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

(21) **PI0801514-7 A2**

BRPI0801514A2

(22) Data de Depósito: 27/05/2008
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)

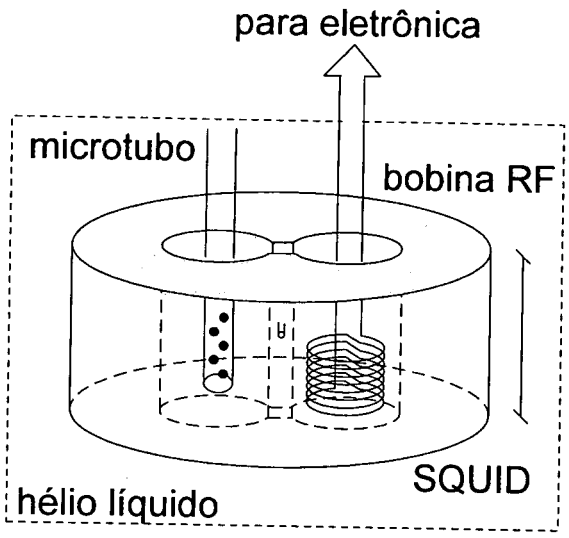
(51) Int.Cl.:
G01N 27/72 2006.01
B82B 1/00 2006.01

(54) Título: **MÉTODO E APARATO PARA DETECÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

(73) Titular(es): Faculdades Católicas, Sociedade Civil Mantenedora da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC RIO)

(72) Inventor(es): Antonio Carlos Oliveira Bruno, Hélio Ricardo Carvalho

(57) Resumo: MÉTODO E APARATO PARA DETECÇÃO DE NANOPARTiCULAS MAGNÉTICAS A presente invenção trata de um método e aparato para detecção de nanopartículas magnéticas em solução. Em especial, o método da presente invenção é capaz de medir o fluxo magnético causado pelo campo magnético remanente gerado durante o resfriamento das nanopartículas após processo de magnetização. A presente invenção se situa principalmente no campo da física e da medicina.



PI0801514-7

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO E APARATO PARA DETECÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Campo da Invenção

A presente invenção trata de um método e aparato para detecção de nanopartículas magnéticas em solução. Em especial, o método da presente invenção permite a medição do fluxo magnético causado pelo campo magnético remanente gerado durante o resfriamento das nanopartículas após processo de magnetização, assim como um aparato para realização de tal medição. A presente invenção se situa principalmente no campo da física e da medicina.

Antecedentes da Invenção

Nanopartículas Magnéticas

Nanopartículas magnéticas são importantes ferramentas para o diagnóstico em biologia e medicina. Seus tamanhos podem ser controlados, variando de dezenas até centenas de nanômetros, tornando-as menores ou comparáveis às dimensões de células (5 – 100 μm), bactérias (200 nm – 6 μm), vírus (20 – 500 nm) e proteínas (5 – 50 nm). Por terem seu tamanho reduzido, elas chegam muito perto e podem interagir com estas estruturas. As nanopartículas possuem um núcleo de material magnético, na maioria das vezes, coberto por sílica, um polímero, ou algum tipo de açúcar, como o dextran. Esta cobertura é funcionalizada através da adição de moléculas biológicas, permitindo que a nanopartícula se ligue aos vírus, bactérias ou células de interesse. Desta forma eles poderão ser acessados, marcados magneticamente, contados e imobilizados, por exemplo.

Nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas *in vivo* e *in vitro*. A capacidade das nanopartículas de transporte e manipulação à distância, devido ao seu núcleo magnético, permite várias aplicações *in vivo*. Elas podem transportar drogas como quimioterápicos, diretamente para a região específica de um tumor no corpo humano, diminuindo os efeitos colaterais do

medicamento. As nanopartículas podem também ser aquecidas através de campos magnéticos variantes no tempo, tornando-se um agente efetivo em tratamentos baseados em hipertermia, eficazes no combate às células malignas, sem falar no seu uso como agente de contraste para medidas de ressonância magnética.

Cobertas com anticorpos apropriados, elas também podem ser utilizadas para procedimentos *in-vitro* como imunoensaios, onde funcionam como biosensores para marcar vírus, moléculas específicas ou bactérias com o objetivo de detectá-las e quantificá-las. O procedimento consiste em introduzir nanopartículas cobertas com os anticorpos da célula ou vírus que se deseja detectar em uma amostra. Se estes estiverem presentes na amostra, eles se ligarão por afinidade às nanopartículas através da ligação antígeno-anticorpo. As partículas tradicionalmente usadas em imunoensaios contêm uma camada extra com enzimas, materiais fluorescentes ou radioisótopos. A detecção é tradicionalmente realizada através das propriedades desta última camada, por exemplo, medindo a fluorescência da amostra.

Recentemente, com o objetivo de aumentar sua sensibilidade, imunoensaios magnéticos têm sido propostos, onde a detecção e quantificação são feitas através do campo magnético, gerado ou induzido no núcleo da nanopartícula magnética ligada à célula de interesse. Para isto um magnetômetro sensível é utilizado.

A utilização de magnetômetros como os baseados nos dispositivos supercondutores de interferência quântica (SQUIDs), nos sensores baseados na magnetoresistência gigante (GMR) e na magnetoimpedância gigante (GMI), para detecção e quantificação das nanopartículas, abre novas perspectivas para a realização deste tipo de imunoensaio. Sua aplicação permitirá a determinação de um número reduzido de células procuradas quando comparado às técnicas tradicionais. O diagnóstico precoce de várias patologias será possível.

Na maioria dos casos, o núcleo das nanopartículas é constituído de magnetita (Fe_3O_4) o que implicará, dependendo do tamanho do núcleo, que as

nanopartículas apresentem propriedades ferromagnéticas ou superparamagnéticas. Isto afetará sua forma de excitação e detecção, que poderá ser: (i) através do campo remanente adquirido após magnetização prévia; (ii) através da aplicação de um campo e da medida simultânea da susceptibilidade magnética a este campo e (iii) da medida do tempo de relaxação da magnetização após a aplicação de um pulso de campo magnético. Dos três, o melhor sistema de excitação seria o primeiro já que evita contribuições paramagnéticas ou diamagnéticas do recipiente onde a solução de partículas está contida e evita a aplicação de um campo externo na presença de um magnetômetro sensível.

A presente invenção trata de um método e aparato para detecção de nanopartículas magnéticas em solução. Em especial, o método da presente invenção é capaz de medir o fluxo magnético causado pelo campo magnético remanente gerado durante o resfriamento das nanopartículas após processo de magnetização.

No âmbito patentário, alguns documentos descrevem métodos de detecção de nanopartículas magnéticas.

O documento WO 05/47864 descreve nanopartículas magnéticas, métodos de detecção dessas nanopartículas e também a detecção de moléculas biológicas. Esse método consiste em ter uma molécula covalentemente ligada à pelo menos uma nanopartícula magnetizável e uma segunda molécula ligada à um substrato, no qual a primeira molécula irá se ligar, sendo assim selecionada. O método necessita de canais microfluídicos para sua realização e magnetiza as partículas durante a realização das medidas. A presente invenção difere desse documento por não necessitar de canais microfluídicos para a detecção e por utilizar um processo de magnetização da nanopartícula distinto, realizado durante uma variação da temperatura desde a temperatura ambiente até a temperatura do hélio líquido. Além disso, na presente invenção o campo de magnetização é desligado durante a realização da medida.

O documento US 2006/0292555 descreve nanopartículas magnéticas para a detecção de patógenos. Essas nanopartículas são submetidas à um campo magnético a fim de agregar nanopartículas e patógenos e a detecção é realizada através de microscopia óptica ou eletrônica. A presente invenção difere desse documento por não se destinar a agregação de complexos patógeno-nanopartícula e por utilizar detecção magnética que relaciona o fluxo magnético medido com o número de marcadores magnéticos da amostra.

O documento WO 07/027843 descreve um dispositivo de NMR para detecção de nanopartículas magnéticas. Esse dispositivo compreende um suporte contendo uma amostra líquida com as partículas magnéticas e analitos onde as partículas magnéticas se ligam. Logo após, a amostra é exposta à um campo magnético. A presente invenção difere desse documento pelo dispositivo de medição ser um sensor de fluxo magnético e, não, um NMR.

O documento WO 07/089564 descreve um imunoensaio magnético para determinar a concentração de analitos. Esse ensaio consiste no contato de uma amostra do analito com uma partícula magnética luminescente e no calculo da quantidade do analito através de sua marcação luminescente. A presente invenção difere desse documento por não necessitar de nanopartículas magnéticas luminescentes para a detecção.

O documento US 6,825,655 descreve um método para detectar mudanças na resposta magnética de partículas em uma camada externa de um fluido através da medição da rotação da partícula utilizando o relaxamento Browniano e, consequentemente, a modificação do volume hidrodinâmico. A presente invenção difere desse documento por não utilizar o relaxamento Browniano para detecção da mesma em uma solução, mas sim, a relação entre o fluxo magnético remanente com o número de marcadores magnéticos da amostra na temperatura de hélio líquido.

O documento US 6,770,489 descreve um método para detectar analitos utilizando nanopartículas magnéticas e um dispositivo SQUID através da aplicação de um campo de magnetização perpendicular à direção do fluxo detectado pelo SQUID estando o analito e as partículas à temperatura

ambiente. A presente invenção difere desse documento por magnetizar os analitos enquanto a temperatura nas partículas ligadas é diminuída, por fazer a detecção a uma temperatura de hélio líquido e por não aplicar o campo de magnetização enquanto a medição é realizada.

O documento US 6,123,902 descreve um dispositivo magnético para detecção de analitos de alta sensibilidade. Esse aparato compreende a produção de um campo magnético no local em que se encontra a amostra e meios para reduzir a força do campo magnético na amostra por um fator de pelo menos 10 durante o tempo de medição. A presente invenção difere desse documento por compreender um resfriamento da amostra durante a magnetização das mesmas, sendo que a medição do fluxo somente ocorre após esse resfriamento, o que não é citado pelo referido documento.

Portanto, não foi encontrado nenhum documento antecipando e/ou sugerindo os objetos da presente invenção.

Sumário da Invenção

É um dos objetos da presente invenção um método para detecção de nanopartículas magnéticas. Em uma concretização preferencial, o método da invenção compreende:

a) magnetizar as nanopartículas enquanto são resfriadas;

b) medir o fluxo magnético remanente após o resfriamento de a) por meio de um sensor magnético.

Em uma realização preferencial, o resfriamento das nanopartículas de a) ocorre preferencialmente entre a temperatura ambiente e -270° C.

Em uma realização preferencial, a medição do fluxomagnético remanente de b) é realizada utilizando sensores magnéticos que compreendem imersão em hélio líquido.

Em uma realização preferencial, o sistema permite a medição de amostras de 1 µl a 20 µl.

É um objeto adicional da presente invenção um aparato compreendendo:

a) meios para magnetização de nanopartículas magnéticas desmagnetizadas;

b) meios para resfriamento das nanopartículas magnéticas; e

c) meios para medição do fluxo magnético remanente após o resfriamento.

Esses e outros objetos da invenção serão valorizados e melhor compreendidos a partir da descrição detalhada da invenção.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 mostra um microtubo contendo partículas sendo inseridas dentro de um dos furos do SQUID.

A figura 2 exemplifica a técnica da presente invenção através da representação dos sinais magnéticos gerados pela mesma quantidade de partículas (Nanomag-D-spio fabricada pela Micromod). Utilizando a medida do campo remanente após o resfriamento das nanopartículas previamente magnetizadas (curva em formato de sino – resfriada com campo) e sem a utilização da mesma (linha reta – resfriada sem campo). Um aumento de 100 vezes na sensibilidade é alcançado utilizando a metodologia da presente invenção.

A figura 3 exemplifica a bobina de magnetização utilizada para magnetizar as partículas enquanto elas são resfriadas e finalmente mergulhadas no hélio líquido.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Método Para Detecção de Nanopartículas

O método para detecção de nanopartículas magnéticas da presente invenção compreende as etapas de:

a) magnetizar as nanopartículas desmagnetizadas enquanto são resfriadas;

b) medir o fluxo magnético remanente após o resfriamento de a) por meio de um sensor magnético;

Em uma realização preferencial, as nanopartículas de a) são magnetizadas, preferencialmente à 10 mT de campo magnético através de uma bobina de 770 voltas, e o campo magnético é desligado logo após o resfriamento das nanopartículas.

O método da presente invenção pode ser utilizado para detectar nanopartículas ligadas a vírus, bactérias, moléculas e/ou células de interesse, permitindo assim uma medida indireta de tal objeto ligado.

Nanopartículas magnéticas

A presente invenção utiliza nanopartículas disponíveis comercialmente que apresentam características superparamagnéticas, o que implica na ausência de remanência à temperatura ambiente, prejudicando sua detecção magnética através do campo remanente nessa temperatura. Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza nanopartículas magnéticas comerciais, comumente utilizadas em imunoensaios. Em uma realização preferencial, a presente invenção utiliza nanopartículas magnéticas cobertas com sílica e/ou dextran.

Sensores magnéticos contendo imersão em hélio líquido

A presente invenção utiliza sensores magnéticos contendo dispositivos contendo imersão em hélio líquido. Em uma realização preferencial é utilizado um dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID) maciço. A presente invenção utilizou um SQUID simétrico de dois furos feito de nióbio com design tradicional Zimmerman (2,4 mm de diâmetro de furo, profundidade de 10 mm e com junção Josephson do tipo ponto de contacto). Ainda, o SQUID utiliza uma bobina de calibração com momento magnético detectável mínimo de 6,6 $x10^{-16}$ Am^2.

Aparato de Detecção de Nanopartículas

O aparato de detecção de nanopartículas da presente invenção compreende:

a) meios para magnetização de nanopartículas magnéticas desmagnetizadas;

b) meios para resfriamento das nanopartículas magnéticas; e

c) meios para medição do fluxo magnético remanente após o resfriamento.

Em especial, os meios para magnetização das nanopartículas inclui, sem contudo limitar-se a bobinas. Já os meios para resfriamento incluem, sem contudo limitar-se a hélio líquido.

Exemplo 1 – Método de detecção

Exemplo 1.1 – Calibração do sistema

Utilizando o SHE SQUID 330X, o sistema da presente invenção apresentou um ruído de $50\mu\Phi_0/Hz^{1/2}$ na faixa de 0,1 Hz- 100 Hz. Entretanto, as medidas aqui apresentadas foram realizadas de 0,1Hz à 10 Hz, o que levou a um ruído de fluxo com amplitude de $20\mu\Phi_0$ à 5 Hz. O Φ_0 equivale a $2,05 \times 10^{-15} Tm^2$.

Utilizando uma bobina de calibração introduzida no SQUID, tem-se um momento magnético detectável mínimo de $6,6 \times 10^{-16} Am^2$.

Exemplo 1.2 Preparação da Amostra

Na presente invenção, foram utilizadas partículas magnéticas recobertas com sílica e/ou dextran. Cuidados especiais devem ser tomados com partículas que tenham seu núcleo na faixa das centenas de nanômetros, a fim de evitar precipitação e/ou agregação. Para este caso as partículas devem ser inicialmente desmagnetizadas. A fim de dispersar uniformemente estas partículas, um meio viscoso de PEG (polietileno glicol) em água miliQ (1:2 w/w) foi feito. Cerca de 10 µl das suspensões de partículas foram transferidas para os microtubos a fim de realizar as medidas com o SQUID. Se o núcleo das partículas for menor, não há necessidade dos cuidados mencionados anteriormente.

Exemplo 1.3 Medidas com SQUID

A suspensão de partículas dentro dos microtubos é magnetizada ao longo do microtubo com 10 mT de campo magnético através de uma bobina com 770 voltas com diâmetro interno de 14,7 mm e diâmetro externo de 27 mm. Este conjunto (microtubo e bobina) é resfriado até a temperatura do hélio líquido com o campo magnético ligado. Depois de imerso no banho de hélio o campo magnético é desligado e o microtubo é introduzido no furo do SQUID.

Um dos resultados demonstrou que o fluxo dentro do SQUID para a mesma massa de nanopartículas tem um aumento de 100 vezes em relação ao fluxo que seria detectado utilizando um processo de magnetização sem resfriamento.

O técnico no assunto saberá avaliar que a presente invenção pode ser realizada de diferentes maneiras à luz das informações aqui descritas.

Reivindicações

MÉTODO E APARATO PARA DETECÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

1. Método para detecção de nanopartículas magnéticas caracterizado por compreender as etapas de:

a) magnetizar as nanopartículas enquanto são resfriadas;

b) medir o fluxo magnético remanente após o resfriamento de a) por meio de um sensor magnético.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo resfriamento das nanopartículas magnetizadas de a) ocorrerem preferencialmente em uma faixa de temperatura que vai de 25°C a -270° C.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas nanopartículas magnéticas de a) estarem ligadas a vírus, bactérias, células, proteínas, macromoléculas e mistura dos mesmos.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas nanopartículas de a) serem previamente magnetizadas através de uma bobina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela magnetização prévia das nanopartículas ocorrer preferencialmente à 10 mT de campo magnético através de uma bobina de 770 voltas.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo campo magnético ser desligado logo após o resfriamento das nanopartículas.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela medição do fluxo magnético remanente de b) ser realizada utilizando sensores magnéticos que compreendem imersão em hélio líquido.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo sensor magnético ser preferencialmente o dispositivo supercondutor de interferência quântica maciço (SQUID).

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo SQUID utilizar uma bobina de calibração com momento magnético detectável mínimo de $6{,}6 \times 10^{-16}$ Am^2.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas nanopartículas estarem cobertas com sílica e/ou dextran.

11. Aparato para detecção de nanopartículas magnéticas caracterizado por compreender:

a) meios para magnetização de nanopartículas magnéticas desmagnetizadas;

b) meios para resfriamento das nanopartículas magnéticas; e

c) meios para medição do fluxo magnético remanente após o resfriamento.

12. Aparato, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo meio de magnetização ser uma bobina.

13. Aparato, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela magnetização ocorrer preferencialmente à 10 mT de campo magnético através de uma bobina de 770 voltas.

14. Aparato, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo meio de medição utilizar sensores magnéticos que compreendem imersão em hélio líquido.

15. Aparato, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo sensor magnético ser preferencialmente o dispositivo supercondutor de interferência quântica maciço (SQUID).

16. Aparato, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo SQUID utilizar uma bobina de calibração com momento magnético detectável mínimo de $6,6 \times 10^{-16}$ Am^2.

FIGURAS

Figura1

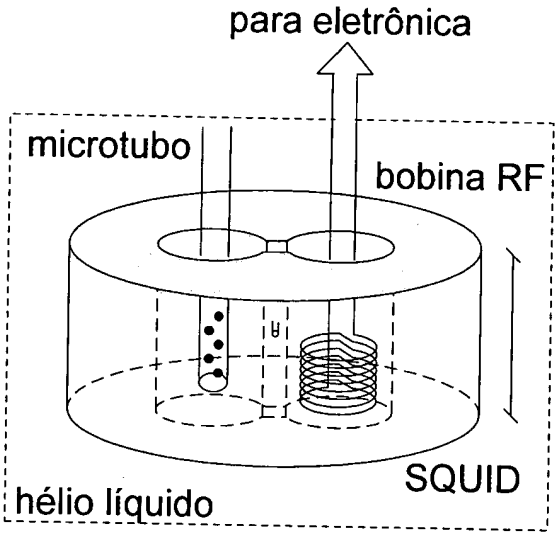


Figura 2

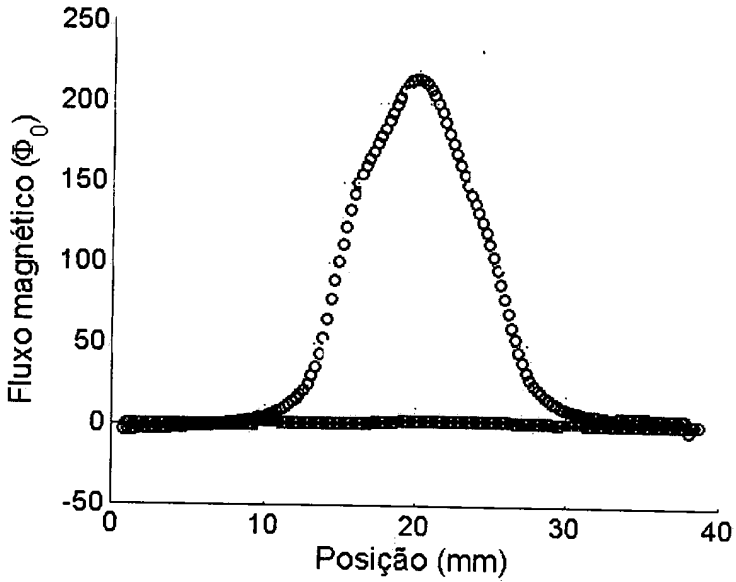
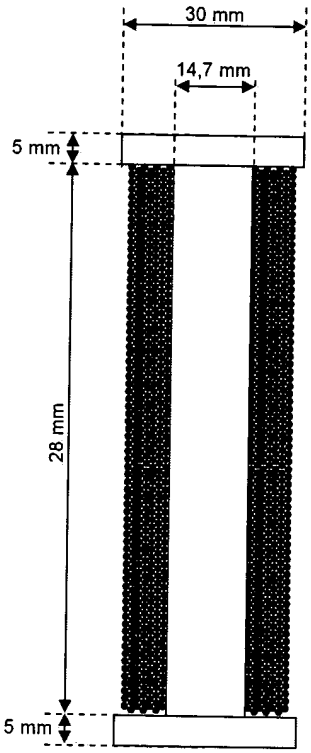


Figura 3



PI0801514-7

Resumo

MÉTODO E APARATO PARA DETECÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

A presente invenção trata de um método e aparato para detecção de nanopartículas magnéticas em solução. Em especial, o método da presente invenção é capaz de medir o fluxo magnético causado pelo campo magnético remanente gerado durante o resfriamento das nanopartículas após processo de magnetização. A presente invenção se situa principalmente no campo da física e da medicina.