



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

(11) PI 1104516-7 B1



(22) Data do Depósito: 16/09/2011

(45) Data de Concessão: 02/03/2021

(54) Título: PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA UTILIZANDO NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO

(51) Int.Cl.: B82B 3/00.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP; COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR.

(72) Inventor(es): MARCELO LANCELLOTTI; LUCIANA MARIA DE HOLLANDA; EDÉSIA MARTINS BARROS DE SOUSA; TIAGO HILÁRIO FERREIRA.

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO, NANOTUBOS ASSIM OBTIDOS E PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA UTILIZANDO NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO. A presente invenção descreve um processo de obtenção de nanotubos de nitreto de boro (BNNT) e um processo para transformação bacteriana empregando nanotubos de nitreto de boro como facilitadores. Mais especificamente, a presente invenção descreve um processo de transformação, por choque térmico, de linhagens competentes de Escherichia coli utilizando nanopartículas de nitreto de boro como sistema de entrega de plasmídeos.

PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA UTILIZANDO NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO

Campo da invenção

[001] A presente invenção se refere a um processo de obtenção de nanotubos de nitreto de boro e um processo para transformação bacteriana empregando os referidos nanotubos como facilitadores. Mais especificamente, a presente invenção descreve um processo de transformação, por choque térmico, de linhagens competentes de *Escherichia coli* utilizando nanopartículas como carreadoras de material genético.

Fundamentos da invenção

[002] A internalização de plasmídeo exógeno por bactérias competentes é um dos principais métodos utilizados em biologia molecular. Através desta metodologia, a bactéria hospedeira expressa genes que serão traduzidos em novas proteínas, não necessariamente pertinentes a célula de origem. Infelizmente, a transformação natural bacteriana, encontrada no meio ambiente é limitada a condições especiais e/ou, ocorre em pequenos grupos, cujas bactérias são naturalmente competentes e, capazes de internalizar o DNA exógeno (Chen *et al.*, 2002a; He *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002a).

[003] Até o presente momento, existem três metodologias que executam essa função *in vitro*, a sonoporação, a eletroporação e o choque térmico (Adler *et al.*, 2002; Meadows *et al.*, 2002).

[004] A sonoporação, ou sonicação celular, é o uso do ultrassom para modificar a permeabilidade da membrana plasmática celular. Desta forma, essa técnica emprega a cavitação acústica de microbolhas para aumentar a entrega de moléculas grandes de DNA exógeno em bactérias e células, nos respectivos ensaios transformação e transfecção (Teng *et al.*, 2002). A bioatividade dessa técnica é semelhante e, em alguns casos, superiores aos encontrados na eletroporação. Embora, a exposição prolongada à baixa frequência (<MHz) de ultra-som demonstrou queda na viabilidade celular. Desta forma, empregar

essa técnica significa correr este risco (Teng *et al.*, 2002). Além do que, torna-se cara já que necessita de um equipamento que emita o som na faixa estabelecida para esta metodologia.

[005] Enquanto a sonoporação utiliza o ultrassom para permeabilizar a membrana celular a eletroporação utiliza o pulso elétrico de muitos kV cm^{-1} de amplitude com duração de submicrosegundos (Wu *et al.*, 2002a). Esta metodologia, permeabiliza temporariamente a membrana celular bacteriana permitindo que moléculas solvatadas como DNA, entrem nas células eletroporadas. Porém, se os impulsos elétricos forem empregados erroneamente ocorrerá à lise celular (Rojas-Chapana *et al.*, 2005).

[006] Outra metodologia empregada é o choque térmico. O protocolo original desta metodologia envolve um pré-tratamento de *E. coli* com íons cálcio (Ca^{+2}) e íons magnésio (Mg^{+2}) a 0°C . Este tratamento permite a formação dos poros na parede celular bacteriana. O plasmídeo de interesse é adicionado e o posterior choque térmico a 42°C , permite a internalização do mesmo (Chen *et al.*, 2002d; Chen *et al.*, 2002f). Desta forma, essa é uma metodologia barata, uma vez que, não necessita da compra de equipamentos para a transformação celular. Dependendo do plasmídeo a ser inserido, a taxa de transformação é baixa, pois a parede não fica permeável o suficiente para a entrada do mesmo.

[007] Assim, para minimizar os efeitos deletérios das metodologias acima descritas, diversos pesquisadores apostaram na utilização de nanobiotecnologia como facilitadores das taxas de transformação.

[008] Rojas-Chapana e colaboradores (Rojas-Chapana *et al.*, 2005) utilizaram nanotubos de carbono para transformar linhagens de *E. coli* DH5 α com o plasmídeo pUC19. Os autores desenvolveram uma técnica que utiliza nanotubos de carbono como vetores físicos para a eletroporação, diferentemente dos outros métodos utilizados, já que não são necessários eletrodos. Nanotubos de carbono (NTCs) dispersos na água tem carga de superfície aniônica e dessa forma se ligam a membrana das bactérias gram-negativas por interações eletrostáticas (Chen *et al.*, 2002e; Rojas-Chapana *et*

al., 2005). Por outro lado, o efeito das microondas (1000W a uma frequência de 2.45Ghz) do pulso de campo eletromagnético sobre a interação de nanotubos de carbono com as bactérias leva à eletropermeabilização da parede celular. Assim, os autores demonstraram através desta técnica, que é possível a eletroporação reversível, no qual o crescimento e a morfologia bacteriana não são alterados, assim como ocorre no processo descrito na presente invenção. Porém, diferentemente do exposto pelo presente invento, para que ocorra a internalização do material é necessária uma fonte de emissão de elétrons, o que encarece a metodologia.

[009] Zeng e colaboradores empregaram nanopartículas de sílica, substituídas com grupos amino, para transformação de *E. coli*. Os autores construíram uma nanopartícula de sílica a partir de TEOS (tetraethoxysilane) e AEAPS (N-(β -aminoethyl)- γ aminopropyltriethoxysilane), formando a partícula a-SiNP. A superfície da partícula foi funcionalizada com “amidogen” transformando-a em partícula eletricamente positiva, o que facilitaria a ligação do DNA a superfície celular bacteriana, pois ambas possuem carga negativa. A nanopartícula de boro descrita na presente invenção possui carga positiva ao final do seu processo de obtenção, sem a necessidade de mais uma etapa de funcionalização. Dessa forma, os nanotubos se apresentam como uma alternativa mais atrativa, já que sua obtenção é mais simplificada, sem necessidade de uma funcionalização com outro composto químico.

[010] Além destes sistemas de entrega, destacamos os nanotubos de nitreto de boro (BNNTs), empregados na presente invenção. Os BNNTs possuem estrutura similar aos nanotubos de carbono, com os átomos de carbono substituídos por boro e nitrogênio, exibindo estabilidade química e térmica superiores (Han *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002b). Nos últimos cinco anos essas nanopartículas foram muito estudadas devido as suas propriedades químicas. Quando submetidas ao ultrassom ou luz polarizada são capazes de adquirem carga elétrica, tornando-as de grande importância para a área biomédica (Gnjatic *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002), sendo adequadas para o

desenvolvimento de novos nanovetores para terapia celular, liberação controlada de princípios ativos, e outras aplicações clínicas (Han *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002).

[011] Nas últimas décadas foram feitas inúmeras sínteses usando diferentes técnicas como deposição química de vapor, ablação por laser, descarga por arco, moinho de bolas, redução carbotermal, crescimento hidrotermal entre outras (Chen *et al.*, 2002b; GAN *et al.*, 2005).

[012] Inicialmente os métodos de descarga por arco e por ablação a laser eram os principais métodos para obtenção de nanotubos com pequena concentração de defeitos. Entretanto, esses métodos apresentam algumas desvantagens. Dentre elas podemos destacar as altas temperaturas (superiores a 3000 °C) necessárias para a evaporação do alvo, o que dificulta muito a aplicação dos sistemas para escala industrial. Outro problema é que a amostra apresenta impurezas como partículas metálicas e fases amorfas de BN, e os BNNTs formados geralmente estão em uma forma altamente aglomerada, formando feixes muito coesos, o que dificulta a separação e obtenção de nanotubos na forma individual para posterior aplicação (Chen *et al.*, 1999).

[013] Em 1999, foi relatada uma forma alternativa de produzir BNNTs envolvendo a moagem do boro elementar, em fluxo de gás de amônia (NH₃) seguido por tratamento térmico em fluxo de N₂ ou Ar (Chen *et al.*, 1999). Este processo envolve a moagem dos reagentes por um longo período de tempo para produzir mudanças estruturais significativas no composto formado. Esta técnica é muito utilizada para produzir BNNT em grande escala, entretanto produz significativa quantidade de material amorfo.

[014] O processo de obtenção de nanotubos por deposição química por vapor (CVD) de maneira geral ocorre pelo aquecimento do material catalizador até uma determinada temperatura, que pode variar entre 300 e 1200 °C. A introdução de uma corrente de gás contendo os reagentes apropriados ocorre em temperatura específica. Cinco anos após os primeiros relatos da síntese de

BNNT, tornou-se possível sintetizar BNNT através do método CVD (Lourie *et al.*, 2000). Outros resultados semelhantes foram obtidos através de sínteses utilizando B_2O_3 como um dos reagentes, neste caso, o rendimento da síntese atingiu centenas de miligramas em um único ensaio experimental (Zhi *et al.*, 2005).

[015] Existem algumas variações no método, adaptadas ao tipo de síntese proposta. Neste trabalho os reagentes e catalisadores são colocados sobre um substrato no início do processo, à temperatura ambiente. Com o aumento da temperatura ocorre o aumento da pressão de vapor do sistema e consequentemente a volatilização dos reagentes. A partir daí ocorre a deposição de fase vapor para a formação das nanoestruturas. A partir deste processo é possível obter BNNT de forma eficiente, com baixo custo e em grande quantidade.

[016] Estudos iniciais confirmaram experimentalmente que os BNNTs apresentam estabilidade térmica e química elevada, e superiores às apresentadas pelos CNTs, por isso, o uso de BNNT torna-se preferencial para aplicações em dispositivos que serão submetidos a altas temperaturas e a ambientes quimicamente ativos (Golberg *et al.*, 2001).

[017] Previsões teóricas e resultados experimentais com respeito às propriedades mecânicas dos BNNT sugerem seu uso de forma promissora como nanofibras para reforço em nanocompósitos (Bettinger *et al.*, 2002).

Atualmente as nanoestruturas de nitreto de boro também têm despertado grande interesse na área biomédica. Suas configurações, dimensões e propriedades físico-químicas influenciam nas interações celulares que conduzem a diversas possibilidades de bioaplicação, entretanto, até o presente momento, as aplicações biomédicas para os BNNTs ainda foram pouco exploradas (Feng *et al.*, 2002). Zhi e colaboradores investigaram a interação entre BNNTs e várias espécies de proteínas (Hung *et al.*, 2002) e entre BNNT e DNA (Xiang *et al.*, 2002). Ciofani e colaboradores foram os primeiros a testar as interações de BNNTs em cultura de células. Os autores

demonstraram que, BNNTs misturados com PEI (*polyethyleneimine*) são solúveis e, quando testados *in vitro* em neuroblastomas SHSY5Y não apresentaram nenhum efeito citotóxico (Chen *et al.*, 2002c). Outro experimento envolvendo a mesma linhagem celular, com BNNT ressuspendido em PEI e conjugado com marcador de fluorescência, demonstrou excelente endocitose celular (Olivier *et al.*, 2002), demonstrando que este nanoconjugado possui propriedades nanocarreadoras.

[018] Várias aplicações nanocarreadoras foram sugeridas para os BNNTs, entre elas destacam-se a terapia celular pela entrega de genes e drogas. Um estudo realizado por Ciofani e colaboradores, demonstrou que, para ambas as transfecções de entrega de drogas, as propriedades físicas e eletrônicas dos BNNTs são úteis no processo de eletroporabilidade celular pela eletroporação (Li *et al.*, 2002). Além disso, Raffa e colaboradores demonstraram que estes nanovetores conseguem adentrar na célula quando essas são submetidas à eletroporação com baixo campo elétrico ($40\text{-}60\text{V cm}^{-1}$) (Han *et al.*, 2002).

[019] Embora, a literatura já descreva alguns trabalhos da utilização de nanopartículas de nitreto de boro como nanocarreadores, a presente invenção trata, vantajosamente, de uma transformação bacteriana, nunca antes descrita para este nanomaterial, além de não utilizar uma fonte externa de emissão de elétrons ou íons.

[020] Diante das informações disponíveis no estado da técnica, a presente invenção torna-se útil na rotina de biologia molecular, uma vez que aumenta a taxa de transformação bacteriana pelo processo de choque térmico. O processo é simples e de baixo custo. Além disso, apresenta fácil manipulação, já que não precisa de uma fonte externa de elétrons. Ainda, vantajosamente, é eficiente, triplicando o número de transformantes em relação aos processos usuais de transformação química. Os nanotubos de nitreto de boro (BNNT) são os principais responsáveis pela eficácia do processo. Apesar de apresentarem estrutura similar aos nanotubos de carbono, os BNNT

apresentam características diferenciadas devido ao caráter de suas ligações químicas B-N, que garantem maior estabilidade química e térmica.

[021] Além disso, a nanopartícula de boro descrita na presente invenção possui carga positiva ao final do seu processo de obtenção, sem a necessidade de mais uma etapa de funcionalização. Dessa forma, os nanotubos se apresentam como uma alternativa simples e eficiente para a transferência de material genético em células bacterianas.

[022] Além da aplicação no processo de transformação bacteriana, objeto da presente invenção, os nanotubos de nitreto de boro também podem ser aplicados como nanovetores para terapia celular, liberação controlada de princípios ativos, agente transformante bacteriano e agente transfectante celular.

Breve descrição da invenção

[023] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de nanotubos de nitreto de boro compreendendo as etapas de mistura dos reagentes boro, nitrato de amônio e hematita, tratamento térmico, seguida por uma outra etapa de tratamento térmico sob atmosfera inerte de nitrogênio, adição de gás amônia, resfriamento, adição de nitrato de amônio, novamente um tratamento térmico sob atmosfera inerte de nitrogênio e um resfriamento, finalizando com a purificação das nanopartículas, empregando uma solução ácida, filtração e secagem. Além disso, a presente invenção refere-se ao uso dos referidos nanotubos.

[024] O presente invento também trata do processo de transformação bacteriana empregando os nanotubos de nitreto de boro, seguindo as etapas de descongelamento de células bacterianas competentes, adição de nanotubos de nitreto de boro, adição do plasmídeo de interesse, incubação em gelo, banho quente e novamente em gelo, adição de um meio de cultura apropriado, incubação em estufa bacteriológica e finalmente, inoculação em placas de Petri.

Breve descrição das figuras

[025] A estrutura e operação da presente invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser mais bem entendidas mediante referência às figuras em anexo e à seguinte descrição:

[026] - A Figura 1 apresenta um espectro de infravermelho (FTIR) da amostra de BNNT sintetizada pelo processo descrito nesta invenção.

[027] - A Figura 2 demonstra os difratogramas de Raios-X da amostra de nitreto de boro antes e depois do processo de purificação

[028] - A Figura 3 demonstra a média e o desvio padrão das amostras bacterianas transformadas com 1mg/mL de BNNT (coluna A) e amostras controle transformadas sob as mesmas condições sem a utilização de BNNT (coluna F), com $P \leq 0,0017$.

[029] - A Figura 4 demonstra a média e o desvio padrão das amostras bacterianas transformadas com 0,5 mg/mL de BNNT (coluna A) e amostras controle (coluna F), com $P \leq 0,0087$.

Breve descrição dos anexos

[030] - O Anexo 1 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) da amostra de BNNT, onde em A o aumento é de 1 μ m e em B o aumento é de 10 μ m.

[031] - O Anexo 2 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (TEM) de amostras de BNNT obtidas a 950°C a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min, onde A é a imagem de SEM, B é a imagem de TEM, e, C e D imagens de TEM com maior aumento permitindo uma melhor visualização das paredes dos tubos.

Descrição detalhada da invenção

[032] A presente invenção trata-se de um processo de obtenção de nanotubos de nitreto de boro. Adicionalmente, o presente invento descreve o processo para transformação, por choque térmico, de células bacterianas competentes utilizando nanopartículas de nitreto de boro como carreadoras de material genético para transformação bacteriana.

[033] É objeto da presente invenção um processo para obtenção dos nanotubos de nitreto de boro que compreende as seguintes etapas:

- a. Mistura dos reagentes;
- b. Tratamento térmico;
- c. Tratamento térmico sob atmosfera inerte de nitrogênio;
- d. Adição de gás amônia;
- e. Resfriamento;
- f. Adição de nitrato de amônio;
- g. Tratamento térmico sob atmosfera inerte de nitrogênio;
- h. Resfriamento;
- i. Purificação
 - i1. Tratamento com solução ácida;
 - i2. Filtração;
 - i3. Secagem.

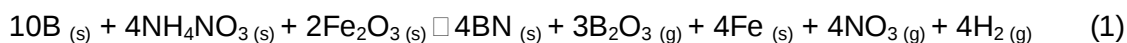
[034] Na primeira etapa (a) os reagentes boro, nitrato de amônio e hematita, com pureza superior a 95%, são empregados na seguinte proporção em peso que pode variar de 15:45:1 a 15:15:1 e de 15:15:4 a 15:15:1, sendo preferencialmente 15:15:1. Os compostos são misturados e pulverizados em graal de porcelana.

[035] A mistura obtida é então submetida à etapa de tratamento térmico (b), utilizando um cadinho de alumina em forma de barco. O material é levado ao forno tubular, preferencialmente na ausência de fluxo de gás. O tratamento térmico é feito a uma faixa de temperatura de 400 a 600 °C, preferencialmente, 550° C, com duração de 30 a 120 minutos, preferencialmente por 60 minutos.

[036] A próxima etapa é o tratamento térmico sob atmosfera inerte de nitrogênio (c), onde o material é aquecido até uma faixa de temperatura que pode variar de 1100 a 1500 °C, preferencialmente de 1.300° C.

[037] Após a estabilização da temperatura é adicionado gás amônia (d) no meio reacional por 1 a 5 horas, preferencialmente 2 horas. Em seguida, na etapa (e), a atmosfera inerte é restabelecida até o resfriamento completo do

material. A formação do nitreto de boro a partir do processo descrito na presente invenção está representada nas reações 1 e 2:



[038] A próxima etapa do processo de síntese dos nanotubos de nitreto de boro é a adição de nitrato de amônio (f), em uma proporção molar que pode variar de 2:2 a 4:2, preferencialmente 3:2. Após esta etapa o material obtido é submetido a um tratamento térmico sob atmosfera inerte de nitrogênio (g), a uma taxa de aquecimento de 1 a 10°C/minuto, preferencialmente 3 °C/minuto, até a temperatura controlável e preferencial de 950 °C, por 1 a 5 horas, preferencialmente 2 horas.

[039] Na etapa de resfriamento (h) o material é submetido a um fluxo de nitrogênio.

[040] A etapa de purificação (i), para a retirada das impurezas, é iniciada com o tratamento do material com uma solução ácida (i1), preferencialmente solução de HCl (3 M), a uma faixa de temperatura de 40 a 90°C, preferencialmente 90° C, por 10 minutos a 3 horas, preferencialmente 10 minutos. Após o tratamento o material passa por uma filtração simples (i2) e em seguida por um processo de secagem (i3) a uma faixa de temperatura de 40 a 60°C, preferencialmente 40 °C.

[041] Outro objeto de proteção da presente invenção é o processo de transformação bacteriana com os nanotubos de nitreto de boro que compreende as seguintes etapas:

- a. Descongelamento das células bacterianas
- b. competentes;
- c. Adição de nanotubos de nitreto de boro;
- d. Adição do plasmídeo de interesse;
- e. Incubação;
- f. Adição de meio de cultura;
- g. Incubação;
- h. Inoculação.

[042] Na primeira etapa (a), as células bacterianas competentes, previamente congeladas a -80°C , são completamente descongeladas em gelo.

[043] Em seguida, na etapa (b) são adicionados de 50 a 300 μL , preferencialmente 200 μL de nanotubos de nitreto de boro à solução de células bacterianas da etapa (a). A solução é homogeneizada suavemente com o auxílio de uma micropipeta.

[044] Na etapa (c) é adicionado de 0,5 μL a 15 μL , preferencialmente 5 μL do plasmídeo de interesse e novamente a solução é suavemente homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta.

[045] Após a adição do facilitador e do plasmídeo de interesse, a mistura é submetida à incubação (d). Nesta etapa o microtubo contendo a solução é incubado em gelo por preferencialmente 30 minutos. Transcorrido este tempo, o microtubo é colocado em banho pré-aquecido a uma temperatura controlável e preferencial de 42°C por exatos 90 segundos. Novamente os microtubos são incubados em gelo por preferencialmente 2 minutos.

[046] Na próxima etapa (e) ocorre a adição de 300 a 800 μL , preferencialmente 600 μL de um meio de cultura pré-aquecido a preferencialmente 37°C .

[047] Os tubos são novamente sujeitos a incubação (f), agora em estufa bacteriológica, por 1 a 4 horas, preferencialmente 3 horas, a 37°C .

[048] Finalmente, a solução é inoculada (g) por espalhamento na superfície de placas de Petri contendo o meio de inóculo apropriado e um antibiótico no qual o plasmídeo inserido é resistente.

Exemplo 1: Caracterização dos nanotubos de nitreto de boro (BNNT)

[049] Após o processo de síntese dos BNNT, os materiais são submetidos a diferentes métodos de caracterização com o objetivo de confirmar a formação do nitreto de boro hexagonal, que é o composto base para a obtenção de BNNT, e verificar as características estruturais dos nanotubos formados.

[050] Com as análises feitas pela técnica de Espectroscopia na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi possível caracterizar os grupos funcionais típicos do nitreto de boro, bem como possíveis impurezas presentes. Os espectros de IV abrangendo a região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ foram obtidos em espectrofotômetro FTIR Galaxy-Matson modelo 3020. O espectro foi obtido à temperatura ambiente em pastilhas sólidas do pó com KBR.

[051] As amostras também foram analisadas por difração de raios-X (XRD) para identificação e avaliação semi-quantitativa de fases cristalinas presentes. Utilizou-se um difratômetro de raios-X, de fabricação Rigaku, modelo Geigerflex. A identificação de fases cristalinas foi obtida por comparação do difratograma de raios-X das amostras com o banco de dados da ICDD – International Center for Diffraction Data/Joint Committee on Powder Diffraction Standards – JCPDS (Sets 01 – 50; 2000).

[052] Para uma melhor caracterização morfológica das amostras foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e de transmissão (TEM). As imagens foram feitas no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com os equipamentos Quanta 200 FEG (FEI) e Tecnai-G2-20-FEI, respectivamente.

[053] No espectro de infravermelho (FTIR) da amostra de BNNT sintetizada pelo processo descrito nesta invenção a característica mais importante apresentada é a forte banda assimétrica centrada em 1380 cm^{-1} , o qual corresponde ao estiramento da ligação B-N, juntamente com outra banda menos intensa a 780 cm^{-1} , atribuída a ligações B-N-B. Portanto foi verificada apenas a presença de vibrações características para o nitreto de boro hexagonal. As absorções em torno de 3430 cm^{-1} podem ser atribuídas às moléculas de água adsorvidas na superfície da amostra (Figura 1).

[054] É importante destacar que esta técnica é muito relevante para caracterizar h-BN, uma vez que é possível distinguir as ligações sp^2 da fase hexagonal e sp^3 da fase cúbica. De acordo com estudos apresentados por Rao e colaboradores as ligações do tipo sp^2 do h-BN são termodinamicamente

estáveis sob as condições de síntese deste trabalho, enquanto que para a formação de ligações sp^3 típicas do c-BN, existe uma barreira cinética de formação. Picos entre 1096 e 1166 cm^{-1} são atribuídos à formação da fase c-BN. Portanto foi verificada apenas a presença de vibrações características para o h-BN. Esse resultado é muito importante para o objetivo proposto, uma vez que somente o h-BN possui as características necessárias para a formação de nanoestruturas de BN desejadas.

[055] A Figura 2 apresenta o difratograma da amostra de nitreto de boro antes e depois da purificação. Nas duas amostras é possível identificar claramente a presença de picos típicos da fase hexagonal do nitreto de boro em $2\theta = 26,75^\circ$, $2\theta = 41,58^\circ$, $2\theta = 50,16^\circ$ e $2\theta = 75,86^\circ$, que estão perfeitamente alinhados com o padrão do h-BN do banco de dados JCPDS, ficha N°. 9-12. Entretanto somente na amostra não purificada (curva preta) é possível observar os picos de menor intensidade relativos ao ferro metálico em $2\theta = 44,67^\circ$ e $2\theta = 65,02^\circ$ (JCPDS, N°. 12-62) e, ao óxido de boro B_2O_3 em $2\theta = 14,55^\circ$ e $2\theta = 27,76^\circ$ (JCPDS, N°. 41-624) remanescente no produto final. Este resultado indica que o nitreto de boro está sendo formado de maneira satisfatória e que com o processo de purificação empregado foi possível remover grande parte das impurezas presentes na amostra.

[056] O Anexo 1 apresenta imagens de SEM (Microscopia Eletrônica de Varredura) da amostra, na qual é possível observar a formação dos BNNT. Os nanotubos presentes nesta amostra possuem diâmetro aproximado de 60 nm. A Anexo 1B possui um menor aumento e devido a isso é possível observar que a formação dos BNNT ocorre em quantidade apreciável.

[057] O Anexo 2 mostra alguns nanotubos com cerca de 3 μm de comprimento e 30 nm de diâmetro. Essas micrografias obtidas por SEM (Anexo 2A), são relacionadas a algumas imagens obtidas por TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão) mostradas no Anexo 2B, 2C e 2D. No Anexo 2C e 2D, que foram obtidas com maior aumento, é possível observar dois nanotubos distintos que possuem características semelhantes. Os nanotubos possuem

paredes com cerca de 10 nm de espessura, e aproximadamente 30 camadas que estão organizadas de forma relativamente uniforme. O interior dos tubos possui cerca de 14 nm de diâmetro.

Exemplo 2: Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico utilizando nanotubos de nitreto de boro como partícula facilitadora

[058] Para a transformação bacteriana a linhagem celular *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers DH5 α (ATCC n°53868), foi descongelada em 5mL de meio Luria-Bertani (10 gramas de Triptona; 5 gramas de Extrato de Levedura; 10 gramas de NaCl, Água Milli-Q q.s.p. 1000 mL) e incubada a 37°C de 16 a 20 horas. Em seguida as bactérias foram inoculadas em placas de Petri, contendo o mesmo meio de cultivo citado acima, por estrias de isolamento e incubadas por 20 horas a 37°C.

[059] Transcorrido o tempo, 5 colônias isoladas foram inoculadas em erlemayers contendo 100 mL de meio Luria-Bertani. Em seguida, foram incubadas em “shaker” a 37°C, com velocidade de 150 rpm por 3 horas (obtendo-se aproximadamente ao final do processo, a densidade ótica de 10⁸ bactérias/mL). O volume foi dividido em dois tubos de 50mL previamente resfriados em gelo e incubados na mesma temperatura por 10 minutos. Após esse processo, os tubos foram centrifugados a 2700 g (aproximadamente 5.000 rpm), por 10 minutos a 4°C.

[060] O sobrenadante foi descartado, o tubo foi invertido em papel toalha por 1 minuto para escorrer qualquer meio excedente. Cada “pellet” de cada tubo foi ressuspensionado em 30 mL da solução gelada de MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂ e 20mM de CaCl₂). Novamente os tubos foram centrifugados a 2700 g (5000 rpm), por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e ao “pellet” adicionou-se 2mL de 100mM de CaCl₂ com 30% de Glicerol. Os tubos foram incubados por 16 horas em gelo, dentro da geladeira. Após este período as células foram aliquotadas em microtubos de 1,5mL. Em cada microtubo colocou-se 200 μ L da célula competente.

[061] No presente exemplo, para a transformação bacteriana o plasmídeo de interesse testado foi o plasmídeo GFP, que além de emitir fluorescência quando submetido à luz ultravioleta, também é resistente ao antibiótico ampicilina.

[062] Todos os experimentos foram realizados em triplicata sendo que os tubos A foram transformados com GFP mais 1mg/mL de BNNT enquanto que, os tubos B foram transformados com GFP mais 0,5 mg/mL de BNNT.

[063] As células competentes DH5 α previamente congeladas a -80°C foram completamente descongeladas em gelo, em seguida adicionou-se 200 μ L de BNNT e a solução foi homogeneizada suavemente com o auxílio da micropipeta. Em seguida adicionou-se 5 μ L do plasmídeo GFP e novamente a solução foi suavemente homogeneizada com o auxílio da micropipeta. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos. Transcorrido o tempo, foi colocada em banho pré-aquecido a 42°C por exatos 90 segundos. Novamente os microtubos foram incubados em gelo por mais 2 minutos. Adicionou-se 600 μ L do meio Luria-Bertani pré-aquecido a 37°C. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica por 3 horas a 37°C e em seguida inoculados em placas de Petri contendo o meio Luria-Bertani e 50mg/mL do antibiótico ampicilina.

[064] Após 24 horas de crescimento as colônias bacterianas foram contadas da seguinte forma, a placa foi dividida em 8 partes iguais e 3 partes foram contadas, em seguida a média foi calculada e multiplicada por 8, obtendo o número total de colônias de cada placa. Em seguida a razão de amplitude foi calculada dividindo o valor do número de colônias de cada placa contendo BNNT pelo número de colônias da placa sem BNNT.

[065] Os microtubos contendo 1mg/mL de BNNT apresentaram os resultados demonstrados na Tabela 1. Nesta tabela observamos que as amostras bacterianas transformadas com BNNT apresentaram 4155 ufc (unidades formadoras de colônias), enquanto que, as amostras bacterianas transformadas sem BNNT (controle positivo) apresentaram 1141 ufc (unidades formadoras de colônias). Como esperado o controle negativo (bactéria sem

plasmídeo e sem BNNT) não mostrou crescimento, pois o plasmídeo apresenta resistência ao antibiótico ampicilina colocado na placa. Desta forma demonstramos que as bactérias e as placas não estavam contaminadas. Observamos ainda que se dividirmos o valor das bactérias transformadas com BNNT pelas bactérias transformadas sem BNNT (controle positivo), observamos uma razão de 3,64 vezes, evidenciando a eficiência do processo de transformação empregando BNNT.

[066] **Tabela 1** – Unidades formadoras de colônias (ufc) nas placas transformadas com 1 mg/ml de BNNT e nas placas dos grupos controle.

		1ª Contagem (ufc)	2ª Contagem (ufc)	3ª Contagem (ufc)	Média	Média x 8 (Número total ufc)	Razão
A	BNNT	542	516	500	519	4155	3,64
B	Controle (+)	179	96	153	143	1141	1
C	Controle (-)	0	0	0	0	0	0

Controle (+) - Linhagem de DH5α com o plasmídeo GFP sem o BNNT

Controle (-) - Linhagem de DH5α sem o plasmídeo GFP sem o BNNT

Razão - Número total de ufc com BNNT / Número total de ufc do Controle (+)

[067] Enquanto que os microtubos transformados com 0,5 mg/mL de BNNT apresentaram os resultados a seguir. Observamos que as amostras bacterianas transformadas com BNNT apresentaram 2019 ufc, enquanto que, as amostras bacterianas transformadas sem BNNT (controle positivo) apresentaram 1352 ufc. Como esperado o controle negativo (bactéria sem plasmídeo e sem BNNT) não mostrou crescimento, pois o plasmídeo apresenta resistência ao antibiótico ampicilina colocado na placa. Desta forma, demonstramos que as bactérias e as placas não estavam contaminadas. Observamos ainda que se dividirmos o valor das bactérias transformadas com BNNT pelas bactérias transformadas sem BNNT (controle positivo), observamos uma razão de 1,49 vezes. Isso significa que o BNNT aumentou a taxa de transformação nesta proporção observada, demonstrando a eficiência do processo.

[068] Além disso, o teste estatístico foi realizado pelo programa GraphPad InStat 3.06 (2003) pelo teste t pareado, considerando resultados significativos, $P \leq 0,05$. Na Figura 3 estão os resultados para as transformações realizadas com 1mg/ml de BNNT (coluna A) e controle de transformação bacteriana sob as mesmas condições sem a utilização de BNNT (coluna F). Desta forma demonstramos que a amostra transformada com BNNT apresentou 3,64 vezes mais colônias transformadas que o controle utilizado sem BNNT. Na Figura 4 estão os resultados para as transformações realizadas com 0,5 mg/ml de BNNT (coluna A) e controle de transformação bacteriana submetida sob as mesmas condições só que sem o uso de BNNT (coluna F). Demonstramos assim, que a amostra com BNNT apresentou 1,49 vezes mais colônias viáveis e transformadas com o plasmídeo utilizado que o controle sem BNNT.

Referências bibliográficas

[069] Adler, C., Ahammed, Z., Allgower, C., *et al.* (2002). "Azimuthal anisotropy of $K(0)(S)$ and $\Lambda+\Lambda$ production at midrapidity from Au+Au collisions at $\sqrt{s(NN)}=130$ GeV." *Phys Rev Lett* 89(13): 132301.

[070] Bettinger, H. F., Dumitrica, T., Scuseria, G. E. and Yakobson, B. I. (2002). "Mechanically induced defects and strength of BN nanotubes." *Physical Review*: 65.

[071] Chen, J., Chen, Y., Niu, Y. L., Fu, H. and Zhao, Y. F. (2002a). "A carbonyl oxygen migration in electrospray ionization mass spectrometry and its application in differentiating alpha- and beta-alanyl peptides." *J Mass Spectrom* 37(9): 934-939.

[072] Chen, Y., Chadderton, L. T., Fitzgerald, J., Williams, J. S. and Bulcock, S. (1999). "A solid-state process for formation of boron nitride nanotubes." *Applied Physics Letters* 74: 2960-2962.

[073] Chen, Y., Conway, M. and Williams, J. S. (2002b). "Large-quantity production of high-yield boron nitride nanotubes." *J. Mater. Res.* 17(8): 1896-1899.

[074] Chen, Y., Dabovic, B., Annes, J. P. and Rifkin, D. B. (2002c). "Latent TGF-beta binding protein-3 (LTBP-3) requires binding to TGF-beta for secretion." *FEBS Lett* 517(1-3): 277-280.

[075] Chen, Y., Kamat, V., Dougherty, E. R., *et al.* (2002d). "Ratio statistics of gene expression levels and applications to microarray data analysis." *Bioinformatics* 18(9): 1207-1215.

[076] Chen, Y., Meyer, J. D., Song, J., McDonald, J. C. and Cherry, N. (2002e). "Reliability assessment of a coding scheme for the physical risk factors of work-related musculoskeletal disorders." *Scand J Work Environ Health* 28(4): 232-237.

[077] Chen, Y. W., Jeng, Y. M., Yeh, S. H. and Chen, P. J. (2002f). "P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia." *Hepatology* 36(4 Pt 1): 927-935.

[078] Feng, L. X., Chen, Y., Dettin, L., *et al.* (2002). "Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line." *Science* 297(5580): 392-395.

[079] GAN, W. Z., DING, X. X., HUANG, Z. X., *et al.* (2005). "Growth of boron nitride nanotube film in situ." *Applied Physics A* 81: 527-529.

[080] Gnjjatic, S., Jager, E., Chen, W., *et al.* (2002). "CD8(+) T cell responses against a dominant cryptic HLA-A2 epitope after NY-ESO-1 peptide immunization of cancer patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11813-11818.

[081] Golberg, D. and Bando, Y. (2001). "Unique morphology of boron nitride nanotubes." *Applied Physics Letters* 79: 415-417.

[082] Han, J. Z., Lin, W., Lou, S. J., Qiu, J. and Chen, Y. Z. (2002). "A rapid, nongenomic action of glucocorticoids in rat B103 neuroblastoma cells." *Biochim Biophys Acta* 1591(1-3): 21-27.

[083] He, M. L., Chen, Y., Peng, Y., *et al.* (2002). "Induction of apoptosis and inhibition of cell growth by developmental regulator hTBX5." *Biochem Biophys Res Commun* 297(2): 185-192.

[084] Huang, C. C., Chen, Y. L., Liang, Y. C. and Hsu, K. S. (2002). "Role for cAMP and protein phosphatase in the presynaptic expression of mouse hippocampal mossy fibre depotentiation." *J Physiol* 543(Pt 3): 767-778.

[085] Hung, S. L., Wang, Y. H., Chen, H. W., Lee, P. L. and Chen, Y. T. (2002). "Analysis of herpes simplex virus entering into cells of oral origin." *Virus Res* 86(1-2): 59-69.

[086] Li, C. S., Lin, W. H., Yang, Y. Y., *et al.* (2002). "Impairment of temporal attention in patients with schizophrenia." *Neuroreport* 13(11): 1427-1430.

[087] Lourie, O. R., Jones, C. R., Bartlett, B. M., *et al.* (2000). "CVD growth of boron nitride nanotubes." *Chemical Materials* 12(1808-1810).

[088] Meadows, L. S., Chen, Y. H., Powell, A. J., Clare, J. J. and Ragsdale, D. S. (2002). "Functional modulation of human brain Nav1.3 sodium channels, expressed in mammalian cells, by auxiliary beta 1, beta 2 and beta 3 subunits." *Neuroscience* 114(3): 745-753.

[089] Nakashima, Y., Chen, Y. X., Kinukawa, N. and Sueishi, K. (2002). "Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age." *Virchows Arch* 441(3): 279-288.

[090] Olivier, M., Chuang, L. M., Chang, M. S., *et al.* (2002). "High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms using new biplex invader technology." *Nucleic Acids Res* 30(12): e53.

[091] Rojas-Chapana, J., Troszczyńska, J., Firkowska, I., Morsczech, C. and Giersig, M. (2005). "Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells." *Lab Chip* 5(5): 536-539.

[092] Teng, Y. N., Tsai, W. H., Wu, C. J., *et al.* (2002). "Referral diagnosis of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome based on methylation-specific polymerase chain reaction." *J Formos Med Assoc* 101(7): 488-494.

[093] Wu, Q., Chen, Y. Q., Chen, Z. M., Chen, F. and Su, W. J. (2002a). "Effects of retinoic acid on metastasis and its related proteins in gastric cancer cells in vivo and in vitro." *Acta Pharmacol Sin* 23(9): 835-841.

[094] Wu, Q., Zhang, M., Liu, S., Chen, Y. and Su, W. (2002b). "Retinoic acid receptor beta is required for anti-activator protein-1 activity by retinoic acid in gastric cancer cells." *Chin Med J (Engl)* 115(6): 810-814.

[095] Xiang, C. C., Kozhich, O. A., Chen, M., *et al.* (2002). "Amine-modified random primers to label probes for DNA microarrays." *Nat Biotechnol* 20(7): 738-742.

[096] Zhi, C., Bando, Y., Tang, C., *et al.* (2005). "Perfectly dissolved boron nitride nanotubes due to polymer wrapping." *J Am Chem Soc* 127(46): 15996-15997.

REIVINDICAÇÃO

1. Processo de transformação bacteriana utilizando nanotubos de nitreto de boro **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- a) Descongelamento das células bacterianas competentes em gelo;
- b) Adição 50 a 300 μL , preferencialmente 200 μL de nanotubos de nitreto de boro;
- c) Adição 0,5 μL a 15 μL , preferencialmente 5 μL do plasmídeo de interesse;
- d) Incubação em gelo por preferencialmente 30 minutos, seguida de banho pré-aquecido a uma temperatura controlável e preferencial de 42°C por exatos 90 segundos e novamente em gelo por preferencialmente 2 minutos.;
- e) Adição de 300 a 800 μL , preferencialmente 600 μL de um meio de cultura pré-aquecido a preferencialmente 37°C;
- f) Incubação em estufa bacteriológica, por 1 a 4 horas, preferencialmente 3 horas, a 37°C;
- g) Inoculação por espalhamento em placas de Petri contendo o meio de inóculo apropriado e um antibiótico.

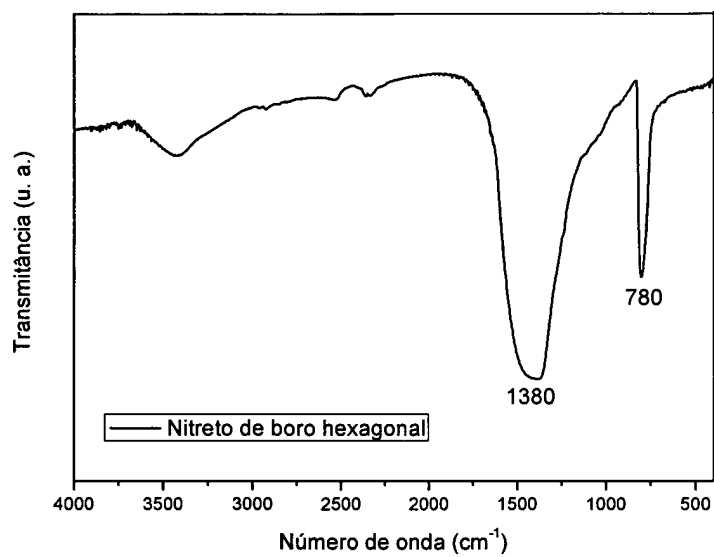


Figura 1

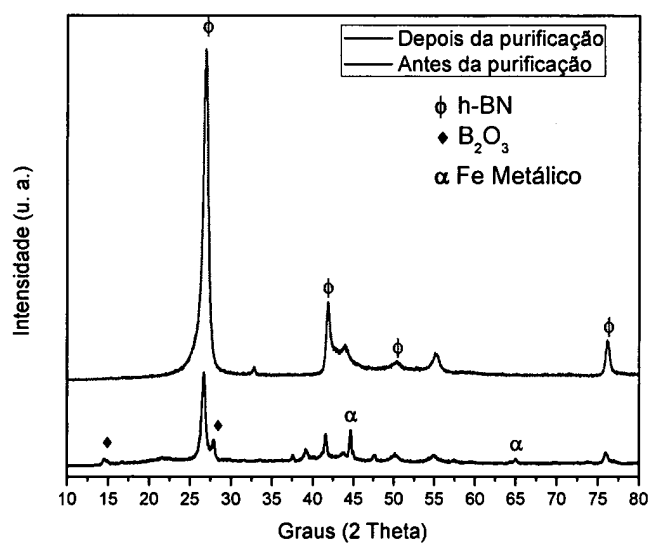
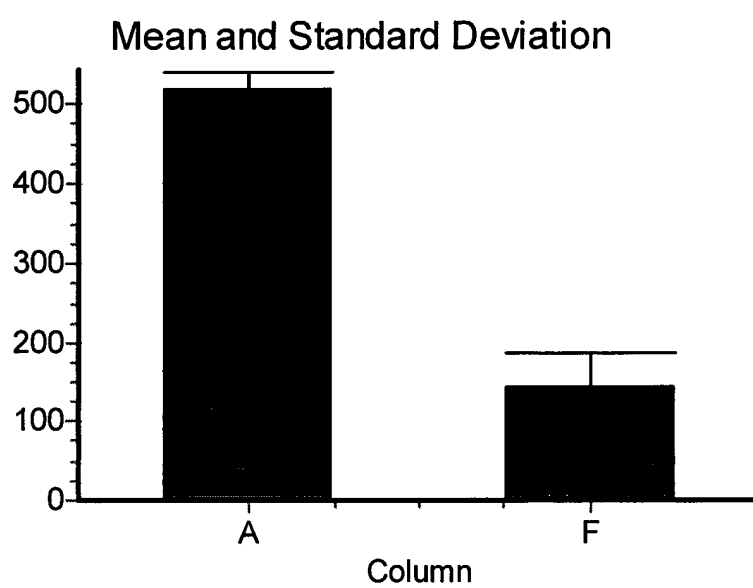
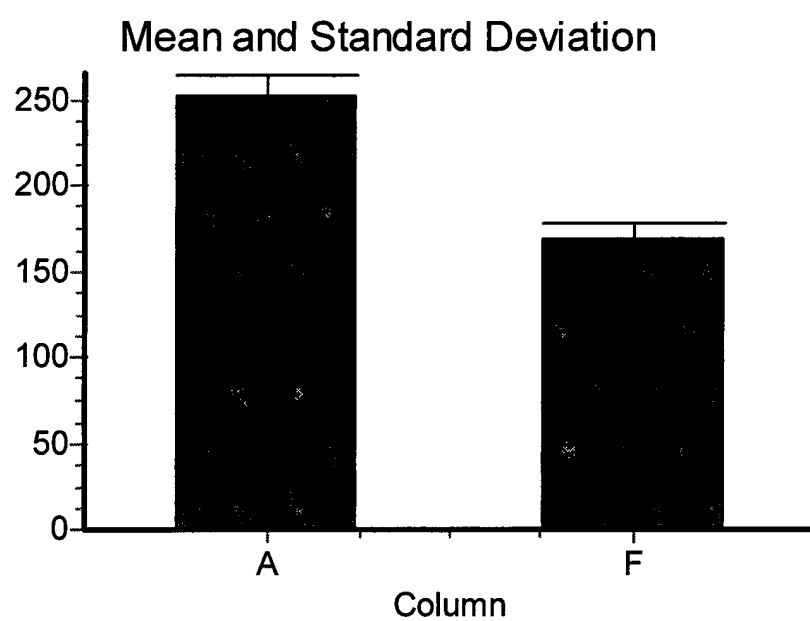


Figura 2

**Figura 3****Figura 4**