi colocada por 2 h em um béquer contendo uma solução de quitosana (0,1 a 15%) dissolvida em ácido acético. Em seguida, a membrana de PMMA/Qui foi retirada da solução, lavada com água deionizada e deixada secar à temperatura ambiente.

[39] Já a incorporação das cadeias de PANI foi obtida pela colocação da membrana PMMA/Qui em um béquer contendo 0,33 mmol de anilina e 75 mg do agente redutor (preferencialmente o APS) dissolvidos em 50 mL de HCl (0,1 M). Esta mistura foi deixada sob agitação constante por 12 h a uma temperatura de 5 °C. Ao final, as membranas de PMMA/Qui/PANI obtidas foram lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente.

**Exemplo 1.3. Métodos de caracterização e as características da membrana compósita**

[40] O diâmetro das fibras e as características morfológicas das membranas de PMMA, PMMA/Qui e PMMA/Qui/PANI foram determinados usando um microscópio eletrônico de varredura MIRA3 (TESCAN, República Tcheca). A molhabilidade das membranas frente à solução aquosa foi estimada usando um medidor de ângulo de contato CAM 100 (KSV, Finlândia). Para corroborar a composição dos materiais preparados, bem como o estado de oxidação do polímero condutor na membrana PMMA/Qui/PANI, os espectros de absorção no ultravioleta-visível (200–900 nm) e no infravermelho (4000–400 cm<sup>-1</sup>) correspondentes foram obtidos usando os espectrofotômetros UV-2600 e IR Tracer-100 (ambos da Shimadzu, Japão), respectivamente.

[41] Na Fig. 1 são apresentadas as micrografias de microscopia eletrônica de varredura das membranas em cada etapa da síntese. A membrana de PMMA eletrofiada é porosa e possui fibras uniformes e com pouca rugosidade (Fig. 1a). As fibras da membrana de PMMA permanecem homogêneas após o revestimento com a quitosana (Fig. 1b), embora seja possível observar a presença de filmes finos de quitosana formados entre algumas fibras. Já na Fig. 1c pode ser notado que, após a polimerização da anilina, as fibras se tornam mais rugosas e ficam recobertas por nanoestruturas de PANI. Além disso, a porosidade da membrana de PMMA se mantém na membrana compósita PMMA/Qui/PANI.

[42] As mudanças na propriedade de molhabilidade das membranas ao longo das diferentes etapas de sua preparação e funcionalização foram estudadas analisando o ângulo de contato de uma gota de água sobre sua superfície (Fig. 2). A membrana de PMMA é altamente hidrofóbica em sua forma pura, apresentando um ângulo de contato de  $117^\circ$  (Fig. 2a). Essa característica representa um impedimento para que a polimerização da anilina ocorra sobre toda a membrana de PMMA, pois a solução de reação não consegue interagir com as fibras mais internas. No entanto, esta limitação foi contornada ao se revestir as fibras com quitosana, procedimento que leva as membranas a assumirem uma natureza mais hidrofílica (Fig. 2b). Essa propriedade de hidrofilicidade é mantida na membrana compósita PMMA/Qui/PANI (Fig. 2c). Essas mudanças no ângulo mostram que o revestimento das fibras de PMMA com quitosana se constitui como um passo importante para a obtenção da membrana compósita, pois suprime a necessidade de tratamentos adicionais para a modificação da química de superfície das membranas (como o uso de plasma de ar, por exemplo). Além disso, assim como a PANI, a quitosana também possui grupos aminos capazes de interagir com moléculas carregadas (como o DNA, por exemplo).

[43] Para confirmar a incorporação da quitosana e da polianilina, as membranas preparadas foram submetidas a análises pelo uso da espectroscopia no infravermelho (Fig. 3). No espectro da membrana de PMMA pura (curva a),

podem ser observados picos característicos em 2995, 2951 e 1732  $\text{cm}^{-1}$  que são correlacionados aos estiramentos C–H assimétrico e simétrico, e ao estiramento C=O nos grupos carbonilas na cadeia do polímero, respectivamente. Já os picos em 1438, 1242, 1150 e 987  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos aos estiramentos  $\text{CH}_3$ , C–O, O– $\text{CH}_3$  e ao dobramento C–H, respectivamente. No espectro da membrana de PMMA revestida por quitosana (curva b), enquanto os picos correspondentes à matriz polimérica de polimetilmetacrilato são preservados, três novas bandas, características da quitosana (ver curva d), aparecem em torno de 3435, 1654 e 1595  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas estão associadas ao estiramento N–H dos grupos aminos primários, deformação axial C=O de grupos amidas e deformação angular N–H de amins primárias, respectivamente. No caso do espectro da membrana PMMA/Qui/PANI (curva c), muito embora todas as bandas e picos observados na membrana PMMA/Qui estejam presentes, não é possível distinguir as vibrações características da PANI daquelas relacionadas à quitosana e ao PMMA, devido à sobreposição das bandas.

[44] A presença da PANI na membrana preparada pôde ser confirmada pelas análises de UV-Vis (Fig. 4). O espectro do PMMA puro (curva a) apresenta uma banda de alta intensidade na região (200–240) nm, que pode ser atribuída às transições  $\pi-\pi^*$  dos grupos carbonilas presentes na estrutura do polímero. No caso da membrana PMMA/Qui (curva b), a banda que aparece em torno de 280 nm (parcialmente sobreposta) corresponde à absorbância característica da quitosana. Já o espectro da membrana PMMA/Qui/PANI (curva c) mostra que a polianilina foi efetivamente incorporada à superfície da membrana: observa-se a existência de três bandas de absorção próximas de 340, 430 e 800 nm, que são atribuídas às transições  $\pi-\pi^*$  dos anéis benzenóides e à presença de pólarons e bipólarons, respectivamente. Essas bandas são características da PANI em sua forma condutora (sal esmeraldina).

### **Extração, separação, purificação e concentração de moléculas de DNA usando a membrana compósita**

[45] A presente invenção compreende, além de um método para a produção de uma membrana compósita de PMMA/Qui/PANI, o uso desta em kits ou métodos para a extração, purificação e concentração de biomoléculas, preferencialmente de ácidos nucleicos.

[46] A membrana compósita descrita na presente invenção possui afinidade não específica por ácidos nucleicos, o que possibilita a sua utilização em aplicações de extração, purificação e concentração destas biomoléculas. A membrana compósita pode interagir com moléculas de ácidos nucleicos por meios de interações eletrostáticas e/ou troca iônica entre os grupos ativos da membrana compósita (carregados positivamente) e os grupos fosfatos do ácido nucléico (carregados negativamente). Algumas exemplificações de uso da membrana compósita são ilustradas a seguir. Deixa-se compreendido que a presente invenção não se limita aos detalhes ou condições específicas descritas nos exemplos, que apenas têm o objetivo de ilustrar algumas das diferentes formas de aplicação da invenção.

### **Exemplo 2. Adsorção, separação e dessorção de DNA a partir de meios aquosos**

[47] Para avaliar a capacidade da membrana compósita PMMA/Qui/PANI adsorver moléculas de DNA a partir de meios aquosos, inicialmente preparou-se uma solução estoque de DNA de esperma de salmão (250 mg/L). Os experimentos de adsorção foram realizados colocando-se 0,6 mg de membrana PMMA/Qui/PANI dentro de microtubos contendo 1 mL da solução de DNA. Os tubos foram mantidos sob agitação constante de 300 rpm por um determinado período de tempo. Por fim, a membrana foi retirada do tubo e a solução sobrenadante analisada por UV-Vis. As concentrações das soluções de DNA, antes e após os experimentos de adsorção, foram determinadas medindo sua

absorbância em 260 nm, por meio de um espectrofotômetro UV-Vis Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA).

[48] A capacidade de adsorção de DNA em função do tempo ( $q_t$ , em mg/g), isto é, a quantidade de DNA adsorvido (mg) por unidade de massa (g) de membrana no tempo  $t$ , foi calculada de acordo com a relação

$$q_t = \frac{V(C_0 - C_t)}{m}, \quad (1)$$

onde  $V$  é o volume da solução (L),  $C_0$  é a concentração inicial (mg/L) de DNA,  $C_t$  é a concentração da solução de DNA (mg/L) no tempo  $t$  e  $m$  é a massa (g) de membrana utilizada.

[49] Na Fig. 5 pode-se observar os espectros de absorção no UV-Vis de uma solução de DNA (17 mg/L) antes e após interagir com a membrana PMMA/Qui/PANI. Pode-se notar que o pico de absorbância característico do DNA em 260 nm diminui após a interação com a membrana, indicando que o DNA está sendo adsorvido por ela.

[50] Também na Fig. 5 pode-se observar que a dessorção (liberação) do DNA adsorvido na membrana é possível de ser realizada. Como um exemplo, a membrana com DNA adsorvido em sua superfície foi colocada para interagir com uma solução alcalina (como o NaOH 10 mM, por exemplo) por 10 min sob agitação constante de 300 rpm, sendo obtido um percentual de dessorção de aproximadamente 80% do DNA capturado.

[51] Em uma exemplificação foi investigado o efeito da variação do pH da solução de DNA na capacidade de adsorção das membranas PMMA/Qui/PANI. Para isso, foi utilizada uma solução de DNA com uma concentração de 250 mg/L, com um tempo de interação membrana-DNA fixo de 60 min. Os valores de pH das soluções foram variados de 2,5 a 5,0 utilizando soluções tampão ácidas (como ácido cítrico/citrato de sódio ou Glicina/HCl/NaCl, entre outros). Na Fig. 6 são apresentados os resultados do estudo de pH, onde pode ser observado que a membrana apresentou maiores capacidades de adsorção quando

em pHs mais ácidos. Essa capacidade, então, diminui gradativamente com o incremento do pH da solução, atingindo um valor equivalente a 20% ao obtido em pH 2,5 quando a interação membrana-DNA passa a ocorrer no pH = 5,0.

[52] A interação entre a membrana compósita PMMA/Qui/PANI e o DNA pode ser explicada a partir dos resultados do efeito do pH (Fig. 6) e do experimento de dessorção (Fig. 5). Em pHs ácidos, ambas as moléculas de quitosana e polianilina são passíveis de protonação, adquirindo assim cargas positivas e podendo atuar como polications. Já a molécula de DNA pode ser considerada como um poliânion, uma vez que grupos fosfatos, carregados negativamente, ocupam sua borda mais externa. Desse modo, a adsorção do DNA sobre a membrana PMMA/Qui/PANI ocorre principalmente por troca iônica, ou seja: em pHs ácidos, as cadeias de PANI são protonadas, com contra-íons se posicionando entre as cadeias para estabilizar a carga. Ao utilizar uma solução tampão de Glicina/HCl, por exemplo, o ânion cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) atua como contra-íon. Assim, durante a interação DNA-membrana, os ânions cloretos são substituídos pelos grupos fosfatos, que passam a atuar como contra-íons. Além disso, as cargas positivas da quitosana podem também contribuir para a adsorção do DNA, por meio de interações eletrostáticas. A maior quantidade de DNA adsorvido em pHs mais baixos (como 2,5) se deve ao fato que, nestes pHs, a membrana compósita apresenta mais grupos aminos protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) disponíveis para interagir.

[53] Em outra exemplificação, estudou-se o tempo necessário para a membrana PMMA/Qui/PANI remover a quantidade máxima de DNA de esperma de salmão (2 a 60 min) (Fig. 7). Para isso, foi utilizado 1 mL de uma solução aquosa de DNA (250 mg/L) com o pH ajustado para um valor de 2,5. Como mostrado na Fig. 7, o processo de captura das moléculas é rápido, e em apenas 10 min a capacidade da membrana já corresponde a aproximadamente 78 mg/g. Com um tempo maior de contato, a taxa de adsorção diminui gradativamente até o sistema atingir seu equilíbrio (máximo de adsorção) após decorridos 30 min de

interação, indicando que os sítios ativos da membrana saturaram de DNA, e que a mesma não pode capturar mais DNA.

[54] Na Fig. 8 mostramos um procedimento geral das etapas de captura e eluição de DNA pela membrana PMMA/Qui/PANI a partir de meios aquosos. Na etapa de captura (a), inicialmente uma membrana PMMA/Qui/PANI é adicionada em um recipiente contendo uma solução de DNA; então, a interação entre o DNA e a membrana é permitida ocorrer por um intervalo de tempo sob agitação constante; após isso, o complexo DNA-membrana é removido do recipiente e a solução sobrenadante descartada. O DNA capturado é então eluído em uma nova solução (b) colocando o complexo DNA-membrana em uma solução de eluição por um intervalo de tempo de, pelo menos, 10 min. Ao final, a membrana é retirada da solução de eluição.

### **Exemplo 3. Uso da membrana compósita para extração, purificação e concentração de DNA a partir de sangue total de humanos**

#### **Exemplo 3.1. Extração, purificação e concentração de DNA a partir de sangue total de humanos via interação membrana compósita/solução de sangue**

[55] Em algumas exemplificações, a extração, purificação e concentração de DNA a partir de sangue e utilizando a membrana PMMA/Qui/PANI envolve etapas de lise das células, captura/ligação do DNA à membrana, lavagem da membrana e a eluição do DNA capturado. Em cada uma dessas etapas, faz-se necessário a utilização de diferentes soluções tampão.

[56] Como uma exemplificação de solução tampão de lise, no procedimento descrito em [60] foi utilizada uma solução de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol) (triton X-100) a 1%, contendo 20 µL da enzima proteinase K (26 mg/mL) por mL de solução.

[57] Como uma exemplificação de solução tampão de ligação, no procedimento descrito em [60] foi utilizada uma solução tampão de ácido cítrico/citrato de sódio (pH 2,5).

[58] Como uma exemplificação de solução tampão de lavagem, no procedimento descrito em [60] foi utilizada uma solução de Tris/acetato de potássio/HCl (pH 7,0).

[59] Como uma exemplificação de solução de eluição, no procedimento descrito em [60] foi utilizada uma solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,8).

[60] Em uma exemplificação baseada no uso da membrana PMMA/Qui/PANI para extração, concentração e purificação de DNA a partir de sangue total, o seguinte procedimento, que consiste de etapas de lise (i), captura (ii), lavagem (iii) e eluição (iv), foi implementado: (i) na etapa de lise, 100  $\mu\text{L}$  de sangue e 500  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão de lise foram misturados em um microtubo e incubados a 65 °C por alguns minutos (a incubação da mistura foi alternada com breve agitação em vórtex por alguns segundos); (ii) depois adicionou-se, ao microtubo, a membrana PMMA/Qui/PANI e 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão de ligação (pH abaixo de 7,0) e permitiu-se a interação a temperatura ambiente; (iii) a solução sobrenadante foi descartada e o complexo membrana/DNA foi lavado com 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão de lavagem. Em seguida, (iii) o DNA foi eluído da membrana através do uso de uma solução tampão de eluição (pH maior que 7,0) e, finalmente, a solução de eluição contendo o DNA foi transferida para um microtubo para armazenagem e/ou aplicações posteriores.

[61] Através de espectroscopia no UV-Vis, a concentração de DNA na solução de eluição, obtida após realizados os procedimentos descritos em [60], foi determinada como correspondendo a valores na faixa de 10 a 600  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , a depender do volume de solução de eluição utilizado. Na Fig. 9 é mostrado um espectro de absorção no UV-Vis de uma das amostras obtidas, no qual é possível observar uma banda bem definida e com um máximo de absorção centrado em 260 nm – que corresponde à absorção característica do DNA.

**Exemplo 3.2. Extração, purificação e concentração de DNA a partir de sangue total de humanos usando a membrana compósita incorporada em coluna de centrifugação**

[62] A extração, purificação e concentração de DNA a partir de sangue total de humanos também pode ser realizada por centrifugação utilizando colunas de centrifugação contendo a membrana compósita.

[63] Como uma exemplificação, colunas de centrifugação foram montadas utilizando de 1 a 20 membranas de PMMA, na forma de membranas circulares, produzidas pelo método descrito no Exemplo 1.1, conforme ilustrado na Fig. 10a. A configuração montada nesta exemplificação foi denominada como “coluna de centrifugação 01”.

[64] Como uma exemplificação, colunas de centrifugação foram montadas utilizando de 1 a 20 membranas compósitas de PMMA/Qui/PANI, na forma de membranas circulares, produzidas pelo método descrito no Exemplo 1.2, conforme ilustrado na Fig. 10b. A configuração montada nesta exemplificação foi denominada como “coluna de centrifugação 02”.

[65] No procedimento descrito em [67], como uma exemplificação de soluções tampão de lise, tampão de lavagem e tampão de eluição, foram utilizadas as soluções descritas em [56], [58] e [59], respectivamente.

[66] Como uma exemplificação, no procedimento descrito em [67], a coluna de centrifugação 02 foi ativada com uma solução de ligação previamente a seu uso. A solução tampão descrita em [57] foi utilizada como uma exemplificação de solução de ligação.

[67] Em uma exemplificação baseada no uso da membrana PMMA/Qui/PANI incorporada a uma coluna de centrifugação para extração, concentração e purificação de DNA a partir de sangue total, o seguinte procedimento, que consiste de etapas de lise (i), captura (ii), lavagem (iii) e eluição (iv), foi implementado: (i) na etapa de lise, 100  $\mu$ L de sangue e 500  $\mu$ L de uma solução tampão de lise foram misturados em um microtubo e incubados a 65 °C por alguns minutos (a incubação da mistura foi alternada com breve

agitação em vórtex por alguns segundos); (ii) depois, a solução foi centrifugada utilizando a coluna de centrifugação 01 e, em seguida, transferida para a coluna de centrifugação 02 e, após nova centrifugação, a solução sobrenadante descartada; (iii) a coluna de centrifugação 02, já com o DNA adsorvido, foi lavada com 600  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão de lavagem. Após outra breve centrifugação, a solução de enxague foi descartada. (iv) Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de eluição (pH maior que 7,0) foi adicionada na coluna de centrifugação 02 e, após, pelo menos, 5 min de incubação, a solução foi centrifugada. Finalmente, a solução de eluição contendo o DNA foi transferida para um microtubo para armazenagem e/ou aplicações posteriores.

[68] Na Fig. 11 é mostrado um espectro de absorção no UV-Vis de uma das amostras obtida após realizados os procedimentos descritos em [67], no qual é possível visualizar uma banda bem definida, com o máximo de absorção centrado em 260 nm, que corresponde ao DNA eluído. A concentração de DNA na solução de eluição foi determinada através do uso de um espectrofotômetro (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, EUA), sendo encontrados valores na faixa de 10 a 600  $\text{ng}/\mu\text{L}$  – a depender do volume de eluição utilizado. Além da espectroscopia no UV-Vis, também realizou-se um procedimento de amplificação com a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Na Fig. 12 pode-se observar que, utilizando um conjunto de primers para a região  $\beta$ -actina do DNA humano, a amplificação do DNA extraído ocorreu durante a PCR, indicando a boa qualidade e integridade do DNA extraído usando a membrana PMMA/Qui/PANI no procedimento aqui exemplificado.

## REIVINDICAÇÕES

- 1) Membrana compósita porosa, **caracterizada por** ser produzida através da técnica de eletrofição, a partir de um polímero não-condutor em solução, e ser posteriormente funcionalizada por, pelo menos, um polissacarídeo catiônico e um polímero condutor, sendo que a referida membrana pode ser utilizada em métodos ou kits para extração, purificação, separação e concentração de ácidos nucleicos, a partir de meios aquosos ou sistemas biológicos.
- 2) Membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de ser composta por fibras de polímero não-condutor, obtidas pela técnica de eletrofição, que apresentem diâmetros entre 50nm a 20µm, e que permitam tratamentos mecânicos e térmicos para melhoramento de suas propriedades morfológicas e mecânicas.
- 3) Membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o polímero não-condutor trata-se, preferencialmente, de polimetilmetacrilato (PMMA).
- 4) Membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o referido polissacarídeo catiônico trata-se, preferencialmente, de quitosana.
- 5) Membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o referido polímero condutor apresenta estrutura nanométrica e trata-se, preferencialmente, de polianilina, ou de qualquer outro polímero condutor que apresente propriedades de protonação sensíveis a mudanças do pH do meio.
- 6) Membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a membrana de polímero não-condutor é formada por uma malha de fibras de PMMA, na superfície das quais quitosana e polianilina são depositadas de forma uniforme, e como estruturas nanométricas, de modo a manter a porosidade e conformação da membrana.
- 7) Processo para preparação de membranas compósitas porosas, **caracterizado pelo** fato da referida membrana ser produzida através da técnica de eletrofição,

e poder ser submetida a tratamento mecânico, térmico e de funcionalização por adsorção e polimerização química *in situ*, para obtenção das propriedades desejadas.

**8)** Processo, conforme Reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato da referida membrana ser formada por um polímero de origem biológica ou sintética, que possa ser processado através da técnica de eletrofiação, preferencialmente PMMA, porém, não limitado a este.

**9)** Processo, conforme Reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato do tratamento térmico não exceder a temperatura de transição vítrea do polímero de origem, biológica ou sintética, que compõe a referida membrana porosa.

**10)** Processo, conforme Reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato da referida membrana ser funcionalizada por adsorção, através da interação da mesma por, pelo menos, 60min, com uma solução diluída e ácida de polissacarídeo catiônico.

**11)** Processo, conforme Reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato da referida membrana ser funcionalizada por polimerização de um monômero, tal como anilina, edot, tiofeno, pirrol e/ou a combinação desses e/ou qualquer composto que possa ser polimerizado através da ação de agentes oxidantes.

**12)** Processo, conforme Reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato da referida membrana ser funcionalizada por polimerização, em uma síntese que emprega um agente oxidante, que pode ser  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuBr}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$ , ou  $\text{CuSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , ou a combinação desses, ou de qualquer outra molécula ou composto com potencial de redução superior ao do monômero.

**13)** Processo, conforme Reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato da referida membrana ser funcionalizada por polimerização, com o dopante da membrana, a ser adicionado ao meio reacional, podendo ser um ácido inorgânico, tal como  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e/ou surfactante, mas, preferencialmente  $\text{HCl}$ , cujo dopante é o  $\text{Cl}^-$ .

**14)** Processo, conforme Reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato da referida membrana ser funcionalizada, inicialmente, por adsorção da quitosana e, posteri-

ormente, por polimerização química *in situ*, preferencialmente empregando o monômero de anilina e o  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  como oxidante.

**15)** Uso da membrana compósita porosa, **caracterizado pelo** fato de que a referida membrana possa ser produzida através da técnica de eletrofição, a partir da solução de um polímero não-condutor de origem biológica ou sintética, e ser posteriormente funcionalizada por, pelo menos, um polissacarídeo catiônico e um polímero condutor, para extração, purificação, separação e concentração de biomoléculas, a partir de meios aquosos ou sistemas biológicos.

**16)** Uso da membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de que as biomoléculas de interesse podem ser derivadas de células, bactérias ou vírus.

**17)** Uso da membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de que as biomoléculas de interesse podem ser derivadas de sistemas biológicos de composição complexa, tais como sangue, plasma, urina, saliva, entre outros.

**18)** Uso da membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de que as biomoléculas de interesse podem ser derivadas, em particular, de amostras de sangue total, e que sejam, preferencialmente, mas não apenas, ácidos nucleicos, tais como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA).

**19)** Uso da membrana compósita porosa, conforme Reivindicação 15, **caracterizado pela** extração, purificação, separação e concentração de ácidos nucleicos serem a partir de sistemas biológicos ou meios aquosos, e compreenderem etapas de:

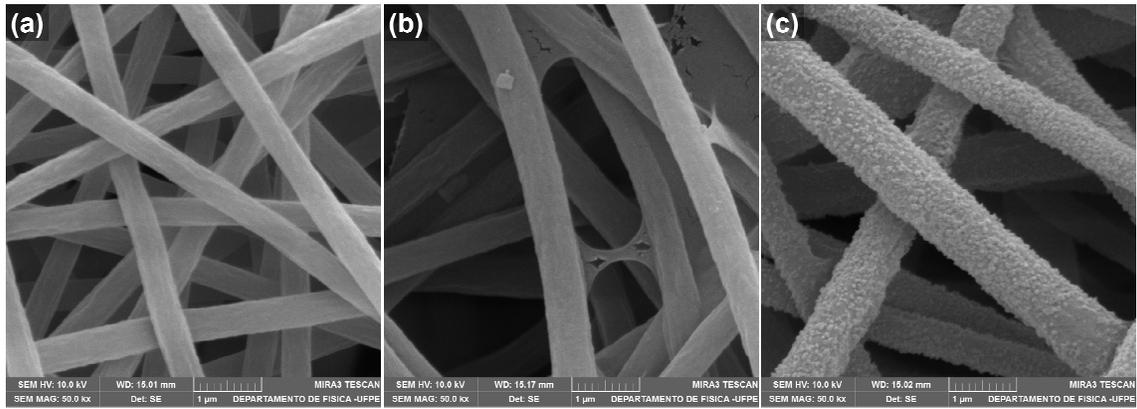
**a)** adsorção do ácido nucleico à membrana compósita, ao permitir que uma solução de células lisadas, em que o pH do tampão de lise é inferior a 7,0, entre em contato com a membrana compósita;

**b)** lavagem da membrana compósita porosa com, pelo menos, um tampão de lavagem, de força iônica suficiente para remover proteínas residuais e detritos celulares fracamente adsorvidos e/ou contidos na referida membrana;

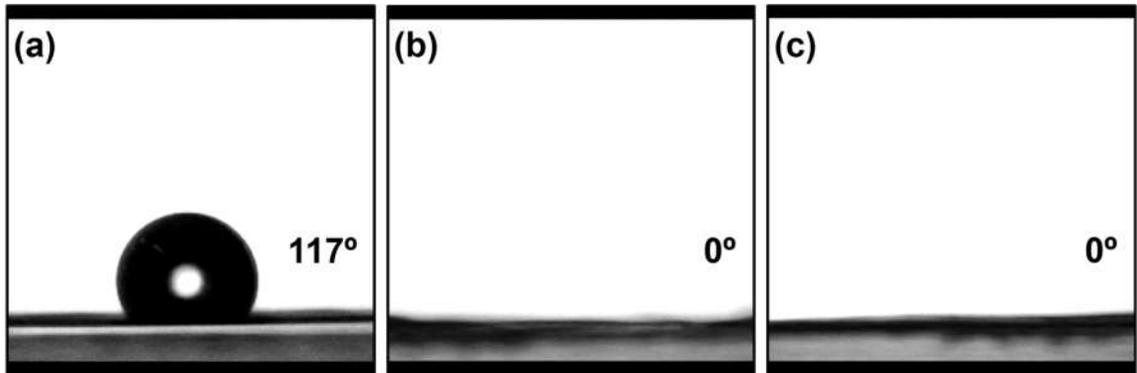
c) dessorção dos ácidos nucleicos ligados à membrana compósita porosa, ao permitir que uma solução de eluição, em que o pH do tampão de eluição é superior a 7,0, e apresente força iônica suficiente para libertar o ácido nucleico ligado à membrana, entre em contato por, pelo menos, 5min, com a referida membrana.

**20) Uso da membrana compósita porosa, conforme descrito na Reivindicação 1, caracterizado pela** sua utilização na remoção de contaminantes de meios aquosos e efluentes, tais como íons de metais pesados e corantes, porém, não limitado a estes.

**FIGURAS**



**Fig. 1**



**Fig. 2**

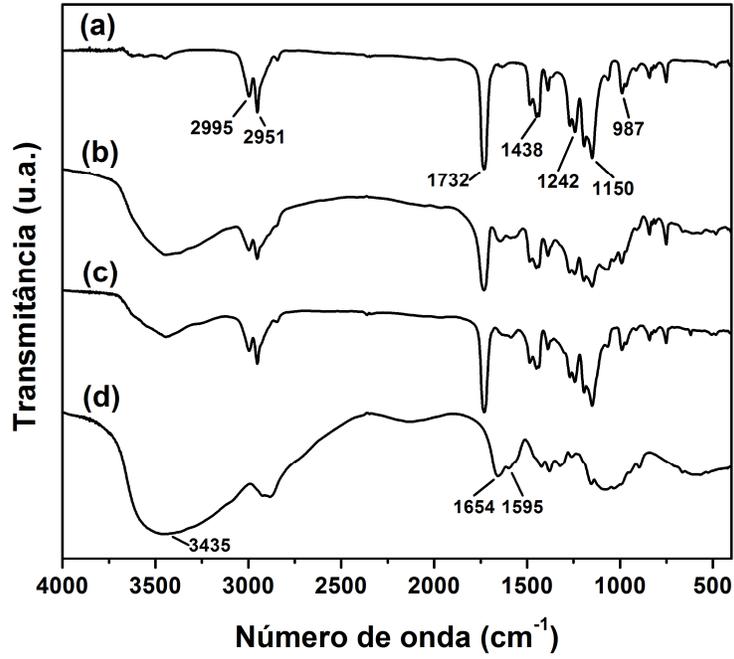


Fig. 3

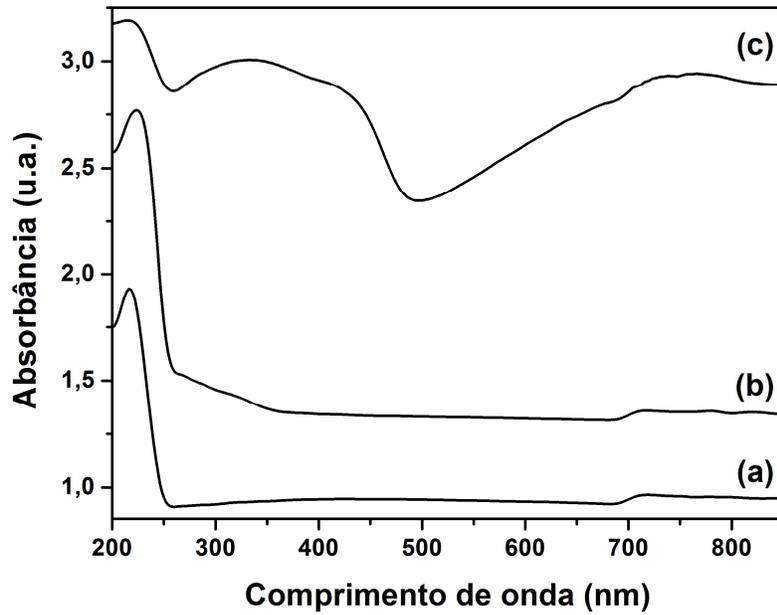


Fig. 4

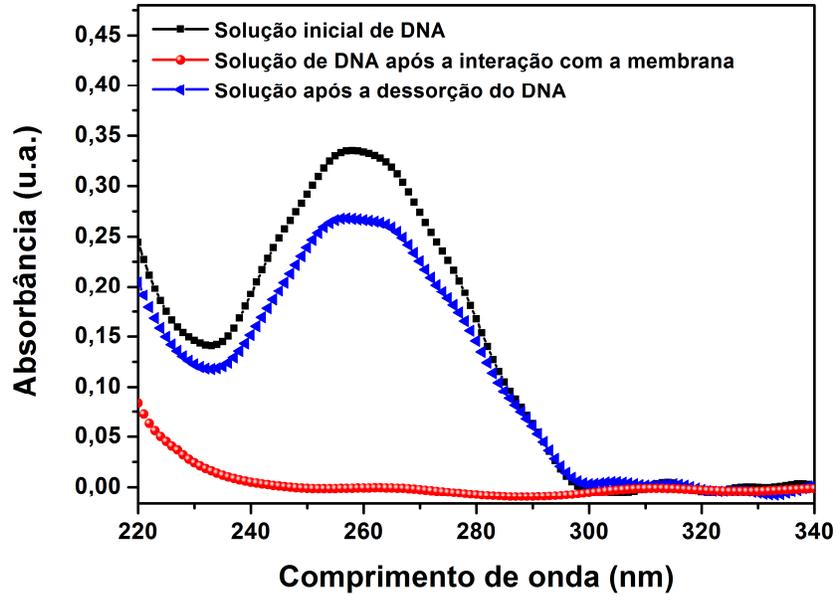


Fig. 5

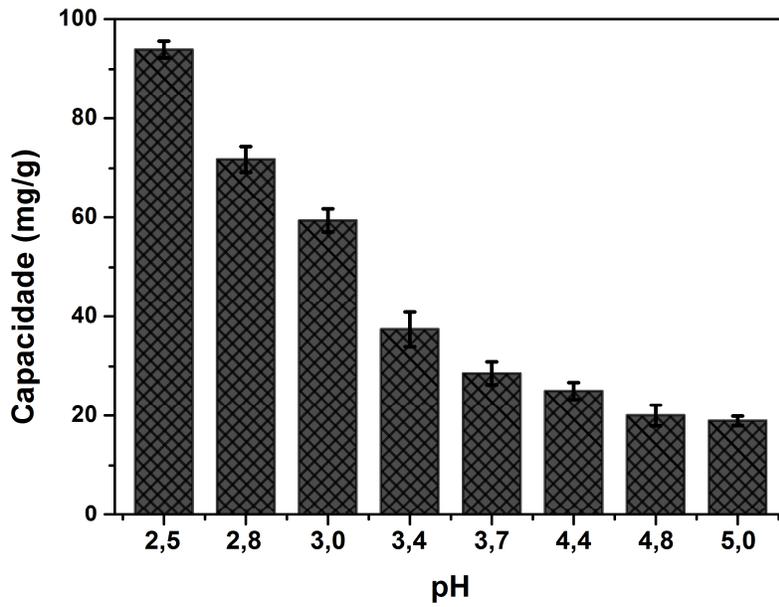


Fig. 6

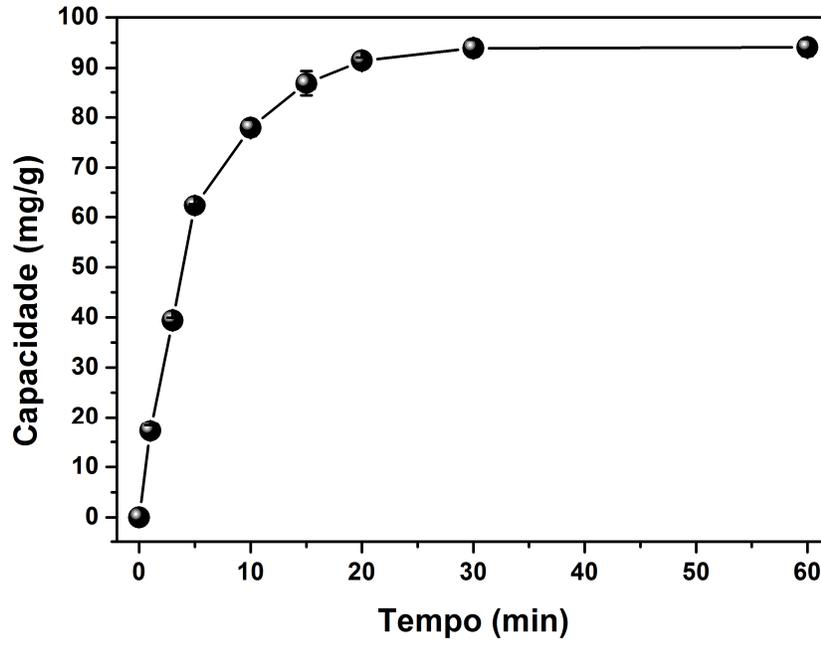


Fig. 7

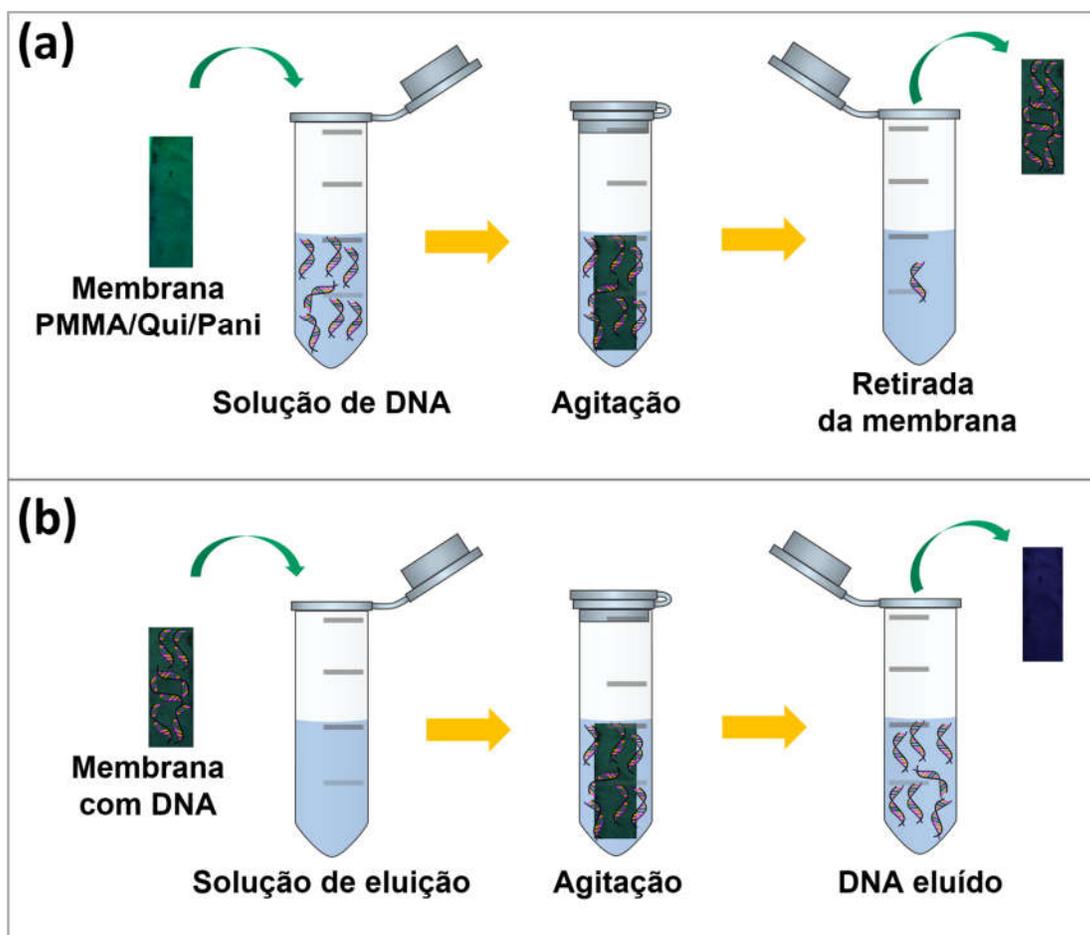


Fig. 8

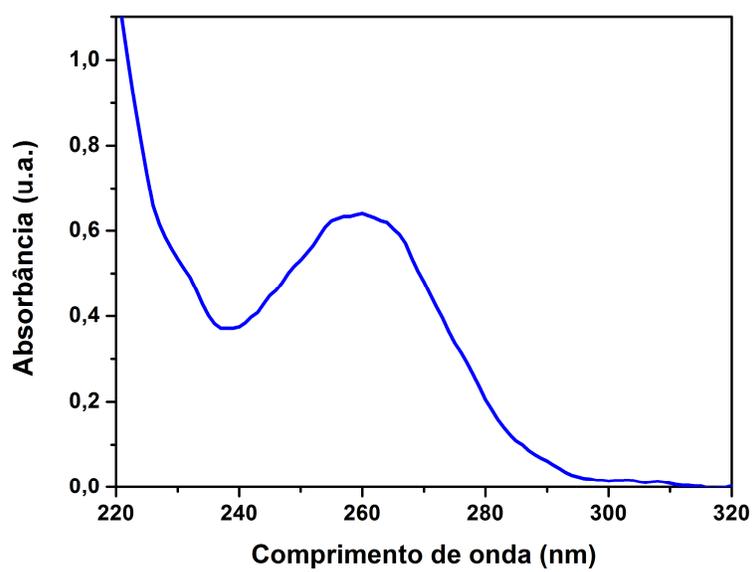


Fig. 9

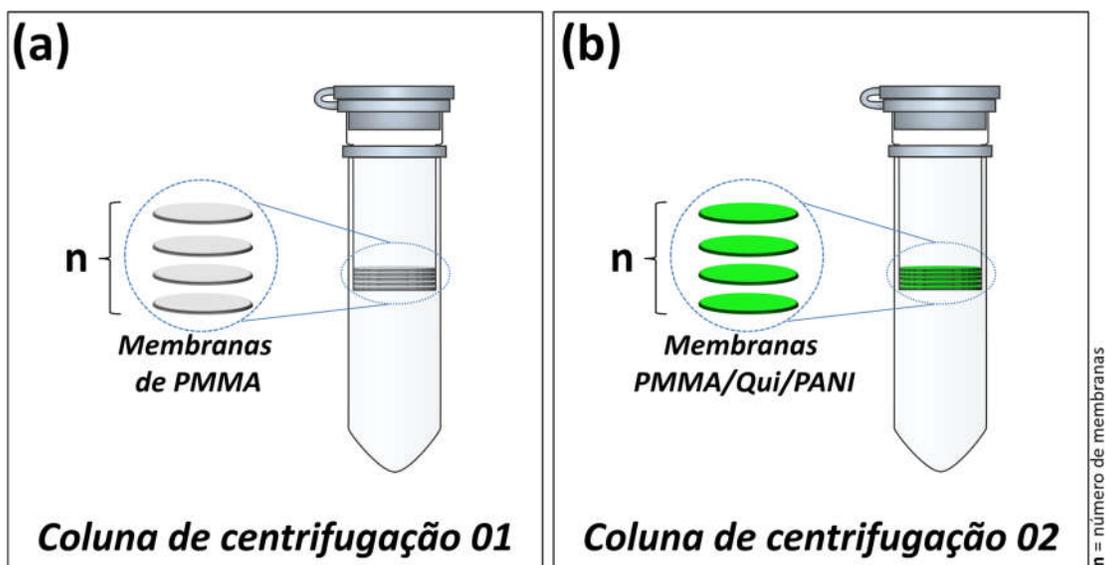


Fig. 10

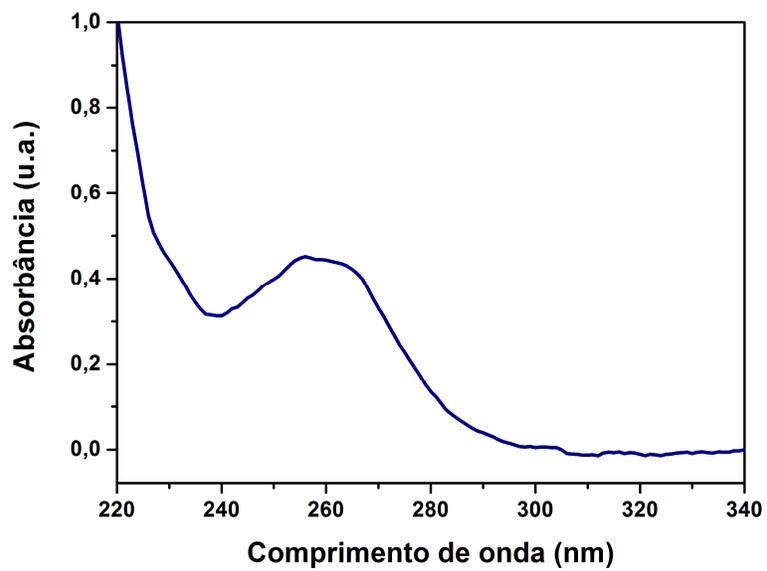


Fig. 11

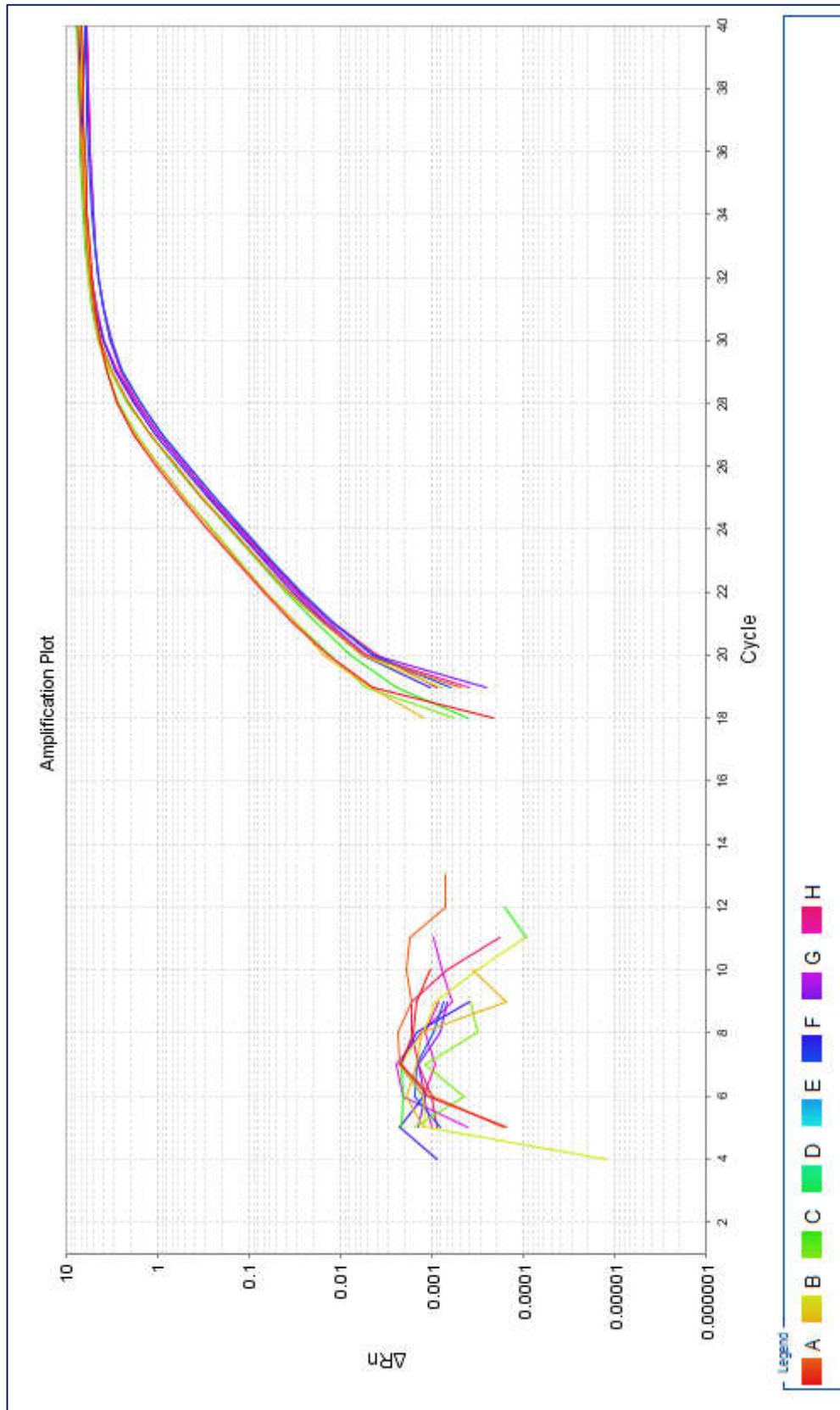


Fig. 12

PATENTE / PUBLICAÇÃO	Matriz (tipo)	Material utilizado para modificação da membrana / matriz	Meio de extração	Tipo de biomolécula
KR 2009 0099256 A	Dispositivo microfluídico com substrato formado por polidimetilsiloxano ou polimetilmetacrilato	Esferas de silicato de zircônio ou sílica	Células	DNA
CN 101016510 A	Dispositivo microfluídico com substrato formado por polimetilmetacrilato	Gel de óxido de silício	Soluções aquosas e sangue total	DNA
EP 3141298 A1	Dispositivo microfluídico com substrato formado por polimetilmetacrilato ou polidimetilsiloxano	Grupos funcionais COOH e SiO <sub>x</sub> obtidos por tratamento a plasma de oxigênio	Soluções aquosas e células de bactéria	DNA
Reedy et al. (2011)	Dispositivo microfluídico usando substratos de polimetilmetacrilato	Quitosana	Sangue total	DNA
Kendall et al. (2014)	Dispositivo microfluídico com monólitos de metacrilato de glicidilo	Quitosana	Soluções aquosas	DNA
US 2009 0215124 A1 & Cao et al. (2006)	Dispositivo microfluídico com esferas magnéticas ou de sílica	Quitosana	Sangue total	DNA
US 2017 0015992 A1	Biochip com esferas ou membranas	Quitosana	Células humanas e de ratos	DNA
Parton et al. (2012)	Dispositivo microfluídico com esferas de sílica	Quitosana	Soluções aquosas e urina artificial	DNA
Tiwari et al. (2015)	Nanopartículas magnéticas Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @sílica	Quitosana	Saliva humana	DNA

Hagan et al. (2009)	Esferas de sílica	Quitosana	Sangue total	RNA
Jiang et al. (2012)	Partículas magnéticas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @sílica	Quitosana	Soja geneticamente modificada	DNA
Maciel et al. (2018)	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Quitosana e polianilina	Soluções aquosas e sangue total	DNA
RU 2631934 C1	Membranas de poliamida, polietersulfona ou fluoreto de polivinilideno	Polianilina	Células de bactéria	DNA
US 7018538 B2 & Kapustin et al. (2003)	Suporte orgânico ou inorgânico poroso tal como partículas de sílica porosa	Polianilina	Células de bactérias	DNA
BR 10 2015 007423 9 A2 & Brandão et al. (2016)	Membranas eletrofiadas de poliestireno	Polianilina	Soluções aquosas	DNA e íons de metais pesados
CN 102174195 B	Microesferas magnéticas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Polianilina ou polipirrol	Bactérias	DNA
BR 10 2014 028423 0 & Medina-Llamas et al. (2014)	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Polianilina	Soluções aquosas e sangue total	Ácidos nucleicos
Gai et al. (2013)	Microesferas magnéticas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Polianilina	Células de fungo <i>Aspergillus niger</i>	DNA
PRESENTE INVENÇÃO	Membranas eletrofiadas de polimetilmetacrilato	Quitosana e polianilina	Soluções aquosas e sangue total	Ácidos nucleicos

Figura 13

## RESUMO

### **Membrana compósita porosa de polimetilmetacrilato/quitosana/polianilina - Processo para sua obtenção e seu uso para a extração, purificação e concentração de biomoléculas**

A extração e purificação de biomoléculas são etapas-chave em vários protocolos de biologia molecular. Em particular, a concentração de ácidos nucleicos de boa qualidade e alta produtividade é cada vez mais necessária em procedimentos envolvendo sequenciamento genético, diagnóstico de doenças e criminologia forense, entre outras aplicações. Neste contexto, na presente invenção, é relatada a preparação de uma nova membrana compósita porosa e seu uso em kits ou protocolos para extração, purificação e concentração de biomoléculas. A membrana compósita consiste de uma membrana de polímero não-condutor produzida através da técnica de eletrofição, que, posteriormente, é funcionalizada com o uso de um polissacarídeo catiônico e, em seguida, por um polímero condutor.

No relatório descritivo, é demonstrada a produção da membrana em sua forma preferencial, a qual é composta por polimetilmetacrilato/quitosana/polianilina, e seu uso efetivo, como material ativo, em procedimentos para a obtenção de ácidos nucleicos de boa qualidade a partir de amostras dissolvidas em meios aquosos ou de sangue total de humanos. A membrana de PMMA/Qui/PANI possui carga superficial positiva, que pode ser modulada pela simples mudança do pH do meio. Deste modo, ácidos nucleicos, que possuem carga superficial negativa em sua estrutura, devido à presença de grupos fosfatos, podem se associar à membrana compósita através de interações eletrostáticas. Podendo, ainda, o método ser estendido para a extração, purificação, separação e concentração de outras biomoléculas ou moléculas que apresentem cargas negativas disponíveis para realizar troca iônica com a referida membrana.