



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS**

**BRUNA GOMES MACIEL**

**NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS**  
**MAGNETITA/QUITOSANA/POLIANILINA E SEU USO NA**  
**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA**

**Recife**

**2017**

**BRUNA GOMES MACIEL**

**NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS  
MAGNETITA/QUITOSANA/POLIANILINA E SEU USO NA  
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

**Orientador:** Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

**Co-orientador interno:** Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago Falcão

**Co-orientador externo:** Profa. Dra. Alicia Elizabeth Chávez Guajardo

**Recife**

**2017**

Catálogo na fonte  
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB 4-1758

M152n Maciel, Bruna Gomes.  
Nanocompósitos magnéticos magnetita/quitosana/polianilina e seu uso na extração e purificação de DNA. / Bruna Gomes Maciel . – 2017.  
94 f.: fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de materiais, Recife, 2017.  
Inclui referências.

1. Ciência de materiais. 2. Polímeros . 3. Nanotecnologia. I. Melo, Celso Pinto de. (Orientador). II. Título.

620.11      CDD (22. ed.)      UFPE-FQ 2017-27

BRUNA GOMES MACIEL

**NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS MAGNETITA/QUITOSANA/POLIANILINA E  
SEU USO NA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 13/03/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Goreti Carvalho Pereira (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por guiar minha caminhada e me proporcionar força para permanecer.

Aos meus pais (Edilene Gomes e Noé Ferreira) e a minha irmã Maria Eduarda, por todo apoio, paciência e amor dedicado a mim, principalmente nesta nova etapa de saída e retorno para casa.

A todos os meus familiares, que sempre me incentivaram a continuar esta caminhada. Em memória ao meu tio Reginaldo e a minha avó Maria, que sempre estarão comigo.

Ao professor Celso, pela paciência e orientação.

Ao prof. Valdir, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) pelas coletas realizadas no Laboratório de Genética.

Ao prof. Alexandre Ricalde, do Departamento de Física (DF) por realizar as medidas magnéticas das nossas amostras.

A Davian pela ajuda com os difratogramas.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

As pessoas que compõem o grupo de Polímeros Não Convencionais (PNC): Graciela, Filipe, Yuri, Sandro, Edson, Winnie, Rubênia, em especial a Alícia, Juan, Jarib, Romário que contribuíram bastante na construção deste trabalho.

Ao meu namorado Romário pelas discussões, ajuda e alguns desenhos contidos neste trabalho.

Aos meus amigos Evanily, Ingrid, Wladson, Jacqueline.

Ao Ministério da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco pela bolsa concedida no início do mestrado.

A Capes pela concessão da bolsa para a continuação deste trabalho.

## RESUMO

Descrevemos neste trabalho a preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro/quitosana (NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$ ) por co-precipitação química, e sua funcionalização com polianilina por polimerização em emulsão do monômero anilina, do que resulta o nanocompósito híbrido composto por óxido de ferro, quitosana e polianilina (NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$ ). As NPMs e o NCM foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), medidas magnéticas, espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV). Ainda, através dos métodos de Brunauer-Emmett-Teller (BET) e Barrett-Joyner-Halenda (BJH) obtivemos uma estimativa da área superficial, tamanho e volume dos poros. As NPMs e o NCM possuem tamanho médio de 12 nm e 20 nm, respectivamente; ambos apresentam comportamento superparamagnético com magnetização de saturação ( $M_s$ ) de 42 emu/g para as nanopartículas e de 22 emu/g para o nanocompósito. Após o estudo das propriedades físicas e químicas destes materiais, prosseguimos a investigação para aplicação do NCM como adsorvente de fase sólida para extração de ácido desoxirribonucléico (DNA). Inicialmente usamos como sistema modelo soluções de DNA de esperma de salmão em meio aquoso, e utilizamos a espectroscopia na região do UV-VIS, correspondente ao comprimento de onda do pico de absorção característico do DNA ( $\lambda = 260$  nm) para determinar a concentração da solução de DNA antes e após a interação com o nanocompósito. Ao realizar experimentos de adsorção no modo de batelada, obtivemos que a capacidade de adsorção do NCM é de 49,5 mg/g após 60 minutos de interação, mas quando este processo é realizado no vortex, há um aumento na capacidade que atinge o máximo de 90,5 mg/g em 10 minutos com porcentagem de adsorção de 61%. Além do processo de adsorção, conseguimos realizar a dessorção (liberação) de uma quantidade significativa (66%) do DNA capturado, apenas por alteração do pH. Diante dos resultados obtidos, decidimos posteriormente aplicar o NCM para extração de DNA total a partir de sangue humano, analisando a interação por espectroscopia UV-VIS, eletroforese e reação em cadeia da polimerase (PCR) com bons resultados.

**Palavras-chave:** Magnetita. Quitosana. Polianilina. Nanocompósito magnético híbrido. Extração de DNA.

## ABSTRACT

In this work, we describe the preparation of magnetic nanoparticles of iron oxide/chitosan (Chitosan@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>MNPs) by chemical co-precipitation, and their functionalization with polyaniline by emulsion polymerization of the aniline monomer, resulting in a hybrid polyaniline, chitosan and iron oxide nanocomposite (Pani@Chi@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>MNC). The MNPs and MNC were characterized by X-ray diffraction (XRD), magnetic measurements, ultraviolet-visible absorption spectroscopy (UV-VIS), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (MEV). In addition, through the methods of Brunauer-Emmett-Teller (BET) and Barrett-Joyner-Halenda (BJH), we have obtained an estimate of surface area, size and volume of pores. The MNPs and MNC have an average size of 12 nm and 20 nm, respectively, and both exhibit superparamagnetic behavior with a saturation magnetization (Ms) of 42 emu/g [22 emu/g] for the nanoparticles [nanocomposite]. After establishing the most relevant physical-chemical properties of these materials, we applied the MNC as a solid phase adsorbent for the extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) molecules. Initially, we used salmon sperm DNA in aqueous media as a model system, and the characteristic absorption peak of the DNA ( $\lambda = 260$  nm) was measured to determine the variation in the DNA concentration of the solution as a result of the interaction with the nanocomposite. When adsorption experiments were carried out in the batch mode, the adsorption capacity of the MNC was 49.5 mg/g after 60 minutes of interaction, but when this process is performed in the vortex, the capacity increase, reaching a maximum of 90.5 mg/g in 10 minutes with percentage of adsorption of 61%. In addition, we have shown that a significant amount (66%) of the captured DNA can be desorbed by a simple change in the pH of the solution. These results have stimulated us to apply the MNC for the DNA extraction from human blood samples. The retrieved nucleic acid exhibited good quality as determined UV-Vis spectroscopy, electrophoresis and polymerase chain reaction (PCR) investigations.

**Keywords:** Magnetite. Chitosan. Polyaniline. Magnetic hybrid nanocomposite. DNA extraction.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Estrutura cristalina da magnetita (a) e maghemita (b). Adaptado da Ref. [26]. ...	17
<b>Figura 2.2.</b> Estrutura química da celulose e da quitosana. ....	19
<b>Figura 2.3.</b> Diferença de solubilidade da quitosana em meio ácido (solúvel) e em meio básico (insolúvel). ....	20
<b>Figura 2.4.</b> Representação esquemática da distribuição das bandas de valência e de condução para metais, semicondutores e isolantes. ....	23
<b>Figura 2.5.</b> Esquema de como ocorrem os defeitos estruturais (pólaron e bipólaron) na polianilina. ....	24
<b>Figura 2.6.</b> Síntese da anilina através do processo de nitração. ....	25
<b>Figura 2.7.</b> Mecanismo da polianilina através da síntese química. ....	25
<b>Figura 2.8.</b> Estrutura química geral da polianilina. ....	26
<b>Figura 2.9.</b> Estrutura dos nucleotídeos. ....	28
<b>Figura 2.10.</b> Estrutura química da desoxirribose e ribose. ....	28
<b>Figura 2.11.</b> Bases nitrogenadas púricas e pirimídicas. ....	29
<b>Figura 2.12.</b> Representação da cadeia dupla hélice do DNA e da estrutura química dos nucleotídeos com ligação de hidrogênio. Adaptado da Ref. [73]. ....	30
<b>Figura 2.13.</b> Representação do processo de adsorção. ....	31
<b>Figura 3.1.</b> Difração de raios X em planos atômicos. ....	38
<b>Figura 3.2.</b> Espectro eletromagnético. ....	40
<b>Figura 3.3.</b> Representação do processo de absorção da radiação eletromagnética. ....	40
<b>Figura 3.4.</b> Possíveis transições eletrônicas. ....	41
<b>Figura 3.5.</b> Representação das possíveis deformações axiais ou angulares que pode acontecer em uma molécula. ....	43
<b>Figura 3.6.</b> Magnetômetro de amostra vibrante. ....	45
<b>Figura 3.7.</b> Curva de magnetização. ....	45
<b>Figura 3.8.</b> Cuba de eletroforese de configuração horizontal (a) e acessórios (b). ....	47
<b>Figura 3.9.</b> Reação em cadeia da polimerase. ....	49
<b>Figura 3.10.</b> Amplificação da sequência de DNA alvo. ....	49
<b>Figura 4.1.</b> Síntese das nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana. ....	52
<b>Figura 4.2.</b> Polimerização das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana. ....	53
<b>Figura 4.3.</b> Representação do experimento de dessorção do DNA. ....	55
<b>Figura 4.4.</b> Esquema do experimento para investigação dos parâmetros do processo de adsorção. ....	56
<b>Figura 4.5.</b> Procedimento para extração de DNA de uma amostra complexa (sangue humano). ....	57
<b>Figura 4.6.</b> Poços onde ocorre a reação de PCR. ....	59
<b>Figura 4.7.</b> Estágios de temperatura da reação em cadeia da polimerase. ....	60
<b>Figura 5.1.</b> Difratoograma das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui (a) e NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani (b). ....	65
<b>Figura 5.2.</b> Espectros IV do NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani (a), das NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui (b) e da Quitosana (c). ....	67
<b>Figura 5.3.</b> Espectro UV-VIS das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui (a) e do NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani (b). ....	68
<b>Figura 5.4.</b> NPMs e NCM atraídos magneticamente (a) e NCM disperso em solução-tampão e separação magnética (b). ....	69
<b>Figura 5.5.</b> Curvas de magnetização das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui (a) e para o NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani. ....	70
<b>Figura 5.6.</b> Micrografia MEV $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui (a) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani (b). ....	71
<b>Figura 5.7.</b> Espectros UV-VIS para adsorção de DNA com o NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani (a) e com as NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui. ....	72

<b>Figura 5.8.</b> Eletroforese em gel de agarose para: DNA padrão diluído em H <sub>2</sub> O livre (a), após interação com NPMs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui (b) e NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani (c). .....	73
<b>Figura 5.9.</b> Adsorção de DNA utilizando o NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani em função do tempo de interação para (a) 2 mg, (b) 3 mg, (c) 4 mg e (d) 5 mg, 2,5 mL de uma solução de DNA com concentração de 100 ng/μL. ....	74
<b>Figura 5.10.</b> Porcentagem de adsorção e capacidade de adsorção no equilíbrio em função da concentração inicial de DNA.....	75
<b>Figura 5.11.</b> Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA com o NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani usando os modelos de Langmuir (a) e de Freundlich (b). ....	76
<b>Figura 5.12.</b> Ajuste dos dados experimentais de adsorção de DNA pelo NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani para os modelos de Langmuir e Freundlich. ....	77
<b>Figura 5.13.</b> Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA com o NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani para os modelos cinéticos: de pseudo primeira ordem (a), pseudo segunda ordem (b), Morris-Weber (c) e ajuste dos dados experimentais aos modelos de pseudo segunda ordem e Morris-Weber (d).....	78
<b>Figura 5.14.</b> Representação dos processos de interação (adsorção e absorção) entre o NCM e o DNA. ....	79
<b>Figura 5.15.</b> Adsorção de DNA esperma de salmão pelo NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani no intervalo de 4h com uma solução de concentração de 434 ng/μL.....	80
<b>Figura 5.16.</b> Dessorção do DNA adsorvido com as NPMs e o NCM para as soluções-tampão: fosfato/fosfato pH 7,6, SDS/NaOH pH 11,0 e Tris/HCl pH 8,0. ....	82
<b>Figura 5.17.</b> Etapas da extração de DNA a partir de sangue humano com o NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani. ....	84
<b>Figura 5.18.</b> Espectros UV-VIS de DNA a partir de sangue humano com as NPMs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui (curva tracejada) e com o NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani (curva contínua).....	85
<b>Figura 5.19.</b> Eletroforese em gel de agarose do DNA extraído a partir de sangue humano com as NPMs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui (a) e com o NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani (b). ....	86
<b>Figura 5.20.</b> Espectro UV-VIS das amplificações de PCR para DNA a partir de sangue humano com as NPMs (a) e com o NCM (b). ....	86
<b>Figura 5.21.</b> Eletroforese do DNA padrão (a), amplificação de PCR de DNA a partir de sangue humano extraído com as NPMs (b), amostra negativa (c) e extraído com o NCM (d). ....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Estrutura química de alguns polímeros condutores [58].	22
<b>Tabela 2.2.</b> Estados de oxidação da polianilina.	27
<b>Tabela 2.3.</b> Diferenças entre os mecanismos de adsorção física e química.	32
<b>Tabela 4.1.</b> Reagentes utilizados para a síntese e aplicação das NPMs e do NCM.	51
<b>Tabela 4.2.</b> Primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).	59
<b>Tabela 5.1.</b> Dados obtidos dos difratogramas e valores calculados das distâncias interplanares e parâmetro de rede para NPMs e NCM.	66
<b>Tabela 5.2.</b> Picos de absorção característicos das NPM, do NCM e da quitosana.	67
<b>Tabela 5.3.</b> Área superficial BET, tamanho e volume dos poros das NPMs e do NCM.	71
<b>Tabela 5.4.</b> Parâmetros de isotermas para os modelos de Langmuir e Freundlich correspondentes a adsorção de DNA com o nanocompósito Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani.	76
<b>Tabela 5.5.</b> Parâmetros de cinética para adsorção de DNA com o nanocompósito Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani.	78
<b>Tabela 5.6.</b> Porcentagem de dessorção de DNA das NPM e do NCM.	81
<b>Tabela 5.7.</b> Comparação da capacidade de adsorção de DNA do NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani com outros materiais adsorventes.	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A</b>	Adenina
<b>a</b>	Parâmetro de rede
<b>APS</b>	Persulfato de amônio
<b>b</b>	Constante de Langmuir
<b>BC</b>	Banda de condução
<b>BV</b>	Banda de valência
<b>BET</b>	Brunauer-Emmett-Teller
<b>BJH</b>	Barrett-Joyner-Halenda
<b>C</b>	Citosina
<b>C<sub>0</sub></b>	Concentração inicial
<b>C<sub>e</sub></b>	Concentração no equilíbrio
<b>CFC</b>	Cúbico de face centrada
<b>COD</b>	Crystallography Open Database
<b>DF</b>	Departamento de física
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DRX</b>	Difração de Raios X
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de absorção no infravermelho
<b>G</b>	Guanina
<b>GD</b>	Grau de desacetilação
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>NCMs</b>	Nanocompósitos magnéticos
<b>NPMs</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>Pani</b>	Polianilina
<b>PICs</b>	Polímeros intrinsecamente condutores
<b>PNC</b>	Laboratório de Polímeros não convencionais
<b>q<sub>e</sub></b>	Capacidade de adsorção por unidade de massa do adsorvente
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>T</b>	Timina
<b>U</b>	Uracila
<b>UV-VIS</b>	Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Nanomateriais</b>	<b>15</b>
2.1.1	Nanopartículas magnéticas de ferro	15
<b>2.2</b>	<b>Polímeros</b>	<b>18</b>
2.2.1	Quitosana	19
2.2.2	Polímeros condutores	21
2.2.3	Mecanismos de condução	22
2.2.4	Polianilina	24
<b>2.3</b>	<b>Ácidos nucleicos</b>	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Extração de DNA</b>	<b>31</b>
2.4.1	Adsorção	31
2.4.2	Isotermas de adsorção	32
2.4.2.1	<i>Modelo de Langmuir</i>	33
2.4.2.2	<i>Modelo de Freundlich</i>	33
2.4.3	Cinética	34
2.4.3.1	<i>Modelo de Pseudo primeira ordem</i>	34
2.4.3.2	<i>Modelo de Pseudo segunda ordem</i>	34
2.4.3.3	<i>Modelo de Morris-Weber</i>	35
<b>2.5</b>	<b>Métodos de extração de DNA</b>	<b>35</b>
2.5.1	Extração líquido-líquido	36
2.5.2	Extração fase sólida	37
2.5.2.1	<i>Separação magnética</i>	37
<b>3</b>	<b>TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Difração de Raios-X</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta visível</b>	<b>39</b>
3.2.1	Quantificação da contaminação de ácidos nucleicos por espectroscopia UV-VIS	42
<b>3.3</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b>	<b>43</b>
<b>3.5</b>	<b>Propriedades magnéticas</b>	<b>44</b>
<b>3.6</b>	<b>Eletroforese</b>	<b>45</b>
<b>3.7</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b>	<b>52</b>
4.2.1	Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosana	52
4.2.2	Polimerização das nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosana	52
<b>4.3</b>	<b>Métodos de caracterização das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana e do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana@Pani</b>	<b>53</b>
4.3.1	Difração de raios-X	53

4.3.2	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível.....	53
4.3.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier .....	53
4.3.4	Microscopia eletrônica de varredura .....	54
4.3.5	Curvas de magnetização.....	54
4.3.6	Área superficial BET.....	54
<b>4.4</b>	<b>Aplicação das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui e do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani para extração de DNA em meio aquoso e sistema biológico .....</b>	<b>54</b>
4.4.1	Adsorção.....	54
4.4.2	Dessorção .....	55
4.4.3	Tempo de interação e concentração inicial de DNA .....	56
4.4.4	Extração de DNA a partir de amostras de sangue total .....	56
<b>4.5</b>	<b>Caracterizações da aplicação das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana e do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana@Pani para extração de DNA .....</b>	<b>58</b>
4.5.1	Eletroforese .....	58
4.5.1.1	<i>Preparação do gel de agarose.....</i>	<i>58</i>
4.5.1.2	<i>Preparação da amostra.....</i>	<i>58</i>
4.5.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	58
<b>4.6</b>	<b>Preparo das soluções-tampão .....</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Síntese das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana.....</b>	<b>62</b>
5.1.2	Polimerização das NPMs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosana com Polianilina.....	63
5.1.3	Caracterização das NPMs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui e do NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani .....	64
5.1.3.1	<i>Difração de Raios-X.....</i>	<i>64</i>
5.1.3.2	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....</i>	<i>66</i>
5.1.3.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível .....</i>	<i>68</i>
5.1.3.4	<i>Curvas de magnetização.....</i>	<i>68</i>
5.1.3.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	<i>70</i>
5.1.3.6	<i>BET.....</i>	<i>71</i>
<b>5.2</b>	<b>Aplicação das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui e do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani para extração de DNA em meio aquoso e sistema biológico .....</b>	<b>71</b>
5.2.1	Adsorção.....	71
5.2.2	Tempo de interação .....	73
5.2.3	Efeito da concentração inicial de DNA .....	74
5.2.4	Isotermas de adsorção.....	75
5.2.5	Cinética de adsorção.....	77
5.2.6	Dessorção .....	80
5.2.7	Comparação do NCM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Qui@Pani com outros adsorventes encontrados na literatura .....	82
5.2.8	Extração de DNA total a partir de sangue humano.....	83
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>88</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>90</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Como seria de esperar, a obtenção de amostras de boa qualidade do ácido desoxirribonucléico (DNA), molécula responsável pela transmissão dos dados genéticos, é de fundamental relevância para diversas aplicações na área de biologia molecular. Para a extração de DNA dois tipos de processos são utilizados: em fase líquida (extração orgânica) ou em fase sólida. A extração em fase líquida não apenas demanda o uso de solventes orgânicos tóxicos que requerem maior cuidado durante a manipulação, como também requer a transferência da amostra para diferentes tubos, o que pode ocasionar contaminação do DNA. Já a extração em fase sólida pode ser realizada de modo mais rápido, pelo uso de uma coluna de centrifugação ou através de partículas magnéticas. Apesar dos avanços nessas técnicas, a busca por novos protocolos que permitam a extração de amostras de DNA com maior qualidade e pureza, em menor intervalo de tempo, permanece como sendo de grande interesse atual. Com o progresso nos estudos de nanomateriais, diferentes procedimentos alternativos estão sendo utilizados para a extração de DNA, como o uso de biopolímeros (celulose, quitosana). Recentemente, no Grupo de Polímeros Não-Convencionais (PNC) do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco foi desenvolvido nanocompósitos de maghemita/polianilina que apresentaram bons resultados para a adsorção de DNA. Diferentes alternativas para a otimização desses nanocompósitos para a extração de DNA a partir de amostras biológicas, como as de sangue humano, foram propostas, como o revestimento das partículas de óxido de ferro com outros polímeros além da polianilina, e também pelo uso de diferentes soluções-tampão para o controle do pH do meio. Nesse sentido, escolhemos revestir as partículas de ferro com quitosana para reforçar as cargas positivas contidas na polianilina, e que se devem aos grupos aminos. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo geral aplicar o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana@Pani para a extração de moléculas de DNA presentes tanto em meio aquoso, quanto em amostras de origem biológica.

Para alcançar esse objetivo geral, foram adotados como objetivos específicos:

- Sintetizar e caracterizar as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui e o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani;
- Ajustar as propriedades físico-químicas para a extração e dessorção de DNA;
- Estudar a natureza da interação entre o NCM e o DNA responsável pelo processo de adsorção, assim como determinar a capacidade de adsorção do nanocompósito preparado, e os parâmetros de isotermas e cinética correspondentes;

- Extrair e purificar DNA a partir de sangue humano.

Este trabalho está organizado da seguinte forma: uma breve introdução (Capítulo 1), é seguida pelo Capítulo 2, onde é apresentada uma revisão da literatura relativa aos conceitos mais importantes utilizados. Essa abordagem continua no Capítulo 3, que é dedicado à discussão das técnicas de caracterização usadas tanto para investigar as propriedades físico-químicas das nanopartículas e do nanocompósito, quanto para aplicação na extração de DNA. No Capítulo 4 exibimos os procedimentos adotados não apenas para a síntese e a caracterização das NPMs e do NCM, como também para sua aplicação na extração de DNA a partir de meios aquosos e de amostras biológica. Em seguida, no Capítulo 5 descrevemos os resultados obtidos, e por fim, mostramos a conclusão e as perspectivas para este trabalho.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Como discutido anteriormente, este trabalho teve por objetivo a síntese de um nanocompósito de óxido de ferro, quitosana, polianilina e sua aplicação para a extração e purificação de cadeias de ácido nucléico (DNA) presentes em meios líquidos. Assim, compreende-se a necessidade de uma revisão dos principais conceitos relacionados com a composição do nanocompósito e sua aplicação, que são descritos a seguir.

### 2.1 Nanomateriais

Em 1959, Richard Feynman em sua palestra “ Há mais espaço lá embaixo (*There’s plenty of room at the bottom*) ” falou da possibilidade de síntese de materiais nanométricos, isto é, materiais com dimensões físicas inferiores a 100 nanômetros (nm), unidade que corresponde a uma parte por bilhão do metro ( $10^{-9}$ m). Os nanomateriais apresentam propriedades distintas quando comparados a materiais macroscópicos (em inglês, *bulk*) com a mesma composição, por exemplo, uma elevada área superficial, eficiência catalítica alta, maior capacidade de adsorção, e diferenças em suas propriedades elétricas, óticas e magnéticas [1, 2].

Como seria de esperar, ao serem preparados como nanomateriais, por exemplo na forma de nanopartículas, nanotubos, nanofitas ou nanocristais, apresentam propriedades que dependem da composição específica (metais, polímeros e cerâmicas), do tamanho final da amostra e de sua relação área/volume. Para que seja obtido um material com propriedades melhores, e por vezes inusitadas, uma prática frequente é a preparação de nanocompósitos (NCMs) a partir da mistura homogênea de dois ou mais componentes, um deles já em escala nanométrica [3, 4].

#### 2.1.1 Nanopartículas magnéticas de ferro

O ferro é um metal associado a amplas mudanças na sociedade, desde seu uso na pré-história da humanidade até sua contribuição para a revolução industrial. Na tabela periódica, ele fica localizado no bloco de transição, apresentando a tendência para perder elétrons, enquanto a presença de elétrons *d* desemparelhados lhe atribui propriedades magnéticas. Encontra aplicação na indústria, como o principal componente do aço, e também se faz presente no corpo humano. Possui dois estados de oxidação mais comum, o  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Fe}^{3+}$ , e a exposição ao oxigênio ocasiona sua oxidação [5], na forma da reação:



O ferro tem oito óxidos conhecidos, dos quais três são mais usuais: magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Por mudança de temperatura é possível obter óxidos em fases diferentes, sendo a maghemita a forma totalmente oxidada da magnetita, e a hematita a mais estável [5].

Em especial, as nanopartículas magnéticas (NPMs), são bastante utilizadas em áreas tão diversas como em aplicações biomédicas [6], terapêuticas (uso na hipertemia) [7, 8], no diagnóstico (técnicas de ressonância magnética) [9], e ambientais [10-12]. Há vários tipos de nanopartículas magnéticas, como as de níquel (Ni), cobalto (Co), zinco (Zn), assim a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) que se destacam por causa do forte magnetismo, susceptibilidade magnética elevada e alta magnetização de saturação [13, 14]. Neste trabalho investigaremos as propriedades das nanopartículas de ferro.

Nanopartículas de óxido de ferro possuem como características vantajosas boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, facilidade de separação magnética, ótima capacidade de adsorção, facilidade na transferência de elétrons, baixa transferência de massa, estabilidade em água (a pH neutro) e sob condições fisiológicas [13, 15, 16]. Contudo, também existem desvantagens em trabalhar com nanopartículas magnéticas, tais como a facilidade de oxidação e aglomeração em sistemas aquosos, sendo comum ocorrer agregação em nanopartículas devido à elevada área superficial, que resulta no aumento da interação dipolo-dipolo entre as partículas. Uma maneira de atenuar estes efeitos é através do revestimento das nanopartículas com materiais orgânicos e/ou inorgânicos (surfactantes, polímeros, sílica), como por exemplo, polietilenoglicol, dextrano, quitosana, álcool polivinílico (PVA), sílica [9, 13, 15-20].

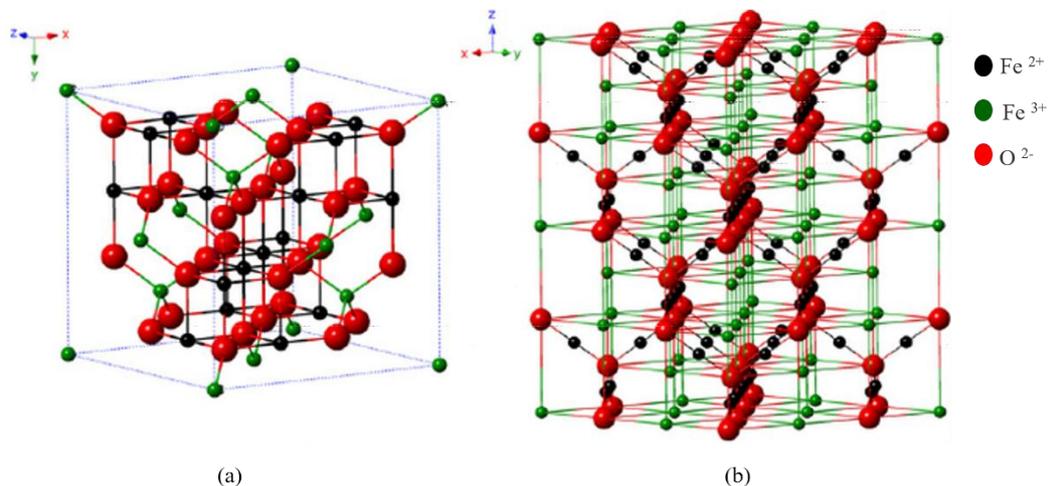
As nanopartículas podem ser sintetizadas por métodos tão diversos quanto a co-precipitação [21], tratamento hidrotérmico [22], microondas [9], sonoquímico, uso de microemulsão de água e óleo, decomposição térmica, ou sol-gel. Além do método a ser adotado, o reagente utilizado (como cloretos, sulfatos, nitratos, ou percloratos) influencia diretamente no tamanho, forma, distribuição e composição do material obtido [6].

Dentre os métodos citados, a técnica de co-precipitação é bastante utilizada para a síntese da magnetita. Este método consiste na adição de uma base – geralmente hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) – na solução de cloreto ferroso e férrico, como demonstrado na reação [6]



O produto da reação (2.2) é a magnetita. No entanto, devido à oxidação na presença de oxigênio, como mostrado na reação (2.1), é provável que a amostra obtida contenha também a maghemita, pela presença do cloreto férrico. A diferença entre a magnetita e a maghemita é a maior quantidade de átomos de ferro no estado trivalente na fase maghemita, assim, é possível obter esta fase por oxidação da magnetita na presença de oxigênio, por uma mistura de sais de ferro ou através da desidratação da hidrohematita ( $\gamma$ -FeOOH) [23, 24].

A maghemita possui estrutura semelhante à da magnetita, ambas tendo uma estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC), com valores aproximados de parâmetros de rede (a magnetita com 8,39 Å e a maghemita 8,35 Å), como mostrado na Figura 2.1. Dentro da classe das ferritas existe o tipo de estrutura espinela, de fórmula geral ( $MFe_2O_4$ ), onde M é um metal divalente. Os óxidos de ferro ( $Fe_3O_4$  e  $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ) possuem estrutura de espinela inversa, o que quer dizer que na célula unitária de cada um deles existem 8 locais tetraédricos (A) e 16 locais octaédricos (B). Na magnetita, os sítios tetraédricos são ocupados por cátions de ferro no estado trivalente ( $Fe^{3+}$ ) e os sítios octaédricos podem ser ocupados por íons  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ , estando os ânions de oxigênio localizados em um empacotamento cúbico denso na direção [111]; assim, a magnetita pode ser representada como  $Fe^{3+}_A[Fe^{2+} Fe^{3+}]_B(O^{2-})_4$ . Por sua vez a maghemita, possui sítios não ocupados, também chamados de vagas, aqui representadas por  $\square$ , geralmente em posições octaédricas, que surgem para compensar o aumento de carga positiva, com representação  $Fe_A[Fe_{5/3}\square_{1/3}]_B(O^{2-})_4$  [8, 23-25].



**Figura 2.1.** Estrutura cristalina da magnetita (a) e maghemita (b). Adaptado da Ref. [26].

Existem diferenças nas propriedades magnéticas desses óxidos quando preparados em escala macroscópica ou nano. Por exemplo, a magnetita e a maghemita são ferrimagnéticas quando em escala macroscópica (isto é, possuem momentos magnéticos que se alinham em presença de um campo externo e se mantêm nesse alinhamento mesmo após a retirada do campo

de magnetização), mas quando na forma de nanomateriais com diâmetro igual ou inferior a 30 nm, geralmente exibem um comportamento superparamagnético, que ocasiona a perda do alinhamento assim que é retirado o campo externo [14, 27].

## 2.2 Polímeros

Os polímeros orgânicos são macromoléculas compostas basicamente por hidrocarbonetos, isto é, carbono e hidrogênio, e podem apresentar em sua estrutura heteroátomos (nitrogênio, cloro). A formação dos polímeros acontece através de ligações intramoleculares covalentes de pequenas unidades (monômeros) que se repetem sucessivamente ao longo da cadeia [28].

Nos dias de hoje, os seres humanos vivem cercados por polímeros, sejam os naturais, presentes na composição dos organismos, como DNA e proteínas, em alimentos (amido), madeira, e até mesmo na fabricação de roupas (algodão, lã), seja na forma de materiais artificiais, como papel, plásticos, garrafas, pisos, cano, espumas, filmes e tecidos sintéticos [29].

Os polímeros podem ser classificados de diferentes maneiras, como por exemplo, com relação à sua origem (natural ou sintético), composição (homopolímero, copolímero), cristalinidade da cadeia (isotático, sindiotático e atático), propriedades mecânicas (termofixos, termoplásticos e elastômeros) ou natureza da síntese (polimerização de adição ou condensação) utilizada.

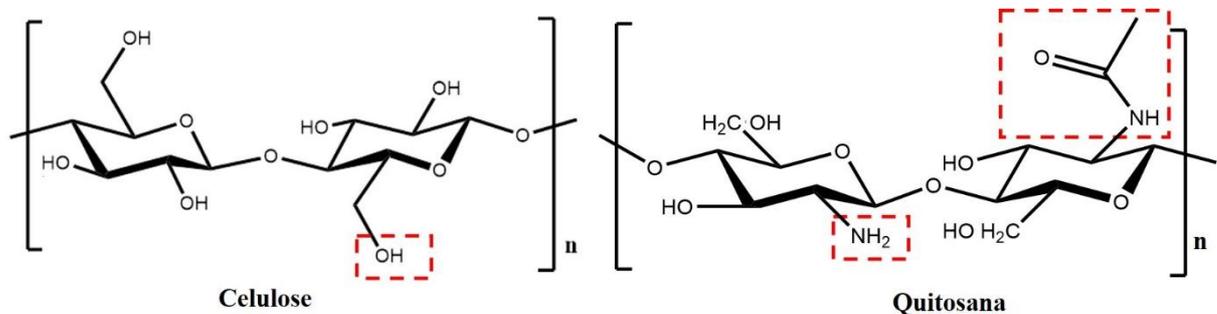
O processo de polimerização acontece por meio da junção de monômeros (unidades de baixo peso molecular) para produzir uma cadeia de peso molecular elevado. Há dois tipos de polimerização: adição ou condensação, também conhecidos como crescimento em cadeia e em estágios, respectivamente. O tipo de polimerização depende dos grupos funcionais presentes no material de partida: para acontecer condensação é necessário a existência de dois grupos funcionais, como acontece na síntese de poliésteres e poliamidas, enquanto que a polimerização por adição geralmente acontece com alquenos (compostos que possuem dupla ligação) como o eteno e o estireno levando ao polietileno e o poliestireno, respectivamente como produto [5, 29].

### 2.2.1 Quitosana

O desenvolvimento de materiais que utilizam biopolímeros<sup>1</sup>, isto é, polímeros produzidos por seres vivos, como proteínas, DNA, quitosana, etc, tem aumentado acentuadamente, por conta das diversas possibilidades de aplicações, principalmente na área biológica.

A quitosana é um copolímero formado por duas unidades: o 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e o 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose, que são unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4<sup>2</sup>. A quitosana é obtida através de um processo de desacetilação da quitina, que foi relatado pela primeira vez por Rouget em 1859. O processo acontece em condições alcalinas, geralmente usando hidróxido de sódio ou de potássio para remoção do grupo acetato, e posteriores tratamentos de desmineralização e despigmentação [1, 30-32].

A quitina (2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose) é o principal componente encontrado em exoesqueletos de crustáceos, insetos e também em menor quantidade em fungos, sendo o segundo biopolímero mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose. Entretanto, sua aplicação é limitada devido à sua insolubilidade em água e solventes orgânicos, como resultado da ligação de hidrogênio formada com o grupo acetamida. Na Fig. 2.2, observa-se a diferença entre os grupos funcionais presentes na estrutura da celulose (hidroxila), da quitosana (amina) e da quitina (acetamida).



**Figura 2.2.** Estrutura química da celulose e da quitosana.

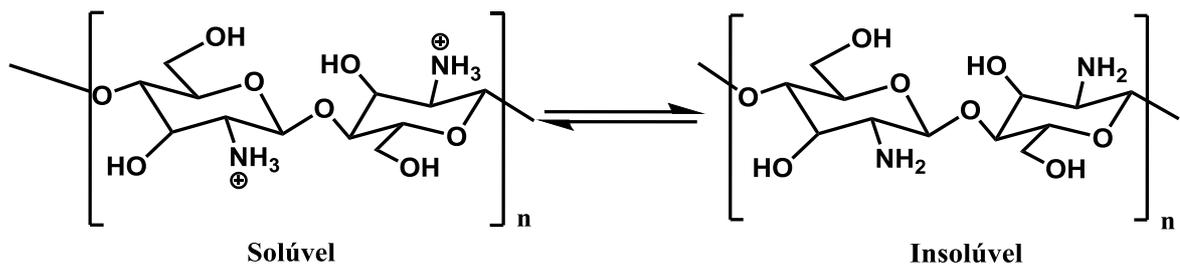
É possível obter quitosana com diferentes distribuições de peso molecular e grau de desacetilação (GD), mudanças que proporcionam alterações em suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Por exemplo, a quitosana com maior grau de desacetilação possui uma maior quantidade de grupos aminos, que ao serem protonados melhoram a solubilidade [1, 33, 34].

<sup>1</sup> Biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis.

<sup>2</sup> Ligações glicosídicas são ligações entre moléculas de açúcar que contêm grupos hidroxila, ocorrendo liberação de água.

A quitosana é um biopolímero biodegradável<sup>3</sup> e biocompatível que possui propriedades antibacterianas, alta resistência mecânica e é suscetível a modificações químicas devido à presença dos grupos aminas no carbono-2 (C-2) e dos grupos hidroxilas, nas posições C-3 e C-6 [16, 30, 31, 34-36].

Como descrito anteriormente, enquanto a quitina é insolúvel em água e ácidos orgânicos, a quitosana é solúvel em  $\text{pH} \geq 6$ , pois as aminas são protonadas e carregadas positivamente, o que faz da quitosana um polieletrólito catiônico solúvel. Em  $\text{pH}$  mais elevado (acima de 6,5), as aminas perdem a carga, o que torna as cadeias insolúveis em meios aquosos (Figura 2.3). É importante ressaltar que o  $\text{pKa}$  da quitosana é próximo da neutralidade, com sua transição solúvel-insolúvel ocorrendo a um valor de  $\text{pH}$  entre 6,0 e 6,5, que é uma faixa particularmente conveniente para aplicações biológicas. Por exemplo, a protonação das aminas em meio ácido permite a interação eletrostática com cadeias de DNA (ácido desoxirribonucléico), que é uma molécula carregada negativamente [34, 37].



**Figura 2.3.** Diferença de solubilidade da quitosana em meio ácido (solúvel) e em meio básico (insolúvel).

Face a essas características, a quitosana pode ser tratada por diferentes métodos, como eletropulverização (*electrospraying*) [36], microemulsão água e óleo [27], osmose [37], micela reversa [38] ou gelificação iônica [39]. Quando em associação com outros materiais, a quitosana pode ser utilizada em diversas áreas, como biossensores eletroquímicos [15, 16, 35], adsorção de metais pesados (cobre, cobalto, níquel, platina, paládio, cromo, mercúrio, cádmio, urânio [40-44], remoção de corantes [45, 46], ação antimicrobiana [47, 48], adsorção de proteínas [18], liberação de fármacos [49], na medicina [38, 50, 51], e na indústria de alimentos [52, 53].

<sup>3</sup> Biodegradável é quando a degradação resulta primariamente da ação de microrganismos (fungos, bactérias). A quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima.

A utilização prática da quitosana traz a vantagem adicional de redução de seu impacto ambiental, pois uma grande quantidade de resíduos a ela associados é gerada pela indústria pesqueira, com o descarte inadequado dos resíduos orgânicos correspondentes tendo importante efeito negativo sobre a qualidade do solo e da água [54].

### 2.2.2 Polímeros condutores

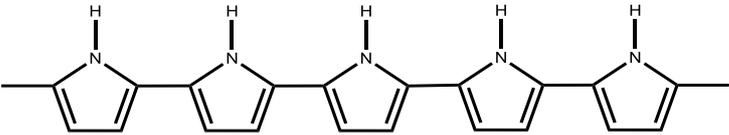
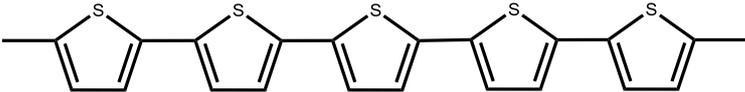
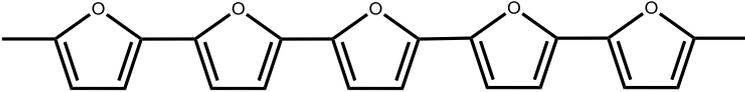
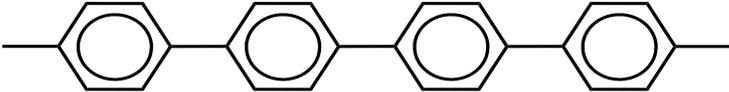
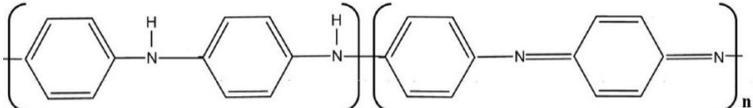
Devido à sua grande diversidade, facilidade e baixo custo de processamento, os materiais poliméricos encontram aplicação em diversos setores. Por exemplo, quando partículas carregadas são incorporadas a uma matriz polimérica (do que pode resultar uma condutividade tão elevada quanto 10 Siemens/centímetro ( $S \cdot cm^{-1}$ ), eles podem ser usados como materiais condutores de eletricidade, os chamados polímeros condutores extrínsecos [55].

No entanto, como regra geral, por muito tempo os polímeros eram conhecidos por seu caráter isolante. Só em 1977 é que o primeiro polímero intrinsecamente condutor (PIC, em inglês *Intrinsically Conducting Polymer*- ICP) foi descoberto por Hideki Shirakawa, através da dopagem do polímero isolante poliacetileno com vapor de iodo, que provocava um aumento na condutividade elétrica. Frente as novas propriedades desse material, Shirakawa em conjunto com Alan Heeger e Alan MacDiarmid investigaram tais propriedades, em um trabalho que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Química no ano 2000 [56].

A partir de então, outros exemplos de PICs foram rapidamente identificados. Materiais desta classe reúnem as propriedades mecânicas e a processabilidade dos polímeros convencionais com características de resposta elétrica, ótica e magnética semelhantes a aquelas encontradas em metais e semicondutores inorgânicos. Essas características estão associadas à natureza conjugada de sua estrutura, onde ligações simples e duplas se alternam, resultando em uma longa cadeia de átomos de carbonos com hibridização  $sp^2$  [57].

São exemplos de polímeros condutores o poliacetileno (condutividade na faixa de  $10^3$ - $10^6$  S/cm), polipirrol (600 S/cm), politiofeno (200 S/cm), polifurano, poli (p-fenileno) (1 S/cm), polianilina ( $10$ - $10^4$  S/cm), cujas estruturas químicas podem ser encontradas na Tabela 2.1. Os PICs podem ser aplicados como materiais ativos em baterias, sensores, dispositivos eletrocromáticos, células fotovoltaicas, reações que envolvem catálise, fibras têxteis, supercapacitores, LEDs, etc [5, 55, 58].

**Tabela 2.1.** Estrutura química de alguns polímeros condutores [58].

Polímero	Estrutura química
Poliacetileno	
Polipirrol	
Politiofeno	
Polifureno	
Poli (p-fenileno)	
Polianilina	

Com a adição de agentes oxidantes e redutores, reações redox podem ocorrer nos polímeros condutores, resultando na formação de cargas positivas ou negativas deslocalizáveis ao longo da cadeia, e que devem ser neutralizadas pela presença de ânions ou cátions das substâncias introduzidas, conhecidas como dopantes. A dopagem que pode ser do tipo p (quando o dopante retira elétrons da cadeia polimérica) ou n (o dopante doa elétrons), à semelhança do que é observado para semicondutores inorgânicos, é responsável pelas peculiares propriedades eletroquímicas, eletrocromáticas e de condução elétrica exibidas pelos polímeros condutores.

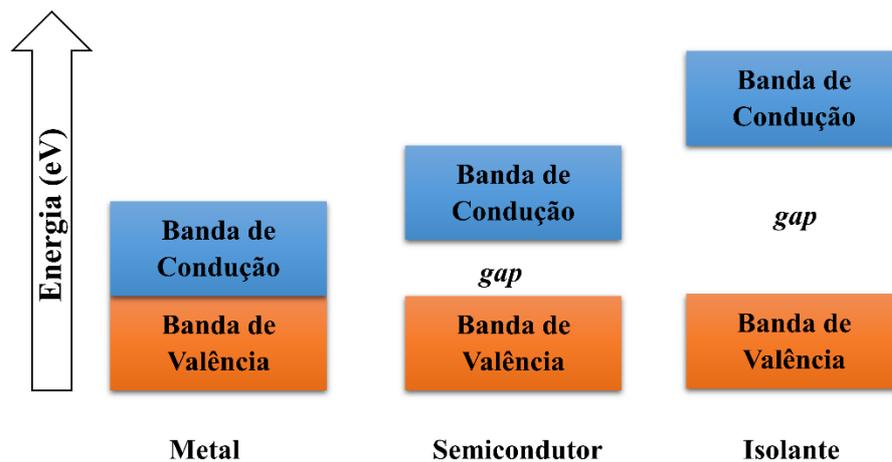
### 2.2.3 Mecanismos de condução

Para que possa ser melhor compreendido o mecanismo de condutividade elétrica em polímeros é necessário rever alguns conceitos básicos da teoria de bandas eletrônicas em sistemas periódicos.

Para átomos individuais existem níveis discretos de energia que podem ser ocupados pelos elétrons, os quais estão arranjados em camadas e subcamadas. Na maioria dos átomos, os elétrons preenchem os estados de menor energia, seguindo o princípio de exclusão de Pauli, onde dois elétrons com spins opostos ocupam um mesmo estado. Já materiais sólidos

apresentam um grande número de átomos tão próximos um dos outros que suas estruturas eletrônicas passam a ser influenciada pelos átomos vizinhos. Assim, os níveis de energia correspondentes se aproximam, formando uma banda de energia eletrônica. A banda de mais alta energia completamente preenchida com elétrons é chamada de banda de valência (BV). Já os níveis eletrônicos vazios ou incompletos de menor energia, formam a chamada banda de condução (BC). A região de energia que separa as bandas de valência e de condução é conhecida como faixa proibida ou *gap* [5, 28].

A largura do espaçamento entre as bandas de valência e de condução tem influência direta sobre a condutividade de um material. Para os metais, a energia térmica é suficiente para promover os elétrons para os estados vazios de energia mais baixos (BC). Já no caso de semicondutores, é necessária uma maior quantidade de energia para promover a passagem dos elétrons da BV para a BC. Por sua vez, os materiais isolantes não conduzem eletricidade devido ao grande valor de energia do espaçamento entre as bandas.



**Figura 2.4.** Representação esquemática da distribuição das bandas de valência e de condução para metais, semicondutores e isolantes.

A condutividade nos polímeros conjugados acontece por meio da criação de defeitos (sóliton, pólaron e bipólaron) durante a polimerização, cujas energias ocorrem na região proibida (*gap*). A remoção de um elétron da cadeia forma um íon radical denominado pólaron, provocando uma distorção da cadeia, com os anéis passando da forma aromática para a quinóide, e o aparecimento de estados eletrônicos mais localizados. Com a remoção de um segundo elétron da cadeia polimérica podem acontecer duas situações: a primeira é a criação de mais um pólaron, ou a formação de um bipólaron, que é um par de cargas iguais (dicátion), como indicado na Figura 2.5. O bipólaron é termodinamicamente mais estável do que dois pólarons separados, o que se deve à repulsão coulombiana entre as duas cargas próximas [55, 58].

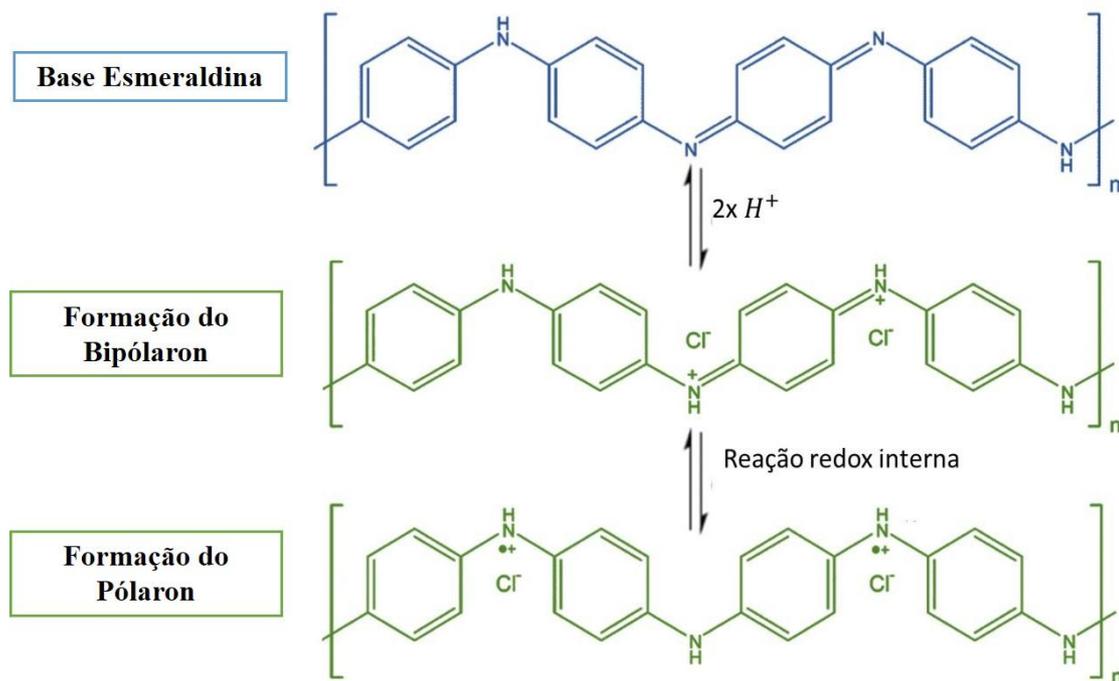
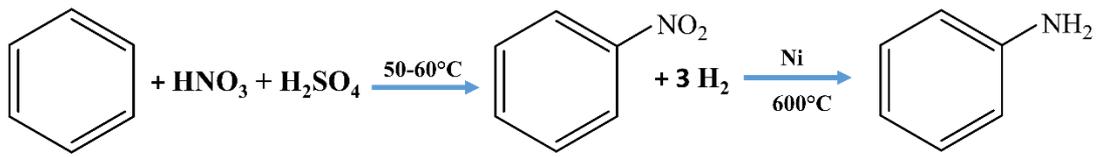


Figura 2.5. Esquema de como ocorrem os defeitos estruturais (pólaron e bipólaron) na polianilina.

## 2.2.4 Polianilina

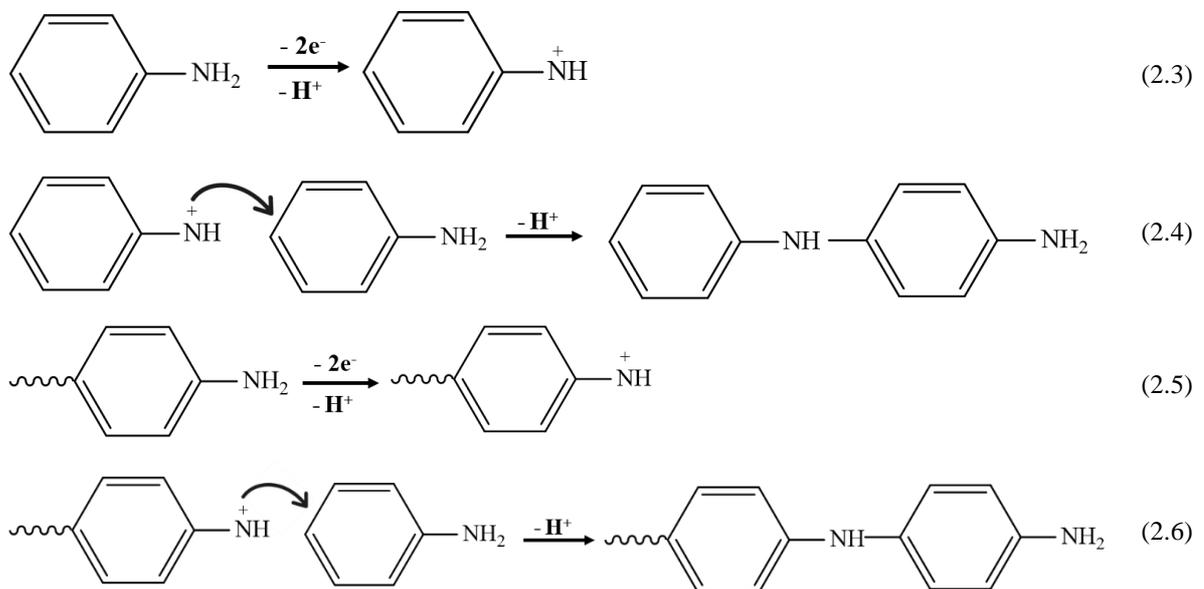
Identificada como um polímero condutor apenas na década de 70 do século passado, a polianilina (pani) já havia sido obtida por Henry Letheby em 1862 [56]. Este polímero, que é obtido pela polimerização do monômero anilina, possui propriedades bastante interessantes, como boa processabilidade, fácil polimerização, solubilidade em água e solventes orgânicos, elevada estabilidade química, baixo custo de produção (os reagentes utilizados na síntese têm valores acessíveis), alta pureza, boa condutividade elétrica, e processo de dopagem reversível [59, 60].

É possível sintetizar a anilina por diferentes maneiras: (1) a redução do nitrobenzeno, (2) usando como reagente de partida o cloro-benzeno ou o fenol com amônia ou (3) por nitração do benzeno. A obtenção da anilina por nitração se inicia com a reação entre o benzeno e os ácidos nítrico e sulfúrico com temperatura entre  $50^\circ - 60^\circ C$ , quando é formado um nitrobenzeno; neste momento é inserido um catalisador (usualmente níquel ou ferro) a uma temperatura elevada ( $600^\circ C$ ) [61], como demonstrado na Fig. 2.6.



**Figura 2.6.** Síntese da anilina através do processo de nitração.

A ani pode ser obtida por via eletroquímica ou pelo método químico; neste último, se faz necessário o uso de agentes oxidantes, como o persulfato de amônio- $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , o peróxido de hidrogênio- $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou o dicromato de potássio- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  em um meio ácido (na presença dos ácidos clorídrico, sulfúrico ou fosfórico). Na síntese química, o processo ocorre através da polimerização por adição, que se inicia com uma reação de oxidação por meio da perda de dois elétrons e um próton, resultando em um íon nitrogênio (2.3); em seguida, este radical ataca por substituição eletrofílica um monômero da anilina (2.4). A propagação da cadeia continua da mesma maneira, com a oxidação da amina primária formando um cátion (2.5), o que posteriormente ocasiona substituição eletrofílica (2.6) [62].

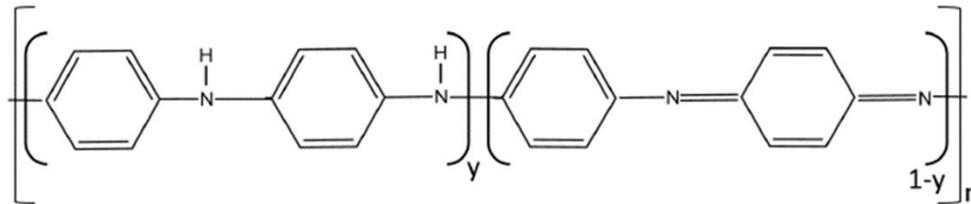


**Figura 2.7.** Mecanismo da polianilina através da síntese química.

Uma propriedade bastante interessante dos polímeros condutores é a possibilidade de controlar o nível de sua condutividade, de modo que podem passar facilmente da forma isolante para a condutora. A pani se constitui em um caso especial, pois além das características acima ela pode ser dopada pela protonação da cadeia polimérica; isso se faz sem que seja necessário remover ou adicionar elétrons, com a dopagem ocorrendo pela protonação parcial ou completa dos grupos nitrogênios imina, quando sua imersão em soluções ácidas. O nível final de

protonação determina o grau de oxidação da cadeia, do que resultam quatro possíveis estados de oxidação diferentes [63].

Como mostrado na Figura 2.7, a polianilina no seu estado não dopado (básico) é composta por duas unidades repetitivas, o estado reduzido (lado esquerdo) e estado oxidado (direito), onde  $y$  corresponde a valores entre 0 e 1, a depender do estado de oxidação da polianilina.

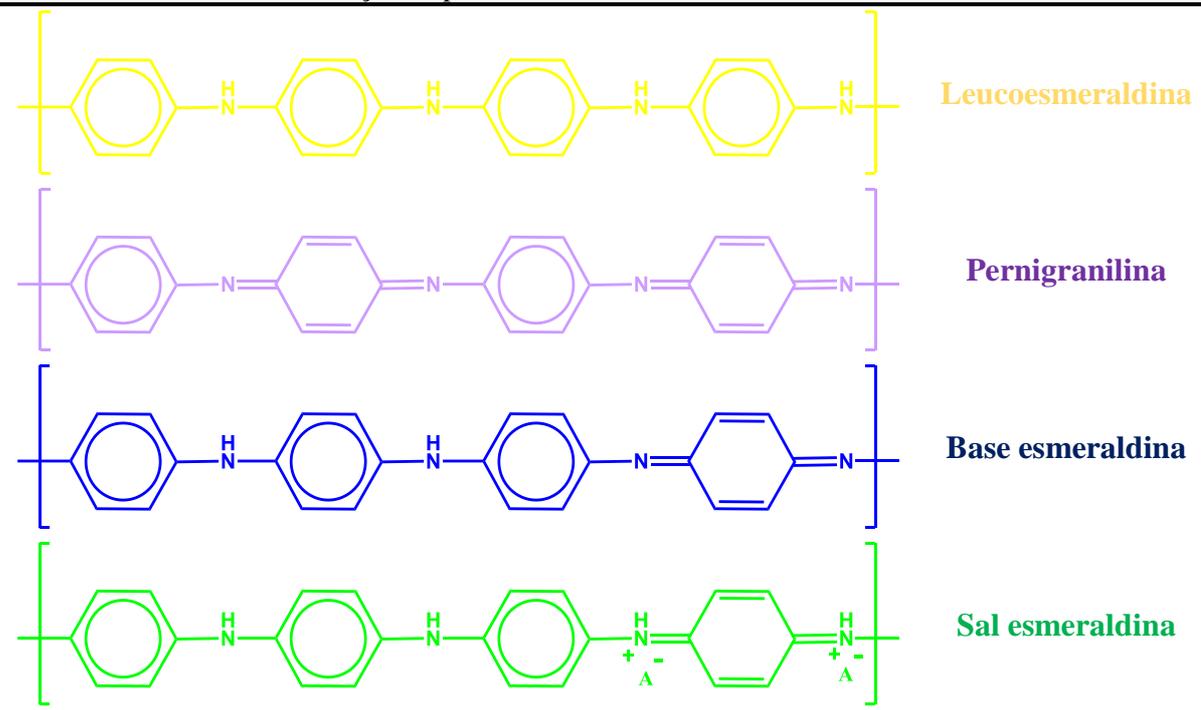


**Figura 2.8.** Estrutura química geral da polianilina.

Os estados oxidados da pani são conhecidos como leucoesmeraldina, pernigranilina, esmeraldina e sal esmeraldina (Tabela 2.2). A leucoesmeraldina, a forma completamente reduzida ( $y= 1$ ), corresponde à presença de nitrogênios amina, resultando na estrutura benzenóide. Já a pernigranilina é o estado de oxidação completa ( $y= 0$ ), com a presença somente de nitrogênios imina, sendo sua estrutura quinoidal. A estrutura base esmeraldina é parcialmente oxidada ( $y= 0,5$ ), sendo formada por anéis quinóides e benzenóides. As mudanças nos estados de oxidação são perceptíveis pela mudança de coloração, no que é denominado de efeito eletrocromico. A estrutura leucoesmeraldina apresenta coloração amarela, a pernigranilina exibe cor violeta, enquanto que a base esmeraldina é azul, sendo a forma sal esmeraldina (verde) o único estado condutor de eletricidade [56, 57].

A condutividade da pani é ajustável, por ser possível reverter o processo de protonação, isto é, desprotonar a polianilina, através de sua exposição a um meio básico [57].

A pani encontra uma gama de aplicações, como na remoção de metais [64, 65] e de corantes [66], sensor para detecção de gás [67] e de sistemas biológicos [68], células fotovoltaicas [69] e supercapacitores [70]. As propriedades da pani como sensibilidade e seletividade em relação a moléculas biológicas são ainda mais elevadas quando a modificação da superfície é realizada utilizando compostos que contenham grupos funcionais -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH. Um exemplo de nosso especial interesse é a quitosana, que tem em sua estrutura grupos hidroxila e amino (Figura 2.2) e se mostra uma opção conveniente para aumentar a sensibilidade e seletividade [1, 35].

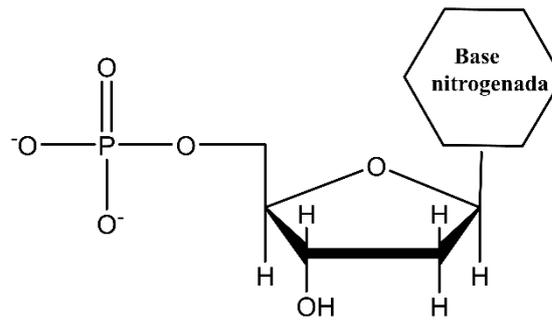
**Tabela 2.2.** Estados de oxidação da polianilina.

### 2.3 Ácidos nucleicos

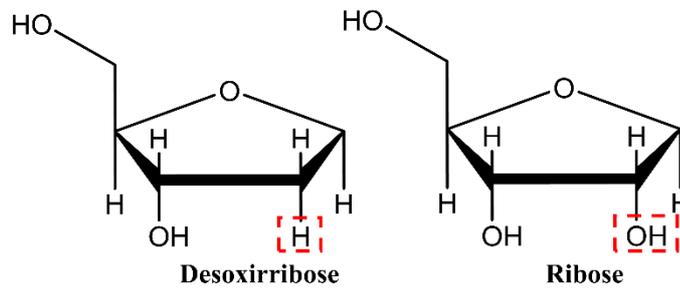
O ácido desoxirribonucléico (DNA), que foi isolado e caracterizado pela primeira vez em 1868 por Friedrich Miescher, é um polímero orgânico formado por unidades repetidas de nucleotídeos, cuja função biológica principal é o armazenamento e transmissão de informação genética, servindo ainda como molde para a síntese de moléculas de ácidos ribonucléicos (RNA).

Em 1953, James D. Watson e Francis Crick sugeriram que a molécula de DNA possuía uma estrutura em hélice dupla, explicando assim sua capacidade de replicação, isto é, antes de uma célula se dividir, as fitas duplas de DNA se separam em unidades complementares com cada uma passando a servir como molde para a síntese de uma nova fita complementar [5].

Os nucleotídeos são formados por três grupos: a base nitrogenada, a pentose (açúcar) e o fosfato, que confere a carga negativa a esta estrutura, como exibido na Figura 2.8. É possível distinguir entre o DNA e o RNA ao se observar o grupo açúcar, já que a desoxirribose contém um átomo de oxigênio a menos no carbono C-2, quando comparado à ribose (Fig.2.9) [5].



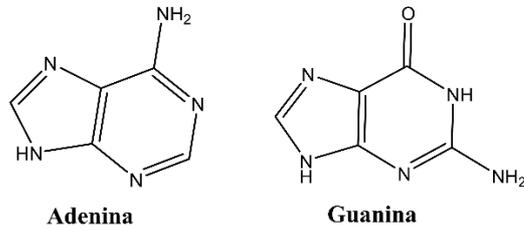
**Figura 2.9.** Estrutura dos nucleotídeos.



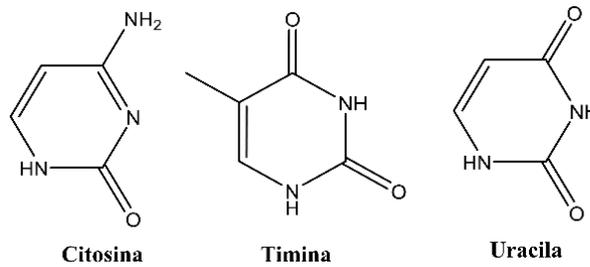
**Figura 2.10.** Estrutura química da desoxirribose e ribose.

A base nitrogenada (ver Fig. 2.8) pode ser do tipo desoxiadenilato, desoxitimidilato, desoxiguanilato e desoxicitidilato, que são conhecidos como adenina (a), timina (t), guanina (g) e citosina (c), respectivamente. Essas bases são classificadas em púricas, que são moléculas maiores compostas por dois anéis (estrutura cíclica), adenina e guanina, e as bases pirimídicas, aquelas que contêm apenas um anel (a citosina, no caso dos dois ácidos, e a timina, encontrada apenas no DNA) e a uracila (presente no ácido ribonucléico, RNA), cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 2.10. Estas bases são hidrofóbicas e se localizam no interior da hélice, enquanto que a desoxirribose e o fosfato, por serem hidrofílicos, estão posicionados externamente [71].

### Bases púricas

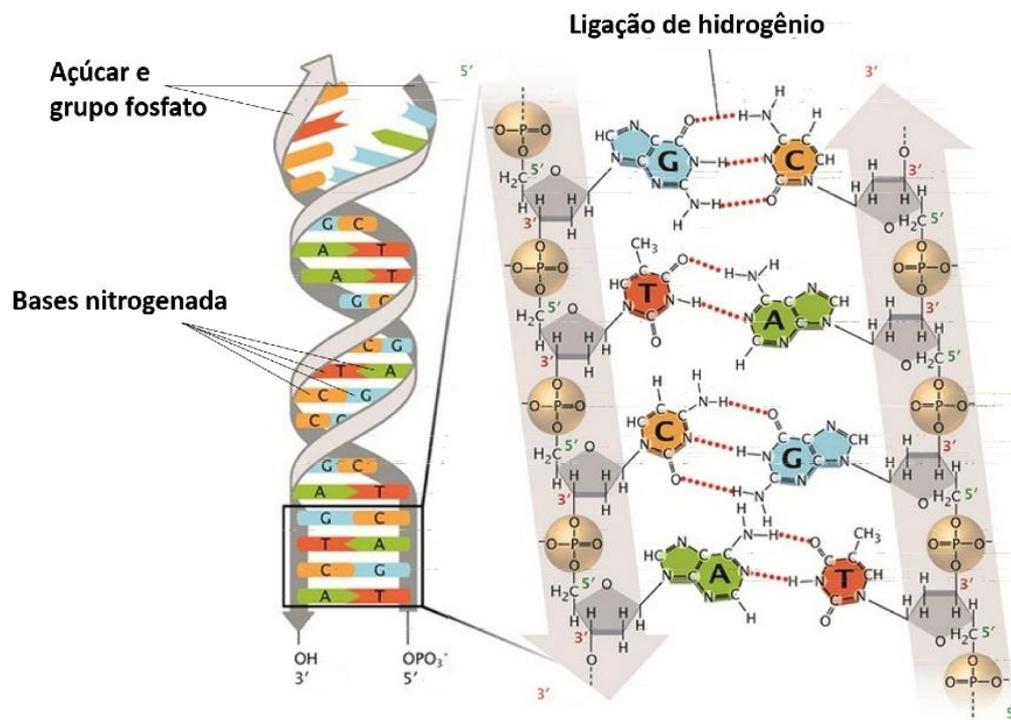


### Bases pirimídicas



**Figura 2.11.** Bases nitrogenadas púricas e pirimídicas.

Os nucleotídeos interagem de maneira específica, isto é, a adenina liga-se apenas à timina, por duas ligações de hidrogênio, e a guanina com a citosina, por três ligações de hidrogênio. Erwin Chargaff descobriu que nos seres vivos a quantidade de adenina é igual à de timina, assim como a de citosina é igual à de guanina [72]. A dupla hélice resulta dessa especificidade das ligações, com o grupo hidroxila (OH) de um açúcar no carbono 3' formando uma ligação fosfodiéster ao se ligar com o grupo hidroxila do carbono 5' de outra molécula de açúcar, e com isso liberando uma molécula de água. Por este motivo, as fitas são antiparalelas, isto é, enquanto uma cadeia está na direção 5' → 3', a outra está na direção 3' → 5', características que podem ser observadas na Figura 2.11.



**Figura 2.12.** Representação da cadeia dupla hélice do DNA e da estrutura química dos nucleotídeos com ligação de hidrogênio. Adaptado da Ref. [73].

A dupla hélice se mantém estável devido ao grande número de ligações de hidrogênio de curto alcance, que podem, no entanto serem quebradas, seja pela elevação de temperatura a  $95^{\circ}\text{C}$ , ou por tratamento químico (com a exposição a uma solução de sal de baixa força iônica ou reagentes como ureia ou formamida). A separação da fita dupla de DNA em duas fitas simples é conhecida como desnaturação, um processo que é reversível, pois as fitas têm a tendência de voltar a se ligar novamente com a diminuição da temperatura para a faixa de  $50^{\circ}\text{C}$  [72, 74, 75].

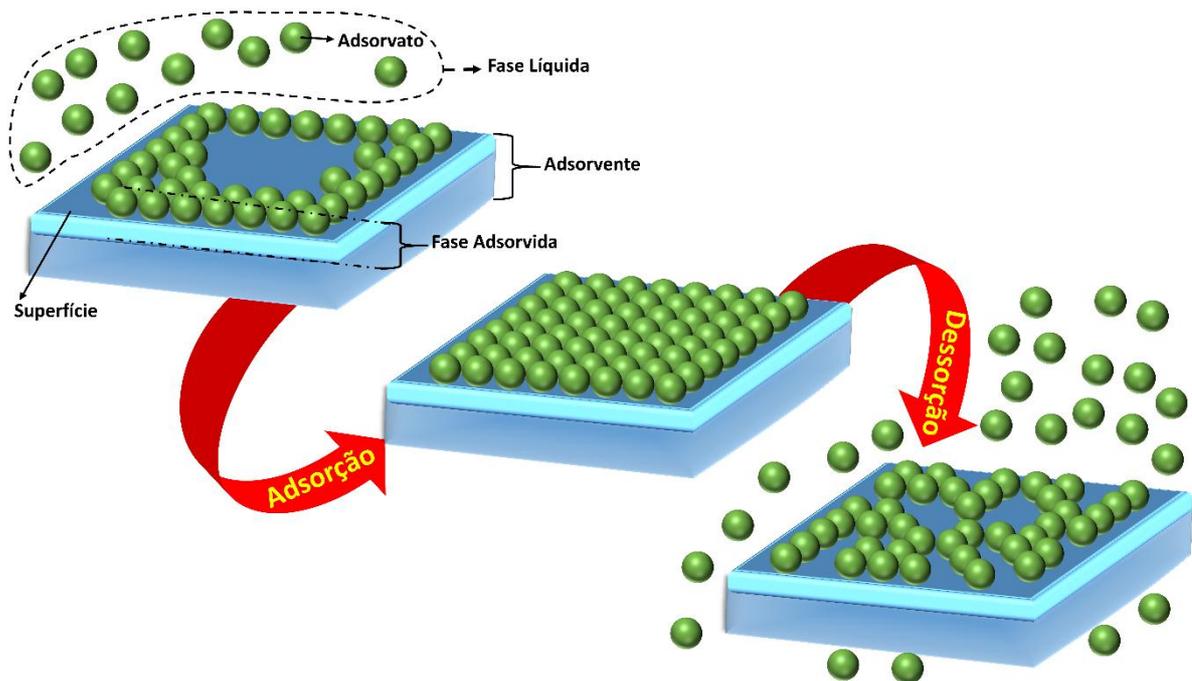
Os ácidos nucleicos podem ser degradados pelo calor e principalmente pela alteração de pH. Assim, muito embora o DNA seja uma molécula mais estável que o RNA, sua manipulação requer cuidados como proteção ao ar e à ação de luz e água, já a molécula de RNA é tão instável que, após sua extração, temperaturas muito baixas ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) devem ser usadas para evitar sua degradação. O DNA tem maior estabilidade, pois é a única macromolécula que se beneficia de reparos bioquímicos. Este processo de reparo é possível pelo fato de que as duas fitas são complementares, e desta maneira o dano a uma fita pode ser removido usando a fita não danificada como molde. Uma mutação, ou seja, a mudança permanente na sequência de nucleotídeos do DNA, é um exemplo de DNA não reparado [71].

## 2.4 Extração de DNA

Neste tópico descreveremos alguns dos métodos mais utilizados para a extração de DNA, de modo a compreender o mecanismo envolvido; inicialmente abordaremos os processos de adsorção, equilíbrio e cinética de adsorção.

### 2.4.1 Adsorção

A adsorção é um fenômeno físico-químico em que uma molécula (gás ou líquido), conhecido como adsorvato, é transferida para uma superfície sólida, o adsorvente (Fig. 2.12), segundo uma interação que pode ser de natureza covalente ou simplesmente eletrostática. Por exemplo, desde muito tempo que este processo vem sendo utilizado para a separação de gases e no tratamento da água para remoção de corantes e metais [76].



**Figura 2.13.** Representação do processo de adsorção.

O mecanismo responsável pela adesão do adsorvato depende de fatores como tamanho, área superficial, tipo e quantidade de adsorvente, concentração do adsorvato, velocidade de agitação, valor do pH e temperatura, etc, que causam alterações na porcentagem final de remoção [77].

O processo de adsorção pode acontecer por duas vias: adsorção física (fisissorção) ou química (quimissorção) [78]. Enquanto a adsorção física pode ocorrer por toda a superfície, com a formação de multicamadas (como resultado da ação de interações de forças

intermoleculares relativamente mais fracas como as forças de Van der Waals, ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo), na quimissorção, o processo acontece somente em determinados sítios ativos, por meio de ligações específicas (ligações covalentes ou iônicas), com a formação de uma camada única [79, 80]. As principais diferenças entre esses mecanismos são mostradas na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3.** Diferenças entre os mecanismos de adsorção física e química.

	<b>Fisissorção</b>	<b>Quimissorção</b>
<b>Mecanismo predominante</b>	Interações intermoleculares	Ligação covalente ou iônica
<b>Alcance</b>	Formação de multicamadas	Formação de uma única camada
<b>Ocorrência</b>	Pode ocorrer em qualquer ponto da superfície	Ocorre somente em determinados sítios ativos

A porcentagem de adsorção é obtida pelo uso da relação,

$$\text{Adsorção \%} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} * 100 \quad , \quad (2.7)$$

onde  $C_0$  é a concentração inicial do adsorvato (neste trabalho o DNA) e  $C_f$  é a concentração final (após interação com o adsorvente), ambas expressas em ng/ $\mu$ L.

Ao final as moléculas adsorvidas podem ser liberadas do adsorvente por meio de alterações na concentração, temperatura, pH, em um processo chamado de dessorção (ver Fig. 2.12) [76].

#### 2.4.2 Isotermas de adsorção

Quando se utiliza o processo de adsorção é necessário obter informações mais detalhadas sobre o sistema analisado, como por exemplo, suas características em condições de equilíbrio<sup>4</sup>. Por meio de isotermas, processos em que as variáveis relacionadas são analisadas sob temperatura constante; no caso da isoterma de adsorção, a capacidade de adsorção no equilíbrio ( $q_e$ ) é registrada como função da concentração alcançada no equilíbrio ( $c_e$ ).

Ao colocar uma quantidade de massa ( $m$ ) do adsorvente em um volume ( $V$ ) determinado de uma solução com concentração inicial do adsorvato conhecida ( $C_0$ , com unidade mg/L), a interação entre o adsorvente e o adsorvato começa a ocorrer, levando um certo tempo (que é

<sup>4</sup> Equilíbrio corresponde à situação em que ocorre a igualdade entre as velocidades da reação na ordem direta e inversa, neste caso entre a adsorção e dessorção.

diferente para cada sistema a ser analisado) até que uma situação de equilíbrio venha a ser alcançada. As moléculas do adsorvato deixam a solução e passam a aderir ao adsorvente até o momento em que sua concentração no meio líquido se torna constante, o que caracteriza a concentração no equilíbrio [80]. A capacidade de adsorção ( $q_e$ ) pode ser calculada em mg/g como,

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m} V \quad , \quad (2.8)$$

onde  $C_0$  e  $C_e$  (mg/L) correspondem respectivamente às concentrações inicial e de equilíbrio,  $m$  é a massa do adsorvente (em g) e  $V$  é o volume (em L) da solução.

Os modelos de isotermas comumente encontrados na literatura são os de Langmuir e Freundlich.

#### 2.4.2.1 Modelo de Langmuir

Em 1918, a partir de seus estudos referentes à adsorção de um gás ideal, Irvin Langmuir propôs um modelo de adsorção no qual o sistema analisado deve obedecer a algumas características, como: (a) a adsorção deve acontecer em sítios definidos de uma superfície energeticamente homogênea, em que (b) cada sítio é ocupado exclusivamente por uma molécula (levando à formação de apenas uma monocamada), (c) não existe interação entre as moléculas adsorvidas e (d) todos os sítios possuem a mesma energia de adsorção [81, 82]. Em sua forma linearizada, esse modelo pode ser expresso pela equação

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{bq_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad , \quad (2.9)$$

onde  $b$  é a constante de Langmuir e  $q_m$  é quantidade máxima de moléculas adsorvidas (mg/g). Se os dados obtidos são apresentados em um gráfico de  $C_e/q_e$  versus  $C_e$ , se torna possível calcular diretamente o valor da constante de Langmuir.

#### 2.4.2.2 Modelo de Freundlich

Em 1906, Herbert Freundlich apresentou um trabalho que relacionava de maneira empírica a quantidade de material adsorvido por massa de adsorvente, este modelo descreve que um sítio pode conter mais de uma molécula (superfície heterogênea) e a distribuição de energia acontece de forma exponencial, permitindo a formação de multicamadas [83]. A forma linearizada da equação de Freundlich é descrita na forma logarítmica como

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad , \quad (2.10)$$

onde  $q_e$  é a capacidade de adsorção,  $K_f$  e  $n$  são constante,  $C_e$  é a concentração no equilíbrio do adsorvato. Através do gráfico  $\log q_e$  versus  $\log C_e$ , os valores das constantes são obtidos.

### 2.4.3 Cinética

A cinética de uma reação de adsorção, isto é, a maneira como evolui no tempo a concentração dos materiais envolvidos, é de importância para uma melhor compreensão dos mecanismos de adsorção prevalentes na interface sólido-líquido. Neste trabalho, os resultados obtidos para a cinética de adsorção foram analisados pela comparação de sua aderência aos modelos de pseudo primeira ordem, pseudo segunda ordem e Morris-Weber.

#### 2.4.3.1 Modelo de Pseudo primeira ordem

Em 1898, S. Lagergren propôs o modelo cinético de pseudo primeira ordem [84, 85], em que se propõe que o processo de cinética de adsorção tem relação direta com processos físicos na forma [86]

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad , \quad (2.11)$$

onde  $q_e$  [ $q_t$ ] é a quantidade (em mg/g) do adsorvido por unidade de massa do adsorvente na situação de equilíbrio [em um determinado instante  $t$  de tempo], e  $k_1$  é a constante de adsorção de pseudo primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ). Para obter o valor das constantes, é necessário fazer o gráfico do logaritmo ( $q_e - q_t$ ) versus  $t$  pelo método de regressão linear.

#### 2.4.3.2 Modelo de Pseudo segunda ordem

Embora tenha sido introduzido já na metade dos anos 80, o modelo de pseudo segunda ordem só se tornou mais conhecido em 1999, após as contribuições de Ho e McKay [87, 88]. Este modelo descreve a mudança de velocidade quando a variação da concentração de adsorvato é perceptível [81], na forma

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad , \quad (2.12)$$

onde  $q_t$  e  $q_e$  representam a quantidade do material adsorvido em um tempo  $t$  definido e no equilíbrio, respectivamente, e  $K_2$  é a constante da taxa de adsorção de pseudo segunda ordem

com unidade (mg min/g). Usando uma regressão linear, é possível obter os valores das constantes ao traçar o gráfico de  $t/q_t$  versus  $t$  [84].

### 2.4.3.3 Modelo de Morris-Weber

O mecanismo de cinética de adsorção proposto por Morris-Weber considera que a velocidade de adsorção é determinada pela difusão de moléculas através dos poros do adsorvente [89], sendo portanto aplicável a processos que ocorram mais devagar que aqueles descritos pelos modelos de pseudo primeira e segunda ordem. Neste modelo de cinética, o fator determinante é a velocidade da reação mais lenta, que comanda o processo na forma

$$q_t = k_{id}(t)^{0.5} + c \quad , \quad (2.13)$$

onde  $k_{id}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) e  $C$  são constantes que podem ser obtidas por regressão linear a partir da variação de  $q_t$  (quantidade de adsorvato em  $\text{mg g}^{-1}$ ) como função da raiz quadrada do tempo de interação.

## 2.5 Métodos de extração de DNA

Continua a ser crescente o interesse por processos simplificados para a extração e purificação de ácido nucléicos, face a necessidade de obtenção de amostras com elevada qualidade e pureza. A etapa de extração é determinante na qualidade da amostra, sendo o ponto de partida para aplicações tão diversas como na área forense, na indústria farmacêutica, em biologia (principalmente em diagnóstico molecular), epidemiologia, etc.

Os estudos de isolamento de ácidos nucléicos no plasma sanguíneo tiveram início em 1947, quando P. Mandel e P. Métails detectaram a presença de ácidos nucléicos ao empregarem o método de precipitação com ácido perclórico. Com o passar do tempo, porém, surgiram novas propostas metodológicas para uma extração mais rápida e de maior sensibilidade, e em 1989 Johns propôs um método para a extração de DNA de sangue com perclorato de sódio e clorofórmio, sem utilização de fenol. No ano seguinte, Boom sugeriu o isolamento de DNA utilizando sílica, que, embora realizado em menor intervalo de tempo, ainda utilizava tiocionato de guanidina, um reagente tóxico [74, 90].

De um modo geral, a extração de DNA de componentes celulares pode ser dividida em quatro etapas [91]:

- 1- Lise: momento em que se provoca a ruptura da célula, liberando todos os componentes que a formam;

- 2- Desnaturação: dos complexos protéicos;
- 3- Inativação de nucleases, por exemplo, quando o material alvo é DNA, pode se inserir RNase para degradar o RNA presente na amostra;
- 4- Remoção de proteínas e outros contaminantes para finalmente se tornar possível a extração final do DNA.

Hoje em dia, vários métodos para a extração de biomoléculas, como DNA, RNA e proteínas, podem ser encontrados sob a forma de kits comerciais que se baseiam em protocolos para a extração em fase sólida (coluna) ou em fase líquido-líquido (soluções). Tipicamente, a escolha do método mais apropriado depende da amostra a ser analisada, se sangue total, saliva, urina, sêmen, mancha de sangue ou tecido, assim como do tipo de ácido nucléico que se pretende extrair. Estes métodos são descritos a seguir.

### 2.5.1 Extração líquido-líquido

O método de extração líquido-líquido, também conhecido como extração orgânica, é uma técnica convencional utilizada há muito tempo, onde por meio da utilização de solventes orgânicos é possível extrair o DNA.

Esse método consiste em várias etapas, começando pela ruptura da parede celular utilizando um surfactante como o SDS, seguido da adição de tiocionato de guanidina ou proteinase k para degradar proteínas, após o que é adicionada uma mistura dos solventes fenol-clorofórmio, quando então a amostra é submetida à centrifugação, sendo o sobrenadante (que contém o DNA) retirado e precipitado com adição de álcool (etanol ou isopropanol). Depois disso, se fazem necessárias várias etapas de centrifugação e de lavagem para a retirada dos solventes, quando por fim o DNA é dissolvido em água ou em um tampão adequado [75, 91, 92].

Este tipo de extração tem como desvantagem o uso de reagentes tóxicos, o que demanda mais atenção do manipulador e um tempo maior, com uma maior probabilidade de contaminação por conta das sucessivas transferências de tubos, e requerer uma purificação cuidadosa para minimizar a possibilidade que os reagentes usados venham a causar interferências posteriores em técnicas de biologia molecular, como PCR, que venha a ser usadas [93].

## 2.5.2 Extração fase sólida

A extração em fase sólida surgiu como alternativa, sendo um método de extração mais rápido, com menos contaminação e sem que sejam utilizadas substâncias nocivas ao manipulador. Nela, é comum a utilização de uma coluna de rotação composta por um material em fase sólida, denominado substrato, sendo que na maioria das vezes são usadas membranas de sílica.

Em geral, este processo é realizado em quatro etapas: lise celular, adsorção de ácidos nucleicos, lavagem e eluição (dessorção), por meio da centrifugação da coluna com velocidade relativamente lenta [91].

Para iniciar este processo, é necessário ativar a coluna por uma mudança de pH provocada por uma solução-tampão, sendo em seguida a amostra dissolvida em um solvente, inserida na coluna onde o material alvo será especificamente ligado; componentes indesejados, que podem ficar aprisionados na coluna, são a seguir retirados na etapa de lavagem, quando por fim o DNA pode ser “liberado” da coluna no processo de eluição [94].

### 2.5.2.1 Separação magnética

Esta metodologia pode ser classificada como uma subdivisão da técnica de extração em fase sólida, onde são utilizadas partículas magnéticas ao invés de membranas. Este é um método prático e rápido, uma vez que não requer etapas de centrifugação, com uma diminuição do risco de contaminação pelo fato do procedimento ser realizado com o uso de um único tubo, onde são realizadas as várias etapas de adição e remoção das soluções, evitando assim transferências da amostra para outros recipientes. Outras vantagens incluem o fato de que a extração pode ser automatizada, e de que ela é adequada para volumes pequenos, não sendo necessário acondicionar o material usado a um suporte [75].

### 3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Neste capítulo apresentaremos uma breve revisão sobre os princípios das diferentes técnicas utilizadas no decorrer deste trabalho para a caracterização das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Q_{ui}$  e do nanocompósito  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Q_{ui}@P_{ani}$ , e discutiremos também as técnicas utilizadas para determinar a qualidade e a pureza do DNA extraído.

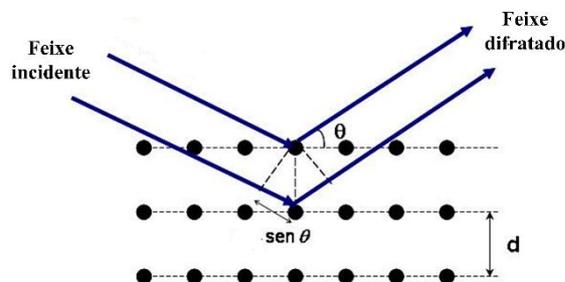
#### 3.1 Difração de Raios-X

Com a técnica de difração de raios-X é possível determinar o arranjo dos átomos em compostos sólidos, o comprimento e os ângulos de ligação, como também definir o tamanho e o tipo de célula unitária de amostras que possuam estrutura cristalina, isto é, aquelas com os átomos organizados em um arranjo repetitivo na estrutura, formando um conjunto de planos cristalográficos. A difração da radiação incidente sobre uma amostra ocorre quando seu comprimento de onda é comparável aos espaçamentos característicos do material sob análise.

Na técnica de difração de pó, um feixe de raios X monocromático é direcionado para a amostra que se encontra pulverizada e espalhada sobre um suporte. A intensidade da difração é medida pelo movimento do detector ao longo de diferentes ângulos em relação à amostra (Fig. 3.1). Para analisar os dados obtidos, aplica-se a equação de Bragg (3.1)

$$2d \sin\theta = \lambda \quad , \quad (3.1)$$

onde  $d$  é o espaçamento dos átomos da amostra,  $\theta$  é o ângulo do feixe difratado da radiação incidente com a amostra,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente [5].



**Figura 3.1.** Difração de raios X em planos atômicos.

O espaçamento interplanar ( $d_{h,k,l}$ ) é a distância entre dois planos atômicos adjacentes e paralelos que possuem os mesmos índices de Miller<sup>5</sup>  $h$ ,  $k$  e  $l$ . Essa distância pode ser calculada em função do parâmetro de rede  $a$  e dos índices de Miller (3.2).

$$d_{h,k,l} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (3.2)$$

em que  $d_{hkl}$  é o espaçamento entre os planos,  $a$  é parâmetro de rede que corresponde ao comprimento da aresta da célula unitária e  $h$ ,  $k$  e  $l$  são os índices de Miller.

O tamanho dos cristais que compõem a amostra, também chamados de grão pode ser obtido por meio da equação de Scherrer (3.3) [95]

$$\tau = \frac{K\lambda}{B \cos\theta} \quad (3.3)$$

onde  $\tau$  é o tamanho do cristal (nm),  $K$  é a constante de Scherrer (com valor de 0,9 para partículas esféricas e 1 para outras formas),  $\lambda$  é o comprimento de onda da fonte de radiação,  $B$  é a largura a meia altura do pico de maior intensidade e  $\theta$  é a posição angular da fonte de raios X.

Para a identificação do material analisado, os resultados obtidos são então comparados com aqueles disponíveis nas bases de dados cristalográficos existentes.

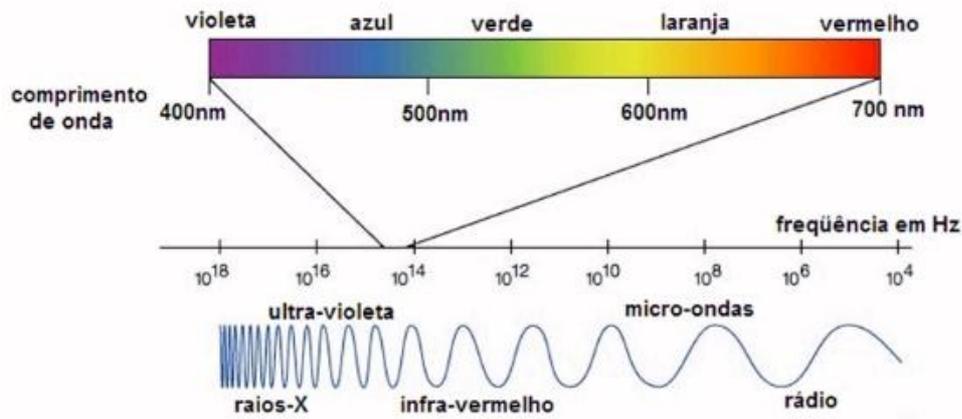
### 3.2 Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta visível

Na espectroscopia de absorção é medida a intensidade da luz absorvida por uma amostra como função de seu comprimento de onda, o que fornece informações qualitativas e quantitativas a respeito da natureza da mesma. Na absorção molecular estão envolvidos três tipos de energia: eletrônica, vibracional e rotacional.

Através da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível é possível identificar e determinar a concentração dos compostos presentes em um dado material e obter informações sobre a energia dos níveis eletrônicos correspondentes. A energia envolvida nesses processos corresponde a comprimentos de onda na faixa de 400-700 nm (Fig. 3.2) e diz respeito a transições envolvendo os elétrons da camada de valência. [96].

---

<sup>5</sup> Os planos cristalográficos são especificados através dos índices de Miller na forma ( $h k l$ ).



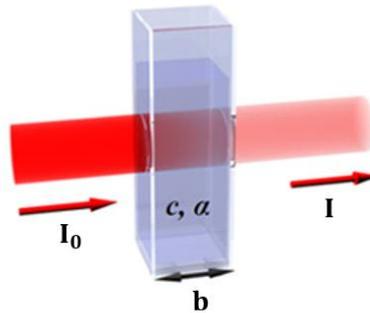
**Figura 3.2.** Espectro eletromagnético.

A energia de uma radiação eletromagnética obedece à relação

$$\Delta E = h\nu \quad , \quad (3.4)$$

onde  $E$  é a energia do fóton,  $\nu$  é a frequência, e  $h$  é a constante de Planck.

Quando a radiação atravessa uma cubeta que possui caminho óptico ( $b$ ) em cm, que contém uma solução absorvente com determinada concentração ( $c$ ), após a interação da luz com a amostra ocorre uma diminuição da intensidade da radiação incidente ( $I_0$ ), como demonstrado na Fig.3.3



**Figura 3.3.** Representação do processo de absorção da radiação eletromagnética.

Assim, a quantidade de luz absorvida pela amostra é obtida através da transmitância, que é a razão entre a intensidade da radiação transmitida ( $I$ ), isto é, após a luz passar através da amostra, e a da radiação incidente ( $I_0$ )

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.5)$$

A absorbância depende da transmitância na forma

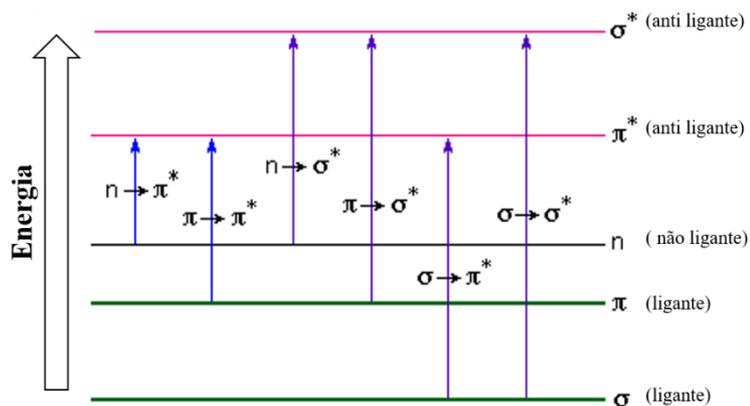
$$A = -\text{Log } T \quad , \quad (3.6)$$

de onde se obtém a relação,

$$A = \log \frac{I_0}{I} = abc = \epsilon bc \quad , \quad (3.7)$$

conhecida como a Lei de Lambert-Beer, que expressa a relação entre a concentração ( $c$ ) do absorvente em mol/L, o caminho ótico ( $b$ ) percorrido pela radiação em cm, onde  $a$  é constante de proporcionalidade também chamada de absorvidade ( $\epsilon$ ). É importante ressaltar que a lei de Lambert-Beer não é válida se concentrações elevadas são usadas [5].

Antes da amostra ser submetida a alguma forma de energia (calor, luz, entre outras), as moléculas estão predominantemente em seu estado fundamental, isto é, estado de menor energia. Quando a radiação eletromagnética, por exemplo, atravessa a amostra, pode ocorrer uma transição eletrônica para um estado de maior energia (estado excitado). A transição eletrônica ocorre se a energia for igual à diferença de energia entre dois estados permitidos. Na teoria dos orbitais moleculares, quando os elétrons são excitados passam a ocupar um orbital não ocupado, assim a transição de energia mais baixa ocorre do orbital molecular ocupado de maior energia (em inglês, Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) para o orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (Lowest Unoccupied Molecular Orbital-LUMO) [97]. A Fig. 3.4 mostra as possíveis transições eletrônicas.



**Figura 3.4.** Possíveis transições eletrônicas.

O espectrofotômetro é o equipamento utilizado para realizar as medidas de espectroscopia no UV-VIS. Este equipamento é composto por uma fonte de luz, um monocromador e um detector. Existem duas configurações possíveis para o espectrofotômetro: instrumentos com feixe simples, e aqueles de feixe duplo. Na configuração de feixe duplo, o compartimento da amostra possui espaço para duas cubetas, uma de referência, que contém

apenas a mesma solução utilizada com a amostra, e uma segunda cubeta, onde se coloca a amostra a ser analisada. A absorvância da amostra é obtida através da subtração do resultado para a amostra de referência [98].

### 3.2.1 Quantificação da contaminação de ácidos nucleicos por espectroscopia UV-VIS

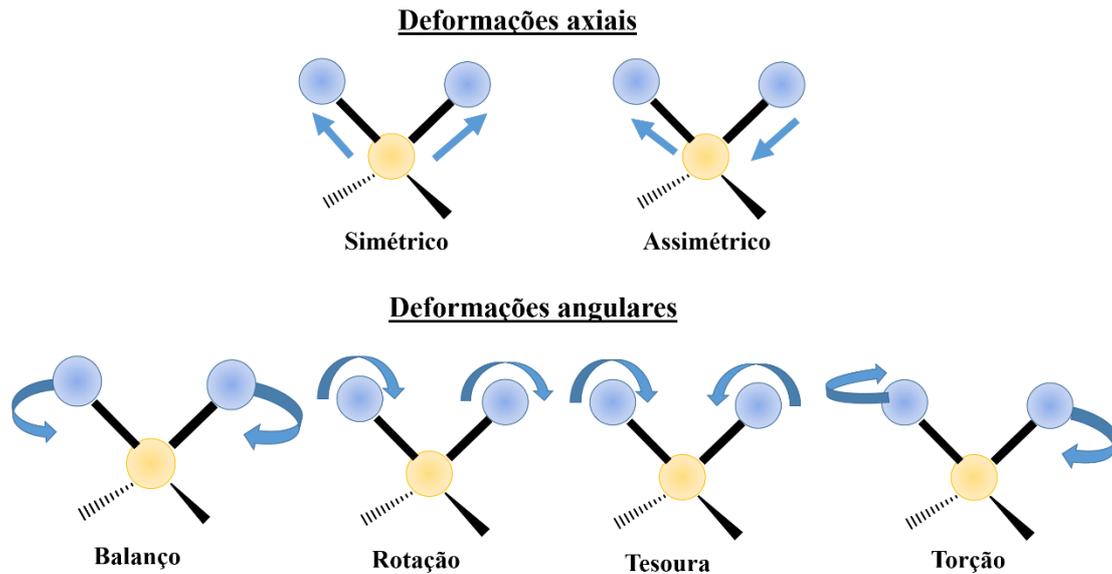
As moléculas de ácido nucleicos apresentam forte absorção em comprimento de onda próximo a 260 nm, o que se deve à presença dos anéis heterocíclicos dos nucleotídeos. É possível verificar a pureza da amostra através da razão das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), estando o valor de referência na faixa de 1,8-2,0; a obtenção de valores inferiores a isso indica a presença de interferentes como sais, solventes (por exemplo, o fenol) [71, 99].

A absorvância dos nucleotídeos é diferente, a depender se a cadeia de DNA está na forma de fita simples ou dupla. Quando comparada com o DNA de cadeia dupla, a fita simples apresenta maior absorvância, sendo a diferença decorrente da leve mudança na estrutura da molécula causada pelas interações hidrofóbicas e dipolo-dipolo, o que altera a distribuição eletrônica das bases, no chamado efeito hipocrômico [72, 99]. Deste modo, uma unidade de absorvância para o DNA de cadeia dupla e fita simples corresponde a 50 e 33 ng, respectivamente [98].

## 3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Radiação infravermelha é a radiação eletromagnética de comprimentos de onda mais longos (e, portanto, de mais baixas frequências) do que a luz vermelha. Geralmente a radiação infravermelha não tem energia suficiente para provocar transições eletrônicas, mas pode ocasionar transições nos estados vibracionais e rotacionais. A espectroscopia no infravermelho permite identificar a estrutura química das moléculas [97].

Qualquer comprimento de ligação entre dois átomos muda de tamanho com a aproximação ou afastamento entre eles, em um movimento conhecido como deformação axial ou estiramento. A deformação angular ou dobramento acontece quando moléculas poliatômicas vibram, causando alteração nos ângulos das ligações. A vibração das moléculas depende das massas dos átomos envolvidos e da força da ligação entre eles [5]. As deformações axiais podem ocorrer de maneira simétrica ou assimétrica, enquanto as deformações angulares podem acontecer de quatro maneiras: balanço, rotação, tesoura e torção (Fig. 3.5).



**Figura 3.5.** Representação das possíveis deformações axiais ou angulares que pode acontecer em uma molécula.

### 3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia é uma técnica que permite visualizar estruturas muito pequenas, com dimensão na ordem de micrometro ( $10^{-6}\text{m}$ ), possibilitando a observação de detalhes que não são perceptíveis a olho nu, o que é possível por meio da ampliação da imagem dos objetos pelas lentes.

Há dois tipos de microscopia: a óptica e a eletrônica. A diferença consiste na fonte de radiação utilizada: enquanto na microscopia óptica, que possui um limite de magnificação em torno de 2000 vezes, o feixe emitido é de fótons, na microscopia eletrônica o feixe é de elétrons, o que torna possível ampliar a imagem por mais de 50.000 vezes.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) fornece informações a respeito da superfície, morfologia, com uma imagem tridimensional com alta resolução de amostras sólidas, a identificação de elementos químicos (quando acessórios especiais são acoplados ao microscópio). O princípio desta técnica está baseado na utilização de um feixe de elétrons acelerado por uma alta tensão criada entre o filamento e o ânodo, e que é focalizado sobre a amostra por lentes eletromagnéticas. A imagem é formada a partir da interação entre o feixe de elétrons e o feixe de elétrons refletido (retroespalhado) sobre a superfície da amostra, emitindo um sinal para o detector. Geralmente a fonte de elétrons utilizada é um filamento de tungstênio (W) [100].

Como a superfície da amostra a ser analisada precisa ser condutora de eletricidade, a alternativa para materiais isolantes é o seu revestimento por uma fina camada de ouro, através de um processo chamado de metalização [28].

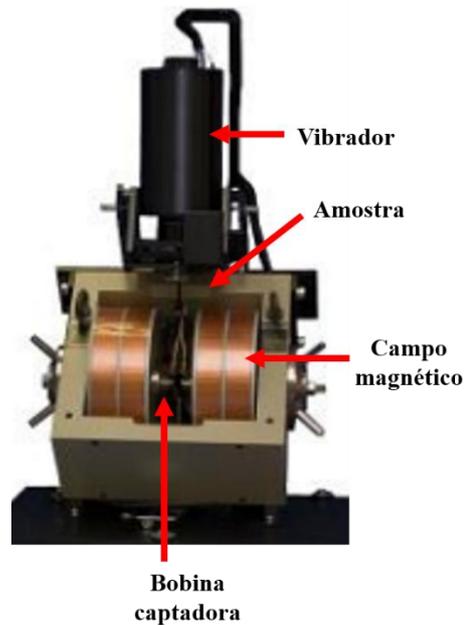
### 3.5 Propriedades magnéticas

Materiais magnéticos são compostos por pequenas regiões magnetizadas chamadas de domínios magnéticos, onde os átomos apresentam o mesmo alinhamento. Os materiais apresentam diferentes respostas quando um campo magnético externo ( $H$ ) é aplicado, e de acordo com suas propriedades magnéticas podem ser classificados como: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos e antiferromagnéticos.

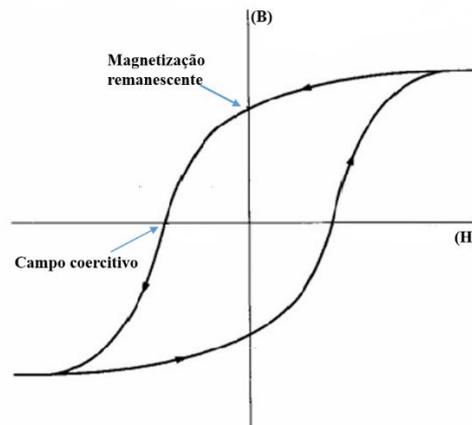
Para materiais diamagnéticos, quando o campo de magnetização externo é aplicado os átomos respondem em sentido contrário ao campo, e por isso não ocorre atração entre eles, enquanto que os materiais paramagnéticos são fracamente atraídos, uma vez que alguns domínios se alinham no mesmo sentido do campo. Já os materiais ferromagnéticos apresentam magnetização devido a uma forte interação entre os domínios magnéticos, e os materiais ferrimagnéticos possuem momentos magnéticos diferentes, e assim apresentam magnetização espontânea (os materiais naturais que tem essa característica são conhecidos como ferritas).

O magnetômetro de amostra vibrante (MAV, em inglês vibrating sample magnetometer - VSM), foi desenvolvido em 1955 por Simon Foner para medir propriedades magnéticas. A técnica consiste em inserir a amostra na extremidade inferior de um tubo estreito não magnético, que é encaixado no vibrador pela extremidade superior, e então submetido ao campo magnético; quando as amostras começam a vibrar até alcançar a magnetização de saturação ( $M_s$ ), o sinal elétrico emitido é capturado através das bobinas captadoras (Fig. 3.6) [101].

Para conhecer as propriedades de saturação, se aplica um campo de magnetização externo ( $H$ ) até que o material alcance um limite onde a magnetização não aumenta mais; neste momento, os domínios estão alinhados e o material atinge a magnetização de saturação ( $M_s$ ). Ao retirar o campo magnético, alguns domínios mantêm o alinhamento adquirido, conhecido como magnetização remanescente ( $M_r$ ), para conhecer o comportamento por completo do material analisado é necessário promover a desmagnetização, isto acontece por aplicação de um campo magnético em sentido contrário, até que a saturação seja atingida, este efeito é chamado de campo coercitivo. Esses dados são mostrados na curva de magnetização, também chamada de curva de histerese (Fig. 3.7).



**Figura 3.6.** Magnetômetro de amostra vibrante.



**Figura 3.7.** Curva de magnetização.

### 3.6 Eletroforese

Eletroforese é uma técnica de separação de macromoléculas, que é usada principalmente no caso de ácidos nucleicos e proteínas. A separação se faz pela migração de uma molécula carregada através de um gel, devido à aplicação de um campo elétrico externo. No caso do DNA, que é uma molécula carregada negativamente devido à presença dos grupos fosfatos, a migração ocorre do cátodo (pólo negativo) em direção ao ânodo (pólo positivo) [102].

O gel da eletroforese pode ser feito com poliacrilamida ou agarose (um polissacarídeo extraído de alga marinha). A escolha da matriz (gel) depende do tamanho do fragmento que se deseja visualizar. O gel de poliacrilamida é moldado em um suporte que apresenta uma

configuração vertical, e é mais usado para o caso de moléculas de DNA, que possuem tamanho pequeno, enquanto que o gel de agarose, de configuração horizontal é usado para a separação de fragmentos maiores (0,2 kb a 50 kb<sup>6</sup>) [103]. Já na eletroforese capilar, a amostra passa por um tubo estreito, que é submetido a uma alta voltagem, promovendo a separação em um menor intervalo de tempo.

A migração da molécula através da matriz depende de fatores como a concentração de agarose, o tamanho, a conformação e a densidade da molécula, a voltagem e a solução-tampão utilizados. A concentração de agarose influencia na porosidade do gel, e conseqüentemente a concentração a ser utilizada depende do tamanho da molécula que se deseja separar, uma vez que a separação de fragmentos grandes não ocorrerá em uma matriz de poros pequenos. O tamanho da molécula também interfere na mobilidade, e assim, quando os fragmentos da molécula são pequenos, eles se distanciam mais rápido do poço (local onde futuramente serão inseridas as amostras) [104].

O procedimento de eletroforese em gel de agarose consiste em quatro etapas (preparação do gel, inserção da amostra, a corrida eletroforética e a análise do resultado), que são descritas a seguir.

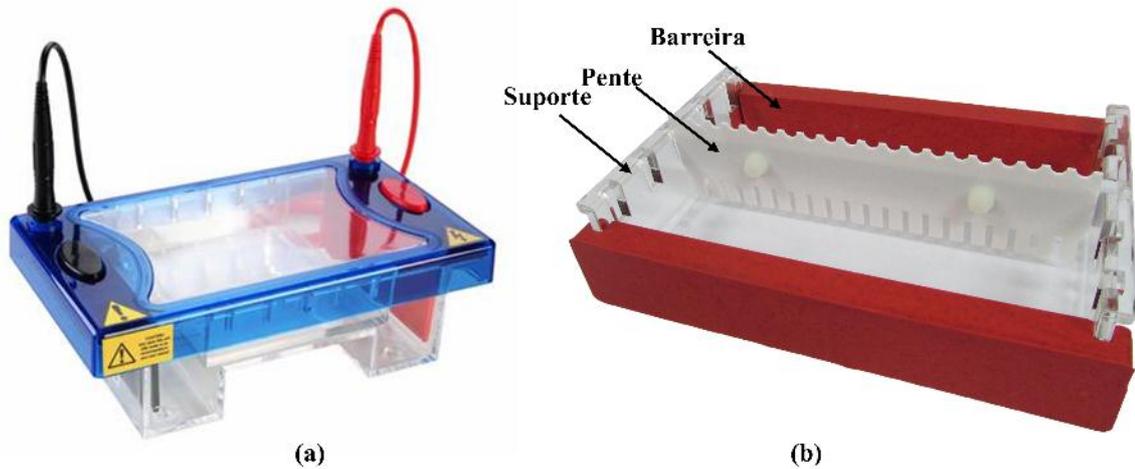
O processo da eletroforese se inicia pela dissolução da agarose em uma solução-tampão (geralmente utiliza-se TAE, TBE e TPE<sup>7</sup>), e para uma completa dissolução submete a solução ao forno de micro-ondas. Em seguida, um corante é inserido para permitir a visualização do DNA quando submetido a uma luz ultravioleta. A solução é então colocada em um suporte e neste momento um acessório chamado de pente é inserido, para a criação dos poços. Após sua solidificação, o gel de agarose é colocado na cuba de eletroforese e recoberto com a mesma solução-tampão utilizada para a dissolução da agarose no início do procedimento. Posteriormente, o pente é retirado com cuidado para evitar a união dos poços. Para inserir a amostra no poço se faz necessário adicionar um corante para atribuir densidade a amostra e assim impedir a saída prévia do poço. Deve ser ressaltado que em cada poço deve ser inserida apenas uma amostra. Nesta etapa é interessante colocar em um poço uma amostra de DNA padrão, isto é, com peso molecular conhecido, para permitir a comparação e assim determinar o tamanho da molécula analisada. Agora, a cuba de eletroforese é fechada, os eletrodos são acoplados e a fonte ligada com uma voltagem específica (60-100 V). No decorrer da corrida, a amostra deixa o poço, percorrendo o gel até o momento que se nota uma separação entre as bandas, quando a fonte de energia pode ser desligada, sendo necessário prestar maior atenção

---

<sup>6</sup> 1 Kb corresponde a 1000 pares de bases.

<sup>7</sup> TAE=Tris-Acetato-EDTA, TBE é Tris-Borato-EDTA e TPE corresponde a Tris-Fosfato-EDTA.

neste momento, para que a amostra não ultrapasse o gel. Para a visualização, o gel é então transferido para um transiluminador de luz ultravioleta [103]. Na Figura 3.8 mostramos a cuba de eletroforese de configuração horizontal (a) e os acessórios (b) usados nesta técnica.



**Figura 3.8.** Cubo de eletroforese de configuração horizontal (a) e acessórios (b).

Embora há algum tempo atrás o gel fosse usualmente corado com brometo de etídio, que emite uma fluorescência de cor laranja na presença de cadeias de DNA em dupla hélice, esse método não é mais indicado por conta da toxicidade desse reagente [105]. Como alternativa, hoje em dia são utilizados corantes como azul de bromofenol, xileno cianol, *orange G*, e *blue orange* [103].

### 3.7 Reação em cadeia da polimerase

A introdução há pouco mais de 30 anos da técnica da reação em cadeia da polimerase (em inglês, Polymerase Chain Reaction-PCR) é um marco histórico na área da genética e da biologia. Ela foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983, para a amplificação (isto é, o aumento da concentração) de uma sequência de DNA específico, possibilitando a rápida produção de milhões de cópias da sequência desejada [106]. Uma vantagem de seu uso em diversas aplicações médicas e forenses, é que a PCR oferece a possibilidade de amplificar uma sequência determinada de uma cadeia de DNA a partir de uma pequena quantidade da amostra original. Ocorre, porém, que essa técnica ainda é cara e sua operação requer a presença de pessoas treinadas capazes de realizar o procedimento com os cuidados necessários em termos da concentração dos reagentes e da limpeza do ambiente.

Existem diferentes tipos de PCR: a PCR convencional (cPCR), do que resultam dados qualitativos, a PCR em tempo real (qPCR), que pode fornecer resultados quantitativos, a PCR

*multiplex*, onde são detectadas simultaneamente duas ou mais sequências de DNA, e a PCR de transcrição reversa (RT-PCR), na qual se parte de cadeias de RNA para obter a formação de cadeias de DNA em fita dupla (DNA complementar-cDNA).

Para realizar uma amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase, se faz necessário fazer a master mix (junção dos reagentes):

- 1- O DNA molde, isto é, que possui a região que pretende amplificar;
- 2- Dois iniciadores<sup>8</sup>, também chamados de primers, (frente e reverso), que são utilizados para iniciar a replicação do DNA por meio do grupo hidroxila na extremidade 3';
- 3- Os desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs), que são as bases nitrogenadas adenina, citosina, guanina e timina;
- 4- DNA polimerase, que é uma enzima termoestável (responsável pela polimerização dos dNTPS nas cadeias de DNA);
- 5- Água livre de nuclease e solução-tampão.

A reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) consiste em três etapas (Fig. 3.9): a primeira envolve o aquecimento da amostra a 95°C, para que haja a desnaturação da fita dupla do DNA, para em seguida ocorrer o anelamento (hibridização) dos iniciadores – o que acontece entre 40-60°C – com as fitas simples obtidas na primeira etapa (quando se faz então necessário adicionar a quantidade correta de iniciador, de modo a evitar a formação de dímeros, ou seja a ligação entre os primers), e, por fim, a terceira etapa, onde acontece a extensão das cadeias sintetizadas a 72°C. As três etapas citadas são usadas em repetidos ciclos de amplificação, e geralmente são realizados de 35 a 40 ciclos. Após os ciclos, os amplicons, isto é, os produtos da amplificação da PCR, podem ser analisados por espectroscopia UV-VIS e eletroforese. A amplificação ocorre de maneira exponencial, ou seja na forma  $2^n$ , e assim, a partir da amostra original contendo a sequência do DNA alvo, no primeiro ciclo se obtém 4 cópias, no segundo ciclo 8 cópias, e assim por diante, de tal maneira que em um intervalo de tempo muito curto podem resultar bilhões de cópias da sequência desejada, como demonstrado na Figura 3.10 [105].

---

<sup>8</sup> Um iniciador é uma sequência da fita de DNA complementar ao molde.

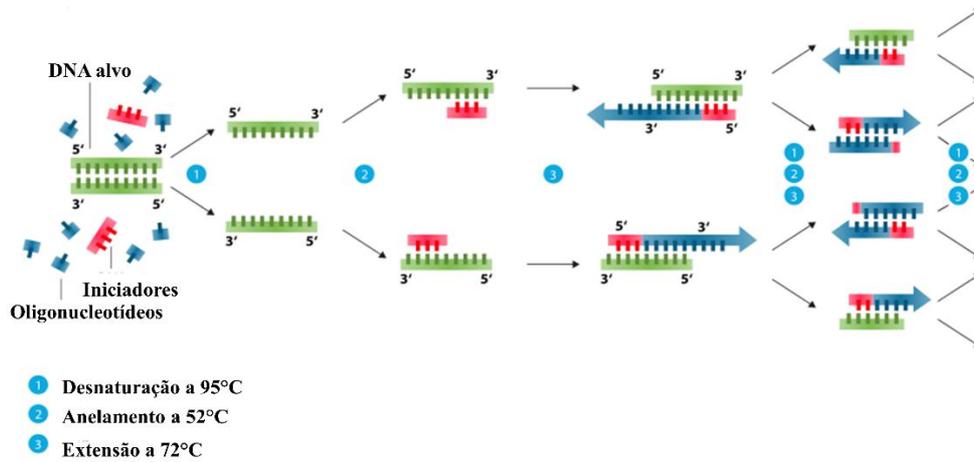


Figura 3.9. Reação em cadeia da polimerase.

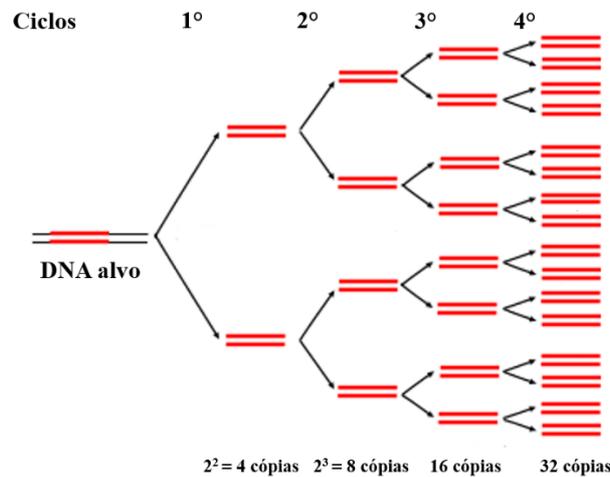


Figura 3.10. Amplificação da sequência de DNA alvo.

Muitas das descobertas relacionadas ao metabolismo do DNA foram realizadas com a *Escherichia coli*. Em 1955, a partir de células de *E. coli*, Arthur Kornberg, com a ajuda de colaboradores, purificou e caracterizou a DNA-polimerase, a primeira enzima capaz de sintetizar DNA [71]. Com a continuidade dos estudos, outros tipos de DNA-polimerase foram descobertos, como, por exemplo, DNA polimerases termoestáveis, que proporcionaram uma facilidade na sequência dos ciclos de PCR, por serem adequadas para a amplificação de DNA em altas temperaturas necessárias para esta técnica, o que pode diminuir problemas de formação de estruturas secundárias; um exemplo de enzima termoestável é a Taq polimerase, obtida a partir da bactéria termófila *thermus aquaticus*, que é encontrada em fontes termais [107].

A revisão da literatura sobre algumas técnicas utilizadas neste trabalho permitiu uma melhor interpretação dos resultados obtidos para as caracterizações e aplicação das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$  e do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$ , que serão mostrados no capítulo seguinte.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descreveremos como foi realizada a síntese das nanopartículas magnéticas e a sua polimerização, como também os procedimentos de preparação das NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui) e do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana@Polianilina para as caracterizações, bem como a aplicação em extração e purificação de DNA em meio aquoso e sistema biológico (sangue humano).

### 4.1 Materiais

Conforme listado na Tabela 4.1, todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção da anilina, que antes de ser utilizada foi previamente purificada por destilação sob vácuo. Em todos os experimentos realizados neste trabalho, utilizamos água deionizada obtida a partir de um sistema Synergy (Milipore, EUA).

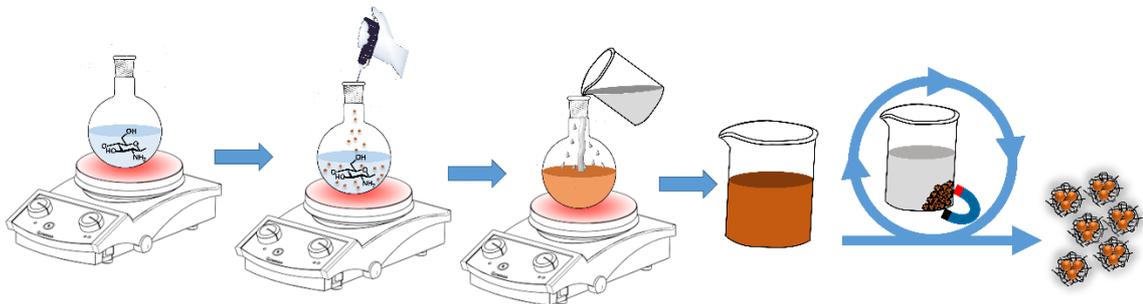
**Tabela 4.1** Reagentes utilizados para a síntese e aplicação das NPMs e do NCM.

Reagente	Fornecedor (país de origem)
Acetato de potássio - $\text{CH}_3\text{COOK}$	Applichem (Alemanha)
Cloreto de ferro III hexahidratado - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Dinâmica (Brasil)
Anilina - $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	Nuclear (Brasil)
Fosfato de sódio monobásico - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Nuclear (Brasil)
Fosfato de sódio bibásico - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Nuclear (Brasil)
Agarose - $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$	Promega (EUA)
Corante <i>blue orange</i>	Promega (EUA)
Diamond	Promega (EUA)
Glicina - $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Promega (EUA)
Proteinase K	Promega (EUA)
Tris-Acetato-EDTA (TAE) 40X	Promega (EUA)
Tris (hidroximetil) aminometano - $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$	Promega (EUA)
Ácido acético - $\text{CH}_3\text{COOH}$	Química moderna (Brasil)
Ácido clorídrico - $\text{HCl}$	Química moderna (Brasil)
Ácido etilenodiamino tetra acético disódico - EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}_2$	Química moderna (Brasil)
Cloreto de sódio - $\text{NaCl}$	Química moderna (Brasil)
Hidróxido de amônio - $\text{NH}_4\text{OH}$	Química moderna (Brasil)
Hidróxido de sódio - $\text{NaOH}$	Química moderna (Brasil)
Metanol - $\text{CH}_3\text{OH}$	Química moderna (Brasil)
Cloreto de ferro II tetrahidratado - $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich (EUA)
Dodecil sulfato de sódio - SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	Sigma Aldrich (EUA)
DNA esperma de salmão sal de sódio	Sigma Aldrich (EUA)
Persulfato de amônio - APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Sigma Aldrich (EUA)
Quitosana - $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N})_n$ baixo peso molecular com grau de desacetilação entre 75-85%	Sigma Aldrich (EUA)
Triton X-100 - $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{C}_6\text{H}_4(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	Vetec (Brasil)

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana

As nanopartículas magnéticas (NPMs) de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana foram obtidas pelo método de co-precipitação química [14]. Primeiramente, em 20 mL de água deionizada, foram adicionados 2,08 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e 0,8 g de FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, após esta solução foi gotejada sob agitação de 1000 rpm em um balão de fundo redondo contendo uma solução de quitosana<sup>9</sup> (0,25 g de quitosana em 100 mL de CH<sub>3</sub>COOH 1% (v/v)). A suspensão foi mantida sob agitação por 1 h à temperatura de 40°C. Após esse intervalo, foram adicionados lentamente 15 mL de NH<sub>4</sub>OH a 28% (v/v), e a agitação prosseguiu por mais 30 minutos, resultando a formação de um precipitado marrom. O produto resultante foi purificado usando NaOH 0,03 M e decantado magneticamente com o auxílio de um ímã para tirar o sobrenadante, este procedimento foi realizado três vezes. Depois, foram realizadas sucessivas lavagens do produto obtido (pó marrom) com água deionizada e decantado novamente para eliminar qualquer impureza não magnética. Por último, o pó é seco a 40 °C por 36 h (Fig 4.1) [108].



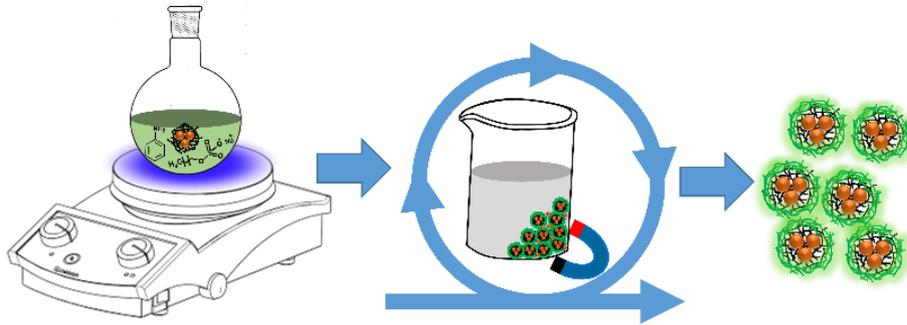
**Figura 4.1.** Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana.

### 4.2.2 Polimerização das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana

A polimerização da anilina sobre a superfície das NPMs foi realizada de acordo com o procedimento descrito na Ref. [109]. Inicialmente, em um balão de fundo redondo são adicionados 100 mL de HCl (0,1 M), 7,3 mmol de SDS, 60 mg das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui e 1,5 mM de anilina. Após 15 min de agitação, foram adicionados lentamente 20 mL de HCl 0.1 M contendo 0,18 mmol de persulfato de amônio (APS), sendo a reação de polimerização permitida ocorrer por 24h, a uma temperatura de 5°C e sob agitação constante. O produto resultante é então submetido a lavagens sucessivas com metanol e água deionizada, em cada lavagem o

<sup>9</sup> Para a completa solubilização da quitosana, é necessário que a solução tenha permanecido sob agitação prévia por 24h, sendo a solução filtrada a vácuo após esse intervalo.

produto é recuperado com o uso de um ímã (ver Fig. 4.2). Finalmente o material é seco a 40 °C por 24 h.



**Figura 4.2.** Polimerização das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana.

### 4.3 Métodos de caracterização das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana e do NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana@Pani

#### 4.3.1 Difração de raios-X

Para obter informações sobre a estrutura cristalina das NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui e do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani, foi utilizado um difratômetro de raios-X modelo D5000 (Siemens, Alemanha), com raios-X emitidos pelo cobre ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) a um ângulo ( $2\theta$ ) na faixa de  $10^\circ$ - $70^\circ$ , com passos de  $0,02^\circ/\text{s}$ .

#### 4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível

Para observar as transições eletrônicas das nanopartículas e do nanocompósito utilizamos um espectrofotômetro UV-VIS UV-2600 (Schimadzu, Japão). A amostra, na forma de pó, foi dispersa em água deionizada e transferida com um micropipetador para uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. Para os testes de adsorção e dessorção entre o nanocompósito e o DNA, os experimentos foram realizados em um Nanodrop 2000 C (Thermo Scientific, EUA).

#### 4.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Para identificar os grupos funcionais presentes nas NPMs e no NCM foi utilizado um espectrofotômetro IRTracer-100 (Schimadzu, Japão). As amostras foram preparadas com pastilha de brometo de potássio (KBr) e os espectros obtidos no intervalo de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Esta técnica foi utilizada para observar a morfologia das NPMs e do NCM, sendo as micrografias obtidas através do uso do microscópio FEG-SEM MIRA3 LM (TESCAN, Europa) do Departamento de Física da UFPE.

As amostras foram preparadas do seguinte modo: em um eppendorf de 1,5 mL, foram adicionadas as nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana e, em seguida 1,0 mL de água deionizada, sendo o eppendorf colocado em um banho de ultrassom (ultrasonic cleaner USC 1450, Unique, Brasil) por uma hora, para uma melhor dispersão das partículas. Após este tempo, colocamos gotas da dispersão sobre um substrato de vidro previamente limpo fixado sobre um suporte metálico que continha fita de carbono. O mesmo procedimento foi realizado para o nanocompósito.

#### 4.3.5 Curvas de magnetização

As curvas de magnetização foram obtidas por um magnetômetro de amostra vibrante (Microsense EV7, EUA) do Departamento de Física da UFPE.

#### 4.3.6 Área superficial BET

Para determinar a área superficial, o tamanho e volume dos poros das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui e do NCM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani foi utilizada a adsorção e dessorção de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) a 77 K com os métodos de Brunauer-Emmett-Teller (BET) e Barrett-Joyner-Halenda (BJH) usando um ASAP 2420 system (Micromeritics, EUA) no Cetene.

### **4.4 Aplicação das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui e do NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani para extração de DNA em meio aquoso e sistema biológico**

#### 4.4.1 Adsorção

Após a caracterização dos materiais, realizamos uma prova de conceito para verificar se as NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui e do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani têm a capacidade de adsorver DNA.

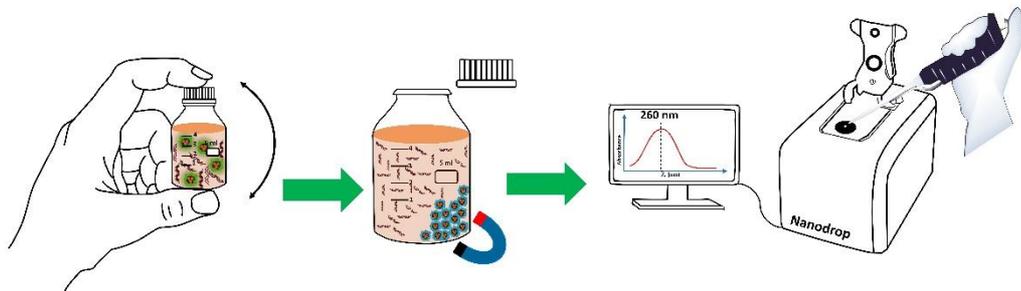
Para isto, as NPMs e o NCM foram colocadas por separado sob interação em um sistema ideal usando DNA de esperma de salmão de cadeia dupla, com aproximadamente 2000 pares de bases (pb) e massa molecular de  $1,3 \times 10^6$  g/mol. A capacidade dos nossos materiais foi verificada por meio da observação da intensidade do pico característico de DNA no

comprimento de onda de 260 nm. As medidas foram realizadas antes e depois da interação com o DNA.

O teste foi realizado do seguinte modo: em um eppendorf de 1,5 mL, adicionamos 4 mg do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  e 500  $\mu\text{L}$  da solução-tampão de ligação glicina/HCl pH 3,6, e agitamos no vortex por 5s; em seguida, inserimos 500  $\mu\text{L}$  da solução de DNA de esperma de salmão, que foi mantida sob agitação por dez minutos (sendo que, a cada minuto, o eppendorf era submetido a quinze segundos de agitação no vortex); depois disso, o nanocompósito era confinado magneticamente e uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  retirada para realização da medida de absorbância. Para fim de comparação, o mesmo procedimento foi realizado separadamente com as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$ .

#### 4.4.2 Dessorção

Após realizar os experimentos de adsorção, confinamos magneticamente o nanocompósito e retiramos o sobrenadante, realizando a lavagem pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de glicina/HCl a pH 3,6 e agitação no vortex por 30 s. Em seguida, confinamos magneticamente o NCM e realizamos uma medida de absorbância para verificar se o NCM estaria ou não liberando o DNA adsorvido na etapa anterior. Depois, realizamos o procedimento de dessorção, que foi feito com a retirada do sobrenadante e adição de 1000  $\mu\text{L}$  de solução-tampão de pH básico ao NCM (Fig. 4.3). Com base na Eq. 4.1, examinamos como conseguir liberar a maior quantidade de DNA adsorvido, testando o uso de diferentes soluções-tampão: fosfato monobásico/fosfato bibásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a pH 7,6, SDS/NaOH a pH 11,0 e Tris/HCl a pH 8,0



**Figura 4.3.** Representação do experimento de dessorção do DNA.

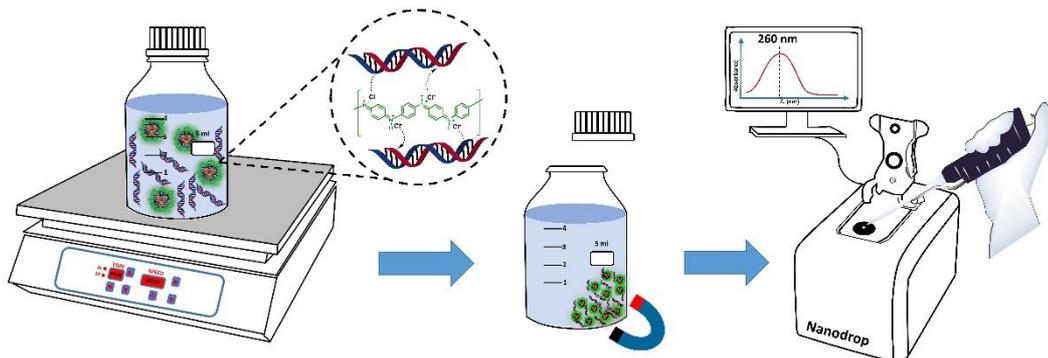
$$\text{Dessorção (\%)} = \frac{C_{\text{dessorvida}}}{C_0 - C_f} \quad (4.1)$$

#### 4.4.3 Tempo de interação e concentração inicial de DNA

A interação entre o NCM e o DNA de espermatozóide de salmão foi realizada para estudar a capacidade de adsorção do mesmo perante diferentes quantidades do NCM, tempo de interação e concentração inicial de DNA.

Desse modo, foram estudadas as quantidades de 2, 3, 4 e 5 mg do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  em função de diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 25, 35, 45, 65, 85, 105, 125 e 145 min). O procedimento foi realizado em frascos de vidro de 5 mL contendo a quantidade correspondente de NCM, em seguida adicionamos 2,5 mL da solução-tampão de ligação glicina/ HCl pH 3,6. Após agitação no vortex por 5 s, adicionamos 2,5 mL da solução de DNA com concentração de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , que foi então mantida sob agitação por até 145 min. Em cada intervalo de tempo determinados, confinamos magneticamente o NCM e retiramos uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  para realizarmos a medida de absorbância no espectrofotômetro Nanodrop (Fig. 4.4).

Para estimar o efeito da concentração inicial de DNA ao NCM, foram realizados testes com diferentes concentrações (4,5; 8,5; 17,0; 33,5; 55; 118; e 173 ng/ $\mu\text{L}$ ) do DNA de espermatozóide de salmão por 60 minutos de agitação. Para esses experimentos, que demandaram mais tempo de execução, usamos a placa agitadora conhecida como “orbital shaker” (SHKE 2000 E-CLASS, Barnstead Lab-Line, EUA) com 230 rotação por minuto (rpm), este modo de execução será chamado de modo batelada.



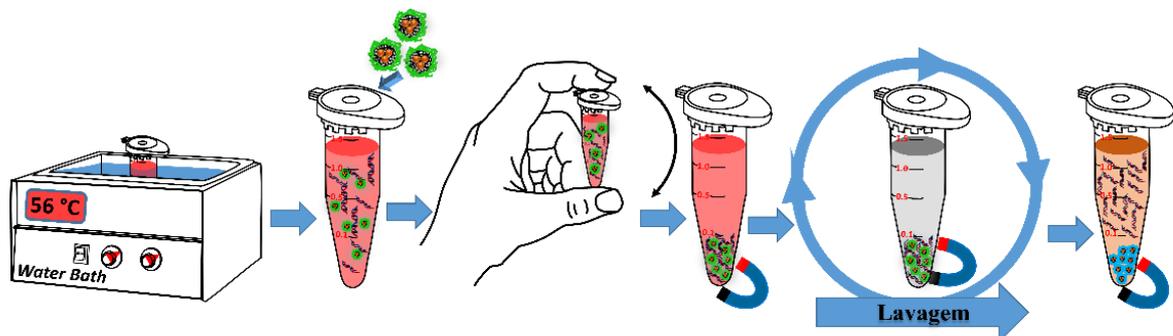
**Figura 4.4.** Esquema do experimento para investigação dos parâmetros do processo de adsorção.

#### 4.4.4 Extração de DNA a partir de amostras de sangue total

O sangue humano foi coletado por punção venosa no Laboratório de Genética da UFPE, e armazenado em tubo de coleta com anticoagulante (EDTA), sendo sua transferência para o Laboratório de Polímeros Não-Convencionais (PNC) feita em um isopor contendo placas de gelo, para minimizar o processo de hemólise.

O procedimento realizado para extração de DNA a partir de sangue humano será descrito por etapas, que estão representadas na Fig. 4.5.

- 1- Em um eppendorf de 2 mL adicionamos 5  $\mu$ L de proteinase K, 100  $\mu$ L de sangue e 500  $\mu$ L da solução de lise (água/triton X-100 a 0,1%, pH 6), o eppendorf foi incubado em banho-maria (BM100, Yamato Scientific) a 56°C por 20 min, sendo agitado no vortex por 30 s, a cada 5 min;
- 2- Após a incubação, 1,2 mL da solução glicina/HCl/ NaCl a pH 3,3 foram adicionados a 4 mg do NCM e transferidos para o eppendorf da etapa anterior. O tempo de interação adotado foi de 10 min, sendo que a cada 1 min o eppendorf era colocado por 15 s no vortex, após o NCM foi confinado magneticamente, com o sobrenadante sendo descartado;
- 3- Em seguida, tem início a etapa de lavagem. Para isso se usa uma solução preparada pela adição de 1,7 mL de etanol para cada 1 mL da solução de lavagem (acetato de potássio-Tris/HCl/EDTA); ao eppendorf que contém o NCM é adicionado 900  $\mu$ L desta solução, que é agitada por 30 s no vortex, e após esta etapa se confina magneticamente o NCM, descartando o sobrenadante. Esse procedimento é repetido por mais duas vezes, totalizando três lavagens, quando então o eppendorf é deixado aberto por 5 min para permitir a evaporação do etanol;
- 4- Por fim, 30  $\mu$ L da solução de eluição  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,6 é inserido no eppendorf, que é então agitado por 15 s no vortex. O sistema é deixado em incubação por 10 min, com o cuidado de garantir que o NCM fique de fato em contato com a solução de eluição, após o que o eppendorf é novamente agitado no vortex por 15 s, e em seguida utilizamos um ímã para concentrar o NCM no fundo do eppendorf. Esta etapa é repetida por mais uma vez, quando enfim o sobrenadante é retirado e armazenado em um eppendorf limpo.



**Figura 4.5.** Procedimento para extração de DNA de uma amostra complexa (sangue humano).

## 4.5 Caracterizações da aplicação das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana e do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosana@Pani para extração de DNA

### 4.5.1 Eletroforese

#### 4.5.1.1 Preparação do gel de agarose

Para a preparação do gel de agarose, inicialmente foi adicionado 12,5 mL de Tris-Acetato-EDTA (TAE) 40X em um balão, que foi completado com água deionizada para um volume total de 1000 mL, de modo a obter o TAE em uma concentração de 0.5X.

Em um erlenmeyer, onde foram adicionados 0,6 g de agarose e 60 mL de TAE 0.5X, foi em seguida colocado em um forno de micro-ondas por 40s, e então deixado resfriar. É preciso ter especial cuidado nesta etapa, pois a agarose gelifica em torno de 35°C; geralmente, sabemos a temperatura correta quando se consegue suportar seu toque na pele. Em seguida, é adicionado 6 µL do corante *Diamond* na solução de agarose, que é despejada lentamente no suporte para evitar a formação de bolhas de ar. O suporte contém um pente inserido, para que no instante que a solução se solidifique, sejam formados poços onde as amostras serão inseridas.

#### 4.5.1.2 Preparação da amostra

Após a gelificação, o gel de agarose é transferido para a cuba de eletroforese e recoberto com a solução de TAE 0.5X, sendo neste momento o pente retirado. Para adicionar a amostra são usados 2 µL do corante *blue orange* e 8 µL do DNA extraído em cada poço, é necessário cuidado para evitar que ocorra a perfuração do mesmo no momento de inserção.

Para a amostra correr no gel de agarose, primeiramente é aplicada uma tensão de 60 V por aproximadamente 20 min, até que ocorra a saída da amostra do poço, quando a tensão é então aumentada para 100 V, permanecendo assim por mais 30 min.

### 4.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após completar as etapas do protocolo adotado para a extração de DNA a partir de sangue humano, foi então realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar uma sequência de DNA, de modo a comprovar se o DNA extraído com o NCM estaria com qualidade adequada para ser utilizado em procedimentos de biologia molecular. Para isso, foi realizada a prévia higienização de toda a sala, de modo a evitar contaminação e interferências, assim como também todo o material utilizado foi previamente autoclavado.

Foi realizado então uma master mix, usando as seguintes quantidades de reagentes em cada reação: 2,5 µL de dNTPs 10X (0,2 mM); 2,5 µL de PCR 10 X – MgCl<sub>2</sub> (200mM Tris-HCl,

pH 8.4 e 500 mM de KCl); 0,75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); 0,2  $\mu$ L de Taq; 15,6  $\mu$ L de água livre, 1,0  $\mu$ L de cada primer (5 pmol), isto é, senso e antisenso (Tabela 4.2) e, para finalizar, adicionamos 1,5  $\mu$ L do DNA extraído, totalizando 25  $\mu$ L para cada poço<sup>10</sup> (Fig. 4.6), exceto para o controle, onde foi acrescentado 1,5  $\mu$ L de água livre. Os reagentes utilizados neste procedimento foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies (EUA).

**Tabela 4.2.** Primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

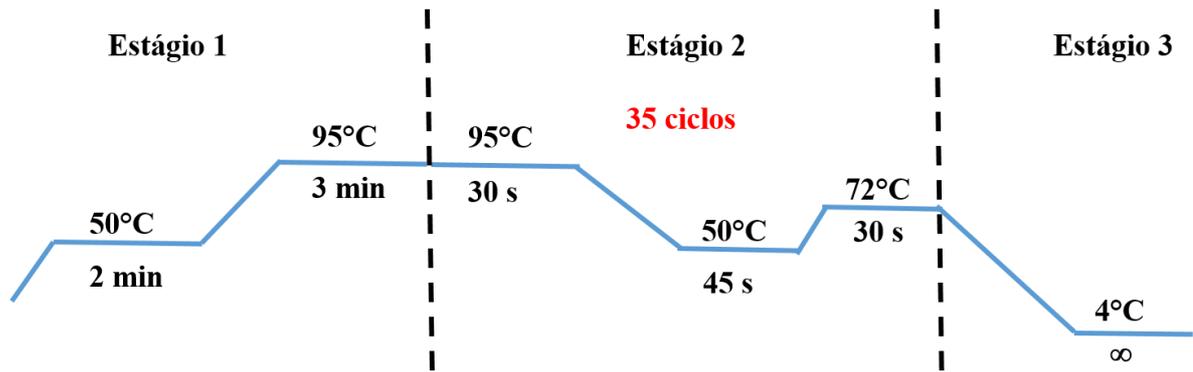
<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Região</b>	<b>Ref.</b>
<b>KM 29</b>	F- GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G	$\beta$ -Globina	[110]
<b>KM 38</b>	R-TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G		
<b>PC 03</b>	F- ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	$\beta$ -Globina	[110]
<b>PC 04</b>	R- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC		
<b>Gene ID; 60</b>	F- CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC	$\beta$ -Actina	[111]
	R- CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT		



**Figura 4.6.** Poços onde ocorre a reação de PCR.

As amplificações foram realizadas em um termociclador-sistema PCR tempo real StepOnePlus (Thermo Scientific -Applied Biosystems, Singapura). Inicialmente, a master mix foi submetida a uma temperatura de 50°C por 2 minutos, após a temperatura foi elevada para 95°C por 3 minutos, para que ocorra a desnaturação da fita dupla hélice de DNA; esta etapa de aumento gradual da temperatura é necessária para evitar a degradação do DNA. Em seguida, começa um ciclo de PCR composto por três etapas: a desnaturação continua a 95°C por 30 s, e é seguida pelo anelamento dos iniciadores a 50°C por 45 s, e por último sendo feito a extensão a 72°C por 30 s; as etapas deste ciclo são então repetidas por 35 vezes, e para finalizar o processo, ocorre a estabilização a 4°C por tempo infinito, como etapa necessária para evitar que ocorram reações indesejadas nos amplicons (produtos da PCR) até a retirada do equipamento (Fig. 4.7).

<sup>10</sup> Os poços são oito eppendorfs interligados, que formam uma série de reação para a mesma amostra.



**Figura 4.7.** Estágios de temperatura da reação em cadeia da polimerase.

Após os ciclos estabelecidos na etapa de PCR, foi realizado o procedimento de purificação dos amplicons. Para isso foi realizado o protocolo de purificação da PCR baseado no kit QIAquick (Qiagen, Alemanha); neste, para cada 1  $\mu\text{L}$  do produto retirado da PCR se adicionou 5  $\mu\text{L}$  do tampão PB, e para cada 250  $\mu\text{L}$  de PB foi acrescentado 1  $\mu\text{L}$  de indicador de pH. A solução resultante foi inserida em uma coluna (eppendorf com membrana) e submetida a uma centrifugação de 14.000 x g por 1 minuto, sendo então o sobrenadante descartado, e então adicionado 750  $\mu\text{L}$  da solução tampão PE a coluna que é centrifugada por um minuto. O sobrenadante é desprezado e a coluna é submetida a 2 min de rotação, e para finalizar este procedimento a coluna é transferida para um eppendorf limpo é adicionado 50  $\mu\text{L}$  do tampão EB (10 mM Tris-HCl, pH8.5) para a eluição do DNA, que é centrifugado por 1 min, de modo que sejam obtidos os amplicons purificados, que são armazenados em um eppendorf limpo.

Após a purificação, a concentração do produto é observada por meio da medida de sua absorvância, e o tamanho de fragmento do DNA sendo verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% marcado com o corante *Diamond*.

#### 4.6 Preparo das soluções-tampão

As soluções-tampão utilizadas neste trabalho foram preparadas do seguinte modo:

##### Glicina/HCl pH 3.6

- 50 mL da solução de glicina 0.1M
- 8,4 mL de ácido clorídrico (HCl) 0.2 M
- Completar o volume para 100 mL com água deionizada.

##### Fosfato/Fosfato pH 7.6

- 6,5 mL de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2 M
- 43,5 mL de fosfato de sódio bibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.2 M

- Completar o volume para 100 mL com água deionizada.

#### Tris/HCl pH 8.0

- 25 mL de Tris a 0.1M
- 14,6 mL de HCl 0.1 M
- Completar para 50 mL com água deionizada.

#### SDS/NaOH pH 11.0

- 50 mL de SDS 4 mM
- 25 mL de hidróxido de sódio NaOH 0.1M
- Para 1 mL colocar 992 µL de SDS pH 6.0 e 8 µL de NaOH 0.1M

#### Glicina/HCl/NaCl pH 3.3

- 25 mL de solução de glicina 0.2M
- 2,5 mL de HCl 0.2 M
- 17,53 g de cloreto de sódio
- Completar para 100 mL com água deionizada

#### Solução de lavagem (acetato de potássio/Tris-HCl/EDTA) pH 8.5

- 162,8 mM acetato de potássio
- 22,6 mM Tris/HCl pH 7,5
- 0,109 mM de EDTA pH 8
- Para 50 mL de solução

Para 1mL dessa solução adicionar 1,7 mL de etanol no momento da análise.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo contém os resultados obtidos no decorrer deste trabalho para a síntese do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana}@Pani$  e que corresponde a duas etapas: (1) a síntese e caracterizações das NPMs híbridas orgânica-inorgânica  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana}$  e a polimerização da mesma com polianilina (Seção 1) e (2) a aplicação para extração de DNA em meio aquoso e em um sistema biológico mais realista (Seção 2).

### 5.1 Síntese das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana}$

Como mencionado anteriormente as NPM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$  foram sintetizadas pelo método de co-precipitação química. Para isto, inicialmente realizamos a dissolução da quitosana (um pó de coloração bege) com ácido acético 1% por 24 h. É importante ressaltar que para a síntese das NPMs utilizamos dois tipos de quitosana: de alto<sup>11</sup> e baixo<sup>12</sup> peso molecular, isto com o objetivo de verificar as propriedades físico-químicas do produto (neste caso o NCM) já que dependem tanto do peso molecular da quitosana, quanto do grau de desacetilação do reagente usado.

No caso da quitosana de alto peso molecular, após aguardar o intervalo de 24 h para a dissolução do polímero, percebemos que ainda existia uma grande quantidade de flocos do material suspensos na solução, o que nos fez deixar a solução em agitação por mais 12 h, em um total de 36 h de agitação. Enquanto isso, para a quitosana de baixo peso molecular o intervalo de 24 h foi satisfatório para a dissolução do polímero, porém para manter as variáveis na mesma condição, a solução permaneceu sob agitação pelo mesmo período total (36 h). Mesmo após esse tempo, os flocos ainda permaneciam presentes, e assim realizamos uma filtração usando uma membrana de poro de 0.20  $\mu\text{m}$ . É importante chamar a atenção para o fato de que, além de demandar mais tempo para a dissolução do material, a solução da quitosana de alto peso molecular apresenta maior viscosidade.

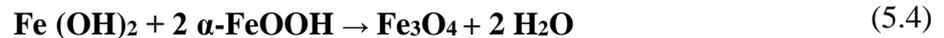
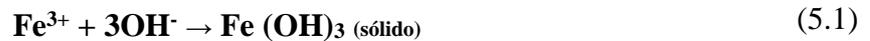
No entanto, para a síntese realizada com quitosana de alto peso molecular não conseguimos obter uma boa reprodutibilidade ao repetir a síntese por diversas vezes. Dessa maneira, os dados mostrados a seguir são todos relacionados com a síntese em que foi usada a quitosana de baixo peso molecular.

---

<sup>11</sup> Código sigma: 417963, peso molecular 190.000-375.000 Da, grau de desacetilação:  $\geq 75\%$ .

<sup>12</sup> Código sigma: 448869, peso molecular 50.000-190.000 Da, grau de desacetilação:  $\geq 75\%$ .

Após a dissolução da quitosana, inserimos as fontes de ferro II e III ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente), e adicionamos hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), o qual desempenha duas finalidades, ao funcionar como agente precipitador e promove a desprotonação da quitosana, tornando a mesma insolúvel em pH básico. Com a adição do  $\text{NH}_4\text{OH}$  foi observada a formação de um precipitado marrom escuro. Tal precipitado é formado devido ao fato que os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  são transformados em hidróxidos  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ,  $\alpha\text{-FeOOH}$  e  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Os hidróxidos formados sofrem oxidação resultando como produto a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), conforme as etapas mostradas nas reações 5.1-5.4:



Em sínteses que utilizam duas fontes de ferro, é maior a probabilidade que venham a coexistir magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemita  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , uma vez que a reação acontece na presença de oxigênio, a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pode ser transformada em  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .



Assim, após o processo de purificação foram obtidas as NPMs de óxido de ferro revestidas com quitosana, em um intervalo de tempo total para o processo – incluindo a etapa de purificação – relativamente curto (3 h), quando comparado com o requerido por outras metodologias para a preparação de NPs revestidas [22]. Mais adiante, com base na interpretação dos resultados das técnicas de DRX, espectroscopia de absorção no UV-VIS e espectroscopia no infravermelho, tentaremos identificar qual a fase do óxido de ferro que de fato está presente em maior quantidade no nosso material.

### 5.1.2 Polimerização das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana com Polianilina

Para verificar a melhor alternativa para revestir as NPMs com pani foram testadas duas metodologias: o método 1 (M1), descrito na Ref. [108], e o método 2 (M2), desenvolvido no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais (PNC) do DF-UFPE. No entanto, no M1 tivemos dificuldades no momento de purificação (lavagem) do NCM, pois não foi possível confinar magneticamente o material obtido. Para isso foi necessário implementar etapas de filtração e

de decantação utilizando a centrífuga por várias vezes, o que resultou em perda de material, tornando o processo pouco eficiente devido ao tempo requerido. Dessa forma, as informações sobre a polimerização das NPM a serem apresentadas a seguir diz respeito apenas ao método desenvolvido pelo grupo PNC (M2).

De acordo com a metodologia adotada modificamos a superfície das nanopartículas magnéticas pelo método de polimerização em emulsão com o monômero da anilina. Como descrito anteriormente, inicialmente HCl e SDS são adicionados a um balão de fundo redondo de 250 mL sob agitação. Ao ser inserido na solução ácida, o SDS<sup>13</sup> promove a formação de micelas uma vez que está com concentração acima de sua concentração micelar crítica (CMC). Quando as nanopartículas de óxido de ferro/quitosana e o monômero de anilina são introduzidos no meio, sua tendência é de migração para o interior das micelas, o que é facilitado pela agitação. A adição do persulfato de amônio (APS), um agente oxidante da anilina, faz com que a polimerização ocorra dentro das micelas. Finalmente, o processo de polimerização é deixado ocorrer durante 24 h a uma temperatura de 5°C<sup>14</sup>, o que torna o revestimento das nanopartículas mais uniforme. Ao término da reação, a quebra das micelas é então feita pela adição de metanol, resultando na precipitação do NCM, que pode ser então separado com o auxílio de um ímã, e em seguida lavado várias vezes com água deionizada e colocado para secar, resultando como produto um pó verde [112].

### 5.1.3 Caracterização das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui e do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani

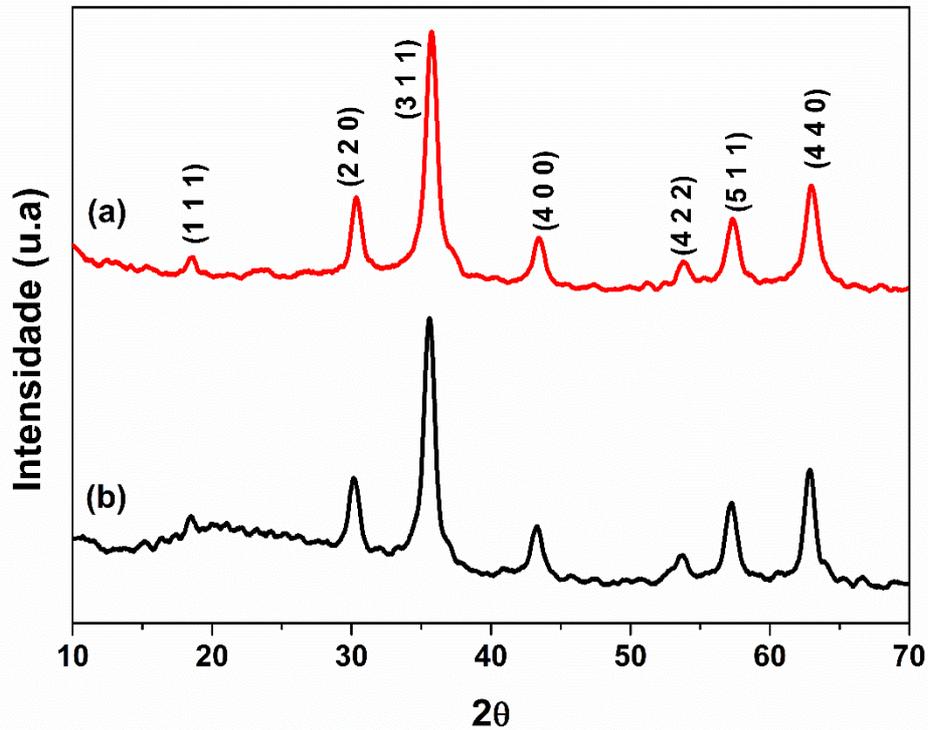
#### 5.1.3.1 Difração de Raios-X

As nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui e o NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani sintetizados foram submetidas a análise em um difratômetro de raios X. Os dados obtidos foram trabalhados com o uso do programa Origin e comparado com a base de dados Crystallography Open Database (COD). Assim ao comparar nossos dados com aqueles da COD encontramos correspondência com a estrutura N° 96.900.6248, referente à fase magnetita do óxido de ferro.

Na Fig. 5.1, mostramos os difratogramas das NPMs (a) e do NCM (b), onde estão identificados os ângulos de difração característicos (em 18,3; 30,2; 35,6; 43,2; 53,6; 57,2 e 63,0) e os respectivos índices de Miller (1 1 1), (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) e (4 4 0), que correspondem à estrutura da magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) [18, 42].

<sup>13</sup> SDS é um surfactante aniônico que possui uma extremidade hidrofílica e cauda hidrofóbica.

<sup>14</sup> A temperatura foi controlada através de um banho termostático FP50-HP (Julabo, Alemanha).



**Figura 5.1.** Difratograma das NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$  (a) e NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$  (b).

Deve ser ressaltado que apenas a estrutura cristalina do ferro é observada, pelo fato que tanto a quitosana como a pani são predominantemente amorfas, justificando o fato de terem sido encontrados os mesmos ângulos de difração para as duas sínteses. No entanto, a presença de uma pequena elevação entre os ângulos ( $2\theta$ ) de  $20^\circ$  a  $30^\circ$  aproximadamente, foi observada no difratograma do NCM (Fig. 5.1b) [60], tal elevação pode ser atribuída à presença dos polímeros (quitosana e polianilina). Portanto, através desta técnica podemos dizer que as NPMs foram revestidas e que a fase do óxido de ferro após a polimerização não foi alterada [22, 42].

Deste modo, para verificar a estrutura cristalina do material desenvolvido, calculamos o espaçamento dos átomos utilizando a lei de Bragg (Eq. 3.1), em seguida substituímos o valor no espaçamento na Eq. 3.2, o que permitiu obter o parâmetro de rede para cada pico característico, conforme mostrado na Tabela 5.1; os valores calculados foram então comparados com os parâmetros de rede da magnetita  $a = 8,39 \text{ \AA}$  e da maghemita  $8,35 \text{ \AA}$ .

**Tabela 5.1.** Dados obtidos dos difratogramas e valores calculados das distâncias interplanares e parâmetro de rede para NPMs e NCM.

Pico	(h k l)	$h^2 + k^2 + l^2$	$2\theta$ (graus)	$\theta$ (graus)	$d_{h,k,l}$ (Å)	$a$ (Å)
1	(1 1 1)	3	18,3	9,15	4,8480	8,3970
2	(2 2 0)	8	30,2	15,10	2,9594	8,3705
3	(3 1 1)	11	35,6	17,80	2,5219	8,3642
4	(4 0 0)	16	43,2	21,60	2,0942	8,3768
5	(4 2 2)	24	53,6	26,80	1,7098	8,3762
6	(5 1 1)	27	57,2	28,60	1,6105	8,3684
7	(4 4 0)	32	63,0	31,50	1,4755	8,3467

Após a análise dos valores que obtivemos para o parâmetro de rede (Tabela 5.1), a indicação é que o NCM apresenta as duas fases do óxido de ferro (magnetita e maghemita), devido à semelhança nos picos de Bragg dessas duas estruturas e à proximidade entre os parâmetros de rede calculados; provavelmente no nanocompósito a fase magnetita está presente em maior quantidade devido uma maior semelhança entre os parâmetros de rede calculados a partir dos dados experimentais. Uma característica observada é que em geral nos trabalhos que preparam nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com quitosana, a magnetita é obtida como resultado. Uma possível explicação para isto é que, no momento que as fontes de ferro são inseridas, a quitosana passa a revestir rapidamente as partículas do óxido ferro ( $Fe_3O_4$ ), evitando a transformação (oxidação) para  $\gamma-Fe_2O_3$ .

O tamanho médio do cristalito foi calculado por meio da equação de Scherrer (Eq. 3.3), onde utilizamos os valores referentes ao pico de maior intensidade (311), e assim concluímos que as nanopartículas e o nanocompósito possuem tamanho aproximado entre 11 e 12 nm, respectivamente, o que se deve ao fato da estrutura cristalina do ferro ser predominante sobre a da quitosana e da pani.

### 5.1.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Tanto a presença dos grupos funcionais das NPMs sintetizadas por óxido de ferro e quitosana, quanto se o revestimento polimérico com polianilina de fato ocorreria ao redor das mesmas, foram investigados pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Na Fig. 5.2 são mostrados os espectros do NCM  $Fe_3O_4@Qui@Pani$  (a), as NPMs  $Fe_3O_4@Qui$  (b) e apenas da Quitosana em (c), e na Tabela 5.2 são mostrados os picos de absorção característicos. No espectro (b) observamos o pico característico da magnetita em  $600\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento do ferro com o oxigênio (Fe-O); após a modificação

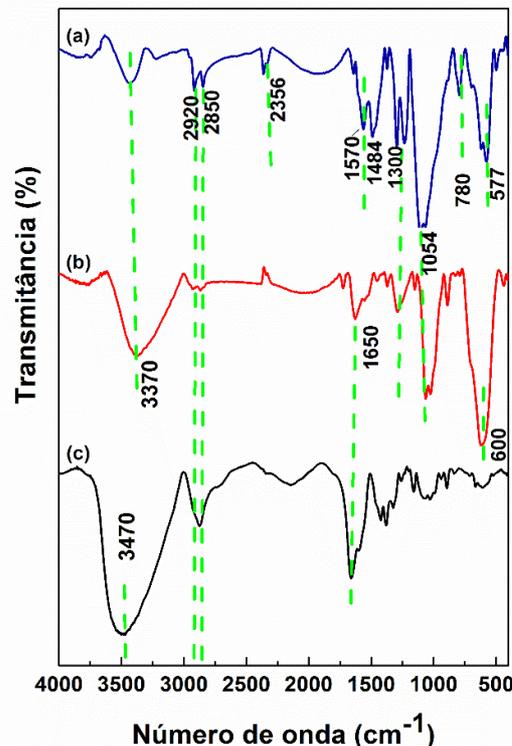
da superfície das nanopartículas com pani, percebe-se tanto o deslocamento quanto a diminuição da intensidade desse pico, que agora se encontra em  $577\text{ cm}^{-1}$  [14].

O espectro do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  (espectro a) apresenta os picos característicos mostrados nos espectros das NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$  (b) e da quitosana (espectro c). O pico em  $780\text{ cm}^{-1}$  corresponde à ligação entre carbono e hidrogênio C-H fora do plano, os picos de absorção em  $1300$ ,  $1484$ ,  $1570\text{ cm}^{-1}$  estão relacionados com a ligação  $\text{C}_{\text{aromático}}-\text{N}$ , estiramento dos anéis benzenóides e quinóides [66], picos que são característicos da polianilina em sua forma condutora. Em  $2850$  e  $2920\text{ cm}^{-1}$  observamos os estiramentos assimétrico e simétrico de  $-\text{CH}_2$ , picos que também são encontrados na estrutura da quitosana (c). A banda de absorção em  $3370\text{ cm}^{-1}$  é referente ao grupo amina [35], enquanto que na quitosana uma banda mais ampla é obtida em  $3470\text{ cm}^{-1}$ , referente à hidroxila e aos grupos aminas [22].

**Tabela 5.2.** Picos de absorção característicos das NPM, do NCM e da quitosana.

Material	Números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )							
	v-Fe-O	C-H	$\text{C}_{\text{ar}}-\text{N}$	v-N- $\text{C}_6\text{H}_6-\text{N}$	v- N-H	vas C-H	vs-CH	v-O-H
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$	577	780	1300	1484	1570	2850	2920	3370
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$	600	-	-	-	-	2850	2920	3370
Quitosana	-	-	-	-	-	2850	2920	3470

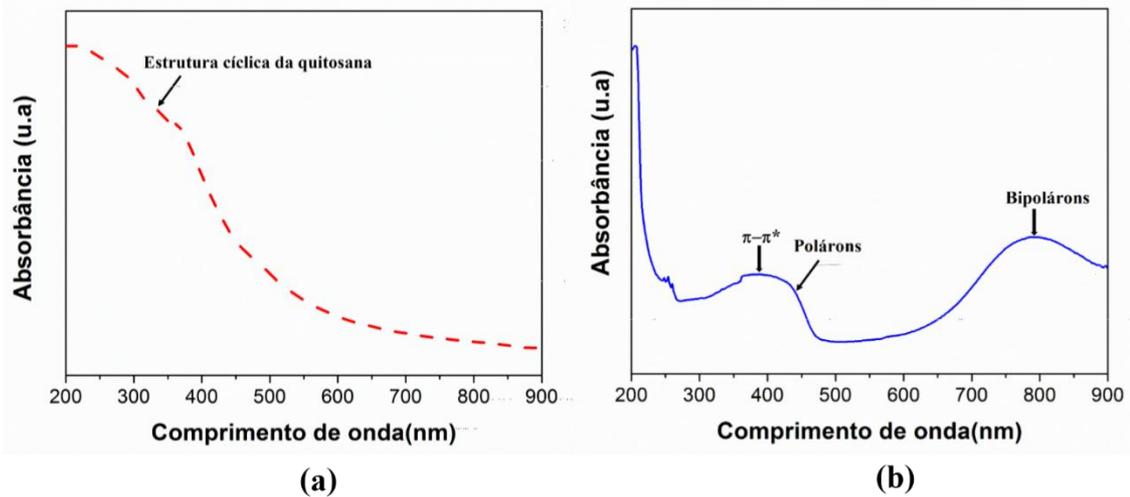
v-estiramento, vas-estiramento assimétrico, vs-estiramento simétrico.



**Figura 5.2.** Espectros IV do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  (a), das NPM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$  (b) e da Quitosana (c).

### 5.1.3.3 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível

Usamos a técnica de espectroscopia de absorção na região ultravioleta visível (UV-VIS) para confirmar se a polianilina obtida estaria de fato em sua forma condutora, uma característica perceptível pela coloração verde da mesma quando em sua forma parcialmente oxidada (sal esmeraldina). Nos espectros mostrados na Fig. 5.3, é possível observar uma banda de absorção em 330 nm correspondentes a quitosana, relacionada com a estrutura cíclica da cadeia [113]. As bandas características da polianilina na forma de sal esmeraldina em (383, 420 e 790 nm) também são observadas (Fig. 5.3b), sendo a primeira relacionada às transições  $\pi-\pi^*$  dos anéis benzenóides, e as duas outras à presença de pólarons e bipólarons, respectivamente [114].

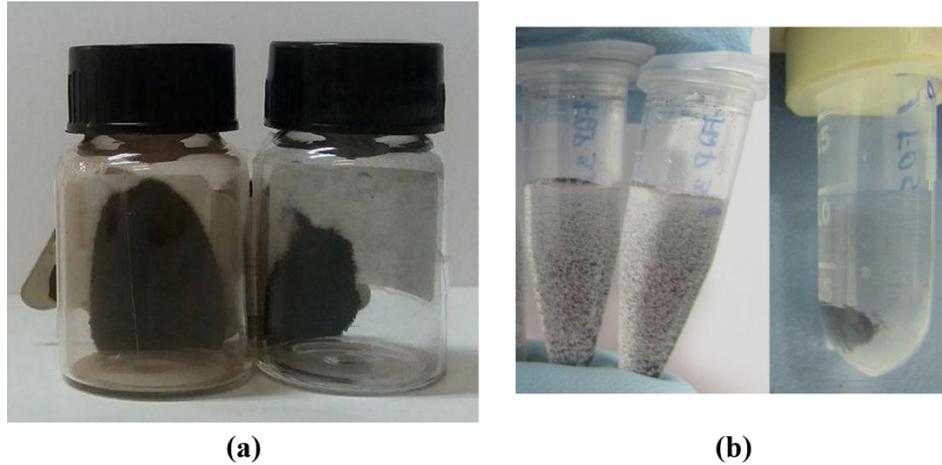


**Figura 5.3.** Espectro UV-VIS das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui (a) e do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani (b).

### 5.1.3.4 Curvas de magnetização

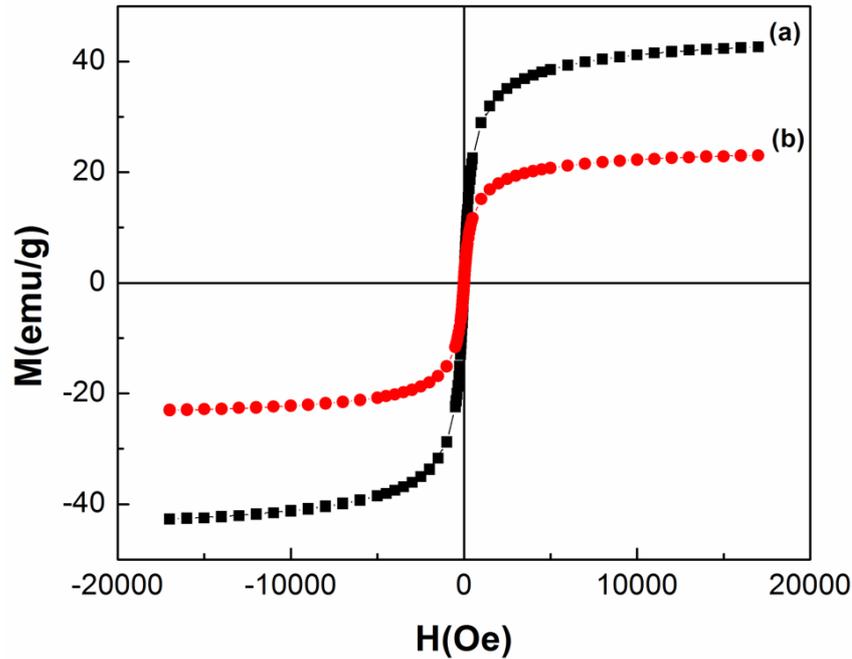
Para aplicações de adsorção a obtenção de um material magnético torna o processo de purificação realizado na síntese, e principalmente a aplicação mais rápida, uma vez que, processos como filtração e centrifugação requerem maior tempo para realização, e podem ocasionar perda do produto obtido.

Na Fig. 5.4a podemos observar a propriedade magnética das NPMs e do NCM sintetizados e na Fig. 5.4b podemos observar o NCM disperso e confinado pela aplicação de um campo magnético externo aplicado por um ímã.



**Figura 5.4.** NPMs e NCM atraídos magneticamente (a) e NCM disperso em solução-tampão e separação magnética (b).

Deste modo, para quantificar a propriedade magnética das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$  e do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$ , as curvas de magnetização correspondentes foram obtidas (Fig. 5.5). As nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$  têm uma magnetização de saturação de 42 unidades eletromagnéticas por grama ( $\text{emu/g}$ ), que deve ser comparado com o valor de 22  $\text{emu/g}$  das nanopartículas revestidas com polianilina. Esta redução no valor se deve ao revestimento das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$  por *pani*, como consequência ocorre o aumento do peso molecular do material, enquanto que suas camadas não contribuem para magnetização. Enquanto Li [22] relata ter obtido nanopartículas de magnetita revestidas com quitosana com magnetização de saturação no valor de 21,5  $\text{emu/g}$ , o valor encontrado neste trabalho foi um pouco superior (22  $\text{emu/g}$ ) para nanopartículas duplamente revestidas.



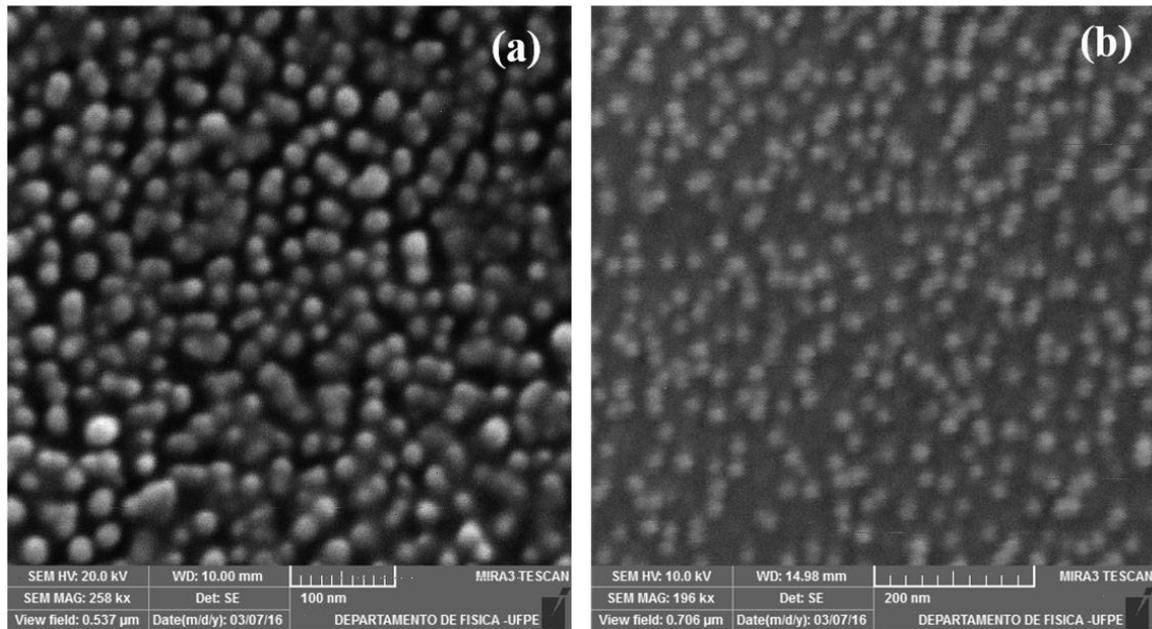
**Figura 5.5.** Curvas de magnetização das NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$  (a) e para o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$ .

Quando em tamanho macroscópico partículas de magnetita exibem magnetização de saturação de 90 emu/g, enquanto que para nanopartículas de magnetita esse valor varia entre 30-50 emu/g [6, 8]; deste modo, podemos concluir que os valores de magnetização obtidos neste trabalho são satisfatórios.

As curvas de magnetização revela outra propriedade de nossos materiais, que é a existência do superparamagnetismo, observado para partículas com tamanho máximo de 30 nm, e que tem como características uma magnetização remanescente ( $\sigma_r$ ) e sua coercividade ( $H_c$ ) iguais a zero; como também, não há magnetismo residual após a retirada do campo magnético, e assim as partículas se dispersam rapidamente [14].

#### 5.1.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi usada para permitir conhecer o tamanho, a distribuição e morfologia dos materiais sintetizados. Como mostrado na Fig. 5.6, tanto as NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$  quanto o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$  apresentam formato esférico, sendo sua distribuição uniforme com tamanho na faixa de 10 e 20 nm, respectivamente.



**Figura 5.6.** Micrografia MEV  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$  (a) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$  (b).

### 5.1.3.6 BET

Na Tabela 5.3 mostramos os resultados obtidos para área superficial BET, tamanho e volume dos poros das NPMs e do NCM, respectivamente. Encontramos que as NPMs possuem uma área superficial de  $81 \text{ m}^2/\text{g}$ , um tamanho de poro de  $5,3 \text{ nm}$ , com um volume de poro de  $0,11 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Enquanto que para o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$  foi observada uma diminuição em todos os parâmetros, a área superficial diminui para  $51 \text{ m}^2/\text{g}$ , o tamanho e o volume do poro para  $4,5 \text{ nm}$  e  $0,06 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectivamente. O decréscimo observado nos parâmetros do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$ , quando comparado com os valores obtidos para as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$ , indica que estas últimas foram revestidas com a pani.

**Tabela 5.3.** Área superficial BET, tamanho e volume dos poros das NPMs e do NCM.

Adsorvente	BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Tamanho do poro (nm)	Volume do poro ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )
$\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$	81	5,3	0,11
$\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$	51	4,5	0,06

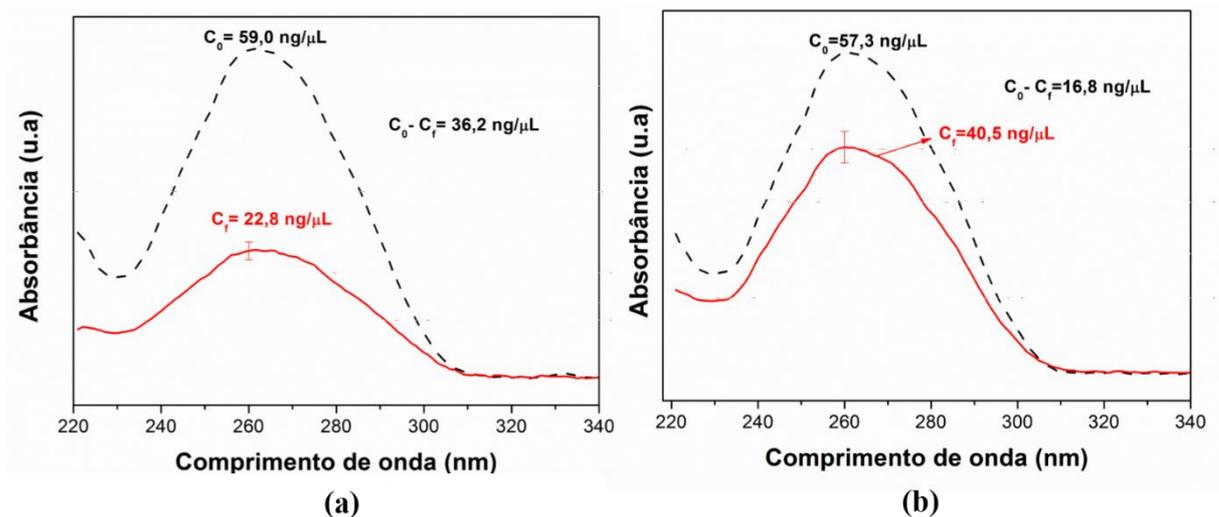
## 5.2 Aplicação das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$ e do NCM $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$ para extração de DNA em meio aquoso e sistema biológico

### 5.2.1 Adsorção

Conforme descrito na Seção 4.4.1, inicialmente testamos a capacidade do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$  para interagir com DNA, para isto foi utilizada uma solução de DNA de

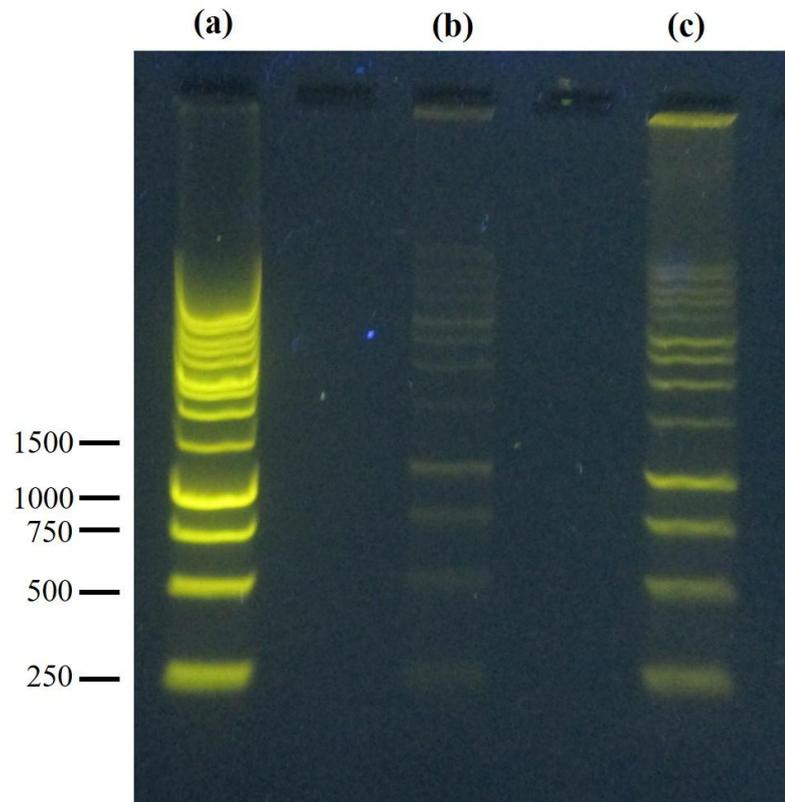
esperma de salmão com concentração aproximada de 60 ng/μL. Esta interação foi observada por espectroscopia UV-VIS no comprimento de onda característico do DNA em 260 nm. A concentração do DNA foi analisada antes e após a interação o NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani. Para efeitos de comparação também testamos a capacidade das NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui.

Como podemos observar na Fig. 5.7, para o NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani (a), a concentração inicial (C<sub>0</sub>) da solução de DNA foi de 59,0 ng/μL (curva tracejada), e após 10 minutos de interação com o NCM ocorreu uma diminuição no pico de absorção para concentração final (C<sub>f</sub>) de 22,8 ng/μL, a adsorção média foi de 61%, o que corresponde a aproximadamente 36,2 ng/μL de ácido desoxirribonucléico capturado pelo nanocompósito. O mesmo procedimento foi realizado para as NPMs (Fig. 5.7b), quando obtivemos como resultado a captura de 16,8 ng/μL, que em porcentagem representa uma adsorção média de 29%.



**Figura 5.7.** Espectros UV-VIS para adsorção de DNA com o NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani (a) e com as NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui.

Com podemos observar na Fig. 5.7 o pico de adsorção em 260 nm após a interação com nossos materiais não sofreu nenhum deslocamento, indicando que o DNA não foi degradado. No entanto, para confirmar isto, o procedimento de adsorção de DNA foi realizado novamente, mas agora em vez de DNA de esperma de salmão usamos DNA padrão de 1kb (Promega, EUA). Na Figura 5.8, o gel de eletroforese mostra que o DNA padrão diluído em H<sub>2</sub>O (sem interação com os materiais) (a), após interação com NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui (b) exibe uma menor intensidade das bandas, enquanto que para o NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani (c) as bandas são mais intensas. Quando estes resultados são comparados com o DNA padrão fornecido pelo fabricante (d), percebemos que a interação do DNA com o NCM não causa degradação.



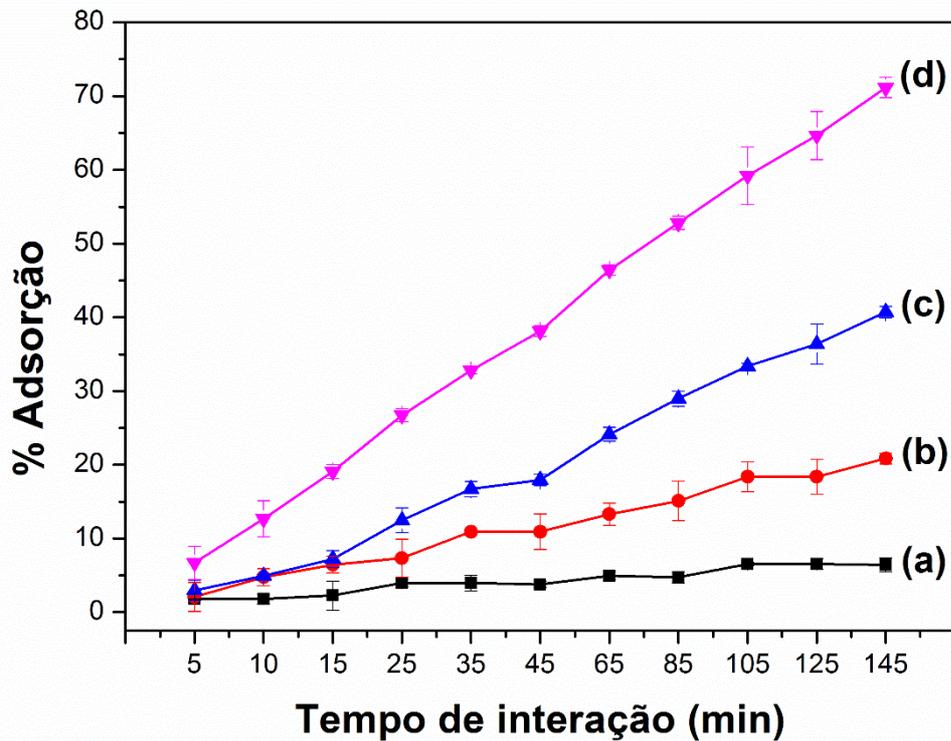
**Figura 5.8.** Eletroforese em gel de agarose para: DNA padrão diluído em H<sub>2</sub>O livre (a), após interação com NPMs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui (b) e NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani (c).

Uma vez que o nanocompósito Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani apresentou melhor capacidade de adsorção quando comparado as NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui, as análises para conhecer os parâmetros de adsorção foram realizadas apenas com o NCM.

### 5.2.2 Tempo de interação

Um parâmetro importante a ser examinado, uma vez que influencia o desempenho do processo de adsorção, é o tempo de interação entre o adsorvente (NCM) e o adsorvato (DNA). Para isso, diferentes quantidades do nanocompósito Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani (2-5 mg) foram deixados a interagir em diferentes intervalos de tempo (0 a 145 minutos) com uma solução de DNA com concentração igual a 100 ng/μL, sendo a primeira medida realizada após cinco minutos de agitação, conforme descrito na Seção 4.4.3.

Na Figura 5.9, podemos observar que o sistema que mais se aproxima do estado de equilíbrio (concentração praticamente constante) é quando foram usadas 2 mg de NCM (a), um efeito notado após 60 min de interação. O sistema apresenta ainda outra característica: para uma maior quantidade de NCM (4 e 5 mg), ocorre uma adsorção de aproximadamente 40% e 70% em 145 min, respectivamente, indicando que a interação entre o NCM e o DNA continua a ocorrer.



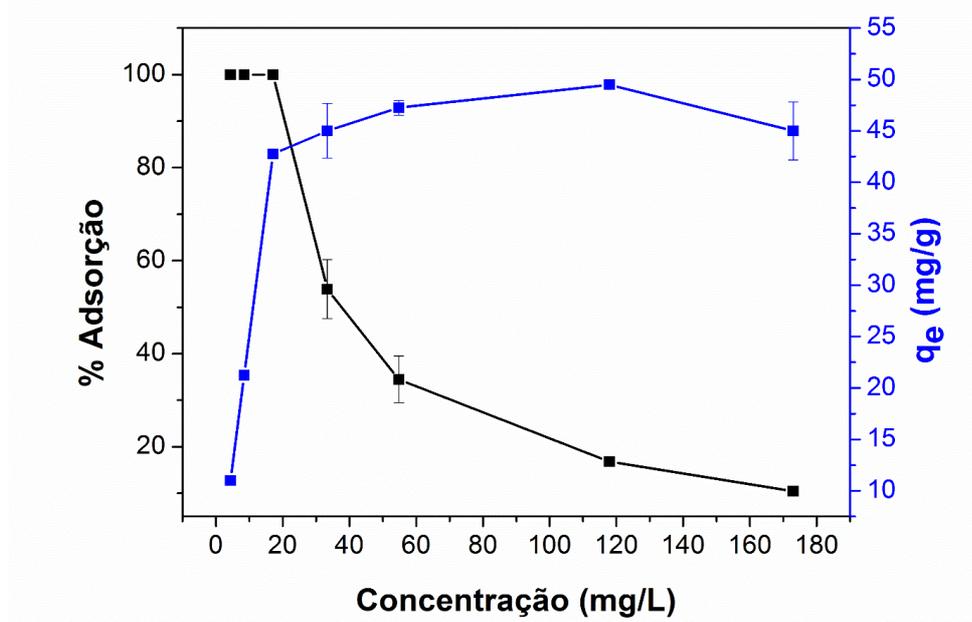
**Figura 5.9.** Adsorção de DNA utilizando o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  em função do tempo de interação para (a) 2 mg, (b) 3 mg, (c) 4 mg e (d) 5 mg, 2,5 mL de uma solução de DNA com concentração de 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

Assim, para garantir que a concentração de equilíbrio fosse atingida, passamos a utilizar 2 mg do nanocompósito  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  nos testes seguintes.

### 5.2.3 Efeito da concentração inicial de DNA

Após avaliarmos a quantidade de nanocompósito e o tempo de interação, outro parâmetro importante a ser analisado foi o efeito da concentração inicial de DNA no processo de adsorção do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$ . Este teste foi realizado com 2 mg do NCM em volume de 5 mL sob agitação na placa agitadora, a diferentes concentrações de DNA: 4,5; 8,5; 17,0; 33,5; 55; 118; e 173 ng/ $\mu\text{L}$ .

Na Fig. 5.10, é possível observar que em baixas concentrações (4,5; 8,5; 17,0 ng/ $\mu\text{L}$ ) o NCM adsorve por completo o DNA presente na solução. Percebemos também que ao aumentar a concentração de DNA a porcentagem de adsorção diminui, enquanto que a capacidade de adsorção aumenta. Por exemplo, para concentrações de 33,5 e 118 ng/ $\mu\text{L}$  a porcentagem de adsorção correspondente ficou em torno de 54% e 17%, enquanto que a sua capacidade de adsorção foi de 45 e 49,5 mg de DNA/g de NCM, respectivamente; desta maneira, embora a adsorção diminua, a capacidade de adsorção em massa aumenta por causa do aumento da força motriz [115].

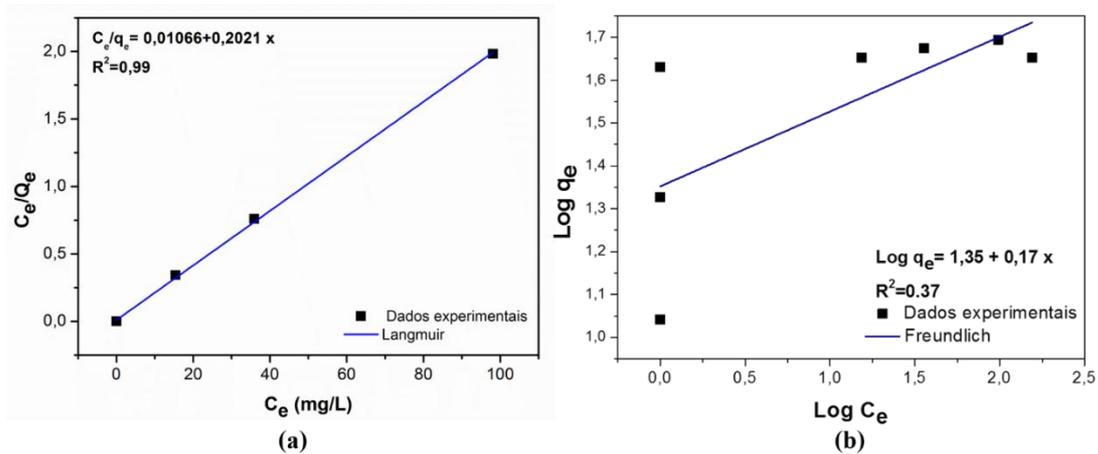


**Figura 5.10.** Porcentagem de adsorção e capacidade de adsorção no equilíbrio em função da concentração inicial de DNA.

#### 5.2.4 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção podem fornecer informações relevantes sobre a distribuição das moléculas entre a solução (fase líquida) e o adsorvente (fase sólida), a partir do uso dos modelos de Langmuir e Freundlich para a descrição dos dados experimentais correspondentes.

Como discutido na Seção 2.5.2, uma isoterma que segue o modelo de Langmuir revela que a adsorção ocorre em monocamada em uma superfície homogênea, enquanto que para o modelo de Freundlich é observado que a adsorção acontece em multicamadas de uma superfície heterogênea. Na Fig. 5.11, mostramos o ajuste dos dados experimentais para estes parâmetros.



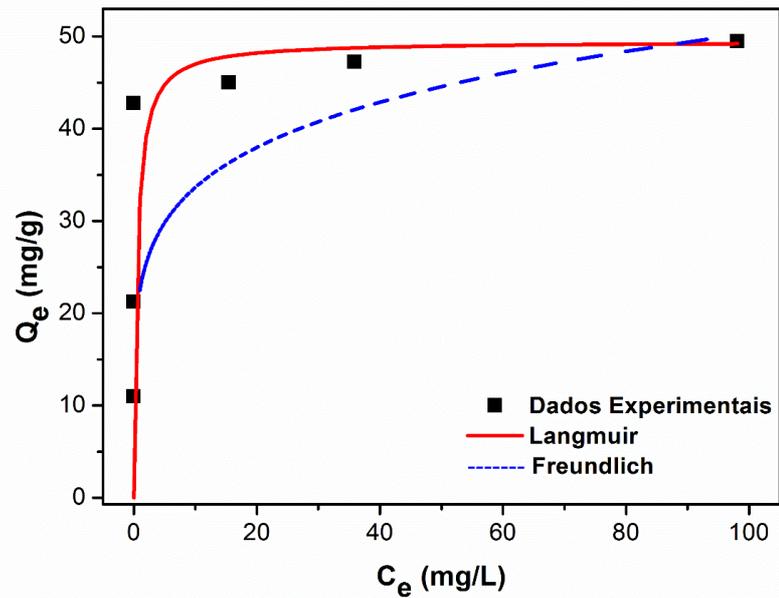
**Figura 5.11.** Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA com o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  usando os modelos de Langmuir (a) e de Freundlich (b).

Os valores das constantes obtidas por meio da interseção e da inclinação da reta para os modelos correspondentes são mostrados na Tabela 5.4. De posse do valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), observamos qual modelo apresentou valor mais próximos de 1, constatando que o nosso sistema se adequa melhor ao modelo de Langmuir por apresentar coeficiente de 0,99, com uma capacidade de adsorção de 49,5 mg/g, o valor é exatamente igual ao que obtivemos para os dados experimentais.

**Tabela 5.4.** Parâmetros de isotermas para os modelos de Langmuir e Freundlich correspondentes a adsorção de DNA com o nanocompósito  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$ .

Langmuir			Freundlich		
$Q_m$ (mg/g)	$b$ (mg/L)	$R^2$	$K_F$ (mg/g)	$n$	$R^2$
49,5	1,89	0,99	22,39	5,88	0,37

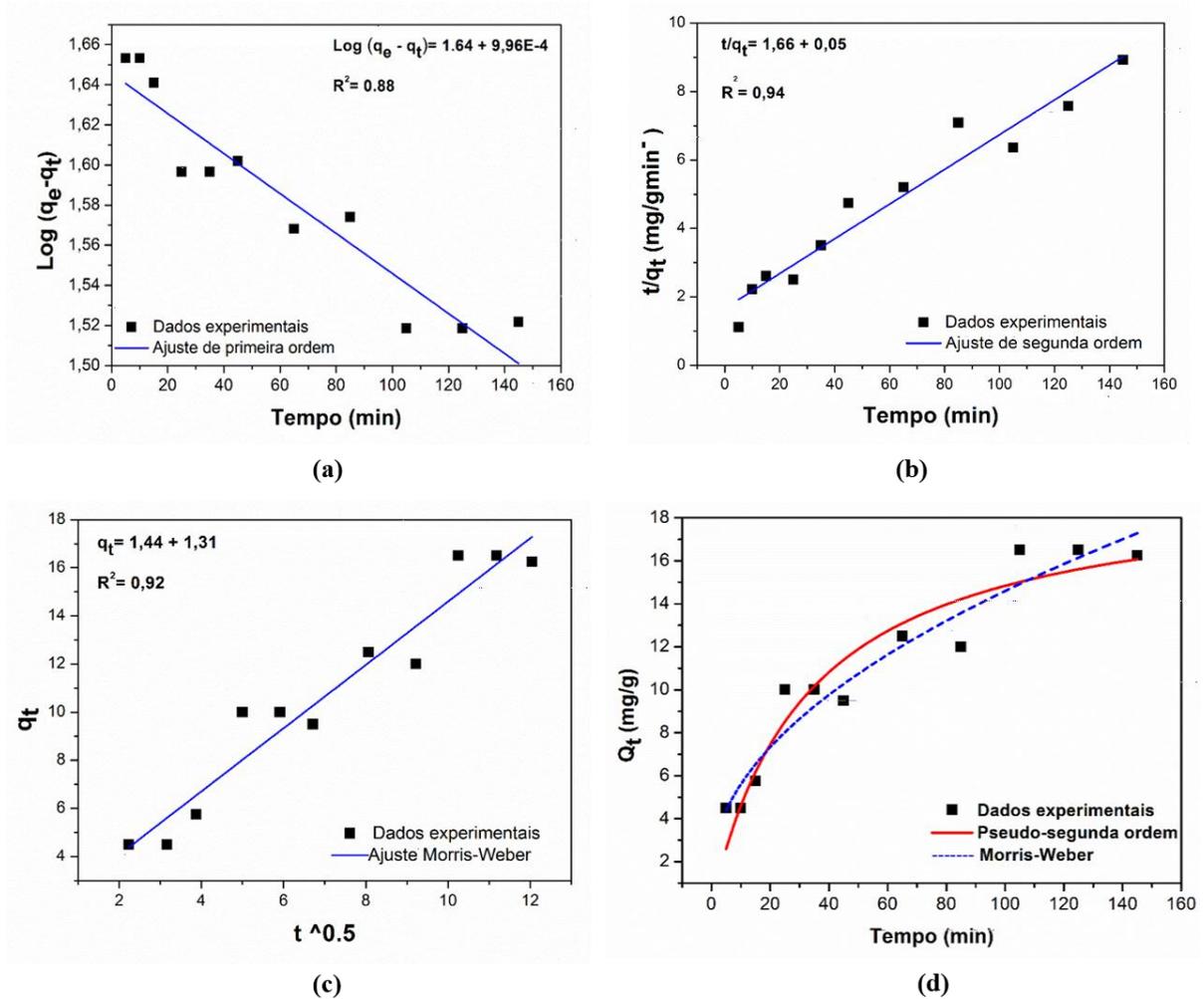
A Fig 5.12 exhibe o ajuste dos dados experimentais obtidos para os modelos de Langmuir e de Freundlich.



**Figura 5.12.** Ajuste dos dados experimentais de adsorção de DNA pelo NCM  $Fe_3O_4@Qui@Pani$  para os modelos de Langmuir e Freundlich.

### 5.2.5 Cinética de adsorção

Através do estudo de cinética, podemos obter informações sobre o processo de interação entre o nanocompósito  $Fe_3O_4@Qui@Pani$  e o DNA. Para isso, aplicamos os dados experimentais aos modelos cinéticos de pseudo primeira ordem, pseudo segunda ordem e Morris-Weber, que permitiu decidir se a interação ocorre através de um processo físico, químico ou se existe a difusão intra-partícula, respectivamente. Na Fig. 5.13, mostramos o ajuste linear para cada modelo.



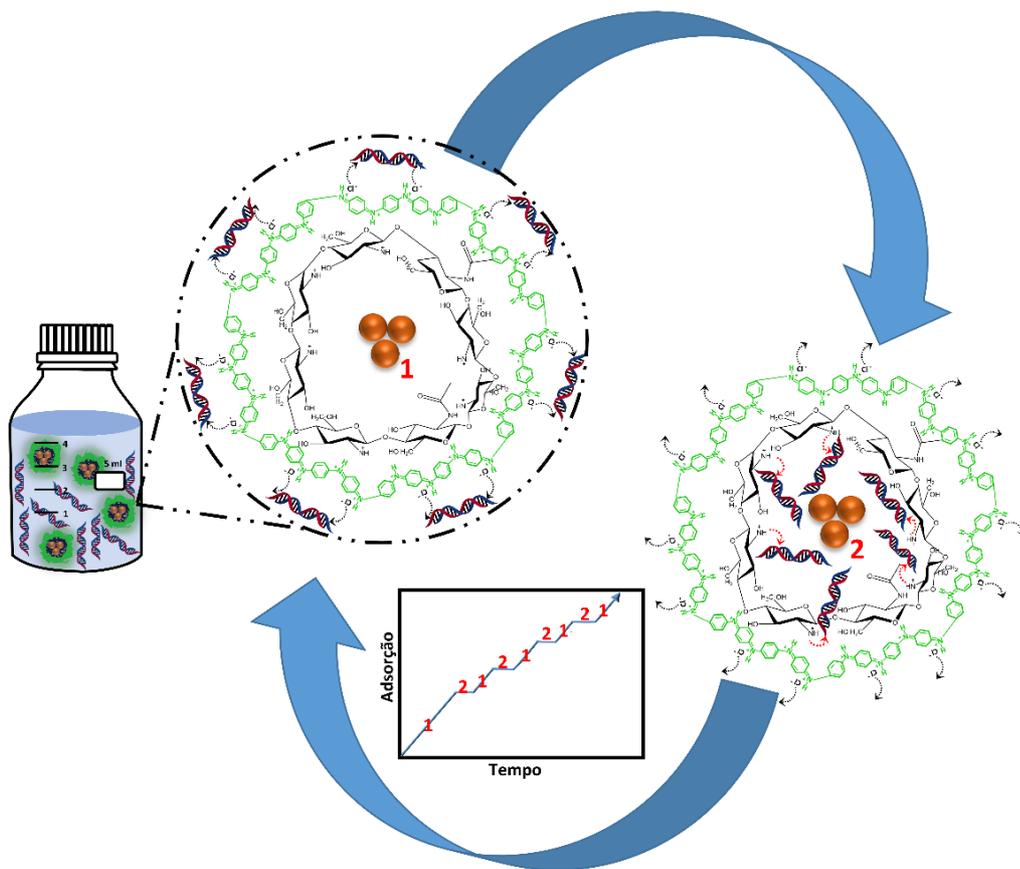
**Figura 5.13.** Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA com o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@Pani$  para os modelos cinéticos: de pseudo primeira ordem (a), pseudo segunda ordem (b), Morris-Weber (c) e ajuste dos dados experimentais aos modelos de pseudo segunda ordem e Morris-Weber (d).

Na Tabela 5.5, mostramos os valores obtidos para os parâmetros dos três modelos cinéticos. Ao analisar os coeficientes  $R^2$  percebemos que o melhor resultado foi de 0,94 para o modelo de pseudo segunda ordem. No entanto, o modelo de Morris-Weber apresentou um coeficiente de 0,92, isto pode ser explicado pela ocorrência de uma competição entre o processo químico (cinética de pseudo segunda ordem) e de difusão intra-partícula (Morris-Weber). Essa disputa indica que no nanocompósito estão ocorrendo simultaneamente os processos de adsorção e de absorção (transferência entre fases) [76].

**Tabela 5.5.** Parâmetros de cinética para adsorção de DNA com o nanocompósito  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@Pani$ .

Pseudo primeira ordem			Pseudo segunda ordem			Morris-Weber	
$K_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$q_e$ (mg/g)	$R^2$	$K_2$ (mg.min/g)	$q_e$ (mg/g)	$R^2$	$K_{id}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
$2,3 \times 10^{-3}$	43,65	0.88	$1,5 \times 10^{-3}$	20	0.94	1,31	0.92

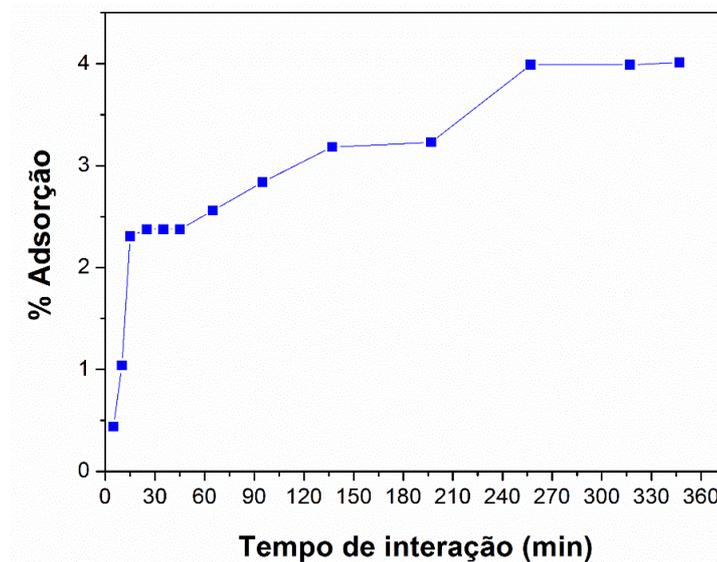
Na Figura 5.14 exibimos o processo de adsorção que provavelmente esteja ocorrendo entre o NCM e o DNA. Inicialmente o DNA interage com a polianilina por meio da interação eletrostática entre as cargas catiônicas dos grupos aminos e os grupos fosfatos carregados negativamente do DNA (Fig. 5.14-1), e em seguida, acontece uma migração do DNA através dos poros da polianilina para o interior do adsorvente, onde se encontra os sítios disponíveis da quitosana, que também possui grupos aminos (Fig. 5.14-2). A interação continua até a ocupação dos poros da quitosana, que possui maior área superficial, tamanho e volume do poro, como mostrado na Seção 5.1.3.6. Deste modo, os sítios da polianilina se tornam disponíveis novamente, e assim, o sistema de interação como mostrado é bem mais complexo.



**Figura 5.14.** Representação dos processos de interação (adsorção e absorção) entre o NCM e o DNA.

A ocorrência dos dois processos pode explicar a diferença encontrada quando realizamos o procedimento de adsorção no vortex ou em batelada. Quando a agitação é mais rigorosa (vortex) e utilizamos 4 mg de NCM, conseguimos extrair 61% de DNA no intervalo de dez minutos de interação. No entanto, quando utilizamos a placa agitadora, obtivemos 70% de remoção com 5 mg de NCM, no intervalo de tempo de 145 minutos. Assim, provavelmente quando a interação ocorre de maneira mais rápida, o DNA é adsorvido não apenas na superfície pelos grupos aminos da pani, e ainda tem a contribuição da quitosana na camada seguinte.

Assim, submetemos nosso material a uma condição extrema, ao colocar 4 mg do NCM para interagir com uma solução de DNA com concentração de 434 ng/ $\mu$ L por um período de seis horas, como mostrado na Fig. 5.15.



**Figura 5.15.** Adsorção de DNA esperma de salmão pelo NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qui@Pani no intervalo de 4h com uma solução de concentração de 434 ng/ $\mu$ L.

Pelo resultado obtido, percebe-se que depois de quinze minutos de interação ocorre uma adsorção de apenas dois por cento, enquanto que após quarenta minutos a adsorção do nanocompósito parece ter atingido o equilíbrio (concentração constante); no entanto, após sessenta e cinco minutos de interação o NCM torna a capturar DNA novamente. Assim entendemos que devido a disponibilidade de sítios, as moléculas são adsorvidas rapidamente sobre a superfície, sendo a interação entre as moléculas (adsorvato-adsorvato) desprezível, de modo que uma monocamada é formada. Apesar da grande quantidade de moléculas de DNA presentes na solução possibilitar uma interação mais rápida, isto não ocorre devido ao fato de que a difusão intra-partícula é um processo lento e determinante da velocidade da reação. Um comportamento similar foi relatado por Wu [41] que ao trabalhar com dióxido de titânio/xilano e quitosana para remoção de metais pesados, descreve ter o processo de adsorção ocorrido a partir de certo momento por difusão intra-partícula.

### 5.2.6 Dessorção

Sabe-se que materiais que possuem cargas catiônicas, como a quitosana e a polianilina, interagem eletrostaticamente por meio dos grupos fosfatos presente na fita dupla de DNA, como demonstrado neste trabalho. Enquanto a adsorção ocorre melhor em valores mais baixos de pH,

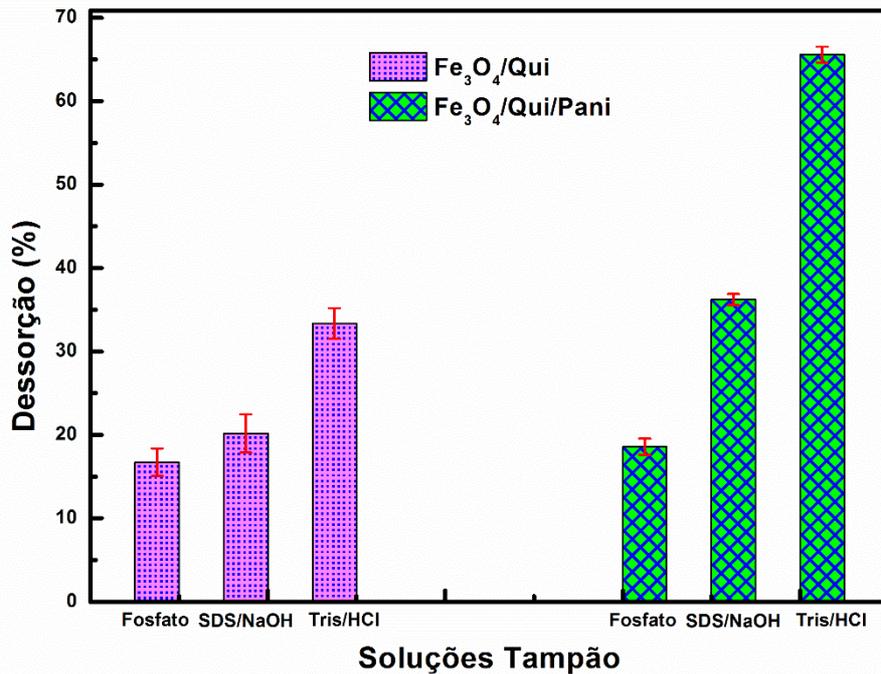
em pH básico (> 6,5) há uma diminuição significativa na capacidade de adsorção do DNA, por ser essa a faixa mais apropriada para eluição (dessorção) do mesmo [36, 116]. Outras maneiras de promover a dessorção é por aumento de temperatura, ou pelo uso de reagentes como ureia e guanidina, que competem com o nitrogênio para formar ligação de hidrogênio, podendo assim liberar o DNA capturado [32, 74].

Para promover a dessorção do DNA adsorvido, fizemos tentativas através da alteração de pH, como descrito na Seção 4.4.2. Na Tabela 5.6 e na Fig. 5.16, mostramos a média de dessorção obtida para as três soluções-tampão: fosfato monobásico/fosfato bibásico pH 7,6, Tris/HCl pH 8,0 e SDS/NaOH pH 11,0.

Para o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$ , quando utilizamos a solução tampão de fosfato/fosfato pH 7,6 ocorreu a liberação de apenas 18,6% de DNA, enquanto que para a solução de SDS/NaOH pH 11,0 a dessorção foi de 36,3%. Na tentativa de aumentar a eficiência de dessorção, utilizamos a solução tampão de Tris/HCl pH 8,0 que foi aquela a apresentar dessorção de 66,0%, a maior porcentagem alcançada para esse sistema. Já para as NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$ , a porcentagem de dessorção foi menor quando comparado ao NCM, e a maior liberação obtida foi de 33,3%, também com a solução de Tris/HCl pH 8,0.

**Tabela 5.6.** Porcentagem de dessorção de DNA das NPM e do NCM.

<b>Solução-tampão</b>	<b>%Dessorção <math>\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui</math></b>	<b>%Dessorção <math>\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani</math></b>
Fosfato/Fosfato pH 7,6	16,7	18,6
SDS/NaOH pH 11,0	20,2	36,3
Tris/HCl pH 8,0	33,3	66,0



**Figura 5.16.** Dessorção do DNA adsorvido com as NPMs e o NCM para as soluções-tampão: fosfato/fosfato pH 7,6, SDS/NaOH pH 11,0 e Tris/HCl pH 8,0.

### 5.2.7 Comparação do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani com outros adsorventes encontrados na literatura

Para avaliar a capacidade de adsorção do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani, realizamos uma comparação entre a capacidade de adsorção, a porcentagem de dessorção e o tempo necessário para cada uma destas etapas do NCM com adsorventes citados na literatura, onde foi utilizado o DNA esperma de salmão como sistema modelo, como mostrado na Tabela 5.7.

Como apresentado anteriormente, o NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani possui uma capacidade de adsorção de 49,5 mg/g, alcançada no intervalo de interação 60 minutos se realizado no modo de batelada. Já quando realizamos o teste com uma agitação mais rigorosa (vortex) no intervalo de 10 min, obtemos uma capacidade de adsorção de 90,5 mg/g. Ao comparar esse resultado com o obtido quando os outros adsorventes listados na Tabela 5.7 foram utilizados, observamos que Teng [117] usou 10 mg de nanopartículas de magnetita revestidas com sílica mesoporosa, obtendo uma capacidade de 46 mg/g em 20 min, e para promover a dessorção do DNA utilizou Tris/EDTA pH 8,0, para isso se fazendo necessário aquecer a solução a 60°C por 20 min. Com 0,5 mg de nanopartículas magnéticas de sílica mesoporosa em uma placa agitadora com rotação de 270 rpm, Li [118] obteve uma capacidade superior de 121,6 mg/g, mas em um intervalo de tempo muito maior (1220 min). Do mesmo modo, Zhang [119] usou 1 mg de nanopartículas de sílica mesoporosa revestidas com poliestireno, que apresentaram capacidade de adsorção de

110,7 mg/g em 1440 min. Já Sun [92], que usou 0.5 mg de M-MSN@TEOS para adsorver 10,6 mg/g, fez uso de tiocionato de guanidina, o que tornou necessário acrescentar etapas de purificação devido à ocorrência de absorção em comprimentos de onda próximos ao do DNA (260 nm). Assim, o NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani apresenta uma melhor capacidade de adsorção e libera uma quantidade de DNA significativa, para o período de tempo analisado. Já os NCMs de Fosfato de ferro@Pei e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Pani (sintetizado no laboratório PNC) exibem uma maior capacidade em relação aos resultados obtidos em nosso teste realizado em batelada, e uma maior porcentagem de dessorção em um curto intervalo. Na etapa de adsorção, 2 mg do NCM FePO<sub>4</sub>@PEI é agitado rigorosamente por 30s e depois submetido à centrifugação a 8000 rpm por 3 min; já para o processo de dessorção, é realizado apenas a centrifugação usando a solução-tampão de Britton-Robinson pH 10. Para o NCM  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Pani é necessário 4 mg para atingir a capacidade de 75.6 mg/g, com a dessorção envolvendo o uso de uma solução-tampão de fosfato/fosfato pH 7.6. No entanto, quando usamos o vortex obtivemos um valor superior para a capacidade de adsorção (90,5 mg/g) com 10 min de interação.

**Tabela 5.7.** Comparação da capacidade de adsorção de DNA do NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani com outros materiais adsorventes.

Adsorvente	Capacidade de adsorção (mg/g)	Tempo de adsorção (min)	Dessorção %	Tempo de dessorção (min)	Ref.
M-MSN	46	20	80 a 60°C	20	[117]
M-MSN	121,6	1200	89,5 a 37°C	60	[118]
M-MSN@PS	110,7	1440	-	-	[119]
M-MSN@TEOS	10,6	120	93	120	[92]
NCM fosfato de ferro@Pei	61,88	4	85	8	[120]
NCM $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @Pani	75,6	10	96,5	2	[109]
<b>NCM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qui@Pani</b>	<b>49,5 (batelada) 90,5 (vortex)</b>	<b>60 min 10 min</b>	<b>66</b>	<b>10 min</b>	<b>Este trabalho</b>

M-MSN- NPMs de sílica mesoporosa; PS- Poliestireno; TEOS- Tetraetilortosilicato; PEI- Polietilenoimina.

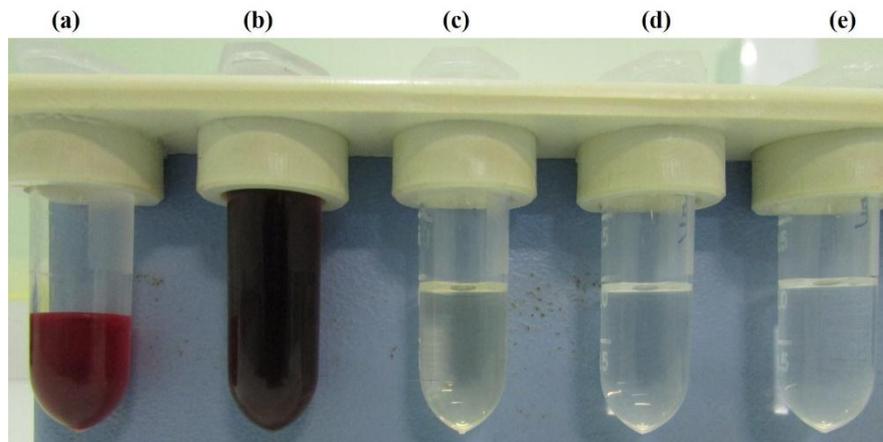
### 5.2.8 Extração de DNA total a partir de sangue humano

Uma vez controlada a extração de DNA em meio aquoso, prosseguimos as análises, agora usando uma amostra de maior complexidade, o sangue humano. Para caracterizar a

pureza e a qualidade do DNA obtido pela extração realizada, submetemos essas amostras ao processo de amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), com o objetivo de ter DNA concentrado que permita a realização de análises clínicas, forense e de biologia molecular em menor intervalo de tempo.

O sangue é um tecido composto por plasma e soro (líquido), com componentes sólidos que consistem em células vermelhas (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos), e que tem como função principal transportar oxigênio e nutrientes pelo organismo [75]. Amostras complexas como sangue possuem componentes chamados de inibidores, como por exemplo, a hemoglobina, imunoglobulina G, a lactoferrina [121, 122], por impedir a ação da DNA polimerase que torna inviável a aplicação direta do sangue total para amplificação na PCR.

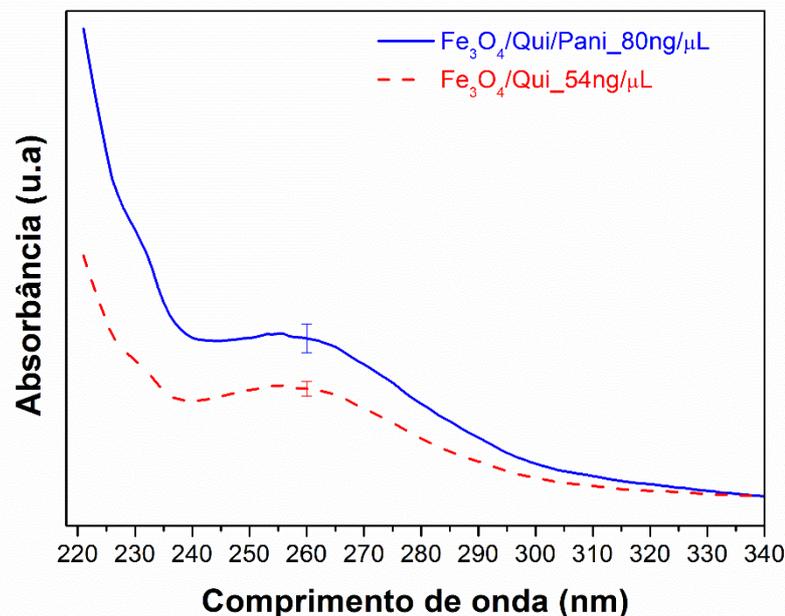
Assim, se faz necessário concentrar, extrair e purificar o DNA do sangue humano, e para isso utilizamos o NCM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@Pani$ , realizamos o procedimento descrito na Seção 4.4.4. Na Fig. 5.17 demonstramos as etapas realizadas, onde inicialmente (Fig. 5.17a) utilizamos proteinase K e uma solução de Triton X-100 (surfactante não iônico) a 0,1% para degradar as proteínas e provocar a lise dos glóbulos vermelhos [93], que foi seguido pela incubação a temperatura de  $56^\circ\text{C}$  para agilizar a ruptura da parede celular. Em seguida, inserimos uma solução de glicina/HCl/NaCl e o NCM (5.17b) neste caso utilizamos glicina/HCl para ativar o NCM, e o NaCl para aumentar a precipitação de proteínas. Após isso promovemos a interação entre o NCM e o DNA por agitação pelo período de 10 minutos, e depois foram realizadas três lavagens ao NCM com glicina/HCl (5.18c-e). Por fim, o DNA foi desorvido do NCM com uma solução tampão de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a pH 7.6. Para efeito de comparação, realizamos o mesmo procedimento para as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}$ .



**Figura 5.17.** Etapas da extração de DNA a partir de sangue humano com o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@Pani$ .

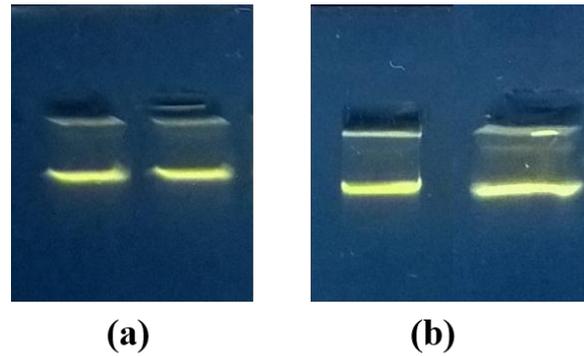
Analisamos a concentração do DNA total, extraído a partir de sangue humano, por espectroscopia UV-VIS, quando observamos o comprimento de onda de 260 nm correspondente ao DNA. Na Figura 5.18, mostramos o espectro de adsorção para as NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Q\text{ui}$  (curva tracejada) e do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Q\text{ui}@P\text{ani}$  (curva contínua), pelo que é possível estimar que obtivemos uma média de adsorção de 54,2 e 80  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , respectivamente.

É importante analisar a razão de absorbância ( $A_{260}/A_{280}$ ), principalmente quando o DNA é isolado a partir de tecido ou de sangue, porque estas amostras possuem uma quantidade em peso de proteína superior a de DNA [99]. Assim, para avaliar a qualidade da amostra, observamos a razão de absorbância  $A_{260}/A_{280}$ , que tem como valor de referência a faixa de 1,8-2,0. Obtivemos o valor de 1,86 para as nanopartículas e de 1,71 para o nanocompósito, em uma indicação de que o DNA extraído possui pureza significativa.



**Figura 5.18.** Espectros UV-VIS de DNA a partir de sangue humano com as NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Q\text{ui}$  (curva tracejada) e com o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Q\text{ui}@P\text{ani}$  (curva contínua).

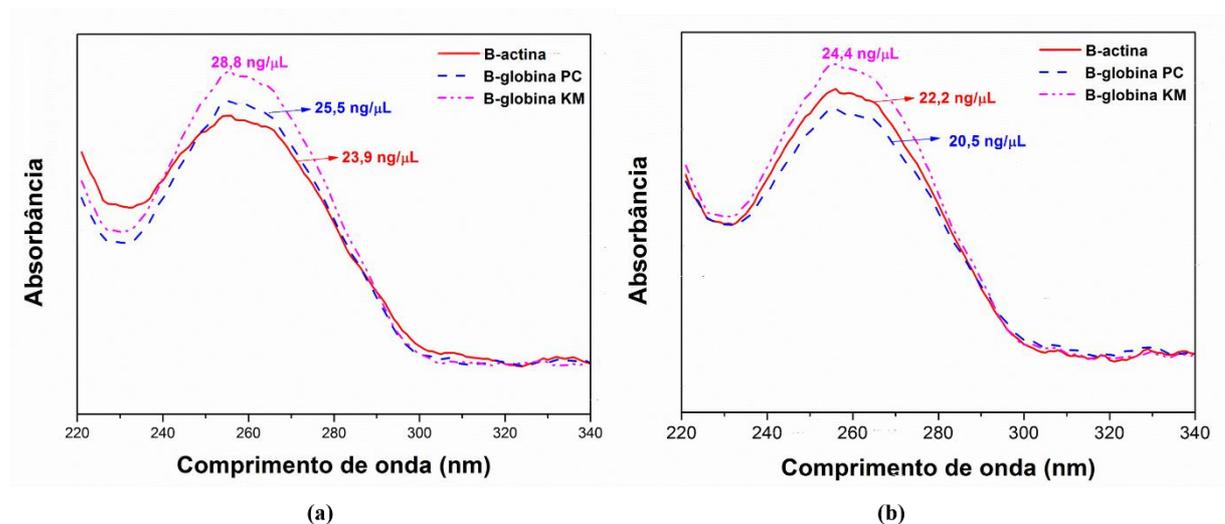
Ao observar a Fig. 5.19, que corresponde a eletroforese em gel de agarose para a extração de DNA total a partir de sangue humano para as NPMs (a) e para o NCM (b), percebemos uma banda que corresponde ao DNA, e que não há a presença de rastros, o que indica o bom estado do material obtido.



**Figura 5.19.** Eletroforese em gel de agarose do DNA extraído a partir de sangue humano com as NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui$  (a) e com o NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Qui@Pani$  (b).

Este protocolo apresenta como vantagens: (1) um nanocompósito que possui uma síntese simples e com baixo custo de produção; (2) separação magnética com um pequeno ímã; (3) pode ser realizado em aproximadamente 70 minutos; (4) não utiliza reagentes tóxicos; (5) é possível recuperar o DNA adsorvido pelo NCM por simples mudança de pH.

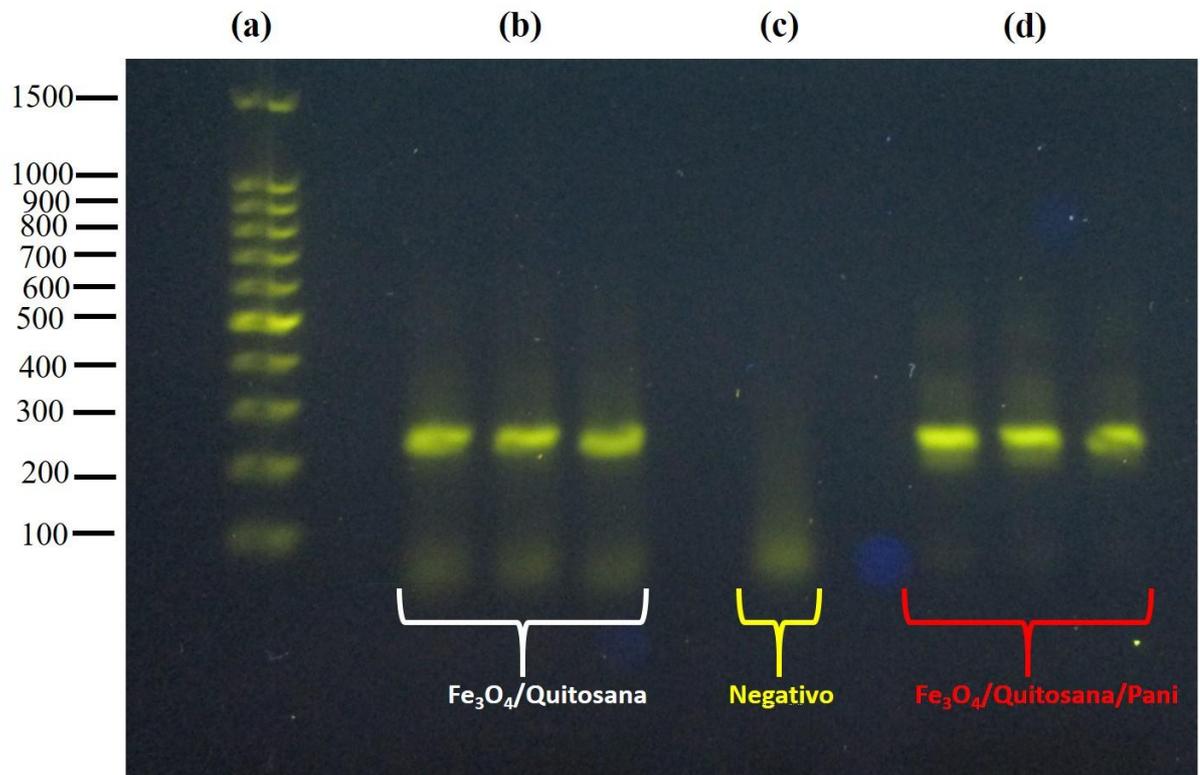
A partir do que observamos para a extração de DNA de sangue total com as NPMs e o NCM, realizamos a reação em cadeia da polimerase de acordo com a metodologia apresentada na Seção 4.5.2. Obtivemos como resultado que, para os três conjuntos de primers adquiridos para sangue humano, a amplificação está acontecendo na PCR devido a concentração de amplicons, como demonstrado na Fig.5.20.



**Figura 5.20.** Espectro UV-VIS das ampliações de PCR para DNA a partir de sangue humano com as NPMs (a) e com o NCM (b).

Na Figura 5.21, mostramos a eletroforese em gel de agarose para o DNA amplificado com os primers da  $\beta$ -actina, e comparamos com o padrão de referência (ID 4501885a1). Pode

ser notado que ocorre a presença de uma banda significativa em 250 pares de bases, demonstrando que a amplificação realizada possui qualidade para prosseguirmos com as análises.



**Figura 5.21.** Eletroforese do DNA padrão (a), amplificação de PCR de DNA a partir de sangue humano extraído com as NPMs (b), amostra negativa (c) e extraído com o NCM (d).

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como discutido nos capítulos anteriores, neste trabalho sintetizamos inicialmente nanopartículas de magnetita/quitosana através do método de co-precipitação, e depois as revestimos com polianilina por meio da polimerização em emulsão da anilina, de modo a obter o nanocompósito híbrido de magnetita/quitosana/polianilina. Para determinar as propriedades dos materiais sintetizados, diversas técnicas foram utilizadas, o que nos permitiu confirmar a composição das NPMs e do NCM, e que a polianilina se encontrava em sua forma condutora; além disso também nos foi possível estimar o tamanho do nanocompósito e quantificar a magnetização de saturação correspondente.

Em seguida, verificamos a eficiência do NCM para a adsorção de ácido desoxirribonucléico em meio aquoso, e também em um sistema biológico (sangue humano), onde mostramos que isso se deve à interação eletrostática entre as cargas positivas dos polímeros (quitosana e polianilina) e os grupos fosfato da cadeia de DNA.

Como resultado, observamos que a capacidade de adsorção do NCM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Qui}@\text{Pani}$  depende da maneira como é realizado o processo: se obtido sob agitação severa (vortex), sua capacidade de adsorção é de 90,5 mg/g no intervalo de 10 minutos, enquanto que se preparada no modo batelada, esse valor cai para 49,5 mg/g no período de 60 minutos. Através da análise de cinética correspondente foi possível verificar que o mecanismo de adsorção do DNA pelo NCM é mais complexo que o inicialmente esperado, o que nós levou a conclusão de que provavelmente o mesmo ocorre em um processo de duas etapas: primeiramente, o DNA é adsorvido pela camada externa do nanocompósito constituída de polianilina, que é seguido pela difusão deste DNA para a camada de quitosana interna que reveste o óxido de ferro. Se por um lado, isso torna a cinética do processo mais lenta, por outro leva ao aumento da capacidade de adsorção do material. A dessorção do DNA, por outro lado, ocorreu por meio da desprotonação dos grupos aminas da polianilina, apenas por alteração de pH com soluções-tampão, das quais tanto no caso do nanocompósito  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana}$ , como no  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana}@\text{Polianilina}$  a melhor dessorção foi obtida com Tris/HCl pH 8,0.

Em relação a aplicação em sistema biológico, conseguimos extrair e purificar com boa qualidade o DNA total a partir de sangue humano, que foi verificado e comprovado por espectroscopia do UV-VIS, eletroforese e PCR. Esses resultados sugerem que este novo nanocompósito é um material promissor na área de biologia molecular e diagnósticos, podendo ser incorporado em processos de purificação dos mesmos.

Como perspectivas deste trabalho, em relação ao nanocompósito, os complexos mecanismos de sorção (adsorção e absorção) dos ácidos nucléicos envolvido pode vir a ser estudado mais detalhadamente, assim como pode ser feita a aplicação do material para a adsorção de outras biomoléculas, (e também de metais pesados). Para a aplicação em sistemas biológicos temos que testar a utilização de outras soluções-tampão de modo a verificar se é possível obter uma maior porcentagem de dessorção, e também estudar a relação da quantidade de adsorvente com o volume utilizado, para assim realizar uma completa comparação com kits comerciais atualmente disponíveis. Deste modo, após o controle destas variáveis, o NCM pode vir a ser aplicado para a captura do DNA presente em outros sistemas biológicos como tecido, saliva, bactérias, entre outros, tendo em mente que para cada sistema protocolos específicos serão necessários.

Além disso, uma alternativa interessante é a funcionalização do NCM para torná-lo específico para a investigação de uma dada região do DNA. Isso o torna seletivo no que diz respeito à captura, o que eleva significativamente seu nível de aplicações para purificação e concentração de moléculas biológicas, contribuindo para a diminuição do tempo de espera de testes diagnósticos e análises na área forense, por exemplo.

## Referências

1. Shukla, S.K., et al., Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*, 2013. **59**: p. 46-58.
2. Melo, C.P.d. and M. Pimenta, *Nanociências e nanotecnologia. Parcerias estratégicas*, 2010. **9**(18): p. 09-22.
3. Whitesides, G.M., *Nanoscience, nanotechnology, and chemistry*. *Small*, 2005. **1**(2): p. 172-179.
4. Adams, F.C. and C. Barbante, *Nanoscience, nanotechnology and spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2013. **86**: p. 3-13.
5. Atkins, P.W. and L. Jones, *Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*. 2006: Bookman Editora.
6. Gupta, A.K. and M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
7. Laurent, S., et al., Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, 2011. **166**(1): p. 8-23.
8. Abenojar, E.C., et al., Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2016. **26**(5): p. 440-448.
9. Osborne, E.A., et al., Rapid microwave-assisted synthesis of dextran-coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*, 2012. **23**(21): p. 215602.
10. Lalley, J., et al., Phosphate adsorption using modified iron oxide-based sorbents in lake water: kinetics, equilibrium, and column tests. *Chemical Engineering Journal*, 2016. **284**: p. 1386-1396.
11. Helal, A.S., et al., Functionalized magnetic nanoparticles for the decontamination of water polluted with cesium. *AIP Advances*, 2016. **6**(5): p. 1-6.
12. Rajabi, A.A., et al., Modified magnetite nanoparticles with cetyltrimethylammonium bromide as superior adsorbent for rapid removal of the disperse dyes from wastewater of textile companies. *Nanochemistry Research*, 2016. **1**(1): p. 49-56.
13. Ardiyanti, H., et al. Crystal structures and magnetic properties of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)/Polyvinyl alcohol (PVA) ribbon. in *The 3rd international conference on advanced materials science and technology (ICAMST 2015)*. 2016. AIP Publishing.
14. Alibeigi, S. and M.R. Vaezi, Phase transformation of iron oxide nanoparticles by varying the molar ratio of Fe<sup>2+</sup>: Fe<sup>3+</sup>. *Chemical engineering & technology*, 2008. **31**(11): p. 1591-1596.
15. Kaushik, A., et al., Iron oxide-chitosan hybrid nanobiocomposite based nucleic acid sensor for pyrethroid detection. *Biochemical Engineering Journal*, 2009. **46**(2): p. 132-140.
16. Yadav, S., et al., Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012. **50**(4-5): p. 247-254.
17. Reddy, D.H.K. and S.-M. Lee, Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2013. **201-202**: p. 68-93.
18. Liang, Y.-Y., et al., Polysaccharide-modified iron oxide nanoparticles as an effective magnetic affinity adsorbent for bovine serum albumin. *Colloid and Polymer Science*, 2007. **285**(11): p. 1193-1199.
19. Hurley, K.R., et al., Predictable Heating and Positive MRI Contrast from a Mesoporous Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticle. *Molecular pharmaceutics*, 2016.
20. Hurley, K.R., et al., Predictable heating and positive MRI contrast from a mesoporous silica-coated iron oxide nanoparticle. *Molecular pharmaceutics*, 2016. **13**(7): p. 2172-2183.
21. Rajput, S., C.U. Pittman, and D. Mohan, Magnetic magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticle synthesis and applications for lead (Pb<sup>2+</sup>) and chromium (Cr<sup>6+</sup>) removal from water. *Journal of colloid and interface science*, 2016. **468**: p. 334-346.
22. Li, G.-y., et al., Preparation and properties of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 2008. **466**(1-2): p. 451-456.
23. Shokrollahi, H., A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of Magnetite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2016. **426**: p. 74-81.

24. Letti, C., et al., The role of polymer films on the oxidation of magnetite nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry*, 2017. **246**: p. 57-64.
25. Fleet, M., The structure of magnetite. *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 1981. **37**(4): p. 917-920.
26. Wu, W., et al., Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2015. **16**: p.44.
27. Zhi, J., et al., In situ preparation of magnetic chitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion. *Reactive and Functional Polymers*, 2006. **66**(12): p. 1552-1558.
28. Callister, W., *Ciência E Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 2015: Grupo Gen-LTC.
29. Shackelford, J.F., *Ciência dos materiais*. 2008: Pearson Prentice Hall.
30. Muzzarelli, R.A., Chitin and its derivatives: new trends of applied research. *Carbohydrate Polymers*, 1983. **3**(1): p. 53-75.
31. Lee, D.W., et al., Strong adhesion and cohesion of chitosan in aqueous solutions. *Langmuir*, 2013. **29**(46): p. 14222-14229.
32. Rinaudo, M., Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 2006. **31**(7): p. 603-632.
33. Wu, T. and S. Zivanovic, Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*, 2008. **73**(2): p. 248-253.
34. Yi, H., et al., Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(6): p. 2881-2894.
35. Tiwari, A. and S. Gong, Electrochemical detection of a breast cancer susceptible gene using cDNA immobilized chitosan-co-polyaniline electrode. *Talanta*, 2009. **77**(3): p. 1217-1222.
36. Matsumoto, H., et al., Characterization of chitosan nanofiber fabric by electrospray deposition: Electrokinetic and adsorption behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007. **310**(2): p. 678-681.
37. Masotti, A., et al., A novel method to obtain chitosan/DNA nanospheres and a study of their release properties. *Nanotechnology*, 2008. **19**(5): p. 055302.
38. Banerjee, T., et al., Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 2002. **243**(1): p. 93-105.
39. Al-Qadi, S., et al., The role of hyaluronic acid inclusion on the energetics of encapsulation and release of a protein molecule from chitosan-based nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. **141**: p. 223-232.
40. Zhou, L., et al., Adsorption of platinum(IV) and palladium(II) from aqueous solution by magnetic cross-linking chitosan nanoparticles modified with ethylenediamine. *Journal of Hazardous Materials*, 2010. **182**(1-3): p. 518-524.
41. Wu, S., et al., Construction of porous chitosan-xylan-TiO<sub>2</sub> hybrid with highly efficient sorption capability on heavy metals. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2014. **2**(3): p. 1568-1577.
42. Chang, Y.-C. and D.-H. Chen, Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005. **283**(2): p. 446-451.
43. Monier, M., et al., Adsorption of Cu(II), Co(II), and Ni(II) ions by modified magnetic chitosan chelating resin. *Journal of Hazardous Materials*, 2010. **177**(1-3): p. 962-970.
44. Oshita, K., et al., Synthesis of novel chitosan resin derivatized with serine moiety for the column collection/concentration of uranium and the determination of uranium by ICP-MS. *Analytica chimica acta*, 2003. **480**(2): p. 239-249.
45. Xiao, G., H. Su, and T. Tan, Synthesis of core-shell bioaffinity chitosan-TiO<sub>2</sub> composite and its environmental applications. *Journal of Hazardous Materials*, 2015. **283**: p. 888-896.
46. Haldorai, Y. and J.J. Shim, Novel chitosan-TiO<sub>2</sub> nanohybrid: Preparation, characterization, antibacterial, and photocatalytic properties. *Polymer Composites*, 2014. **35**(2): p. 327-333.
47. Xiao, G., et al., Visible-light-mediated synergistic photocatalytic antimicrobial effects and mechanism of Ag-nanoparticles@ chitosan-TiO<sub>2</sub> organic-inorganic composites for water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2015. **170**: p. 255-262.

48. Madureira, A.R., et al., Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. *Journal of Food Engineering*, 2015. **167**: p. 210-216.
49. Janes, K.A., et al., Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 2001. **73**(2): p. 255-267.
50. Kumar, S.P., et al., Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. *International journal of biological macromolecules*, 2015. **78**: p. 87-95.
51. Ngo, D.-H., et al., Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 2015. **51**: p. 200-216.
52. Aider, M., Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 2010. **43**(6): p. 837-842.
53. Dotto, G.L., M.L. Vieira, and L.A. Pinto, Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 2015. **64**(1): p. 126-130.
54. Bezerra, A.M., Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molar. *Dissertação. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico, Universidade de São Paulo*, 2011, p.72.
55. Zoppi, R.A. and M.A. De Paoli, Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: perspectivas atuais *Química nova*, 1993. **16**: p. 6.
56. Inzelt, G., *Conducting polymers: a new era in electrochemistry*. 2012: Springer Science & Business Media.
57. Mattoso, L.H.C., Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. *Química Nova*, 1996. **19**(4): p. 388-399.
58. Faez, R., et al., Polímeros condutores. *Química Nova na Escola*, 2000. **11**(1): p. 13-18.
59. Zhou, N., et al., Highly sensitive electrochemical impedance spectroscopic detection of DNA hybridization based on Aunano–CNT/PANnano films. *Talanta*, 2009. **77**(3): p. 1021-1026.
60. Kannusamy, P. and T. Sivalingam, Chitosan–ZnO/polyaniline hybrid composites: Polymerization of aniline with chitosan–ZnO for better thermal and electrical property. *Polymer Degradation and Stability*, 2013. **98**(5): p. 988-996.
61. Hoffmann, N. and M. Muhler, On the Mechanism of the Oxidative Amination of Benzene with Ammonia to Aniline Over NiO/ZrO<sub>2</sub> as Cataloreactant. *Catalysis letters*, 2005. **103**(1): p. 155-159.
62. Odian, G., *Principles of polymerization*. 2004: John Wiley & Sons.
63. Cao, Y., et al., Influence of chemical polymerization conditions on the properties of polyaniline. *Polymer*, 1989. **30**(12): p. 2305-2311.
64. Daraei, P., et al., Novel polyethersulfone nanocomposite membrane prepared by PANI/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with enhanced performance for Cu(II) removal from water. *Journal of Membrane Science*, 2012. **415–416**: p. 250-259.
65. Chávez-Guajardo, A.E., et al., Efficient removal of Cr (VI) and Cu (II) ions from aqueous media by use of polypyrrole/maghemite and polyaniline/maghemite magnetic nanocomposites. *Chemical Engineering Journal*, 2015. **281**: p. 826-836.
66. Mahto, T.K., A.R. Chowdhuri, and S.K. Sahu, Polyaniline-functionalized magnetic nanoparticles for the removal of toxic dye from wastewater. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014. **131**(19).
67. Li, Y., et al., Composites of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanosheets with polyaniline: preparation, gas sensing properties and sensing mechanism. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **245**, p.34-43.
68. Shamagsumova, R., et al., Polyaniline–DNA based sensor for the detection of anthracycline drugs. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. **220**: p. 573-582.
69. Tan, S., et al., Property influence of polyanilines on photovoltaic behaviors of dye-sensitized solar cells. *Langmuir*, 2004. **20**(7): p. 2934-2937.
70. Miao, F., et al., Flexible solid-state supercapacitors based on freestanding nitrogen-doped porous carbon nanofibers derived from electrospun polyacrylonitrile@ polyaniline nanofibers. *Journal of Materials Chemistry A*, 2016. **4**(11): p. 4180-4187.
71. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 2011: Sarvier.

72. Karp, G., *Biologia celular y molecular: conceptos y experimentos* (6a. 2011: McGraw Hill Mexico.
73. Pray, L., *Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick*. *Nature Education*, 2008. **1**(1): p. 100.
74. Liu, D., *Handbook of nucleic acid purification*. 2009: CRC Press.
75. Butler, J.M., *Fundamentals of forensic DNA typing*. 2009: Academic Press.
76. Worch, E., *Adsorption technology in water treatment: fundamentals, processes, and modeling*. 2012: Walter de Gruyter.
77. Ghasemi, N., et al., *Linearized Equations of Pseudo Second-order Kinetic for the Adsorption of Pb (II) on Pistacia Atlantica Shells*. *IERI Procedia*, 2013. **5**: p. 232-237.
78. Sharma, S.K., *Green Chemistry for dyes removal from waste water: research trends and applications*. 2015: John Wiley & Sons.
79. Noll, K.E., *Adsorption technology for air and water pollution control*. 1991: CRC Press.
80. do Nascimento, R.F., et al., *Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais*. *Biblioteca de Ciências e Tecnologia*, 2014.
81. Haerifar, M. and S. Azizian, *An exponential kinetic model for adsorption at solid/solution interface*. *Chemical engineering journal*, 2013. **215**: p. 65-71.
82. Faust, S.D. and O.M. Aly, *Adsorption processes for water treatment*. 2013: Elsevier.
83. Ho, Y., J. Porter, and G. McKay, *Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: copper, nickel and lead single component systems*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2002. **141**(1-4): p. 1-33.
84. Ho, Y.-S. and G. McKay, *Pseudo-second order model for sorption processes*. *Process biochemistry*, 1999. **34**(5): p. 451-465.
85. Ho, Y.-S., *Comments on using of "pseudo-first-order model" in adsorption* [*Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 81]. *International journal of biological macromolecules*, 2016. **88**: p. 505-506.
86. Largergren, S., *Zur theorie der sogenannten adsorption geloster stoffe*. *KungligaSvenska Vetenskapsakademiens*. 1898. v. 24. p.1–39
87. Wu, F.-C., et al., *Characteristics of pseudo-second-order kinetic model for liquid-phase adsorption: A mini-review*. *Chemical Engineering Journal*, 2009. **151**(1): p. 1-9.
88. Simonin, J.-P., *On the comparison of pseudo-first order and pseudo-second order rate laws in the modeling of adsorption kinetics*. *Chemical Engineering Journal*, 2016. **300**: p. 254-263.
89. Plazinski, W. and W. Rudzinski, *Kinetics of adsorption at solid/solution interfaces controlled by intraparticle diffusion: a theoretical analysis*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009. **113**(28): p. 12495-12501.
90. Lahiri, D.K., et al., *A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested*. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 1992. **25**(4): p. 193-205.
91. Tan, S.C. and B.C. Yiap, *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. **2009**: p. 1-10.
92. Sun, N., et al., *Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: Application to viral nucleic acid extraction from serum*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1325**: p. 31-39.
93. Lahiri, D.K. and B. Schnabel, *DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality*. *Biochemical genetics*, 1993. **31**(7-8): p. 321-328.
94. Gjerde, D.T., L. Hoang, and D. Hornby, *RNA purification and analysis: sample preparation, extraction, chromatography*. 2009: John Wiley & Sons.
95. Kittel, C., *Física do Estado Sólido–8ª Edição*. LTC, Rio de Janeiro, 2006.
96. Primer, A., *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. Copyright Hewlett-Packard Company, Hewlett-Packard publication, 1996(12-5965).
97. Skoog, D., et al., *Fundamentos de Química Analítica*, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006. p. 1000.
98. Schmid, F.X., *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. eLS, 2001.

99. Technology, O.G. Understanding and measuring variations in DNA sample quality. [http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483\\_understanding\\_and\\_measuring\\_variations\\_in\\_dna\\_sample\\_quality](http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality). Acessado em 07 de dezembro de 2016.
100. Dedavid, B.A., C.I. Gomes, and G. Machado, Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. 2007: EdiPUCRS.
101. Sampaio, L.C., et al., Técnicas de magnetometria. Revista Brasileira de Ensino de Física, 2000. **22**(3).
102. Reddy, P.R. and N. Raju, Gel-electrophoresis and its applications. Gel Electrophoresis-Principles and basics, InTech, 2012: p. 15-32.
103. Possik, P.A.C., Elisete Marcia. A análise de DNA por eletroforese [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia\\_molecular/testesgeneticos.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia_molecular/testesgeneticos.pdf). Acessado em 08/01/2017.
104. Barril, P. and S. Nates, Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities. 2012: INTECH Open Access Publisher.
105. Jeremy M. Berg, J.L.T., Lubert Stryer, Biochemistry con aplicaciones clinicas 2013: Reverté.
106. Mullis, K.B., The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American, 1990. **262**(4): p. 56-61.
107. Wilton, S., Dideoxy Sequencing of DNA. eLS, 2002.
108. Jiang, X., et al., Polyaniline-coated chitosan-functionalized magnetic nanoparticles: Preparation for the extraction and analysis of endocrine-disrupting phenols in environmental water and juice samples. Talanta, 2015. **141**: p. 239-246.
109. 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.
110. Human beta globin PCR primer set (PCR control). <https://www.westburg.eu/products/genomics-research/pcr-and-rt-pcr/rt-pcr-reagents/primers-for-rt-pcr/human-beta-globin-pcr-primer-set-pcr-control>. Acessado em 19/07/2016.
111. Mera, T., S. Heimfeld, and D. Faustman, The Spleen Contributes Stem Cells to Peripheral Blood Stem Cell Transplants. J Stem Cell Res Ther, 2014. **4**(253): p. 2.
112. Medina-Llamas, J.C., Uso de nanocompósitos magnéticos de polianilina/maghemita e polipirrol/maghemita para recuperação de dna presente em sistemas biológicos ou em meios aquosos. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015, p.133.
113. Cabuk, M., M. Yavuz, and H.I. Unal, Electrokinetic properties of biodegradable conducting polyaniline-graft-chitosan copolymer in aqueous and non-aqueous media. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **460**: p. 494-501.
114. Sergeev, V., et al. Synthesis of a Conducting Interpolymer Polyaniline–DNA Complex. in Doklady Physical Chemistry. 2003. Springer.
115. Wasewar, K.L., Adsorption of metals onto tea factory waste: a review. International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences, 2010. **3**(3): p. 303-322.
116. Cao, W., et al., Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system. Analytical chemistry, 2006. **78**(20): p. 7222-7228.
117. Teng, Z., et al., Highly magnetizable superparamagnetic iron oxide nanoparticles embedded mesoporous silica spheres and their application for efficient recovery of DNA from agarose gel. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(13): p. 1811-1815.
118. Li, X., J. Zhang, and H. Gu, Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles. Langmuir, 2011. **27**(10): p. 6099-6106.
119. Zhang, J., et al., Magnetic mesoporous silica nanospheres as DNA/drug carrier. Materials Letters, 2012. **67**(1): p. 379-382.
120. Hu, L.-L., et al., Polyethyleneimine–iron phosphate nanocomposite as a promising adsorbent for the isolation of DNA. Talanta, 2015. **132**: p. 857-863.

121. Kermekchiev, M.B., et al., Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic acids research*, 2009: p. gkn1055.
122. Mercier, B., et al., Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic acids research*, 1990. **18**(19): p. 5908.