



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

**(21) PI 1101022-3 A2**



\* B R P I 1 1 0 1 0 2 2 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 29/03/2011  
(43) Data da Publicação: 28/05/2013  
(RPI 2212)

**(51) Int.Cl.:**  
C09K 11/77

**(54) Título:** MARCADORES LUMINESCENTES, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO, MÉTODO E KIT DE DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

**(73) Titular(es):** Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Universidade de São Paulo - USP, Universidade de São Paulo - USP, Universidade de São Paulo - USP, Universidade de São Paulo - USP

**(72) Inventor(es):** Ana Valeria Santos de Lourenço, Claudia Akemi Kodaira Goes, Ernesto Rezende Souza, Francisco José Oliveira Rios, Gabriela Cristina Tonini, Hermi Felinto de Brito, Luiz Antonio de Oliveira Nunes, Maria Claudia França da Cunha Felinto, Msgnus Ake Gidlund, Oscar Manoel Loureiro Malta, Roberval Stefani, Severino Alves Júnior

**(57) Resumo:** MARCADORES LUMINESCENTES, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO, MÉTODO E KIT DE DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS. A presente invenção pertence ao campo dos marcadores com propriedades luminescentes. Especificamente, o marcador da presente invenção é uma nanopartícula que compreende óxidos de terras raras ou partícula que compreende complexos de terra raras recobertos por um material de cobertura como por exemplo um organosilano. As nanopartículas recobertas possuem um grupo funcional que possibilita sua ligação com uma biomolécula. A presente invenção compreende ainda processos para preparação dos marcadores, bem como um método para detecção de biomoléculas e um kit compreendendo os marcadores luminescentes.

## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### **MARCADORES LUMINESCENTES, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO, MÉTODO E KIT DE DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

#### **Campo da Invenção**

5 A presente invenção pertence ao campo dos marcadores com propriedades luminescentes. Especificamente, o marcador da presente invenção é uma nanopartícula que compreende óxidos de terras raras ou partícula que compreende complexos de terra raras recobertos por um material de cobertura como por exemplo um organosilano. As nanopartículas recobertas possuem um  
10 grupo funcional que possibilita a sua ligação com uma biomolécula.

A presente invenção compreende ainda processos para preparação dos marcadores, bem como um método para detecção de biomoléculas e um kit compreendendo os marcadores luminescentes.

#### **Antecedentes da Invenção**

15 O uso de materiais inorgânicos vem se destacando desde a década de 90 como sondas luminescentes para fins de diagnóstico. Podemos destacar sua aplicação em laboratórios de análises clínicas, os quais utilizam marcadores luminescentes para quantificar ou diagnosticar determinadas patologias que utilizam reação antígeno-anticorpo. Contudo, os compostos freqüentemente  
20 utilizados em diagnósticos clínicos geralmente contêm os íons európio ( $\text{Eu}^{3+}$ ) e térbio ( $\text{Tb}^{3+}$ ), que emitem na região do ultravioleta (UV).

Os compostos com íons  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  são muito utilizados como sondas luminescentes devido ao seu longo tempo de vida e grande deslocamento de Stokes. Os longos tempos de vida permitem o uso de espectroscopia resolvida no  
25 tempo para separar temporalmente a luminescência do marcador em questão da luminescência do sistema biológico.

O desenvolvimento de metodologias de interesse biotecnológico está fundamentado na interação seletiva e/ou específica do conjugado “espécie biológica-composto de terra rara” com um componente do sistema biológico que  
30 se pretende analisar. O conjugado deve emitir luz quando exposto à radiação eletromagnética ou outro mecanismo de ativação. Estas metodologias analíticas

baseiam-se na medida/detecção da luminescência do composto de terra rara usado como marcador luminescente. Portanto, o diagnóstico é obtido pela medida da intensidade de luz emitida, que é proporcional à quantidade do conjugado “espécie biológica-composto de terra rara”.

5 Tais materiais inorgânicos podem ser divididos inicialmente em duas categorias:

i) sistemas nanoestruturados formados por matrizes de óxidos contendo íons terras raras ( $TR^{3+}$ );

10 ii) compostos que apresentam íons  $TR^{3+}$ , ligados a espécies orgânicas sintéticas (ligantes).

Ambas as categorias, quando funcionalizadas, apresentam grupos de conjugação específicos para permitir a interação do composto de terra rara à espécie biológica. Estes materiais são candidatos promissores ao desenvolvimento de técnicas biotecnológicas.  $Nd^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$  e  $Er^{3+}$  são íons  $TR^{3+}$  que  
15 apresentam luminescência no infravermelho próximo, e  $Sm^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$  e  $Tm^{3+}$  no ultravioleta visível.

A busca na literatura patentária apontou os documentos relevantes descritos a seguir.

20 O documento WO 07/110804 descreve métodos de diagnóstico que utiliza sondas que exibem o chamado efeito avalanche de fóton, de multiplicação da intensidade de sinal, na formação de imagens de tecido.

A presente invenção difere deste documento por utilizar metais de terras raras capazes de emitir na região do infravermelho próximo ou do ultravioleta visível, conjugados a biomoléculas, e não a sondas possuindo efeito avalanche.

25 O documento WO 07/149951 descrevem compostos luminescentes responsivos a luz infravermelha, capazes de gerarem espécies celulares e tissulares tóxicas se irradiados com determinado comprimento de luz.

A presente invenção difere deste documento por apresentar compostos luminescentes que não se degradam nem geram espécies tóxicas, mas sim  
30 compostos funcionalizados capazes de se ligar a biomoléculas, funcionando como marcadores luminescentes.

O documento US 5,891,656 descreve sondas capazes de detectar diversos

analitos biológicos, como por exemplo células e proteínas, onde as sondas são capazes de emitir radiação em um comprimento de onda menor que o comprimento de onda da radiação absorvida.

5 A presente invenção difere deste documento por apresentar sondas capazes de emitir radiação em um comprimento de onda maior que o comprimento de onda da radiação absorvida, que compreendem adicionalmente um revestimento capaz de promover a interação com biomoléculas.

10 Uma das grandes inovações que a presente invenção possibilita é a utilização de compostos que emitem na região do infravermelho e também na utilização de marcadores de terras raras que emitem no ultravioleta visível para identificação e/ou quantificação de patologias clínicas.

15 A técnica desenvolvida utilizando a região do infravermelho próximo para a realização dos ensaios biológicos apresenta um grande diferencial da técnica convencional, que utiliza a região do ultravioleta visível. Isso é explicado pelo fato da técnica desenvolvida não necessitar de espectroscopia resolvida no tempo para remoção da luminescência do sistema biológico, como nas técnicas mais empregadas nas análises por fluorescência. Além disso, em comparação com os marcadores orgânicos que emitem no ultravioleta visível os compostos de terras raras que emitem no ultravioleta visível apresentam tempo de vida mais longo que  
20 permite a leitura da luminescência após a fluorescência da parte biológica.

Devido a estas características inovadoras, torna-se viável a construção de equipamentos portáteis de análise clínica, com baixo consumo e que não utilizam radiação ultravioleta.

25 Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

30 Em um primeiro aspecto a presente invenção provê marcadores luminescentes compreendendo íons de terras raras capazes de se ligar a biomoléculas e que emitem radiação na região do infravermelho próximo ou ultravioleta visível.

É um objeto da presente invenção marcadores luminescentes compreendendo:

- a) um composto compreendendo pelo menos um metal de terras raras;
- 5 b) um material de funcionalização
- c) um espaçador.

Em uma realização preferencial, o marcador luminescente está ligado a uma biomolécula.

10 É um adicional objeto da presente invenção um processo de produção de marcadores luminescentes compreendendo a etapa de funcionalizar o-composto compreendendo um metal de terras raras com um material de revestimento.

Em um segundo aspecto, a presente invenção provê um método de detecção por infravermelho que não necessita de espectroscopia resolvida no tempo para remoção da luminescência do sistema biológico e um método de  
15 detecção por ultravioleta-visível.

É também um objeto da presente invenção, um método de preparo de marcadores luminescentes que compreende as etapas de:

- a) preparação da nanopartícula contendo o óxido de  $TR^{3+}$ , a partir da reação da solução de nitrato de  $TR^{3+}$  e glicina sob aquecimento;
- 20 b) funcionalização do material formado em a) ou do complexo de  $TR^{3+}$ .

O processo de produção pode compreender o uso de um agente espaçador.

25 É ainda um objeto da presente invenção, um método de detecção de biomoléculas que compreende as etapas de:

- a) contatar um material biológico com pelo menos um marcador luminescente;
- b) detectar e/ou quantificar a luminosidade gerada;

Especificamente, a biomolécula identificada pode ser de origem humana, 30 vegetal, animal, dentre outros tipos de biomoléculas possíveis bem como a combinação das mesmas.

É ainda um adicional objeto da presente invenção, um kit de identificação

de biomoléculas que compreende:

- a) meios para contatar um material biológico com um marcador luminescente ; e
- b) meios para detectar e/ou quantificar a luminosidade gerada.

5 Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

10 A Figura 1 mostra o espectro de luminescência na região do infravermelho próximo do material usado como marcador contendo  $\text{Nd}^{3+}$ . A figura inserida refere-se a curva de calibração do anticorpo anti-oxLDL. **(A)** e **(a)** são a intensidade (u.a.), **(B)** é o comprimento de onda (nm), **(b)** é a concentração ( $\text{mg/mL} \times 10^{-4}$ ), **(c)** é a medida da contagem dos poços e **(d)** é o ajuste linear.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

15 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.

A presente invenção descreve a utilização de materiais inorgânicos, que a partir da absorção de energia com adequado comprimento de onda emite 20 luminescência na região do infravermelho próximo ou ultravioleta visível, em métodos analíticos. Tais métodos têm como base a reação antígeno-anticorpo.

A presente invenção foi desenvolvida com o objetivo de estabelecer uma técnica inovadora de detecção de biocompostos no diagnóstico qualitativo e quantitativo de patologias humanas e animais, a partir de soro.

25 A técnica quando fundamentada no uso de marcadores luminescentes que emitem na região do infravermelho próximo apresenta as seguintes vantagens:

- i) não necessita de espectroscopia resolvida no tempo para remoção da luminescência do sistema biológico, como nas técnicas mais empregadas nas 30 análises por fluorescência,
- ii) utiliza fontes de excitação compactas (laser de diodos, LEDs e

etc.), que apresentam melhor rendimento além de serem duradouras e apresentar baixo custo,

iii) não utilizam alta-tensão como as lâmpadas de xenônio, utilizadas convencionalmente.

5           Devido a estas características inovadoras, torna-se viável a construção de equipamentos portáteis de análise clínica, com baixo consumo.

#### Marcadores Luminescentes

Os marcadores luminescentes da presente invenção compreendem:

- 10           a) um composto compreendendo pelo menos um metal de terras raras;
- b) um material de funcionalização; e
- c) um espaçador

15           O metal de terra rara adequado é escolhido do grupo que compreende escândio, ítrio, e os lantanídeos. Preferencialmente os metais de terras raras úteis na presente invenção são capazes de absorver energia com adequado comprimento de onda e emitir luminescência na região do infravermelho próximo ou ultravioleta visível, facilitando seu uso em métodos analíticos.

20           O composto é preferencialmente  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$  e  $\text{Er}^{3+}$  os quais são íons  $\text{TR}^{3+}$  que apresentam luminescência no infravermelho próximo e  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  e  $\text{Tm}^{3+}$  no ultravioleta visível.

25           O material de funcionalização adequado para uso na presente invenção tem a função de revestir as partículas, preservando as propriedades ópticas das nanopartículas e fornecendo grupos biologicamente funcionais para sua conjugação. Exemplos de materiais adequados incluem, sem limitações, organosilanos como APTMS (aminopropiltrimetoxissilano) e APTES (aminopropiltriethoxissilano).

Os espaçadores são compostos que tem a função de aumentar a eficiência de ligação do marcador luminescente com a biomolécula. Como exemplos de espaçadores podem ser utilizados compostos como glutaraldeído.

30           Os marcadores luminescentes funcionalizados da presente invenção podem conjugar com biomoléculas. Exemplos de biomoléculas adequadas incluem, sem limitações, imunoglobulinas (incluindo os genes constantes das

imunoglobulinas kapa, lambda, alfa, gama (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta épsilon e mu assim como os genes das regiões variáveis), polinucleotídeos sintéticos e/ou naturais, incluindo seqüências de DNA e/ou RNA capazes de se hibridizarem com outras seqüências polinucleotídicas, streptavidinas, proteína A, hormônios polipeptídeos, ligantes de receptores (ex. esteroides ou hormônios polipeptídeos), antígenos selecionados dentre polipeptídicos, carboidratos, ácidos nucléicos, haptenos, epítomos, dentre outros. Estas biomoléculas podem tanto atuar como elementos identificadores da biomolécula-alvo como serem as próprias biomoléculas-alvo.

10 A relação entre os conjugados e os marcadores luminescentes é variada. É prevista a possibilidade de um conjugado possuir um ou mais marcadores luminescentes ligados bem como um marcador luminescente possuir um ou mais conjugados ligados.

A ligação entre os marcadores e os conjugados pode ser feita através de 15 ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ligações iônicas, interações eletrostáticas.

#### Processo de Preparo

O processo de preparo do marcador luminescente compreende as etapas de:

20 a) preparação do óxido contendo a terra rara, a partir da reação da solução de nitrato de  $TR^{3+}$  e glicina, sob aquecimento. Posteriormente, o material obtido é calcinado para eliminar resíduos de material orgânico ;

b) funcionalização do material obtido em a) ou do complexo de terra rara.

25 Opcionalmente, a solução aquosa do nitrato de terra rara pode compreender 2 elementos terras raras. Na presente invenção, a referida solução aquosa compreende  $Y^{3+}$  e  $Nd^{3+}$ .

A calcinação é realizada à temperaturas entre 100 e 1000 °C durante um período de tempo que varia de 1 a 20 h. Especificamente, na presente invenção, 30 a calcinação é realizada a 600 °C por 10 h.

A funcionalização do marcador consiste no revestimento da mesma com moléculas do grupo dos organosilanos tais como APTMS

(aminopropiltrimetoxisilano) e APTES (aminopropiltriétoxisilano) e pode ser realizado através de métodos convencionais descritos no estado da técnica como o método das microondas ou o método Stöber. Especificamente, o organosilano utilizado na presente invenção é o APTMS e o método utilizado é o método das microondas.

O processo de revestimento do marcador com o organosilano compreende a etapa de imergir a partícula do marcador em uma solução aquosa do organosilano por tempo adequado. Especificamente, na presente invenção a concentração do organosilano utilizado é 0,1 mL de organosilano/mg de material a ser funcionalizado.

Além disso, a etapa de funcionalização do composto de terras raras com o material de revestimento pode ser realizada através de quaisquer outros métodos conhecidos do estado da técnica, como síntese química, derivatização etc.

#### Método e Kit de detecção de biomoléculas

O método para detecção de biomoléculas da presente invenção compreende:

- a) contatar um material biológico com um marcador luminescente;
- b) detectar e/ou quantificar a luminosidade gerada;

Para efeitos dessa invenção, a expressão “material biológico” deve ser entendida como englobando qualquer material oriundo de um ser vivo que possa ser identificado pelo marcador da presente invenção.

Exemplos de material biológico para uso na presente invenção inclui, sem limitações, células, tecidos, proteínas, polinucleotídeos, os quais podem estar presentes em fluidos corporais como sangue, plasma, soro, urina, suor, saliva, etc.

O kit de identificação de biomoléculas da presente invenção que compreende:

- a) meios para contatar um material biológico com um marcador luminescente ; e
- b) meios para detectar e/ou quantificar a luminosidade gerada.

Em uma realização preferencial, os meios para contactar incluem placas

contendo poços, como as placas conhecidamente para os ensaios de ELISA, e os meios para detectar compreendem fontes de excitação compactas (laser de diodos, LEDs e etc.), que apresentam melhor rendimento.

### **Exemplo 1. Método de preparo da nanopartícula luminescente**

5 O processo de obtenção dos marcadores luminescentes consiste primeiramente na funcionalização dos compostos contendo os íons terras raras, utilizando as microondas e o método Stöber, dependendo do composto a ser preparado. Para a preparação utilizando as microondas, o material inorgânico deve ser insolúvel no organosilano, apresentar uma alta estabilidade térmica e  
10 não degradar com a radiação microondas.

#### *Exemplo 1.1. Processo de preparo das nanopartículas luminescentes*

Para o preparo destas nanopartículas, misturou-se em uma cápsula de porcelana a solução aquosa de nitrato de ítrio dopado com a terra rara ( $Y^{3+}:Nd^{3+}$ ) e glicina na relação estequiométrica (1:1,7). A cápsula foi aquecida em placa de  
15 aquecimento em temperatura de  $\sim 300$  °C. Quando todo o solvente foi eliminado, a ignição ocorreu. A reação foi rápida, gerando o produto final, que foi calcinado em mufla a 600 °C durante 10 h para decomposição de todo material orgânico e de nitrato que ainda pudessem estar presentes no composto sólido.

#### *Exemplo 1.2. Processo de funcionalização compreendendo o uso de microondas*

20 Para ambas as preparações, o reagente da família dos organosilanos é utilizado para promover a funcionalização dos compostos. Para a reação utilizando-se as microondas, mistura-se o composto com o organosilano. A mistura torna-se uma dispersão com a combinação de banho de ultrassom e aquecimento em microondas até que forme uma pasta sólida. Após a reação, as  
25 partículas resultantes são lavadas com água destilada e secas.

#### *Exemplo 1.3. Processo de funcionalização compreendendo o método de Stöber*

O método Stöber consistiu na co-dissolução do composto contendo o íon terra rara e TEOS em etanol. Solução de amônia foi adicionada e deixada sob agitação durante uma noite. O resíduo foi lavado com etanol e re-disperso em  
30 etanol. Adicionou-se organosilano e agitou-se a solução. As partículas foram lavadas com etanol e água e posteriormente, secas.

## **Exemplo 2. Determinação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em soro humano**

Para fins exclusivos de ilustração do funcionamento da invenção, apresenta-se a seguir um caso particular onde é a validade de forma quantitativa a determinação do LDL (*low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade), através do espectro de emissão no infravermelho próximo das nanopartículas de  $Y_2O_3:Nd^{3+}$  (Figura 1).

Vale salientar que estas nanopartículas foram protegidas com um organossilano, que tem a função de revestir as partículas, preservando as propriedades ópticas das nanopartículas e fornecendo grupos biologicamente funcionais para sua conjugação.

A LDL (*low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade) é constituída principalmente por lipídios, vitaminas lipossolúveis e uma parte protéica, a apolipoproteína B-100 (apoB-100). Trata-se de uma partícula esférica com um diâmetro entre 180 a 280 Å e densidade entre 1,019 a 1,063 g.mL<sup>-1</sup>. A partícula de LDL contém cerca de 2700 moléculas de ácidos graxos, onde a maior parte é poliinsaturada com predominância de ácido linoléico e ácido araquidônico. A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma, sendo responsável pelo transporte de colesterol para células em processo ativo de divisão, na síntese de membrana ou por tecidos que utilizam colesterol na síntese de hormônios esteróides ou sais biliares.

Nos últimos anos, surgiram evidências sugerindo que a modificação oxidativa dos componentes lipídicos e apoB-100 da LDL poderiam ser as causas iniciais das estrias gordurosas. Conseqüentemente, estas modificações vão alterar as funções fisiológicas desta lipoproteína, além de contribuir para a instalação do processo inflamatório e formação de células espumosas. Portanto, a oxidação da LDL pode ser um dos eventos essenciais para o desenvolvimento da aterosclerose. O processo oxidativo tem-se mostrado presente em doenças inflamatórias tanto agudas quanto crônicas.

*Exemplo 2.1. Detecção da luminescência gerada na faixa do infravermelho próximo.*

Para a detecção da luminescência dos anticorpos marcados, uma

suspensão da partícula contendo a TR funcionalizada com o espaçador glutaraldeído (que tem a função de tornar mais eficiente a ligação do marcador com a biomolécula) foi incubada com o anticorpo anti-oxLDL em diferentes concentrações (variando de  $2,5 \cdot 10^{-4}$  a  $2,5 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$ ) por uma noite. As  
5 partículas contendo o anticorpo foram lavadas 4 vezes com PBS (Phosphate Buffered Saline) para remover o anticorpo em excesso.

Para a realização do ensaio bioanalítico, a placa de 96 poços foi sensibilizada com antígeno oxLDL (concentração  $7,5 \mu\text{g/mL}$ ) e incubada por uma noite. Lavou-se a placa 4 vezes com solução tampão PBS. Os sítios de ligação  
10 remanescentes foram bloqueados com a adição de proteína láctea ou gelatina por 2 horas à temperatura ambiente. Lavou-se a placa 4 vezes com tampão PBS.

A próxima etapa consistiu na adição do anticorpo marcado com a terra rara: as partículas incubadas com o anticorpo foram transferidas para a placa de imunoenensaio sensibilizada anteriormente. A placa permaneceu em repouso por 2  
15 horas à temperatura ambiente e posteriormente foi lavada 4 vezes com solução-tampão de PBS. A leitura foi realizada no contador Victor. Os resultados foram expressos como valores médios obtidos de dosagens realizadas. Poços controles foram incluídos.

Neste caso, há várias possibilidades de detecção e processamento da  
20 luminescência, como aquisição do espectro de emissão na região de interesse, medida da intensidade da luz emitida em comprimento de onda adequado, obtenção da luminescência correspondente à área da banda ou pico de emissão, tratamento estatístico dos dados coletados, geração de imagens histoquímicas luminescentes, entre outras.

25 Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

#### MARCADORES LUMINESCENTES, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO, MÉTODO E KIT DE DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

1. Marcadores luminescentes caracterizados por compreenderem íons terras raras apresentando a propriedade de se ligarem a biomoléculas e emitirem radiação na região do infravermelho próximo ou do ultravioleta visível.
2. Marcadores, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por compreenderem:
  - a) um composto compreendendo pelo menos um metal de terras raras;
  - b) pelo menos um material de funcionalização; e
  - c) um espaçador.
3. Marcadores, de acordo com a reivindicação 2, caracterizados pelo metal de terras raras ser escolhido do grupo que compreende  $Y^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Er^{3+}$ ,  $Sm^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$  e  $Tm^{3+}$ .
4. Marcadores, de acordo com a reivindicação 3, caracterizados por compreender dois metais de terras raras, o  $Nd^{3+}$  e o  $Y^{3+}$ .
5. Marcadores, de acordo com a reivindicação 2, caracterizados pelo material de funcionalização ser escolhido do grupo que compreende organossilanos como o APTMS (aminopropiltrimetoxissilano) ou APTES (aminopropiltriethoxissilano..)
6. Marcadores, de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo material de funcionalização ser o APTMS.
7. Marcadores, de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pelo espaçador ser o glutaraldeído.
8. Marcadores, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por opcionalmente estar conjugado com uma biomolécula escolhida do grupo que compreende, imunoglobulinas polinucleotídeos sintéticos e/ou naturais, streptavidinas, proteína A, hormônios polipeptídeos, ligantes de receptores carboidratos, ácidos nucleicos, haptenos, epítopos, e combinação dos mesmos.
9. Marcadores, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelas imunoglobulinas serem selecionadas do grupo que compreende os genes

constantes das imunoglobulinas kapa, lambda, alfa, gama (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon, mu e os genes das regiões variáveis.

10. Marcadores, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela biomolécula ser um anticorpo que reconhece a LDL humana.

5 11. Marcadores, de acordo com a reivindicação 2 caracterizado por se ligar diretamente à biomolécula-alvo.

12. Processo de preparo de marcadores luminescentes caracterizado por compreender as etapas de:

10 a) preparação do óxido contendo a terra rara, a partir da reação da solução de nitrato de  $TR^{3+}$  e glicina, sob aquecimento.;

b) calcinação do material obtido em a); e;

c) funcionalização do material obtido em b) ou do complexo de terra rara.

15 13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela solução do nitrato de terra rara compreender pelo menos um elemento terras raras escolhido do grupo que compreende  $Nd^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Er^{3+}$ ,  $Sm^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$  e  $Tm^{3+}$

14. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela temperatura de aquecimento ser 300 °C.

20 15. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela calcinação ser realizada a temperaturas entre 100 e 1000 °C e por um período de tempo entre 1 e 20h.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pela temperatura ser 600 °C e o tempo ser 10 h.

25 17. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela etapa de funcionalização ser realizada através dos métodos das microondas ou pelo método de Stöber.

30 18. Processo, de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pela etapa de funcionalização compreender o uso de uma solução que compreende APTMS (aminopropiltrimetoxisilano) ou APTES (aminopropiltriétoxissilano).

19. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela etapa de funcionalização opcionalmente ocorrer por métodos conhecidos do estado da

técnica tais como síntese química, derivatização química bem como a combinação dos mesmos.

20. Método de identificação de biomoléculas caracterizado por compreender as etapas de:

5 a) contactar um material biológico com pelo menos um marcador luminescente;

b) detectar e/ou quantificar a luminosidade gerada;

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo material biológico ser um material oriundo de um ser vivo.

10 22. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo marcador luminescente compreender pelo menos um elemento terra rara escolhido do grupo que compreende  $Y^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Er^{3+}$ ,  $Sm^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$  e  $Tm^{3+}$

15 23. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo marcador luminescente compreender  $Nd^{3+}$  e  $Y^{3+}$ .

24. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pela detecção e/ou quantificação da luminosidade gerada ocorrer na faixa do infravermelho próximo ou do ultravioleta visível.

25. Kit de detecção de biomoléculas caracterizado por compreender:

20 a) meios para contactar um material biológico com um marcador luminescente ; e

b) meios para detectar e/ou quantificar a luminosidade gerada.

25 26. Kit, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo marcador luminescente ser um marcador funcionalizado compreendendo pelo menos um elemento terra rara.

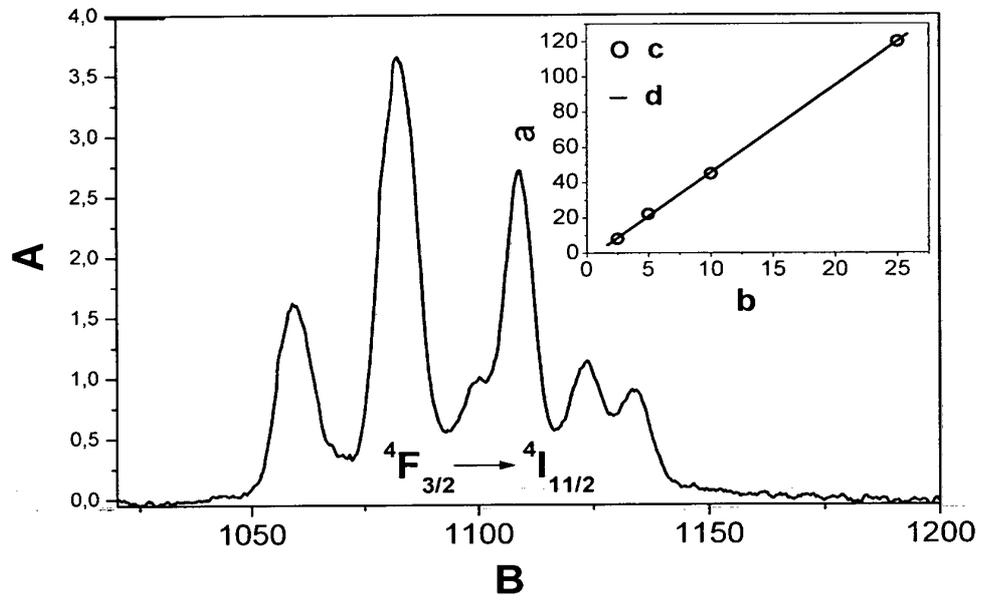
27. Kit, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo marcador luminescente compreender  $Nd^{3+}$  e  $Yb^{3+}$ .

28. Kit, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo meio para contactar o material biológico incluir placas contendo uma pluralidade de poços.

30 29. Kit, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelos meios para detectar a luminosidade gerada serem seleccionados dentre laser de diodos, LEDs e combinação dos mesmos.

30. Kit, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelos meios para detectar a luminescência gerada compreenderem meios para detectar a luminosidade na região do infravermelho próximo ou do ultravioleta visível.

Figura 1



### **Resumo**

## **MARCADORES LUMINESCENTES, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO, MÉTODO E KIT DE DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

5           A presente invenção pertence ao campo dos marcadores com  
propriedades luminescentes. Especificamente, o marcador da presente invenção  
é uma nanopartícula que compreende óxidos de terras raras ou partícula que  
compreende complexos de terra raras recobertos por um material de cobertura  
como por exemplo um organosilano. As nanopartículas recobertas possuem um  
10 grupo funcional que possibilita sua ligação com uma biomolécula.

A presente invenção compreende ainda processos para preparação dos  
marcadores, bem como um método para detecção de biomoléculas e um kit  
compreendendo os marcadores luminescentes.