



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

(21) BR 102020026994-1 A2



(22) Data do Depósito: 30/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 12/07/2022

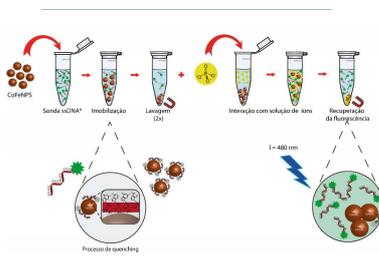
(54) **Título:** USO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO PARA A DETECÇÃO DE ÍONS FOSFATO EM MEIOS AQUOSOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/84; C01B 25/00; C01G 51/00; B82Y 15/00.

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

(72) **Inventor(es):** CELSO PINTO DE MELO; GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI; KAMILA TERESA OLIVEIRA DO NASCIMENTO; GRACIELA DA COSTA PEDRO; DANILO ROBERTO RATKOVSKI; FILIPE DIONE SOUZA GORZA; ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA; BRUNA GOMES MACIEL; LIZETH CAROLINA MOJICA SANCHEZ.

(57) **Resumo:** USO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO PARA A DETECÇÃO DE ÍONS FOSFATO EM MEIOS AQUOSOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS. A presente invenção estende-se ao uso de nanopartículas de ferritas de cobalto (CoFeNPs) como uma plataforma simples e rápida para a detecção de íons fosfato em meios aquosos e em fluidos biológicos, para o monitoramento de efluentes e solos contaminados com agrotóxicos e fertilizantes fosfatados, muito utilizados na agricultura, e também para estimar os níveis de concentração de fosfatos em amostras biológicas (como sangue), que podem estar associados a vários problemas de saúde, como insuficiência renal, hipertensão, hiperfosfatemia, hipofosfatemia, problemas ósseos, insuficiência cardíaca e respiratória, dentre outras doenças, e a problemas ambientais. A presente metodologia é baseada na detecção de íons fosfato (por meio fluorescente, como resultado da troca dos oligonucleotídeos fluorescentes por íons fosfatos na superfície das CoFeNPs) e tem como objetivo permitir o desenvolvimento de protocolos simples, de alta sensibilidade, rápidos, e de baixo custo, para o sensoriamento de contaminantes ambientais e para o diagnóstico simplificado de níveis de fosfato em amostras de fluidos biológicos



## **USO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO PARA A DETECÇÃO DE ÍONS FOSFATO EM MEIOS AQUOSOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

[1] A presente invenção estende-se ao uso de nanopartículas de ferritas de cobalto (CoFeNPs) como uma plataforma simples e rápida para a detecção de íons fosfato em meios aquosos e em fluidos biológicos, para o monitoramento de efluentes e solos contaminados com agrotóxicos e fertilizantes fosfatados, muito utilizados na agricultura, e também para estimar os níveis de concentração de fosfatos em amostras biológicas (como sangue), que podem estar associados a vários problemas de saúde, como insuficiência renal, hipertensão, hiperfosfatemia, hipofosfatemia, problemas ósseos, insuficiência cardíaca e respiratória, dentre outras doenças, e a problemas ambientais. A presente metodologia é baseada na detecção de íons fosfato (por meio fluorescente, como resultado da troca dos oligonucleotídeos<sup>1</sup> fluorescentes por íons fosfatos na superfície das CoFeNPs) e tem como objetivo permitir o desenvolvimento de protocolos simples, de alta sensibilidade, rápidos, e de baixo custo, para o sensoriamento de contaminantes ambientais e para o diagnóstico simplificado de níveis de fosfato em amostras de fluidos biológicos.

### **Antecedentes da invenção**

[2] Nas últimas décadas, o desenvolvimento de sensores simples, portáteis e de baixo custo para a detecção de íons se faz desejável para possibilitar tanto o monitoramento ambiental de recursos híbridos quanto a estimativa do nível de fosfato no soro do sangue humano, uma vez que medidas dos níveis de fosfatos

---

<sup>1</sup> **Oligonucleotídeo** – Fragmento curto de uma cadeia simples de ácido nucleico, com um tamanho típico de não mais do que algumas poucas dezenas de pares de base.

em amostras biológicas podem fornecer muitas informações para o diagnóstico clínico de vários problemas de saúde.

[3] Dentre os procedimentos convencionais adotados para a detecção de íons fosfato, se destaca a exploração das técnicas de cromatografia e espectrofotometria. No entanto, esses métodos são usualmente complicados e laboriosos, exigindo o uso de equipamentos especializados, e demandarem a utilização de muitos solventes, o que torna essas técnicas de alto custo. Assim, a busca por novos métodos mais sensíveis e específicos, rápidos e econômicos tem sido muito intensificada.

[4] Recentemente, novos nanomateriais têm sido explorados na construção de sensores fluorescentes, a serem utilizados como nanosupressores da fluorescência para a detecção de íons fosfato. Assim, a nanoestrutura (ou seja, a nanopartícula) interage com o fluoróforo de uma sonda de DNA marcada, com a fluorescência sendo extinta através de processos de transferência de elétrons. Por sua vez, essa supressão é revertida apenas quando íons fosfato estejam presentes em solução, o que permite a dessorção da sonda marcada, e assim a recuperação do sinal de fluorescência. Exemplos dos materiais citados, e outros, são listados na

**Tabela 1.**

**TABELA 1. PATENTES E ARTIGOS DE DIFERENTES PLATAFORMAS PARA A DETECÇÃO DE ÍONS FOSFATO.**

<b>PATENTE/ ARTIGO</b>	<b>Plataforma (tipo)</b>	<b>Meio de detecção</b>	<b>Limite de Detecção (nM)</b>
<b>WU E TONG (2018)</b>	Ciprofloxacina – Eu <sup>3+</sup>	Soluções aquosas	4,5
<b>JIA ET AL. (2016)</b>	Transistor de AlGaIn/GaN	Soluções aquosas	20
<b>LOPEZ ET AL. (2017)</b>	NPs inorgânicas/ FAM-DNA	Soluções aquosas	29
<b>JONHSON E PETTY (1982)</b>	Análise de Injeção de fluxo - Fosfomolibidato	Soluções aquosas	20

<b>LIU E LIU (2015)</b>	MONPs	Soluções aquosas	1000
<b>WARWICK ET AL. (2014)</b>	MIP	Soluções aquosas	1600
<b>DWIVEDI (2011)</b>	P1/Fe <sup>3+</sup>	Soluções aquosas e complexas	29000
<b>ZHAO E SCHANCE (2010)</b>	CPEs	Soluções aquosas	340
<b>AU2011349050 B2</b>	Eletrodos	Soluções aquosas	-

**MONPs:** Nanopartículas de Óxido de Metal; **MIP:** Polímero

Molecularmente Impresso; **P1:** Polímero poli[2,7-(9,9-diexilfluoreno)-  
co-alt-5,5'-(4,4'-didecil-2,2'-bitiofeno)]; **CPEs:** Polieletrólitos  
conjugados fluorescentes.

[5] Wu e Tong descreveram o uso da técnica de transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET) da Ciprofloxacina (CIP) para o Eu<sup>3+</sup>, através do complexo CIP – Eu<sup>3+</sup>, para a detecção de íons fosfato. Em particular, nessa plataforma o surfactante SDBS é utilizado para induzir o FRET e, com isso, extinguir a fluorescência do CIP. No entanto, quando o complexo entra em contato em uma solução de íons fosfato, o FRET é enfraquecido, e a fluorescência do complexo CIP – Eu<sup>3+</sup> é restaurada.

[6] Jia e col. reportaram o uso de um transistor de alta mobilidade de elétrons (também chamado de FET) de (nitreto gálio alumínio)/(nitreto de gálio) (AlGaN/GaN) como uma plataforma de detecção por corrente elétrica de íons fosfato em sistemas aquosos.

[7] Lopez e col. descreveram o uso de nanopartículas inorgânicas (CeO<sub>2</sub>, CePO<sub>4</sub> e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) imobilizadas com sequências fluorescentes de ácidos nucleicos (FAM – DNA) como plataforma para a detecção íons fosfato em sistemas aquosos.

[8] Jonhson e Petty reportaram o uso da técnica de análise de injeção de fluxo para a detecção de íons fosfato em sistemas aquosos.

[9] Liu e Liu relataram o uso de diferentes nanopartículas de óxido de metal (MONPs) imobilizadas com sequências fluorescentes de ácidos nucleicos (FAM – DNA) para a detecção de íons fosfato presentes em sistemas aquosos; em particular, nesse trabalho, as nanopartículas preparadas foram também utilizadas para a detecção de íons de arsênio.

[10] Warwick e col. descreveram o uso de polímeros molecularmente impressos como sensor para a detecção de íons fosfato em sistemas aquosos.

[11] Dwivedi e col. relataram o uso do polímero P1 (poli[2,7-(9,9-dixilfluoreno)-co-alt-5,5'-(4,4'-didecil-2,2'-bitiofeno) e sais de ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) como uma plataforma de sensoriamento para a detecção de íons fosfato para sistemas aquosos e biológicos.

[12] Zhao e Schance descreveram o uso do polímero catiônico poli(fenileno-etinileno), com cadeias laterais de poliamina, para a detecção de íons fosfato dissolvidos em soluções aquosas. Em particular, nesse trabalho, o polímero utilizado interage com os íons fosfato causando uma alteração espectroscópica significativa, o que permite a quantificação do íon dissolvido.

[13] A patente (AU 2011 349050 B2) descreve o uso de um dispositivo composto por diversos eletrodos para a detecção de um íon analito em um meio líquido. Para a detecção dos íons, os autores utilizaram diferentes eletrodos configurados para gerar um sinal em resposta à detecção da presença de um íon selecionado no líquido. Em particular, nesse trabalho diversos íons foram testados, dentre eles o íon fosfato.

[14] Diante do apresentado, fica estabelecido que até o presente momento não foi descrita a utilização das nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato presentes em sistemas aquosos ou biológicos.

## **Sumário**

[15] A presente invenção apresenta um novo método simples, rápido e de baixo custo para a detecção de íons fosfato dissolvidos em meios aquosos e amostras biológicas, a partir da imobilização de sequências de oligonucleotídeos em decorrência do estabelecimento de interações moleculares específicas (via processo de troca iônica entre uma sequência de oligonucleotídeos e íons fosfato na superfície de nanopartículas), com o uso de nanopartículas de ferrita de cobalto como uma plataforma para a imobilização e consequente supressão da fluorescência de sequências de oligonucleotídeos marcadas com fluoróforos.

[16] Em um primeiro aspecto, a invenção descreve os métodos utilizados para a síntese e caracterização de nanopartículas de ferrita de cobalto. Para esse fim, foi utilizado o método de co-precipitação química, através de um processo de várias etapas que envolve a troca de um precursor de ferro por um precursor de cobalto, que é seguido por um tratamento térmico para otimizar a estrutura cristalina da nanopartícula. A caracterização da composição e da morfologia das CoFeNPs foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X, medidas de magnetização, e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

[17] Em um segundo aspecto, a atual invenção descreve uma metodologia que faz uso de CoFeNPs, para as quais não existem precedentes de uso como uma plataforma para o sensoriamento de íons fosfato e de outros íons presentes em meios aquosos ou biológicos.

[18] Em um outro aspecto, o método de detecção dos íons utilizando as CoFeNPs pode envolver uma resposta de natureza ótica ou espectroscópica, preferencialmente, mas não apenas, via monitoramento da intensidade de fluorescência de sequências de oligonucleotídeos (sonda) marcadas com fluoróforos. Os íons de interesse a serem detectados podem ser provenientes de

amostras de efluentes, solos, meios biológicos com soro, plasma, saliva, urina, ou qualquer outro fluido biológico.

[19] Em um último aspecto, o método de reconhecimento de íons por meio de troca iônica entre as sondas marcadas e os íons alvo, utilizando as CoFeNPs como plataforma, mesmo que preferencialmente aplicável à detecção de íons fosfato, não se limita apenas a esse tipo de íon, podendo ser adaptado para a detecção de outros, como, por exemplo, ao fazer uso de aptâmeros com grande quantidade de Timina (T), o que permite ocorrer a interação específica entre um par de base nitrogenada T e íons de mercúrio ( $T - Hg^{2+} - T$ ), desde que a molécula de reconhecimento a ser imobilizada nas CoFeNPs possa ser marcada com um repórter fluorescente.

[20] Nas exemplificações demonstradas nesta invenção, utilizamos nanopartículas de CoFeNPs obtidas por co-precipitação química e tratadas termicamente. As CoFeNPs foram usadas em ensaios de sensoriamento fluorescente de íons fosfato em sistemas modelos de um meio aquoso e o soro de sangue simulado (SSS), e em um sistema real complexo, por meio do uso de amostras de soro de sangue humano (SSH). Nas exemplificações, especificamente, mas não se limitando a elas, a invenção se utiliza de métodos de sensoriamento que envolvem as seguintes etapas: (i) a imobilização de sequência de oligonucleotídeos (sondas) de cadeias simples marcadas com uma molécula repórter (um fluoróforo, no caso específico) na superfície das nanopartículas (e, conseqüentemente, a supressão da fluorescência do fluoróforo devido à proximidade com a superfície da partícula), (ii) a lavagem das CoFeNPs com as sondas imobilizadas para a remoção de moléculas fracamente adsorvidas, (iii) a inclusão das CoFeNPs com as sondas imobilizadas em amostras contendo ou não o íon de interesse, (iv) a remoção das CoFeNPs do meio de interação, (v) a detecção da recuperação de fluorescência a partir de medidas das amostras em um fluorímetro. Na **Fig. 1** são apresentadas de forma esquemática as principais etapas da metodologia de detecção da atual invenção (i – v).

[21] Pelo termo “*sensoriamento*” compreende-se a capacidade de biossensores (dispositivos analíticos que combinam a especificidade das biomoléculas na detecção, qualificação e quantificação de um analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para a conversão de uma resposta biológica em um domínio elétrico ou ótico, térmico, magnético, etc), de modo a obter informações sobre as moléculas biológicas alvo através do registro de interação intermoleculares por meio de uma resposta elétrica, ótica, magnética, ou térmica, entre outras.

[22] Pelo termo “*troca iônica*” compreende-se o fenômeno onde íons de mesmo sinal presentes em duas fases distintas (sólida e líquida, por exemplo) migram (a depender de afinidade) simultaneamente entre essas fases, mantendo o equilíbrio de carga entre elas.

[23] Pelo termo “*oligonucleotídeos*” compreende-se macromoléculas biológicas poliméricas curtas (algumas dezenas de nucleotídeos) constituídas por nucleotídeos ligados entre si através de ligações fosfodiéster, constituindo os ácidos nucleicos.

[24] Pelo termo “*fluoróforos*” compreende-se compostos que, quando excitados por uma faixa específica de radiação, emitem luz em uma ou mais comprimentos de onda dentro da faixa visível do espectro eletromagnético.

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

[25] A medida de concentrações dos níveis de fosfatos em amostras biológicas pode fornecer muitas informações para o diagnóstico clínico de vários problemas de saúde, indicando a existência de doenças como insuficiência renal, hipertensão, deficiência de vitamina D, distúrbios ósseos e hiperparatireoidismo. Por sua vez, o fosfato é usado comumente em fertilizantes, como precursor do fósforo, um nutriente essencial das plantas. No entanto, seu uso extensivo na agricultura faz dos íons fosfato um importante contaminante do solo e da água.

Elevados índices de fosfato em lagos e rios podem induzir o crescimento excessivo de plantas e algas (no processo conhecido como eutrofização), o que impede a penetração da luz, reduzindo a taxa fotossintética nas camadas inferiores. Com isso, ocorre o déficit do oxigênio necessário para atender a demanda respiratória dos organismos aeróbicos, conseqüentemente interrompendo os ciclos de vida aquáticos.

[26] Deste modo, como descrito anteriormente, nos últimos anos um grande número de pesquisas tem sido dedicado ao desenvolvimento de metodologias simples, rápidas e de baixo custo para a detecção rápida, quantificação e/ou remediação de íons fosfatos. Essa detecção/quantificação, por exemplo, é um passo fundamental, seja para o diagnóstico mais rápido de doenças relacionadas ao desbalanço nos níveis de fosfato no organismo, seja para o monitoramento dos índices de fosfato em efluentes. Os procedimentos convencionais para a detecção de fosfato envolvem o uso de cromatografia e espectrofotometria, métodos que tendem a ser laboriosos e exigir o uso de equipamentos especializados, sendo ainda demorados e demandantes de muitos solventes, o que, por sua vez, torna essas técnicas de alto custo. Tais características representam um entrave à maior difusão de sua implementação em pontos primários de atendimento (quando se refere a diagnóstico), ou em monitoramento *in loco* (ou em tempo real) de lagos, rios e bacias fluviais.

[27] À vista disso, a invenção descrita na presente patente propõe a utilização de nanopartículas de CoFeNPs para o reconhecimento seletivo de íons fosfato dissolvidos em meio aquoso e presentes em amostras mais complexas, como soro de sangue humano (SSH).

### **Vantagens da invenção**

[28] A utilização da presente invenção como plataforma de reconhecimento seletivo de íons fosfato baseados na supressão da fluorescência e troca iônica entre

seqüências de oligonucleotídeos marcadas com fluoróforo e íons fosfato traz como vantagens essenciais;

- a) A metodologia proposta pode ser usada para a detecção de íons fosfato por fluorescência, ou mesmo para outros íons ou moléculas, desde que a seqüência de oligonucleotídeos seja trocada por aptâmeros que apresentem interação específica com os íons ou moléculas alvo de interesse.
- b) Excelente seletividade com relação a íons fosfato, com a possibilidade de distinção efetiva em relação a inúmeros outros íons comumente encontrados em efluentes e meios fisiológicos.
- c) Explorar o comportamento magnético das nanopartículas, o que facilita a manipulação e separação do material pela simples aplicação de um campo magnético.
- d) Boa relação linear (e uma larga faixa de detecção) entre a intensidade de fluorescência e a concentração de íons fosfato.
- e) Baixo limite de detecção, estimado entre  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  Molar.
- f) Curto tempo de detecção, estimado em poucos minutos, para completar o ensaio.
- g) Bom nível de aplicabilidade em ambientes complexos, como amostras de soro humano ou efluentes.

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

[29] O avanço alcançado com essa invenção consiste no fato de que até o presente momento nenhuma instituição de pesquisa, ensino ou setor privado empregou nanopartículas CoFeNPs como plataforma nanossupressora do sinal de fluorescência (nanoquenchers) em ensaios de detecção de íons fosfato.

### **Breve descrição das Figuras**

[30] Na **Fig. 1** é apresentada uma representação pictórica das principais etapas da metodologia de sensoriamento de íons baseada nas nanopartículas CoFeNPs.

[31] Na **Fig. 2** é apresentado o espectro FTIR das CoFeNPs.

[32] Na **Fig. 3** é apresentado o difratograma de raios-X das CoFeNPs.

[33] Na **Fig. 4** são apresentadas a micrografia TEM a) e o histograma da distribuição dos tamanhos de partículas b) das nanopartículas CoFeNPs.

[34] Na **Fig. 5** é apresentada a curva de magnetização das nanopartículas CoFeNPs.

[35] Na **Fig. 6** é apresentada uma representação esquemática do processo de imobilização do ssDNA\* e quenching na superfície das nanopartículas CoFeNPs.

[36] Na **Fig. 7** são apresentados os espectros de emissão de fluorescência normalizados da solução de ssDNA\*, antes (I) e após (II) sua interação com CoFeNPs.

[37] Na **Fig. 8** são apresentadas as medidas de tamanho de partículas por DLS para as amostras CoFeNPs, antes a), e depois b) da imobilização das sondas (ssDNA\*).

[38] Na **Fig. 9** são apresentadas as curvas de TGA para as amostras de CoFeNPs puras a) e CoFeNPs/ssDNA\* com a sonda imobilizada b).

[39] Na **Fig. 10** é apresentada uma representação esquemática da metodologia adotada para os ensaios de detecção de fluorescência dos íons fosfato.

[40] Na **Fig. 11** são apresentados os espectros de emissão de fluorescência da solução sobrenadante ssDNA\* e a intensidade da emissão da fluorescência em 520 nm (detalhe) após interação com íons fosfato, para diferentes concentrações iniciais das CoFeNPs.

[41] Na **Fig. 12** são apresentados os resultados de imobilização (barra vermelha), recuperação (barra azul) de fluorescência e respectivos branco<sup>2</sup> (barra preta), para diferentes concentrações iniciais de nanopartículas.

[42] Na **Fig. 13** são apresentados os estudos cinéticos de imobilização a) e recuperação da fluorescência das sondas ssDNA\* imobilizadas b), após interação com soluções de íons fosfato.

[43] Na **Fig. 14** são apresentadas: a) a intensidade da resposta de fluorescência dos CoFeNPs/ssDNA\* após a interação com soluções de diferentes concentrações de íons fosfato, e b) a faixa de resposta linear do sensor CoFeNPs.

[44] Na **Fig. 15** é apresentada a resposta da plataforma CoFeNPs/ssDNA\* para diferentes ânions dissolvidos em meio aquoso.

[45] Na **Fig. 16** é apresentada a recuperação de fluorescência da plataforma CoFeNPs/ssDNA\* para a) amostras de SSS preparadas com diferentes concentrações de fosfato, b) e após interagir com SSH puro e SSH sem proteínas.

### **Descrição detalhada da invenção**

#### **Exemplo 1. Preparação e caracterização das formas de realização preferidas das nanopartículas CoFeNPs**

---

<sup>2</sup> **Branco** – É o sinal de fluorescência obtido após a exposição do complexo ssDNA\*/a-CoFeNPs a uma solução pura de Tris-HC, ou seja, uma solução tampão que não apresenta íons fosfato em sua composição.

**Exemplo 1.1. Preparação das nanopartículas CoFeNPs**

[46] A síntese adotada para a produção das CoFeNPs foi a rota de coprecipitação química através de uma adaptação do método usado por Medina-Llamas e col. A síntese pode ser descrita do seguinte modo: em um balão de fundo redondo são adicionados 50 mL de uma fonte de ferro e outra de cobalto,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2$ . Esta mistura é mantida sob vigorosa agitação magnética por aproximadamente 5 min, o que é seguido pela adição de 125 mL de uma solução aquosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A reação é deixada ocorrer por um intervalo de tempo de 4 a 8 horas, sob uma temperatura constante na faixa de 100 a 200 °C. Posteriormente, as nanopartículas são decantadas por meio do uso de um ímã, o que é seguido de vários ciclos de lavagens com água ultrapura, para a retirada de quaisquer contaminantes e/ou reagentes em excesso. O produto é seco a 80 °C em um forno por 48 horas e pulverizado com almofariz, obtendo-se ao final um fino pó negro. Finalmente, as amostras foram tratadas termicamente, sendo as CoFeNPs aquecidas primeiro a uma taxa de 10 °C/min até atingir 600 °C, temperatura que foi mantida por 1 h. E em seguida, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente a uma taxa de 10 °C/min.

**Exemplo 1.2. Métodos de caracterização e as características das nanopartículas de CoFeNPs**

[47] Para investigar a composição das CoFeNPs produzidas conforme o procedimento descrito no **Exemplo 1.1**, análises de FTIR foram realizadas no intervalo de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  usando um espectrômetro IR Tracer-100 (Shimadzu, Japão), utilizando pastilha de KBr. Para confirmar a formação da ferrita de cobalto, assim como sua estrutura cristalina, foram realizadas medidas de difração de raios-X utilizando um equipamento multiusuário do Departamento de Física da UFPE, um difratômetro SamarLab (Rigaku, Japão), equipado com uma fonte de raios-X de Cu, de comprimento de onda  $\lambda$  igual a 1,54056 Å. As propriedades magnéticas das CoFeNPs foram determinadas a partir das curvas de magnetização por meio

da técnica de magnetometria de amostra vibrante, utilizando um magnetômetro EV7 (Microsense, Estados Unidos). As características morfológicas das CoFeNPs e a distribuição de tamanhos foram avaliadas por meio da microscopia eletrônica de transmissão, fazendo uso de um microscópio JEM 1200EX-II (JEOL, Japão) com potencial de operação de até 120 kV.

[48] Como pode ser observado na **Fig. 2**, o espectro de FTIR das CoFeNPs apresenta sete picos principais: a banda em  $3435\text{ cm}^{-1}$  associada às vibrações de estiramento das moléculas de água O – H presentes na superfície das nanopartículas, e o pico em  $1632\text{ cm}^{-1}$ , que também pode ser atribuído à vibração no plano e fora do plano da água absorvida O – H. A presença do pico em  $1402\text{ cm}^{-1}$  corresponde às fortes vibrações das moléculas de  $\text{NH}_4^+$  associadas ao agente de co-precipitação usado na síntese das nanopartículas. Já a banda discreta observada em  $1167\text{ cm}^{-1}$  é associada à ligação Fe – Co. Por último, os picos em  $593$ ,  $470$  e  $417\text{ cm}^{-1}$  estão relacionados às vibrações de estiramento das ligações metal-oxigênio (M – O), atribuídas aos sítios tetraédricos e octaédricos, que são características da estrutura cristalina das ferritas de espinélio inverso.

[49] Na **Fig. 3** é mostrado o difratograma das CoFeNPs sintetizada. Como pode ser observado, os picos de difração estão situados em  $2\theta = 18,2^\circ$ ,  $30,2^\circ$ ,  $35,5^\circ$ ,  $37,1^\circ$ ,  $43,1^\circ$ ,  $53,5^\circ$ ,  $56,9^\circ$ ,  $62,6^\circ$ ,  $71,1^\circ$ ,  $73,9^\circ$ ,  $75,1^\circ$ ,  $79,2^\circ$ ,  $86,8^\circ$  e  $89,7^\circ$  (com os respectivos índices de Miller identificados na **Fig. 3**). Através de uma análise estrutural baseada no método de Rietveld, usando o software Maud, foi confirmada a formação da ferrita de cobalto, quando verificou-se que a estrutura cristalina das amostras era do tipo espinélio cúbico inverso com o grupo espacial  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$  (número COD-1533163), de acordo com o que anteriormente relatado na literatura.

[50] A técnica de refinamento de Rietveld, utilizando o software Maud, foi utilizada para o refinamento de estruturas e para a determinação dos parâmetros de rede através do difratogramas de raios-X. Através dessa análise, foi possível identificar a fase espinélio ( $\text{Co}_{0,255}\text{Fe}_{0,745}$ ) ( $\text{Co}_{0,745}\text{Fe}_{1,255}$ )  $\text{O}_4$  e a fase  $\alpha$ -

$\text{Fe}_2\text{O}_3$ , com o óxido de ferro sendo uma impureza residual da preparação das amostras, que foi estimada em 13,2%. O parâmetro de rede determinado foi igual a 8,389 Å, com um volume  $V$  de célula unitária de 590,487 Å<sup>3</sup> e densidade de 5,179 g/cm<sup>3</sup>.

[51] As micrografias de MET com alta ampliação obtidos das CoFeNPs são mostradas na **Fig. 4a**. Através dessas micrografias, é possível observar que as CoFeNPs exibem uma forma hexagonal com tamanhos na escala nanométrica. Também é possível identificar a presença de grandes aglomerados de nanopartículas, o que pode estar associado às interações dipolares entre as nanopartículas magnéticas ou então após terem sido depositadas na grade de cobre, o que pode ser atribuído à tensão superficial da água (devido à diluição na amostra no preparo das análises). Para fins de quantificação do tamanho das nanopartículas, utilizando o software livre ImageJ mediu-se o diâmetro das nanopartículas, sendo o histograma correspondente apresentado na **Fig. 4b**. Como pode ser visto, a distribuição de tamanho apresentou uma forma gaussiana, com uma faixa de tamanho variando de 7,5 a 38 nm, com um diâmetro médio de  $(18 \pm 5)$  nm.

[52] Na **Fig. 5** são mostradas as curvas de magnetização para as amostras CoFeNPs. Como pode ser visto, as CoFeNPs apresentam ciclos de histerese que correspondem a um comportamento ferrimagnético, um resultado consistente com aqueles reportados literatura para CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>NPs preparadas pela síntese de coprecipitação. Através dessas curvas, foram também obtidos os valores de magnetização a campo magnético máximo  $H_{\text{max}} = 18$  kOe de 53,6 emu/g, e um campo de coercividade  $H_C = 12,57$  Oe. Esse valor de  $H_C$  observado na curva a-CoFeNPs é consistente com aquele encontrado na literatura para nanopartículas de ferrita de cobalto com granulometria superior a 10,7 nm. Para partículas desse tamanho, as temperaturas de bloqueio (ou seja, a temperatura na qual a energia térmica diminui e os momentos magnéticos presentes nos materiais superparamagnéticos ficam bloqueados) devem estar acima da temperatura ambiente.

## **Exemplo 2. Sensoriamento de íons fosfato usando a plataforma de nanopartículas CoFeNPs**

[53] A presente invenção compreende o uso de nanopartículas de CoFeNPs, mas não somente estas, como uma plataforma universal para o sensoriamento fluorescente de íons metálicos ou não, preferencialmente íons fosfato.

[54] As nanopartículas de CoFeNPs descritas na presente invenção possuem afinidade por fitas simples de oligonucleotídeos, com a interação entre os grupos fosfatos constituintes dos nucleotídeos e a superfície das CoFeNPs (devida à alta afinidade entre os íons de fosfato e os íons metálicos  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Co}^{3+}$ ), o que possibilita sua utilização na adsorção de fitas simples de oligonucleotídeos (ácidos nucleicos), como cadeias de RNA e de DNA (ssDNA). Por sua vez, tais fitas de ácidos nucleicos podem estar modificadas com moléculas fluorescentes (fluoróforos), ou não. A superfície das CoFeNPs, por ter propriedades condutoras e possuir uma estrutura do tipo espinélio inverso, desempenha duas funções. A primeira, como mencionado, está associada à capacidade de adsorção das fitas simples de ácidos nucleicos pela interação entre os grupos fosfatos dos ácidos nucleicos e a superfície das nanopartículas. Em segundo lugar, as CoFeNPs ao mesmo tempo agem também como um supressor de fluorescência das moléculas repórteres por meio da captura e posterior dispersão do elétron fotoinduzido da molécula ao longo da superfície das nanopartículas. Na presente invenção, é explorada a supressão de fluorescência, mas não se limitando apenas a ela, como mecanismo de sensoriamento de íons. Nas seções a seguir serão descritas algumas exemplificações das nanopartículas de CoFeNPs, com o objetivo apenas de ilustrar algumas das diferentes possibilidades de aplicação da invenção. Assim, deixa-se desde já compreendido que a presente invenção não se limita às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos apresentados.

### **Exemplo 2.1. Imobilização de sondas de DNA fita simples e mecanismo de supressão de fluorescência**

[55] O uso das nanopartículas de CoFeNPs como uma plataforma para a detecção de íons fosfato envolve primeiro a imobilização de uma fita simples de DNA marcada com um fluoróforo (ssDNA\*) (neste exemplo específico, o fluoróforo FAM<sup>3</sup>) na superfície das CoFeNPs, devido à forte interação entre aos grupos fosfato presentes na estrutura dos ácidos nucleicos e os óxidos metálicos. De fato, íons metálicos (como Fe<sub>3</sub><sup>+</sup> e Co<sub>3</sub><sup>+</sup>) podem ser considerados como ácidos duros de Lewis, com alta afinidade por ligantes (bases) duros, como o fosfato, por meio de uma ligação específica. Isso, por sua vez, leva à supressão do sinal de luminescência devido a uma maior proximidade entre o fluoróforo (acoplado na estrutura do ssDNA) e as nanopartículas, após o processo de adsorção. Assim, o doador e o absorvedor devem estar muito próximos, o que favorece a transferência de elétrons e, conseqüentemente, a extinção da fluorescência. Subseqüentemente, quando as nanopartículas com as sondas imobilizadas CoFeNPs/ssDNA\* são postas em contato com a solução de íons fosfato, a troca das sondas marcadas (ssDNA\*) pelos íons fosfato presentes na solução na superfície das nanopartículas é favorecida, e, como resultado dessa troca, tem-se a recuperação da fluorescência. O mecanismo é mostrado esquematicamente, e de forma resumida, na **Fig. 1**.

[56] Para os estudos de imobilização das sondas de DNA marcadas por fluorescência nas nanopartículas, inicialmente foi preparada uma solução tampão contendo Tris<sup>4</sup>, HCl e MgCl<sub>2</sub> (tampão Tris-HCl/MgCl<sub>2</sub>). As sondas foram diluídas no tampão Tris-HCl/MgCl<sub>2</sub>. Posteriormente, foi adicionado 60 µL de uma solução aquosa de CoFeNPs a 1 mL da solução ssDNA\*/Tris-HCl/MgCl<sub>2</sub>, e mantido sob agitação constante por um intervalo de tempo de 30 a 120 min. Depois disso, com

---

<sup>3</sup> **FAM** – O 5 (6) – carboxifluoresceína é um corante fluorescente derivado da fluoresceína mais comum para marcação de biomoléculas. Ele tem uma alta capacidade de absorção, excelente rendimento quântico de fluorescência e boa solubilidade em água, e um máximo de excitação que corresponde exatamente à linha espectral de 488 nm do laser de íons de argônio.

<sup>4</sup> **Tris** – É uma abreviação do composto (hidroximetil)aminometano, N(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, muito usado para a preparação de tampões biológicos.

ajuda de um ímã, as nanopartículas com ssDNA\* imobilizado, CoFeNPs/ssDNA\*, foram confinadas, sendo então o sobrenadante coletado para a análise fluorimétrica. Devido à modificação das sondas de DNA com o fluoróforo, as amostras preparadas apresentam, neste caso específico, uma elevada fluorescência quando excitadas em  $\lambda = 480$  nm. Então, à medida que o ssDNA\* é adsorvido pelas CoFeNPs, a emissão de fluorescência da sonda é extinta e, conseqüentemente, a intensidade de fluorescência do meio líquido deve ser reduzida; portanto, pela medida da supressão progressiva da fluorescência, se faz possível quantificar de maneira simples e direta o processo de adsorção (**Fig. 6**), sendo que a presente invenção não se limita somente às condições ou detalhes específicos aqui descritos.

[57] Após o processo de imobilização, foi implementada uma etapa de lavagem, com a amostra sendo submetida a duas lavagens sucessivas, utilizando 1 mL do tampão Tris-HCl sob agitação constante em vortex, para minimizar a presença de sondas pouco imobilizadas e garantir que apenas as sondas de fato imobilizadas permaneçam no substrato. Finalmente, mais uma vez confinamos magneticamente as CoFeNPs e removemos o sobrenadante, obtendo deste modo, as amostras imobilizadas com as quais foram realizados os ensaios de sensoriamento de íons fosfato descritos nos exemplos a seguir.

[58] Conforme o ssDNA\* é adsorvido na superfície das nanopartículas CoFeNPs, sua emissão de fluorescência passa a ser gradualmente extinta e, conseqüentemente, a intensidade de fluorescência do meio líquido deve ser reduzida. De fato, pode-se observar (**Fig. 7**) que, enquanto a solução inicial da sonda exibe uma forte resposta  $I_0$  (curva I), a intensidade  $I$  da fluorescência da solução sobrenadante diminui significativamente, por um fator de 80% após a interação do ssDNA\* com as CoFeNPs (curva II). Isso indica que as nanopartículas de ferrita de cobalto podem imobilizar uma grande quantidade das cadeias de DNA dissolvida e atuam como um forte inibidor de fluorescência.

[59] Para confirmar que realmente houve a imobilização das sondas na superfície das nanopartículas, como sugerido pela redução da intensidade de fluorescência observada, foram realizadas medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), para avaliar o tamanho dos complexos CoFeNPs/ssDNA\*, e analisada sua decomposição térmica por análises de termogravimetria (TGA).

[60] As análises de DLS mostradas na **Fig. 8** revelam que há um aumento no tamanho médio das nanopartículas após o processo de imobilização da sonda de DNA. Pode-se observar que a distribuição de tamanhos é bimodal, com diâmetros médios centrados em 250 nm e 1600 nm (**Fig. 8a**). Esse resultado está de acordo com o que fora observado nas imagens de TEM, ou seja, a ocorrência de aglomeração das nanopartículas, resultando em agregados de grandes dimensões. Após o processo de imobilização (**Fig. 8b**), é possível observar um crescimento proporcional nos diâmetros médios, com uma distribuição bimodal com centros em 1600 nm e 6000 nm. Mais uma vez, isso indica que as sondas estão realmente imobilizadas na superfície das nanopartículas. Já para as curvas termogravimétricas apresentadas na **Fig. 9**, podemos observar que as amostras de CoFeNPs puras (curva pontilhada) não mostram nenhuma perda de massa, pelo fato de as espécies orgânicas presentes na superfície provenientes da síntese terem sido anteriormente degradadas durante a etapa de tratamento térmico. No entanto, para as partículas após a imobilização (CoFeNPs/ssDNA\*) (curva contínua) há uma primeira perda de 2% de massa associada às moléculas de água remanescentes do processo de imobilização (na faixa entre 50 °C e 200 °C) e um segundo evento térmico (na faixa de 200 °C a 450 °C), correspondente à perda de 9% da massa devida à degradação das sondas de DNA.

[61] Assim, através das análises de TGA, DLS e medidas de supressão de fluorescência, pudemos comprovar a efetiva imobilização das sondas de ácidos nucleicos na superfície das nanopartículas.

## **Exemplo 2.2. Ensaios de sensoriamento por fluorescência de íons fosfato com base no uso de nanopartículas de CoFeNPs em meio aquoso**

[62] Como uma exemplificação de uso da presente invenção, avaliou-se a capacidade de sensoriamento. Para isso, inicialmente, escolhemos utilizar como sistema modelo aquoso com íons fosfato disperso em diferentes concentrações. Além disso, a fim de encontrar as melhores condições para o uso das partículas CoFeNPs como uma plataforma sensora de íons fosfato, passamos a investigar diferentes parâmetros de preparação, como a concentração das partículas e o tempo necessário para adsorção/supressão e interação/recuperação da fluorescência.

[63] Como primeira análise da exemplificação, investigamos a influência de várias concentrações de CoFeNPs na supressão de fluorescência da sonda (ssDNA\*). Para isso, foram adicionados diferentes volumes (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60 e 80  $\mu\text{L}$ ) de uma solução aquosa inicial de 4  $\text{g.L}^{-1}$  de CoFeNPs em 1 mL de uma solução previamente preparada de ssDNA\*, diluída em Tris-HCl/MgCl<sub>2</sub>, resultando em soluções de CoFeNPs com concentrações variadas (0, 0,02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,24 e 0,32  $\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente). Nestes ensaios, um intervalo de tempo na faixa de 60 a 240 min foi utilizado para a adsorção da sonda de DNA sobre a superfície das partículas. Posteriormente, usamos um ímã para confinar o complexo CoFeNPs/ssDNA\*, sendo então medida a fluorescência da solução sobrenadante utilizando um fluorímetro FluoroLog-3 (Horiba, Estados Unidos), conforme esquematizado na **Fig. 10**. Aqui, deve ser novamente lembrado que a presente invenção não se limita às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos.

[64] Como se pode observar na **Fig. 11**, a intensidade do sinal de fluorescência diminui à medida que a concentração de CoFeNPs é aumentada, ocorrendo a saturação para concentrações maiores que 0,16  $\text{g.L}^{-1}$ , como facilmente observado no detalhe dessa figura. Esse resultado pode ser associado à presença

de um maior número de sítios disponíveis para adsorção quando concentrações mais elevadas de CoFeNPs são empregadas.

[65] A partir dos dados obtidos para as análises com diferentes concentrações de CoFeNPs da presente exemplificação, foi realizada uma verificação da influência das concentrações de CoFeNPs em relação à extinção e recuperação da fluorescência da ssDNA\* e ao branco. Na **Fig. 12** é mostrada a intensidade da fluorescência correspondente a três diferentes estágios do protocolo de sensoriamento: (i) imobilização da sonda, (ii) recuperação de fluorescência através da interação com uma solução de íons fosfato e (iii) recuperação da fluorescência usando uma amostra em branco, ou seja, um experimento no qual o complexo CoFeNPs/ssDNA\* foi exposto a uma solução pura de Tris-HCl. A baixa intensidade do sinal de fluorescência nos testes em branco confirma que as sondas ssDNA\* foram firmemente adsorvidas nas nanopartículas. Considerando os resultados mostrados nas **Figs. 11 e 12**, adotamos o valor de  $0,24 \text{ g.L}^{-1}$  para as soluções de CoFeNPs como sendo aquele correspondente à concentração ótima para as subsequentes análises da exemplificação da presente invenção, por ter sido para essa concentração que o melhor sinal de recuperação de fluorescência foi observado, com uma boa taxa de adsorção das sondas e um menor sinal de branco (sendo esse sinal um parâmetro importante para a avaliação do limite de detecção do sensor proposto).

[66] Os ensaios cinéticos de imobilização e recuperação de fluorescência foram realizados utilizando concentrações de sondas e íons fosfato que variaram nas faixas de 10-200 nM e 10-900  $\mu\text{M}$ , respectivamente, durante um período de tempo na faixa de 5 a 360 min. Como pode ser observado a partir dos dados mostrados na **Fig. 13a**, o processo de adsorção da sonda ssDNA\* nas CoFeNPs atinge o equilíbrio por volta de 60 min. No entanto, quando o complexo CoFeNPs/ssDNA\* é exposto à solução de íons fosfato, o sinal de fluorescência é gradualmente restaurado, com a saturação sendo alcançada por volta dos 120 min (**Fig. 13b**). Dessa maneira foi possível determinar os tempos ideais para a

imobilização da sonda e dessorção de ssDNA \* como sendo 60 min e 120 min, respectivamente. Mais uma vez, deve ser ressaltado que a invenção aqui retratada não é limitada às condições específicas reportadas nos exemplos.

### **Exemplo 2.3. Ensaios de sensibilidade e seletividade da detecção de íons fosfato em meio aquoso**

[67] Para avaliar a faixa de detecção efetiva, bem como para estimar o menor limite de detecção para as nanopartículas CoFeNPs, implementamos um estudo detalhado empregando diferentes concentrações de íons fosfato. A recuperação da fluorescência após os íons fosfato com concentrações na faixa de 0,001 a 10000 nM interagirem com o complexo CoFeNPs/ssDNA\* é mostrada na **Fig. 14a**. Como pode ser visto, após exposição a concentrações crescentes de íons fosfato, uma maior quantidade de ssDNA\* é liberada da superfície das nanopartículas, devido a sua substituição (troca) pelos íons presentes na solução. Como resultado, as sondas liberadas na solução restauram a fluorescência (devido a seu desligamento das CoFeNPs), com a observação de proporcionalidade entre a intensidade da fluorescência e a concentração de íons. Nesse exemplo específico, uma relação linear (**Fig. 14b**), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) em torno de 0,997, foi encontrada entre a intensidade de fluorescência a 520 nm (**I**) e a concentração de íons fosfato (**C**), na forma  $\log F = 0,445 \log C + 4,62$ , no intervalo de (150 – 3000) nM. O limite de detecção foi estimado como 1,75 nM, usando a relação  $3\sigma/S$  (onde  $\sigma$  = desvio padrão da amostra branco, e S a inclinação da curva de calibração).

[68] Além da sensibilidade, outro parâmetro importante a se levar em conta na avaliação do desempenho de um sistema de sensoriamento é sua seletividade para a detecção da molécula alvo em relação a outras espécies potencialmente competidoras. Para avaliar a seletividade da plataforma CoFeNPs/ssDNA\* em relação aos íons fosfato, o sensor foi exposto a soluções de diferentes ânions (citrato, acetato, carbonato, iodeto, nitrito, sulfato, cloreto, bicarbonato, hidróxido,

nitrato e brometo), seguindo as condições otimizadas descritas em Tonelli e col., além de Day e Schaufele. Para efeito de comparação, também testamos a resposta em uma amostra branco (íons fosfato). Nesse exemplo, como mostrado na **Fig. 15**, é possível observar que o sensor proposto exibe uma resposta considerável para os íons fosfato. Essa maior resposta para íons fosfato pode ser associada à sua estrutura química, em uma interação ácido-base de Lewis com as partículas de ferrita de cobalto. Neste exemplo específico, esses resultados demonstram que o sensor CoFeNPs/ssDNA\* é de fato seletivo para a detecção de íons fosfato dissolvidos.

[69] A respeito dos limites de detecção e sensibilidade obtidos neste exemplo da presente invenção, vale ressaltar que, segundo o Conselho Brasileiro do Meio Ambiente, CONAMA, o limite aceitável de concentração de íons fosfato nas águas subterrâneas é de 263 nM. Portanto, devido à sua sensibilidade, a atual invenção pode ser usada para avaliar a concentração de íons fosfato dissolvidos em meios aquosos.

### **Exemplo 3. Ensaios de sensoriamento em amostras complexas**

[70] Diante dos bons resultados observados nos ensaios de sensibilidade e seletividade, realizamos análises com amostras biológicas com o objetivo de avaliar o potencial de aplicação da plataforma CoFeNPs/ssDNA\* para o sensoriamento de íons. Para isso, foi examinado o desempenho das CoFeNPs/ssDNA\* usando dois tipos diferentes de amostras complexas: o soro de sangue simulado (SSS) e o soro de sangue humano (SSH).

[71] O SSS é uma solução com uma concentração de íons variados ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ) semelhante à do plasma sanguíneo humano, que deve ser usada sob as mesmas condições fisiológicas de pH e temperatura. Já o SSH é um meio complexo que contém proteínas, globulinas, íons carboxilatos e diferentes eletrólitos. Dentre os eletrólitos presentes no soro

encontra-se o fosfato, cujo nível normal está na faixa de concentração de 25 a 45 mg.L<sup>-1</sup>, a depender do paciente.

[72] As amostras de SBF foram preparadas seguindo a literatura. No entanto, como o objetivo destas análises é quantificar os níveis de fosfato de uma amostra complexa, diferentes concentrações de íons fosfato foram utilizadas na preparação do SSS. Com isso, foram obtidas seis amostras diferentes de SSS, com concentrações de fosfato variando na faixa de 0 a 57 mg.L<sup>-1</sup>. Para as amostras de SSH, primeiramente o sangue de um doador adulto anônimo saudável foi extraído e depois colocado em um tubo do tipo “vacutainer”, sem anticoagulantes. Após o sangue coagular, o tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min, sendo então o soro obtido coletado e separado. Os ensaios foram realizados usando amostras de SSH puras (sem um tratamento prévio do soro sanguíneo, ou seja, usado como coletado) e amostras nas quais as proteínas foram removidas (spSSH), a fim de reduzir a interferência fluorescente das proteínas durante as análises. Os ensaios de detecção por fluorescência foram realizados conforme as condições ótimas descritas em Tonelli e col., além de Day e Schaufele.

[73] Nas **Fig. 16a** e **Fig. 16b** são apresentados os resultados os estudos de sensoriamento para as amostras de SSS e SSH, respectivamente. Como pode-se observar, no caso do SSS (**Fig. 16a**) foi possível obter uma resposta consistente com o que se observou para sistemas aquosos, com a resposta fluorescente aumentando proporcionalmente com a concentração de íons fosfato no meio com o qual a plataforma CoFeNPs/ssDNA\* foi colocada em contato. Além disso, é importante ressaltar que o sensor proposto possui a sensibilidade adequada para ser usado no diagnóstico de pacientes com hiperfosfatemia ou hipofosfatemia, uma vez que é possível diferenciar amostras com concentrações de íons fosfato abaixo de 25 mg L<sup>-1</sup> e acima de 45 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já as amostras de soro de sangue humano (**Fig. 16b**) revelam que, para ambos os tipos de amostras (SSH e spSSH), há uma diferença notável na intensidade da fluorescência da solução após a interação com as CoFeNPs/ssDNA\*. Mesmo para essas amostras biológicas

complexas, para as quais existe um grande sinal de fluorescência basal devido à presença de proteínas, há uma resposta perceptível associada à liberação do ssDNA\* anteriormente imobilizado. Esse efeito é evidente no caso das amostras de spHBS, nas quais as proteínas estão ausentes.

[74] Deste modo, como evidenciado através dos exemplos apresentados da presente invenção, pode-se confirmar que a plataforma de detecção baseada no uso de CoFeNPs/ssDNA\* é realmente eficaz para a avaliação do íon fosfato presentes tanto em meios aquosos (seja no caso de remediação ou no sensoriamento ambiental de efluentes), como em meios biológicos complexos, através de um procedimento simples e que pode ser implementado em um tempo relativamente curto, levando a resultados precisos e altamente sensíveis.

### **Referências**

[75] Wu, H. and C. Tong, *A Specific Turn-On Fluorescent Sensing for Ultrasensitive and Selective Detection of Phosphate in Environmental Samples Based on Antenna Effect-Improved FRET by Surfactant*. ACS Sensors, 2018. **3**(8): p. 1539-1545.

[76] Jia, X., et al., *Highly selective and sensitive phosphate anion sensors based on AlGaIn/GaN high electron mobility transistors functionalized by ion imprinted polymer*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 27728.

[77] Lopez, A., Y. Zhang, and J. Liu, *Tuning DNA adsorption affinity and density on metal oxide and phosphate for improved arsenate detection*. J Colloid Interface Sci, 2017. **493**: p. 249-256.

[78] Johnson, K.S. and R.L. Petty, *Determination of phosphate in seawater by flow injection analysis with injection of reagent*. Analytical Chemistry, 1982. **54**(7): p. 1185-1187.

[79] Liu, B. and J. Liu, *Comprehensive Screen of Metal Oxide Nanoparticles for DNA Adsorption, Fluorescence Quenching, and Anion*

*Discrimination*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. 7(44): p. 24833-24838.

[80] Warwick, C., et al., *A molecular imprinted polymer based sensor for measuring phosphate in wastewater samples*. Water Sci Technol, 2014. 69(1): p. 48-54.

[81] Dwivedi, A.K., G. Saikia, and P.K. Iyer, *Aqueous polyfluorene probe for the detection and estimation of Fe<sup>3+</sup> and inorganic phosphate in blood serum*. Journal of Materials Chemistry, 2011. 21(8): p. 2502-2507.

[82] Zhao, X. and K.S. Schanze, *Fluorescent ratiometric sensing of pyrophosphate via induced aggregation of a conjugated polyelectrolyte*. Chemical Communications, 2010. 46(33): p. 6075-6077.

[83] Zuliang CHEN, M.M., Ravendra Naidu, Liang Wang, *Analyte ion detection method and device*, in *World Intellectual Property Organization*. 2011: USA.

[84] Cui, X., et al., *A fluorescent biosensor based on carbon dots-labeled oligodeoxyribonucleotide and graphene oxide for mercury (II) detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. 63: p. 506-512.

[85] Kumar, R., *Phosphate sensing*. Current opinion in nephrology and hypertension, 2009. 18(4): p. 281.

[86] Slatopolsky, E., *The intact nephron hypothesis: the concept and its implications for phosphate management in CKD-related mineral and bone disorder*. Kidney International, 2011. 79: p. S3-S8.

[87] Slatopolsky, E., *The intact nephron hypothesis: the concept and its implications for phosphate management in CKD-related mineral and bone disorder*. Kidney international. Supplement, 2011. 79(121): p. S3-S8.

[88] Fujiwara, K., et al., *Determination of phosphorus at the parts per trillion level by laser-induced thermal lensing colorimetry*. Analytical Chemistry, 1982. **54**(12): p. 2026-2029.

[89] Quintana, J.B., R. Rodil, and T. Reemtsma, *Determination of Phosphoric Acid Mono- and Diesters in Municipal Wastewater by Solid-Phase Extraction and Ion-Pair Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(5): p. 1644-1650.

[90] Law al, A.T. and S.B. Adeloju, *Progress and recent advances in phosphate sensors: A review*. Talanta, 2013. **114**: p. 191-203.

[91] Medina-Llamas, J.C., et al., *Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions*. Journal of Colloid and Interface Science, 2014. **434**: p. 167-174.

[92] Feng, J., et al., *Effect of Chromium Substitution on Structural and Magnetic Properties of Nickel-Cobalt Ferrite Nanoparticles Synthesized by Coprecipitation Method*. Journal of Superconductivity and Novel Magnetism, 2017. **30**(12): p. 3513-3521.

[93] Sethna, P.P., et al., *Infrared band intensities in ammonium hydroxide and ammonium salts\**. Journal of the Optical Society of America, 1978. **68**(4): p. 429-431.

[94] Masrour, R., M. Hamedoun, and A. Benyoussef, *The magnetic properties of diluted CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanomaterials*. Chinese Physics B, 2012. **21**(4): p. 047501.

[95] Rana, S., J. Philip, and B. Raj, *Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry*. Materials Chemistry and Physics, 2010. **124**(1): p. 264-269.

[96] Verwey, E.J.W. and E.L. Heilmann, *Physical Properties and Cation Arrangement of Oxides with Spinel Structures I. Cation Arrangement in Spinel*. The Journal of Chemical Physics, 1947. **15**(4): p. 174-180.

[97] Shahjuee, T., S.M. Masoudpanah, and S.M. Mirkazemi, *Coprecipitation synthesis of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for hyperthermia*. Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials, 2017. **50**(2): p. 105-110.

[98] Aliyan, N., et al., *The effect of post-calcination on cation distributions and magnetic properties of the coprecipitated MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles*. Applied Physics A, 2017. **123**(6): p. 446.

[99] Ferreira, T.A.S., et al., *Structural and morphological characterization of FeCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinels prepared by a coprecipitation method*. Solid State Sciences, 2003. **5**(2): p. 383-392.

[100] Hosni, N., et al., *Semi-hard magnetic properties of nanoparticles of cobalt ferrite synthesized by the co-precipitation process*. Journal of Alloys and Compounds, 2017. **694**: p. 1295-1301.

[101] Lutterotti, L., et al., *Rietveld texture analysis from diffraction images*. Z. Kristallogr. Suppl, 2007. **26**: p. 125-130.

[102] Rietveld, H., *A profile refinement method for nuclear and magnetic structures*. Journal of applied Crystallography, 1969. **2**(2): p. 65-71.

[103] Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature methods, 2012. **9**(7): p. 671-675.

[104] Gyergyek, S., et al., *Influence of synthesis method on structural and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(4): p. 1263-1273.

[105] Liu, C., et al., *Chemical control of superparamagnetic properties of magnesium and cobalt spinel ferrite nanoparticles through atomic level magnetic*

*couplings*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(26): p. 6263-6267.

[106] Vázquez-Vázquez, C., et al., *Finite size and surface effects on the magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. **13**(4): p. 1663-1676.

[107] Song, C., G.-Y. Wang, and D.-M. Kong, *A facile fluorescence method for versatile biomolecular detection based on pristine  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticle-induced fluorescence quenching*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **68**: p. 239-244.

[108] Zhang, Y., et al., *Novel use of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) nanoparticles for fluorescent nucleic acid detection*. ACS combinatorial science, 2012. **14**(3): p. 191-196.

[109] Li, C.M., et al., *Optical investigations on ATP-induced aggregation of positive-charged gold nanoparticles*. Talanta, 2010. **81**(4-5): p. 1339-1345.

[110] Liu, B. and J. Liu, *DNA adsorption by magnetic iron oxide nanoparticles and its application for arsenate detection*. Chemical Communications, 2014. **50**(62): p. 8568-8570.

[111] Pautler, R., et al., *Attaching DNA to nanoceria: regulating oxidase activity and fluorescence quenching*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013. **5**(15): p. 6820-6825.

[112] Nithiyantham, U., et al., *DNA mediated wire-like clusters of self-assembled TiO<sub>2</sub> nanomaterials: supercapacitor and dye sensitized solar cell applications*. Nanoscale, 2014. **6**(14): p. 8010-8023.

[113] Ye, Y.-D., et al., *DNA-stabilized silver nanoclusters and carbon nanoparticles oxide: A sensitive platform for label-free fluorescence turn-on detection of HIV-DNA sequences*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **85**: p. 837-843.

[114] Györi, E., I. Fábán, and I. Lázár, *Effect of the Chemical Composition of Simulated Body Fluids on Aerogel-Based Bioactive Composites*. Journal of Composites Science, 2017. **1**(2): p. 15.

[115] Tonelli, M., et al., *Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2627-2633.

[116] Day, R.N. and F. Schaufele, *Fluorescent protein tools for studying protein dynamics in living cells: a review*. Journal of biomedical optics, 2008. **13**(3): p. 031202.

## REIVINDICAÇÕES

1) O uso de nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato preparadas pelo método de co-precipitação, ou qualquer outro, **caracterizadas por** poderem ser usadas como plataforma para a imobilização e supressão de fluorescência de ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de íons fosfato, mas não apenas estes, por meio de troca entre sondas marcadas e os íons alvo.

2) O uso de nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato preparadas pelo método de co-precipitação, ou qualquer outro, **caracterizadas por** poderem ser usadas como plataforma para a imobilização e supressão de fluorescência de ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de íons fosfato, mas não apenas estes, podendo as amostras dos íons de interesse serem aquosas, tais como provenientes de lagos, rios, ou outros tipos de recursos hídricos.

3) O uso de nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato preparadas pelo método de co-precipitação, ou qualquer outro, **caracterizadas por** poderem ser usadas como plataforma para a imobilização e supressão de fluorescência de ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de íons fosfato, mas não apenas estes, podendo as amostras dos íons de interesse serem de natureza biológica complexa, tal como soro de sangue.

4) O uso de nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato preparadas pelo método de co-precipitação, ou qualquer outro, **caracterizadas por** poderem ser usadas como plataforma para a imobilização e supressão de fluorescência de ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de íons fosfato, mas não apenas estes, com a sonda a ser usada para sendo uma cadeia de fita simples de ácidos nucleicos ou aptâmeros, podendo a sequência correspondente ser específica ou não, a depender dos íons-alvo de interesse.

5) O uso de nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato preparadas pelo método de co-precipitação, ou qualquer outro, **caracterizadas por** poderem ser usadas como plataforma para a imobilização e supressão de fluorescência de ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de íons fosfato, mas não apenas estes, sendo que devido a sua composição química as nanopartículas são capazes de interagir com fitas simples de ácidos nucleicos, mas não somente essas, através de interações tanto eletrostáticas quanto das interações entre os íons de fosfato e os óxidos metálicos presentes nas estruturas dos ácidos nucleicos e nas nanopartículas, respectivamente.

6) O uso de nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato preparadas pelo método de co-precipitação, ou qualquer outro, **caracterizadas por** poderem ser usadas como plataforma para a imobilização e supressão de fluorescência de ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de íons fosfato, mas não apenas estes, sendo a sonda usada para o reconhecimento marcada preferencialmente, mas não somente, com uma molécula, ou qualquer outro repórter, fluorescente.

7) O uso de nanopartículas de ferrita de cobalto para a detecção de íons fosfato preparadas pelo método de co-precipitação, ou qualquer outro, **caracterizadas por** poderem ser usadas como plataforma de imobilização e supressão de fluorescência de ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de íons fosfato, mas não apenas estes, pela recuperação da intensidade de fluorescência das sondas desorvidas da plataforma via troca da sonda pelos íons fosfato.

## Desenhos

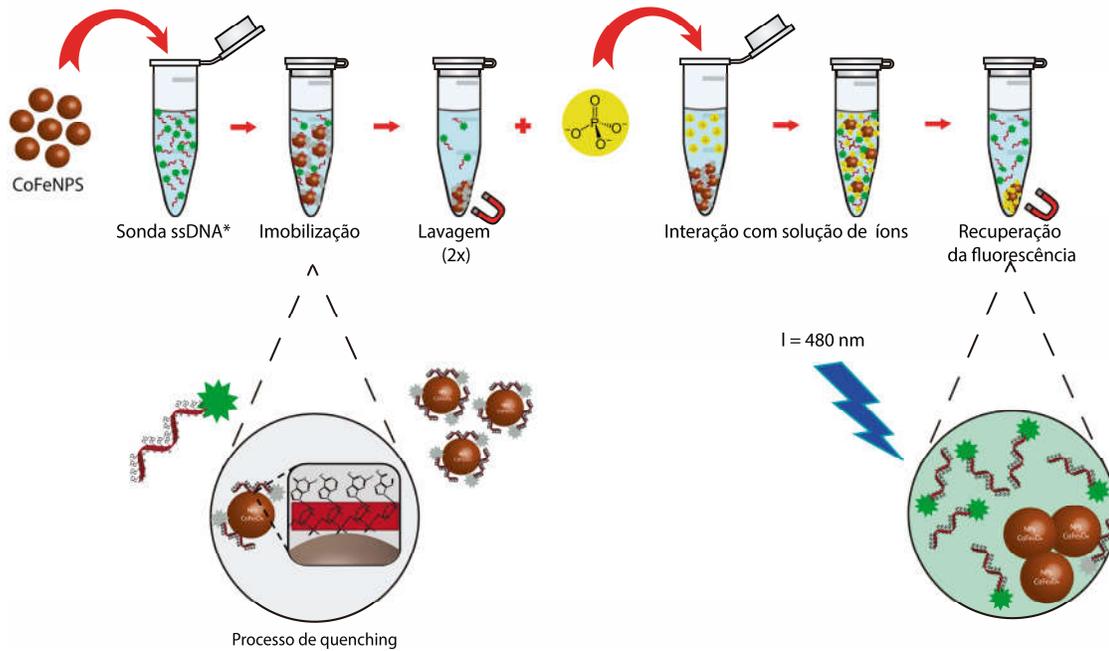


Fig. 1

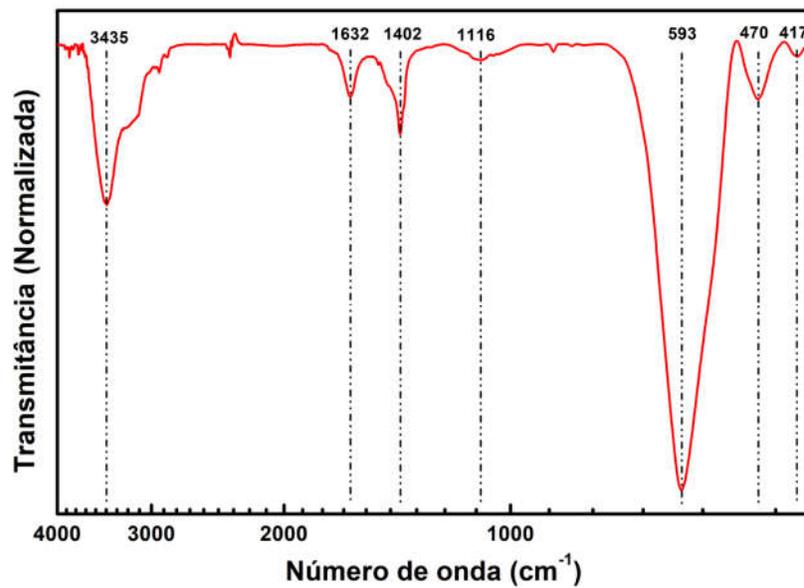


Fig. 2

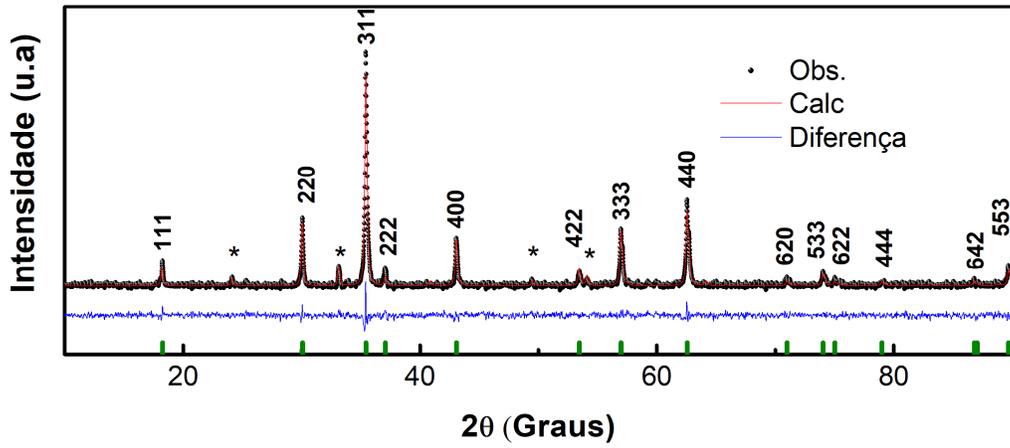


Fig. 3

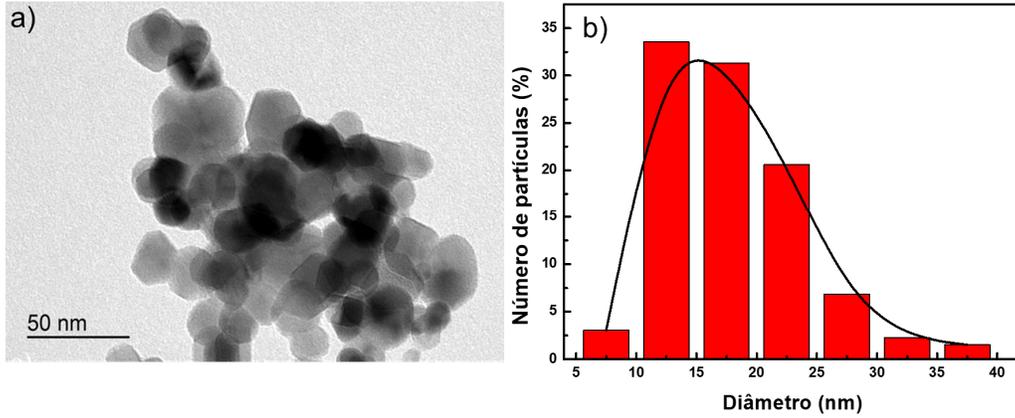


Fig. 4

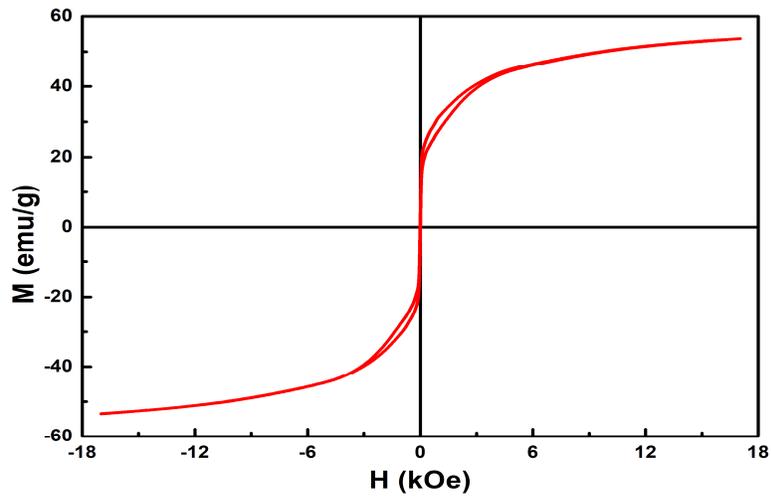


Fig. 5

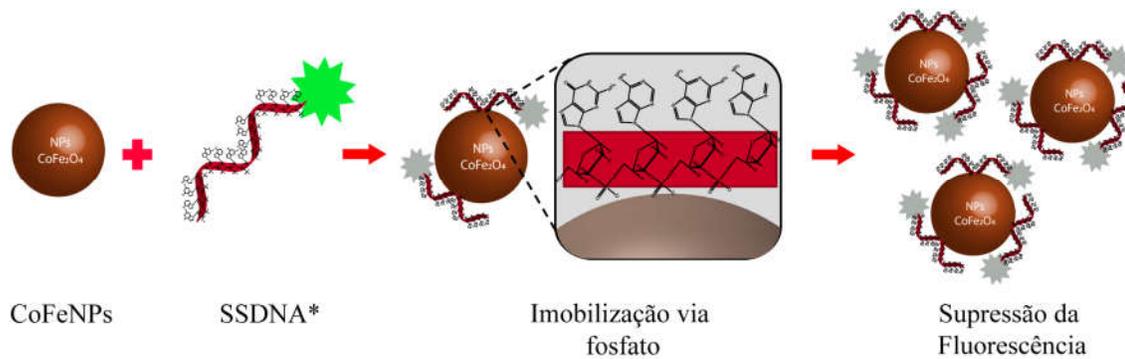


Fig. 6

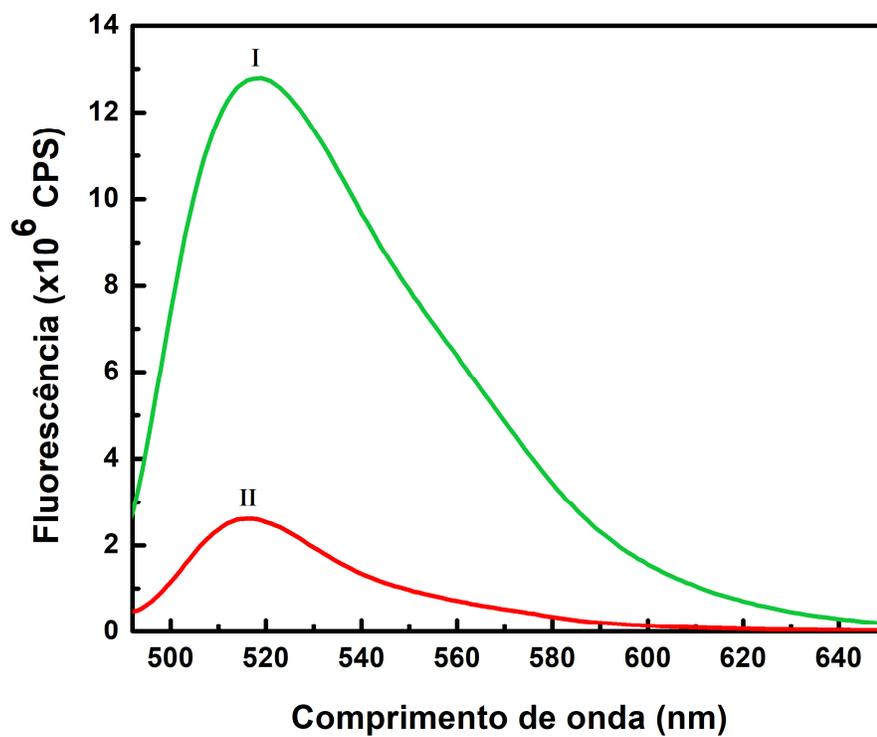


Fig. 7

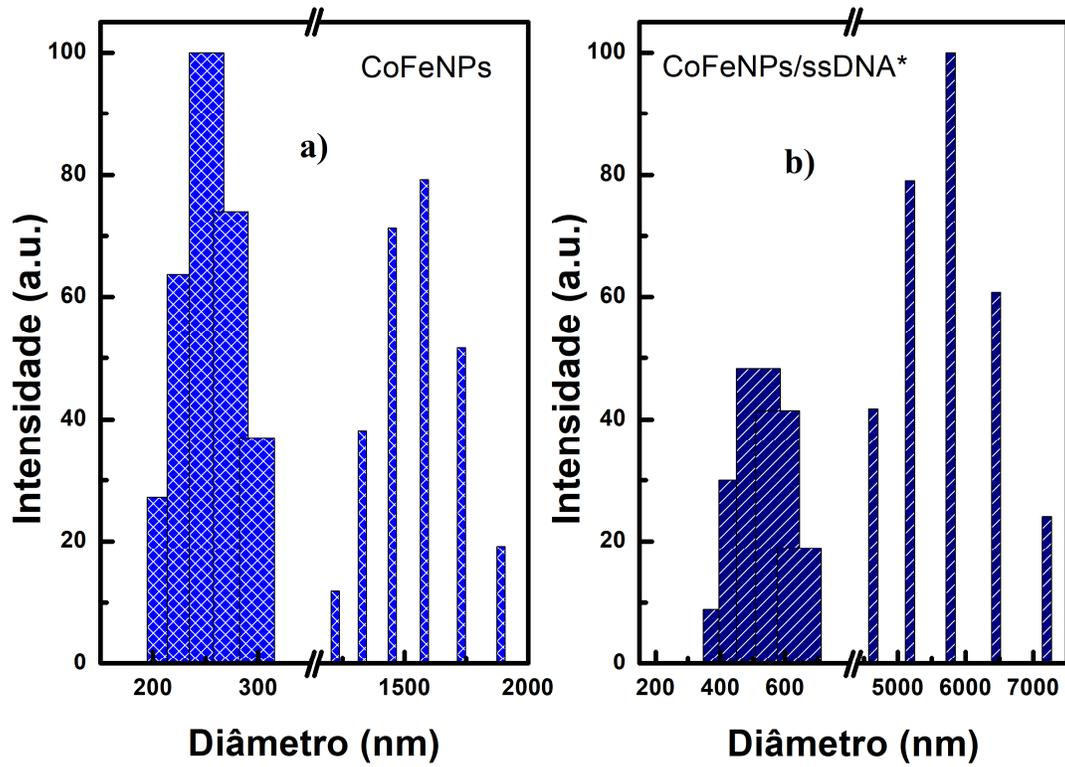


Fig. 8

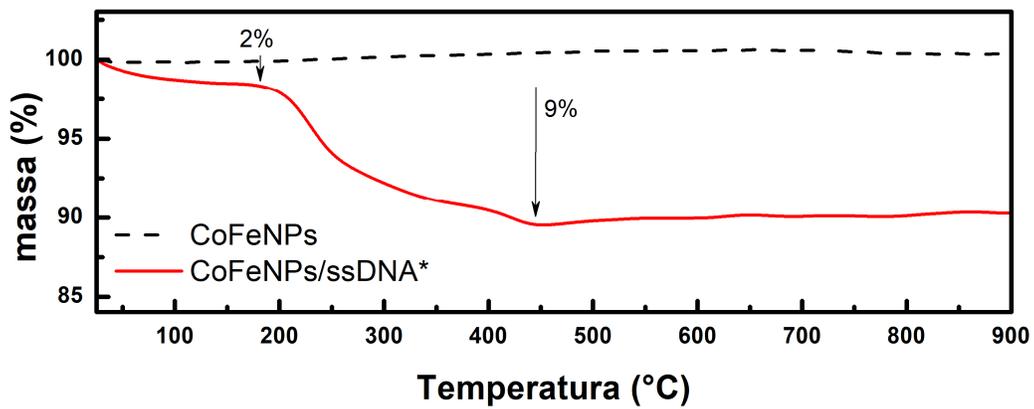


Fig. 9

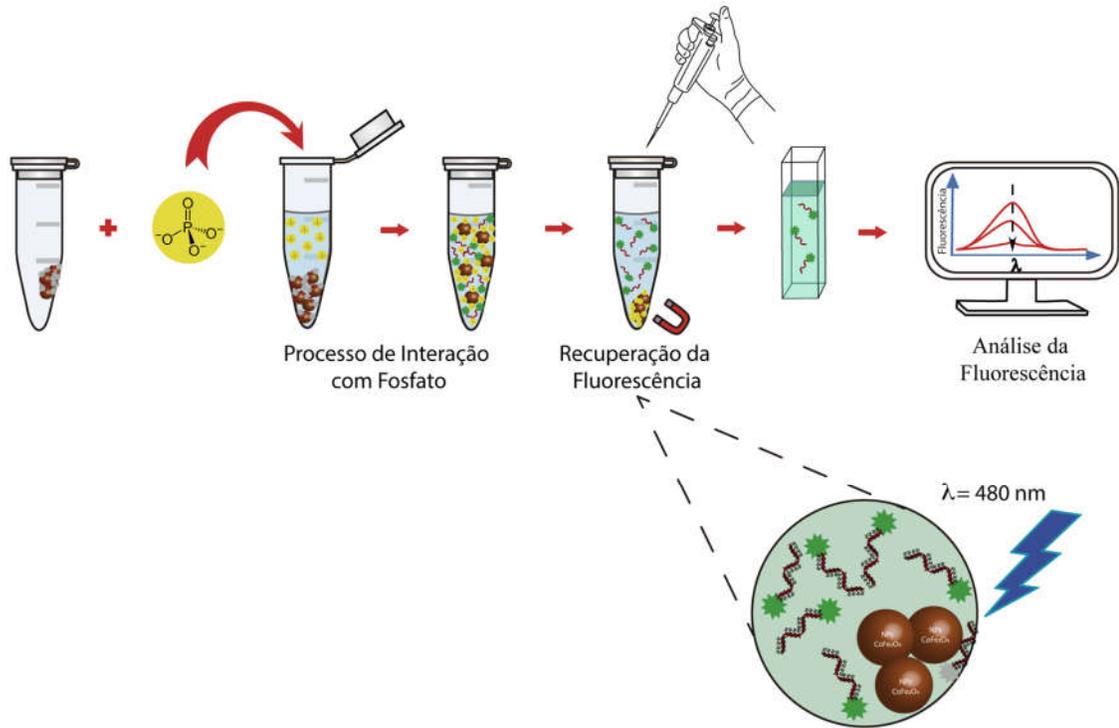


Fig. 10 = 480 nm

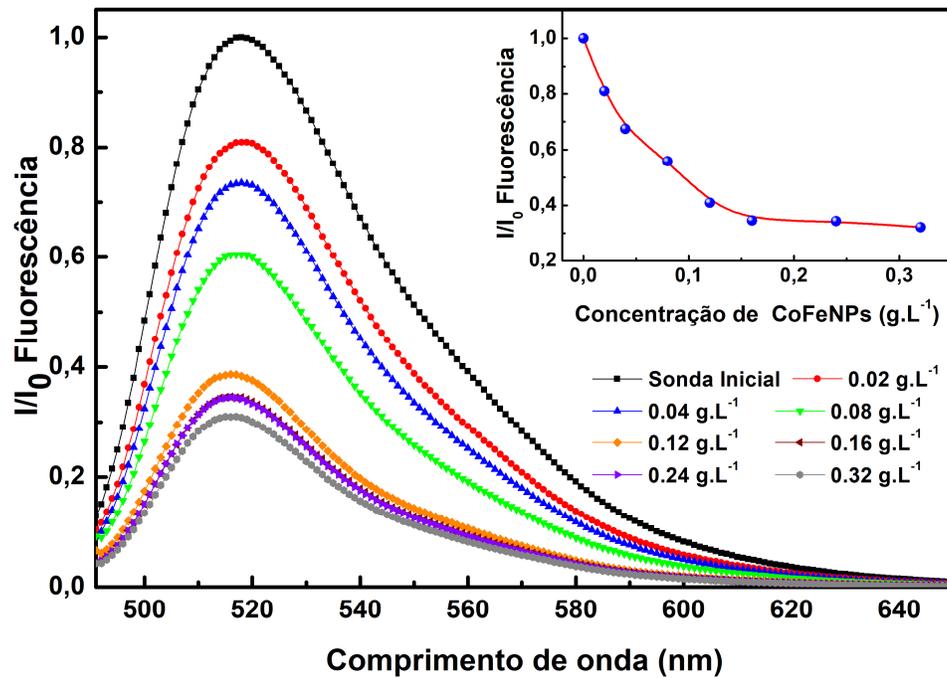


Fig. 11

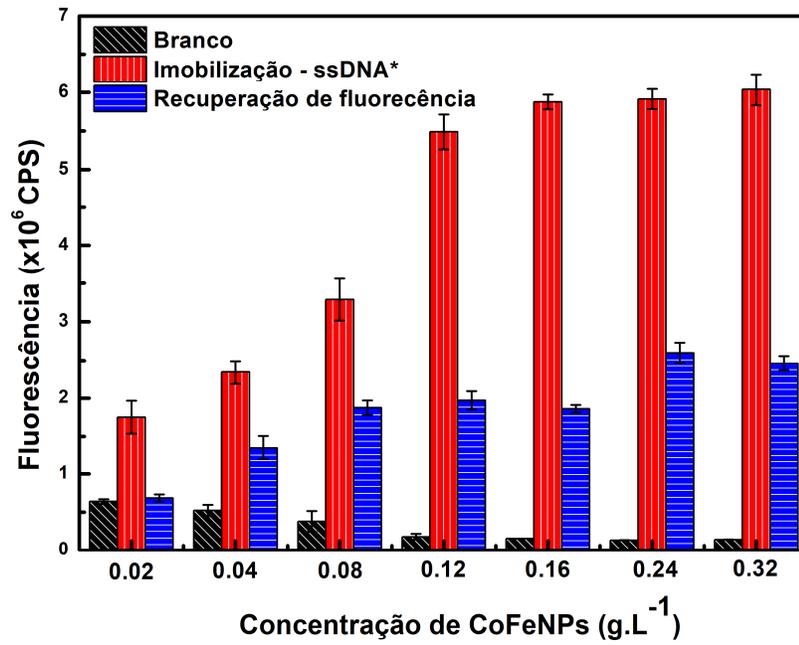


Fig.12

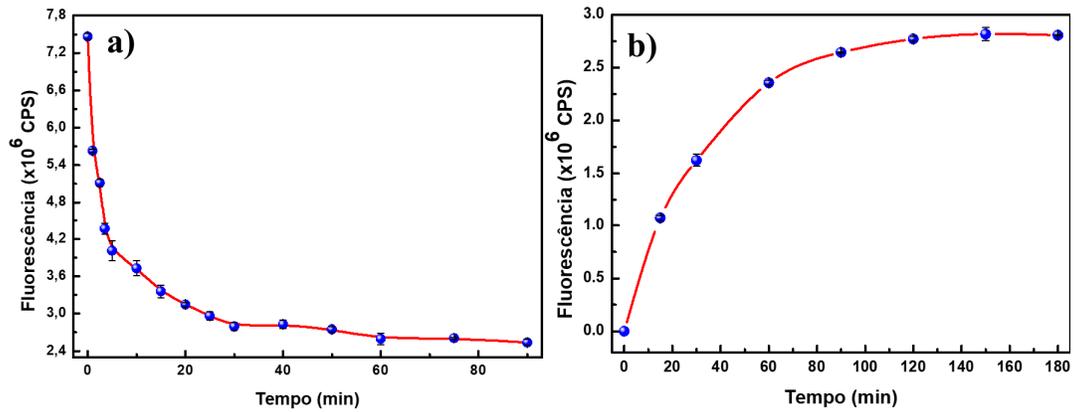


Fig. 13

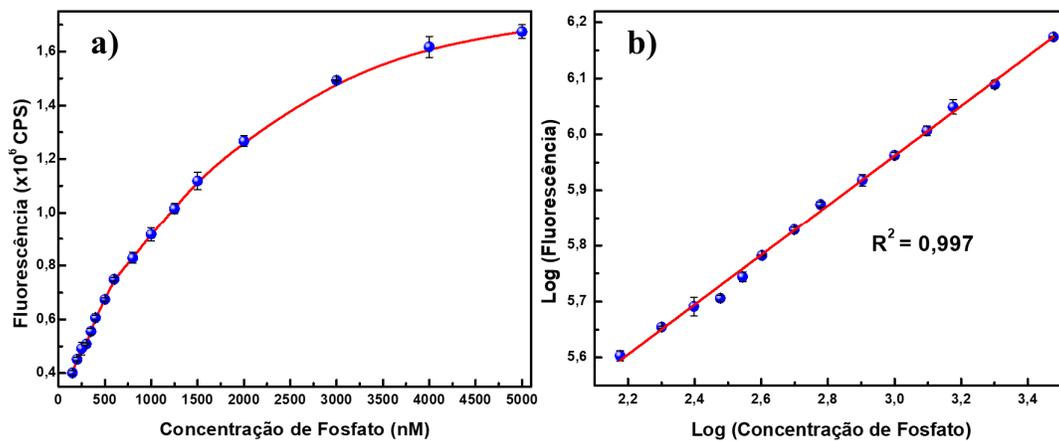


Fig. 14

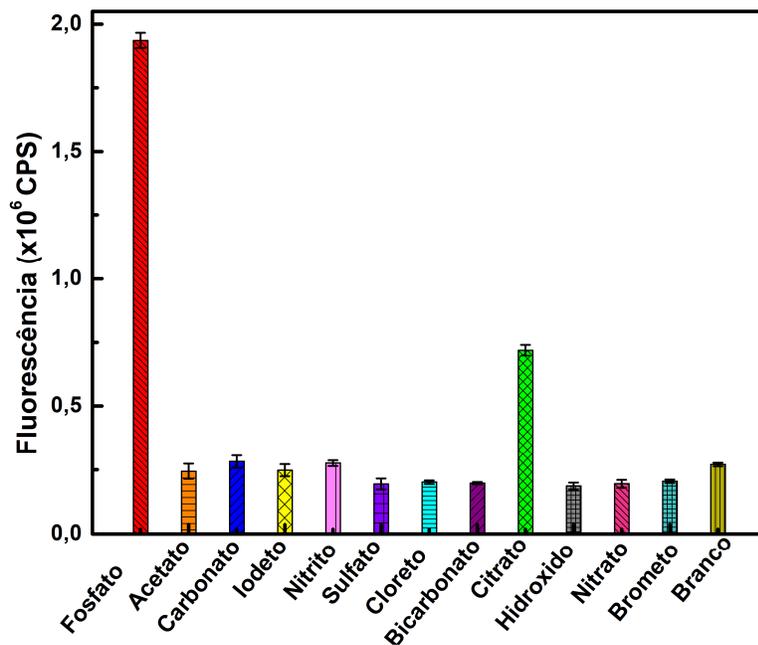


Fig. 15

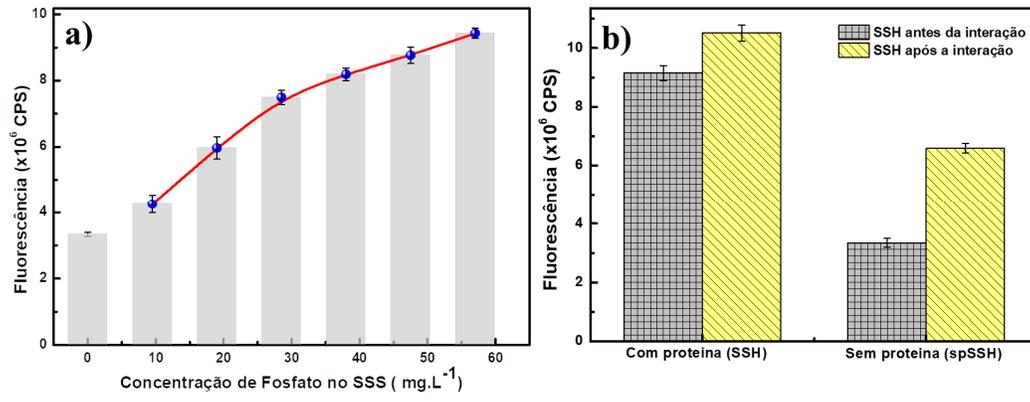


Fig. 16

**RESUMO****USO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO PARA A  
DETECÇÃO DE ÍONS FOSFATO EM MEIOS AQUOSOS E AMOSTRAS  
BIOLÓGICAS**

A presente invenção estende-se ao uso de nanopartículas de ferritas de cobalto (CoFeNPs) como uma plataforma simples e rápida para a detecção de íons fosfato em meios aquosos e em fluidos biológicos, para o monitoramento de efluentes e solos contaminados com agrotóxicos e fertilizantes fosfatados, muito utilizados na agricultura, e também para estimar os níveis de concentração de fosfatos em amostras biológicas (como sangue), que podem estar associados a vários problemas de saúde, como insuficiência renal, hipertensão, hiperfosfatemia, hipofosfatemia, problemas ósseos, insuficiência cardíaca e respiratória, dentre outras doenças, e a problemas ambientais. A presente metodologia é baseada na detecção de íons fosfato (por meio fluorescente, como resultado da troca dos oligonucleotídeos fluorescentes por íons fosfatos na superfície das CoFeNPs) e tem como objetivo permitir o desenvolvimento de protocolos simples, de alta sensibilidade, rápidos, e de baixo custo, para o sensoriamento de contaminantes ambientais e para o diagnóstico simplificado de níveis de fosfato em amostras de fluidos biológicos.