



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

WINNIE QUEIROZ BRANDÃO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS COMPÓSITOS PARA
PURIFICAÇÃO E BIOSSENSORIZAMENTO DE DNA E
REMOÇÃO DE CONTAMINANTES

Recife

2022

WINNIE QUEIROZ BRANDÃO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS COMPÓSITOS PARA
PURIFICAÇÃO E BIOSSENSORIZAMENTO DE DNA E
REMOÇÃO DE CONTAMINANTES

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

Área de Concentração: Materiais não metálicos

Orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago
Falcão

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

B817p Brandão, Winnie Queiroz
 Preparação e caracterização de materiais compósitos para purificação e
 biossensoriamento de DNA e remoção de contaminantes / Winnie Queiroz
 Brandão. – 2022.
 224 f.: il., fig., tab.

 Orientador: Celso Pinto de Melo.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência
 de Materiais, Recife, 2022

 Inclui referências e apêndices.

 1. Materiais não metálicos. 2. Polímeros condutores. 3. DNA - purificação. I.
 Melo, Celso Pinto de (orientador). II. Título.

 620.19 CDD (23. ed.) UFPE - CCEN 2022-170

WINNIE QUEIROZ BRANDÃO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS COMPÓSITOS PARA
PURIFICAÇÃO E BIOSSENSORIZAMENTO DE DNA E REMOÇÃO DE
CONTAMINANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 13/10/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. André Galembeck (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Glória Maria Vinhas (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Adriana Fontes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra (Examinador Externo)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esta Tese aos meus pais e minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Maria e Lourival, e as minhas irmãs, Clarissa, Raísa e Dandara, por todo amor e cuidado, pela torcida, orações e por sempre estarem caminhando ao meu lado e me apoiando.

Aos familiares que sempre me apoiaram, em especial, meus tios Luís e Luiz Alberto (in memoriam), as minhas tia Frances e Maria José, minha prima Nayanna, e a Patrícia, minha irmã do coração, amo vocês.

Ao meu companheiro Dionísio Kór, por todo cuidado, paciência. Sou muito grata por toda sua ajuda, e por sempre me incentivar ao longo dessa jornada.

Ao professor Celso P. de Melo, pela oportunidade, orientação, amizade, por todos os ensinamentos transmitidos e dedicação.

Aos professores Antônio Azevedo, Eduardo Padrón, e Eduardo Falcão por toda atenção e apoio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da UFPE que contribuíram para a minha formação.

A Edwin Sánchez, Elton Marlon, Lizeth Carolina, e Maurício, pelos conselhos, força, ensinamentos e por terem me fortalecido nos momentos mais difíceis dessa jornada, minha eterna gratidão.

Aos integrantes do grupo PNC, em especial a Andressa, Bruna, Elton Marlon, Gabriela, Hérica, Lizeth Carolina, Maurício e Romário pela ajuda e paciência, cada um de vocês teve um papel importante em minha formação.

A família Lendo - Adriana, Heritier e a pequena Iasmim por todos os momentos compartilhados, minha eterna gratidão.

A comunidade africana da UFPE, muito obrigada por sempre me acolher e fortalecer. Gratidão por todos os ensinamentos e momentos vividos, e por tornar os meus dias mais leves, em especial a Habila, Luís, Papa, Lássana, Nádia e Flamel.

Aos amigos que sempre me apoiaram ao longo desses anos: Johanna Gil, Juan Marcos, Alexandre Oliveira, Kelly Camargo, Ari Patrick, Lucas Melo, Jorge Lenin, Alyson José, Joás Venâncio, Julie, Eulises Alejandro, Yoandris Vielza, Lutuima Capangue, Vinícius Nonato, Rafaela Teixeira, Elias Alves, Márcio Cunha, Mirco e Ana Carla Ragni, muito obrigada por tudo.

Aos amigos de longas datas, André, Anderson, Elton, Genevaldo e Tharcila que mesmo de

longe sempre me enviaram boas energias.

Aos funcionários do Departamento de Física da UFPE, em especial a seu João, Alexsandra, Virgínia e Daniel por serem tão prestativos, ao longo desse período.

Ao pessoal do laboratório de Fotônica, em especial ao professor Anderson Gomes, Edwin, Melissa, Cecília, e Alyson, muito obrigada por toda força, conselhos e apoio.

Aos coordenador do laboratório de Compostos Híbridos, Interfaces e Coloides (Professor André Galembek) e do laboratório de Terras Rara (Professor Severino Alves Júnior), ambos localizados no Departamento de Química Fundamental da UFPE, e a coordenadora do laboratório de processo químico, localizado no Instituto de Pesquisa em Petróleo e Energia (Professora Yeda Medeiros Bastos de Almeida) - UFPE, por disponibilizarem os equipamentos para análises de alguns materiais aqui apresentados.

Agradeço a schematicarts.com pelos desenhos de alguns esquemas apresentados neste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da UFPE por auxiliarem em todas as burocracias.

Por fim, agradeço ao CNPq e a FACEPE pelo apoio financeiro.

"A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo." (MANDELA, 2003).

RESUMO

Neste trabalho, descrevemos a preparação e caracterização de materiais compósitos e apresentamos algumas de suas aplicações na purificação e sensoriamento de DNA e para a remoção de contaminantes. Os materiais desenvolvidos e caracterizados foram: i) membranas de poliestireno-polipirrol (PS-PPI), preparadas pela técnica de eletrofiação e revestidas pela polimerização *in situ* do pirrol; ii) membranas da casca do ovo de galinha modificadas com nanopartículas de ouro (MCO-NPsAu) por ultrassonicação, e iii) um compósito magnético de carboximetilcelulose (CM-CMC), preparado pelo método de co-precipitação. A membrana de PS-PPI foi utilizada inicialmente para a adsorção de DNA de esperma de salmão dissolvido em soluções aquosas, quando apresentou uma capacidade de adsorção de 260 mg/g. Em seguida, essas membranas de PS-PPI foram incorporadas em colunas de centrifugação de modo a que pudéssemos otimizar um protocolo para a extração e purificação de DNA de folhas de alface crespa. As amostras de DNA obtidas eram de excelente integridade e pureza. Esse procedimento se apresenta como um protocolo simples e rápido para a extração de DNA de tecidos vegetais. Por sua vez, o sistema MCO-NPsAu foi utilizado como uma bioplataforma sustentável para a detecção de sequências de DNA do patógeno *Leptospira interrogans*, com base na imobilização prévia de cadeias de fita simples de DNA marcadas com um fluoróforo (FAM-ssDNA) por meio de interações entre as nucleobases do ssDNA e as nanopartículas de ouro. A hibridização ocorre após o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA entrar em contato com a sequência de DNA alvo complementar (cDNA). Com isso, a interação é enfraquecida e ocorre a dessorção do dsDNA (cadeias de fita dupla de DNA), o que leva ao aparecimento de um forte sinal de fluorescência no sobrenadante. Os resultados obtidos revelaram que nosso protocolo é um método simples, relativamente rápido, e altamente sensível, e que apresenta um limite de detecção de 0,24 nM. Por último, discutimos o uso do compósito magnético de carboximetilcelulose para a remoção do corante de azul de toluidina (AT) dissolvidos em meio aquoso. Quando comparados com os de outros adsorventes discutidos na literatura, nossos resultados indicaram que o CM-CMC é um material promissor para a remoção econômica e sustentável de moléculas de corantes de meios aquosos.

Palavras-chaves: membranas; polímeros condutores; purificação de DNA; nanopartículas de ouro; detecção de DNA; compósito magnético.

ABSTRACT

In this work, we describe the preparation and characterization of composite materials and present some of their applications in DNA purification and sensing and the removal of contaminants. The materials developed and characterized were: i) polystyrene-polypyrrole (PS-PPi) membranes, prepared by the electrospinning technique and coated by the *in situ* polymerization of pyrrole; ii) hen eggshell membranes modified with gold nanoparticles ((NPsAu-MCO) by ultrasonication, and iii) a carboxymethylcellulose magnetic composite (CM-CMC), prepared by the co-precipitation method. The PS-PPi membrane was initially used for the adsorption of salmon sperm DNA dissolved in aqueous solutions when it presented an adsorption capacity of 260 mg/g. Then, these PS-PPi membranes were incorporated into spin columns so that we could optimize a protocol for the extraction and purification of DNA from crisp lettuce leaves. The DNA samples obtained were of excellent integrity and purity. This procedure is presented as a simple and fast protocol for the extraction of DNA from plant tissues. In turn, the MCO-NPsAu system was used as a sustainable platform for the detection of DNA sequences of the pathogen *Leptospira interrogans*, based on the previous immobilization of single-stranded DNA strands labeled with a fluorophore (FAM-ssDNA) through interactions between ssDNA nucleobases and gold nanoparticles. Hybridization occurs after the MCO-NPsAu/FAM-ssDNA system interacts with the complementary target DNA sequence (cDNA), which leads to the appearance of a strong fluorescence signal in the supernatant. The results obtained revealed that our protocol is a simple, relatively fast, and highly sensitive method, which has a detection limit of 0.24 nM. Finally, we discuss the use of carboxymethylcellulose magnetic composite for the removal of toluidine blue (AT) dye dissolved in an aqueous medium. When compared with those of other adsorbents discussed in the literature, our results indicated that CM-CMC is a promising material for the economical and sustainable removal of dye molecules from aqueous media.

Keywords: membranes; conductive polymers; DNA purification; gold nanoparticles; DNA detection; magnetic composite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do estireno e do poliestireno.	33
Figura 2 – Cada nucleotídeo é composto de um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada.	34
Figura 3 – Diagrama mostrando a formação de uma ligação fosfodiéster.	35
Figura 4 – Representação da cadeia dupla helicoidal do DNA e da estrutura química dos nucleotídeos.	36
Figura 5 – Estrutura química de alguns polímeros condutores comumente usados: Polianilina, Polipirrol e Politiofeno.	37
Figura 6 – Diferentes estados de oxidação do polipirrol: forma não condutora (a) e em suas formas condutoras após a formação de um pólaron (b) e um bipólaron (c). . . .	39
Figura 7 – Aparato experimental usado na técnica de eletrofiação.	41
Figura 8 – Componentes de um processo de adsorção.	42
Figura 9 – Modelo de Langmuir. Os pontos pretos representam os sítios de adsorção e as elipses brancas as moléculas adsorvidas (a). Modelo de Freundlich que descreve a adsorção em uma superfície heterogênea (b).	44
Figura 10 – Representação do protocolo usado em métodos de extração orgânica (Líquido-Líquido) e por fase sólida (coluna spin e por <i>beads</i> magnéticos).	48
Figura 11 – Estrutura de uma célula vegetal (a) e animal (b).	49
Figura 12 – Foto de algumas variedades de alface.	50
Figura 13 – Esquema do procedimento da Reação em Cadeia da Polimerase.	51
Figura 14 – Componentes de um sistema de eletroforese.	52
Figura 15 – Sequência de etapas para a preparação das membranas PS.	54
Figura 16 – Sequência de etapas para a preparação das membranas compostas de PS-PPi. . .	55
Figura 17 – Etapas do processo de adsorção do DNA na membrana de PS-PPi.	57
Figura 18 – Etapas do processo de eluição do DNA na membrana de PS-PPi.	59
Figura 19 – Representação esquemática da membrana em forma de coluna de spin.	60
Figura 20 – Etapas seguidas no processo de extração e purificação do DNA das folhas de alface.	63

Figura 21 – Membrana de PS preparada após 4 h do processo de eletrofiação, depositada sobre o coletor (a). Membrana de poliestireno antes e após o tratamento térmico-mecânico (b).	66
Figura 22 – Membrana de poliestireno antes e depois do revestimento com polipirrol. . . .	67
Figura 23 – Micrografia das fibras de PS após o tratamento térmico em duas distintas magnificações: 20000 x (a) e 50000 x (b).	68
Figura 24 – Micrografia das fibras de PS após o revestimento com polipirrol em duas distintas magnificações: 20000 x (a) e 50000 x (b).	68
Figura 25 – Espectros de UV-Vis para as membranas PS (I) e PS-PPi (II).	69
Figura 26 – Espectros FTIR para membranas PS (I) e PS-PPi (II).	70
Figura 27 – Medida de ângulo de contato mostrando: (a) o caráter hidrofóbico das membranas de PS após o tratamento térmico, e seu caráter hidrofílico após o tratamento a plasma (b) e (c) após o revestimento com PPi.	71
Figura 28 – Determinação do ponto de carga zero da membrana PS-PPi.	72
Figura 29 – Eficiência da membrana de PS-PPi em adsorver o DNA de esperma de salmão com a variação do pH do meio.	73
Figura 30 – Teste de adsorção do DNA com a membrana de PS tratada a plasma e com a membrana de PS-PPi.	74
Figura 31 – Efeito do tempo de interação.	75
Figura 32 – Efeito da concentração inicial.	76
Figura 33 – Ajuste linear dos dados experimentais para a adsorção de moléculas de DNA em membranas PS-PPi de acordo com os modelos de isoterma de Langmuir (I), Freundlich (II) e Temkin (III).	77
Figura 34 – Ajuste dos dados experimentais da adsorção de DNA pela membrana PS-PPi de acordo com o modelo de isoterma de adsorção de Langmuir.	78
Figura 35 – Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA em membranas PS-PPi de acordo com os modelos de Pseudo-primeira ordem (I), Pseudo-segunda ordem (II), Morris-Weber (III) e Boyd (IV).	79
Figura 36 – Ajuste dos dados experimentais da adsorção de DNA pela membrana PS-PPi de acordo com o modelo de cinética de adsorção de pseudo segunda ordem.	80
Figura 37 – Efeito da temperatura no processo de adsorção de DNA pela membrana PS-PPi.	81

Figura 38 – Variação da constante de equilíbrio de Langmuir (K) com o inverso da temperatura absoluta (T) para os processos de adsorção de DNA pela membrana PS-PPI.	82
Figura 39 – Taxa de eluição de DNA de membranas compostas de PS-PPI para diferentes soluções de eluição alcalina.	83
Figura 40 – Imagens de fluorescência da membrana antes do processo de adsorção (a), após a interação com o corante SYBR Green (b), após o processo de adsorção do DNA (c) e eluição (d).	84
Figura 41 – Concentração e pureza do DNA extraído para os diferentes ensaios fatoriais. . .	86
Figura 42 – Gráfico de Pareto para a concentração de DNA obtida usando a membrana PS-PPI. .	87
Figura 43 – Parâmetros relevantes da fração de DNA da planta purificada para diferentes ensaios durante a otimização do protocolo de extração.	88
Figura 44 – Concentração da fração de DNA extraída de folhas jovens e maduras de alface crespa para a membrana de PS e PS-PPI.	89
Figura 45 – Comparação do rendimento de extração de DNA para folhas de alface madura usando a membrana de PS-PPI e um kit comercial.	90
Figura 46 – Comparação do rendimento de extração de DNA para folhas de alface jovem usando a membrana de PS-PPI e um kit comercial.	91
Figura 47 – Resultados das execuções de eletroforese para DNA extraído de folhas jovens de alface usando a membrana PS-PPI para crespo (1.1 e 1.2), roxo (2.1 e 2.2), americana (3.1 e 3.2) e lisa (4.1 e 4.2), e de alface crespa, utilizando o kit comercial (5.1 e 5.2).	92
Figura 48 – Resultados da amplificação por PCR para amostras de DNA de alface crespa, usando membrana PS-PPI (1), o kit comercial de purificação de DNA de planta (2) e para a amostra negativa (3).	92
Figura 49 – Bandas de eletroforese obtidas após a extração de DNA a partir de folhas maduras de coentro.	93
Figura 50 – Esquema de um biossensor e tipos de imobilização de DNA em um substrato. .	98
Figura 51 – Ilustração do fenômeno de hibridização do DNA (a). Biossensores (b) de DNA por detecção eletroquímica (I) e detecção fluorescente (II).	99
Figura 52 – Algumas aplicações de nanomateriais em diferentes setores.	100
Figura 53 – Classificação dos nanomateriais de acordo com as dimensões.	101
Figura 54 – Suspensões coloidais de nanopartículas de ouro.	102

Figura 55 – Ligação das nucleobases de DNA em NPsAu.	103
Figura 56 – A MCO está localizada entre a casca do ovo e a clara e pode ser separada em duas camadas: uma externa e outra interna.	104
Figura 57 – Micrografia eletrônica de varredura da <i>Leptospira interrogans</i> isolada pela primeira vez em 1915.	105
Figura 58 – Etapas de preparação da MCO e das NPsAu e do revestimento da MCO com as NPsAu.	108
Figura 59 – Etapas de imobilização da sonda FAM-ssDNA e detecção das sequências alvo (cDNA).	109
Figura 60 – Distribuição do diâmetro hidrodinâmico e em detalhe a solução coloidal das NPsAu.	112
Figura 61 – Micrografias de MEV da MCO (50 kx) (a), e da MCO - NPsAu (50 kx) -10 mL (b), 30 mL (50 e 100 kx) (c), 50 mL (d). No detalhe, são apresentadas fotos das membranas.	113
Figura 62 – Espectros de UV-Vis da MCO (a), NPsAu (b) e MCO-NPsAu (c).	114
Figura 63 – Análise termogravimétrica para a MCO (a) e MCO-NPsAu (b).	115
Figura 64 – Representação do mecanismo de detecção de fluorescência de ácidos nucleicos com o uso da bioplataforma MCO-NPsAu.	116
Figura 65 – Eficiência de imobilização da fita de DNA em sua forma simples (ssDNA) e dupla (dsDNA) pela membrana MCO-NPsAu.	117
Figura 66 – Espectros de emissão de fluorescência solução de ssDNA-FAM (I), após interação a MCO (II) e após a interação com a MCO-NPsAu (III).	118
Figura 67 – Porcentagem de recuperação de fluorescência após a interação da MCO/FAM-ssDNA e MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com uma solução de DNA alvo cDNA, ncDNA e com o tampão Tris/MgCl ₂ , pH 7,4 (Branco).	119
Figura 68 – Cinética de imobilização da sonda FAM-ssDNA na MCO-NPsAu (a) e de recuperação da fluorescência do FAM-ssDNA (b) após interação dos sistemas MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com o cDNA.	120
Figura 69 – Resposta da intensidade de fluorescência normalizada após a interação do cDNA na faixa de concentração de (2–200) nM. Em detalhe, o espectro de emissão de fluorescência (2–200) nM [a-j].	121
Figura 70 – Resposta linear para diferentes concentrações de cDNA.	122

Figura 71 – Seletividade do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA para a detecção de cDNA alvo complementar e com (B_1) uma base incompatível, (B_2) duas bases incompatíveis, (ncDNA) alvo não complementar e o branco (a). Espectro de emissão de fluorescência (b).	123
Figura 72 – Recuperação da fluorescência em função dos dias de análise do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA armazenado quando interage com o cDNA.	124
Figura 73 – Estruturas químicas de alguns corantes sintéticos.	129
Figura 74 – Estrutura química do corante azul de toluidina.	130
Figura 75 – Estrutura química do sódio carboximetilcelulose.	132
Figura 76 – Etapas da preparação de preparação do compósito magnético de carboximetilcelulose.	134
Figura 77 – Etapas seguidas no processo de adsorção e dessorção do corante AT pelo CM-CMC (I) e no experimento de reutilização do adsorvente (II).	137
Figura 78 – Pó obtido após a síntese do CM-CMC.	138
Figura 79 – Partículas CM-CMC: imagens STEM em diferentes ampliações (a) e (b).	139
Figura 80 – Tamanho de partícula do CM-CMC.	139
Figura 81 – Espectros UV-Vis para CMC (a), NPsM pura (b) e do CM-CMC (c).	140
Figura 82 – Espectros FTIR para CMC (a), NPsM pura (b) e do CM-CMC (c).	141
Figura 83 – Análise termogravimétrica de NPsM (a) e CM-CMC (b).	142
Figura 84 – (a) Eficiência de NPsM e CM-CMC na remoção do corante AT do meio aquoso. (b) Solução de corante AT antes e após a interação com o CM-CMC.	143
Figura 85 – Variação do Potencial Zeta do CM-CMC com a variação do pH.	144
Figura 86 – Gráfico representando a eficiência do CM-CMC em remover o corante AT com a variação do pH do meio.	145
Figura 87 – Mecanismo proposto para a interação do CM-CMC com as moléculas de AT.	145
Figura 88 – Variação da quantidade de corante AT removido em função do tempo de exposição ao CM-CMC na concentração de 30 mg/L de solução de corante.	146
Figura 89 – Efeito da concentração inicial de AT na % de remoção e na capacidade de adsorção do CM-CMC.	147
Figura 90 – Ajuste linear dos dados experimentais para a adsorção de moléculas do AT no CM-CMC de acordo com os modelos de isoterma de Langmuir (I), Freundlich (II) e Temkin (III).	148

Figura 91 – Ajuste dos dados experimentais da adsorção do corante AT pelo CM-CMC de acordo com o modelo de isoterma de adsorção de Langmuir.	149
Figura 92 – Ajuste dos dados experimentais para adsorção do AT por CM-CMC de acordo com os modelos (I) PPO, (II) PSO, (II) MW e (IV) Boyd.	150
Figura 93 – Ajuste dos dados experimentais para adsorção do AT pelo CM-CMC de acordo com o modelo de Pseudo-segunda ordem.	151
Figura 94 – Cinética da dessorção do corante AT por CM-CMC, usando solução salina NaCl (0,1 M).	152
Figura 95 – Desempenho de CM-CMC quando submetido a sucessivos ciclos de adsorção/-dessorção do corante AT.	152
Figura 96 – Gráfico da porcentagem de remoção do AT pelo CM-CMC em diferentes temperaturas e concentrações iniciais.	154
Figura 97 – Variação da constante de equilíbrio de Langmuir (K_L) com o inverso da temperatura absoluta (T).	155
Figura 98 – A capacidade de adsorção do CM-CMC na captura de outros corantes.	156
Figura 99 – Variações de parâmetros (concentração e distância) para otimização do processo de fabricação a membrana de PS.	183
Figura 100 – Diferença da membrana de PS após o revestimento do polipirrol sem e com o tratamento a plasma (a). Membranas cortadas em círculos (b).	184
Figura 101 – Comportamento elétrico da membrana PS-PPi.	185
Figura 102 – Taxa de adsorção de DNA pela membrana de PS-PPi para diferentes tempos de polimerização (a). MEV da membrana de PS-PPi após 6 h de polimerização (b).	186
Figura 103 – Intensidade média de fluorescência do corante SYBR Green após o processo de adsorção e eluição do DNA pela membrana de PS-PPi.	187
Figura 104 – Ponto de carga zero da MCO-NPsAu.	188
Figura 105 – Recuperação da fluorescência em diferentes tampões.	189
Figura 106 – Imagens MEV a uma magnificação de 100 Kx para a MCO-NPsAu preparada por diferentes volumes de NPsAu (a). Espectros de fluorescência após a imobilização das sondas de FAM-ssDNA nas membranas (b). Ensaio de sensoriamento (c).	191
Figura 107 – Representação da preparação da síntese do compósito Au-PPi.	195
Figura 108 – Intensidade de fluorescência do compósito Au/Polipirrol para diferentes comprimentos de onda de excitação (Amostra +++).	200

Figura 109–Espectro de emissão do compósito Au/Polipirrol para $\lambda_{exc} = 350$ nm (a). Imagens da cubeta contendo a amostra 8 (+++) e a amostra branco.	200
Figura 110–Representação gráfica da análise estatística para a intensidade de fluorescência dos compósitos de Au/Polipirrol: Gráfico de Pareto.	201
Figura 111–Representação gráfica da análise estatística para a intensidade de fluorescência dos compósitos de Au/Polipirrol: gráfico cúbico.	202
Figura 112–Representação gráfica da análise estatística para o potencial zeta do compósito Au/Polipirrol: Gráfico de Pareto.	204
Figura 113–Representação gráfica da análise estatística para o potencial zeta do compósito Au/Polipirrol: Gráfico cúbico.	204
Figura 114–Gráfico de Pareto para o diâmetro médio das partículas dos Compósitos Au/Polipirrol.	206
Figura 115–Gráfico cúbico para o diâmetro médio das partículas dos Compósitos Au/Polipirrol.	206
Figura 116–Espectro de UV-Vis do compósito de Au/Polipirrol.	207
Figura 117–Espectro de FTIR do compósito Au/Polipirrol.	208
Figura 118–Imagens de MEV do compósito Au/polipirrol em diferentes magnificações: 66,9 kx (a) e 100 kx (b).	209
Figura 119–Imagens de STEM do compósito Au/polipirrol em diferentes magnificações: 75,5 kx (a), 97 kx (b) e 209 kx (c).	210
Figura 120–Imagens capturadas pelo microscópio de fluorescência em diferentes regiões. . .	211
Figura 121–Técnica de varredura Z em abertura aberta (a) e fechada (b) para o compósito Au/Polipirrol.	212
Figura 122–Efeito do Au/Polipirrol sobre células de mamíferos (Fibroblastos, células Vero e macrófagos) e sobre células de carcinoma cervical humano (Hela).	213
Figura 123–Etapas de preparação do compósito.	215
Figura 124–Espectro UV-Vis das nanopartículas magnéticas de polipirrol-polianilina.	216
Figura 125–Espectro FTIR das nanopartículas magnéticas de polipirrol-polianilina.	216
Figura 126–Espectro de emissão de fluorescência antes e depois da interação com o nanocompósito magnético de PPI-PANI.	217
Figura 127–Recuperação da fluorescência após a interação do sistema NPsM/PPI-PANI/FAM-ssDNA com o seu alvo complementar (cDNA) e não complementar (ncDNA). . .	218
Figura 128–Bandas de eletroforese após a extração de DNA a partir de amostras de fungos.	219

Figura 129–Etapas de preparação e espectro UV-Vis das nanopartículas de óxido de zinco e prova do conceito com o ácido ascórbico.	220
Figura 130–Espectro UV-Vis e a foto do compósito CMC-NPsAu. Além do filme de CMC sem a presença das NPsAu.	221

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de métodos de extração de DNA.	50
Tabela 2 – Planejamento fatorial 2^3 : Fatores e níveis adotados para a seleção da solução de lise.	61
Tabela 3 – Matriz de coeficiente de contraste do planejamento 2^3 para a seleção da solução de lise.	61
Tabela 4 – Abreviaturas das soluções utilizadas no processo de extração e purificação de DNA de plantas.	62
Tabela 5 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção de DNA em membranas PS-PPI de acordo com diferentes modelos de isoterma.	78
Tabela 6 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção de DNA em membranas PS-PPI de acordo com diferentes modelos cinéticos.	80
Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos para adsorção do DNA pela membrana de PS-PPI.	82
Tabela 8 – Comparação dos parâmetros de desempenho da membrana PS-PPI com os de outros adsorventes para a captura de DNA de espermatozoides de salmão dissolvido em meio aquoso.	85
Tabela 9 – Sequências de DNA utilizadas no trabalho.	106
Tabela 10 – Comparação entre o uso da MCO-NPsAu e outros sistemas para detecção fluorescente de ácidos nucleicos.	125
Tabela 11 – Exemplos de métodos de remoção de corantes.	131
Tabela 12 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção do AT no CM-CMC de acordo com os modelos de isoterma de Langmuir, Freundlich e Temkin.	148
Tabela 13 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção do AT pelo CM-CMC de acordo com diferentes modelos cinéticos.	150
Tabela 14 – Comparação dos parâmetros de desempenho do CM-CMC com outros adsorventes para a remoção do adsorção do corante AT dissolvido em meio aquoso.	153
Tabela 15 – Parâmetros termodinâmicos para adsorção do corante Azul de Toluidina pelo CM-CMC.	156
Tabela 16 – Planejamento fatorial 2^3 : Fatores e níveis adotados no planejamento para a síntese do compósito de Au/Polipirrol	194

Tabela 17 – Matriz de coeficiente de contraste do planejamento 2^3 para a síntese do compósito Au/Polipirrol.	195
Tabela 18 – Planejamento fatorial e intensidade de fluorescência dos compósitos Au/Polipirrol.	201
Tabela 19 – Planejamento fatorial e medidas de potencial zeta (mV) dos compósitos Au/Polipirrol.	203
Tabela 20 – Planejamento fatorial e diâmetro médio de partículas dos compósitos Au/Polipirrol.. . . .	205

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AM	Azul de Metileno
AT	Azul de Toluidina
b	Constante de adsorção no equilíbrio
B₁	DNA alvo com uma base incompatível
B₂	DNA alvo com duas bases incompatíveis
C₀	Concentração inicial
C_i	Constante de difusão intrapática
C_e	Concentração no equilíbrio
C_f	Concentração final
C_t	Concentração em função do tempo
CM	Compósito magnético
CMC	Carboximetilcelulose
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d_{A-C}	Distância entre agulha-coletor
dsDNA	DNA de fita dupla
DMF	Dimetilformamida
F	Intensidade de Fluorescência
FAM	6- Carboxifluoresceína
FAM-dsDNA	DNA fita dupla marcado com 6- Carboxifluoresceína
FAM-ssDNA	DNA fita simples marcado com 6- Carboxifluoresceína
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
G	Guanina
ITS	Espaçador interno transcrito
K₁	Constante de velocidade de adsorção do modelo cinético de PPO

K₂	Constante de velocidade de adsorção do modelo cinético de PSO
K_F	Constante relacionada com capacidade de adsorção
K_{id}	Taxa de adsorção do modelo cinético MW
λ	Comprimento de onda
m	Massa do adsorvente
MCO	Membrana da Casca do Ovo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPTS	3-Mercaptopropilmetoxisilano
MW	Modelo cinético de Morris-Weber
nm	Nanômetro (subunidade do metro)
NPsAu	Nanopartículas de Ouro
PANI	Polianilina
PCZ	Ponto de Carga Zero
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCs	Polímeros condutores
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto Isoelétrico
PS	Poliestireno
PPI	Polipirrol
PPO	Modelo cinético de pseudo-primeira-ordem
PPS	Modelo cinético de pseudo-segunda-ordem
PZ	Potencial Zeta
q_e	Capacidade de adsorção no equilíbrio
q_m	Capacidade máxima de adsorção
q_t	Capacidade máxima no tempo
R²	Coeficiente de correlação
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto

ssDNA	DNA de fita simples
STEM	Microscopia eletrônica de varredura por transmissão
<i>t</i>	Tempo
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
θ	Ângulo de contato
U	Uracila
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível
V	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	MEMBRANA DE POLIESTIRENO-POLIPIRROL PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS VEGETAIS	30
2.1	INTRODUÇÃO	30
2.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
2.2.1	Polímeros	33
2.2.1.1	<i>Poliestireno</i>	33
2.2.1.2	<i>Ácido nucleico: DNA</i>	34
2.2.2	A classe dos polímeros condutores	36
2.2.2.1	<i>Polipirrol</i>	38
2.2.3	Técnica de Eletrofiação	40
2.2.4	Estudo sobre adsorção	42
2.2.4.1	<i>Isotermas de adsorção</i>	43
2.2.4.2	<i>Cinética de adsorção</i>	45
2.2.5	Métodos de extração e purificação de DNA	47
2.2.5.1	<i>Extração de DNA a partir de amostras vegetais</i>	48
2.2.6	Alface	50
2.2.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	51
2.2.8	Eletroforese	52
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
2.3.1	Materiais	53
2.3.2	Preparação das membranas de poliestireno	53
2.3.3	Revestimento das membranas com polipirrol	54
2.3.4	Métodos de caracterização	55
2.3.5	Experimentos de adsorção de DNA em um sistema modelo	56
2.3.5.1	<i>Efeito do pH</i>	57
2.3.5.2	<i>Efeito do tempo de interação, concentração inicial de DNA e temperatura</i>	57
2.3.6	Eluição de DNA	58
2.3.7	Microscopia de fluorescência	59
2.3.8	Processo de extração e purificação de DNA de tecidos vegetais	59

2.3.8.1	<i>Preparação do sistema</i>	60
2.3.8.2	<i>Otimização do processo de extração e purificação do DNA de tecidos vegetais</i>	60
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
2.4.1	Produção das membranas de poliestireno e seu revestimento com polipirrol	66
2.4.2	Caracterização das membranas de PS e PS-PPi	68
2.4.2.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	68
2.4.2.2	<i>Espectroscopia no Ultravioleta - Visível (UV-Vis)</i>	69
2.4.2.3	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> . . .	70
2.4.2.4	<i>Ângulo de contato</i>	71
2.4.3	Experimentos de adsorção de DNA em um sistema modelo	72
2.4.3.1	<i>Efeito do pH</i>	72
2.4.3.2	<i>Efeito do tempo de interação e da concentração inicial de DNA</i>	75
2.4.3.3	<i>Isotermas de adsorção</i>	76
2.4.3.4	<i>Cinética de adsorção</i>	78
2.4.4	Efeito da temperatura	81
2.4.5	Experimentos de eluição	83
2.4.6	Microscopia de fluorescência	84
2.4.7	Comparação com outros adsorventes de DNA	85
2.4.8	Extração de DNA de vegetais	86
2.4.8.1	<i>Otimização do protocolo</i>	86
2.4.8.2	<i>Efeito da maturidade da folha e do tipo de alface no rendimento do DNA</i> .	88
2.4.8.3	<i>Comparação de rendimento com um kit comercial</i>	90
2.4.8.4	<i>Integridade e qualidade do DNA</i>	91
2.4.8.5	<i>Purificação de DNA de outro tecido vegetal</i>	93
2.5	CONCLUSÃO	94
3	USO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO BIOPLATAFORMA SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	95
3.1	INTRODUÇÃO	95
3.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	97
3.2.1	Biossensores	97
3.2.1.1	<i>Biossensores baseados em DNA</i>	98

3.2.2	Nanomateriais	100
3.2.3	Nanobiotecnologia	101
3.2.3.1	<i>Nanopartículas de ouro (NPsAu)</i>	102
3.2.4	Membrana da casca do ovo (MCO)	104
3.2.5	Leptospirose	105
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	106
3.3.1	Materiais	106
3.3.2	Preparação da MCO, NPsAu e MCO-NPsAu	106
3.3.2.1	<i>Obtenção da membrana da casca do ovo (MCO)</i>	106
3.3.2.2	<i>Preparação das nanopartículas de ouro (NPsAu)</i>	107
3.3.2.3	<i>Revestimento da membrana da casca do ovo</i>	107
3.3.3	Métodos de caracterização da MCO, NPsAu e MCO-NPsAu	108
3.3.4	Experimentos de biossensoriamento por fluorescência	109
3.3.4.1	<i>Experimentos iniciais</i>	110
3.3.4.2	<i>Cinética de Imobilização</i>	110
3.3.4.3	<i>Cinética de Hibridização</i>	110
3.3.4.4	<i>Limite de detecção</i>	111
3.3.4.5	<i>Seletividade</i>	111
3.3.4.6	<i>Avaliação do período de armazenamento</i>	111
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	112
3.4.1	Preparação das nanopartículas de ouro	112
3.4.2	Caracterização das membranas	112
3.4.2.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	112
3.4.2.2	<i>Espectroscopia no Ultravioleta - Visível (UV-Vis)</i>	114
3.4.2.3	<i>Análises Termogravimétricas (TGA)</i>	115
3.4.3	Experimentos de biossensoriamento	116
3.4.3.1	<i>Teste inicial</i>	116
3.4.3.2	<i>Influência da membrana da casca de ovo no processo de biossensoriamento</i>	117
3.4.3.3	<i>Cinética de Imobilização e Hibridização</i>	119
3.4.3.4	<i>Determinação do limite de detecção</i>	121
3.4.3.5	<i>Seletividade</i>	122
3.4.3.6	<i>Estabilidade do sistema</i>	124
3.4.3.7	<i>Comparação com outros materiais encontrados na literatura</i>	124

3.5	CONCLUSÃO	126
4	USO DE UM COMPÓSITO MAGNÉTICO DE CARBOXIMETIL- CELULOSE PARA REMOÇÃO DE CORANTE AZUL DE TOLUI- DINA DE MEIOS AQUOSOS	127
4.1	INTRODUÇÃO	127
4.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	129
4.2.1	Corantes	129
4.2.1.1	<i>Azul de Toluidina</i>	<i>130</i>
4.2.2	Métodos de remoção de corantes	130
4.2.3	Carboximetilcelulose	131
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	133
4.3.1	Materiais	133
4.3.2	Preparação do compósito magnético de carboximetilcelulose	133
4.3.3	Métodos de caracterização	134
4.3.4	Experimentos de remoção do corante azul de toluidina	135
4.3.4.1	<i>Efeito do pH</i>	<i>135</i>
4.3.4.2	<i>Efeito do tempo de interação e concentração inicial de corante AT</i>	<i>135</i>
4.3.5	Experimentos de dessorção e reutilização	136
4.3.6	Eficiência do CM-CMC na adsorção de outros corantes	137
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	138
4.4.1	Preparação do compósito	138
4.4.2	Métodos de Caracterização	138
4.4.2.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM) e Espalha- mento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	<i>138</i>
4.4.2.2	<i>Espectroscopia no Ultravioleta - Visível (UV-Vis) e Espectroscopia no In- fravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	<i>140</i>
4.4.2.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	<i>142</i>
4.4.3	Experimentos de adsorção do corante AT pelo CM-CMC	143
4.4.3.1	<i>Teste inicial</i>	<i>143</i>
4.4.3.2	<i>Efeito do pH</i>	<i>144</i>
4.4.4	Efeito do tempo de interação e concentração inicial de corante AT	146
4.4.4.1	<i>Isotermas de adsorção</i>	<i>147</i>
4.4.4.2	<i>Cinética de adsorção</i>	<i>149</i>

4.4.5	Experimento de dessorção e reutilização	151
4.4.6	Comparação com outros adsorventes do corante azul de toluidina .	153
4.4.7	Análise da termodinâmica	154
4.4.8	Capacidade do CM-CMC para capturar outros corantes	156
4.5	CONCLUSÃO	157
5	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	158
	REFERÊNCIAS	160
	APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLEMENTARES DE PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA MEMBRANA PS-PPI	183
	APÊNDICE B – RESULTADOS COMPLEMENTARES DA APLICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO	188
	APÊNDICE C – TRABALHO EM PROCESSO DE FINALIZAÇÃO: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO OURO/POLIPIRROL	193
	APÊNDICE D – TRABALHOS EM ANDAMENTO	215
	APÊNDICE E – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	222

1 INTRODUÇÃO

Na presente tese, apresentaremos os resultados obtidos ao longo do período do meu doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais (PGMTR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os trabalhos aqui relatados foram desenvolvidos no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais, localizado no Departamento de Física da UFPE, a menos de algumas caracterizações e ensaios realizados em outros laboratórios localizados na UFPE e na Fiocruz - Instituto Aggeu Magalhães.

Esse trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de materiais baseados em membranas poliméricas, membranas naturais, polímeros condutores, nanopartículas metálicas, nanopartículas magnéticas, e suas aplicações em extração e purificação de DNA, sensoriamento de DNA, remoção de contaminantes em meios aquosos.

Para alcançar nossos objetivos gerais, trabalhamos ao longo dos seguintes objetivos específicos:

- Produzir e caracterizar membranas de poliestireno utilizando a técnica de eletrofiação e revestimento através da polimerização química *in situ* do polímero condutor polipirrol.
- Fazer a captura e eluição do DNA de esperma de salmão dissolvidos em meios aquosos utilizando o processo de batelada.
- Estabelecer os melhores parâmetros para o protocolo de extração e purificação do DNA de amostras vegetais usando a membrana de poliestireno-polipirrol em um sistema de coluna de centrifugação.
- Preparar e caracterizar membranas da casca do ovo revestidas com nanopartículas de ouro.
- Imobilizar cadeias de DNA de fita simples, marcadas com um fluoróforo, na membrana revestida com nanopartículas de ouro (MCO/NPsAu) e aplicá-los como sistema de detecção do DNA alvo associada ao parasita *Leptospira interrogans*.
- Estabelecer parâmetros de sensibilidade, seletividade da detecção por fluorescência.
- Investigar o uso do compósito magnético de carboximetilcelulose (CM-CMC) como adsorvente para a remoção do corante de azul de toluidina em meio aquoso, avaliando seu comportamento em experimentos de adsorção e dessorção e termodinâmicos.

Este manuscrito está organizado da seguinte forma:

- Primeiramente, serão descritos a preparação, caracterização e uso da membrana de poliestireno/polipirrol como adsorvente para na captura de DNA a partir de um sistema modelo, bem como os resultados obtidos no ajuste dos parâmetros no protocolo de extração de DNA a partir de tecidos vegetais e sua purificação.
- Em seguida, são apresentados os procedimentos experimentais utilizados para obtenção da membrana da casca do ovo e o revestimento com nanopartículas de ouro e seu uso como bioplataforma funcionalizada para a detecção fluorescente de sequências de DNA do parasita *Leptospira interrogans*.
- Após isso, são discutidas a preparação e a caracterização de um compósito de CM-CMC e seu uso em ensaios de remoção do corante azul de toluidina dissolvido em meios aquosos.
- Finalmente, serão apresentadas as conclusões e as perspectivas gerais para uma futura continuação deste trabalho.

Esta tese contém ainda cinco apêndices, onde são apresentados experimentos adicionais dos trabalhos realizados, um estudo que se encontra em sua fase final, além de uma breve apresentação de alguns projetos futuros.

2 MEMBRANA DE POLIESTIRENO-POLIPIRROL PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS VEGETAIS

2.1 INTRODUÇÃO

A extração e purificação do DNA é a etapa inicial de diferentes investigações em biologia molecular, como clonagem, identificação de genótipos, entre outros na área genética (ABOUL-MAATY; ORABY, 2019). O processo de extração e purificação de DNA de plantas, obtendo um material de qualidade, é considerado desafiador, por conta da presença de uma parede celular rígida e grande fração de contaminantes e metabólitos secundários (polissacarídeos, polifenóis, entre outros compostos químicos) nos tecidos vegetais. Para que sejam obtidas amostras de DNA de alta qualidade, os procedimentos de extração e purificação precisam ser ajustados de acordo com o grau de contaminantes presentes no tecido da planta, uma vez que metabólitos secundários presentes na amostra final de DNA podem interferir nas aplicações subsequentes, como a amplificação na reação em cadeia da polimerase (PCR) (LAVANYA; ARUN, 2019; TAMARI; HINKLEY, 2016; HENRY, 2012; FRIAR, 2005).

Atualmente, as diferentes metodologias de isolamento de DNA de plantas podem ser enquadradas em uma de três categorias: i) método CTAB padrão (brometo de cetiltrimetilamônio), ii) métodos rápidos de extração de DNA, e iii) kits comerciais de isolamento de DNA (SINGH; SINGH, 2015). O método CTAB, originalmente proposto em 1980 por Murray e Thompson (MURRAY; THOMPSON, 1980), foi adaptado para se adequar a diferentes aplicações (DOYLE; DOYLE, 1987; AZMAT et al., 2012; ALLEN et al., 2006; GHOSH et al., 2009; INGLIS et al., 2018). Embora possa ser considerado um método padrão para a extração de DNA de alta qualidade a partir de uma ampla variedade de plantas, os protocolos correspondentes são demorados, exigindo muitas etapas de centrifugação e incubação e o uso de solventes, como o fenol-clorofórmio, que são tóxicos e podem contaminar o DNA purificado (SHI; PANTHEE, 2017). Face à necessidade de reduzir o tempo de extração e dispensar o uso de reagentes prejudiciais ao homem e ao meio ambiente, se fez essencial o desenvolvimento de protocolos alternativos.

Os métodos de extração rápida, que geralmente se baseiam no uso de soluções alcalinas (NaOH), Tris-HCl, e em processos de centrifugação para purificação do DNA, envolvem procedimentos simples e rápidos, mas de menor eficiência e com valores geralmente baixos na pureza e rendimento dos materiais obtidos (BAGGE; LÜBBERSTEDT, 2008; OSMUNDSON et al., 2013).

Mais recentemente, kits comerciais têm sido amplamente utilizados para extração e purificação de DNA de plantas, por serem eficientes e fáceis de manusear, enquanto resultando em um material final de alta qualidade. Em termos gerais, os kits comerciais são baseados em métodos de extração em fase sólida, em que a fita de DNA se liga a uma matriz sólida que possui afinidade por moléculas de ácido nucleico em condições caotrópicas (TAN; YIAP, 2009; SHI; LEWIS; PANTHEE, 2018). Este processo dispensa o uso de solventes orgânicos tóxicos, permitindo a purificação essencialmente livre de contaminantes. A maioria desses kits usa colunas de rotação, onde o material sólido é acoplado ao exterior para facilitar a ligação, lavagem e eluição do DNA. Os materiais usados contêm sílica na forma de uma matriz sólida, geralmente na forma de um filtro de fibra de vidro ou uma membrana (SHI; PANTHEE, 2017). Atualmente, os kits comerciais para extração de DNA de plantas também incorporam materiais magnéticos funcionalizados, o que simplifica a etapa de purificação, que pode ser feita de modo simples com o auxílio de um campo magnético externo. No entanto, os kits comerciais costumam ser de alto custo para uso regular em laboratórios de pesquisa, e a busca por protocolos simples e econômicos tem levado a um aumento no desenvolvimento e uso de materiais de matriz sólida (VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2011; ALEXANDER et al., 2007; THOMPSON; HRABAK, 2018). Assim, continua a existir a necessidade de métodos melhorados de extração e purificação de DNA, que possam aliar a simplicidade na execução a um bom nível de eficiência. Exemplos de kits comerciais são DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), Genomic DNA Isolation Kit (Plant) (GeneDireX), PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen), Mag-Bind® Plant DNA DS 96 Kit (Omega Bio-tek), etc.

Neste capítulo, será apresentado o uso de uma membrana funcionalizada como alternativa de um material de matriz sólida para a extração e purificação de DNA. Para a preparação das membranas, o método de eletrofiação foi utilizado. Essa é uma técnica versátil e de baixo custo, que permite a utilização de diferentes materiais para a obtenção de micro e nanofibras organizadas em filmes que apresentam alta porosidade e alta área superficial (ALIHEIDARI et al., 2019). Essas características fazem das membranas um material adsorvente que, embora amplamente utilizado em diferentes áreas (SUJA et al., 2017; DOU et al., 2019; HABIBA et al., 2017), não tem sido amplamente aplicado para a captura e purificação de DNA (BARBOSA et al., 2019; DEMIRCI; CELEBIOGLU; UYAR, 2014).

Atualmente, os polímeros condutores (PCs) têm recebido muita atenção, por suas características únicas, como baixa densidade, possibilidade de alteração de suas propriedades de acordo com as condições do meio e resistência à corrosão (MUBARAK et al., 2021). Por esse e

outros motivos, os PCs encontraram as mais diversas aplicações, como dispositivos de armazenamento de energia (SHI; PENG; YU, 2015), sensores e biossensores (JANATA; JOSOWICZ, 2003; NAMBIAR; YEOW, 2011). Dentre os polímeros condutores, o polipirrol tem sido amplamente utilizado no campo da biotecnologia (SAOUDI et al., 1997b; ESMAEILI et al., 2017). Em sua forma protonada, o polipirrol pode interagir com ânions e poliânions, permitindo a captura de macromoléculas, como o DNA (SAOUDI et al., 1997a). No presente estudo, foi examinado o uso de uma membrana composta por poliestireno-polipirrol (PS-PPI), inicialmente para a captura de DNA de esperma de salmão em meio aquoso e posteriormente para a extração e purificação de DNA de amostras vegetais.

2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2.1 Polímeros

Polímeros são macromoléculas formadas pelo encadeamento sucessivo por meio de ligações químicas de um grande número de moléculas menores, ou unidades repetidas, chamadas monômeros (GAD, 2014; KULKARNI; SHAW, 2016). Os polímeros orgânicos são constituídos por ligações do tipo covalente entre átomos de carbono e hidrogênio, em especial, podendo também envolver heteroátomos. Os polímeros podem ser classificados de distintas maneiras; por exemplo, de acordo com sua origem, quando podem ser sintéticos ou naturais. Os polímeros sintéticos são aqueles produzidos artificialmente, e de cuja classe fazem parte o polietileno (PE), polibutadieno (PB), o poliestireno (PS) e entre outros (SHRIVASTAVA, 2018). Por sua vez, polímeros naturais são aqueles produzidos ao longo do desenvolvimento de um organismo vivo, do que são exemplos os ácidos nucleicos (o ácido desoxirribonucleico (DNA) [que será explicado com mais detalhes na Seção 2.2.1.2] e ribonucleico (RNA)), as proteínas, a celulose, e a borracha (COUNCIL et al., 1994). Neste trabalho usamos o polímero sintético poliestireno que será apresentado com mais detalhes na próxima seção.

2.2.1.1 Poliestireno

O poliestireno (PS) é um polímero sintético produzido a partir da polimerização do monômero estireno (um hidrocarboneto líquido obtido comercialmente a partir do petróleo (SARSBY, 2006)). Na Fig. 1, é mostrada a estrutura química desse polímero.



Fonte: Adaptado da Referência: (CHAUHAN et al., 2008).

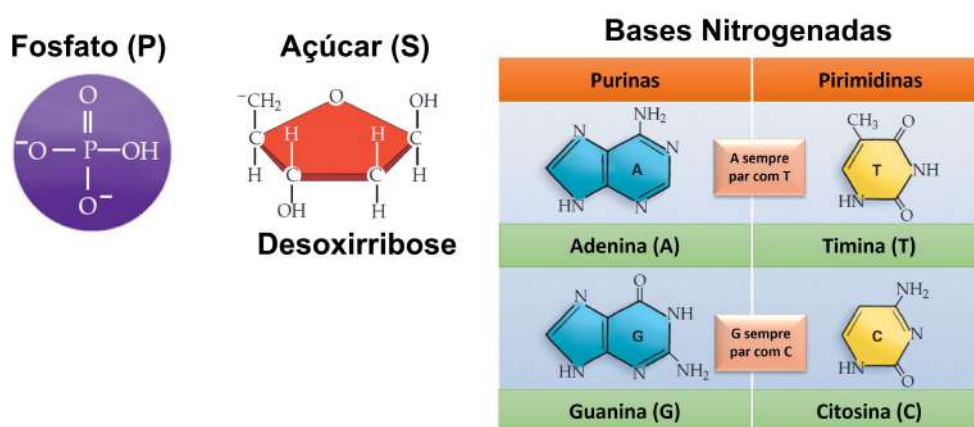
O PS é um material transparente e rígido, sendo hoje um dos polímeros mais utilizados em aplicações como embalagens, isolamento, filtração etc. Além disso, tem sido atualmente usado

na fabricação de membranas pela técnica de eletrospiação (que será abordada mais adiante) para aplicações nas áreas de engenharia de tecidos (OH et al., 2014), filtração (RAJAK et al., 2017), sensores (de Aguiar et al., 2021) etc (ELECTROSPINNING..., 2008).

2.2.1.2 Ácido nucleico: DNA

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) representam uma importante classe de moléculas biológicas, por desempenhar a função essencial de armazenar e transmitir a informação genética em todos os organismos vivos. O DNA é considerado um biopolímero, composto por polinucleotídeos, com a unidade repetitiva sendo constituída por quatro subunidades distintas, denominadas nucleotídeos. Os nucleotídeos são por sua vez compostos pela ligação de uma base nitrogenada, um grupo fosfato e um açúcar (desoxirribose), como mostrado na Fig. 2. Essas bases nitrogenadas podem pertencer a uma de duas classes: as purinas, que são as bases Adenina (A) e Guanina (G), e as pirimidinas, representadas pelas bases Citosina (C) e Timina (T, DNA), e Uracila (U, RNA) (CRAIG et al., 2021). Outra característica da estrutura do DNA é apresentar cargas negativas em cada um dos nucleotídeos, por conta dos grupos fosfatos. Na Fig. 2 é apresentada a estrutura dos nucleotídeos que compõem a cadeia do DNA.

Figura 2 – Cada nucleotídeo é composto de um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada.

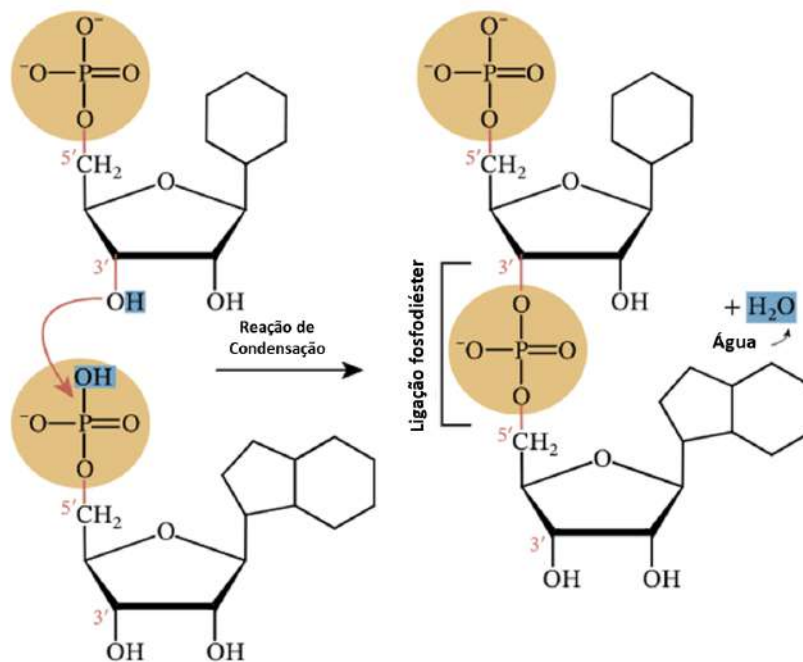


Fonte: Adaptado da Referência: (BELK; MAIER, 2013).

A estrutura do DNA pode ser entendida como consistindo de dois tipos: a primária, correspondendo a cada uma das cadeias simples, e a secundária, que resulta da junção de duas cadeias simples através de ligações tipo hidrogênio (PATRICK, 2013). A estrutura primária é formada a partir da reação de condensação entre os nucleotídeos (Fig. 3). Nesse caso, a polimerização ocorre quando o grupo hidroxila que se encontra ligado ao carbono 3' do açúcar

de um nucleotídeo faz uma ligação chamada de fosfodiéster com o carbono 5' do açúcar de outro nucleotídeo (LODISH; BERK; ZIPURSKY, 2000). Esse procedimento se repete sucessivas vezes para a formação da fita simples de DNA. A polimerização segue uma sequência química, onde o início e o fim da cadeia são indicados pelas extremidades 3' e 5' (BAKER et al., 2008). A extremidade 5' contém um grupo fosfato e a outra extremidade, 3', um grupo hidroxila.

Figura 3 – Diagrama mostrando a formação de uma ligação fosfodiéster.

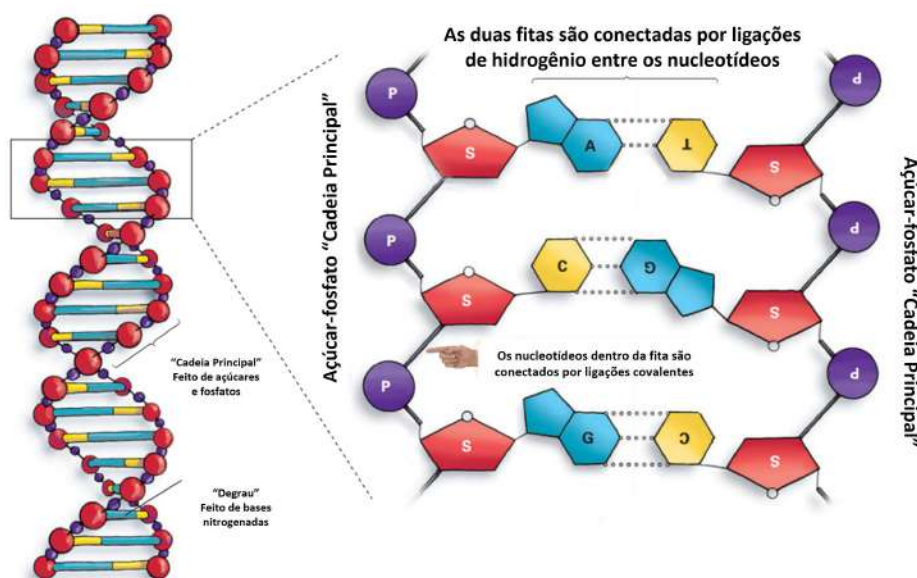


Fonte: Adaptado da Referência: (SINDEN, 2012).

Por sua vez, a estrutura secundária, originalmente identificada por James Watson e Francis Crick em 1953 (WATSON; CRICK et al., 1953; CHANG; GOLDSBY, 2013), está relacionada com o modelo de hélice dupla, como pode ser visto na Fig. 4. Como pode ser visto, este modelo envolve o estabelecimento de uma série de ligações de pontes de hidrogênio entre duas fitas simples, por meio de ligações específicas que permitem a formação da hélice dupla do DNA. Esse fenômeno da junção das duas fitas é chamado de hibridização. Na Fig. 4, pode ser verificado que o emparelhamento das bases é muito específico; a base guanina se une apenas à base citosina através de três ligações de hidrogênio, enquanto a timina sempre se liga a uma base adenina por apenas duas ligações de hidrogênio. Dessa forma, uma base de dois anéis aromáticos (uma purina) é emparelhada com uma base de anel único (uma pirimidina), com todas as bases ficando localizadas no interior da hélice dupla. A largura de todos os pares de bases formados se assemelha, permitindo a manutenção dos esqueletos de açúcar-fosfato a uma distância constante ao longo da molécula de DNA. A consequência de todos esses requisitos

de emparelhamento de bases é que cada cadeia de uma dupla hélice de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é perfeitamente complementar à sequência de nucleotídeos de sua cadeia parceira (ALBERTS et al., 2013).

Figura 4 – Representação da cadeia dupla helicoidal do DNA e da estrutura química dos nucleotídeos.



Fonte: Adaptado da Referência: (BELK; MAIER, 2018).

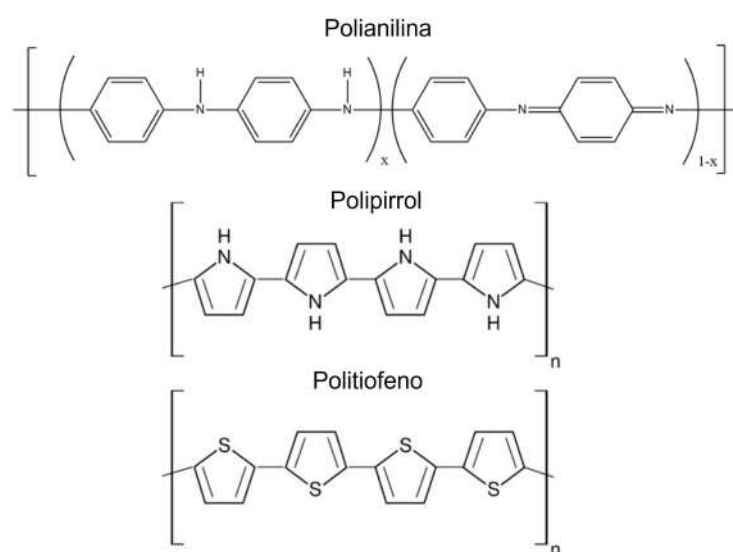
Nas últimas décadas, o estudo sobre a molécula de DNA tem se tornado a base para o conhecimento mais profundo sobre o metabolismo dos seres vivos. Por sua vez, na área da saúde, a especificidade da molécula de DNA pode ser utilizada para o diagnóstico de algumas doenças e, na ciência forense, para a identificação de indivíduos.

2.2.2 A classe dos polímeros condutores

A descoberta da condutividade elétrica em alguns polímeros conjugados por Alan Heeger, Alan MacDiarmid, e Hideki Shirakawa, em 1977, despertou um grande interesse entre pesquisadores de diferentes áreas. Ao expor o poliacetileno, obtido em sua forma isolante, a vapores de iodo (no procedimento atualmente denominado de dopagem), eles observaram um grande aumento na condutividade elétrica (SHIRAKAWA et al., 1977), um feito reconhecido mais de 20 anos depois, quando esses pesquisadores receberam o prêmio Nobel de Química no ano 2000. Atualmente, os polímeros condutores (PCs) têm recebido bastante atenção, por apresentarem características únicas, como a possibilidade de ajuste controlado de suas propriedades de acordo com as condições do meio. Dessa forma, eles tem sido usados nas mais diversas aplicações,

como em dispositivos para armazenamento de energia (SHI; PENG; YU, 2015), sensores e biosensores (JANATA; JOSOWICZ, 2003; NAMBIAR; YEOW, 2011), dispositivos eletrônicos (SHOWN et al., 2015) e na proteção contra corrosão (SITARAM; STOFFER; O'KEEFE, 1997; ROHWERDER, 2009). Alguns dos PCs que tem sido mais utilizados recentemente são o polipirrol (PPI), polianilina (PANI) e o politiofeno (RAVICHANDRAN et al., 2010; PIRO et al., 2018), suas estruturas químicas são mostradas na Fig. 5.

Figura 5 – Estrutura química de alguns polímeros condutores comumente usados: Polianilina, Polipirrol e Politiofeno.



Fonte: Adaptado da Referência: (FOLARIN; SADIKU; MAITY, 2011).

Os polímeros condutores que apresentam alternância entre ligações covalentes simples e duplas ao longo da cadeia polimérica principal são conhecidos como polímeros conjugados. A ligação dupla é constituída por uma ligação σ fortemente localizada e uma ligação π espacialmente deslocalizada (HEEGER; AG; SHIRAKAWA, 2000). A maior condutividade dos polímeros conjugados pode ser explicada pela presença de defeitos estruturais que podem se deslocalizar ao longo da cadeia polimérica, conhecidos como sólitons, pólarons e bipólarons. Esses defeitos ocorrem por meio da oxidação ou redução do sistema π da cadeia polimérica, quando os elétrons da ligação π podem ser removidos ou adicionados facilmente da cadeia polimérica pela adição de um agente de transferência de carga, conhecido como dopante. Os defeitos carregados respondem pela surpreendentemente elevada condutividade elétrica desses materiais. Em alguns casos, a dopagem ocorre ao mesmo tempo que a oxidação do polímero, como, por exemplo, no caso do polipirrol, polímero que será discutido com mais detalhe na próxima seção.

2.2.2.1 Polipirrol

O polipirrol (PPI) é um dos polímeros conjugados mais estudados, assim como a polianilina. A síntese desse polímero foi primeiramente obtida por A. Angeli e L. Alessandro, em 1916, através de uma reação oxidativa do monômero pirrol, onde foi obtido um pó escuro, insolúvel em solventes orgânicos, conhecido como "pyrrole black" (NALWA, 2000). No entanto, a descrição dessa síntese e das propriedades condutoras desse polímero foi somente publicada no final da década de 1960, mais precisamente em 1968 (DALL'OLIO et al., 1968). Nesse trabalho, Dall'Olio e colaboradores sintetizaram o polipirrol através da oxidação eletroquímica usando eletrodos de platina e uma solução de pirrol em ácido sulfúrico (MEDEIROS; FILHO; MATTOSO, 2012; NALWA, 2000).

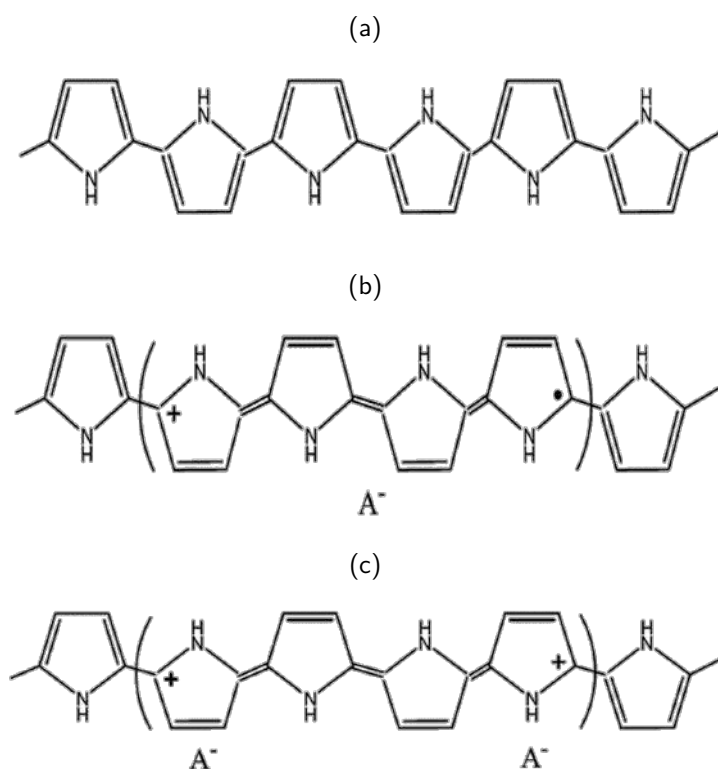
Esse polímero se destaca por possuir propriedades especiais, como uma alta condutividade elétrica, síntese fácil e considerável estabilidade ambiental, que o tornam um material promissor para uma grande variedade de aplicações tecnológicas, como biossensores (ÖZER; ÇETE, 2017), baterias de lítio (Li/PPI) (QIE et al., 2012), e dispositivos fotoeletroquímicos para células solares (HAO et al., 2000), entre outras. A isso se acresce a vantagem de poder ser preparado através de uma síntese química ou eletroquímica.

De acordo com Chu e Liu (CHU; LIU, 2008), a síntese eletroquímica do polipirrol é feita através da aplicação de uma tensão (ou corrente) entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo. A voltagem aplicada deve ser suficiente para oxidar monômeros de pirrol em contato com o eletrodo de trabalho, removendo elétrons das moléculas de pirrol, levando assim à polimerização das cadeias PPI (que são depositadas no eletrodo de trabalho). Uma vantagem da polimerização através da rota eletroquímica é a possibilidade do controle da espessura (LI et al., 2005), além da garantia da homogeneidade do filme do polímero formado. Por sua vez, a síntese química é mais utilizada quando se faz necessária a obtenção de uma grande quantidade de polímero. Neste processo, a oxidação do pirrol ocorre pelo uso de um agente oxidante e dopante, como, por exemplo, FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$, entre outros, que proporcionam a mudança nas propriedades elétricas do polímero, de modo que, ao final da síntese o PPI é obtido em sua forma condutora (NALWA, 2000).

A capacidade de condução do polipirrol pode ser explicada através da formação dos pólarons e bipólarons. A dopagem oxidativa do polipirrol ocorre com a remoção de um elétron de sua cadeia principal, do que resultam defeitos conformacionais móveis, chamados de pólarons. Outro elétron é removido em uma nova oxidação, o que dá origem a um novo tipo de defeito

estrutural, o bipólaron, cuja energia é menor que aquela correspondente a dois pólarons independentes. Dessa maneira, o processo de dopagem introduz portadores de carga na cadeia polimérica do polipirrol na forma de pólarons carregados (cátions) ou bipólarons (dicátions), que podem se deslocar ao longo da cadeia, permitindo a mobilidade da carga introduzida (LEAL et al., 2021; MISHRA, 2018; GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Na Fig. 6, podem ser observados os três estados de oxidação do polipirrol: em (a), o polímero se encontra em seu estado não condutor, e em (b) e (c) após a formação de um polaron (remoção de um elétron da cadeia polimérica) e de um bipolaron (remoção de dois elétrons da cadeia polimérica), respectivamente, ambos estando em sua forma condutora.

Figura 6 – Diferentes estados de oxidação do polipirrol: forma não condutora (a) e em suas formas condutoras após a formação de um polaron (b) e um bipolaron (c).



Fonte: Adaptado da Referência: (HOU et al., 2014).

Atualmente, o pó obtido após a polimerização dos polímeros condutores tem sido acoplados a materiais sólidos como membranas (ROCHA et al., 2021) e filmes (PEDRO et al., 2019), afim de melhor aproveitar as suas propriedades, sem a necessidade de centrifugação. Dessa forma, na próxima seção será mostrado um breve resumo sobre a técnica de eletrofiação que é utilizada para preparar membranas poliméricas.

2.2.3 Técnica de Eletrofiação

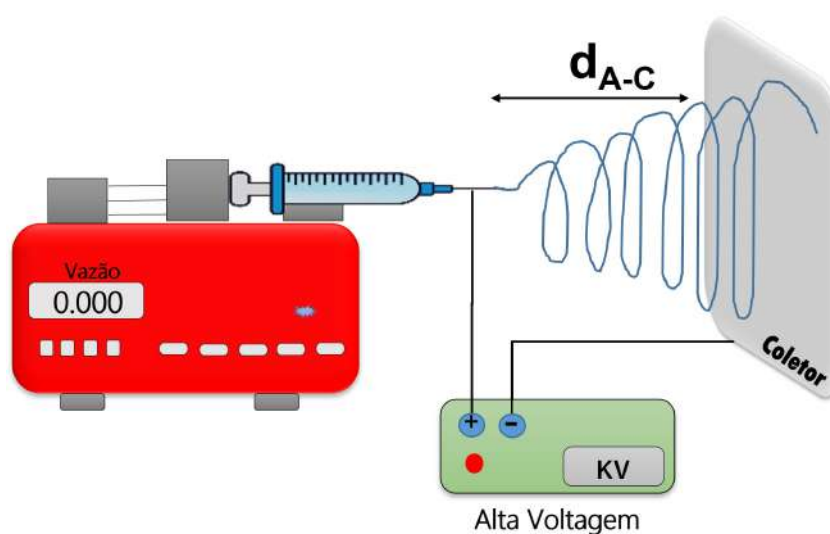
Atualmente, por razões diversas há interesse pela busca por materiais que possuam alta porosidade e elevada área superficial, e as membranas (conjunto de fibras) formadas através da técnica de eletrofiação apresentam essas características vantajosas. A eletrofiação é uma técnica de processamento de polímeros que tem recebido bastante atenção nas últimas décadas (RNJAK-KOVACINA; WEISS, 2011). Ela se destaca por permitir a produção de fibras poliméricas com diâmetros em escalas nano e micrométricas, com alta porosidade e elevada área superficial. Nessa técnica, que é versátil e de baixo custo, é possível controlar a morfologia e as propriedades do material resultante, de acordo com a aplicação desejada. Essas características a tornam de grande interesse para a preparação de membranas poliméricas para uso nas mais diversas áreas, como em processos de filtração, na indústria farmacêutica (por exemplo, na liberação controlada de fármacos), e em biotecnologia, entre outras (SHARMA; JAMES,).

A técnica de eletrofiação permite o processamento de polímeros sintéticos ou naturais (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Os polímeros sintéticos, que são os materiais mais utilizados na produção de fibras por eletrofiação, apresentam algumas vantagens em relação aos materiais naturais (como o colágeno, a quitosana, e o acetato de celulose, por exemplo), como a possibilidade de adaptar a solução polimérica para configurar as propriedades mecânicas (tal como a resistência) necessárias para determinadas aplicações (LIU et al., 2013). Atualmente, existe uma gama de polímeros sintéticos que são capazes de formar fibras através do processo de eletrofiação, dentre os quais estão o poliestireno (UYAR; BESENBACHER, 2008), o policloreto de vinila (PVC) (ES-SAHAB et al., 2012), o fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GEE; JOHNSON; SMITH, 2018), entre outros.

Basicamente, um sistema de eletrofiação é composto por três componentes (Na Fig. 7, é mostrado o aparato experimental com configuração horizontal usado na execução do processo de eletrofiação.): uma seringa com agulha metálica, onde é armazenada a solução polimérica, uma fonte de alta tensão, e um coletor, onde são depositadas as fibras. O eletrodo positivo da fonte de tensão é conectado à agulha metálica, enquanto o eletrodo negativo é conectado ao coletor a uma certa distância da agulha (d_{A-C}). O processo de produção das membranas tem início com a aplicação de uma grande diferença de potencial entre a agulha e o coletor, o que faz com que cargas sejam induzidas no interior da solução. Quando há o aumento do campo elétrico, ocorre a formação de uma gota da solução na extremidade da agulha, que rapidamente se transforma em um jato alongado de solução, em uma forma conhecida como

cone de Taylor (HE et al., 2008). Ao ser aumentado ainda mais o campo elétrico, as cargas atingem um valor crítico em que a força eletrostática vence a tensão superficial da solução, e dessa forma a solução na ponta do cone de Taylor é expelida em direção ao coletor (região de menor potencial). Enquanto o jato está sendo expelido, o solvente é evaporado, de modo a fazer com que apenas o polímero solidificado e carregado seja depositado sobre a superfície do coletor.

Figura 7 – Aparato experimental usado na técnica de eletrofiação.



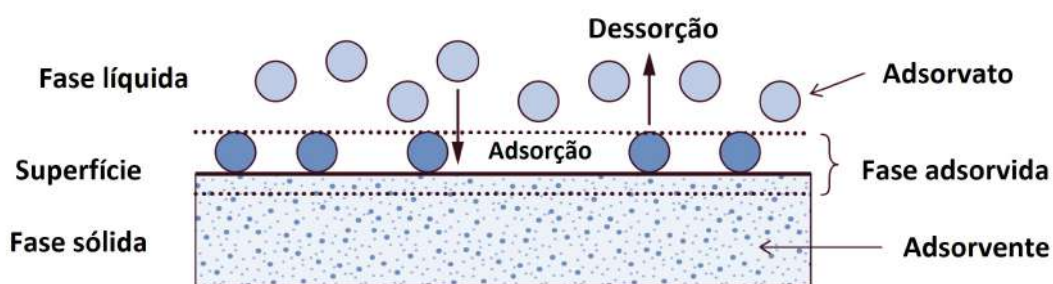
Fonte: Autoria Própria (2021).

Atualmente, as membranas produzidas por eletrofiação tem sido modificadas afim de serem utilizadas em processos de adsorção de diversos tipos de moléculas, como corantes, metais pesados (ROCHA et al., 2021), proteínas (ESFAHANI et al., 2015), isso devido as suas propriedades vantajosas, como uma grande área superficial. Na próxima seção, será apresentado um breve resumo o processo de adsorção

2.2.4 Estudo sobre adsorção

Por adsorção entende-se o fenômeno em que moléculas dissolvidas em um fluido (gases ou líquidos) são transferidas para uma superfície sólida. Esse método se destaca por ser um processo rápido e limpo (ou seja, na maioria das vezes não se faz necessário o uso de produtos tóxicos durante o processo de adsorção). Nos últimos anos, o método de adsorção tem sido bastante usado, por exemplo, para a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos (tais como metais tóxicos e corantes) de meios aquosos (SHARMA, 2015) e na purificação de biomoléculas (DNA, proteínas,...) a partir de amostras biológicas. Detalhes de um processo de adsorção são mostrados na Fig. 8.

Figura 8 – Componentes de um processo de adsorção.



Fonte: Adaptado da Referência: (WORCH, 2012).

O material sólido no qual ocorre a adsorção denomina-se adsorvente, que pode ser classificado como natural (por exemplo, carvão e argilas) ou sintético (quando, por exemplo, preparado a partir de polímeros), enquanto as espécies adsorvidas são chamadas de adsorvatos (WORCH, 2012). Quando as condições do meio líquido - como, por exemplo, a temperatura e o pH - são modificadas, o adsorvido poderá ser liberado da superfície, voltando assim para a fase líquida. O processo de adsorção pode ocorrer como uma fisissorção ou quimissorção. A fisissorção ocorre quando as interações predominantes entre o adsorvato e o adsorvente são fracas, como é o caso das forças de Van der Waals. Por outro lado, na quimissorção as moléculas do adsorvato interagem com o adsorvente através de ligações químicas (por exemplo, as de natureza covalente) (NASCIMENTO et al., 2020; SHARMA, 2015). No processo de adsorção, diversos fatores podem influenciar a interação entre o adsorvente e o adsorvato, como a temperatura, a área superficial do adsorvente, e o pH do meio.

2.2.4.1 Isotermas de adsorção

O estudo do comportamento de um material adsorvente no equilíbrio é de fundamental importância para a otimização do processo de remoção de um determinado soluto. Para uma melhor análise desse fenômeno, normalmente o sistema é mantido à temperatura constante, e o material adsorvente de massa (m) é colocado a interagir com o adsorvato (com concentração inicial C_0 em um certo volume (V)). Com o passar do tempo, as moléculas presentes na solução irão migrar para o adsorvente, até que seja atingido o equilíbrio, quando a concentração do soluto (C_e) em solução passa a ser constante. Através dos dados obtidos, é possível encontrar a capacidade de adsorção (q_e) do adsorvente. Esse procedimento é repetido para diferentes concentrações iniciais. Uma vez que os processos são realizados a uma mesma temperatura constante, um gráfico da variação de q_e vs. C_e , conhecido como isoterma de adsorção, pode ser montado. A capacidade de adsorção do adsorvente no equilíbrio sendo obtida através da relação (NASCIMENTO et al., 2020)

$$q_e = V \frac{(C_0 - C_e)}{m}, \quad (2.1)$$

onde V é o volume total da solução (L), m é a massa de adsorvente (g), q_e é a capacidade de adsorção no equilíbrio (mg/g), e C_0 e C_e são as concentrações inicial e no equilíbrio de soluto (mg/L), respectivamente.

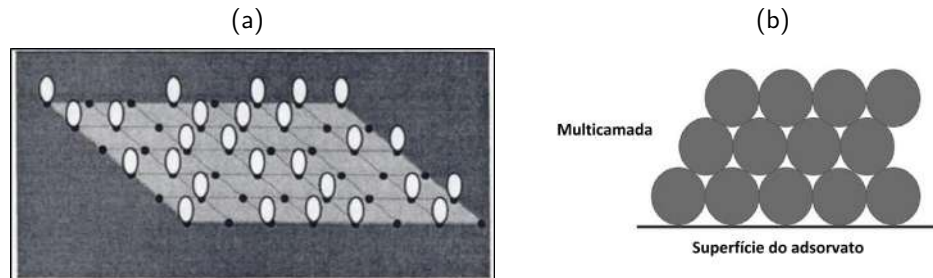
Na literatura podem ser encontrados diferentes modelos de isoterma que descrevem o comportamento da variação de q_e vs. C_e , de modo que a partir desses ajustes a capacidade máxima de adsorção do adsorvente pode ser encontrada. Neste trabalho, discutiremos os modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich e Temkin, que são aqueles mais amplamente utilizados.

O modelo de isoterma de Langmuir se baseia em alguns pressupostos básicos (FAUST; ALY, 2013): i) as moléculas devem ter sido adsorvidas em locais bem definidos na superfície do adsorvente, ii) cada local pode acomodar apenas uma molécula (do que resulta na formação de uma monocamada - ver Fig. 9a), iii) as moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras, e iv) a energia de adsorção é a mesma em todos os locais.

Por sua vez, o modelo de isoterma de Freundlich descreve a adsorção em superfícies heterogêneas, ou seja, uma situação em que mais de uma molécula pode estar em um único sítio e a adsorção ocorre em uma configuração de multicamada (ver Fig. 9b) (FAUST; ALY,

2013).

Figura 9 – Modelo de Langmuir. Os pontos pretos representam os sítios de adsorção e as elipses brancas as moléculas adsorvidas (a). Modelo de Freundlich que descreve a adsorção em uma superfície heterogênea (b).



Fonte: Adaptado da Referência: (MASEL, 1996; MOHAMMED et al., 2020), respectivamente.

Por fim, a isoterma de Temkin propõe que o calor de adsorção de todas as moléculas na camada diminui linearmente com a cobertura da superfície, devido às interações entre o adsorvente e o adsorvido, com a adsorção sendo caracterizada por uma distribuição uniforme de energias de ligação (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; DADA et al., 2012; HAMD AOUI; NAFFRECHOUX, 2007). Em suas formas linearizadas, esses modelos podem ser expressos, respectivamente, como

- **Langmuir**

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{b q_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad (2.2)$$

- **Freundlich**

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (2.3)$$

- **Temkin**

$$q_e = B \ln K_T + B \ln C_e \quad (2.4)$$

onde as grandezas C_e e q_e já foram definidas acima, q_m é a quantidade máxima de moléculas adsorvida por unidade de massa de adsorvente e b é uma constante de Langmuir, K_F é a constante de Freundlich relacionada a capacidade de adsorção e $1/n$ é a constante de heterogeneidade da superfície. Na Eq. 2.4, B é a constante de Temkin que está relacionada com o calor de adsorção e K_T está correlacionada com a energia de ligação máxima. Os valores constantes de cada modelo isotérmico foram determinados a partir da inclinação e da interceptação dos termos C_e/q_e vs. C_e , $\log q_e$ vs. $\log C_e$ e q_e vs. $\ln C_e$, respectivamente.

2.2.4.2 Cinética de adsorção

A análise da cinética da adsorção, ou seja, da velocidade do processo em que as moléculas são adsorvidas no material, é essencial para conhecermos o mecanismo de interação entre o adsorvato e o adsorvente. Existem diferentes modelos cinéticos na literatura, que possibilitam investigar qual mecanismo de adsorção melhor se aplica a um determinado sistema. Aqueles mais utilizados são o modelo de pseudo-primeira-ordem, de pseudo-segunda-ordem, de Morris-Weber e o de Boyd, que serão apresentados a seguir.

- **Pseudo primeira ordem:** Neste modelo, o mecanismo do sistema está relacionado com processos físicos. A equação que representa esse modelo é

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2,303}t \quad , \quad (2.5)$$

onde k_1 é a constante da taxa de adsorção de pseudo primeira ordem (min^{-1}), q_e e q_t são as quantidades de soluto adsorvido no equilíbrio e em um instante t (mg/g), respectivamente. As constantes são obtidas por regressão linear, através do gráfico de $\log(q_e - q_t)$ vs. t .

- **Pseudo segunda ordem:** esse modelo está relacionado com a ocorrência de adsorção química (ou quimissorção), ou seja, um processo em que ocorre a partilha ou troca de elétrons entre o adsorvente e o adsorvato (HO; MCKAY, 1999; FEBRIANTO et al., 2009). A equação que descreve esse modelo é dada por:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2(q_e)^2} + \frac{t}{q_e} \quad , \quad (2.6)$$

onde k_2 é a constante da taxa de adsorção de pseudo segunda ordem (min^{-1}), e q_e e q_t são a quantidade de soluto adsorvido no equilíbrio e em um instante t (mg/g), respectivamente. As constantes podem ser obtidas por regressão linear, através do gráfico de t/q_t vs. t .

- **Morris Weber:** esse modelo se aplica quando o processo de adsorção ocorre por meio de difusão do soluto através dos poros de um dado material, no que pode ser chamado de difusão intrapartícula (PLAZINSKI; RUDZINSKI, 2009). A equação característica desse

modelo admite que a quantidade de soluto adsorvida em um dado tempo t (q_t) varia de acordo com a raiz quadrada do tempo, na forma:

$$q_t = k_{id}t^{0,5} + C \quad , \quad (2.7)$$

onde k_{id} (min^{-1}) e C são as constantes de velocidade de difusão intrapartícula. As constantes são determinadas por regressão linear, através do gráfico de q_t vs. $t^{0,5}$.

- **Modelo de difusão de Boyd:** O modelo de Boyd assume que a difusão é a etapa limitante do processo de adsorção, devido à camada limite que envolve o material adsorvente (CAMPOS et al., 2018). A expressão do modelo de Boyd é representada como

$$F = 1 - \left(\frac{6}{\pi^2}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{1}{n^2}\right) \exp(-\pi^2 B_t) \quad , \quad (2.8)$$

sendo,

$$F = \frac{q_t}{q_e} \quad , \quad (2.9)$$

onde q_e e q_t já foram definidos anteriormente, F representa a fração da molécula adsorvida em qualquer tempo t , e B_t é uma função matemática de F . Após aplicar a transformada de Fourier e integrar a Eq. 2.8, obtêm-se as aproximações (VIEGAS et al., 2014):

$$B_t = -0,4977 - \ln 1 - F \quad , F > 0,85 \quad (2.10)$$

$$B_t = \left(\sqrt{\pi} - \frac{\pi^2 F}{3}\right)^2 \quad , F < 0,85. \quad (2.11)$$

Neste trabalho, os diferentes modelos de isoterma e de cinética apresentados anteriormente foram aplicados para o estudo de adsorção do DNA na membrana de PS-PPI.

2.2.5 Métodos de extração e purificação de DNA

A extração e purificação de biomoléculas (DNA, proteínas etc.) é um procedimento fundamental em laboratórios de biotecnologia, se constituindo em uma etapa inicial em diversas práticas clínicas, como aquelas relacionadas com o diagnóstico de doenças, provas forenses, e identificação de organismos. Para essas análises, inicialmente é feita a coleta da amostra biológica de interesse (como, por exemplo, sangue, saliva e tecido vegetal). Depois disso, é preciso liberar todos os componentes da célula (proteínas, RNA, entre outros), incluindo a fração de DNA. Por essa razão, diferentes métodos e tecnologias têm sido desenvolvidos para a extração de DNA. Os métodos de extração de DNA atualmente mais utilizados são classificados como sendo de fase líquida e de fase sólida. De uma forma geral, em princípio ambos os tipos de métodos envolvem um procedimento inicial conhecido como lise celular. A seguir, serão brevemente discutidos alguns métodos de extração de biomoléculas.

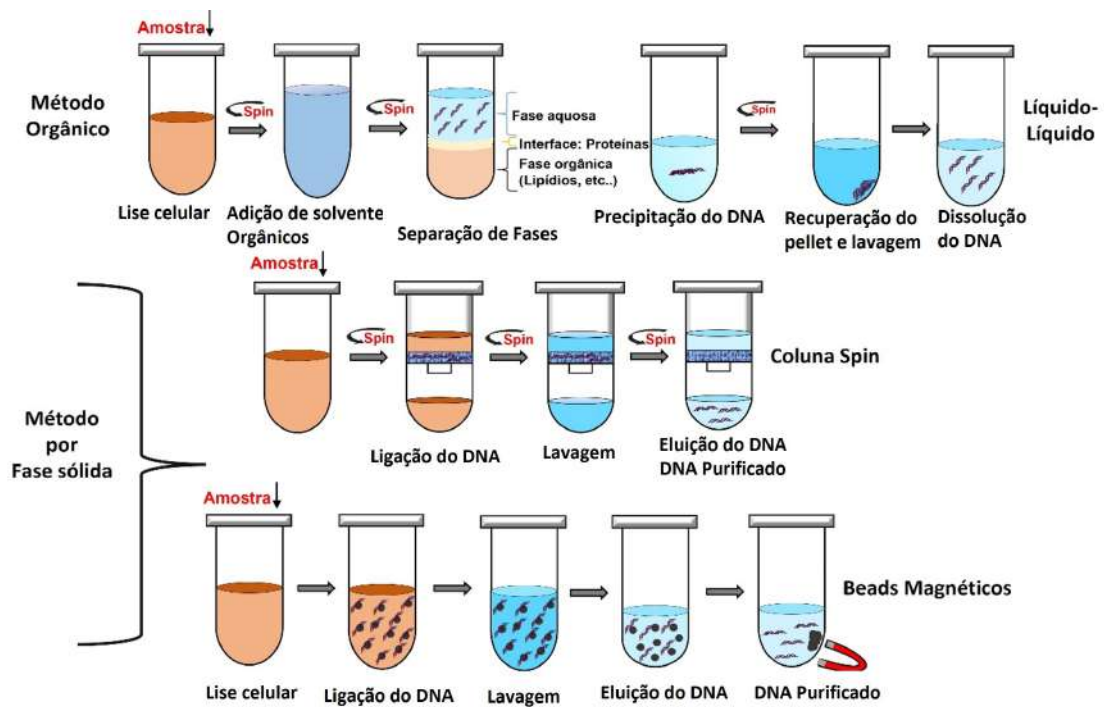
▪ Extração por fase líquido-líquido e por fase sólida

O método de extração de biomoléculas por fase líquido-líquido se baseia no uso de uma série de solventes orgânicos para a precipitação da molécula de interesse. Geralmente, na extração de DNA se utiliza como solvente orgânico uma mistura de fenol/clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987; KIRBY; COOK, 1967). Apesar de ser considerado muito eficiente, esse método apresenta algumas limitações, como a demanda de um longo tempo na execução (CORTELL, 2014; SANKHYAN; RAO, 2007) e, principalmente, o uso de solventes tóxicos (UZMA et al., 2008). A extração por fase sólida, por outro lado, se destaca por ser um processo de maior rapidez e eficiência (HAWKINS et al., 1994; WOLFE et al., 2002), que, na maioria das vezes, dispensa o uso de solventes orgânicos tóxicos, o que torna a purificação livre de contaminantes.

Na extração de DNA por fase sólida, os procedimentos podem ser realizados com auxílio de um tubo, em cuja parte externa se encontra o material sólido (por exemplo, membranas e nanopartículas magnéticas) geralmente revestido com um composto que possua afinidade com as moléculas de ácido nucleico, como, por exemplo, polímeros condutores como a polianilina (MEDINA-LLAMAS et al., 2014), para permitir sua captura por adsorção. Atualmente, podem ser encontrados disponíveis no mercado kits de extração de ácidos nucleicos consistindo em uma coluna com o material sólido e as soluções necessárias para a realização dos procedimentos. Uma série de fatores devem ser considerados para a escolha correta de um kit de extração, como, por exemplo, a origem da amostra (sangue, tecido, etc.), quantidade de amostras a

serem analisadas, pureza, peso molecular do DNA, entre outros. Na Fig. 10, estão ilustrados os passos a serem seguidos para a extração de DNA utilizando os métodos de extração por fase orgânica e pelo método de fase sólida.

Figura 10 – Representação do protocolo usado em métodos de extração orgânica (Líquido-Líquido) e por fase sólida (coluna spin e por *beads* magnéticos).

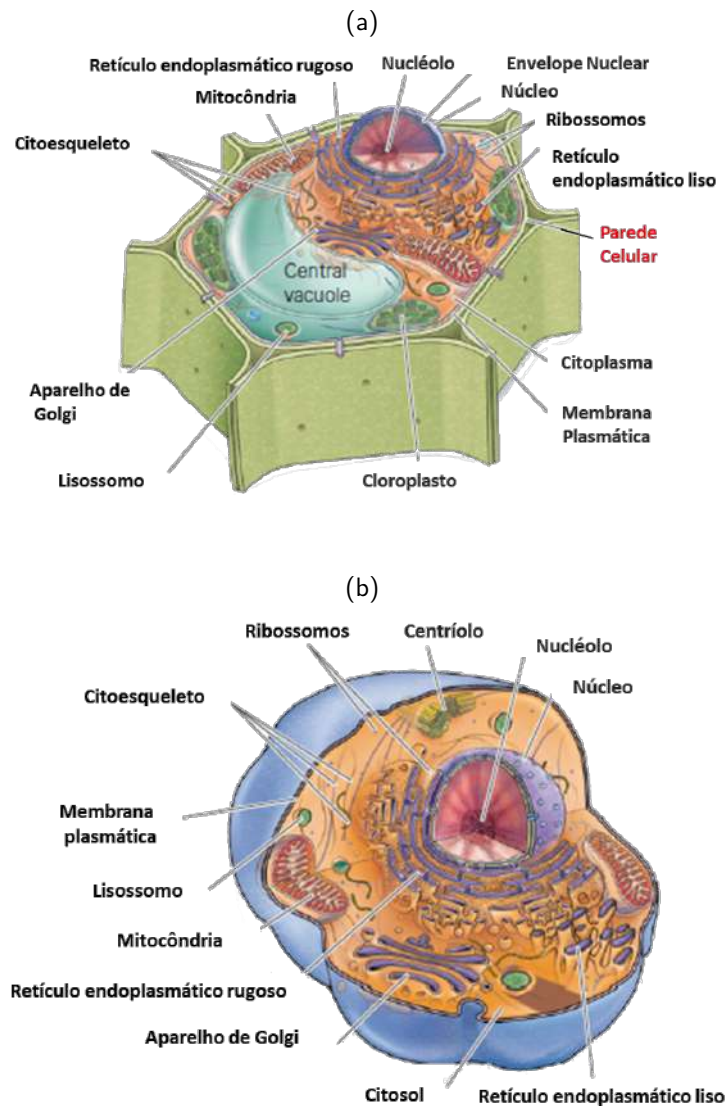


Fonte: Autoria própria (2021).

2.2.5.1 Extração de DNA a partir de amostras vegetais

As células vegetais diferem das células animais (ver Figs. 11a e 11b) principalmente pela presença de uma parede celular rígida situada fora da membrana plasmática (REVIEW, 2020). Essa característica torna o isolamento do DNA de tecidos vegetais um desafio nos estudos em biologia molecular. Além disso, plantas produzem metabólitos secundários que interferem na extração de DNA genômico de alta qualidade, e nas reações subsequentes, como PCR e análises genéticas (SIKA et al., 2015). Atualmente, os protocolos de extração de DNA de amostras vegetais precisam ser ajustados devido à presença de diferentes níveis de concentrações de metabólitos secundários em espécies de plantas distintas, o que não acontece com amostras de animais (SAHU; THANGARAJ; KATHIRESAN, 2012).

Figura 11 – Estrutura de uma célula vegetal (a) e animal (b).



Fonte: Adaptado da Referência: (REVIEW, 2020).

De acordo com SINGH (SINGH; SINGH, 2015), os protocolos de extração de DNA de plantas podem ser agrupados em três categorias, como explicado no início desse capítulo: o método padrão CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), métodos rápidos de extração de DNA e kits comerciais de isolamento de DNA. Na Tabela 1 (adaptada da referência (SINGH; SINGH, 2015)) é mostrada uma comparação entre esses três métodos de extração. O protocolo de extração de DNA também pode variar de acordo com a parte da planta que será escolhida, como folhas, sementes, caule ou raiz. A etapa inicial do processo de extração, onde se faz a maceração do material, é semelhante em todos os métodos de isolamento do DNA. Geralmente, esse procedimento é realizado com o auxílio de um pistilo e um almofariz (SANTOS et al., 2014), sendo usado nitrogênio líquido na maioria das vezes para facilitar o processo (na falta do

nitrogênio líquido, uma solução tampão de extração é usada na maceração). A partir de então, cada método segue o seu próprio protocolo de isolamento do DNA.

Tabela 1 – Características de métodos de extração de DNA.

Características	Métodos de extração de DNA		
	kits de extração de DNA	Métodos rápidos de extração de DNA	Método Padrão CTAB
Qualidade do DNA	Bom	Muito baixo	Bom
Rendimento do DNA	Baixo	Baixo	Alto
Tempo	≈30 min	>30 min	>2h

Fonte: Autoria Própria (2021).

Neste trabalho, folhas de alface foram usadas como modelo para a purificação do DNA, dessa forma, na próxima seção será apresentada um breve resumo desse tipo de folha.

2.2.6 Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.), uma das principais hortaliças de consumo mundial, é um vegetal pertencente à família Asteraceae (YANG et al., 2018). As suas folhas são ricas em vitamina A e minerais como cálcio e ferro. Além de conter proteínas, carboidratos e vitamina C, a alface possui algumas propriedades benéficas à saúde que são determinadas pela presença de altos níveis de polifenóis antioxidantes, como ácidos clorogênicos, além de outros derivados do ácido cafeico ou flavonóides. Devido a essas características, estudos recentes feitos em ratos e humanos, mostraram que há efeitos benéficos das folhas de alface na prevenção de doenças cardiovasculares (SHARMA et al., 2018; MATERSKA et al., 2019). Na Fig. 12 são mostradas algumas variedades de folhas de alface.

Figura 12 – Foto de algumas variedades de alface.

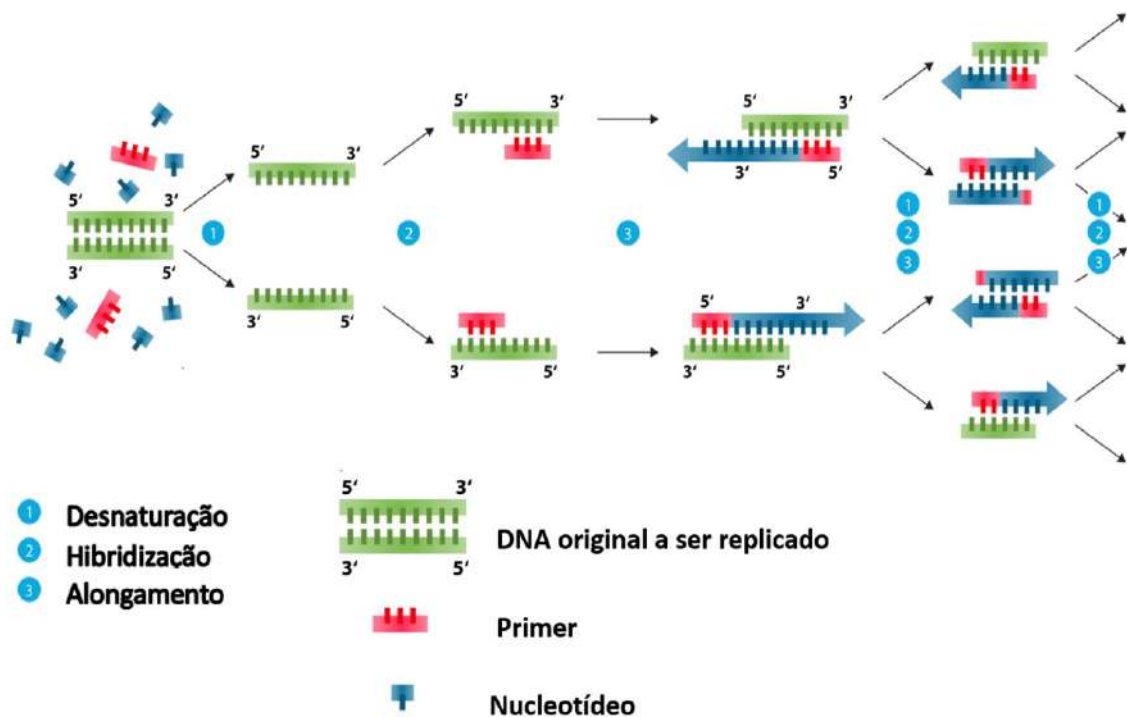


Fonte: Adaptado da Referência: (WIKIFARMER, 2021).

2.2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica molecular básica usada para amplificar sequências-alvo de uma região específica do DNA, ou seja, produzir de maneira exponencial inúmeras cópias idênticas (BHATIA; DAHIYA, 2015). Nessa técnica é implementado um ciclo térmico, ou seja, um processo no qual uma solução que inclui DNA é repetidamente aquecida e resfriada. Resumidamente, o procedimento de PCR ocorre através de diversos ciclos de desnaturação, no qual o DNA de dupla fita se separa, formando duas fitas simples, e, após isso, um par de primers (uma fita de DNA específica para o gene que se quer estudar) complementa a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada. Em seguida, ocorre a amplificação do DNA por meio do uso da enzima Taq DNA polimerase (KASVI, 2018; RATKOVSKI et al., 2020). Na Fig. 13 é mostrado um esquema representativo da técnica de PCR.

Figura 13 – Esquema do procedimento da Reação em Cadeia da Polimerase.

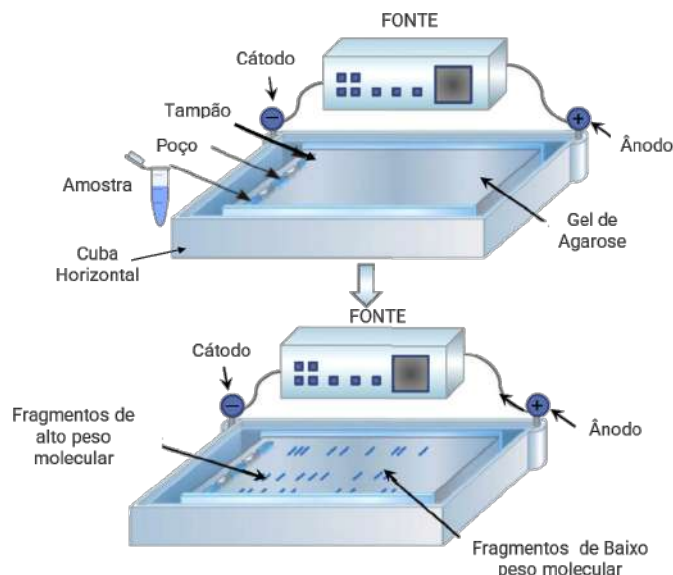


Fonte: Adaptado da Referência: (OKSUZ et al., 2019).

2.2.8 Eletroforese

A eletroforese é uma técnica amplamente utilizada para separar fragmentos de macromoléculas, especialmente proteínas e ácidos nucleicos (DNA/RNA), com base em seu tamanho e a carga. Ela é atualmente usada em diversas áreas, como bioquímica, biologia molecular, farmacologia, além da medicina criminal (CIBOROWSKI; SILBERRING, 2016; SYAIFUDIN, 2021). A eletroforese tem por base a migração de uma molécula carregada pelo interior de um gel, sob a influência de um campo elétrico aplicado (REDDY; RAJU, 2012). No caso da molécula de DNA, que apresenta uma carga líquida negativa devido à presença dos grupos fosfatos, ao ser exposta à ação de um campo elétrico, ela irá migrar do cátodo para o ânodo (POSSIK, 2016; KARP, 2011). Após a finalização do processo, o gel é exposto à luz UV e uma foto das bandas de DNA formadas registrada. O gel usado no procedimento pode ser preparado com base em agarose ou pela poliacrilamida. A eletroforese em gel de agarose é um método eficaz para separar fragmentos de DNA com tamanhos entre 0,5 a 25 kb (quilo-bases), enquanto o gel de poliacrilamida é mais usado para a separação de fragmentos menores. Na Fig. 14 são mostrados os componentes de um sistema de eletroforese.

Figura 14 – Componentes de um sistema de eletroforese.



Fonte: Adaptado da Referência: (CIBOROWSKI; SILBERRING, 2016).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Materiais

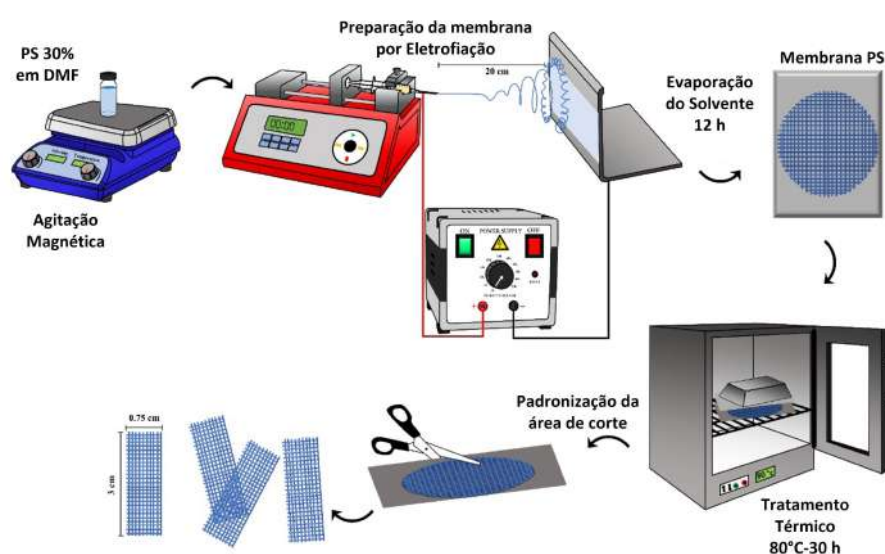
O poliestireno (PS) (PM = 250.000) foi adquirido da Acros Organic (EUA), enquanto que pirrol e o DNA de esperma de salmão foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA). Dimetilformamida (DMF), polivinilpirrolidona (PVP, K-30), ácido acético (CH_3COOH) e cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Dinâmica (Brasil). O ácido clorídrico (HCl), o hidróxido de sódio (NaOH), o sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético dihidratado (EDTA-Na) e o cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da empresa brasileira Química Moderna. Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). O acetato de potássio (CH_3COOK) foi obtido pela AppliChem (Alemanha) e o etanol absoluto (EMSURE - Merck, Alemanha). Glicina, dodecil sulfato de sódio (SDS), tris (hidroximetil) aminometano (Tris), Tris-Acetato-EDTA (TAE) 40X, Agarose, corante de carregamento Blue/Orange 6X, corante de ácido nucleico DiamondTM e 100bp DNA Ladder foram adquiridos Promega (EUA). O corante SYBR Green, a PureLinkTM RNase A (20 mg/mL), o PureLinkTM Genomic Plant DNA Purification Kit, ITS (espaçadores de transcrição internos) primers: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3'direto e reverso 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' foram obtidos da ThermoFisher Scientific (EUA). As folhas de alface foram compradas em um supermercado local do Recife. Todos os reagentes foram usados como recebido, com exceção do monômero de pirrol, que foi destilado sob pressão reduzida antes do uso. Em todos os experimentos, utilizamos água deionizada de alta pureza obtida a partir de um sistema de purificação Synergy® (Millipore, EUA).

2.3.2 Preparação das membranas de poliestireno

As membranas PS foram obtidas pela técnica de eletrofiliação horizontal. Para isso, foi inicialmente preparada uma solução polimérica de 30% p/v em DMF, a qual foi submetida a agitação magnética por 12 h, à temperatura de 85 °C. Em seguida, um volume de 2 mL da solução foi adicionado a uma seringa de 3 mL (Beckton Dickinson, EUA), na qual foi posteriormente acoplada uma agulha metálica. O aparato experimental foi montado em configuração horizontal, utilizando-se bomba de seringa NE-4000 (New Era, EUA). Os parâmetros operacionais para a produção das membranas foram ajustados para uma vazão de 0,5 mL/h, tensão

de 17 kV. A distância entre a agulha e o coletor (recoberta com folha de alumínio) foi de 20 cm. Após 4h de preparação, a membrana formada foi recolhida e deixada secar durante 12 h à 25 °C. Em seguida, ela foi submetida a um tratamento termomecânico para a melhoria de suas propriedades mecânicas, no qual ela foi mantida sob um peso de aproximadamente 2 kg em um forno a 80 °C por 30 h, tornando-se mais compacta e robusta ((ALCARAZ-ESPINOZA et al., 2015). Uma vista esquemática das etapas seguidas na preparação da membrana é indicada na Fig.15.

Figura 15 – Sequência de etapas para a preparação das membranas PS.



Fonte: Desenhado por schematicarts.com (2021).

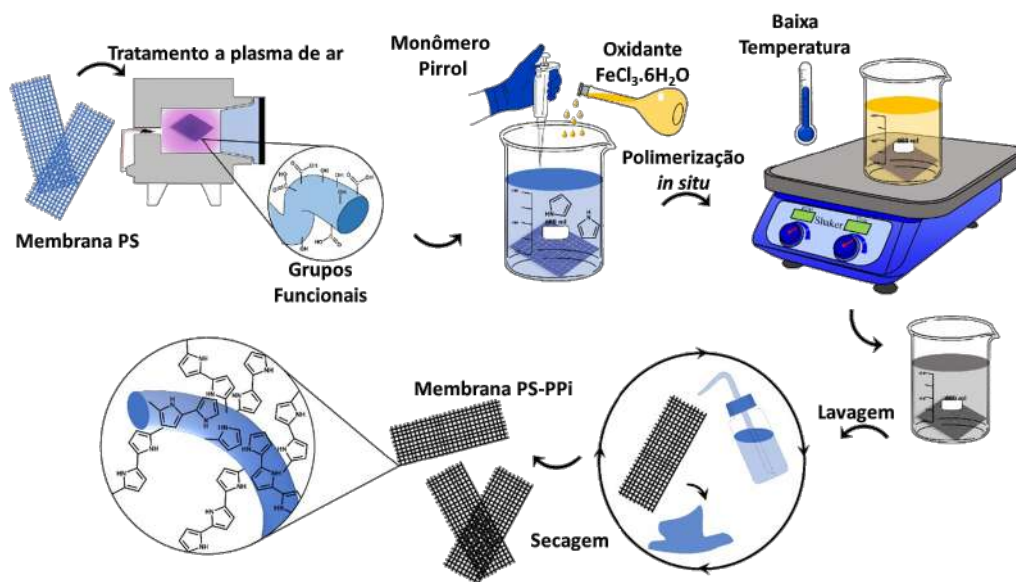
Na Seção A.1.1 do Apêndice A, são mostradas uma série de experimentos realizados para a escolha dos parâmetros da concentração da solução de PS.

2.3.3 Revestimento das membranas com polipirrol

Após a secagem, a membrana de PS foi modificada através da polimerização *in situ* de pirrol em meio aquoso. Para isso, a membrana foi inicialmente cortada em retângulos de 0,75 cm x 3,00 cm, os quais foram submetidos a um tratamento de plasma de ar em um limpador de plasma PDC-002 (Harrick, EUA) por 6 min, para conferir um caráter hidrofílico à sua superfície. Em seguida, as membranas foram colocadas em um béquer contendo 30 mL de H₂O e 0,49 mmol de pirrol, e após 15 min. foram adicionados 20 mL de H₂O contendo cloreto de ferro (III) hexa-hidratado (0,05 M). O processo de polimerização ocorreu a 5°C sob agitação constante durante 2 h. Depois disso, a membrana foi lavada repetidamente com

água deionizada e seca à temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram pesadas para determinar a quantidade de PPI depositada. A preparação da membrana composta é indicada na Fig. 16.

Figura 16 – Sequência de etapas para a preparação das membranas compostas de PS-PPI.



Fonte: Desenhado por schematicarts.com (2021).

Na Seção A.1.2 do Apêndice A é mostrada a importância do tratamento a plasma de ar.

2.3.4 Métodos de caracterização

A caracterização morfológica foi avaliada usando o microscópio eletrônico de varredura MIRA3 (TESCAN, República Tcheca) do Departamento de Física da UFPE, sendo o diâmetro médio das fibras estimado com o auxílio do software Image J. Foram analisadas tanto as membranas obtidas logo após o tratamento termomecânico, quanto aquelas revestidas com polipirrol. Para isso, usando fita de carbono, as amostras foram fixadas em um suporte, para posterior metalização pela deposição de uma camada de 10 nm de ouro, utilizando uma metalizadora SC-701 (SANYU ELECTRON, China) do Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Para estimar o grau de incorporação do polipirrol na membrana de PS, foi usada a caracterização por espectroscopia UV-Vis utilizando um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão). Para isso, foram inicialmente obtidos os espectros de refletância, que, em seguida, foram convertidos em espectros de absorbância.

A análise estrutural das membranas de PS e PS-PPI foi realizada através da caracterização por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para essas medidas, 50 mg de brometo de potássio (KBr) foram macerados juntamente com a amostra a ser analisada (ou seja, as membranas de PS e de PS-PPI), sendo o pó resultante prensado na forma de uma pastilha.

O grau de molhabilidade das membranas foi estimado através da medida em modo estático do ângulo de contato, usando um sistema CAM 100 (KSV, Finlândia). Para isso, uma gota de água foi depositada em 5 regiões distintas da superfície da membrana, sendo o valor final do ângulo considerado como a média aritmética dos valores encontrados em cada região. Essa caracterização foi feita na superfície tanto das membranas de PS logo após o tratamento térmico-mecânico, como também naquelas revestidas com PPI.

Para determinar o ponto de carga zero (pH_{pzc}) da membrana de PS-PPI, foi utilizado o método de adição de sal. Para isso, uma solução de KCl (0,1 M) foi preparada, ajustando o pH inicial (pH_i) no intervalo de pH de 2 a 10, pela adição de pequenas alíquotas das soluções de HCl ou NaOH. O experimento foi realizado em um erlenmeyer de 25 mL, quando 10 mL da solução de KCL foi adicionado, juntamente com uma tira da membrana de PS-PPI (0,75 cm x 3,0 cm). O sistema foi deixado interagir por 24 h a 300 rpm. Após isso, o pH final (pH_f) da solução foi verificado e, por fim, o valor do pH_{pzc} foi determinado, de acordo com a relação $\Delta\text{pH} = \text{pH}_f - \text{pH}_i$ (ROCHA et al., 2021).

Na Seção A.1.3 do Apêndice A é mostrada a caracterização elétrica da membrana de PS-PPI.

2.3.5 Experimentos de adsorção de DNA em um sistema modelo

Como um teste inicial da capacidade de absorção das membranas híbridas PS-PPI, adotamos um sistema modelo para a captura de cadeias de DNA de esperma de salmão dissolvidas em soluções aquosas. Para definir as melhores condições para a recuperação de moléculas de DNA, realizamos diferentes experimentos testando o efeito da variação dos seguintes parâmetros: (i) pH da solução tampão, (ii) tempo de interação entre DNA-membrana, e (iii) concentração inicial de DNA na solução. A metodologia seguida em cada experimento será apresentada na próxima seção. Cada um deles foi realizado em triplicata, utilizando um volume total de 2 mL da solução (usando tubos Eppendorf de 2 mL), com membranas de PS-PPI nas dimensões de 0,75 cm x 3,00 cm (correspondendo a 0,3 mg de PPI). Os tubos foram agitados

à temperatura ambiente com o auxílio de um agitador orbital operando a 300 rpm.

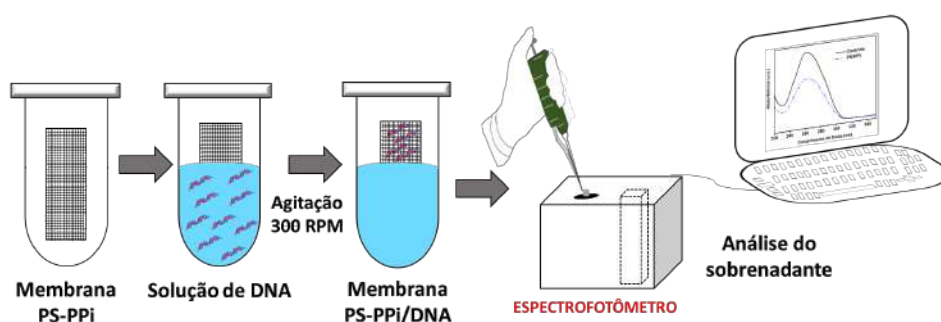
2.3.5.1 Efeito do pH

Inicialmente, uma solução estoque foi preparada dissolvendo 20 mg de DNA de esperma de salmão em 100 mL de água deionizada e ajustando a concentração final para 100 mg/L pela adição de uma solução tampão de glicina/HCl. O valor do pH foi ajustado na faixa 2,8-6,0, de modo a nos permitir determinar aquele em que ocorreria a maior eficiência de adsorção do DNA pela membrana, a ser então usado na continuidade dos experimentos. Após a membrana ter sido deixada por 60 min no interior da solução, o grau de interação com as cadeias de DNA foi estimada com a retirada de uma alíquota (2 μ L) da solução para a medida da absorbância (em 260 nm), com a utilização de um espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). A quantidade de DNA adsorvido na membrana PS-PPi foi estimada como

$$\% \text{Adsorção} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \cdot 100 \quad , \quad (2.12)$$

onde C_0 e C_f são as concentrações de DNA inicial e final (mg/L) na solução, respectivamente. As etapas seguidas no teste de adsorção são mostradas na Fig. 17.

Figura 17 – Etapas do processo de adsorção do DNA na membrana de PS-PPi.



Fonte: Autoria própria (2021).

2.3.5.2 Efeito do tempo de interação, concentração inicial de DNA e temperatura

Determinado o melhor valor do pH, o experimento seguinte consistiu em examinar como a variação no tempo de interação afetaria o desempenho do PS-PPi como agente adsorvente, pela medida da absorção em 260 nm de alíquotas (2 μ L) tomadas em diferentes momentos

ao longo de 120 min. Uma vez determinado o tempo necessário para o equilíbrio, examinamos o efeito da concentração inicial de DNA (5-100 mg/L).

A capacidade de adsorção de DNA pela membrana em um dado instante de tempo t , ou seja, a quantidade (em mg) de DNA adsorvido por unidade de massa (g) da membrana nesse instante, denotada como q_t , foi estimada como

$$q_t = V \frac{(C_0 - C_t)}{m}, \quad (2.13)$$

onde V é o volume total da solução (L), C_0 é a concentração inicial de DNA (mg/L) na solução, C_t é a concentração de DNA correspondente (mg/L) na solução naquele instante e m é a massa de PPI depositada nas fibras de PS. Depois que o processo atinge o equilíbrio, a capacidade de adsorção de DNA da membrana final q_e , corresponde à quantidade total (em mg) de DNA adsorvido por unidade de massa (g) da membrana, ou seja,

$$q_e = V \frac{(C_0 - C_e)}{m}, \quad (2.14)$$

onde C_e é a concentração de equilíbrio de DNA (mg/L) na solução.

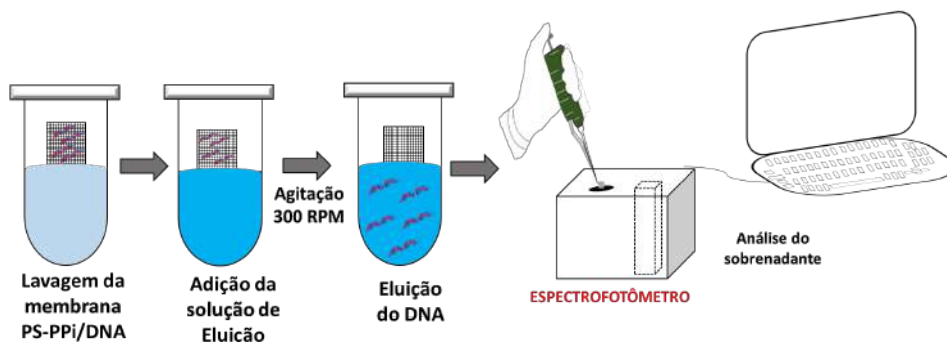
Os dados experimentais foram ajustados aos modelos de isoterma de Langmuir, Freundlich e Temkin, e aos modelos cinéticos de pseudo-primeira-ordem (PPO), de pseudo-segunda-ordem (PSO), de Morris-Weber (MW) e de Boyd. O efeito da temperatura na adsorção de DNA foi estudado na faixa de 10 °C a 50 °C, o que possibilitou a determinação dos parâmetros termodinâmicos correspondentes às variações da energia livre de Gibbs, da entalpia, e da entropia.

2.3.6 Eluição de DNA

Concluído o estudo da adsorção do DNA na membrana, passamos a examinar a facilidade com que poderia ser eluída a fração de ácido nucleico inicialmente capturada pela membrana. Para isso, as membranas foram primeiramente saturadas com DNA de esperma de salmão (50 mg/L) e então lavadas com 1 mL com água deionizada. Diferentes soluções de eluição foram avaliadas - Tris/SDS (50 mM Tris/8,7 mM SDS, pH 8), Tris/HCl-EDTA-Na (TE, 10 mM Tris/HCl/1 mM EDTA-Na, pH 8,5) e Fosfato/Fosfato (Na_2HPO_4 87 mM/ NaH_2PO_4 13 mM, pH 7,6), seguindo um procedimento em que 2 mL de cada solução foram adicionados separadamente a um tubo contendo a membrana/DNA. Posteriormente, o tubo foi agitado

em um agitador orbital operando a 300 rpm por 30 min, sendo então o sobrenadante coletado para análise do espectro UV-Vis. As etapas do processo de eluição são apresentadas na Fig. 18.

Figura 18 – Etapas do processo de eluição do DNA na membrana de PS-PPi.



Fonte: Autoria própria (2021).

2.3.7 Microscopia de fluorescência

Para monitorar os processos de adsorção-eluição de DNA, imagens da membrana PS-PPi em diferentes momentos do processo foram obtidas usando um microscópio Axio Imager 2 (Zeiss, Alemanha), equipado com excitação de (450-490) nm e emissão de (515-565) nm. Para isso, 2 μ L do corante SYBR Green foram adicionados a 2 mL de uma solução de DNA de glicina/esperma de salmão (50 mg/L) pH 2,8. Após o processo de adsorção ser completado, a membrana foi lavada, sendo finalmente o DNA capturado eluído pelo uso de uma solução Tris/SDS (50 mM Tris/8,7 mM SDS, pH 8). Para efeito de comparação, foi também realizado um experimento em que apenas glicina e o corante SYBR Green foram adicionados.

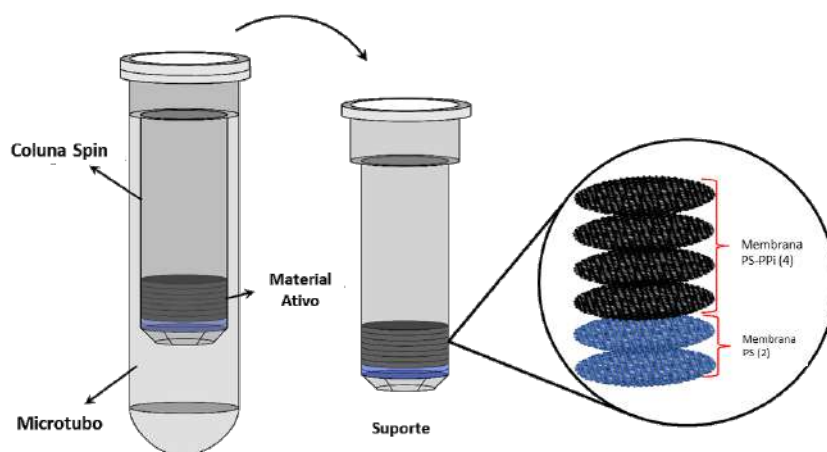
2.3.8 Processo de extração e purificação de DNA de tecidos vegetais

Para os testes iniciais da utilização das membranas PS-PPi para a extração de DNA de amostras de plantas, utilizamos folhas maduras de alface do tipo crespo.

2.3.8.1 Preparação do sistema

A purificação do DNA extraído das folhas de alface foi feito pelo uso de um sistema baseado em colunas de centrifugação, semelhantes aos encontrados em kits comerciais de extração de DNA. Essas colunas são compostas por um suporte para a fixação do material adsorvente (ao qual o DNA se ligará) e um microtubo para reter o líquido (Fig. 19). Duas membranas PS e quatro membranas PS-PPI, cortadas em círculos de 7 mm de diâmetro, foram empilhadas no suporte de maneira que as membranas PS ficassem na parte inferior e as membranas PS-PPI na parte superior.

Figura 19 – Representação esquemática da membrana em forma de coluna de spin.



Fonte: Desenhado por schematicarts.com (2021).

2.3.8.2 Otimização do processo de extração e purificação do DNA de tecidos vegetais

Neste trabalho, o processo de extração do DNA de tecidos vegetais e sua posterior purificação consistiu na quebra inicial das paredes celulares rígidas com o auxílio de um tampão de extração, o que é seguido do rompimento das membranas celulares e liberação do DNA. A próxima etapa foi a precipitação de contaminantes, como proteínas e polissacarídeos, que é seguida da ligação do DNA ao material adsorvente fixado no suporte da coluna. Após a lavagem do sistema, o DNA foi finalmente eluído. O tampão de extração utilizado no processo é composto por cinco componentes: a) o surfactante SDS, responsável por auxiliar na quebra da membrana celular (ROGERS; BENDICH, 1989), b) o Tris/HCl, que mantém o pH da solução, c) o NaCl, que auxilia na remoção de proteínas ligadas ao DNA e também ajuda a manter as proteínas dissolvidas no meio, d) o EDTA-Na, que atua como agente quelante e,

por fim, e) o PVP, que tem a função de remover compostos fenólicos (HEIKRUJAM; KISHOR; MAZUMDER, 2020). No processo de extração, a concentração de cada um desses componentes é um parâmetro crucial para determinar o rendimento e a pureza das fitas de DNA finalmente obtidas. Assim, para estabelecer as melhores condições de operação, um planejamento fatorial (2^3) foi implementado (SELVAMUTHU; DAS, 2018), em que foram usados dois níveis (- e +) de concentração de três componentes fundamentais, o tampão de extração (Tris/HCl (pH 8), NaCl e EDTA-Na – ver Tabela 2), o que leva à necessidade de realização de um total de oito experimentos (I-VIII, conforme mostrado na Tabela 3). Em todos os experimentos foram utilizados volumes fixos de 15 μ L de tensoativo aniônico SDS a 20% e concentração de 4% de PVP. Na Tabela 4 são mostrados os componentes de todas as soluções usadas no procedimento de extração e purificação de DNA.

Tabela 2 – Planejamento fatorial 2^3 : Fatores e níveis adotados para a seleção da solução de lise.

Fatores	Nível de Concentração (mM)	
	-	+
Tris/HCl	100	200
NaCl	500	1500
EDTA-Na	25	50

Fonte: Autoria Própria (2021).

Tabela 3 – Matriz de coeficiente de contraste do planejamento 2^3 para a seleção da solução de lise.

Experimento	Tris/HCl	NaCl	EDTA-Na
I	-	-	-
II	+	-	-
III	-	+	-
IV	+	+	-
V	-	-	+
VI	+	-	+
VII	-	+	+
VIII	+	+	+

Fonte: Autoria Própria (2021).

Todas as variações possíveis para o tampão de lise (I-VIII) foram testadas em triplicata usando o seguinte protocolo para extração e purificação de DNA (adaptado da Referência (SHI; PANTHEE, 2017)).

Tabela 4 – Abreviaturas das soluções utilizadas no processo de extração e purificação de DNA de plantas.

Soluções	Componentes da solução	Abreviações
Lise	I-VIII	SL1(I-VIII)
Precipitação	Acetato de potássio-5 M, pH 6,35)	SP2
Ligação	Glicina/HCl, etanol a 60% - pH 3,3	SL3
Lavagem	10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 6,5	SL4
Lavagem	10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 6,5, 80% etanol	SL5
Eluição	10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA-Na pH 8,5	SE6

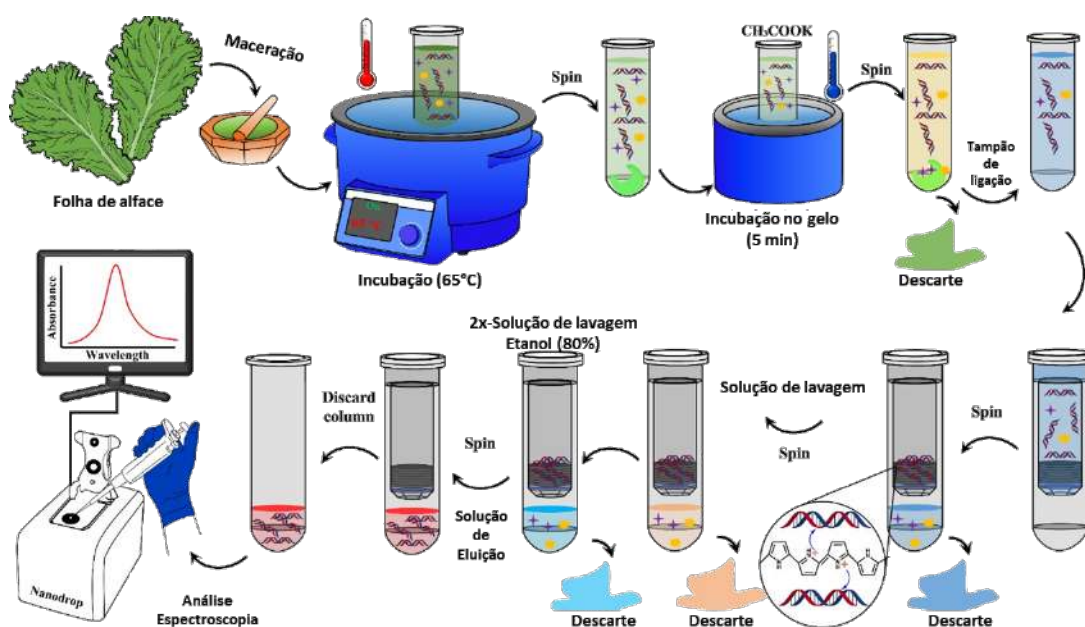
Fonte: Autoria Própria (2021).

1. Em um pilão, 100 mg de folhas de alface maduras congeladas foi macerado com 50 μ L de tampão de lise SL1 (I-VIII/PVP 4%).
2. Em um microtubo de 2 mL foram adicionados 15 μ L de RNase A, a amostra da planta previamente macerada, e mais de 250 μ L do tampão de lise (SL1 (I-VIII)/PVP 4%) e, finalmente, 15 μ L de SDS (20 %).
3. O microtubo foi homogeneizado em um vórtex por 10 s e então incubado a 65°C por 10 min (o microtubo foi invertido manualmente por 30 s a cada 5 min).
4. Em seguida, o sistema foi centrifugado por 2 min a 14.000 g para retirada dos resíduos.
5. Com uma micropipeta, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e levado a um microtubo limpo, sendo em seguida um volume de 130 μ L adicionado à solução de precipitação SP2. Posteriormente, o microtubo foi incubado por 5 min. em gelo (para induzir a precipitação de proteínas e polissacarídeos) (NIU et al., 2008).
6. O microtubo foi retirado do gelo e então centrifugado a 14.000 g por 5 min, sendo o sobrenadante finalmente transferido para um novo microtubo, ao qual foi então adicionado 365 μ L da solução de ligação (SL3).
7. A solução resultante é então introduzida na coluna da centrífuga contendo a membrana PS-PPi e centrifugada a 1000 g por 1 min. Em seguida, o sobrenadante é descartado e a coluna colocada em um novo microtubo.
8. Adicionou-se 500 μ L de uma solução tampão de lavagem (SL4) à coluna e o microtubo foi centrifugado a 10.000 g por 0,5 min.

9. O sobrenadante foi descartado e a coluna, colocada novamente no microtubo, foi lavada mais duas vezes com 500 μL da solução de lavagem (SL5). Ao final do processo, o microtubo foi centrifugado por 2 min a 14.000 g, para retirada completa da solução de lavagem.
10. Finalmente, a coluna foi colocada em um novo microtubo e adicionado 50 μL da solução de eluição (SE6), sendo o sistema então incubado em temperatura ambiente por 5 min e centrifugado a 1000 g por 1 min.

O procedimento acima é representado na Fig. 20.

Figura 20 – Etapas seguidas no processo de extração e purificação do DNA das folhas de alface.



Fonte: Desenhado por schematicarts.com (2021).

Após testar todas as variações do tampão de lise (I-VIII), a concentração e a pureza da fração de DNA obtida em cada experiência foram analisadas por um espectrofotômetro UV-Vis. O protocolo escolhido foi aquele que levou à obtenção da maior concentração de DNA com pureza próxima da ideal (Experimento VIII). Conforme relatado na literatura (LUCENA-AGUILAR et al., 2016), para uma amostra de DNA ser considerada uma razão pura $A_{260/280}$ [ou $A_{260/230}$] ela deve estar próxima a 1,8 [na faixa de 2,0-2,2].

Após definir os melhores parâmetros para a solução de lise (Experimento VIII), examinamos como a variação do volume utilizado do surfactante SDS 20% e da solução de acetato de potássio 5 M (pH 6,3) nas faixas de 15 μL a 62,5 μL e de 50 μL a 200 μL , respectivamente,

afetaria a quantidade e a pureza da fração de DNA extraída. Com o protocolo finalmente otimizado (ou seja, usando a solução de lise do Experimento VIII, e 25 μL SDS 20%, numa concentração final de 1,5%, e 50 μL acetato de potássio 5 M pH 6,3, concentração final de 0,8 M), foi então possível iniciar os experimentos de coleta de DNA de folhas jovens de alface das variedades crespa, roxa, americana e lisa.

Para uma melhor avaliação do desempenho de nosso protocolo de extração de DNA de folhas de alface crespa usando a membrana PS-PPi, comparamos o rendimento e a pureza da fração de DNA extraída com aqueles obtidos com o uso de um kit de extração comercial (PureLink™ Genomic Plant DNA Purification, ThermoFisher Scientific (EUA)). Em ambos os casos, a validação da qualidade do DNA purificado foi verificada através de seu uso bem-sucedido em um experimento de PCR.

▪ **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As amostras de DNA purificado foram submetidas à amplificação por PCR, utilizando os primers ITS listados na Seção 2.3. Para preparar o master mix, adicionamos 1,5 μL de DNA purificado, 10 μL Fast SYBR Green Master Mix, 1,5 μL (10 pmol) do primer direto e 1,5 μL (10 pmol) do reverso, mais 5,5 μL de Água Livre de RNase, totalizando um volume de 20 μL . Como experimento negativo, utilizamos uma amostra composta por 1,5 μL de Água Livre de RNase. Após a adição das amostras aos poços, elas foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: (i) 50 °C por 2 min; (ii) 95 °C durante 3 min; (iii) e 40 ciclos de amplificação sequenciais consistindo em etapas de 95 °C por 3 s, 60 °C por 30 s e uma etapa final de resfriamento de 4 °C usando um termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA). As amostras amplificadas foram então purificadas com o kit QIAquick PCR (Qiagen, EUA), e posteriormente analisadas pela técnica de eletroforese.

▪ **Eletroforese em Gel de Agarose**

Os experimentos foram realizados em uma cuba de eletroforese horizontal K33-15H (Kasvi, Brasil) de acordo com a seguinte metodologia:

1. Inicialmente, foi preparado 1 L de uma solução de TAE de 0,5 X. Para isso, água deionizada foi adicionada a 12,5 mL de TAE 40 X até completar o volume de 1L.
2. Pesar 1 g de agarose e transferir para um frasco erlenmeyer de 250 mL, adicionando a seguir 100 mL da solução de TAE 0,5 X.

3. O erlenmeyer foi levado ao forno de micro-ondas por 1 min, a fim de dissolver toda a agarose.
4. Homogeneizar o erlenmeyer e esperar a solução atingir uma temperatura próxima a 37 °C.
5. Adicionar 10 μ L do corante de ácidos nucleicos Diamond e homogeneizar a solução.
6. Colocar a solução de agarose, dentro de um suporte contendo o pente (acessório responsável pela formação dos poços onde será colocada a amostra de DNA a ser analisada).
7. Esperar a polimerização da agarose (formação do gel).
8. Colocar o suporte contendo o gel de agarose dentro da cuba de eletroforese.
9. Adicionar à solução de TAE 0,5 X, até recobrir o gel e retirar o pente para formação dos poços.
10. Adicionar as amostras previamente preparadas em um papel filme (homogeneizar bem: 2 μ L do carregador Blue/Orange 6X e 8 μ L da amostra de DNA) nos poços.
11. Fechar a cuba, conectar à fonte de tensão, e em seguida aplicar uma diferença de potencial de 60 V por 10 min.
12. Passado esse tempo, aumentar a diferença de potencial para 100 Volts, e esperar a amostra correr por 1-2h.
13. Em seguida, levar o gel para o transiluminador (Maestrogen, EUA).
14. Finalmente, as imagens são registradas com o auxílio de uma câmera digital.

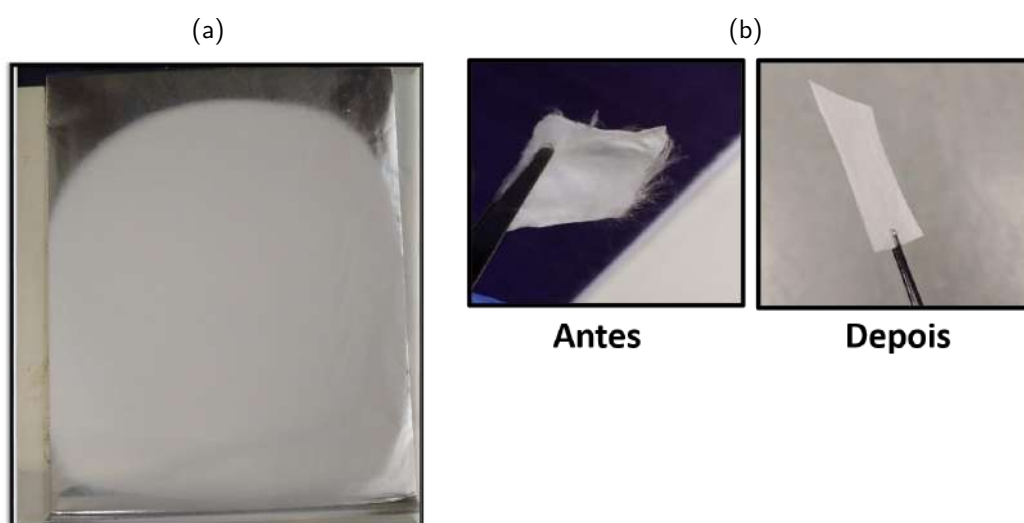
A concentração e a pureza do DNA foram determinadas usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific, EUA), para medir a intensidade da absorção característica em 260 nm e as razões de pureza $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$, respectivamente. A integridade do DNA extraído foi verificada por meio de experimentos em gel de agarose usando um sistema de cuba de eletroforese horizontal K33-15H (Kasvi, Brasil) e um transiluminador MB-16 (Maestrogen, EUA) UV (302 nm). A qualidade das amostras de DNA obtidas foi avaliada submetendo-as à amplificação por PCR em um termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Produção das membranas de poliestireno e seu revestimento com polipirrol

As membranas de poliestireno foram produzidas através da técnica de eletrofiação, com soluções de PS em uma concentração de 30%, aquela para a qual a viscosidade é a mais apropriada para a fabricação. As membranas obtidas apresentavam um aspecto uniforme, sem a presença de grânulos em sua superfície. Na Fig. 21a é mostrada a imagem de uma membrana ainda depositada sobre o coletor de alumínio. Após serem secas, elas foram submetidas a um tratamento térmico-mecânico para a melhora de suas propriedades físicas. Como pode ser visto na Fig. 21b, enquanto as membranas logo após o processo de eletrofiação apresentam propriedades mecânicas relativamente fracas, semelhantes às de um chumaço de algodão, depois do tratamento térmico-mecânico elas se tornam mais compactas e resistentes.

Figura 21 – Membrana de PS preparada após 4 h do processo de eletrofiação, depositada sobre o coletor (a). Membrana de poliestireno antes e após o tratamento térmico-mecânico (b).

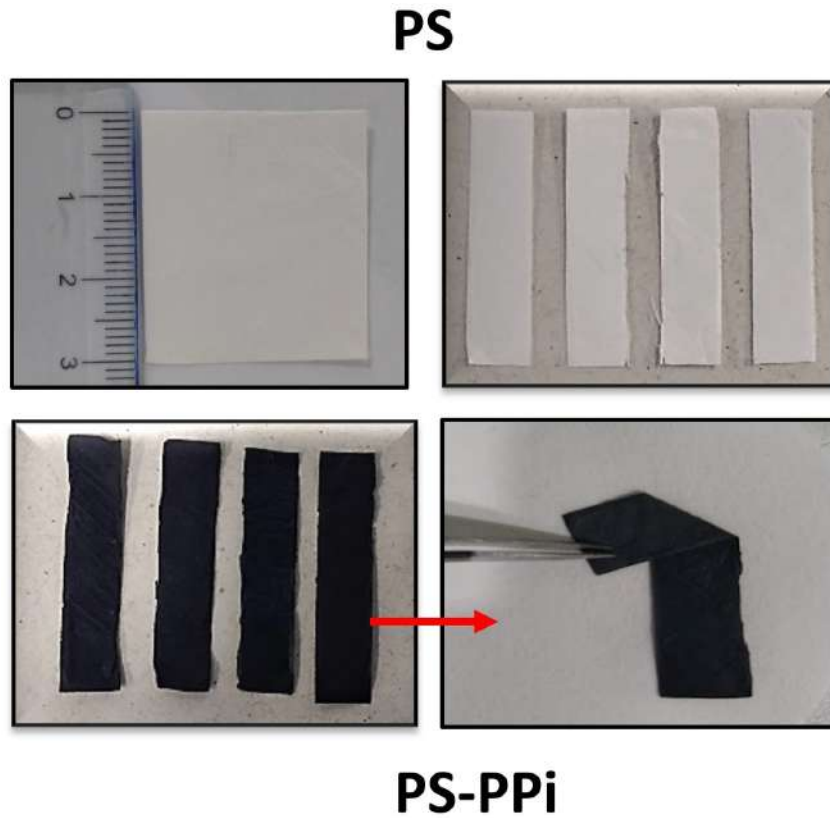


Fonte: Autoria própria (2021).

Após o tratamento térmico, a membrana de poliestireno então foi revestida por cadeias de polipirrol. Esse polímero condutor foi escolhido em função de suas propriedades adequadas, como uma alta estabilidade, ser de fácil preparo e apresentar boa condutividade, entre outras (ELAHI et al., 2011). Inicialmente, para favorecer o revestimento da PPI, a membrana de PS foi exposta a um ambiente de plasma, o que permite a incorporação de grupos funcionais polares (como por exemplo, o C-O) à sua superfície, tornando a membrana hidrofílica. O

revestimento pelas cadeias da PPI foi implementado através da polimerização *in situ*. Na Fig. 22, são mostradas as membranas de PS antes e depois do revestimento por PPI.

Figura 22 – Membrana de poliestireno antes e depois do revestimento com polipirrol.



Fonte: Autoria própria (2021).

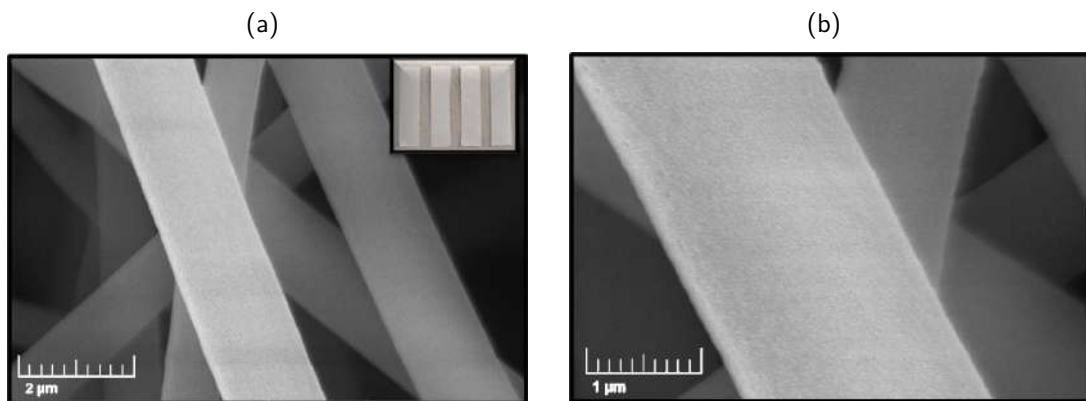
Como pode ser observado na figura, o polipirrol revestiu uniformemente a membrana de PS em ambos os lados, dando a ela uma coloração escura.

2.4.2 Caracterização das membranas de PS e PS-PPi

2.4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

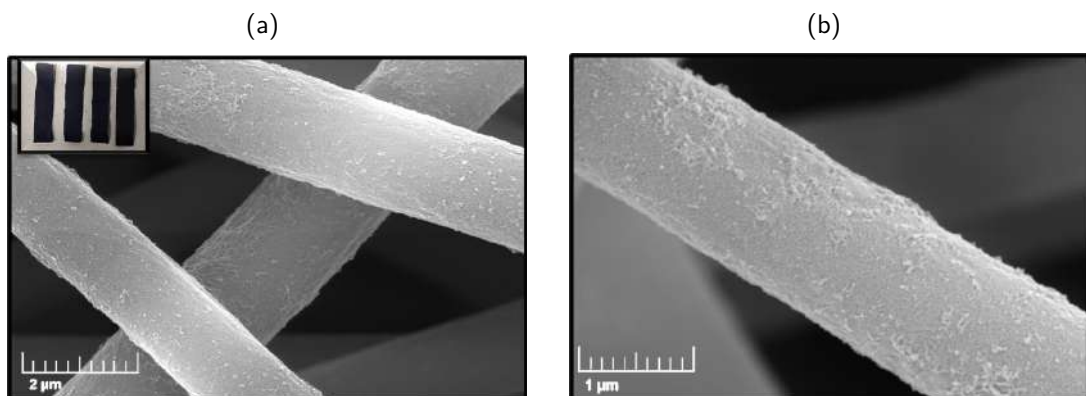
Na Fig. 23a é mostrada a micrografia das fibras de PS após o tratamento térmico-mecânico, onde pode ser comprovada a boa homogeneidade, sem a presença de grânulos ou rugosidade. Por sua vez, na Fig. 24a é possível observar a presença de uma fina camada de polipirrol na superfície das fibras de PS, após 2 h de polimerização. Nas Figs. 23b e 24b, respectivamente, são mostradas a superfície de uma fibra de PS e PS-PPi em uma maior amplificação.

Figura 23 – Micrografia das fibras de PS após o tratamento térmico em duas distintas magnificações: 20000 x (a) e 50000 x (b).



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 24 – Micrografia das fibras de PS após o revestimento com polipirrol em duas distintas magnificações: 20000 x (a) e 50000 x (b).

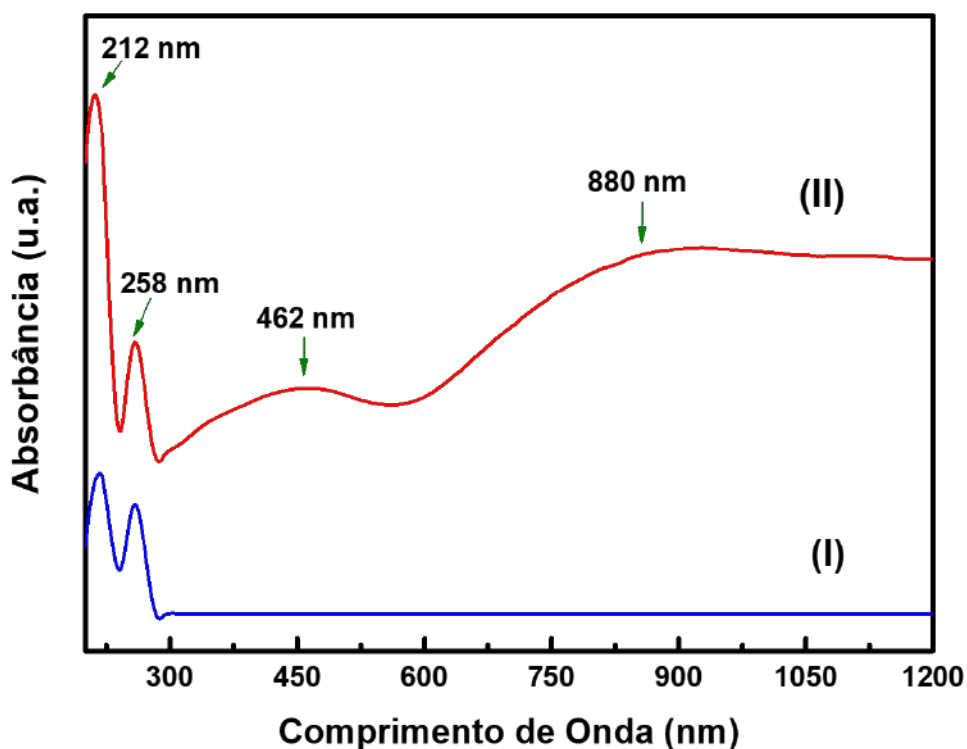


Fonte: Autoria própria (2021).

2.4.2.2 Espectroscopia no Ultravioleta - Visível (UV-Vis)

Na Fig. 25, é mostrado o espectro de UV-Vis da membrana PS (curva I), onde podem ser vistos os picos característicos do poliestireno em 212 nm e 258 nm, devidos à presença de anéis de benzeno (SU, 2013). No caso das membranas PS-PPI (curva II), podem-se observar os picos característicos da forma protonada do polipirrol. Os picos 462 nm e 880 nm são atribuídos à transição $\pi - \pi^*$ dos anéis benzenóides, e à presença de bipólarons característicos do estado condutor do polipirrol (RAHAMAN et al., 2018), respectivamente.

Figura 25 – Espectros de UV-Vis para as membranas PS (I) e PS-PPI (II).

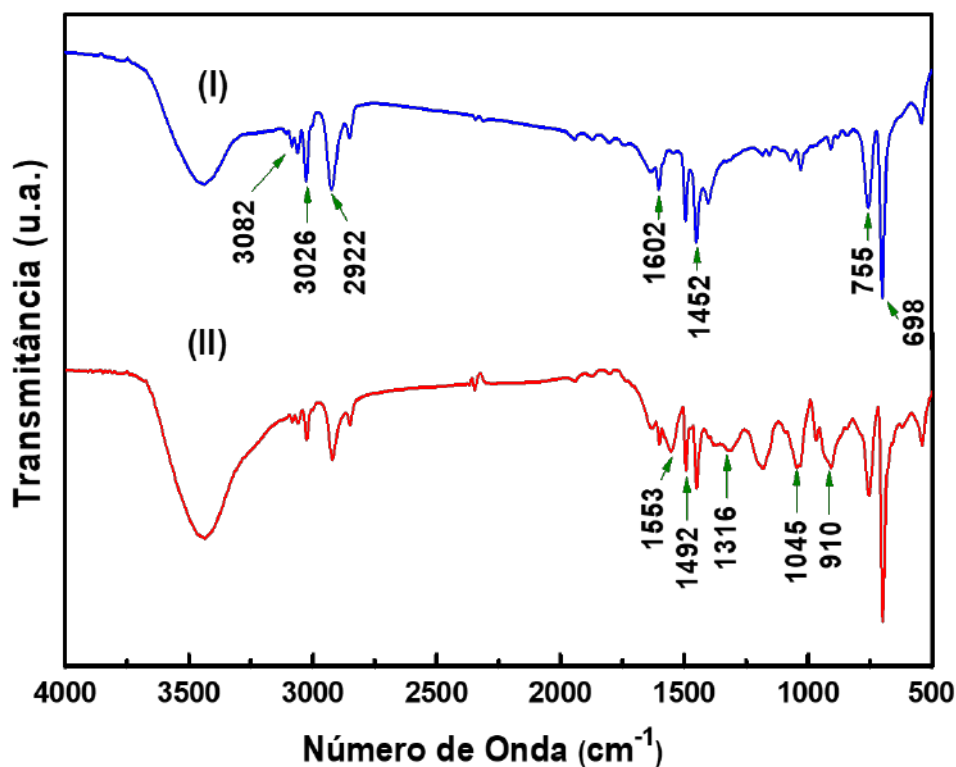


Fonte: Autoria própria (2021).

2.4.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das membranas PS e PS-PPI foram coletados para investigar sua análise estrutural (Ver Fig. 26). No espectro da membrana PS (curva I), os picos em 3060 cm^{-1} e 3026 cm^{-1} estão associados à vibração CH do anel aromático (LU et al., 2008), aqueles em 2855 cm^{-1} e 2922 cm^{-1} são relacionados à vibração de alongamento CH dos grupos CH_2 (GORZA et al., 2018; HUANG et al., 2012), e o pico em 1602 cm^{-1} é atribuído ao alongamento aromático $\text{C} = \text{C}$. O pico em 1494 cm^{-1} corresponde a uma vibração de flexão do C-H e o de 698 cm^{-1} pode ser atribuído aos anéis aromáticos mono-substituídos (ALCARAZ-ESPINOZA et al., 2015). No espectro correspondente à membrana PS-PPI (curva II), podem-se identificar os picos característicos de PS e PPI. Os picos de 1553 cm^{-1} e 1492 cm^{-1} podem ser atribuídos às vibrações de alongamento nos anéis de polipirrol. A vibração de alongamento C-N pode ser vista em 1181 cm^{-1} . Finalmente, as bandas em 1045 cm^{-1} e 1316 cm^{-1} são atribuídas à deformação da ligação C-H (RAMESAN, 2013; FU; SU; MANTHIRAM, 2012).

Figura 26 – Espectros FTIR para membranas PS (I) e PS-PPI (II).

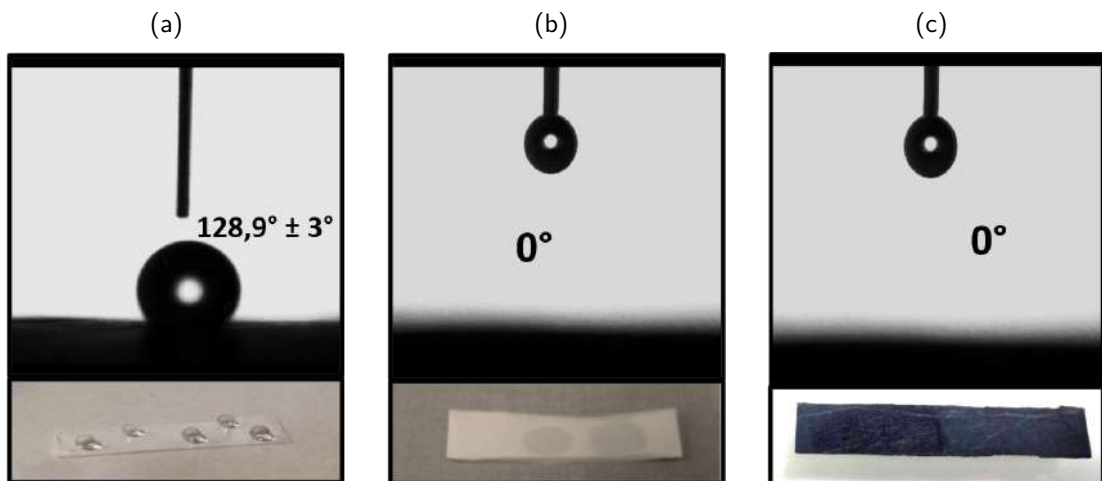


Fonte: Autoria própria (2021).

2.4.2.4 Ângulo de contato

A molhabilidade das membranas de PS e PS-PPI foi analisada através da medida de ângulo de contato. Na Fig. 27a é mostrado o resultado dos experimentos feitos com as membranas de PS após o tratamento térmico, onde o valor de $128,9^\circ \pm 3^\circ$ obtido para o ângulo indica um alto grau de hidrofobicidade da membrana (ver detalhes na seção de metodologia). Por sua vez, o tratamento a plasma leva a uma mudança nas características da superfície da membrana de PS, que se torna totalmente hidrofílica (0°), como mostrado na Fig. 27b, permanecendo assim mesmo após o revestimento de sua superfície pelo PPI (Fig. 27c), resultado que corrobora com aquele encontrado na literatura (ROCHA et al., 2021).

Figura 27 – Medida de ângulo de contato mostrando: (a) o caráter hidrofóbico das membranas de PS após o tratamento térmico, e seu caráter hidrofílico após o tratamento a plasma (b) e (c) após o revestimento com PPI.



Fonte: Autoria própria (2021).

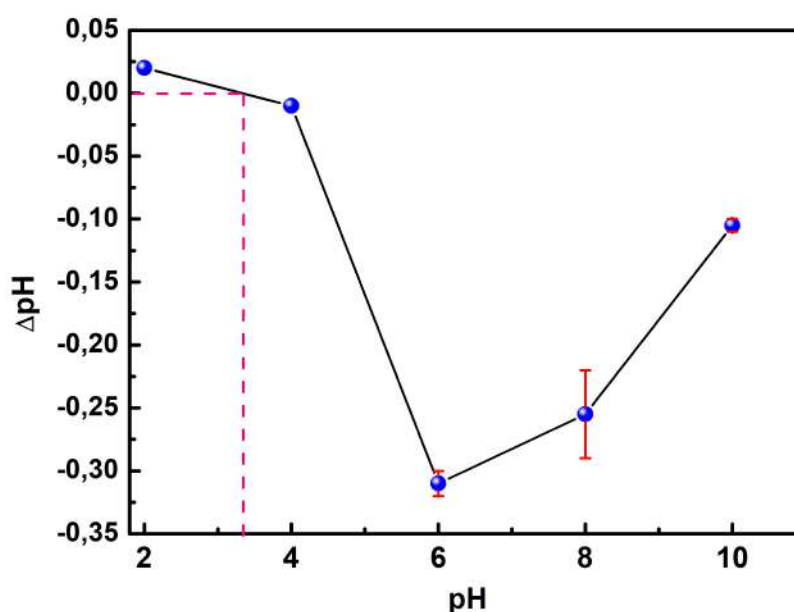
2.4.3 Experimentos de adsorção de DNA em um sistema modelo

As membranas PS-PPI foram usadas como material adsorvente para a captura de cadeias de DNA. O DNA de espermatozoides de salmão, comercialmente obtido, foi utilizado como sistema modelo inicial. Para isso, as membranas foram cortadas em retângulos de 0,75 cm x 3,00 cm.

2.4.3.1 Efeito do pH

O efeito da variação do pH do meio é um fator de grande importância a ser avaliado em um processo de adsorção, pois não apenas causa uma mudança na carga superficial do adsorvente, como também afeta o grau de ionização do adsorbato, o que pode favorecer ou dificultar a captura do adsorbato (SILVA et al., 2021a). Dessa forma, foi determinado inicialmente ponto de carga zero (pH_{pzc}) da membrana PS-PPI, de acordo com o método mostrado na Seção 2.3.4. Como pode ser visto na Fig. 28, o valor encontrado para o pH_{pzc} está na faixa de pH entre 2,0 e 4,0; para valores abaixo do pH_{pzc} , a membrana é carregada positivamente, o que favorece a adsorção de moléculas aniônicas, enquanto que para valores acima do pH_{pzc} , a membrana é carregada negativamente, favorecendo a adsorção de moléculas catiônicas (NIZAM et al., 2021).

Figura 28 – Determinação do ponto de carga zero da membrana PS-PPI.

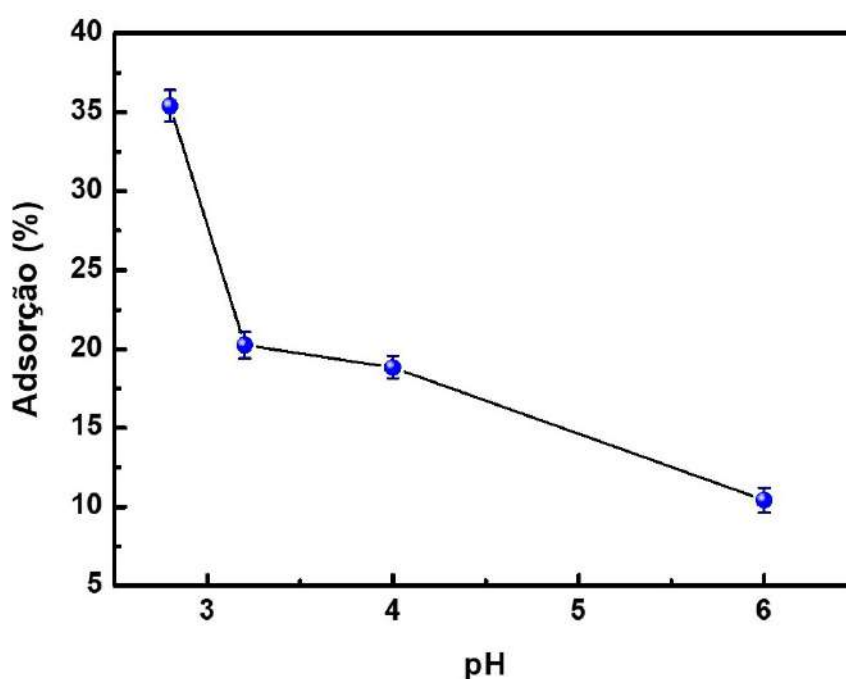


Fonte: Autoria própria (2021).

Inicialmente, foi avaliada como a variação do pH da solução afetaria a eficiência da mem-

brana de PS-PPi em capturar o DNA de espermatozoides de salmão (Fig. 29). Foram analisados quatro diferentes valores de pH na faixa entre 2,8 e 6,0. Como pode ser observado, a maior porcentagem de captura de DNA (cerca de 35,4%) ocorreu para o pH igual a 2,8. Com o aumento do pH da solução, ocorre uma diminuição da eficiência de captura, sendo de apenas 10,7% para o pH 6,0. Essas estimativas da eficiência de captura foram obtidas pelo uso da Eq. 2.12, com as medidas sendo acompanhadas por espectroscopia UV-Vis, o que também nos permitiu determinar as concentrações do DNA inicial (C_0) e final (C_f) após a interação com a membrana.

Figura 29 – Eficiência da membrana de PS-PPi em adsorver o DNA de espermatozoides de salmão com a variação do pH do meio.



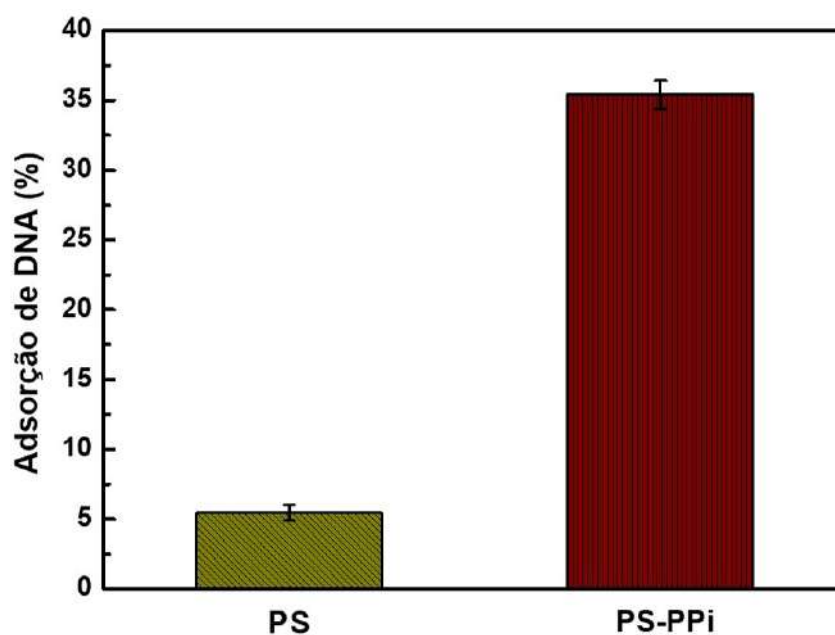
Fonte: Autoria própria (2021).

Assim, em um meio mais ácido é observada uma maior taxa de remoção do DNA dissolvido na solução. Nessa condição, as cadeias do polipirrol se encontram mais protonadas, o que faz com que mais cargas positivas sejam incorporadas à superfície da membrana compósita, possibilitando uma maior atração eletrostática entre o material e as cadeias de DNA, que exibem cargas negativas associadas aos grupos fosfatos presentes em sua estrutura.

Após encontrar o melhor valor de pH (2,8) para a ocorrência da adsorção, realizamos um teste de captura do DNA (concentração 100 mg/L) usando a membrana de PS tratada a plasma (sem a presença do polímero condutor). Na Fig. 30, são mostradas as porcentagens de adsorção do DNA pela membrana de PS e pela membrana de PS-PPi. Como pode ser

visto, para uma concentração inicial de 100 mg/L, não houve adsorção de DNA significativa pela membrana de PS (um valor de 5,4%), enquanto que para a membrana de PS-PPi essa porcentagem foi bem superior, em torno de 35,4%. Esse resultado mostra que o aumento da adsorção está relacionado com a presença do polipirrol na superfície das fibras da membrana PS.

Figura 30 – Teste de adsorção do DNA com a membrana de PS tratada a plasma e com a membrana de PS-PPi.



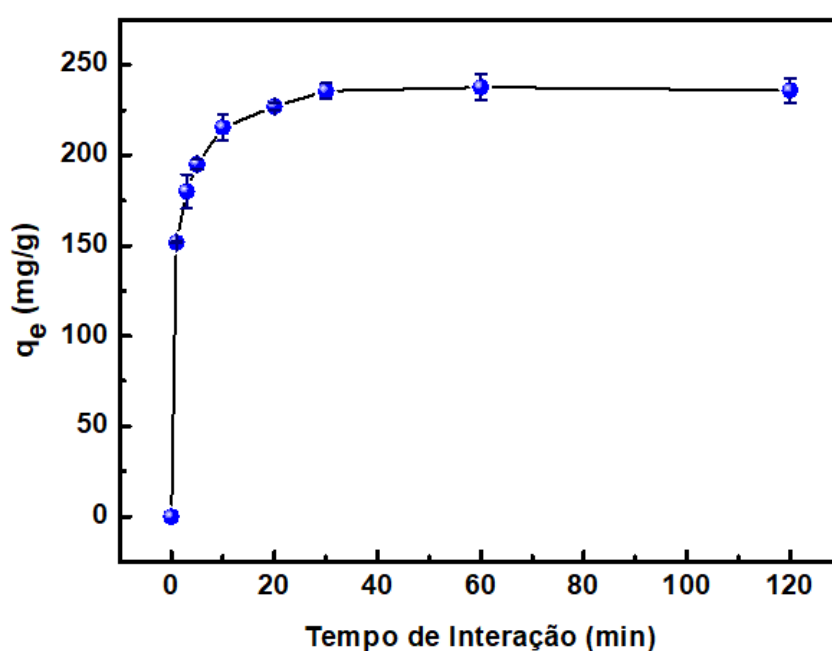
Fonte: Autoria própria (2021).

Por completeza, avaliamos ainda como a eficiência da membrana PS-PPi em adsorver DNA variava quando ela era preparada com diferentes tempos de polimerização (4h e 6h) - o resultado correspondente pode ser encontrado no Apêndice A.1.4.

2.4.3.2 Efeito do tempo de interação e da concentração inicial de DNA

Como pode ser visto na Fig. 31, a adsorção se faz a uma taxa mais rápida nos primeiros minutos de interação, quando a maioria dos sítios ativos da membrana ainda estão disponíveis, do que resulta um rápido crescimento inicial da capacidade de adsorção. Para uma concentração inicial de DNA de 100 mg/L, uma capacidade de adsorção de equilíbrio q_e da ordem de 236,0 mg/g foi alcançada em 30 min.

Figura 31 – Efeito do tempo de interação.

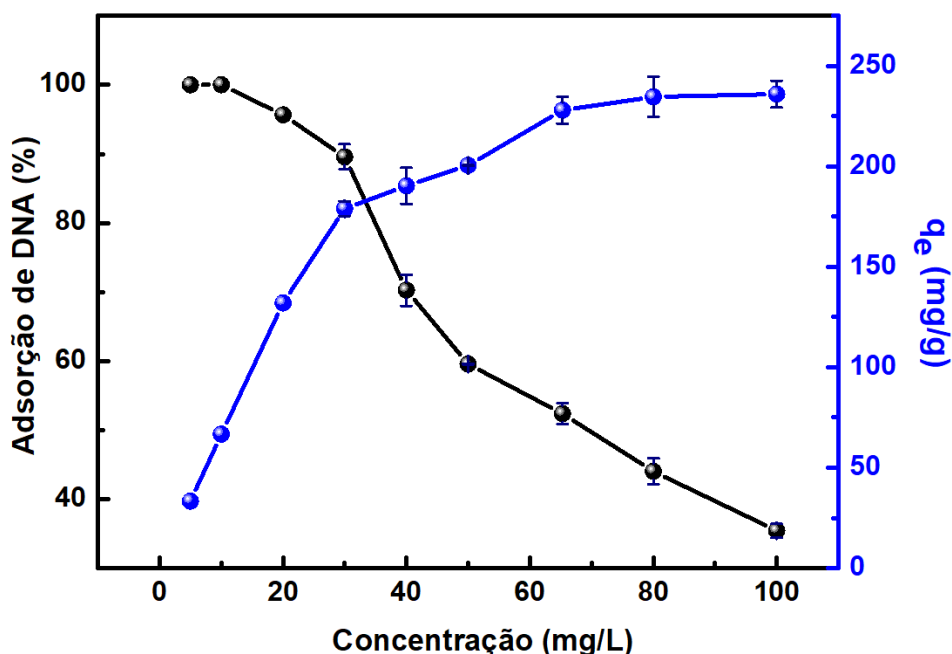


Fonte: Autoria própria (2021).

Na Fig. 32, é mostrado como a variação da concentração inicial de adsorção de DNA afeta a capacidade de equilíbrio (q_e) e o grau de adsorção. Quando a quantidade inicial de DNA é aumentada, são observados tanto uma diminuição na porcentagem de adsorção quanto um aumento no valor de q_e . Enquanto a redução progressiva do número de sítios ativos disponíveis na superfície contribui para explicar a diminuição do grau de adsorção, a força motriz da transferência de massa da solução para o processo adsorvente torna-se mais intensa com uma maior concentração inicial de DNA, uma vez que um maior número de moléculas de ácido nucleico estará disponível para interagir com os sítios ativos na membrana, resultando em um maior valor de q_e (JAVADIAN; VAHEDIAN; TOOSI, 2013). Dessa forma, para uma concentração inicial de 10 mg/L [65 mg/L], 100% [53,2%] da quantidade de DNA dissolvido foi capturado pela membrana, com um grau de adsorção de 66,6 mg/g [228,0 mg/g]. Os valores correspondentes

mudam para uma adsorção de 35,4% e um q_e de 236,0 mg/g, quando uma concentração inicial de DNA de 100 mg/L é usada.

Figura 32 – Efeito da concentração inicial.



Fonte: Autoria própria (2021).

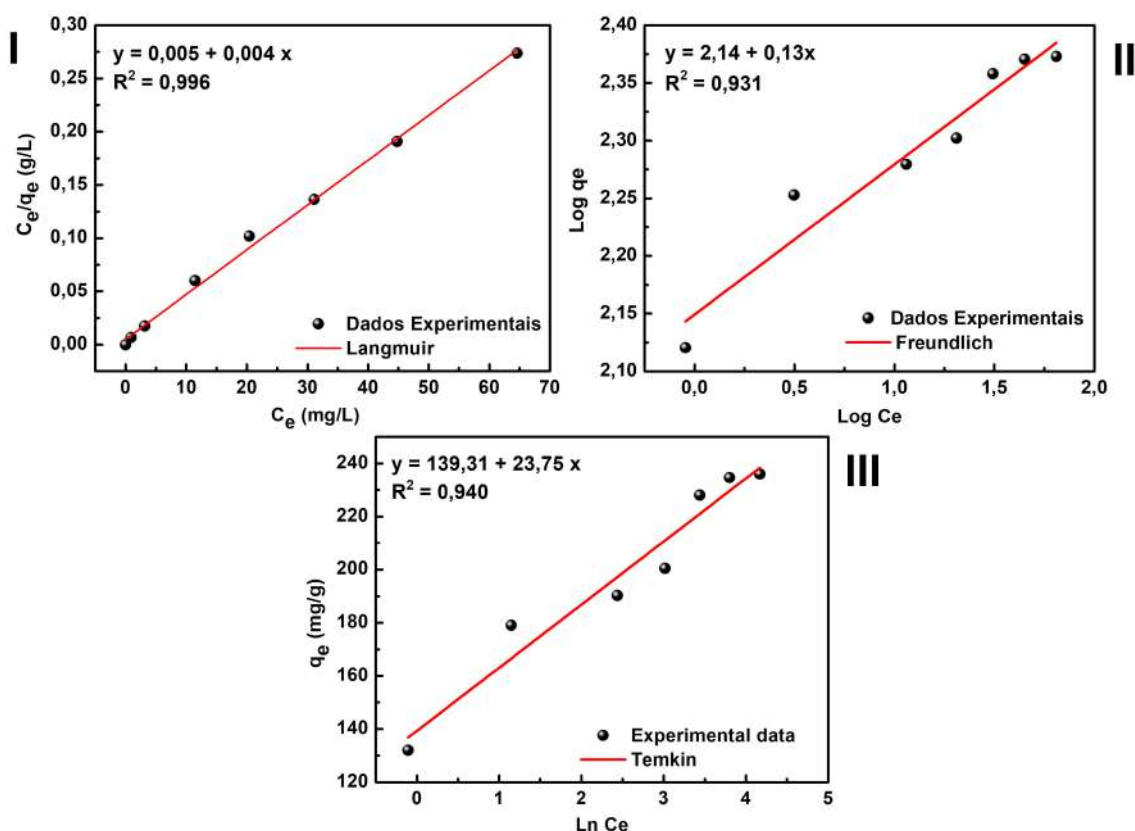
2.4.3.3 Isotermas de adsorção

Para uma melhor compreensão da adsorção das moléculas de DNA na membrana PS-PPI, os dados experimentais foram ajustados aos modelos de isoterma de Langmuir, Freundlich e Temkin.

Como já mencionado anteriormente, o modelo de isoterma de Langmuir admite que o processo ocorre com a formação de uma monocamada do adsorbato. Por sua vez, o modelo de Freundlich assume a existência de sítios ativos de diferentes naturezas, com a adsorção ocorrendo em multicamadas. Por fim, a isoterma de Temkin propõe que, devido às interações entre o adsorvente e o adsorvido, o calor de adsorção de todas as moléculas da camada diminui linearmente com a cobertura da superfície (DADA et al., 2012; HAMDIAOUI; NAFFRECHOUX, 2007). Os dados experimentais foram ajustados usando as equações que representam cada um desses modelos na forma linearizada. Os valores constantes de cada modelo isotérmico foram determinados a partir da inclinação e interceptação dos termos C_e/q_e vs. C_e , para o modelo

de Langmuir, $\log q_e$ vs. $\log C_e$ para o modelo de Freundlich, e q_e vs. $\ln C_e$ para o modelo de Temkin (ver Fig. 33).

Figura 33 – Ajuste linear dos dados experimentais para a adsorção de moléculas de DNA em membranas PS-PPI de acordo com os modelos de isoterma de Langmuir (I), Freundlich (II) e Temkin (III).



Fonte: Autoria própria (2021).

Após o ajuste, se fez possível calcular os parâmetros adequados para cada modelo (Tabela 5). Como pode ser observado, os dados experimentais são mais bem ajustados pelo modelo de Langmuir, para o qual foi obtido um coeficiente de correlação de 0,996 e valores mais baixos de AIC (Akaike Information Criterion) e RMSE (Root Mean Squared Error). Esse resultado sugere que as fitas duplas de DNA se adsorvem de maneira homogênea na superfície da membrana, formando uma monocamada. De fato, usando o modelo de Langmuir, a capacidade máxima de adsorção foi estimada como sendo de 237,5 mg de DNA por grama de PPI, um valor próximo ao resultado experimental (236,0 mg/g).

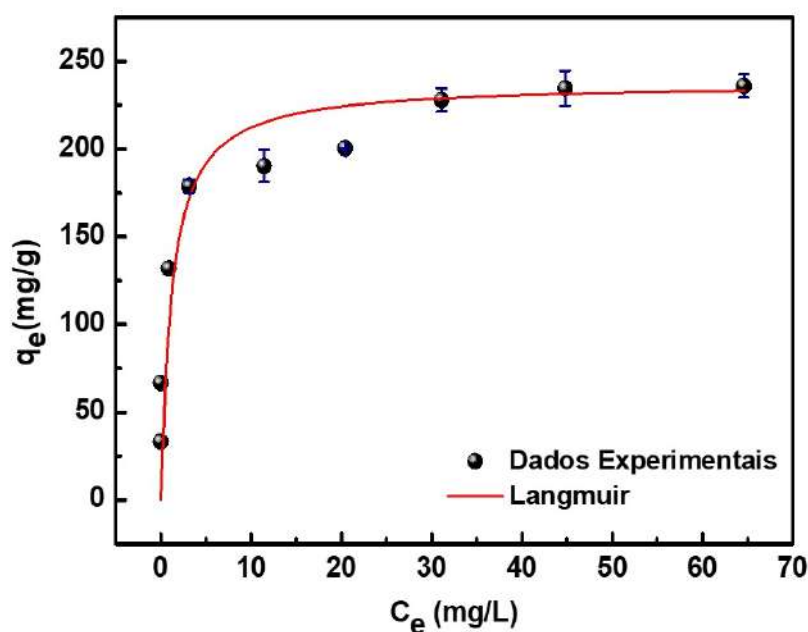
Tabela 5 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção de DNA em membranas PS-PPI de acordo com diferentes modelos de isoterma.

Modelos de Isotherma		Parâmetros			R^2	
$q_{e,exp}$ (mg/g)	Langmuir	q_m (mg/g)	b (L/mg)	AIC	RMSE	0,996
		237,5	0,8369	-80,08	0,0058	
	Freundlich	K_F (mg/g)	$1/n$	AIC	RMSE	
236,0		140,9	0,13	-44,81	0,0235	0,931
	Temkin	B (J/mol)	K_t (L/mg)	AIC	RMSE	
		23,7	352,75	38,57	9,1124	0,940

Fonte: Autoria Própria (2021).

O ajuste da variação da capacidade limite de adsorção q_e em função da concentração inicial de DNA de acordo com o modelo de Langmuir é mostrado na Fig. 34.

Figura 34 – Ajuste dos dados experimentais da adsorção de DNA pela membrana PS-PPI de acordo com o modelo de isoterma de adsorção de Langmuir.



Fonte: Autoria própria (2021).

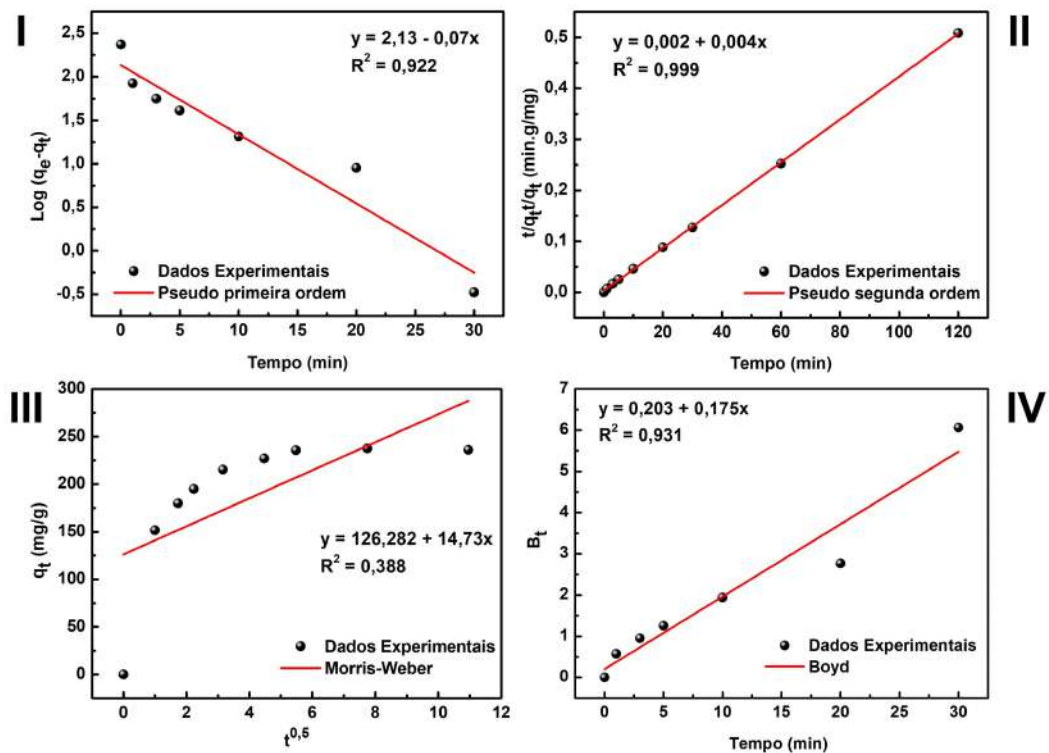
2.4.3.4 Cinética de adsorção

Para investigar os mecanismos predominantes na cinética do processo de adsorção, ajustamos nossos dados experimentais aos modelos cinéticos de pseudo-primeira-ordem (PPO),

pseudo-segunda-ordem (PSO), Morris-Weber (MW) e Boyd (LIN; WANG, 2009; NASCIMENTO et al., 2020).

Os modelos de pseudo-primeira-ordem e pseudo-segunda-ordem estão associados com processos físicos e químicos, respectivamente. Por sua vez, os modelos de Morris-Weber e Boyd estão respectivamente relacionados a processos de difusão intrapartícula e difusão no interior dos poros. Na Fig. 35, é mostrado o ajuste linear dos dados para cada um desses modelos de cinética.

Figura 35 – Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA em membranas PS-PPI de acordo com os modelos de Pseudo-primeira ordem (I), Pseudo-segunda ordem (II), Morris-Weber (III) e Boyd (IV).



Fonte: Autoria própria (2021).

Os parâmetros otimizados correspondentes são apresentados na Tabela 6. A partir dos coeficientes de determinação correspondentes (R^2) e dos valores AIC e RMSE, pode ser visto que a cinética de adsorção é mais bem descrita pelo modelo de pseudo-segunda-ordem, o que é confirmado pelo fato do valor estimado da capacidade máxima de adsorção (238,0 mg/g) ser bastante próximo do resultado experimental (236,0 mg/g).

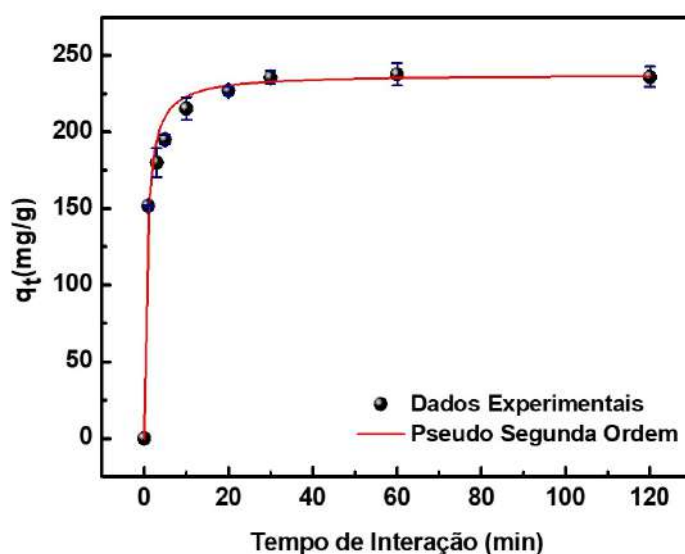
Tabela 6 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção de DNA em membranas PS-PPI de acordo com diferentes modelos cinéticos.

Modelos de Cinética			Parâmetros		R^2	
$q_{e,exp}$ (mg/g) 236,0	PPO	k_1 (min^{-1})	$q_{e,calc.}$ (mg/g)	AIC	RMSE	
		0,18	136,1	-11,36	0,2571	0,922
	PSO	k_2 (g/mg.min)	$q_{e,calc.}$ (mg/g)	AIC	RMSE	
		0,0063	238,0	-100	0,0019	0,999
	MW	k_{id} (min^{-1})		AIC	RMSE	
		14,73	-	85,20	59	0,388
	Boyd	-	-	AIC	RMSE	
		-	-	-1,21	0,5311	0,931

Fonte: Autoria Própria (2021).

Na Fig. 36 é mostrado o ajuste da variação da capacidade de adsorção limite q_e em função do tempo alocado para a interação de acordo com o modelo de pseudo-segunda-ordem. Esse resultado confirma a hipótese de que as fitas de DNA são adsorvidas pela membrana PS-PPI de acordo com processos químicos. No presente caso, as cadeias PPI são dopadas, com os grupos amina PPI estando altamente protonados, conforme comprovado pela análise espectroscópica de UV-Vis através da banda 880 nm correspondente à presença de pólarons e bipólarons. Com a ocorrência da interação de DNA, os contraíons Cl^- associados às cadeias PPI (SASSO et al., 2011) são substituídos pelos grupos fosfato do DNA, em um processo de troca iônica.

Figura 36 – Ajuste dos dados experimentais da adsorção de DNA pela membrana PS-PPI de acordo com o modelo de cinética de adsorção de pseudo segunda ordem.

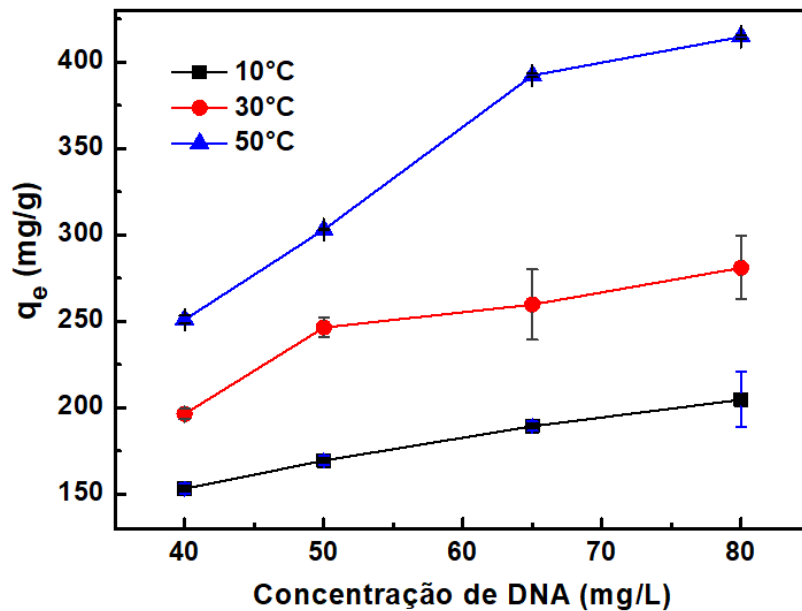


Fonte: Autoria própria (2021).

2.4.4 Efeito da temperatura

A variação da temperatura do meio é um parâmetro fundamental no processo de adsorção, pois afeta as interações moleculares (HASANPOUR; HATAMI, 2020). Para investigar esse efeito, foram usadas 4 diferentes concentrações, com a temperatura sendo variada no intervalo entre 10 °C - 50 °C. Como pode ser visto na Fig. 37, a capacidade de adsorção aumenta com o aumento da temperatura; assim, por exemplo, para uma concentração de 80 mg/L a 10 °C a capacidade é de 204,6 mg/g, enquanto para 50 °C está em torno de 414,0 mg/g.

Figura 37 – Efeito da temperatura no processo de adsorção de DNA pela membrana PS-PPI.



Fonte: Autoria própria (2021).

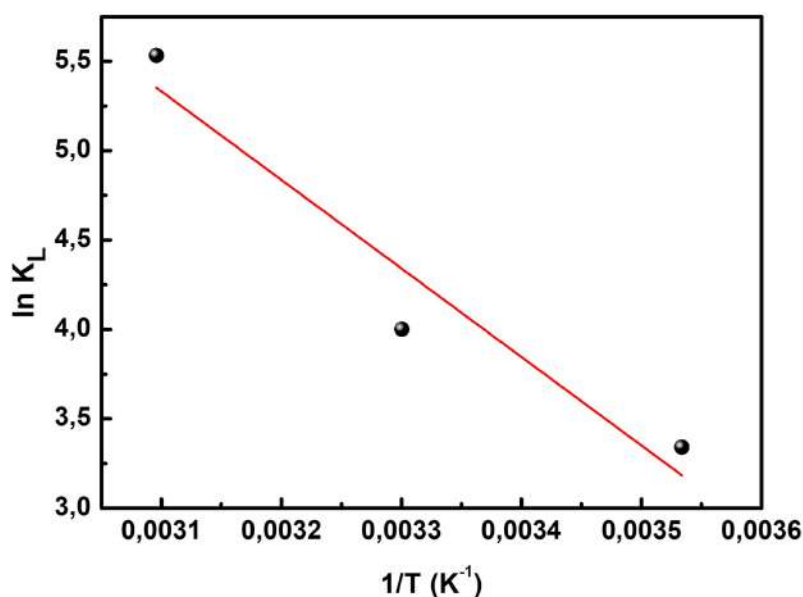
Em seguida, obtivemos os parâmetros termodinâmicos relevantes, a fim de ter um estudo mais aprofundado sobre o mecanismo de adsorção do DNA. Para isso, foram avaliadas a mudança na energia livre de Gibbs padrão (ΔG , kJ/mol), mudança na entalpia (ΔH , kJ/mol) e mudança na entropia de adsorção (ΔS , kJ/(K · mol)), que foram calculadas pelas seguintes equações (HASANPOUR; HATAMI, 2020):

$$\Delta G = -RT \ln K_L \quad (2.15)$$

$$\ln k_L = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (2.16)$$

onde R é a constante universal dos gases. Os resultados do estudo de isoterma de adsorção mostraram que o modelo de isoterma de Langmuir é aquele que melhor se ajusta aos dados experimentais obtidos. A partir dessa análise, foi possível obter o valor da constante de Langmuir, chamada aqui de $\ln K_L$. Com isso, o gráfico de $\ln K_L$ vs. $1/T$ foi construído (Fig. 38) e a partir dos valores dos coeficientes angular e linear foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos ΔH e ΔS .

Figura 38 – Variação da constante de equilíbrio de Langmuir (K) com o inverso da temperatura absoluta (T) para os processos de adsorção de DNA pela membrana PS-PPI.



Fonte: Autoria própria (2021).

Conforme mostrado na Tabela 7, o fato de que os valores de ΔG são negativos para todas as temperaturas indica que a adsorção é espontânea e termodinamicamente viável. Por sua vez, os valores positivos de ΔH e ΔS mostram que a adsorção tem uma natureza endotérmica e que no processo de adsorção do DNA há uma aleatoriedade na interface sólido-solução (HASANPOUR; HATAMI, 2020).

Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos para adsorção do DNA pela membrana de PS-PPI.

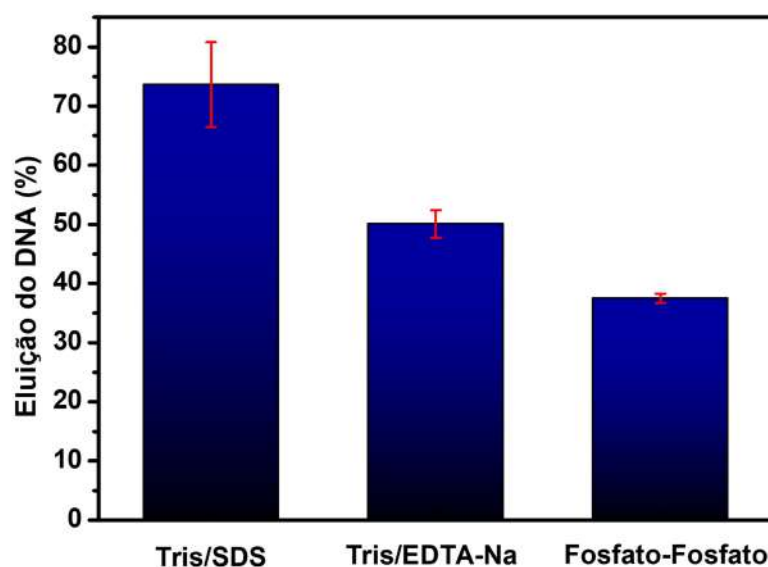
Parâmetros Termodinâmicos			
T (°C)	ΔG (KJ/mol)	ΔH (KJ/mol)	ΔS (KJ/mol.K)
10	-7,85	41,17	0,17
30	-10,08		
50	-15,60		

Fonte: Autoria Própria (2021).

2.4.5 Experimentos de eluição

Uma bem-sucedida eluição da fração de DNA capturada de modo a permitir seu processamento posterior é uma etapa extremamente importante em um protocolo de purificação. A eficiência desse processo depende de parâmetros como o pH do meio e da força iônica das espécies envolvidas (XU et al., 2021). Na síntese química do polipirrol, as cadeias são dopadas simultaneamente (em nosso caso, com íons Cl^-) ao processo de oxidação (SASSO et al., 2011), o que torna altamente protonados os grupos amina das cadeias de PPI. Após a exposição às cadeias de DNA dissolvidas, os contraíons Cl^- são substituídos pela interação com os grupos fosfato presentes nas bordas externas das cadeias duplas do DNA, em um processo de troca iônica. Analisamos a eficiência de diferentes soluções aquosas alcalinas na desprotonação das cadeias de PPI, de modo a promover a eluição do DNA adsorvido na membrana. Houve uma diferença significativa nas porcentagens de eluição do DNA, muito embora os valores de pH das soluções alcalinas fossem próximos. Como os resultados mostrados na Fig. 39 revelam, a maior porcentagem de eluição ($\approx 73,6\%$) foi obtida quando uma solução Tris-SDS (pH 8) foi usada. Eluições da ordem de 50,0% e 37,5% resultaram do uso de soluções de Tris-EDTA-Na (pH 8,5) e Fosfato/Fosfato (pH 7,6), respectivamente. Em todos os casos, a presença de íons nas soluções favorece a troca com os grupos fosfato do DNA, principalmente os ânions sulfato de cadeia longa do surfactante SDS.

Figura 39 – Taxa de eluição de DNA de membranas compostas de PS-PPI para diferentes soluções de eluição alcalina.

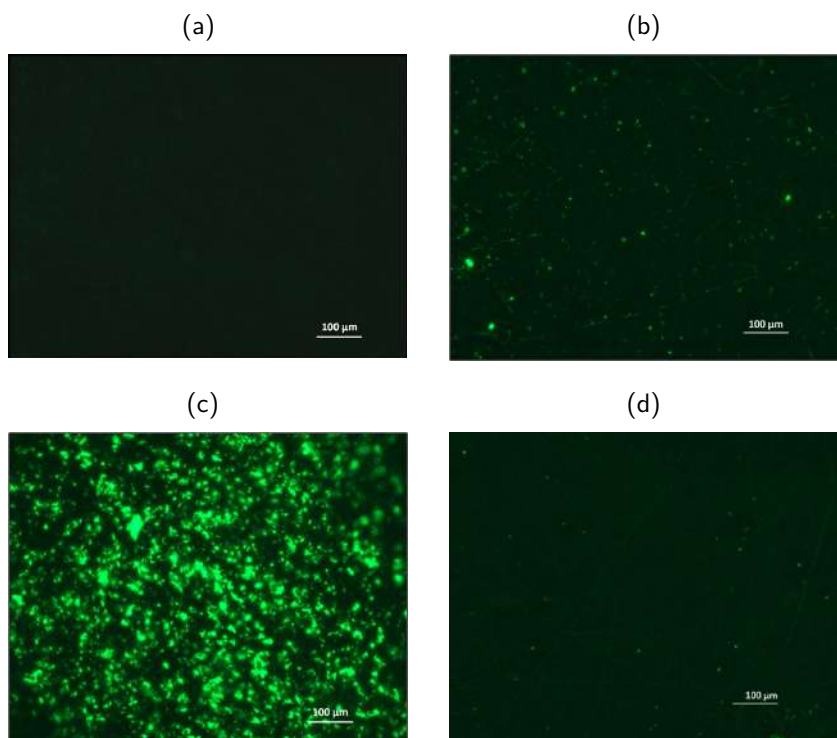


Fonte: Autoria própria (2021).

2.4.6 Microscopia de fluorescência

O corante SYBR Green é amplamente utilizado em diferentes protocolos de biologia molecular, pois exibe uma forte fluorescência após a interação com ácidos nucleicos de fita dupla (LAI; OOI; LAU, 2021). No presente trabalho, este corante foi usado para monitorar os processos de adsorção e eluição de fitas de DNA na superfície da membrana. Após o processo de adsorção e eluição, utilizamos um microscópio de fluorescência para obter as imagens da membrana (Fig. 40). Enquanto a membrana PS-PPi não apresenta fluorescência (Fig. 40a), pequenos pontos verdes podem ser vistos após a interação ao corante SYBR Green apenas (Fig. 40b), com essa intensidade aumentando bastante após a exposição à solução aquosa contendo cadeias de DNA de esperma de salmão dissolvidas (Fig. 40c) marcados com o corante. Como esperado, há uma diminuição/completa desses pontos brilhantes após a etapa de eluição (Fig. 40d). Com isso, foi possível demonstrar a capacidade da membrana em ligar e desligar a ligação das cadeias de DNA, controlando os mecanismos de troca iônica, de acordo com as diferentes condições físico-químicas.

Figura 40 – Imagens de fluorescência da membrana antes do processo de adsorção (a), após a interação com o corante SYBR Green (b), após o processo de adsorção do DNA (c) e eluição (d).



Fonte: Autoria própria (2021).

2.4.7 Comparação com outros adsorventes de DNA

Para melhor avaliar o desempenho das membranas híbridas PS-PPi como materiais competitivos para a purificação do DNA do espermatozoides de salmão, comparamos parâmetros operacionais relevantes, como capacidade de adsorção, taxa de eluição e os tempos necessários para que os processos de adsorção e eluição atinjam o equilíbrio, com aqueles de adsorventes diferentes (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação dos parâmetros de desempenho da membrana PS-PPi com os de outros adsorventes para a captura de DNA de espermatozoides de salmão dissolvido em meio aquoso.

Adsorventes	q_e /Elui. (mg/g)/(%)	Tempo Ads/Elui. (min)	Ref.
MSP^a ZrBF	238,6/89,0	480,0/240,0	(TANG; REN; SHI, 2013)
MSP Fe₃O₄/SiO₂	121,6/89,5	1200,0/60,0	(LI; ZHANG; GU, 2011)
Montmorillonita	54,3/46,6	140,0/140,0	(CAI et al., 2006)
MSP PEI/FePO₄	61,8/100,0	0,5/5,0	(HU et al., 2015)
NCM^b λ - Fe₂O₃/PANI	75,2/94,0	10,0/2,0	(MEDINA-LLAMAS et al., 2014)
NCM λ-Fe₂O₃@Qui@PANI	49,5/66,0	60,0/10,0	(MACIEL et al., 2018)
NCM λ-Fe₂O₃/PEDOT	248,7/94,2	360,0/5,0	(SILVA et al., 2021b)
Membrana PS-PANI	153,8/100,0	9,0/10,0	(BRANDÃO et al., 2016)
Membrana PS-PPi	236,0/73,6	30,0/30,0	Presente Trabalho

Fonte: Autoria Própria (2021).

^a Mesoporoso

^b Nanocompósito magnético

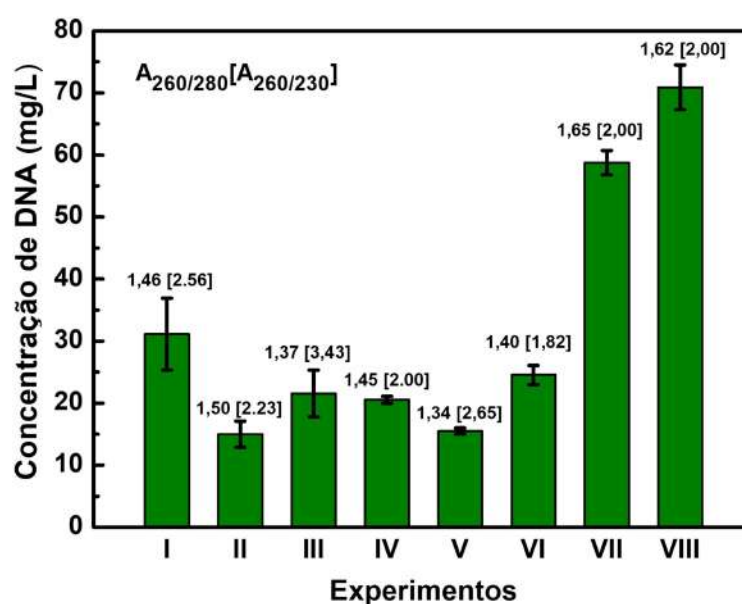
Com base nesses resultados, pode-se afirmar que após 30 min de interação a membrana proposta apresenta excelente capacidade de adsorção (236,0 mg/g) quando comparada a outros materiais. Em particular, o adsorvente MSP ZrBF [NCM λ-Fe₂O₃/PEDOT tem uma capacidade estimada em 238,6 [248,7] mg/g, um valor semelhante à aquela da membrana compósita; entretanto, em ambos os casos, o tempo para que o processo de adsorção atingisse o equilíbrio foi maior, em torno de 480 [360] min. No processo de eluição, pode-se fazer com que a membrana PS-PPi libere 73,6% do DNA adsorvido em 30 min, parâmetros que são competitivos em relação ao desempenho de outros materiais. Por exemplo, uma maior eficiência (89,0% [89,5]) foi observada para MSP ZrBF [MSP Fe₃O₄/SiO₂], mas em um tempo mais longo (240,0 [60,0] min). A boa capacidade de adsorção e eluição do compósito PPI sugere que este é um material adsorvente promissor para ser utilizado na extração de fitas de DNA de tecidos vegetais.

2.4.8 Extração de DNA de vegetais

2.4.8.1 Otimização do protocolo

A diversidade de espécies de plantas é um sério obstáculo para a definição de um protocolo genérico para a extração de grandes quantidades de DNA de boa qualidade a partir de amostras de tecidos vegetais. Um planejamento fatorial 2^3 foi utilizado para a otimização do uso de membranas PS-PPi na extração e purificação de DNA de folhas de alface maduras, com a variação controlada da concentração de três componentes do tampão de lise celular (Tris/HCl, NaCl e EDTA-Na), e mantendo fixa a quantidade relativa de SDS e PVP. Foi visto que o experimento VIII (Fig. 41), onde foram utilizadas as maiores concentrações dos fatores de controle, corresponde à melhor condição quando uma concentração média de DNA de 70,9 mg/L. No entanto, foi observado uma relação $A_{260/280}$ média de 1,6, em uma indicação de que ainda havia uma leve presença de proteínas ou outros contaminantes.

Figura 41 – Concentração e pureza do DNA extraído para os diferentes ensaios fatoriais.

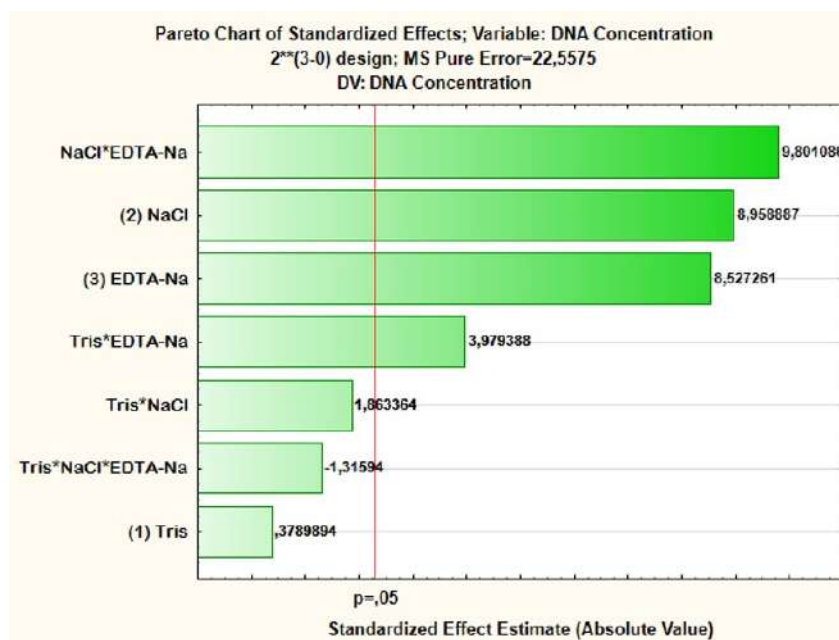


Fonte: Autoria própria (2021).

A análise estatística foi realizada por meio do software Statistica 10 (Statsoft, EUA) para obtenção do gráfico de Pareto (Fig. 42). O gráfico mostrou quais dos três fatores analisados (concentração de Tris/HCl, NaCl e EDTA-Na) ou de suas interações deveriam ser estatisticamente significativos de acordo com a variação entre os dois níveis escolhidos. A linha vermelha em 0,05 indica o limite de significância estatística. Os resultados demonstram que a

concentração de DNA aumenta principalmente quando se utiliza a solução de lise com maior concentração de NaCl e EDTA-Na e interações (NaCl e EDTA-Na, Tris/HCl e EDTA-Na), conforme indicado pelo valor positivo do efeito padronizado (NaCl e EDTA-Na = 9,80; NaCl = 8,95; EDTA-Na = 8,52, e a interação de Tris e EDTA-Na = 3,97).

Figura 42 – Gráfico de Pareto para a concentração de DNA obtida usando a membrana PS-PPI.

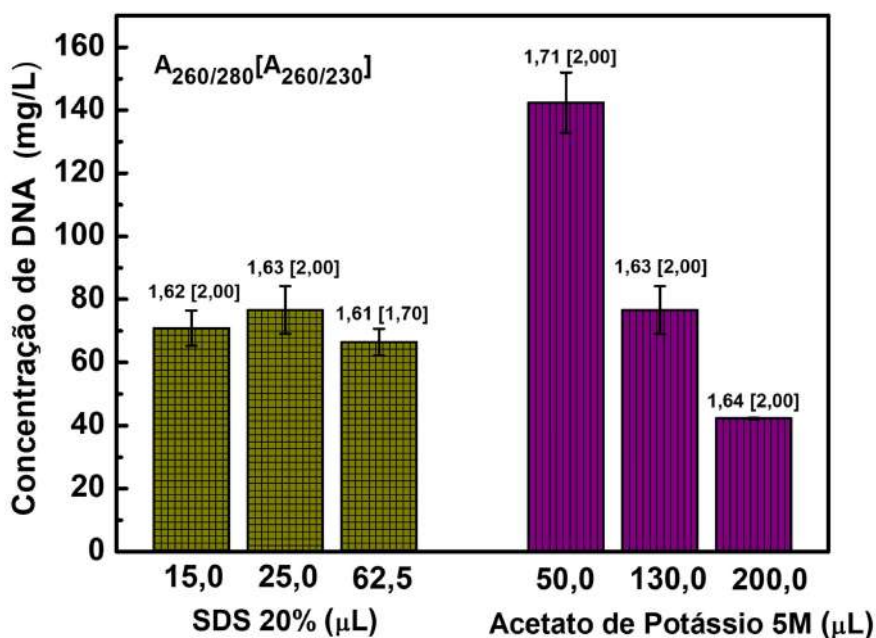


Fonte: Autoria própria (2021).

Na otimização do protocolo de isolamento de DNA de folhas de alface, foram utilizadas as condições do experimento VIII (+++), sendo em seguida variado o volume do surfactante (SDS 20%) no tampão de lise. Como os resultados mostrados na Fig. 43 indicam, foi observado um ligeiro aumento na concentração de DNA (para aproximadamente (76,6 mg/L), sem alteração perceptível nas razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ quando 25 μ L de SDS (correspondendo a uma concentração final de $\approx 1,5\%$). Também foi avaliada a influência de vários volumes da solução de acetato de potássio. Na Fig. 43, é possível observar que, ao se utilizar um volume menor (50 μ L), há um aumento considerável na concentração de DNA (média de (147,4 mg/L) e uma melhora no $A_{260/280}$ razão (média de 1,7). Alterando o volume da solução, a concentração final da solução de acetato de potássio (50 μ L/0,8 M, 130 μ L/1,6 M e 200 μ L/2,0 M) foi variada de forma controlada. Foi sugerido que ao utilizar uma concentração final de 0,8 M, haja maior precipitação do complexo formado pelo surfactante SDS-proteína e polissacarídeos (NIU et al., 2008), deixando o DNA livre em solução. Por outro lado, para concentrações finais mais elevadas (1,6 M e 2,0 M), o excesso de íons presentes na solução

interfere no processo de precipitação, ou mesmo permite a interação do DNA com o complexo formado, levando à diminuição do rendimento final de DNA purificado.

Figura 43 – Parâmetros relevantes da fração de DNA da planta purificada para diferentes ensaios durante a otimização do protocolo de extração.



Fonte: Autoria própria (2021).

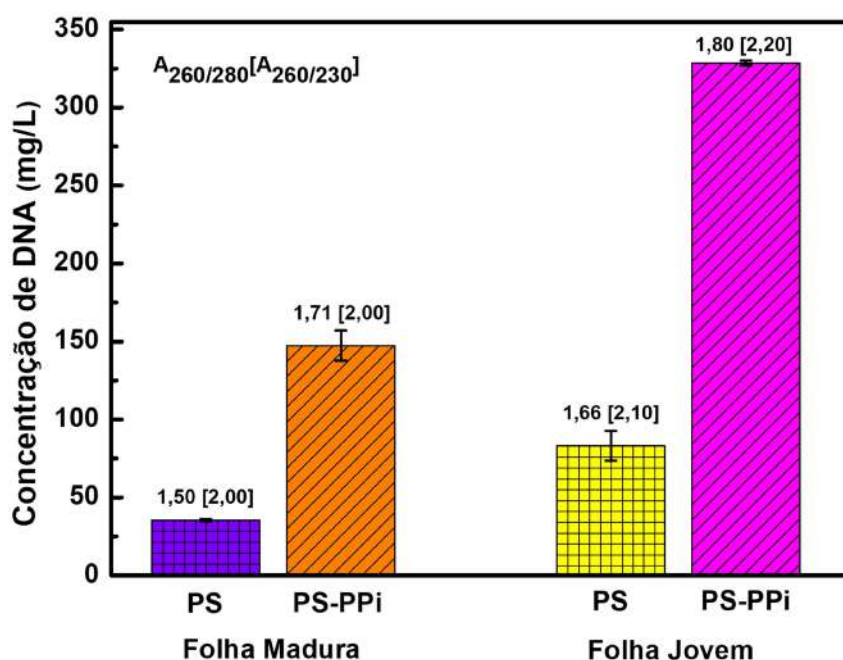
Após a otimização do protocolo de purificação de DNA otimizado de folhas de alface maduras, usamos as mesmas condições, mas agora para a membrana PS pura, afim de avaliar a sua eficiência no processo, após a aplicação do protocolo, observamos uma contribuição mínima de cerca de 35,4 mg/L e pureza respectiva de 1,5 e 2,0 para as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ (ver Fig. 44).

2.4.8.2 Efeito da maturidade da folha e do tipo de alface no rendimento do DNA

Sabe-se que as folhas maduras costumam conter um maior grau de espécies como polifenóis e polissacarídeos, que atuam como contaminantes em protocolos de extração de DNA (SAHU; THANGARAJ; KATHIRESAN, 2012). Assim, para obter frações de DNA de tecidos vegetais em maior quantidade e com boa qualidade, sempre que possível se faz preferível usar folhas jovens. Para estabelecer esses efeitos em nosso protocolo baseado em membrana PS-PPi, comparamos a quantidade de concentração de DNA purificado quando foram usadas folhas de alface maduras e jovens. Como esperado, foi obtida uma maior concentração de DNA (328,5 mg/L),

com maior pureza ($A_{260/280} = 1,8$; $A_{260/230} = 2,0$), ao serem usadas folhas jovens de alface. Ao realizar o mesmo experimento com a membrana PS, foi obtida uma contribuição de 83,1 mg/L, com pureza de 1,6 [2,1] (Fig. 44).

Figura 44 – Concentração da fração de DNA extraída de folhas jovens e maduras de alface crespa para a membrana de PS e PS-PPi.



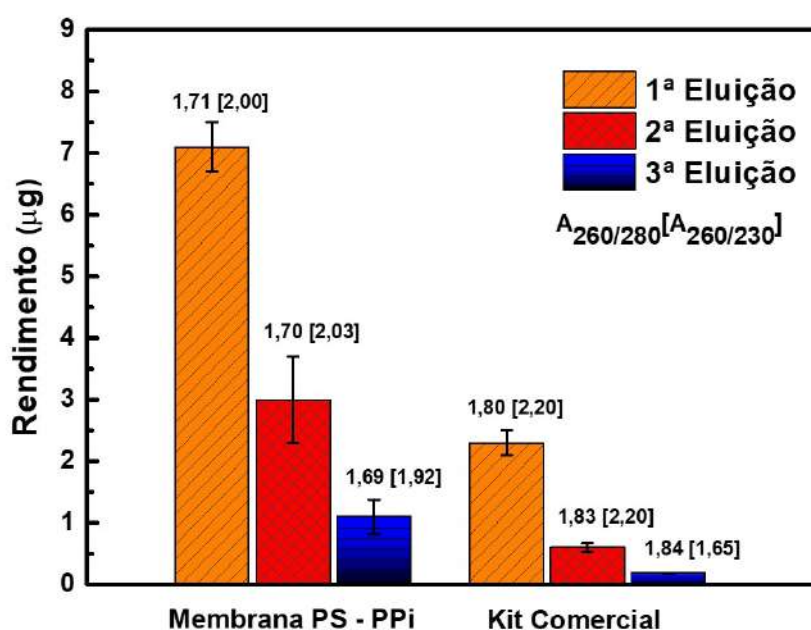
Fonte: Autoria própria (2021).

Diferenças na textura das folhas de diferentes tipos de alface podem afetar o rendimento e qualidade da fração de DNA extraída. Por exemplo, folhas jovens da alface americana apresentam uma textura mais espessa, o que representa um entrave para a etapa inicial de homogeneização manual no protocolo do processo de extração. Nesse caso, nitrogênio líquido deve ser utilizado para reduzir o tempo de homogeneização (SAHU; THANGARAJ; KATHIRESAN, 2012). Por outro lado, folhas jovens de alface roxa (DURNER, 2013) e lisa apresentam uma textura macia, mais propícia à homogeneização. Essas considerações foram confirmadas através dos resultados obtidos quando usamos o protocolo de membrana PS-PPi e obtivemos uma concentração média de 74 mg/L e razões de 1,70 [2,06] para as folhas de alface americana, enquanto foram obtidos valores de 289,0 (1,80 [2,05]) e 233,8 (1,80 [2,03]) para a alface roxa e lisa, respectivamente.

2.4.8.3 Comparação de rendimento com um kit comercial

Para avaliar a eficiência das membranas PS-PPi na extração de ácidos nucleicos de tecidos vegetais, os rendimentos de seu uso na purificação de DNA de folhas jovens e maduras de alface crespa foram comparados com aqueles obtidos seguindo o protocolo de extração de um kit comercial. Em ambos os casos, a fração de DNA extraída foi submetida a três eluições consecutivas. Como os resultados mostrados na Fig. 45 para folhas de alface maduras indicam, uma quantidade maior de DNA foi extraída usando membranas PS-PPi (um total de 11,2 μ g, correspondendo a frações parciais de 7,1 μ g, 3,0 μ g e 1,1 μ g após cada eluição consecutiva) do que usando o kit comercial (um total de 3,2 μ g após extrações parciais de 2,3 μ g, 0,7 μ g e 0,2 μ g).

Figura 45 – Comparação do rendimento de extração de DNA para folhas de alface madura usando a membrana de PS-PPi e um kit comercial.

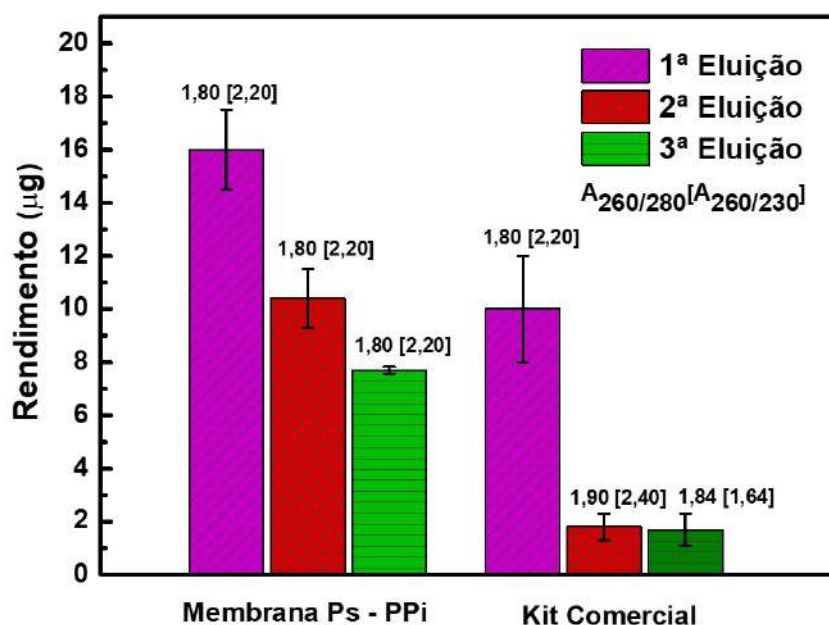


Fonte: Autoria própria (2021).

Quando o material de origem correspondia a folhas jovens de alface (Fig. 46), novamente foi obtida uma maior quantidade de DNA para cada eluição usando membranas PS-PPi (um total de 34,1 μ g correspondendo a frações parciais de 16,0 μ g, 10,4 μ g, 7,7 μ g após cada eluição consecutiva) do que usando o kit comercial (um total de 13,5 μ g após extrações parciais de 10,0 μ g, 1,8 μ g e 1,7 μ g). Nas Figs. 45 e 46, também são mostradas as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ correspondentes. Em geral, esses resultados sugerem que os protocolos

baseados em membrana PS-PPI aparecem como uma alternativa promissora para a extração e purificação de frações de DNA de tecidos vegetais.

Figura 46 – Comparação do rendimento de extração de DNA para folhas de alface jovem usando a membrana de PS-PPI e um kit comercial.



Fonte: Autoria própria (2021).

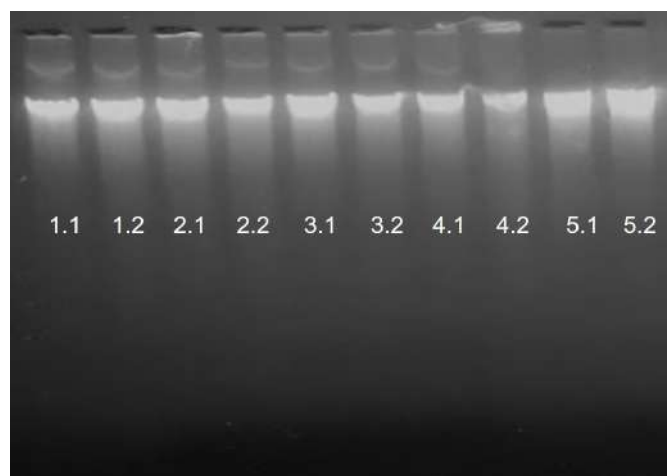
2.4.8.4 Integridade e qualidade do DNA

Em ambos os casos, ou seja, utilizando a membrana PS-PPI e o kit comercial, a fração de DNA coletada foi submetida a experimentos de eletroforese realizados em duplicata, para que fosse avaliada sua integridade. Em todos os casos, os resultados revelam a presença de bandas de DNA bem definidas com intensidades semelhantes, confirmando que as etapas de purificação não induzem a desnaturação do DNA coletado nos diferentes tipos de folhas de alface examinados (Fig. 47). Deve ser ressaltado que bandas idênticas foram obtidas quando o kit comercial foi usado para extrair DNA de folhas jovens de alface crespa.

Como teste adicional da qualidade, as amostras de DNA de alface crespa obtidas foram submetidas a experimentos de amplificação por PCR, que é um procedimento extremamente suscetível à presença de contaminantes. Posteriormente, as amostras amplificadas foram usadas em corridas de eletroforese em gel de agarose. Em todos os casos (Fig. 48), podem ser identificadas bandas intensas com tamanho de aproximadamente 700 pares de bases, como

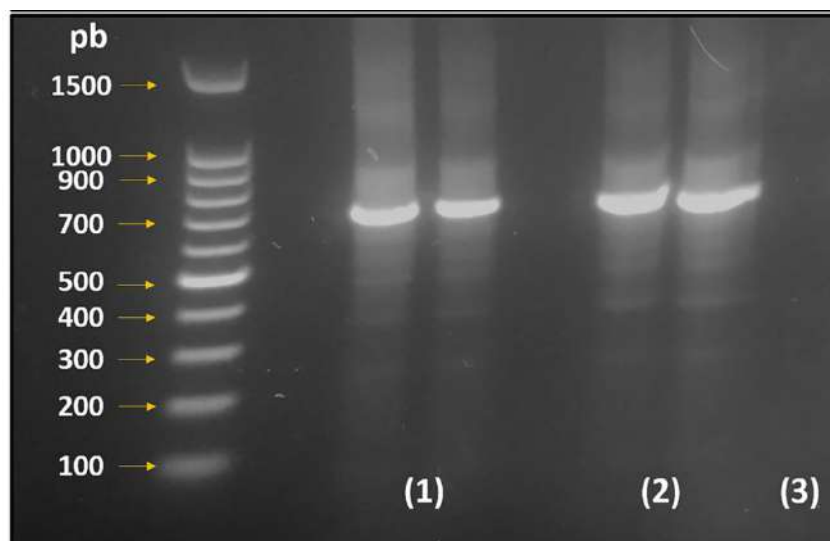
seria de se esperar para o conjunto de primers usados na região do ITS (Internal Transcript Spacers) (CHENG et al., 2016; ŠTEFÚNOVÁ et al., 2013). Mais uma vez, os resultados obtidos com o uso de uma membrana PS-PPi foram idênticos aos obtidos com o uso de um kit comercial. A amplificação bem-sucedida das amostras coletadas demonstra a boa pureza e integridade da fração de DNA purificado, que é, portanto, de qualidade adequada para uso posterior em procedimentos de biologia molecular subsequentes.

Figura 47 – Resultados das execuções de eletroforese para DNA extraído de folhas jovens de alface usando a membrana PS-PPi para crespo (1.1 e 1.2), roxo (2.1 e 2.2), americana (3.1 e 3.2) e lisa (4.1 e 4.2), e de alface crespa, utilizando o kit comercial (5.1 e 5.2).



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 48 – Resultados da amplificação por PCR para amostras de DNA de alface crespa, usando membrana PS-PPi (1), o kit comercial de purificação de DNA de planta (2) e para a amostra negativa (3).

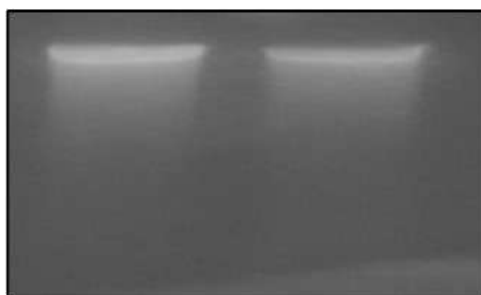


Fonte: Autoria própria (2021).

2.4.8.5 Purificação de DNA de outro tecido vegetal

O protocolo otimizado foi utilizado com sucesso para a extração de DNA a partir de folhas de coentro maduras, quando foi conseguida uma concentração de 72,0 mg/L, com razões de 1,7 e 2,0 para o $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$, respectivamente. Na Fig. 49, são mostradas em duplicata as bandas eletroforese do DNA purificado.

Figura 49 – Bandas de eletroforese obtidas após a extração de DNA a partir de folhas maduras de coentro.



Fonte: Autoria própria (2021).

2.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi abordado um método simples para a preparação de membranas híbridas de PS-PPi fabricadas após a exposição dos filmes de PS eletrofiados a uma polimerização química *in situ* do monômero de pirrol. As membranas PS-PPi exibiram excelente afinidade para DNA dissolvido em meio aquoso, atingindo capacidade de adsorção [eluição] de 236,0 mg/g [73,6%], valores comparáveis aos obtidos pelo uso de outros adsorventes discutidos na literatura. Estudos preliminares do protocolo de extração de DNA de folhas de alface maduras [jovens] mostraram que a membrana PS-PPi apresenta um excelente rendimento de 7,1 [16,0] μg após uma primeira eluição, quando 100 mg de folhas são usadas no processo, um resultado que se compara favoravelmente em relação ao rendimento obtido com o kit comercial 2,3 [10,0] μg . A qualidade e a pureza do DNA purificado foram confirmadas através do processo de PCR e eletroforese. Esse protocolo simples e rápido para a extração de DNA a partir de folhas de alface sugere que as membranas de PS-PPi representam uma alternativa promissora para a extração e purificação de DNA obtido a partir de amostras de tecidos vegetais.

3 USO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO BIOPLATAFORMA SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido uma busca crescente pelo desenvolvimento de biossensores que permitam uma identificação rápida e precisa de sequências específicas de ácidos nucleicos (KAVITA, 2017). A isso se acresce um grande esforço da comunidade científica em construir novos dispositivos de detecção que sejam não apenas de manuseio simples e econômico, mas também miniaturizados e portáteis, tendo em vista a necessidade urgente da implementação desses sistemas em locais de acesso mais remoto, de modo a permitir o diagnóstico rápido de doenças infecciosas, além de auxiliar no rastreamento de patógenos capazes de afetar a produtividade dos setores alimentícios e de produtos agrícolas (MCCONNELL; NGUYEN; LI, 2020; SRINIVASAN; TUNG, 2015).

O DNA é uma biomolécula que tem a capacidade de se automontar pela formação de uma hélice dupla de cadeias complementares. Esse fenômeno tem sido utilizado como base para a construção de dispositivos baseados em ácidos nucleicos para detecção altamente específica de sequências de alvo de DNA. A depender do dispositivo, um sinal – que poderá ser ótico (WEI et al., 2021; ZHOU et al., 2022), eletroquímico (DU et al., 2009; RANA et al., 2021; YOLA; EREN; ATAR, 2014), entre outros – irá ser detectado quando ocorrer a hibridização. Alguns desses métodos de detecção exigem metodologias complicadas e demoradas, além do uso de equipamentos especializados para realizar o processo de detecção do ácido nucleico, o que torna mais difícil, por exemplo, o acesso desses dispositivos por parte de centros de atendimentos iniciais de diagnósticos (PEDRO et al., 2019; YAN et al., 2015). Por essa razão, ao longo dos últimos anos tem sido bastante explorado o desenvolvimento de biossensores baseados em nanomateriais, como nanopartículas de ouro, que apresentam propriedades ópticas únicas por conta da grande área superficial, além de ótima sensibilidade e especificidade na detecção de biomoléculas (RADWAN; AZZAZY, 2009).

Ao longo dos últimos anos, nanopartículas de ouro têm sido constantemente utilizadas para o desenvolvimento de biossensores de ácidos nucleicos. Neste sentido, as NPsAu podem ser funcionalizadas por sondas de ssDNA modificadas por grupos tiol (S-H), formando uma ligação Au-S, ou por sondas não modificadas, as quais permitem a imobilização na superfície

das NPsAu através das nucleobases (SAEED et al., 2017; RADWAN; AZZAZY, 2009). Trabalhos recentes mostraram o potencial das nanopartículas de ouro em detectar fitas de DNA por meio de ensaios colorimétricos (AHMADI et al., 2018), eletroquímicos (MOGHA et al., 2018), fluorescentes (MA et al., 2018), entre outros. Na maioria das vezes, ensaios de biossensoriamento de DNA usando NPsAu são realizados usando soluções coloidais (MATSUMOTO et al., 2021), não sendo geralmente utilizadas NPsAu incorporadas em substratos sólidos.

A integração das propriedades funcionais das NPsAu em uma superfície sólida para aplicação em biossensoriamento pode facilitar a portabilidade e manuseio em locais de atendimento primário. Além disso, quando impregnadas em um substrato sólido as nanopartículas de ouro possuem algumas vantagens no processo de biossensoriamento comparativamente a seu uso na forma coloidal. Por exemplo, quando em suspensão, as nanopartículas podem se autoagregar, o que levaria a resultados falsos positivos ou falsos negativos ¹ (ALBERTI et al., 2021). A membrana extraída da casca do ovo é um material à base de proteínas bastante abundante, que exhibe uma estrutura natural de rede fibrosa e uma boa flexibilidade em solução aquosa (SILVA; ARAÚJO; GONSALVES, 2021). Neste capítulo, iremos descrever como essas características foram exploradas para integrar as nanoestruturas de Au na superfície das fibras da membrana, e aplicar como uma bioplataforma sustentável para a imobilização e subsequente detecção fluorescente de sequências de DNA de patógenos, como a *Leptospira interrogans*.

¹ Em biossensores colorimétricos, a detecção de ácidos nucleicos é percebida quando ocorre a agregação das nanopartículas, ocorrendo a mudança de cor do vermelho para roxo.

3.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.2.1 Biossensores

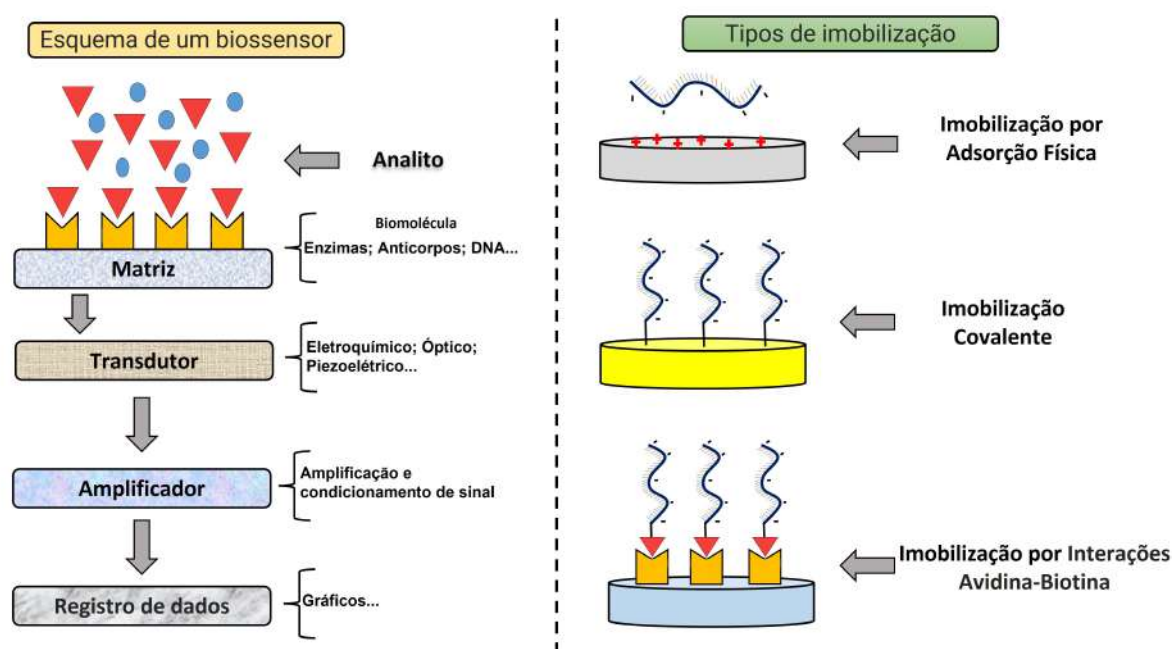
Basicamente, biossensores podem ser entendidos como sendo ferramentas analíticas utilizadas para a detecção de um elemento biológico (tal como enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, etc.) de interesse (SALOMÃO, 2018). Outra forma de defini-los é dizer que são instrumentos analíticos usados para converter o andamento de reações biológicas em sinais mensuráveis que permitem detectar os analitos alvo (ASAL et al., 2018). Historicamente, o primeiro biossensor, introduzido em 1962 por Clark e Lyons, foi um sensor que permitia monitorar o teor de glicose no sangue total pela medida da quantidade de oxigênio consumida através do uso de um eletrodo amperométrico (CAO et al., 2011). Desde então, vários outros biossensores foram construídos e hoje eles encontram as mais diversas aplicações como em diagnósticos, aplicações médicas e clínicas, biorreatores, controle de processos, agricultura e medicina veterinária, controle de qualidade, diagnósticos patogênicos, produção de medicamentos, mineração e controle de efluentes industriais (LAKSHMIPRIYA; GOPINATH, 2019).

Essencialmente, os biossensores são compostos por três componentes: o elemento de reconhecimento biológico (bioreceptor), o transdutor, e um sistema de processamento de sinal (ver Fig. 50). Os elementos biológicos comumente usados são enzimas, ácidos nucleicos (DNA ou RNA), e anticorpos, que uma vez imobilizados em suportes adequados, têm a função de reconhecer seletivamente os analitos-alvo, como substratos enzimáticos, DNA complementar, antígenos (ASAL et al., 2018). Os transdutores são usados para converter em sinais observáveis a mudança de parâmetros físico-químicos resultante da interação entre a biomolécula e o analito alvo. De acordo com a natureza dos elementos transdutores, os biossensores podem ser classificados como sensores ópticos, eletroquímicos, térmicos e piezoelétricos (LAKSHMIPRIYA; GOPINATH, 2019). Por fim, o sistema de saída, com o sinal de resposta sendo exibido sob a forma de gráficos ou bases de dados.

Em geral, os elementos de reconhecimento biológico são imobilizados ao substrato usando diferentes métodos, como adsorção, ligação covalente, ou a interação avidina/biotina. Na primeira dessas técnicas, que é a mais simples para a imobilização, as interações podem envolver ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (MUÑOZ-BERBEL et al., 2008). Por sua vez, a técnica de ligação covalente é o método de imobilização mais utilizado atualmente. Usualmente, neste caso, para que ocorra a imobilização covalente de sondas de

DNA, elas devem ter sido sintetizadas com grupos tiois (SH-) ou aminas (NH₂) no final 3' ou 5'. Finalmente, a estratégia de imobilização por interação avidina-biotina é um método não covalente. Avidina é uma proteína tetramérica contendo quatro sítios de ligação de biotina idênticos que podem formar ligações biotina de avidina tetravalentes capazes de promover a imobilização de DNA, o que pode ser feito pela modificação do final 3' ou 5' da sonda de DNA com a molécula de biotina (RASHID; YUSOF, 2017; REYNOLDS; THOMPSON; SKOTHEIM, 2019). Na Fig. 50, é mostrada uma ilustração dos diferentes tipos de imobilização, usando sondas de DNA como exemplo.

Figura 50 – Esquema de um biossensor e tipos de imobilização de DNA em um substrato.



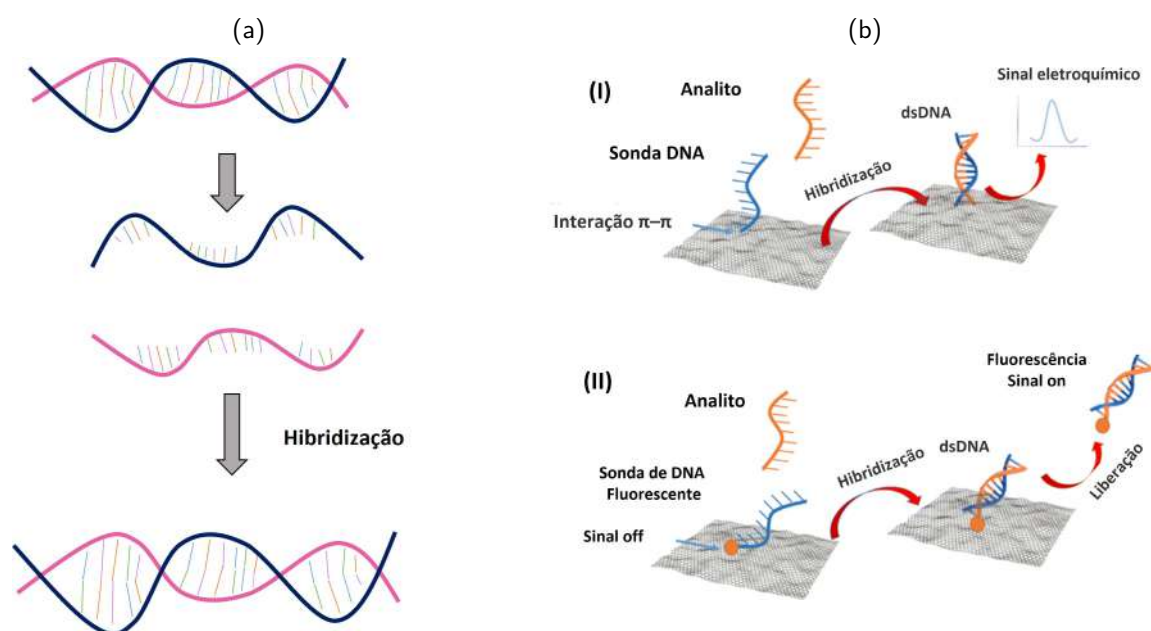
Fonte: Autoria própria (2021).

3.2.1.1 Biossensores baseados em DNA

Biossensores de DNA, também chamados de genossensores, têm atraído bastante atenção devido a sua ampla faixa de aplicações em áreas como análise de genes, diagnóstico clínico, e estudos forenses. Para um eficiente reconhecimento de ácidos nucleicos, nesse tipo de instrumento um substrato é modificado com a incorporação de oligonucleotídeos específicos (por exemplo, sondas de cadeias simples de DNA: ssDNA) de modo a poder reconhecer a presença de sequências complementares de DNA (DNA alvo) por meio de hibridização (ver Fig. 51a) (KARUNAKARAN; BHARGAVA; BENJAMIN, 2015).

Entre os diferentes tipos de genossensores, merecem destaque os eletroquímicos, ópticos e piezoelétricos. Na Fig. 51b (I), pode ser vista uma representação de um biossensor de DNA eletroquímico, atualmente a classe mais utilizada. Nesse caso, reações eletroquímicas são utilizadas para detectar as alterações nas propriedades elétricas (como corrente, voltagem, etc.) decorrentes da hibridização do DNA (RAMOS-SONO et al., 2020). Por sua vez, em um biossensor óptico (Fig. 51b (II)) ocorre a detecção de sinais ópticos (como absorbância, fluorescência, etc.) produzidos pela hibridização entre a biomolécula imobilizada no substrato (por exemplo, sondas de DNA marcada com um fluoróforo) e o analito.

Figura 51 – Ilustração do fenômeno de hibridização do DNA (a). Biossensores (b) de DNA por detecção eletroquímica (I) e detecção fluorescente (II).



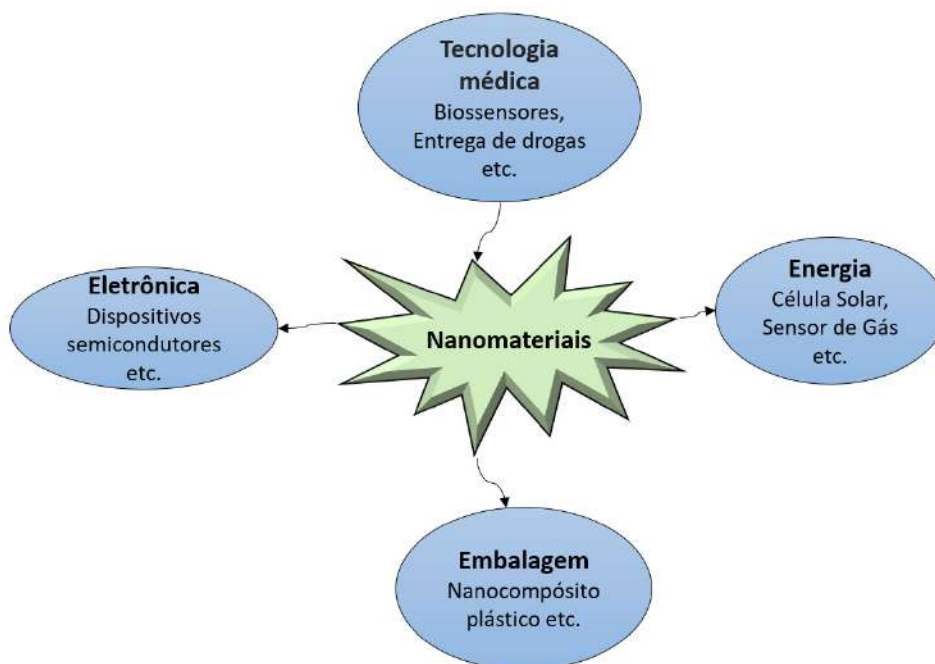
Fonte: Autoria própria (2021) (a) e adaptado da Referência: (PEÑA-BAHAMONDE et al., 2018) (b).

Em um dispositivo de detecção de ácidos nucleicos, é de fundamental importância a escolha da superfície em que será imobilizada a biomolécula. Nesse sentido, nanomateriais têm sido preferidos por serem plataformas bastante estáveis para a imobilização de biomoléculas como cadeias de DNA, o que pode melhorar significativamente a sensibilidade do sensor. Exemplos desses nanomateriais são os nanotubos de carbono, grafeno e óxido de grafeno, nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata e pontos quânticos (SAEED et al., 2017).

3.2.2 Nanomateriais

Os nanomateriais (NMs) são materiais com ao menos uma dimensão menor que 100 nanômetros. Por conta de suas propriedades especiais, ao longo dos anos os NMs vêm despertando grande interesse da comunidade científica por encontrarem aplicações (Fig. 52), como em dispositivos eletrônicos, energia, alimentação e medicina (DEVATHA; THALLA, 2018; MALHOTRA; ALI, 2018). A importância dos nanomateriais foi notada quando pesquisadores descobriram que o tamanho influencia as propriedades físico-químicas de uma substância, incluindo sua reatividade e características químicas, elétricas, mecânicas e ópticas (KHAN, 2018; SALEH, 2020).

Figura 52 – Algumas aplicações de nanomateriais em diferentes setores.

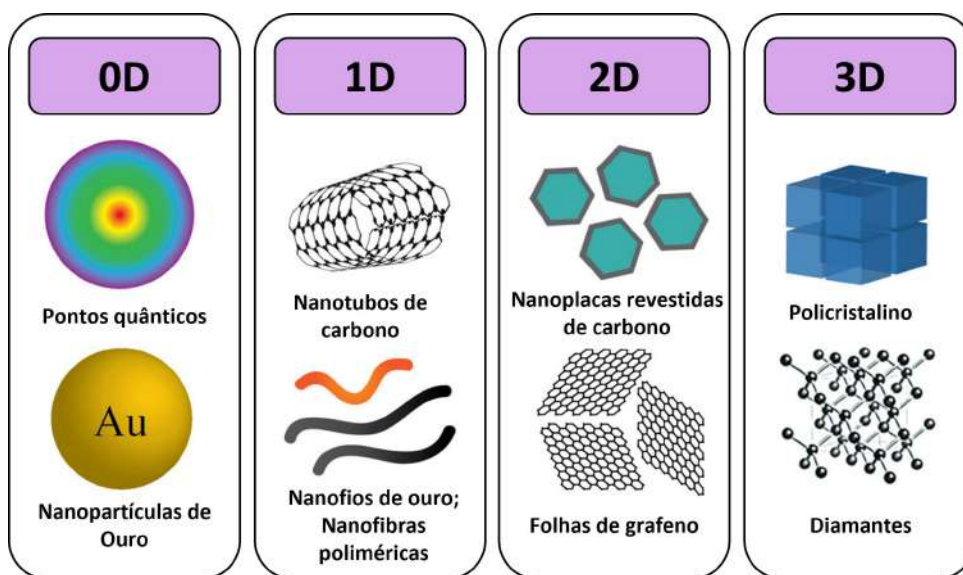


Fonte: Adaptado da Referência: (MALHOTRA; ALI, 2018).

Geralmente, os NMs são classificados de acordo com sua dimensionalidade, morfologia, estado e composição química. Com base em sua dimensionalidade e na forma geral desses materiais, os NMs podem ser divididos em quatro classes: 0D, 1D, 2D e 3D (alguns exemplos de materiais que fazem parte desta classe estão representados na Fig. 53). Em relação à morfologia, eles podem ser nanoesferas, nanotubos, etc. De acordo com o estado físico e de agregação, podem existir em formas de suspensões ou coloides, ou em um estado aglomerado, e, por fim, a quanto à composição química eles podem ser classificados como nanopartículas

de constituintes únicos (prata, cobre, ferro, etc), ou nanocompósitos (materiais que incorporam nanopartículas em uma matriz de materiais para melhorar propriedades como resistência mecânica e condutividade elétrica ou térmica) (SALEH, 2020).

Figura 53 – Classificação dos nanomateriais de acordo com as dimensões.



Fonte: Adaptado da Referência: (POH et al., 2018).

3.2.3 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é um campo de pesquisa em crescente desenvolvimento, que combina sistemas biológicos (como células, ácidos nucleicos e proteínas) com a nanociência. Ela trata do controle, manipulação, síntese e biofuncionalização de dispositivos em escala nanométrica. Atualmente, a nanobiotecnologia tem encontrado aplicação em áreas como medicina, agricultura, e meio ambiente, por exemplo, no design de biossensores eficientes para a detecção rápida e direta de várias doenças, patógenos, pesticidas, etc, tanto no campo ainda de pesquisas, quanto comercialmente (MAGHSOUDI et al., 2021). Nesse contexto, os biossensores baseados em nanomateriais tornaram-se um dos principais tópicos no campo do diagnóstico, o que se deve à crescente demanda por dispositivos com maior sensibilidade e seletividade, um menor tempo de resposta e baixo custo. Entre os nanomateriais usados para esse fim, podem ser destacados as nanopartículas de ouro, grafeno, nanotubos de carbono, entre outros (SU et al., 2017). Nesta seção, daremos destaque às nanopartículas de ouro, nanomaterial por nós utilizado.

3.2.3.1 Nanopartículas de ouro (NPsAu)

Quando uma partícula metálica é exposta à radiação eletromagnética, o campo oscilante da luz incidente induz uma oscilação coletiva coerente de seus elétrons livres, resultando em um processo ressonante em uma frequência particular da luz, em um processo denominado de ressonância plasmônica localizada na superfície (LSPR) (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; MODY et al., 2010). Se essas partículas têm dimensões nanométricas, em certo grau as propriedades ópticas correspondentes podem ser controladas pelo ajuste de seu tamanho.

Em especial, nanopartículas de ouro apresentam propriedades especiais, como biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e propriedades ópticas únicas (NEJATI et al., 2021), que têm sido exploradas para aplicações nas mais diversas áreas, como, por exemplo, biomedicina e eletrônica (ERASMUS et al., 2014). De acordo com o método de síntese, as NPsAu podem ter diversas formas, como nanoesferas e nanobastões. Na Fig. 54, são mostradas imagens de nanopartículas de ouro de forma esférica, onde pode ser percebido que há uma diferença de coloração de acordo com o tamanho da partícula.

Figura 54 – Suspensões coloidais de nanopartículas de ouro.



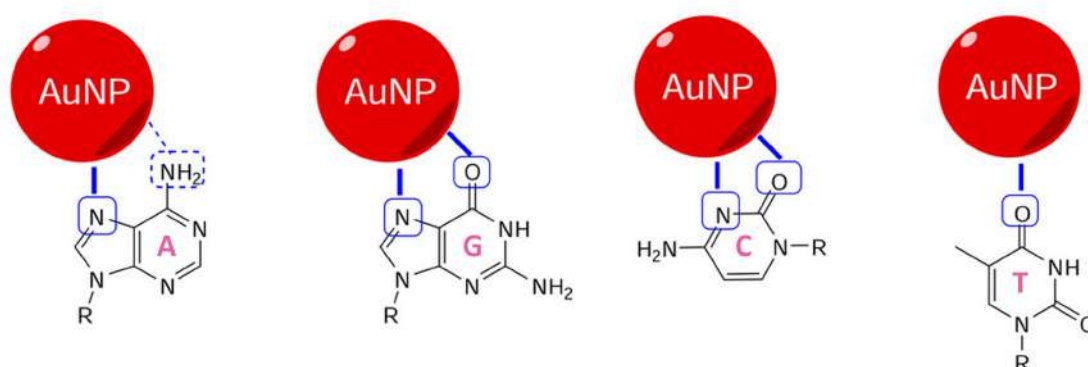
Fonte: Adaptado da Referência: (ABRICA-GONZÁLEZ et al., 2018).

Atualmente, nanopartículas de ouro de forma esférica têm sido usadas em biossensores, em especial, para a detecção de ácidos nucleicos, por conta de sua boa biocompatibilidade, propriedades ópticas especiais, além da relativa simplicidade para sua produção e modificação (HOLZINGER; GOFF; COSNIER, 2014). A síntese das NPsAu é usualmente feita pelo método Turkevich (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951), no qual a formação de ouro coloidal ocorre pela reação do cloreto de ouro (HAuCl_4) e citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), com o tamanho da partícula podendo ser controlado de maneira simples pela variação da concentração de citrato

(DONG et al., 2020; TYAGI et al., 2016).

Como mencionado anteriormente, as NPsAu são bastante usadas em processos de biossensoriamento de ácidos nucleicos. Para isso, uma sonda de ssDNA é inicialmente imobilizada na superfície das NPsAu, o que pode ocorrer via ligação covalente ou adsorção físico-química (HE et al., 2020). No primeiro caso, a molécula de DNA pode ser funcionalizada com um grupo tiol (S-H) ou dissulfeto (S-S) em sua extremidade, resultando em uma ligação covalente entre ouro e enxofre (Au-S) (ABU-SALAH; ANSARI; ALROKAYAN, 2010). Por outro lado, a adsorção físico-química está relacionada com a ligação da molécula de DNA na superfície das NPsAu através das suas bases nitrogenadas (Fig. 55). Quando preparadas com citrato de sódio, as NPsAu estão carregadas negativamente, mas mesmo assim, apesar da repulsão com as cadeias de DNA polianiónicas existem interações de atração que permitem a adsorção de sondas de DNA não modificadas (HE et al., 2020; LI; ROTHBERG, 2004). Para diminuir a repulsão de carga, sais são frequentemente adicionados. De acordo com a literatura, as bases de DNA possuem interações de coordenação estáveis com NPsAu via nitrogênio do anel, grupos amino ou ceto nos anéis de purina ou pirimidina, com a força de ligação dependendo de sua estrutura química (HE et al., 2020; JANG, 2002).

Figura 55 – Ligação das nucleobases de DNA em NPsAu.



Fonte: Adaptado da Referência: (CARNERERO et al., 2017).

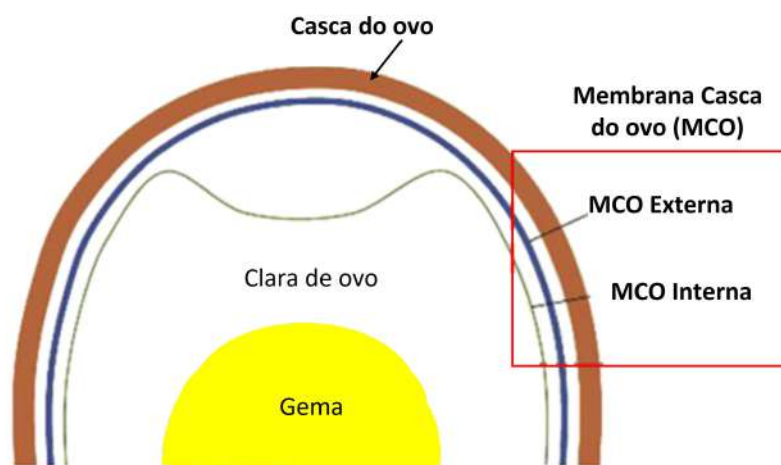
As ligações nas nanopartículas de ouro via base nitrogenadas tem sido utilizadas em alguns sensores do tipo colorimétrico, onde o método de detecção das cadeias de DNA alvo é feita após a agregação e consequente mudança de coloração das nanopartículas. Uma limitação que ocorre nesse tipo de sensor é que se as nanopartículas não estiverem bem estabilizadas, com o tempo poderá ocorrer uma autoagregação o que pode prejudicar o processo de detecção. Dessa forma, à incorporação desse tipo de materiais em superfícies sólidas seria uma estratégia

para contornar esse problema. E entre os materiais sólidos, temos a membrana da casca de ovo que será brevemente apresentada na próxima seção.

3.2.4 Membrana da casca do ovo (MCO)

A membrana da casca do ovo é constituída por fibras colágenas que se organizam em uma membrana externa espessa ligada à casca e uma interna, mais fina e localizada sobre a clara do ovo (Fig. 56). Juntas, elas possuem uma espessura de aproximadamente 100 μm (ALI et al., 2021; TSAI et al., 2006). De acordo com a literatura (DING et al., 2019), a MCO é constituída de 80% a 85% de proteínas, incluindo $\approx 10\%$ de colágenos (tipo I, V e X) e outras proteínas (70 a 75%), como glicoproteína. Essas proteínas contêm muitos grupos amino, grupos carboxila e grupos sulfidril, o que facilita o processo de funcionalização e adsorção de moléculas.

Figura 56 – A MCO está localizada entre a casca do ovo e a clara e pode ser separada em duas camadas: uma externa e outra interna.



Fonte: Adaptado da Referência: (PARK et al., 2016).

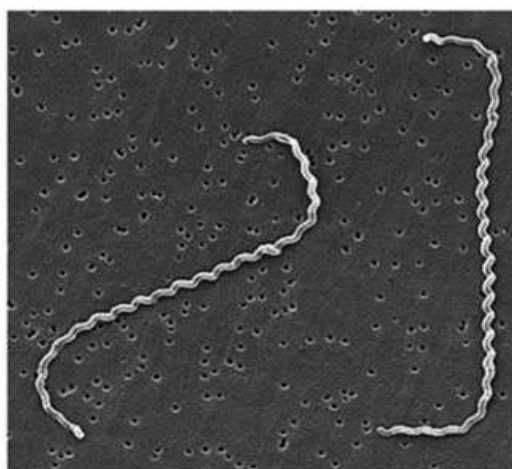
Devido a sua alta biocompatibilidade, grande área superficial, e flexibilidade em solução aquosa, a MCO tem sido amplamente aplicada em diversas situações, como, por exemplo, na adsorção de metais pesados e outros poluentes, como plataforma para dispositivos elétricos, matriz de imobilização de enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos, biomaterial na engenharia de tecidos e em estudos em liberação de drogas (PARK et al., 2016; SILVA; ARAÚJO; GONSALVES, 2021). A modificação deste tipo de membrana pode levar a seu uso como uma plataforma de biossensoriamento de patógenos como a bactéria *Leptospira interrogans*, causadora da doença

leptospirose.

3.2.5 Leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa causada pela bactéria do gênero *Leptospira* (ver Fig. 57). Essa doença pode ser encontrada em praticamente todas as áreas tropicais e temperadas do mundo. Na maioria das vezes, há uma grande ocorrência dessa doença após fortes chuvas e inundações, que podem causar grandes epidemias (VERMA et al., 2020). Em humanos, os portais de entrada da bactéria no corpo incluem cortes e escoriações, ou pelas membranas mucosas, como as superfícies conjuntival e oral, após o contato direto com um animal infectado, ou por contato indireto via solo ou água contaminada pela urina de um animal infectado. Após a infecção, o indivíduo poderá apresentar manifestações clínicas, como desconforto respiratório, hemorragia pulmonar, meningite, e insuficiência renal (NAGRAIK et al., 2021).

Figura 57 – Micrografia eletrônica de varredura da *Leptospira interrogans* isolada pela primeira vez em 1915.



Fonte: Adaptado da Referência: (CARNERERO et al., 2017).

Atualmente, vários métodos de diagnóstico estão disponíveis para confirmar a presença de leptospirose, tais como cultura bacteriana, teste de aglutinação em lâmina macroscópica (MSAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), e reação em cadeia da polimerase (PCR), entre outras. Embora eficientes, esses métodos são demorados e trabalhosos, além de demandarem pessoal qualificado. Com isso, os biossensores têm ganhado uma importância significativa no diagnóstico devido a vantagens como alta sensibilidade, especificidade e rapidez (NAGRAIK et al., 2021).

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais

Todos os ovos utilizados neste trabalho foram adquiridos em uma feira agrícola no bairro da Várzea (Recife-PE). O ácido tetracloreáurico (III) tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e o Tris-Base foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA) e da Promega (EUA), respectivamente. O cloreto de magnésio (MgCl_2) e o ácido clorídrico (HCl) foram fornecidos pelas empresas brasileiras Vetec-Química Fina e pela Química Moderna, respectivamente. O citrato de sódio tribásico foi adquirido pela Nuclear (Brasil). A água utilizada nos experimentos foi obtida após passagem através de um sistema de purificação (Millipore, EUA). Na Tabela 9 se encontram listadas as sequências de oligonucleotídeos de ssDNA sintetizadas e purificadas pela ThermoFisher Scientific (EUA): FAM-ssDNA Gene *LipL32 Leptospira interrogans*, DNA alvo complementar (cDNA), DNA alvo com uma base incompatível (B_1), DNA alvo com duas bases incompatíveis (B_2), DNA não-complementar (ncDNA).

Tabela 9 – Sequências de DNA utilizadas no trabalho.

Nome	Sequência
FAM-ssDNA	5'- FAM-TGG CTA TCT CCG TTG CAC TC-3')
cDNA	5'- GAG TGC AAC GGA GAT AGC CA -3'
B₁	5'- GAG TGC AAC TGA GAT AGC CA -3'
B₂	5'- GAG TGC AAC TGT GAT AGC CA -3'
ncDNA	5'- CAT AGT TGG AGA AAT TTT CAA TT -3'

Fonte: Autoria Própria (2021).

3.3.2 Preparação da MCO, NPsAu e MCO-NPsAu

3.3.2.1 Obtenção da membrana da casca do ovo (MCO)

Neste trabalho, utilizamos como substrato a membrana que reveste internamente a casca do ovo de galinha. Esse é um material com propriedades vantajosas, como uma ótima resistência mecânica e elevado grau de porosidade. Para a separação da membrana da casca do ovo, o seguinte protocolo foi seguido: inicialmente, um pequeno furo foi feito na ponta mais

estreita da casca do ovo, por onde a clara e a gema foram descartadas. Em seguida, as cascas foram lavadas com água deionizada, até a completa remoção dos resíduos da gema e da clara. Posteriormente, as cascas inteiras foram adicionadas em um béquer contendo uma solução 1 M de ácido clorídrico, até que a parte interna ficasse totalmente molhada, com o sistema sendo então deixado em repouso por 30 min.. Finalmente, a membrana que reveste a parte interna da casca do ovo foi retirada da solução com o auxílio de uma pinça, e lavada várias vezes com água deionizada para a retirada do excesso de ácido, até atingir o pH neutro. Em seguida, essa membrana foi cortada em quadrados com dimensões 2 cm x 2 cm.

3.3.2.2 *Preparação das nanopartículas de ouro (NPsAu)*

Após serem separadas e lavadas, as membranas foram revestidas por NPsAu. As nanopartículas haviam sido anteriormente preparadas de acordo com o seguinte protocolo (adaptado de (JR et al., 2012)): em um erlenmeyer de 125 mL (previamente limpo com água régia), foi adicionado 50 mL de água deionizada, seguido de 85 μ L do ácido tetracloroáurico (III) tri-hidratado (concentração $\approx$ 0,15 M) e, usando uma placa agitadora, o sistema foi aquecido até a ebulição. Posteriormente, (mantendo a ebulição) foi adicionado à reação 2,5 mL de uma solução de citrato de sódio tribásico (1%), que também estava quente (aproximadamente 100 °C). A interação foi deixada em agitação, e após mudança de cor para um vermelho intenso o erlenmeyer foi colocado em agitação por 15 min. à temperatura ambiente.

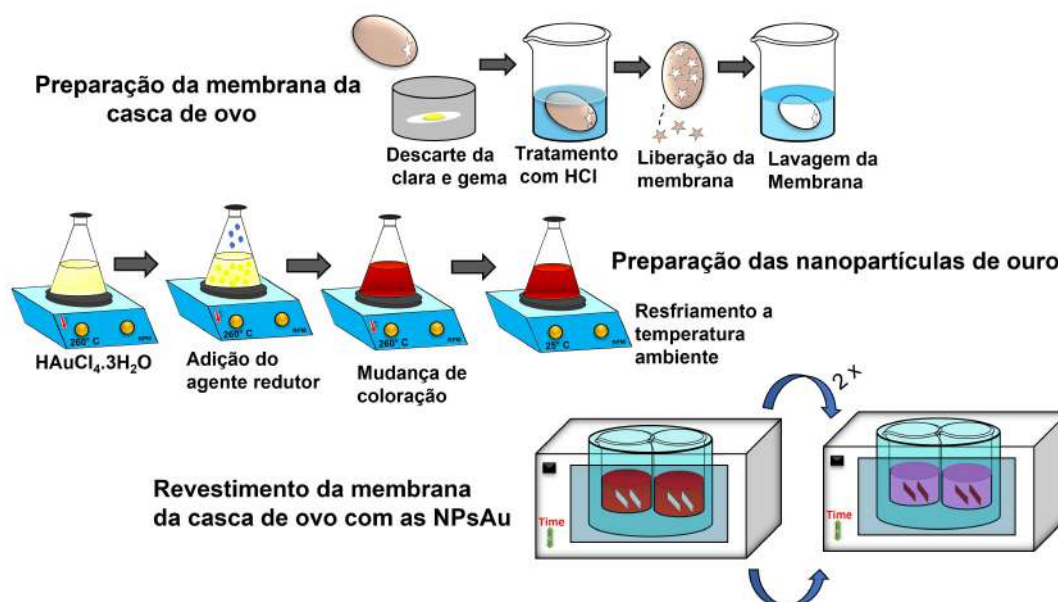
3.3.2.3 *Revestimento da membrana da casca do ovo*

Uma vez preparadas as nanopartículas de ouro, foi iniciada a incorporação nas membranas. Para isso, diferentes volumes da solução coloidal foram testados, com o intuito de se conseguir uma incorporação mais uniforme possível. Esse procedimento foi realizado da seguinte forma: em um Becker, foi colocado 5/15/25 mL de uma solução coloidal de NPsAu com concentração estimada ² em 0,24 mg/mL, sendo em seguida imersos 12 pequenos pedaços da membrana (0,5 cm x 0,66 cm, cortadas com auxílio de um molde), com a interação deixada ocorrer por aproximadamente 90 min em um banho ultrassônico. Em seguida, a solução original foi descartada, sendo adicionado mais 5/15/25 mL da mesma solução coloidal de NPsAu, e

² O seguinte procedimento foi adotado para estimar a concentração da solução coloidal: um volume de 5 mL foi seco a 80 °C por 2 horas e depois calcinada a uma temperatura de 400 °C. O pó obtido foi então macerado e pesado.

deixado no banho ultrassônico por cerca de 60 min. As membranas agora completamente revestidas pelas NPsAu foram guardadas na geladeira até uso posterior. Na Fig. 58, estão ilustradas as etapas descritas acima.

Figura 58 – Etapas de preparação da MCO e das NPsAu e do revestimento da MCO com as NPsAu.



Fonte: Autoria própria (2021).

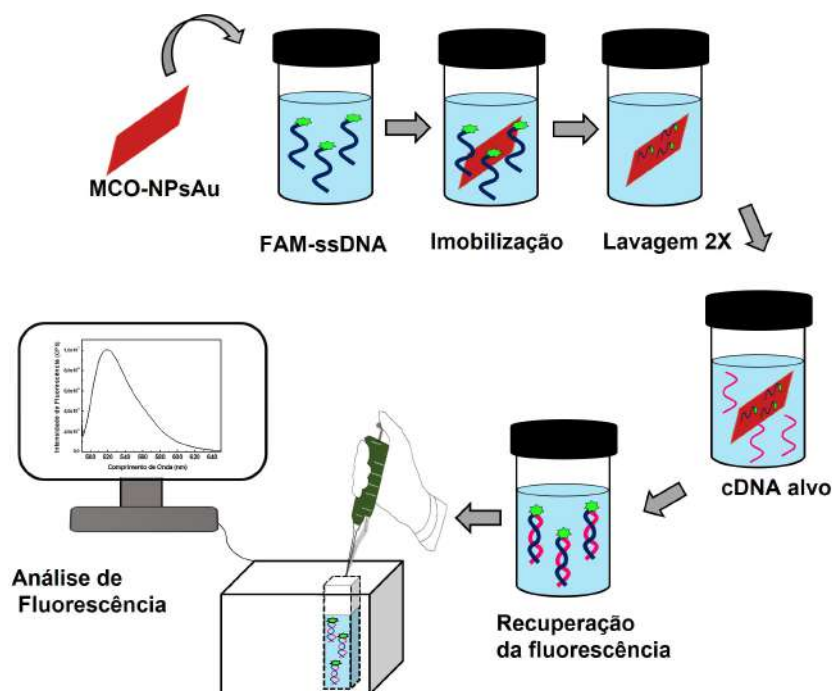
3.3.3 Métodos de caracterização da MCO, NPsAu e MCO-NPsAu

Um microscópio eletrônico de varredura MIRA 3 (TESCAN, República Tcheca) foi usado para avaliar a morfologia das membranas MCO e MCO-NPsAu. A análise termogravimétrica das membranas foi realizada em um analisador térmico (TGA-60H, Shimadzu), sob atmosfera de nitrogênio (100 mL/min) com taxa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 1000 °C. Para identificar a banda de ressonância plasmônica das nanopartículas de ouro presente na membrana MCO-NPsAu, os espectros UV-vis das membranas foram coletados usando um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão) no modo de refletância. A distribuição do tamanho de partícula da suspensão coloidal foi estimada pelo equipamento LitesizerTM 500 (Anton Paar). A concentração das soluções estoque de ssDNA foi determinada pelo uso de um espectrofotômetro UV-vis NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific, EUA). Todas as medições de fluorescência foram realizadas usando um espectrofluorímetro FluoroLog-3 (Horiba, EUA). O comprimento de onda de excitação foi fixado em 480 nm, com os espectros de emissão registrados na faixa de 490 e 650 nm.

3.3.4 Experimentos de biossensoriamento por fluorescência

Como sistema modelo para a realização dos ensaios de biossensoriamento, foram utilizadas sondas de DNA marcadas com o fluoróforo FAM associadas ao patógeno *Leptospira Interrogan*. As etapas do processo de detecção são mostradas na Fig. 59.

Figura 59 – Etapas de imobilização da sonda FAM-ssDNA e detecção das sequências alvo (cDNA).



Fonte: Autoria própria (2021).

A primeira etapa a ser realizada no processo de detecção é a imobilização das sondas FAM-ssDNA na superfície da membrana modificada. Para isso, inicialmente a sonda foi preparada em meio tamponado (juntamente com o sal para diminuir/anular qualquer repulsão entre as NPsAu capeadas por citrato e o FAM-ssDNA) - Tris/MgCl₂, pH 7,4. Posteriormente, 1 mL dessa solução foi adicionado em um frasco de 5 mL, seguido da MCO-NPsAu (cortadas a 0,25 cm x 0,33 cm, com auxílio de um molde), e depois disso o sistema foi levado para interagir no orbital shaker, a 300 rpm. Em seguida, a membrana foi removida do frasco e o sobrenadante analisado em um fluorímetro FluoroLog-3 (Horiba, EUA). Devido à modificação das sondas de ssDNA com o fluoróforo (FAM), as amostras foram excitadas em $\lambda = 480$ nm. Após isso, o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA foi submetido a 2 lavagens consecutivas de 15 min cada, usando 1 mL do tampão Tris/MgCl₂). Por fim, o sistema foi colocado em contato com a solução de DNA alvo complementar (cDNA). Após isso, a membrana foi removida

da solução e a intensidade de fluorescência do sobrenadante medida no fluorímetro. Para comparação, o mesmo procedimento foi realizado tanto utilizando alvos não complementares (ncDNA) como sem a presença dos alvos, ou seja, na etapa de detecção, o sistema sendo colocado para interagir apenas com a solução tamponada. A seguir, serão mostrados detalhes dos experimentos realizados. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3.3.4.1 Experimentos iniciais

Inicialmente, o comportamento da membrana MCO-NPsAu foi examinado quando ela foi submetida ao processo de imobilização de fitas de DNA em sua forma simples (FAM-ssDNA) e dupla (FAM-dsDNA). Para isso, foi preparada uma solução tamponada de FAM-dsDNA, onde 75 nM de FAM-ssDNA foi colocado para interagir com uma mesma quantidade de cDNA (75 nM), durante 1 hora. Após isso, a solução foi levada para interagir com a MCO-NPsAu durante 2 horas, sendo em seguida feita a análise do sobrenadante no fluorímetro. Um teste adicional consistiu em analisar a influência da membrana original (ou seja, sem as nanopartículas de ouro) no processo de reconhecimento das sequências alvo (cDNA).

3.3.4.2 Cinética de Imobilização

A cinética de imobilização foi investigada para que o tempo máximo em que a sonda de FAM-ssDNA é adsorvida na MCO-NPsAu fosse determinado. Para isso, uma solução estoque foi inicialmente preparada contendo a sonda de FAM-ssDNA em meio tamponado (Tris/MgCl₂, pH 7,4) a uma concentração de 75 nM, seguido de uma leitura inicial no fluorímetro. Posteriormente, 1 mL dessa solução foi colocado em um frasco de 5 mL, sendo em seguida feita a imersão da membrana. Por fim, o frasco foi levado para a agitação, e periodicamente retirado para a medida da fluorescência da solução.

3.3.4.3 Cinética de Hibridização

Determinado o tempo de imobilização, o sobrenadante foi retirado, e em seguida 1 mL do tampão Tris/MgCl₂, pH 7,4 foi adicionado para a lavagem da membrana; O frasco foi então levado novamente para agitação durante 15 min, sendo depois descartada a solução, com a adição de mais 1 mL do tampão para uma segunda lavagem. Esse procedimento é necessário

para remover toda as sondas FAM-ssDNA não ligadas à membrana. Depois do processo de lavagem, o sistema-membrana/FAM-ssDNA foi retirado cuidadosamente e levado para um novo frasco, contendo 1 mL de 75 nM do cDNA alvo (75 nM), e colocado novamente em agitação, sendo periodicamente retirado para a medida de fluorescência do sobrenadante.

3.3.4.4 Limite de detecção

Uma vez determinados os tempos ótimos para os processos e imobilização e de hibridização, o próximo parâmetro a ser avaliado foi o limiar de detecção. Para isso, diferentes concentrações do cDNA alvo (na faixa de 2 a 200 nM) foram avaliadas, utilizando a metodologia relatada anteriormente. Após a construção da curva de calibração, a fórmula $3\sigma/S$ foi usada para calcular o limite de detecção (LIU; SU, 2017; PEDRO et al., 2019), onde σ é o desvio padrão do branco e S é a inclinação da curva de calibração. O branco significa a resposta de recuperação da fluorescência após a interação da MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com apenas o tampão Tris/MgCl₂ (pH 7,4).

3.3.4.5 Seletividade

A seletividade do sistema MCO-NpsAu/FAM-ssDNA foi também examinada, pela comparação da resposta da recuperação da fluorescência quando o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA é colocado para interagir com diferentes cadeias de ssDNA alvo, mantendo a concentração fixa: i) ssDNA perfeitamente complementar (cDNA), ii) com uma única (B_1) ou iii) duas bases nitrogenadas incompatíveis (B_2), e iv) ssDNA não complementar (ncDNA).

3.3.4.6 Avaliação do período de armazenamento

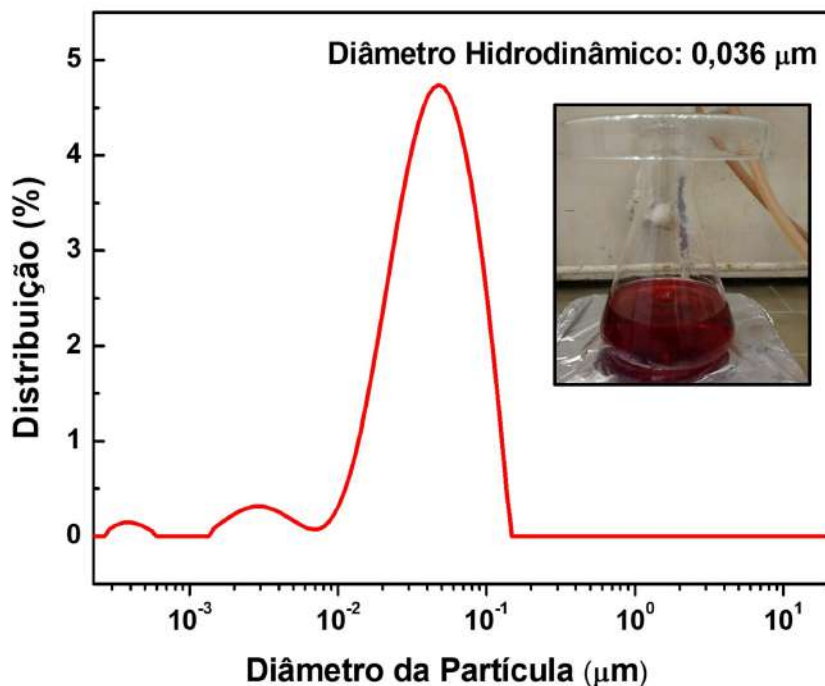
Testamos ainda a estabilidade da detecção do DNA alvo, com a bioplataforma funcionalizada com FAM-ssDNA sendo armazenada ao longo de 30 dias a baixa temperatura ($\approx 10^\circ\text{C}$). Todo o procedimento de imobilização de detecção foi realizado como descrito anteriormente.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Preparação das nanopartículas de ouro

A estabilidade das nanopartículas se deve à presença de íons citrato (agente redutor) adsorvidos em suas superfícies (BALASUBRAMANIAN et al., 2010; JR et al., 2012). Na Fig. 60, se encontra mostrada a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das NPsAu, cujo valor médio foi de $0,036 \mu\text{m}$ (36 nm) e, no detalhe, uma fotografia da solução coloidal obtida, de uma coloração vermelha escura. Produzidas as nanopartículas, o passo seguinte foi revestir com elas as membranas da casca do ovo.

Figura 60 – Distribuição do diâmetro hidrodinâmico e em detalhe a solução coloidal das NPsAu.



Fonte: Autoria própria (2021).

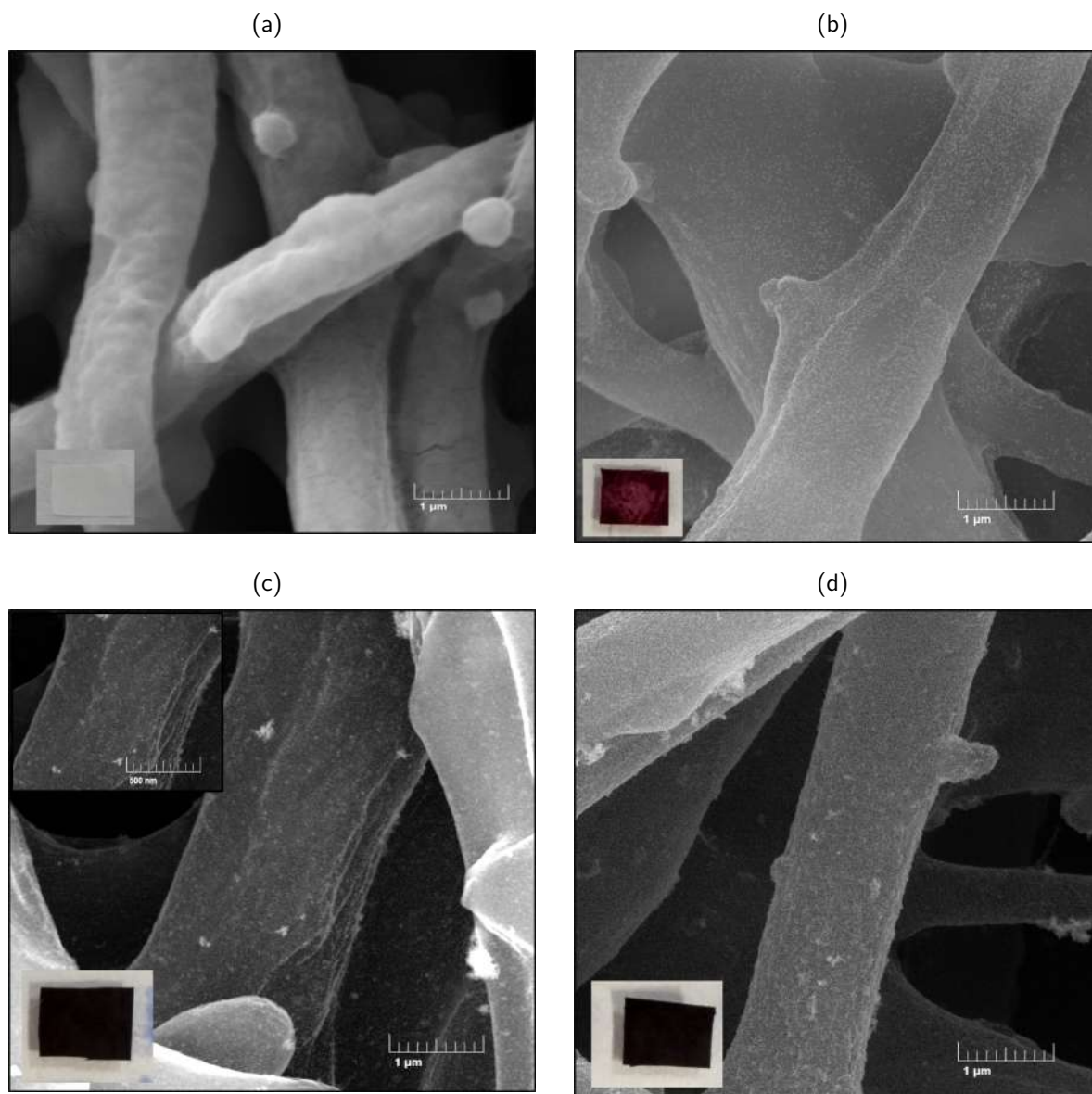
3.4.2 Caracterização das membranas

3.4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

De modo a examinar a morfologia das membranas de ovo antes e depois do revestimento com as nanopartículas de ouro, implementamos sua caracterização por microscopia eletrônica

de varredura. Na Fig. 61a é mostrada a micrografia da membrana da casca do ovo antes do revestimento: como pode ser visto, a membrana é composta por estruturas fibrilares orgânicas, sendo bastante porosa. Por sua vez, as fibras da membrana após o revestimento com as NPsAu são apresentadas nas Figs. 61b (10 mL), 61c (30 mL) e 61d (50 mL).

Figura 61 – Micrografias de MEV da MCO (50 kx) (a), e da MCO - NPsAu (50 kx) -10 mL (b), 30 mL (50 e 100 kx) (c), 50 mL (d). No detalhe, são apresentadas fotos das membranas.



Fonte: Autoria própria (2021).

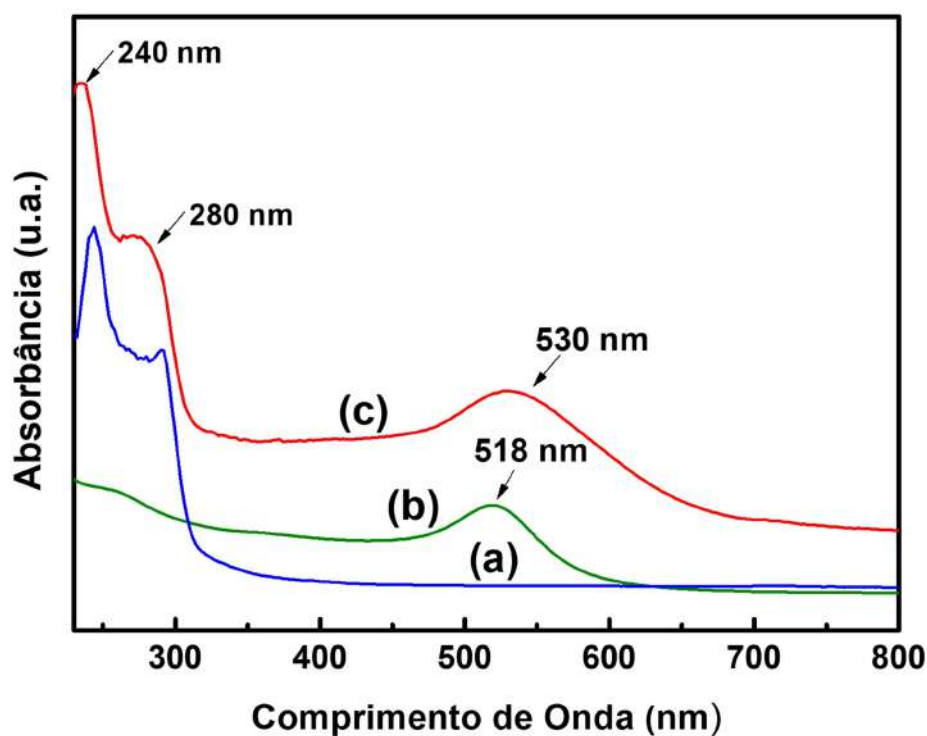
Conforme mostrado na Fig. 61b, o revestimento da membrana com 10 mL de solução coloidal de NPsAu (0,24 mg/mL) não foi suficiente para preencher toda a fibra com as nanopartículas de ouro, o que é confirmado na fotografia em detalhe. Por sua vez, as membranas mostradas nas Figs. 61c e 61d, revestidas respectivamente com 30 mL e 50 mL da solução

coloidal de NPsAu, apresentaram uma distribuição uniforme das nanopartículas na superfície das fibras. Dessa forma, os experimentos de biossensoriamento passaram a ser realizados com a membrana revestida com 30 mL de solução de NPsAu (ainda no detalhe da Fig. 61c é mostrada uma maior magnificação).

3.4.2.2 Espectroscopia no Ultravioleta - Visível (UV-Vis)

As nanopartículas de ouro exibem propriedades ópticas peculiares, como, por exemplo, o fenômeno da ressonância plasmônica de superfície localizada (LI et al., 2009; SAMSURI et al., 2017), o que nos permitiu usar a caracterização por espectroscopia na região do ultravioleta visível para confirmar que de fato as NPsAu tinham sido obtidas (Fig. 62).

Figura 62 – Espectros de UV-Vis da MCO (a), NPsAu (b) e MCO-NPsAu (c).



Fonte: Autoria própria (2021).

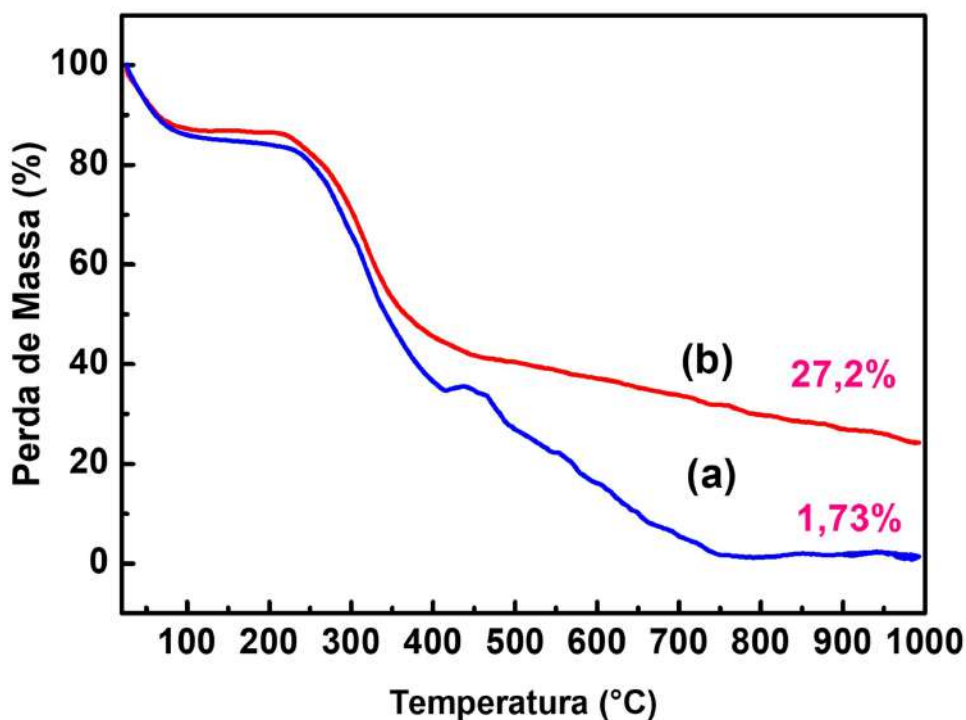
O espectro de absorção da MCO (curva a) apresenta dois picos em 240 nm e 280 nm, respectivamente associados às proteínas colágenos e aos grupos aromáticos de proteínas que compõem a membrana (HUANG; DU; FENG, 2016). Na curva b, é mostrado o espectro de absorção da solução coloidal das nanopartículas de ouro, onde pode ser observado a presença da banda de ressonância de plásmon de superfície do metal, em 518 nm. Por sua vez, além da presença do pico característico da MCO o revestimento da membrana com as NPsAu (curva

c) é comprovado tanto pelo deslocamento para a direita da banda de ressonância (que passa agora para 530 nm) quanto pelo aumento observado da intensidade de absorção.

3.4.2.3 Análises Termogravimétricas (TGA)

Os resultados da análise termogravimétrica para as amostras MCO e MCO - NPsAu podem ser vistos na Fig. 63. A perda de massa observada abaixo de 100 °C para as duas amostras (MCO (curva a) e MCO - NPsAu (curva b)) se deve à evaporação das moléculas de água absorvidas. Pode ser observado também uma grande perda de massa nas duas curvas entre 170° C e 350° C, atribuída à decomposição da MCO. Com o aumento da temperatura, enquanto houve a decomposição quase completa da MCO (sobrando uma pequena porcentagem de 1,73%), da MCO-NPsAu restou uma porcentagem maior (27,2%), um resultado que indica que nanopartículas de ouro ainda permaneceram ao final do processo (WANG et al., 2019).

Figura 63 – Análise termogravimétrica para a MCO (a) e MCO-NPsAu (b).



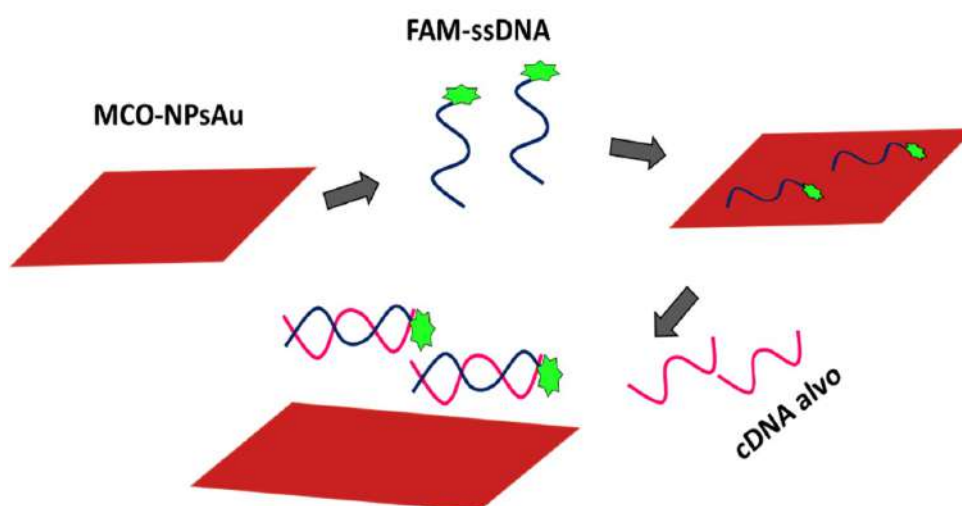
Fonte: Autoria própria (2021).

Na Seção B.1 do Apêndice B pode ser encontrada a análise para a determinação do ponto de carga zero da MCO-NPsAu.

3.4.3 Experimentos de biossensoriamento

Nanopartículas de ouro interagem com o ssDNA, seja por meio dos grupos tiol (Au-S), ou por via das nucleobases. No presente trabalho, o segundo método foi utilizado para imobilizar sequências de ssDNA do gene Lep32 do patógeno *Leptospira Interrogan* (marcadas com um fluoróforo) em nanopartículas de ouro capeadas por citrato depositadas na membrana proteica da casca de ovo e, posteriormente, reconhecer seu alvo complementar pela recuperação da fluorescência no sobrenadante. Na Fig. 64, é mostrado um esquema representando o mecanismo de detecção de fluorescência de ácidos nucleicos com o uso da bioplataforma MCO-NPsAu.

Figura 64 – Representação do mecanismo de detecção de fluorescência de ácidos nucleicos com o uso da bioplataforma MCO-NPsAu.



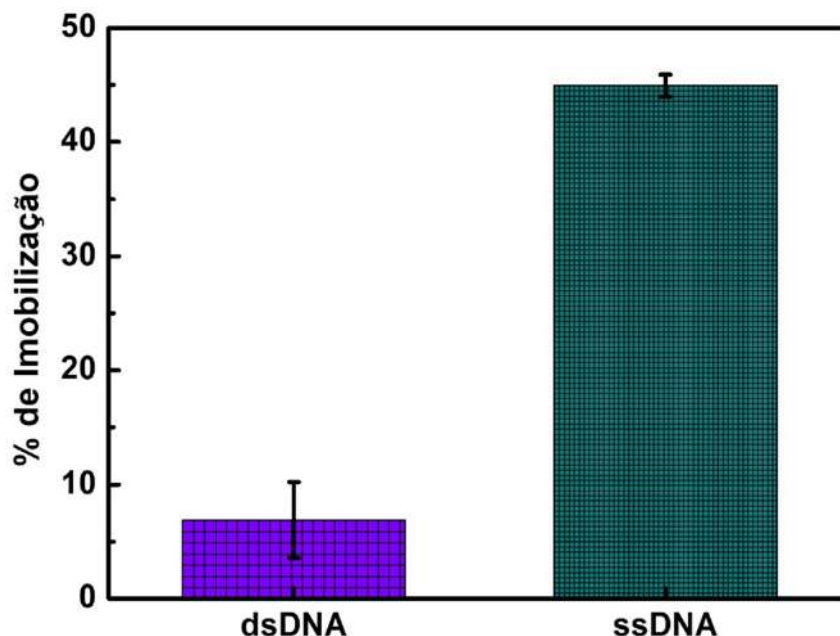
Fonte: Autoria própria (2021).

3.4.3.1 Teste inicial

As fitas de ssDNA e dsDNA interagem de forma distinta com as nanopartículas de ouro capeadas por citrato. Enquanto que, na presença de sal, as fitas de ssDNA têm a capacidade de se desenrolar o suficiente para expor suas bases e assim interagir com a superfície das nanopartículas de ouro, a dupla fita de DNA é caracterizada por sua pouca afinidade com NPsAu (carregadas negativamente), devido à sua geometria estável de dupla hélice que isola as nucleobases e expõe a cadeia principal de fosfato de carga negativa (ZHOU et al., 2020). Esse efeito é mostrado na Fig. 65, onde após a interação do dsDNA e ssDNA com a membrana de MCO-NPsAu foi obtida uma porcentagem de imobilização de 44,9% para ssDNA e de apenas

6,8% para o dsDNA.

Figura 65 – Eficiência de imobilização da fita de DNA em sua forma simples (ssDNA) e dupla (dsDNA) pela membrana MCO-NPsAu.

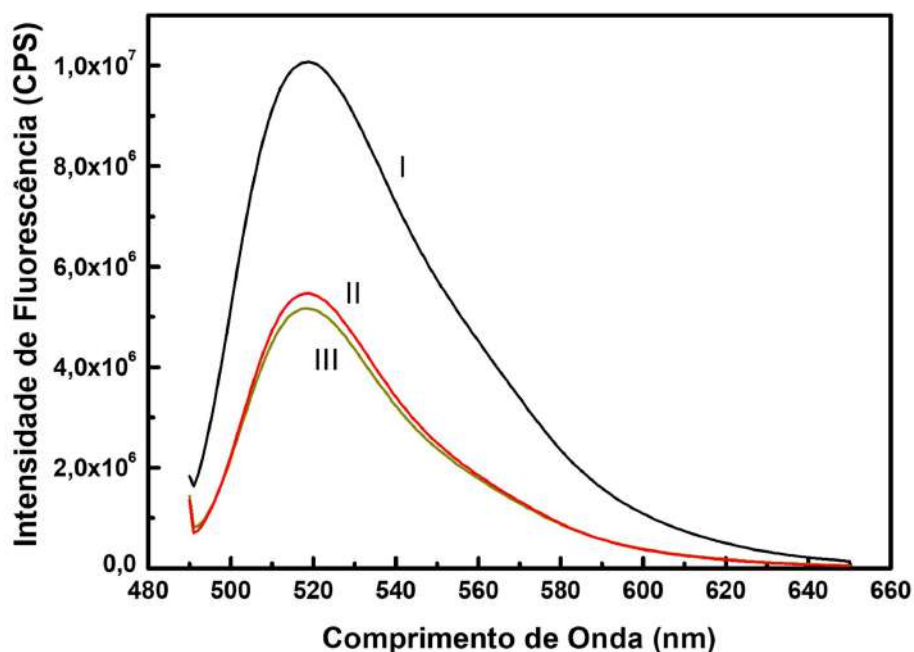


Fonte: Autoria própria (2021).

3.4.3.2 Influência da membrana da casca de ovo no processo de biossensoriamento

À medida que as fitas de ssDNA modificadas com o fluoróforo FAM são imobilizadas na superfície da membrana, a intensidade de fluorescência do meio deve ser diminuída, um fato que pode ser comprovado pela análise dos espectros de emissão do fluoróforo apresentados na Fig. 66. Na curva I pode ser vista uma intensa emissão da fluorescência da solução inicial das cadeias de FAM-ssDNA, enquanto por outro lado a diminuição na intensidade da fluorescência mostrada nas curvas II e III indica que tanto a MCO quanto a MCO-NPsAu foram capazes de adsorver as fitas de FAM-ssDNA, em cerca de 52,3% e 50,6%, respectivamente. A membrana proteica da casca do ovo é composta por uma grande quantidade de grupos funcionais orgânicos, como amina, hidroxila, carboxílica e carbonila, o que pode ter contribuído para adsorção da fita de FAM-ssDNA. Além disso, de acordo com a literatura (LAHMARA et al., 2020; ASGARI; DAYARI, 2018), mesmo em pH básico a membrana ainda continua positivamente carregada, permitindo assim os grupos fosfato negativamente carregados presentes na cadeia da FAM-ssDNA serem adsorvidos via interação eletrostática.

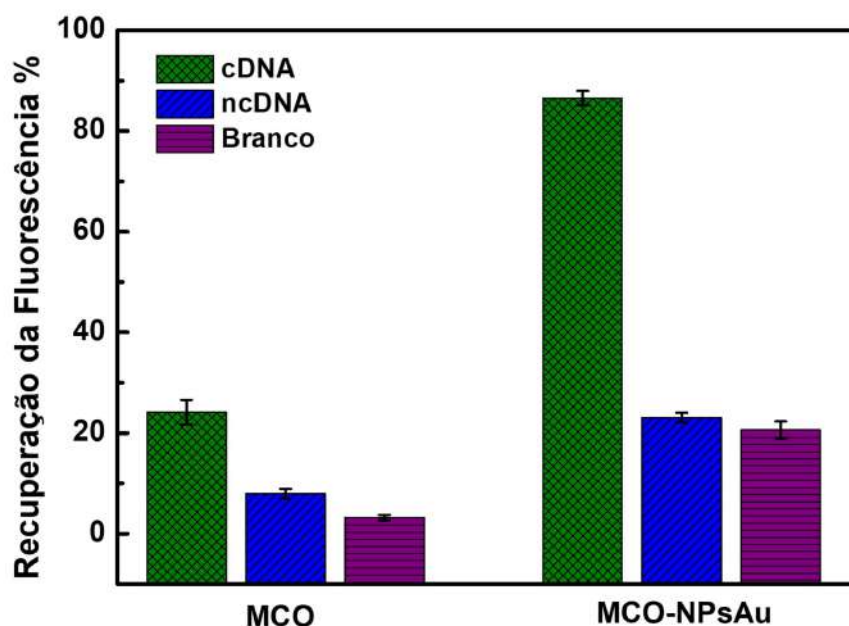
Figura 66 – Espectros de emissão de fluorescência solução de ssDNA-FAM (I), após interação a MCO (II) e após a interação com a MCO-NPsAu (III).



Fonte: Autoria própria (2021).

Após a lavagem, os sistemas MCO/FAM-ssDNA e MCO-NPsAu/FAM-ssDNA foram imersos separadamente em uma solução do DNA alvo (fita simples complementar (cDNA) ou não complementar (ncDNA)). Como observado na Fig. 67, ao usar a MCO-NPsAu foi obtida uma porcentagem maior de recuperação da fluorescência quando analisado o sobrenadante de cDNA alvo (86,6%), enquanto, por outro lado, a recuperação do FAM-ssDNA pela a MCO pura foi de apenas 24,1%. Após colocar os sistemas MCO/FAM-ssDNA e MCO-NPsAu/FAM-ssDNA para interagir com a sonda não complementar, a resposta da recuperação de fluorescência foi bem inferior, passando a ser cerca de 11,5% e 23,0%, respectivamente. Apesar de conseguir perceber a diferença entre complementar e não-complementar pelos dois sistemas, o material proposto (MCO-NPsAu) foi mais eficiente em relação a recuperação de fluorescência pelo cDNA. Dessa forma, os experimentos seguintes foram realizados com a MCO-NPsAu. Na Fig. 67, o branco significa a resposta de recuperação da fluorescência após a interação dos sistemas apenas com o tampão Tris-HCl/MgCl₂ (pH 7,4), que é um parâmetro essencial para o cálculo do limite de detecção do biossensor.

Figura 67 – Porcentagem de recuperação de fluorescência após a interação da MCO/FAM-ssDNA e MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com uma solução de DNA alvo cDNA, ncDNA e com o tampão Tris/MgCl₂, pH 7,4 (Branco).



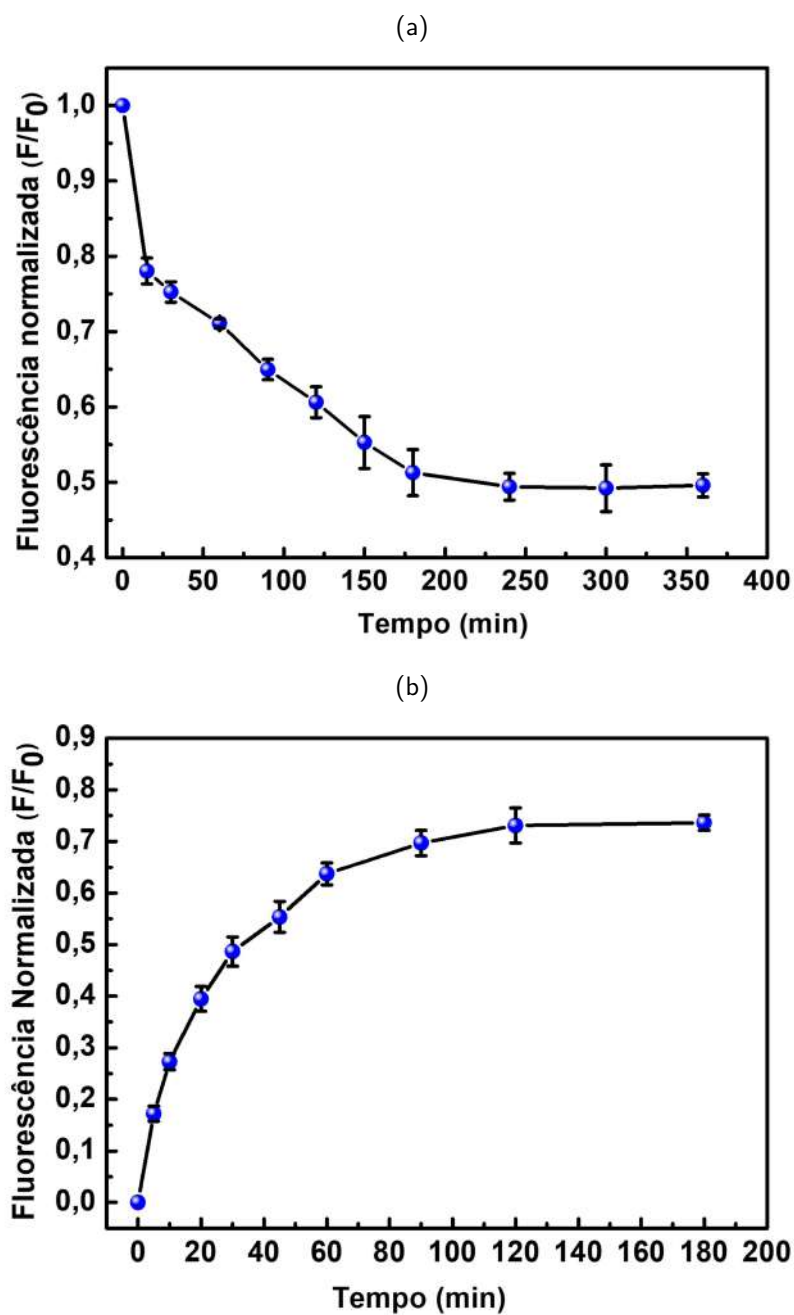
Fonte: Autoria própria (2021).

No Apêndice B, se encontram os resultados de alguns testes adicionais com a membrana MCO-NPsAu, como a avaliação de distintas soluções tampões na etapa do processo de hibridização (Seção B.2.1). Além disso, foi ainda verificado o comportamento das membranas preparadas com distintos volumes de NPsAu no processo de biossensoriamento (Seção B.2.2).

3.4.3.3 Cinética de Imobilização e Hibridização

Na Fig. 68a, é mostrado o resultado da avaliação da cinética de imobilização do FAM-ssDNA na bioplataforma MCO-NPsAu. Como pode ser visto, uma diminuição da intensidade de fluorescência do sobrenadante ocorre ao longo do tempo, até que em 240 min o sistema entra em equilíbrio e as sondas não são mais adsorvidas na membrana. Na Fig. 68b, é apresentada a cinética de recuperação da fluorescência, após o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA entrar em contato com as sondas complementares (cDNA), onde pode ser visto que nos primeiros 60 min ocorre uma rápida resposta da fluorescência, com o equilíbrio sendo alcançado em 120 min. Dessa forma, os tempos ótimos escolhidos para a próximos experimentos de imobilização e dessorção da sonda FAM-ssDNA pela MCO-NPsAu foram de 240 e 120 min.

Figura 68 – Cinética de imobilização da sonda FAM-ssDNA na MCO-NPsAu (a) e de recuperação da fluorescência do FAM-ssDNA (b) após interação dos sistemas MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com o cDNA.

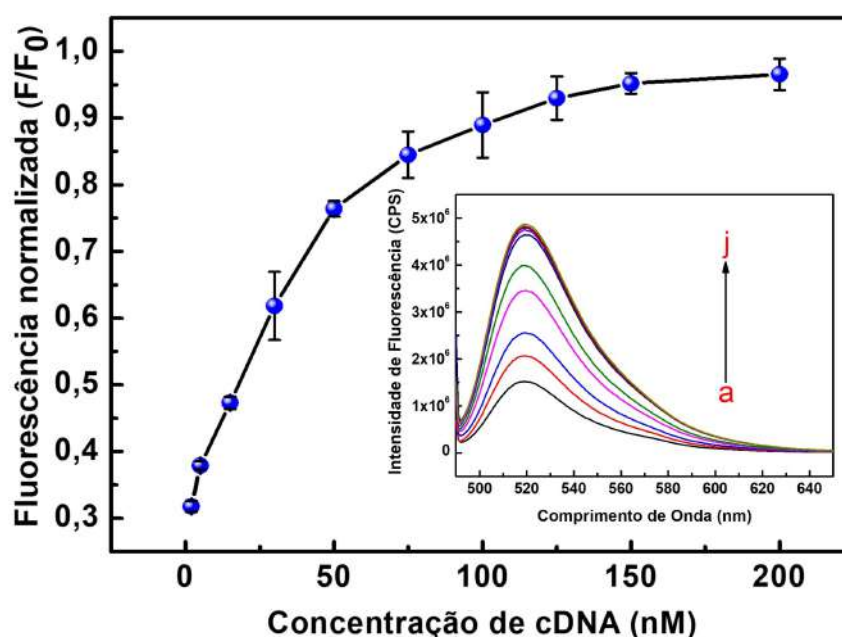


Fonte: Autoria própria (2021).

3.4.3.4 Determinação do limite de detecção

Uma vez definidos os tempos ótimos de imobilização (240 min) e hibridização (120 min), o próximo parâmetro a ser avaliado foi o limite de detecção. Para isso, examinamos a recuperação da fluorescência para concentrações de cDNA na faixa de 2 a 200 nM (Fig. 69). Como pode ser observado, um aumento no valor da concentração leva a uma maior dessorção da sonda no meio e, conseqüentemente, a um aumento na recuperação da fluorescência, devido ao aumento de cadeias dsDNA formadas no meio, com a saturação do processo sendo alcançada para uma concentração de cDNA de 125 nM. No detalhe da Fig. 69, é possível acompanhar esse resultado através dos espectros de emissão de fluorescência, quando o sistema é colocado em contato com diferentes concentrações de cDNA alvo.

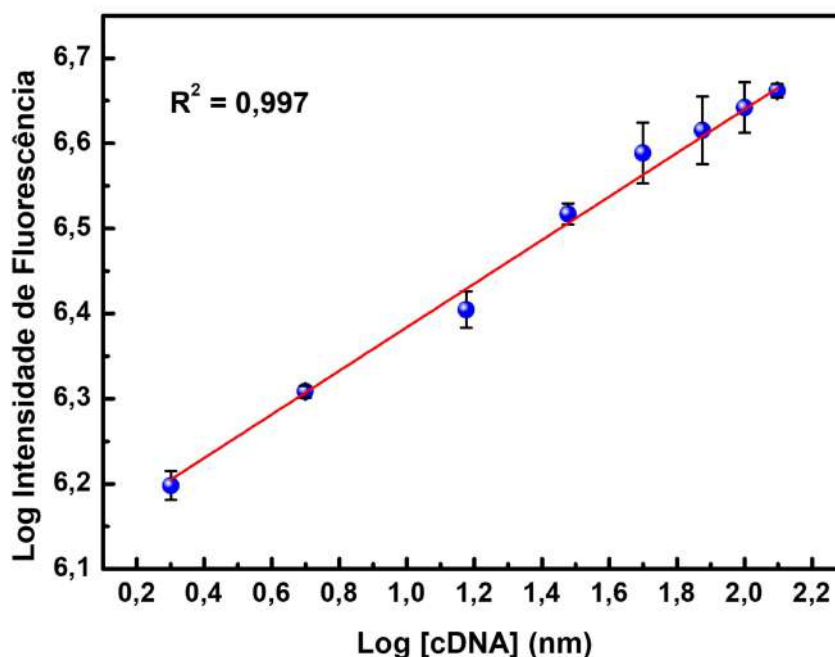
Figura 69 – Resposta da intensidade de fluorescência normalizada após a interação do cDNA na faixa de concentração de (2–200) nM. Em detalhe, o espectro de emissão de fluorescência (2–200) nM [a-j].



Fonte: Autoria própria (2021).

A partir desses dados, foi possível obter uma relação linear (Fig. 70) com coeficiente de determinação (R^2) em torno de 0,997. A relação entre a log da intensidade de fluorescência a 518 nm (F) e o log da concentração do DNA alvo (cDNA) no intervalo de 125 nM) era na forma $\log F = 6,12 + 0,255 \log \text{cDNA}$, de modo que, usando a relação $3\sigma/S$ (onde σ = desvio padrão da amostra branco, e S a inclinação da curva de calibração) (PEDRO et al., 2019), foi possível estimar o limite de detecção da membrana MCO-NPsAu em cerca de 0,24 nM.

Figura 70 – Resposta linear para diferentes concentrações de cDNA.

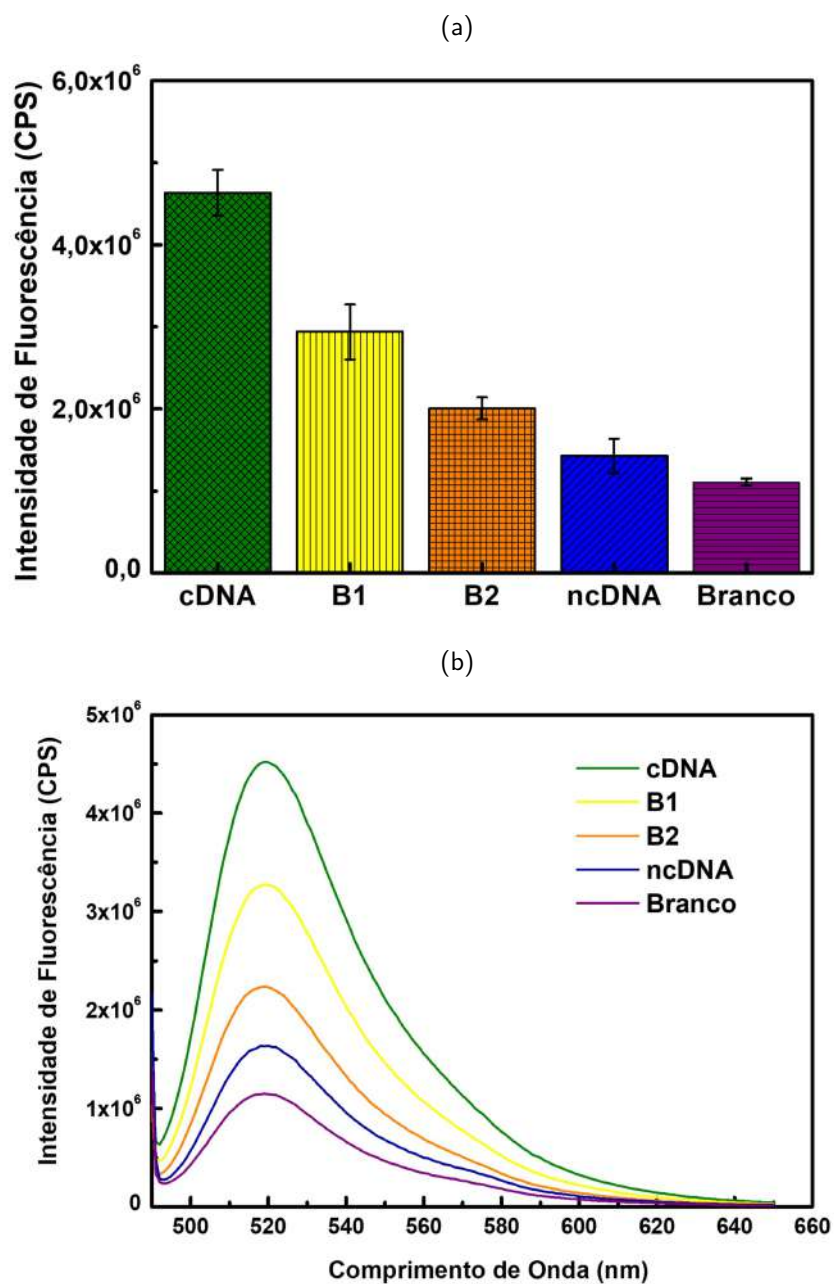


Fonte: Autoria própria (2021).

3.4.3.5 Seletividade

A seletividade de um sensor é um parâmetro de grande importância para seu uso bem-sucedido no processo de detecção de uma molécula alvo específica. Para investigar esse parâmetro, a resposta da recuperação da fluorescência foi comparada quando o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA foi colocado para interagir com uma mesma concentração de diferentes cadeias de ssDNA alvo: i) ssDNA perfeitamente complementar (cDNA), ii) com uma única (B_1) ou iii) duas bases nitrogenadas incompatíveis (B_2) e iv) ssDNA não complementar (ncDNA). Isso nos permitiu constatar que após entrar em contato com as sequências B_1 e B_2 , a resposta de recuperação da fluorescência foi de aproximadamente 52,8% e 32,6%, respectivamente, em relação ao observado para o caso da sequência de DNA perfeitamente complementar, para o qual obtivemos um valor de 86,6%. Nas Figs. 71a e 71b, é mostrada a resposta da fluorescência (intensidade máxima) e os espectros de emissão para as diferentes sequências alvo. Essa capacidade de distinguir entre sequências alvo complementares e incompatíveis confirma que o material proposto é de fato uma bioplataforma promissora para uso em protocolos de diagnóstico molecular.

Figura 71 – Seletividade do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA para a detecção de cDNA alvo complementar e com (B_1) uma base incompatível, (B_2) duas bases incompatíveis, (ncDNA) alvo não complementar e o branco (a). Espectro de emissão de fluorescência (b).

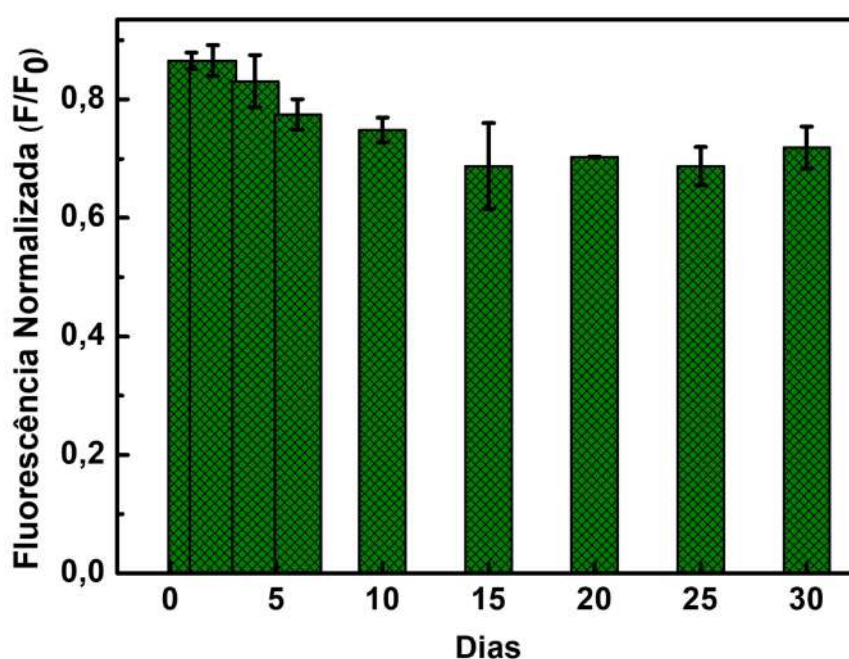


Fonte: Autoria própria (2021).

3.4.3.6 Estabilidade do sistema

Examinamos ainda a estabilidade da detecção do DNA alvo, ao testar a bioplaforma funcionalizada com FAM-ssDNA após ter sido ela armazenada por vários dias a baixa temperatura ($\approx 10^{\circ}\text{C}$). O resultado apresentado na Fig. 72 mostra que a resposta de fluorescência se mostrou estável durante os primeiros dias, sofrendo uma pequena diminuição a partir do 5º dia, e permanecendo sem grandes variações após um período de 30 dias de armazenamento.

Figura 72 – Recuperação da fluorescência em função dos dias de análise do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA armazenado quando interage com o cDNA.



Fonte: Autoria própria (2021).

3.4.3.7 Comparação com outros materiais encontrados na literatura

Na Tabela 10, é mostrada uma comparação entre a performance da membrana modificada e a de alguns materiais relatados na literatura para a detecção fluorescente de ácidos nucleicos. Em nosso trabalho, a membrana da casca do ovo de galinha revestida com nanopartículas de ouro foi usada para a detecção de sequências do patógeno *Leptospira Interrogan*, quando um limiar de 0,24 nM foi obtido para um tempo de detecção de 120 min. Dessa forma, o sistema de detecção proposto é promissor, como comprovado pela comparação desses resultados com aqueles obtidos quando do uso de outros dispositivos relatados na literatura para a detecção

de ácidos nucleicos, o que indica que a membrana da casca do ovo de galinha pode ser usada como um eficiente biossensor fluorescente no campo de diagnóstico.

Tabela 10 – Comparação entre o uso da MCO-NPsAu e outros sistemas para detecção fluorescente de ácidos nucleicos.

Material	Alvo	Limite de detecção (nM)	Tempo (min)	Ref.
F^a. PET PAni/PPi	DNA	1,3/1,1	60/60	(PEDRO et al., 2019)
F. PET PAni-PPi/PPi-PAni	DNA	0,278 /0,345	60/60	(NASCIMENTO et al., 2021)
MOF^b	DNA/RNA	1,1/0,8	-	(YANG et al., 2015)
NPs $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$	DNA-miRNA ^c	1,1/0,8	10	(SONG; WANG; KONG, 2015)
Nanocéria	DNA	0,12	-	(BÜLBÜL et al., 2018)
cCQD^d quantum dots	DNA	17,4	20	(LOO et al., 2016)
Óxido de Grafeno	DNA	10	30	(LU et al., 2009)
Nanofolha MoS₂	DNA	0,5	10	zhu2013single
MCO-NPsAu	DNA	0,24	120	Presente Trabalho

Fonte: Autoria Própria (2021).

^a Filmes

^b Estrutura metal-orgânica

^c micro RNA

^d Carboxylic carbon quantum dots

3.5 CONCLUSÃO

No presente trabalho descrevemos a preparação e caracterização de membranas da casca do ovo de galinha modificadas pela deposição de nanopartículas de ouro (NPsAu), e seu uso como uma bioplataforma sustentável para a imobilização e subsequente detecção de sequências de DNA da *Leptospira Interrogan*, adotado como sistema modelo. A membrana foi inicialmente removida da casca do ovo através de um tratamento ácido, o que foi seguido pela incorporação das nanopartículas de ouro por banho ultrassônico. Para confirmar a presença das NPsAu nas fibras da membrana, as técnicas como MEV, UV-Vis e TGA foram usadas. O princípio de detecção se baseou na imobilização direta das cadeias de fita simples de DNA marcadas com um fluoróforo (FAM-ssDNA) através de interações entre as nucleobases do ssDNA e as nanopartículas de ouro, de forma esférica. A hibridização ocorreu após o sistema (MCO-NPsAu/FAM-ssDNA) entrar em contato a sequência de DNA alvo complementar (cDNA), quando a interação é então enfraquecida e ocorre a dessorção do dsDNA (cadeias de fita dupla de DNA), o que leva ao aparecimento de um forte sinal de fluorescência. Experimentos realizados examinando o efeito do tempo de imobilização FAM-ssDNA e a consequente hibridização com o cDNA, mostraram que em cada caso o equilíbrio no sistema foi obtido após 240 min e 120 min, respectivamente. Após testes em que foram usados diferentes valores da concentração do cDNA, foi possível estabelecer que a membrana oferece um bom limite de detecção (0,24 nM), valor que é similar a aqueles reportados na literatura para outras plataformas de biossensoriamento. Foi possível ainda verificar que o sistema apresenta uma boa estabilidade e adequada seletividade, com a bioplataforma sendo capaz de diferenciar a molécula alvo complementar daquelas com uma ou duas bases erradas. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a plataforma sólida de biossensoriamento fluorescente aparece como um material promissor para uso na área de diagnóstico molecular, em dispositivos eficientes, de fácil manuseio, e de grande portabilidade.

4 USO DE UM COMPÓSITO MAGNÉTICO DE CARBOXIMETILCELULOSE PARA REMOÇÃO DE CORANTE AZUL DE TOLUIDINA DE MEIOS AQUOSOS

4.1 INTRODUÇÃO

O continuado desenvolvimento industrial tem contribuído para a escalada do problema da poluição de mananciais aquosos, o que inclui o aumento descontrolado na contaminação dos recursos hídricos por poluentes orgânicos perigosos (AHMED; THAKUR; GOYAL, 2021; TEH; MOHAMED, 2011; GUPTA, 2004). Não só a maioria desses compostos apresenta níveis consideráveis de toxicidade, como também alguns deles são carcinogênicos ou inibidores da atividade fotossintética em meios aquosos, características extremamente prejudiciais à biosfera (ISMAIL et al., 2019a; SHINDHAL et al., 2021). A indústria têxtil é considerada a maior geradora de efluentes não tratados (ARDILA-LEAL et al., 2021), a maioria deles associados a resíduos resultantes das etapas de tingimento e lavagem (LELLIS et al., 2019). A indústria de papel e celulose, curtumes e tintas e a fabricação de pigmentos estão entre as outras grandes atividades que contribuem para esse tipo de contaminação (KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018). Dessa forma, a remediação efetiva de corpos d'água poluídos continua sendo uma demanda crucial para a proteção do meio ambiente e dos ecossistemas biológicos associados (SAMSAMI et al., 2020; YASEEN; SCHOLZ, 2019).

Os diversos métodos de tratamento de água contaminada discutidos na literatura podem ser divididos em três categorias principais: físicos (como adsorção, filtração por membranas etc.), químicos (coagulação, oxidação fotocatalítica etc.) e biológicos (remediação microbiana) (KUMAR et al., 2012; PIASKOWSKI; ŚWIDERSKA-DĄBROWSKA; ZARZYCKI, 2018; RÁPÓ; TONK, 2021; MORSY et al., 2020; BHATIA et al., 2017). Em particular, os procedimentos baseados em adsorção têm atraído muita atenção devido à sua simplicidade, versatilidade e eficiência na remoção de contaminantes de efluentes, bem como a possibilidade de permitir a reutilização dos agentes adsorventes (AMENAGHAWON et al., 2022). Continua a existir a necessidade de buscar novos materiais adsorventes que, embora baratos e simples de preparar e manusear, tenham uma boa eficiência na remoção de poluentes.

Materiais magnéticos à base de carboximetilcelulose foram previamente explorados para a remoção de corantes catiônicos. Por exemplo, quando aplicadas à captura de azul de metileno (MB), nanopartículas magnéticas revestidas com carboximetilcelulose preparadas pelo

método de oxidação-precipitação em diferentes temperaturas exibiram uma capacidade máxima de adsorção de 13,5 mg/g (ANUSHREE; PHILIP, 2019). As nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ funcionalizadas com aminopropiltriethoxissilano e revestidas com CMC apresentaram capacidade de adsorção de MB de 22,7 mg/g (ZIRAK et al., 2018).

O azul de toluidina, outro corante catiônico que pertence ao grupo das fenotiazinas, é comumente utilizado no campo da biologia molecular, como marcador de tecidos ricos em ácidos nucleicos, e nas indústrias têxtil e médica, como mediador de diversas reações (WU et al., 2021). A remoção deste corante tem sido relatada para o uso de materiais encontrados na natureza, como resíduos de casca de laranja (LAFI; REZMA; HAFIANE, 2015), folhas de chá preto (ALI, 2017), sementes de caqui (BRETANHA et al., 2016), além de alguns materiais inorgânicos, como gesso (RAUF et al., 2009) e o pó de grafeno compósitos óxido/bentonita (XU et al., 2019), entre outros. Apesar disso, o uso de compósitos magnéticos não tem sido amplamente explorado (JOSHI et al., 2018; MALAYERI; SOHRABI; GHOURCHIAN, 2012), o que abre a possibilidade de um maior aprimoramento dos métodos de uso desse tipo de material para a remediação de efluentes descartados pelas indústrias e laboratórios de biologia molecular, uma vez que o processo de remoção pode ser implementado de maneira mais simples e evitando etapas trabalhosas como centrifugação.

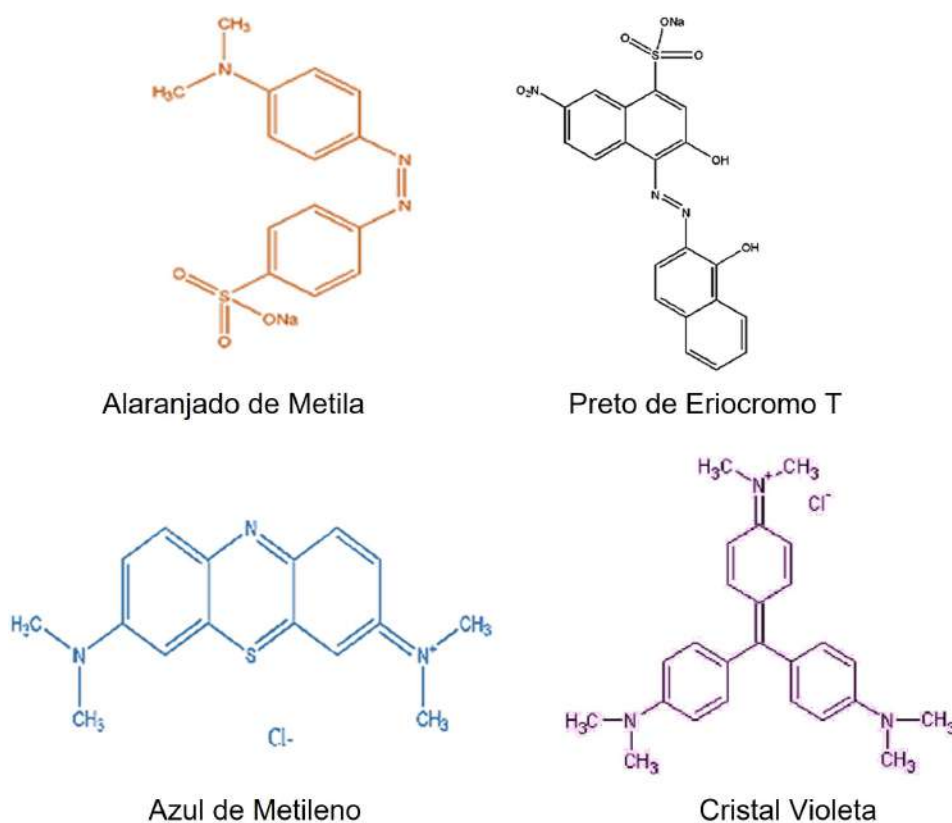
No presente capítulo, iremos apresentar a discussão da preparação simples de um compósito magnético de carboximetilcelulose (CM-CMC), que após devidamente caracterizado foi aplicado para a remoção do corante catiônico azul de toluidina (AT) de meios aquosos. Ao melhor de nosso conhecimento, compostos magnéticos ativos não foram adequadamente explorados para a remoção do corante AT. Dessa forma, neste trabalho examinamos os efeitos da variação do pH, da concentração inicial do corante AT e da temperatura, além das características gerais do processo de adsorção, e da análise das condições de dessorção do material capturado para permitir a reciclagem sucessiva do material composto. Também, foi comparado o desempenho do CM-CMC com o de outros adsorventes discutidos na literatura para a adsorção do corante azul de toluidina.

4.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.2.1 Corantes

Um corante pode ser definido como uma substância química capaz de conferir cor a um substrato ao qual é aplicado, por meio de uma ligação físico-química. Esses compostos podem ser obtidos a partir de uma fonte natural ou sintética. As fontes naturais, como plantas (por exemplo, folhas), animais (por exemplo, insetos secos) e minerais (como pedras) (AFFAT, 2021). Por outro lado, os corantes sintéticos são produzidos como diferentes moléculas orgânicas, e podem ser divididos em grupos de corantes iônicos (ácidos) e catiônicos (básicos). Na Fig. 73, é mostrada a estrutura química de alguns corantes sintéticos. Em sua grande maioria, os corantes sintéticos são as fontes mais importantes de poluentes industriais liberados por diferentes indústrias, como têxtil, cosmética, alimentícia, farmacêutica, de tintas, e de celulose e papel (DUTTA et al., 2021).

Figura 73 – Estruturas químicas de alguns corantes sintéticos.

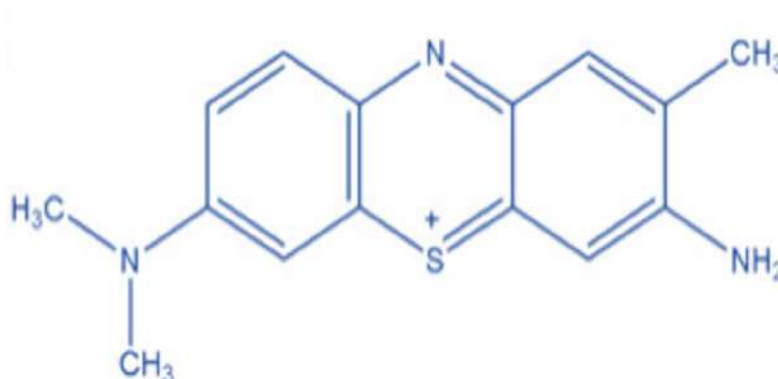


Fonte: Adaptado da Referência: (ATTALLAH et al., 2016).

4.2.1.1 Azul de Toluidina

O azul de toluidina é um corante catiônico do tipo fenotiazina (cuja estrutura química está mostrada na Fig. 74), descoberto em 1856 por William Henry Perkin (SRIDHARAN; SHANKAR, 2012). Ele é atualmente utilizado de maneira ampla para diferentes fins em campos diversos, como na ciência médica e na indústria. Na área médica, por conta de sua grande afinidade por ácidos nucleicos ele é muito usado para a marcação de tecidos ricos em DNA e RNA (ALPAT et al., 2008; MALAYERI; SOHRABI; GHOURCHIAN, 2012).

Figura 74 – Estrutura química do corante azul de toluidina.



Fonte: Adaptado da Referência: (GONZALES et al., 2010).

4.2.2 Métodos de remoção de corantes

Ao longo dos anos, o uso extensivo de corantes, principalmente nas indústrias têxteis, tem causado um grande problema de poluição no meio ambiente. Por exemplo, após o uso dos corantes para tingimento de tecidos, coloração de alimentos, os efluentes de corantes são armazenados como resíduos industriais, sendo então em seguida esses resíduos purgados para os corpos d'água ambientais, que se transformam em reservatórios de água contaminada (KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018). A maioria dos corantes sintéticos usados nas indústrias são cancerígenos, podendo causar danos ao rim, sistema reprodutivo, fígado, cérebro e sistema nervoso central em seres humanos (BREBBIA; TIEZZI; CONTI, 2006; XIA et al., 2018). Portanto, devido tanto às preocupações ambientais quanto as de saúde associadas aos efluentes de águas residuais, atualmente diferentes técnicas de remoção de corantes têm sido utilizadas, como métodos físicos, químicos e biológicos (KANDISA et al., 2016). Na Tabela 11, são mostrados

exemplos desses métodos, além de suas descrições, vantagens e desvantagens (KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018).

Tabela 11 – Exemplos de métodos de remoção de corantes.

Métodos	Descrição	Vantagem	Desvantagem
Método Biológico Ex: Usando algas	As algas consomem partículas de corante para auto crescimento	Barato; facilmente avaliável	Sistema instável
Método Físico Ex: Adsorção	Adsorventes formados a partir de materiais	Excelente método de remoção para uma ampla variedade de corantes	Os adsorventes podem ser caros
Método Químico Ex: Oxidação	Agentes oxidantes usados para tratar efluentes de corantes	Podem degradar completamente os corantes; Tempo de reação curto	Requer catalisador para remoção eficiente

Fonte: Adaptado da Referência: (KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018).

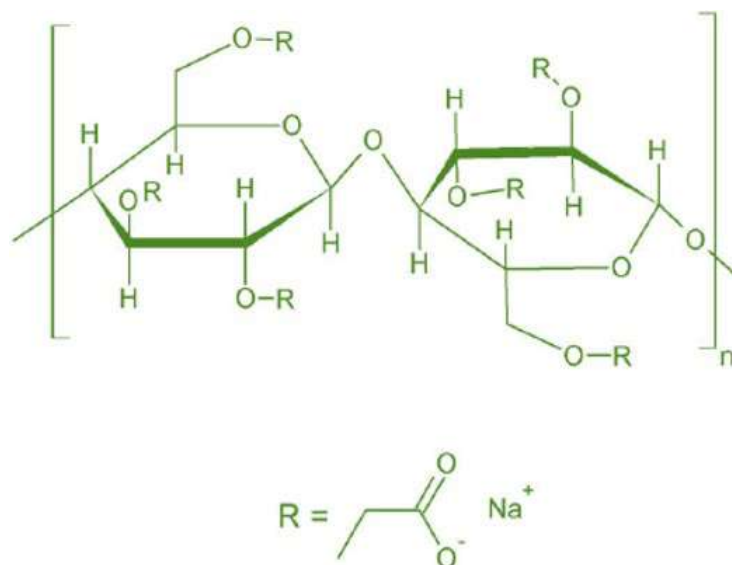
Dentre esses métodos, os físicos são atualmente os mais utilizados para a remoção de corantes, devido a vantagens como facilidade de uso e baixo custo, tornando os processos mais eficientes e com a possibilidade de reutilização do material adsorvente (SOLTANI; FARAMARZI; PARSA, 2021). Na literatura, pode ser encontrada a descrição de uma ampla variedade de adsorventes, desde naturais, como cascas de frutas (LIMA et al., 2008), a materiais sintéticos, como membranas poliméricas funcionalizadas (ROCHA et al., 2021). Nesse contexto, o uso de materiais compósitos magnéticos oferece uma conveniência especial, pois esses materiais podem ser facilmente combinados com agentes adsorventes ativos de modo a permitir o uso de um ímã para facilitar a separação do poluente do meio (CHÁVEZ-GUAJARDO et al., 2015; REIS et al., 2021; SUO et al., 2020; VASILIEV; MOROZOV, 2013). Esses materiais têm recebido atenção nos últimos anos, devido as suas vantagens consideráveis em comparação com os métodos tradicionais realizados para recuperação de adsorventes, como a filtração por membrana ou centrifugação. Isto permite o desenvolvimento de métodos muito mais rápidos em termos de recuperação, além de serem mais fáceis de implementar (MOOSAVI et al., 2020).

4.2.3 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo aniônico derivado de celulose que possui grupos funcionais carboxilato e hidroxila em sua estrutura (Fig. 75). A CMC não apresenta

toxicidade, além de ser de baixo custo, biocompatível e biodegradável (LEONEL et al., 2019; SINGH et al., 2021), características que a fazem ser amplamente utilizada em várias áreas, como nas indústrias de papel, têxtil, farmacêutica, cosmética e alimentícia, além de ser extensivamente investigada para várias aplicações biomédicas, como a entrega de drogas e curativos (ZENNIFER et al., 2021; ZHAO et al., 2018).

Figura 75 – Estrutura química do sódio carboximetilcelulose.



Fonte: Adaptado da Referência: (CHYTIL; LIŠKOVÁ; JANEČEK, 2014).

Além disso, a CMC vem sendo utilizado em processos de tratamento de água, devido à adsorção favorecida de compostos catiônicos que se faz por meio do estabelecimento de interações eletrostáticas com os íons carboxilato carregados negativamente (LIU; OMER; OUYANG, 2018; WANG; WANG, 2013). Na literatura encontramos aplicações em diversas áreas, como a remoção de íons metálicos (FAN et al., 2019), lantanídeos/actinídeos trivalentes (CAI et al., 2017) e a adsorção de substâncias antimicrobianas (VLAD et al., 2014).

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Materiais

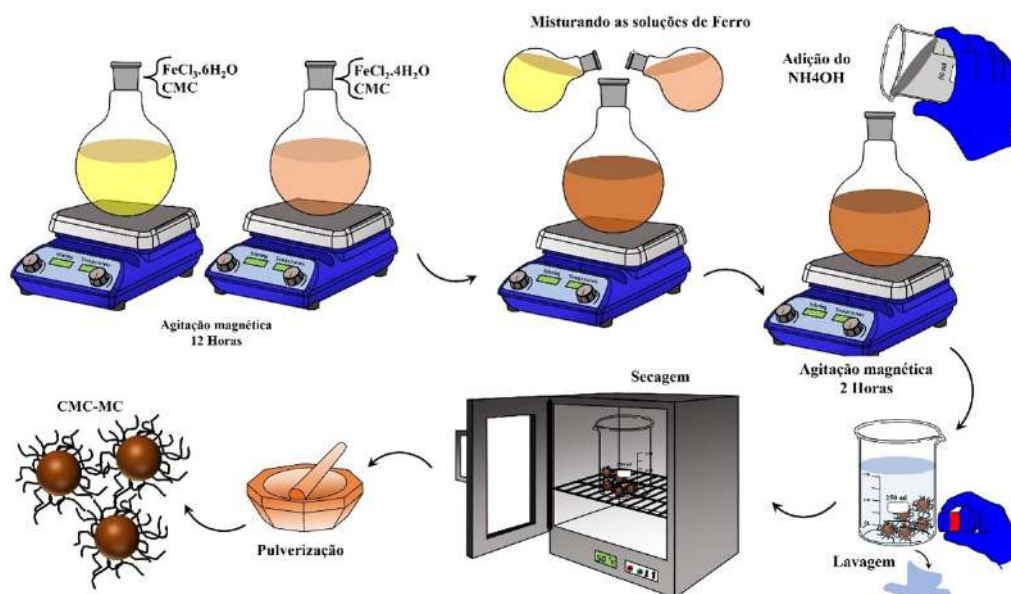
O cloreto de ferro tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e o corante Remazol Black (RBB) (Color Index – Reactive Black 5, RB5) foram obtidos da Sigma Aldrich (EUA). Cloreto de ferro (III) hexa hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de amônio (NH_4OH), tartrazina e sal carboximetilcelulose sódica (CMC) (Visc.1000/2000 CP) foram fornecidos pela Dinâmica (Brasil). Os corantes: azul de toluidina e safranina foram obtidos da Nuclear (Brasil) e Neon (Brasil), respectivamente. Ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Química Moderna (Brasil). Todos os reagentes foram utilizados sem purificação adicional e a água necessária para os experimentos foi obtida após passagem por um sistema de purificação (Millipore, EUA).

4.3.2 Preparação do compósito magnético de carboximetilcelulose

O compósito magnético de carboximetilcelulose foi preparado de acordo com o protocolo relatado por Suo et al. (SUO et al., 2020), com modificações nas concentrações dos componentes e tempo de preparo. Resumidamente, 25 mL de água deionizada e 0,6 g de CMC foram adicionados separadamente em dois frascos de fundo de 50 mL. Em seguida, foi colocado 1 M de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ no primeiro frasco e 2 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ no segundo, sendo depois disso ambas as soluções submetidas a uma agitação de 12 h à 25 °C. Após esse tempo, as duas soluções foram vigorosamente misturadas por 15 min em um frasco de 250 mL, quando lentamente foi adicionado 125 mL de NH_4OH (50%). Após agitação da mistura por 2 h, colocou-se a solução escura resultante em dois béqueres de 250 mL e com o auxílio de uma placa magnética confinou o material sólido ao fundo. Em seguida, o material foi lavado com água deionizada e novamente confinado para o descarte do líquido, um processo repetido até atingir o pH 7. Em seguida, ambos os béqueres foram colocados em estufa a 60°C até a completa secagem do compósito.

O material foi então macerado e o pó fino obtido finalmente armazenado para uso posterior. Para efeito de comparação, preparamos nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sem a presença de carboximetilcelulose. Na Fig. 76, pode ser vista as etapas sucessivas seguidas na preparação do compósito.

Figura 76 – Etapas da preparação de preparação do composto magnético de carboximetilcelulose.



Fonte: Desenhado por schematicarts.com (2021).

4.3.3 Métodos de caracterização

Imagens do compósito foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura por transmissão (STEM) MIRA3 (TESCAN, República Tcheca) do Programa de Pós Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco. Para isso, 1 mg do compósito foi disperso em 2 mL de etanol e em seguida 10 μL foi depositado em um grid. Após a evaporação do álcool, o porta amostra foi colocado em um dessecador para posterior obtenção das imagens.

O tamanho médio hidrodinâmico e o potencial zeta do CM-CMC foram determinados utilizando o equipamento Nanobrook Omni Particle Analyzer (Brookhaven Instruments), localizado no Departamento de Química Fundamental da UFPE (Laboratório de Compostos Híbridos, Interfaces e Coloides). O diâmetro hidrodinâmico do compósito, foi obtido através de medidas por espalhamento de luz dinâmico em triplicata. Para isso, 50 μL do material compósito (retirado logo após a finalização da síntese) foi disperso em 2 mL de água deionizada. O potencial zeta foi determinado a uma faixa de pH entre 2,0 - 10,0.

Os espectros de absorção na região do UV-Vis e FTIR das nanopartículas de óxido de ferro, da CMC e do CM-CMC foram obtidos utilizando um espectrofotômetro CHEM200-UV-Vis (Ocean Optics, EUA) e um espectrofotômetro infravermelho IR Tracer-100 (Shimadzu, Japão), respectivamente. As amostras (NPsM e CM-CMC) foram preparadas usando 50 μL do material retirado após a síntese e disperso em 2 mL de água. Para a análise de FTIR, as

amostras foram previamente preparadas na forma de pastilhas KBr.

A análise termogravimétrica do CM-CMC foi feita no analisador térmico da Mettler Toledo, sob atmosfera de Nitrogênio (100 mL/min) com uma taxa de aquecimento de 10°C/min na faixa de temperatura de 35°C até 1000°C. As medidas foram obtidas no Laboratório de processo químico do Instituto de Pesquisa em Petróleo e Energia, localizado na UFPE.

4.3.4 Experimentos de remoção do corante azul de toluidina

Inicialmente, foi realizado um teste de prova de conceito comparando o desempenho de nanopartículas magnéticas puras (NPsM) e do compósito magnético de carboximetilcelulose (CM-CMC) na remoção do corante AT.

4.3.4.1 Efeito do pH

Em seguida, o pH da solução do corante azul de toluidina foi avaliado para estabelecer as melhores condições para a remoção. Ao fazer isso, o pH foi ajustado na faixa de 2,0-9,5 (em meios mais básicos, o corante começou a precipitar) adicionando pequenas quantidades de HCl e NaOH (0,1 M). Todos os experimentos foram realizados em um Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL da solução corante e 2 mg do compósito, que foram deixados interagir sob 300 rpm por 24 h à 25 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Ao final, uma alíquota da solução foi coletada e a absorbância $\lambda = 626$ nm foi medida para avaliar a quantidade de corante removido.

A eficiência da adsorção de AT foi expressa pela Eq. 2.12, mostrada na subseção 2.3.5.1 do Capítulo 2, neste caso, C_0 (mg/L) e C_f (mg/L) são as concentrações inicial e final (após a interação com o compósito CM-CMC) do corante.

4.3.4.2 Efeito do tempo de interação e concentração inicial de corante AT

O efeito do tempo de interação de AT foi avaliado para verificar como afetaria o desempenho do CM-CMC como agente adsorvente, medindo a absorção de 626 nm em alíquotas tomadas em diferentes instantes no (5 – 240) min. Uma vez determinado o tempo necessário para o equilíbrio, o próximo experimento realizado consistiu em avaliar o efeito da concentração inicial de AT na faixa (5-60) mg/L.

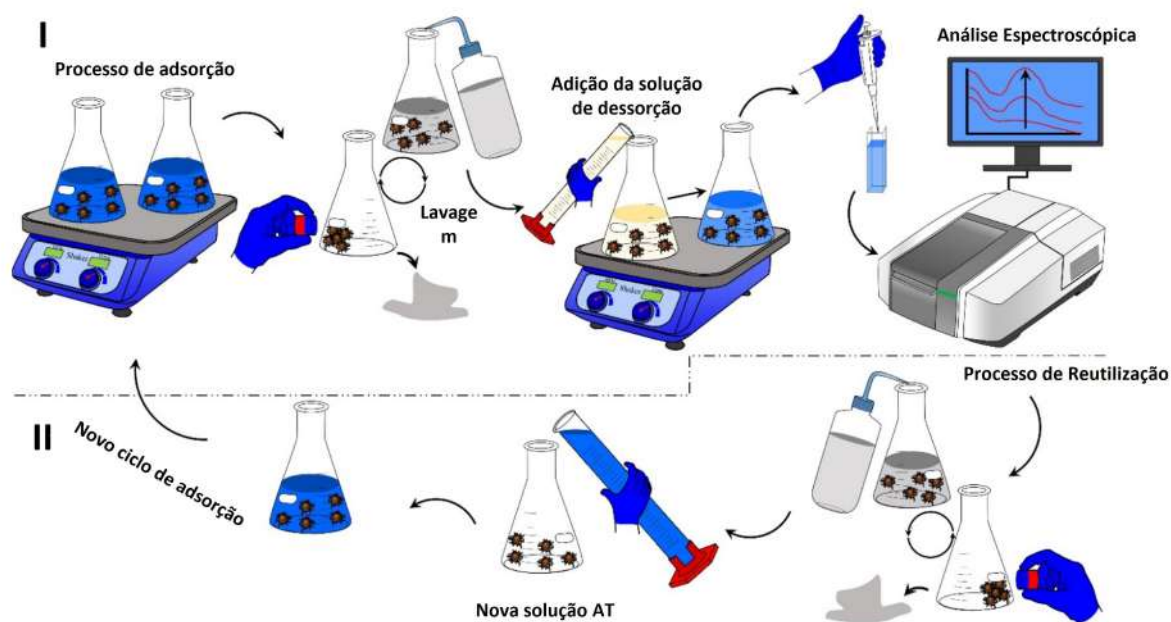
A capacidade de adsorção no tempo t (q_t), isto é, a quantidade em (mg) de AT adsorvido por unidade de massa (g) do compósito foi calculada através da Eq. 2.13. Sendo neste caso, V o volume total da solução (L), C_0 é a concentração inicial de corante AT (mg/L) na solução, C_t é a concentração de corante AT correspondente (mg/L) na solução naquele instante em que corresponde a massa de compósito utilizada. Depois que o processo atinge o equilíbrio, a capacidade de adsorção do corante, corresponde à quantidade total (em mg) de corante adsorvido por unidade de massa (g)- q_e . Em seguida, os modelos isotérmicos de Langmuir, Freundlich e Temkin foram ajustados aos dados experimentais correspondentes, além dos modelos cinéticos de Pseudo-primeira- ordem e Pseudo-segunda-ordem, Morris-Weber e Boyd. O efeito da variação da temperatura na faixa (293 K - 333 K), também foi avaliado e assim foi possível estimar os parâmetros termodinâmicos relevantes do processo de adsorção, como a mudança na energia livre de Gibbs correspondente, entalpia e entropia.

4.3.5 Experimentos de dessorção e reutilização

Também a facilidade com que se pode liberar o corante azul de toluidina da superfície do agente adsorvente foi examinado. Para isso, primeiro o processo de adsorção foi feito para uma concentração inicial de corante de 30 mg/L usando as condições otimizadas de pH (7,5) e tempo de saturação (150 min). Após atingir o equilíbrio, o sobrenadante foi descartado e o compósito CM-CMC contendo o corante lavado com água deionizada por três vezes consecutivas. Em seguida, 15 mL de uma solução de dessorção de NaCl 0,1 M foi adicionado ao Erlenmeyer, seguido da agitação em 300 rpm para permitir a dessorção do corante à temperatura ambiente. O processo foi realizado em triplicata. Periodicamente, uma alíquota da solução era retirada e analisada no espectrofotômetro UV-Vis para estimar a eficiência de dessorção. Com isso, foi possível avaliar a possibilidade de reaproveitamento do material compósito em sucessivos ciclos de adsorção e dessorção.

Na Fig. 77, é mostrada a representação esquemática das etapas seguidas na adsorção e dessorção do corante azul de toluidina (I). Ainda na Fig. 77, pode-se visualizar os passos seguidos no processo de reutilização do CM-CMC (II).

Figura 77 – Etapas seguidas no processo de adsorção e dessorção do corante AT pelo CM-CMC (I) e no experimento de reutilização do adsorvente (II).



Fonte: Desenhado por schematicarts.com (2021).

4.3.6 Eficiência do CM-CMC na adsorção de outros corantes

A eficiência de remoção foi avaliada para outros corantes catiônicos (azul de metileno e safranina), bem como para corantes aniônicos (Remazol B e Tartrazina) pelo CM-CMC. Para este experimento, foram utilizados 15 mL da solução corante com concentração inicial de 30 mg/L, que foi permitido interagir com o compósito por 240 min a 300 rpm e temperatura ambiente.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Preparação do compósito

O compósito magnético de carboximetilcelulose foi preparado através do método de co-precipitação. Após a maceração, foi observado uma coloração marrom-alaranjada, como pode ser vista na Fig. 78.

Figura 78 – Pó obtido após a síntese do CM-CMC.



Fonte: Autoria própria (2021).

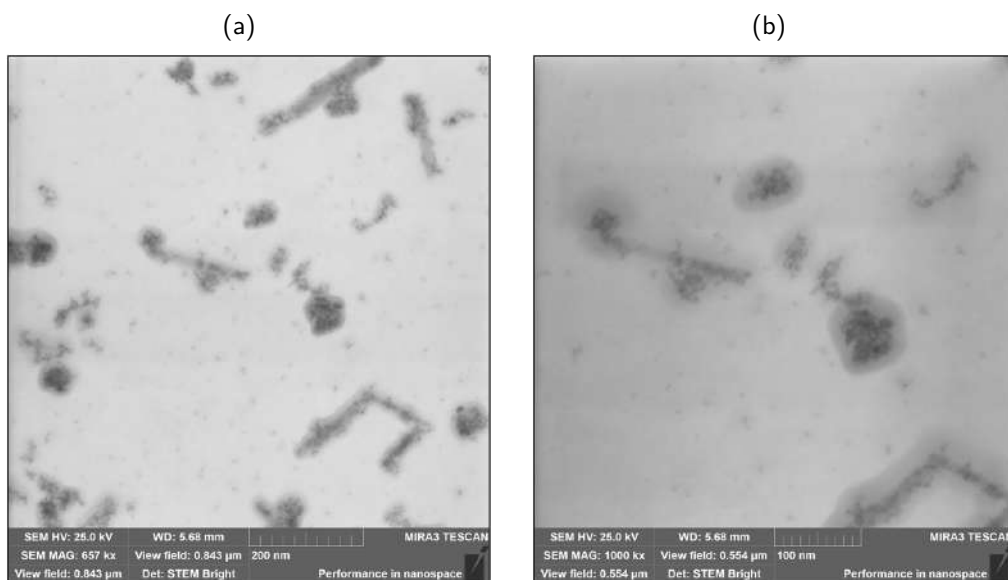
4.4.2 Métodos de Caracterização

4.4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O compósito obtido foi seco e fotografado por STEM. Nas Figs. 79a e 79b é possível visualizar as imagens STEM de aglomerados do CM-CMC sintetizado.

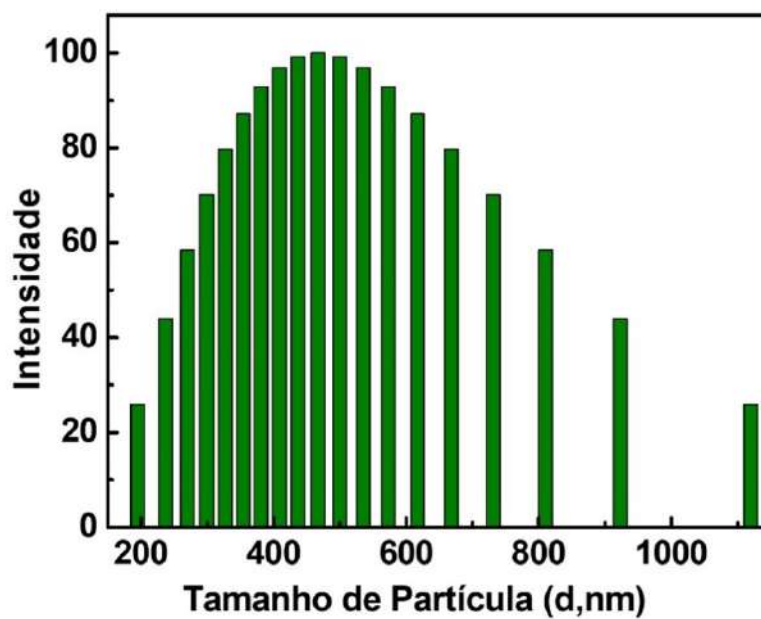
O tamanho médio do CM-CMC foi medido através do Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS). Essa caracterização mede a intensidade espalhada ao longo de uma faixa de ângulos de espalhamento θ_{dls} um determinado tempo t_k em intervalos de tempo Δ_t (LIM et al., 2013). O tamanho médio determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz se refere ao diâmetro hidrodinâmico da partícula. Na Fig. 80 é mostrada a distribuição de tamanho do CM-CMC, onde foi obtido um valor médio de 489,2 nm.

Figura 79 – Partículas CM-CMC: imagens STEM em diferentes ampliações (a) e (b).



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 80 – Tamanho de partícula do CM-CMC.

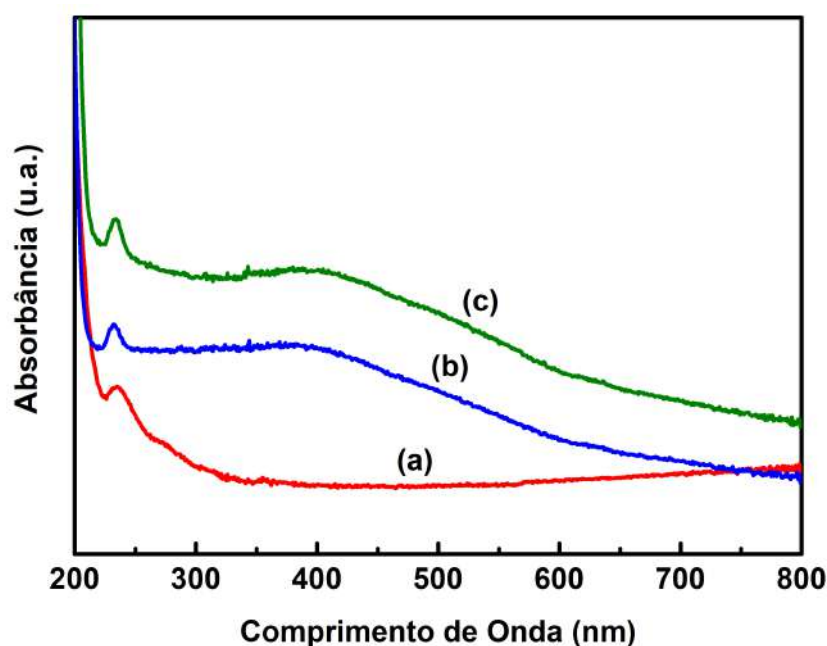


Fonte: Autoria própria (2021).

4.4.2.2 Espectroscopia no Ultravioleta - Visível (UV-Vis) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para verificar se ocorreu a formação do composto, foram obtidos os espectros UV-Vis (ver Fig. 81) e FTIR (Fig. 82) das partículas de óxido de ferro, da carboximetilcelulose (CMC) e do material CM-CMC. Na Fig. 81, a CMC (curva a) mostrou uma banda de absorção em 200-245 nm devido à conjugação $p-\pi$ dos grupos carbonila (YE et al., 2016). O espectro característico das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro pura (curva b), apresentou duas bandas, uma em torno de 230 nm devida a transições de carga entre Fe (III) e O, e outra em 395 nm das transições eletrônicas dos íons Fe (III). No caso do CM-CMC (curva c), uma banda de alta intensidade na região de 230 nm pode ser atribuída a uma sobreposição das bandas observadas em CMC e para as nanopartículas de óxido de ferro pura, além da banda em 395 nm.

Figura 81 – Espectros UV-Vis para CMC (a), NPsM pura (b) e do CM-CMC (c).

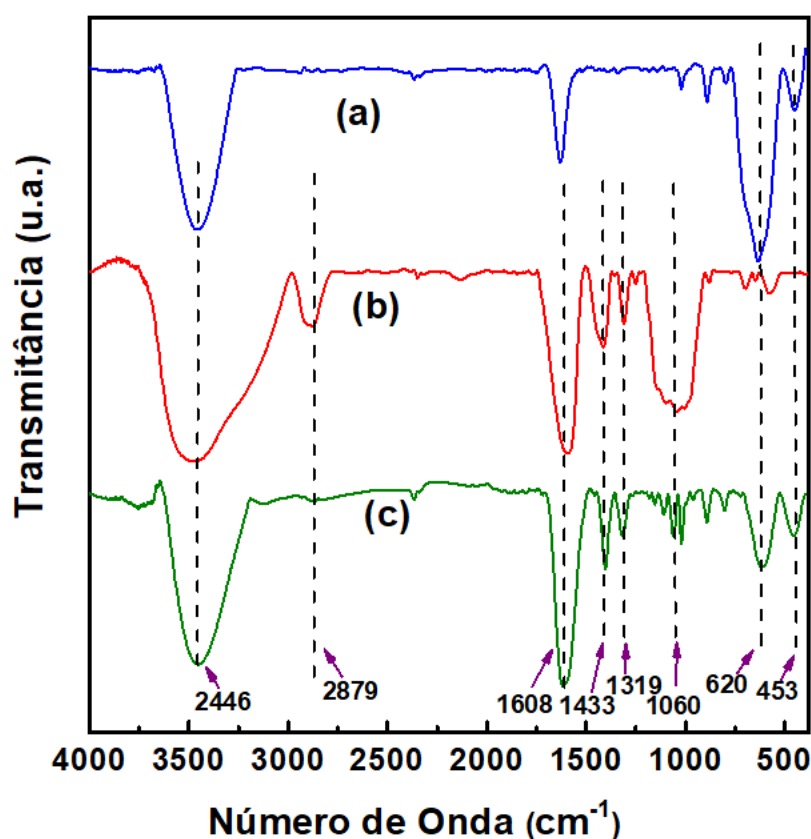


Fonte: Autoria própria (2021).

Os espectros de FTIR de carboximetilcelulose foram coletados para as nanopartículas de óxido de ferro e composto magnético de carboximetilcelulose afim de avaliar sua composição química. Os espectros de FTIR mostrados na Fig. 82 confirmam a formação do CM-CMC. Na curva a, pode ser vista as bandas características da carboximetilcelulose, onde a banda em 1608 cm^{-1} pode ser atribuída à presença do grupo carboxila $-\text{COO}-$, e os picos em 1433 cm^{-1} e 1319 cm^{-1} representam o grupo $-\text{CH}_2$ e vibração de flexão $-\text{OH}$, respectivamente.

Além disso, a banda presente em 3446 cm^{-1} está associada à frequência de estiramento do grupo -OH , que em 2879 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do grupo CH e, por fim, o pico em 1060 cm^{-1} é devido ao alongamento CH-O-CH_2 (VITAMIN, 2015). No espectro das nanopartículas magnéticas (curva b), pode-se observar bandas em 620 cm^{-1} e 453 cm^{-1} , que são devidas a vibrações de Fe-O (OGHOLBEYG et al., 2018; SOOD et al., 2016). Por fim, no espectro CM-CMC (curva c) podem-se observar os picos relacionados à CMC e aqueles pertencentes às nanopartículas magnéticas.

Figura 82 – Espectros FTIR para CMC (a), NPsM pura (b) e do CM-CMC (c).

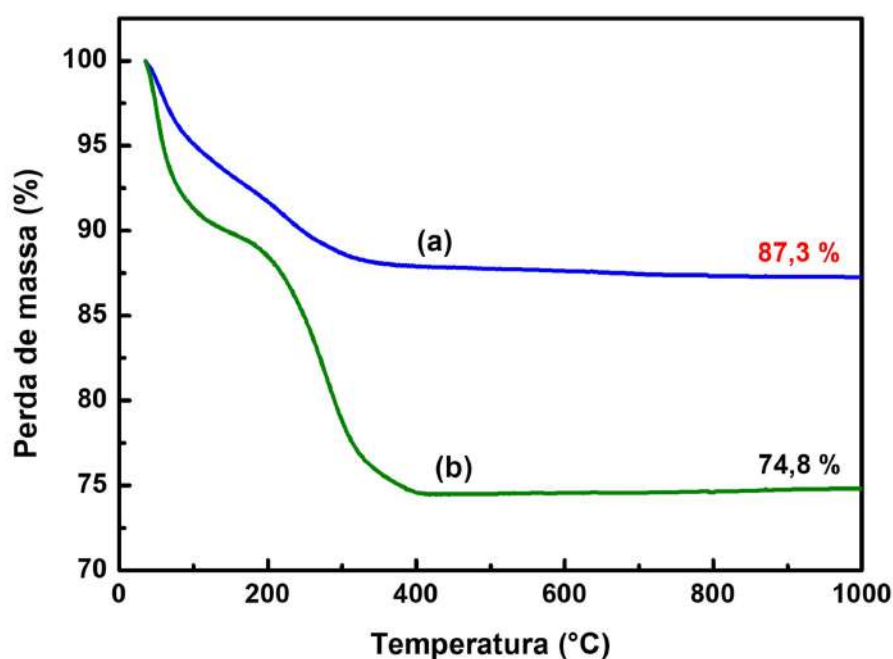


Fonte: Autoria própria (2021).

4.4.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Através da análise das curvas termogravimétricas (TGA) de um adsorvente, é possível obter uma avaliação quantitativa da quantidade de material ativo (CAI et al., 2017). Na Fig. 83, podem ser vistas as curvas TGA das MNPs (curva a) e da CM-CMC (curva b). Como pode ser visto, para ambos os materiais há uma notável perda de massa inicial na faixa de 25°C-140°C, devido à evaporação das moléculas de água absorvidas (CAI et al., 2017; SITTHICHAJ et al., 2015). Para o material compósito (curva b), há também uma perda de massa significativa entre 140°C-400°C, que está relacionada à decomposição das cadeias poliméricas (SITTHICHAJ et al., 2015). A perda de peso total na faixa de 25°C-1000°C foi de 12,7% [25,2%] para as amostras de NPsM puras [CM-CMC]. Esses resultados confirmam que os dois materiais (ou seja, nanopartículas magnéticas e carboximetilcelulose) foram combinados com sucesso.

Figura 83 – Análise termogravimétrica de NPsM (a) e CM-CMC (b).



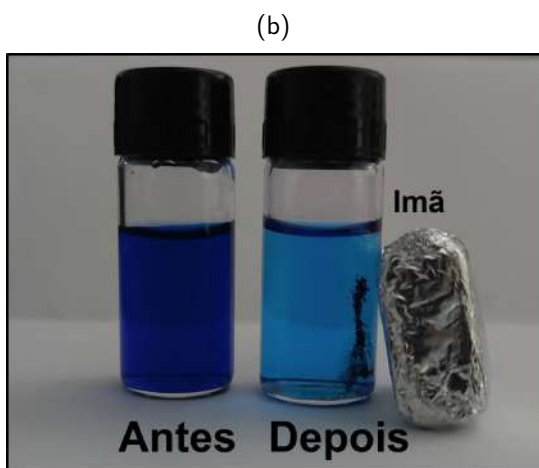
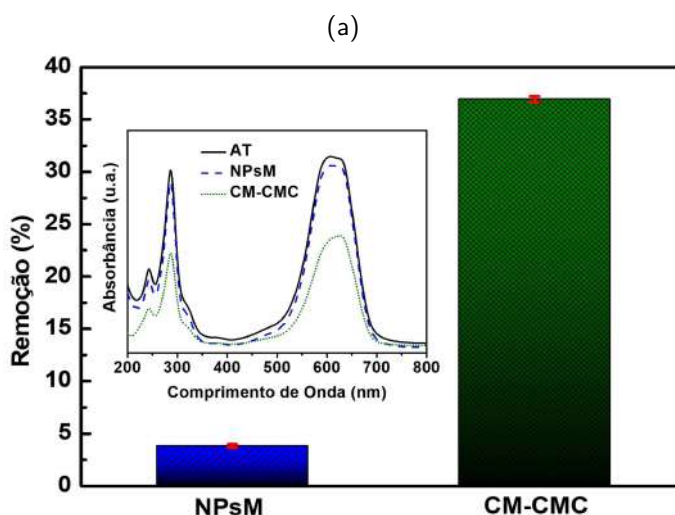
Fonte: Autoria própria (2021).

4.4.3 Experimentos de adsorção do corante AT pelo CM-CMC

4.4.3.1 Teste inicial

A remoção progressiva do corante AT pelo compósito foi observada pela diminuição concomitante do pico de absorbância $\lambda = 626$ nm em alíquotas retiradas da solução mestre, sendo em seguida comparado com os resultados com o de um experimento de referência onde foram usadas nanopartículas magnéticas puras (NPsM). Como os resultados são mostrados na Fig. 84 revelam, uma porcentagem maior de remoção (36%, para uma concentração de 30 mg/L) é observada no caso de usar o compósito magnético CMC, em comparação com um valor próximo a 6% (para uma concentração de 30 mg/L) para as nanopartículas magnéticas puras.

Figura 84 – (a) Eficiência de NPsM e CM-CMC na remoção do corante AT do meio aquoso. (b) Solução de corante AT antes e após a interação com o CM-CMC.

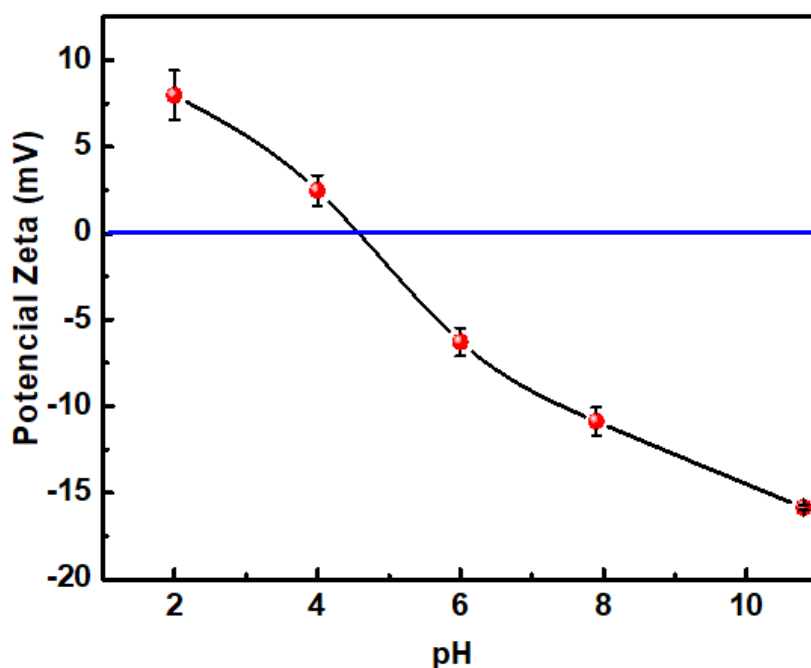


Fonte: Autoria própria (2021).

4.4.3.2 Efeito do pH

O pH é um parâmetro crucial na determinação da capacidade de adsorção, pois afeta a carga superficial do adsorvente (UDDIN; AMPIAW; LEE, 2021). Neste trabalho, a variação do perfil de Potencial Zeta do CM-CMC em função do pH foi examinado, para determinar a carga superficial das partículas coloidais correspondentes. Conforme mostrado na Fig. 85, o Ponto Isoelétrico (PI) está em um pH ligeiramente inferior a 5, uma indicação de que algumas das cargas negativas na superfície do CMC podem ser neutralizadas pelas cargas positivas das nanopartículas magnéticas (LIU et al., 2021). Estabelecido isso, o pH da solução de corante AT foi variada na faixa de 2,0-9,5 (em valores de pH mais altos, observou-se precipitação do corante na forma de pó), seguida da análise da mudança na eficiência de remoção pelo CM-CMC.

Figura 85 – Variação do Potencial Zeta do CM-CMC com a variação do pH.

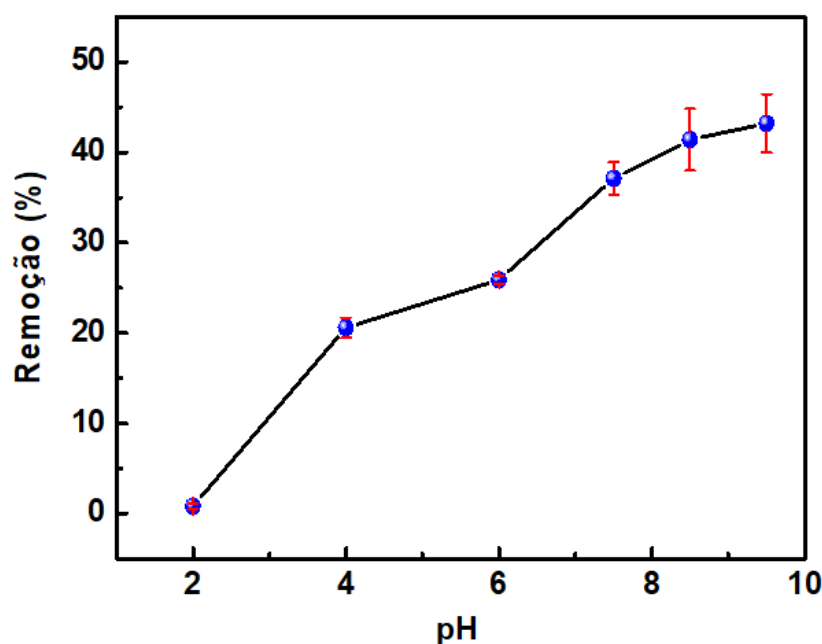


Fonte: Autoria própria (2021).

Como pode ser visto na Fig. 86, um aumento na porcentagem de adsorção é observado à medida que o meio se torna mais alcalino. Em pH 2, a porcentagem de remoção fica em torno de 0,8%, um valor pequeno que indica que em pH baixo os grupos carboxílicos da CMC tendem a adquirir carga positiva, causando assim uma repulsão com as moléculas do corante catiônico. Em pH 9,5, a adsorção chega a 43%, aumento devido à dissociação dos grupos

carboxílicos da carboximetilcelulose, o que torna a superfície do compósito magnético mais negativa, favorecendo assim uma maior atração entre o corante AT carregado positivamente e o ânion carboxilato de o CMC (BEGUM; MAHBUB, 2013). Embora o maior percentual de adsorção tenha sido observado para pH 9,5, optou-se por realizar novos experimentos no pH natural do corante (7,5), para o qual o percentual de adsorção ficou em torno de 37%.

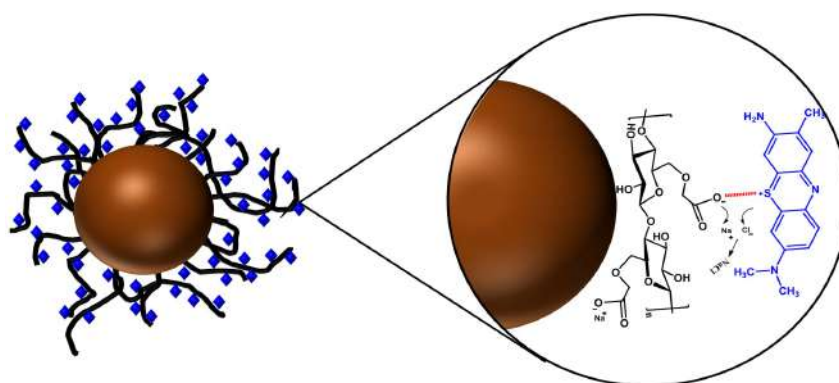
Figura 86 – Gráfico representando a eficiência do CM-CMC em remover o corante AT com a variação do pH do meio.



Fonte: Autoria própria (2021).

A Fig. 87 ilustra o mecanismo de adsorção do corante pelo compósito CM-CMC.

Figura 87 – Mecanismo proposto para a interação do CM-CMC com as moléculas de AT.

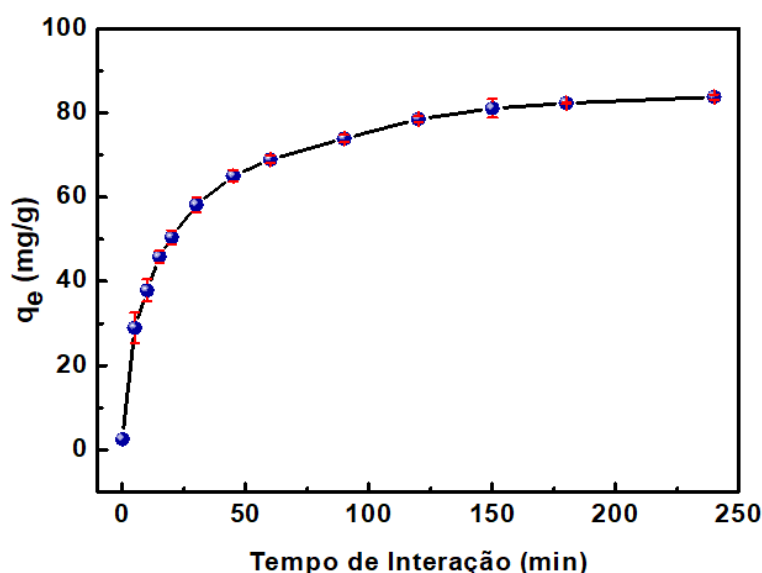


Fonte: Autoria própria (2021).

4.4.4 Efeito do tempo de interação e concentração inicial de corante AT

O efeito do tempo de interação no processo de adsorção do corante AT pelo compósito foi avaliado, como pode ser visto na Fig. 88, a capacidade de remoção cresce de forma mais pronunciada e mais rápida nos primeiros minutos de interação, quando há mais sítios ativos disponíveis na superfície do compósito (ROCHA et al., 2021), e prossegue a um ritmo mais lento até à sua saturação. O equilíbrio é alcançado em 150 min quando a capacidade de adsorção de CM-CMC foi estimada em 83,7 mg/g.

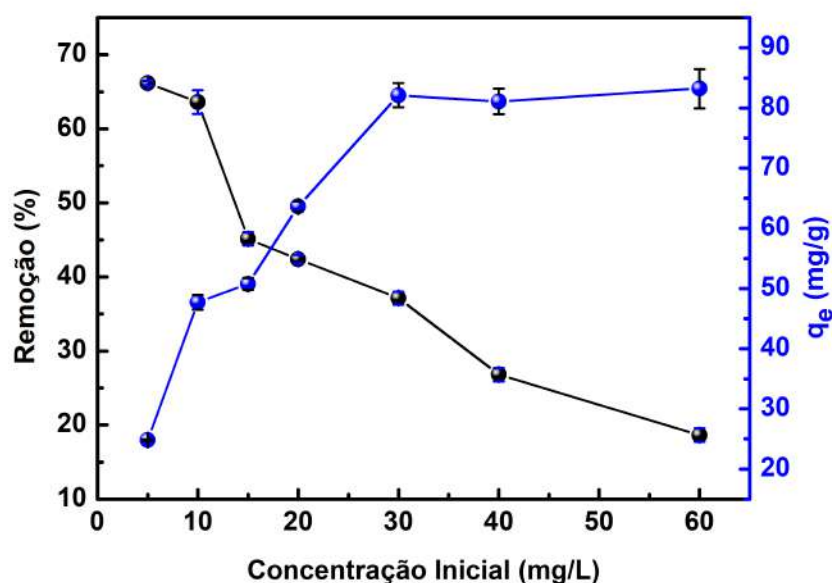
Figura 88 – Variação da quantidade de corante AT removido em função do tempo de exposição ao CM-CMC na concentração de 30 mg/L de solução de corante.



Fonte: Autoria própria (2021).

É bem conhecido que a concentração do adsorbato desempenha um papel fundamental no processo de adsorção (ISMAIL et al., 2019b). Como os dados da Fig. 89 revelam, na baixa concentração de AT de 5 mg/L, 66,1% do corante foi capturado pelo compósito magnético, o que corresponde a uma capacidade de adsorção de apenas 24,8 mg/g, enquanto para uma concentração de 60 mg/L, esse valor aumenta para 83,2 mg/g, mas com uma taxa de remoção menor de 18,6%. Esse aumento de capacidade foi atribuído ao maior número de moléculas de corante que ficam disponíveis para interagir com os sítios ativos do compósito, favorecendo assim a força motriz da transferência de massa entre o adsorbato e o adsorvente (SILVA et al., 2021a; GORZA et al., 2018).

Figura 89 – Efeito da concentração inicial de AT na % de remoção e na capacidade de adsorção do CM-CMC.



Fonte: Autoria própria (2021).

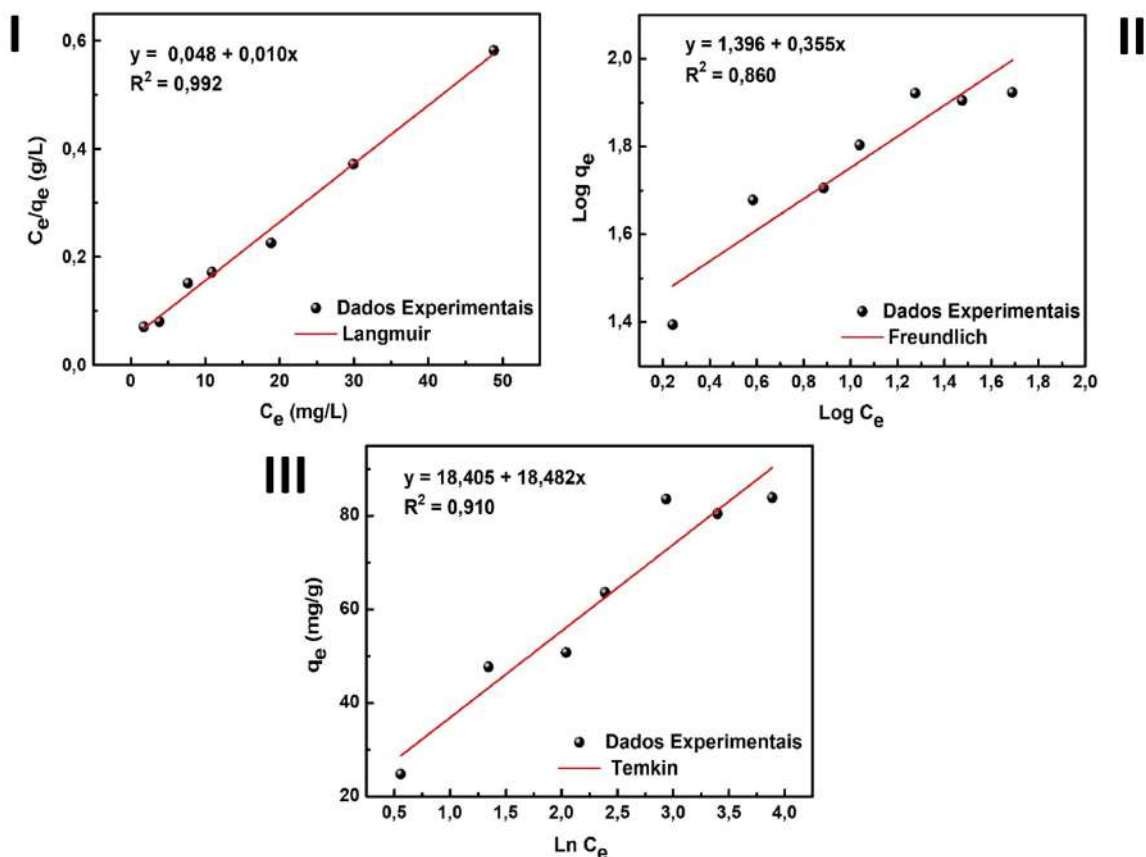
4.4.4.1 Isotermas de adsorção

A partir de uma isoterma de adsorção é possível extrair informações importantes sobre a natureza das interações que ocorrem entre as moléculas do poluente e o adsorvente até o momento em que o equilíbrio do processo é alcançado (ISRAELACHVILI, 2011). Para isso, adotamos as formas linearizadas dos modelos isotérmicos de Langmuir, Freundlich e Temkin (IDAN et al., 2018; RIOS-DONATO et al., 2017) para o ajuste de nossos dados experimentais. Os valores das constantes dos modelos isotérmicos foram determinados a partir da inclinação e interceptação dos termos C_e/q_e vs. C_e , para o modelo de Langmuir, $\log q_e$ vs. $\log C_e$ e modelo de Freundlich, e q_e vs. $\ln C_e$, para o modelo de Temkin (Fig. 90).

Com isso, pudemos calcular os parâmetros relativos a cada modelo, cujos resultados são apresentados na Tabela 12. A partir dos dados apresentados (Fig. 90), pode-se observar que nossos dados são mais bem ajustados pelo modelo de Langmuir, para o qual um coeficiente de correlação de 0,996 e menores valores de AIC (Akaike Information Criterion) e RMSE (Root Mean Squared Error) foram obtidos. Além disso, utilizando o modelo de Langmuir, a capacidade máxima de adsorção foi obtida no valor de 100,0 mg de corante por grama de compósito, um valor próximo ao resultado experimental (83,7 mg/g). Este resultado sugere que as moléculas do corante AT adsorvem homogeneamente na superfície do compósito magnético,

formando uma monocamada.

Figura 90 – Ajuste linear dos dados experimentais para a adsorção de moléculas do AT no CM-CMC de acordo com os modelos de isoterma de Langmuir (I), Freundlich (II) e Temkin (III).



Fonte: Autoria própria (2021).

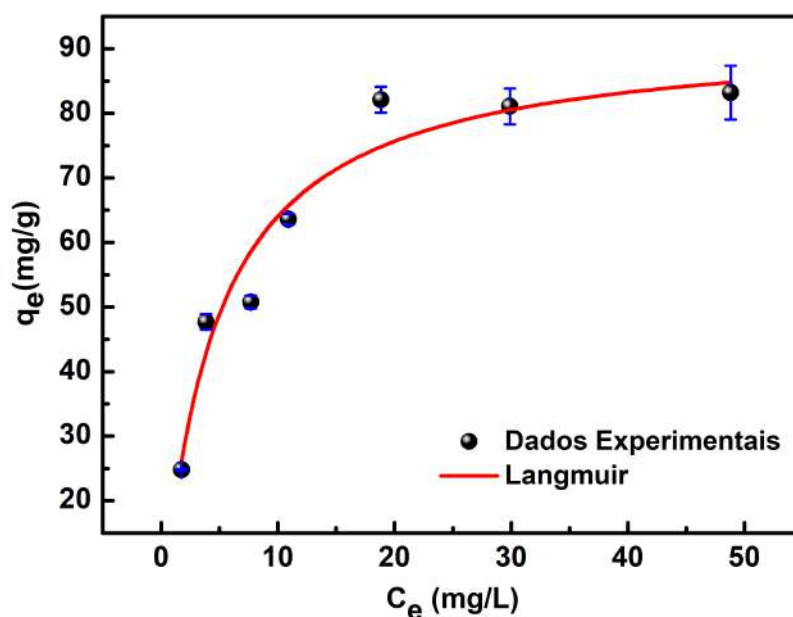
Tabela 12 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção do AT no CM-CMC de acordo com os modelos de isoterma de Langmuir, Freundlich e Temkin.

Modelos de Isotherma			Parâmetros		R^2	
$q_{e,exp}$ (mg/g) 83,7	Langmuir	q_m (mg/g)	b (L/mg)	AIC	RMSE	0,992
		100	0,2083	-50,40	0,0158	
	Freundlich	K_F (mg/g)	$1/n$	AIC	RMSE	0,860
		24,8	0,3550	-29,30	0,0715	
	Temkin	B (J/mol)	K_t (L/mg)	AIC	RMSE	0,910
		18,4	2,7069	34,20	6,6951	

Fonte: Autoria Própria (2021).

Na Fig. 91, pode ser visto o ajuste da variação da capacidade de adsorção q_e em função da concentração inicial do corante AT de acordo com o modelo de Langmuir, com o ajuste linear mostrado no detalhe.

Figura 91 – Ajuste dos dados experimentais da adsorção do corante AT pelo CM-CMC de acordo com o modelo de isoterma de adsorção de Langmuir.



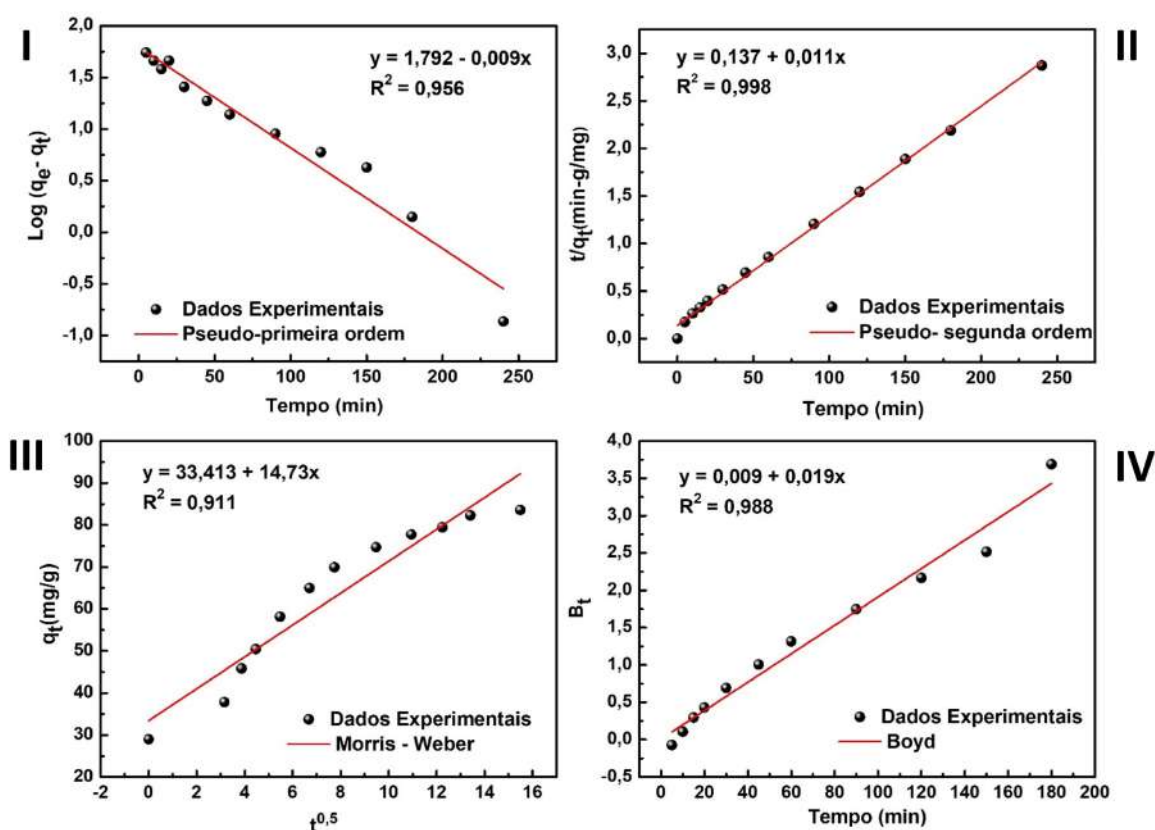
Fonte: Autoria própria (2021).

4.4.4.2 Cinética de adsorção

Para obter uma melhor compreensão dos mecanismos de adsorção predominantes durante o processo de adsorção do corante AT pelo CMC-MC, ajustamos nossos dados experimentais às formas linearizadas dos modelos cinéticos de Pseudo-primeira-ordem (PPO), Pseudo-segunda-ordem (PSO), Morris-Weber (MW) e Boyd (Fig. 92).

Com isso, foi possível determinar os valores das constantes de cada modelo cinético (BEN-JELLOUN et al., 2021), que são apresentados na Tabela 13. Como pode ser observado, os dados experimentais são bem descritos pelo modelo de Pseudo-segunda-ordem (Fig. 92), para o qual foi obtido um excelente coeficiente de correlação e menores valores de AIC e RMSE, sugerindo que mecanismos químicos dominam o processo de adsorção. Além disso, o valor estimado para a capacidade máxima de adsorção (90,9 mg/g) é relativamente próximo do resultado experimental (83,7 mg/g).

Figura 92 – Ajuste dos dados experimentais para adsorção do AT por CM-CMC de acordo com os modelos (I) PPO, (II) PSO, (II) MW e (IV) Boyd.



Fonte: Autoria própria (2021).

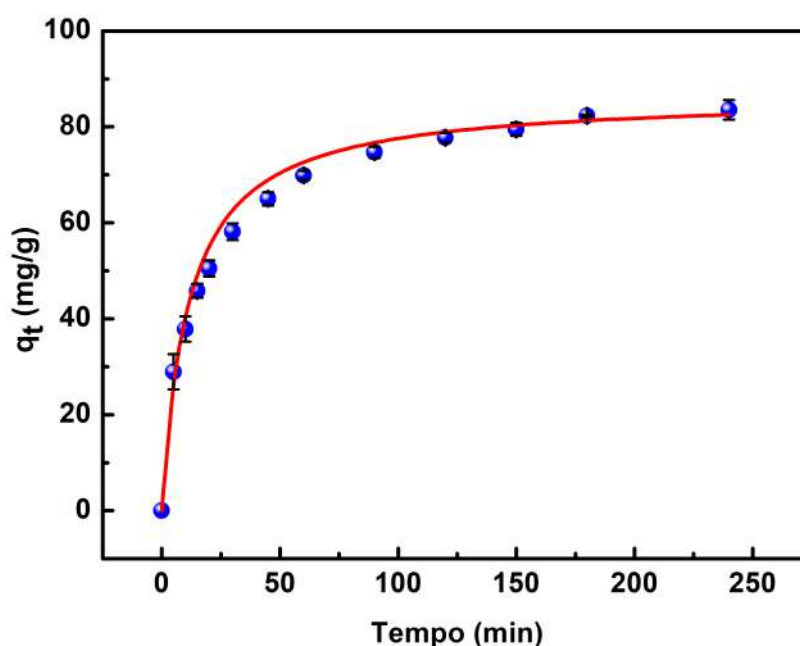
Tabela 13 – Parâmetros otimizados para o ajuste dos dados experimentais para a adsorção do AT pelo CM-CMC de acordo com diferentes modelos cinéticos.

Modelos de Cinética		Parâmetros				R ²
q _{e,exp} (mg/g) 83,7	PPO	k ₁ (min ⁻¹)	q _{e,calc.} (mg/g)	AIC	RMSE	0,956
		0,02	61,9	-26,21	0,1596	
	PSO	k ₂ (g/mg.min)	q _{e,calc.} (mg/g)	AIC	RMSE	0,998
		8,8x10 ⁻⁴	90,9	-58,2	0,0019	
	MW	k _{id} (min ⁻¹)	c	AIC	RMSE	0,911
		3,79	33,4	58,6	5,4822	
	Boyd	-	-	AIC	RMSE	0,988
		-	-	-21,5	0,1835	

Fonte: Autoria Própria (2021).

Na Fig. 93 é apresentado o ajuste da variação da capacidade de adsorção q_t em função do tempo, de acordo com o modelo de pseudo-segunda-ordem.

Figura 93 – Ajuste dos dados experimentais para adsorção do AT pelo CM-CMC de acordo com o modelo de Pseudo-segunda ordem.



Fonte: Autoria própria (2021).

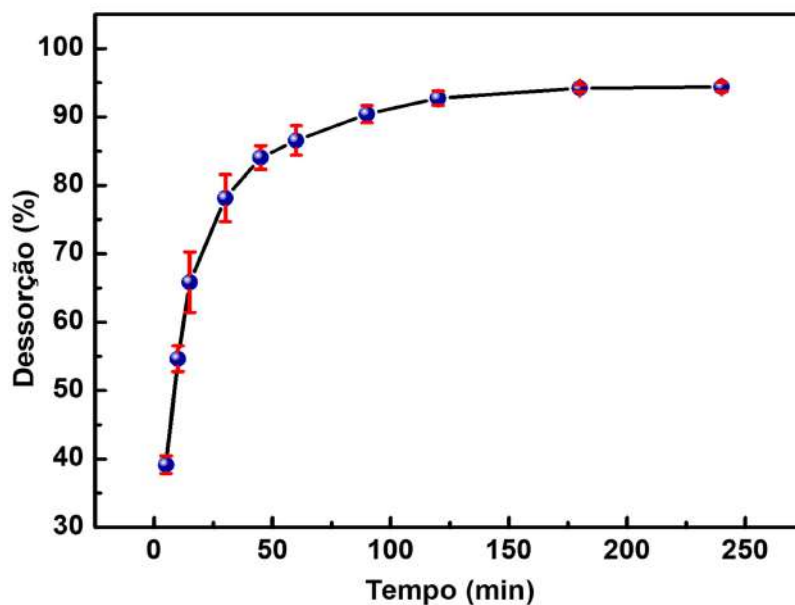
4.4.5 Experimento de dessorção e reutilização

A liberação das moléculas de corante AT após sua captura pelo CM-CMC também foi avaliada. Para isso, utilizou-se uma solução salina de NaCl 0,1 M para promover uma troca iônica com os íons catiônicos da molécula de AT, com a dessorção do corante da superfície CM-CMC sendo acompanhada em função do tempo (Fig. 94). Como se pode observar, o equilíbrio de dessorção é alcançado após 120 min de interação, quando 94,3% do corante já foram liberados.

A possibilidade de reuso é uma característica muito importante de um material adsorvente, pois isso torna o tratamento da água mais econômico (LIU; OMER; OUYANG, 2018). Tendo estabelecido o tempo necessário para o processo de dessorção atingir a saturação, experimentos subsequentes para examinar a possibilidade do CM-CMC ser usado em sucessivos ciclos de adsorção-dessorção foram realizados. Conforme mostrado na Fig. 95, a eficiência de adsorção do corante AT pelo CM-CMC diminuiu progressivamente após o segundo ciclo, atingindo o percentual de 24% no 10º ciclo. Por outro lado, a eficiência de dessorção permaneceu relativamente alta, sendo da ordem de 85% no 10º ciclo. Esses resultados indicam que o compósito magnético de carboximetilcelulose é um material adsorvente que pode ser reutilizado

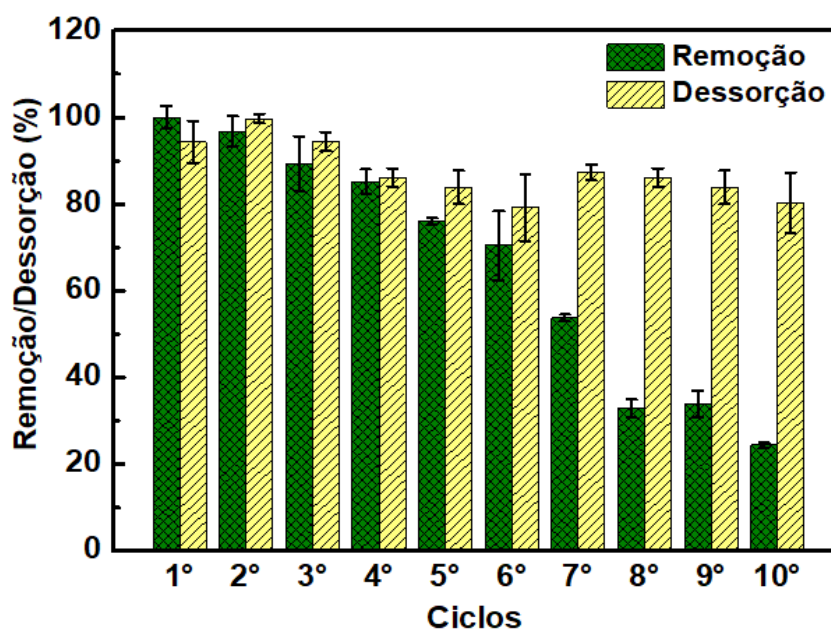
para o tratamento de água contaminada com corantes por ao menos cinco ou seis ciclos consecutivos.

Figura 94 – Cinética da dessorção do corante AT por CM-CMC, usando solução salina NaCl (0,1 M).



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 95 – Desempenho de CM-CMC quando submetido a sucessivos ciclos de adsorção/dessorção do corante AT.



Fonte: Autoria própria (2021).

4.4.6 Comparação com outros adsorventes do corante azul de toluidina

Na Tabela 14, é mostrado a comparação do desempenho do CM-CMC na remoção do corante AT de meios aquosos com o de outros adsorventes relatados na literatura. Como se pode observar, o CM-CMC mostrou-se um adsorvente competitivo, apresentando capacidade máxima de adsorção q_m de 100 mg/g (calculada pelo modelo de Langmuir) após 150 min de interação, valores que devem ser comparados aos obtidos com o uso do gesso (28,0 mg/g, em 60,0 min) (RAUF et al., 2009), sulfato de amido (26,5 mg/g, em 40 min) (GUO et al., 2011), e folhas de chá preto (81,3 mg/g, em 150 min) (ALI, 2017). Os ACPBs adsorventes (HARADA; NAKAMURA; UYAMA, 2021) exibiram uma capacidade máxima maior (123,5 mg/g), mas exigiram um tempo de interação muito maior (>1440 min). Em relação aos experimentos de dessorção, o CM-CMC alcançou uma taxa de 94,3% após 120 min de interação com a solução de eluição, enquanto Duran et al. (DURAN et al., 2011) conseguiram liberar 82,2% do corante adsorvido na Casca de Amêndoa, ao utilizar uma solução de HCl 0,5 M em metanol (60%, v/v) durante 30,0 min de interação. Já Bretanha e colaboradores (BRETANHA et al., 2016), usando ácido acético, conseguiram obter uma taxa de dessorção de 93,5% de sementes de caqui após 180 min.

Tabela 14 – Comparação dos parâmetros de desempenho do CM-CMC com outros adsorventes para a remoção do adsorção do corante AT dissolvido em meio aquoso.

Adsorventes	q_m /Elui. (mg/g)/(%)	Tempo Ads/Dessor. (min)	Ref.
Gesso	28,0/-	60,0/-	RAUF et al., 2009
SS ^a	26,5/-	40,0/-	BRETANHA et al., 2016
Semente de caqui Giombo	34,7/93,5	180/180	CAI et al., 2006
Casca de amêndoa	72,9/60,0	30,0/30,0	DURAN et al., 2011
BCPCA ^b	123,5/-	> 24 h/-	HARADA et al, 2021
Folha de chá preto	47,3/-	120,0/-	ALI, 2017
Zeólita Turca	33,0/-	30/-	ALPAT et al., 2008
CM-CMC	100,0/96,3	150/120	Presente Trabalho

Fonte: Autoria Própria (2021).

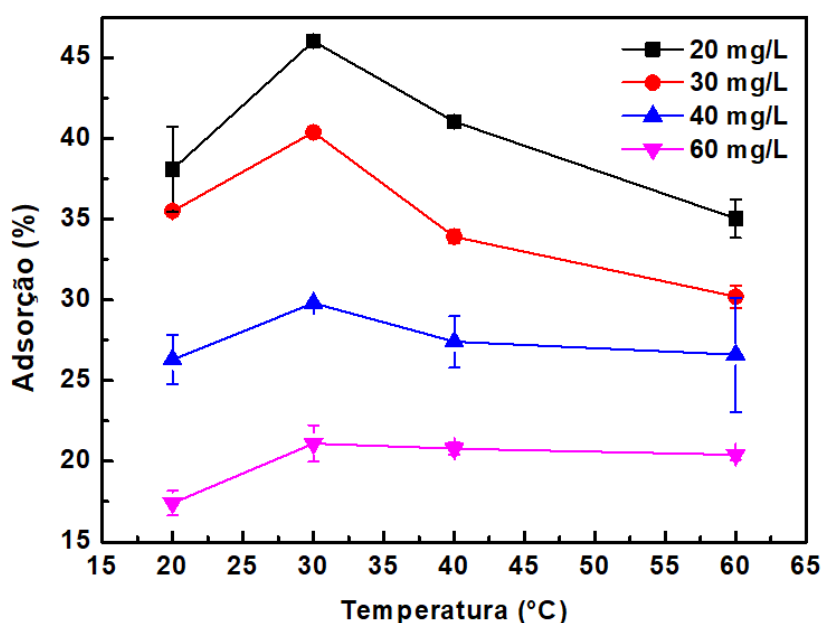
^a Sulfatos de amido insolúveis em água

^b Beads de celulose porosa contendo carvão ativado

4.4.7 Análise da termodinâmica

A capacidade de um determinado adsorvente em capturar poluentes pode ser fortemente afetada por mudanças na temperatura do meio (SOLTANI; FARAMARZI; PARSA, 2021). Para examinar essa questão, avaliamos a eficiência do compósito magnético de carboximetilcelulose na remoção do corante azul de toluidina em diferentes temperaturas na faixa entre 293 K e 333 K. Como pode ser visto na Fig. 96, para todos os valores das concentrações iniciais examinadas, a capacidade de adsorção passa por um máximo em 303 K e depois diminui, sugerindo que em temperaturas mais altas as forças de adsorção entre os sítios ativos na superfície do compósito magnético e as moléculas do corante AT são enfraquecidas (NAIM; EL-SHAMY, 2021).

Figura 96 – Gráfico da porcentagem de remoção do AT pelo CM-CMC em diferentes temperaturas e concentrações iniciais.



Fonte: Autoria própria (2021).

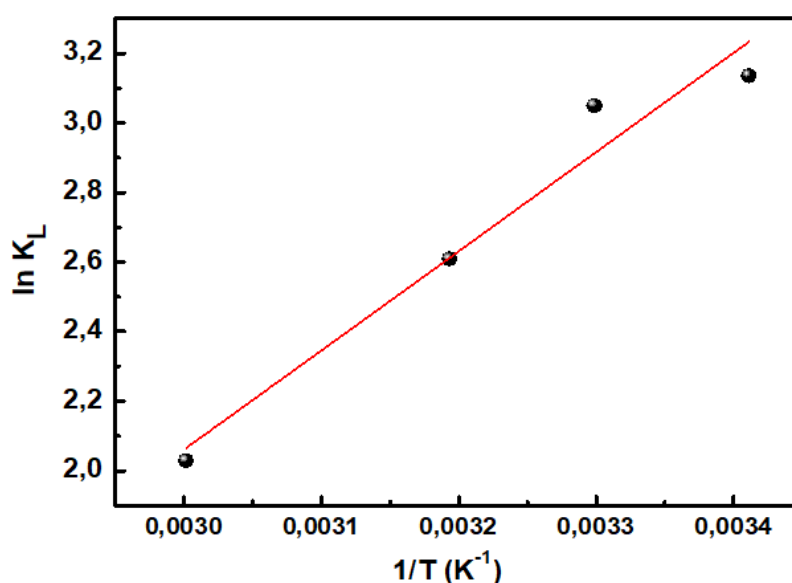
Os dados coletados nos permitiram determinar as variações correspondentes na energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS). Esses parâmetros termodinâmicos foram obtidos pelas relações (HASANPOUR; HATAMI, 2020).

$$\Delta G = -RT \ln K_L \quad (4.1)$$

$$\ln K = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (4.2)$$

onde R é a constante universal do gás, T (K) é a temperatura e K_L é a constante de equilíbrio de Langmuir em diferentes temperaturas, que foi determinada após ajustarmos os dados da isoterma de adsorção ao modelo de isoterma de Langmuir. Assim, traçando a variação de $\ln K_L$ versus $1/T$ (Fig. 97), foi possível calcular o ΔS e ΔH .

Figura 97 – Variação da constante de equilíbrio de Langmuir (K_L) com o inverso da temperatura absoluta (T).



Fonte: Autoria própria (2021).

Os valores obtidos para os diferentes parâmetros termodinâmicos estão listados na Tabela 15. O fato de ΔG apresentar valores negativos em toda a faixa de temperatura indica que o processo de adsorção é espontâneo, enquanto os valores negativos de ΔH e ΔS mostram não só que o processo de adsorção é de natureza exotérmica, mas também que há uma diminuição da aleatoriedade na interface sólido-líquido durante a adsorção do corante pelo compósito magnético (HASANPOUR; HATAMI, 2020).

Tabela 15 – Parâmetros termodinâmicos para adsorção do corante Azul de Toluidina pelo CM-CMC.

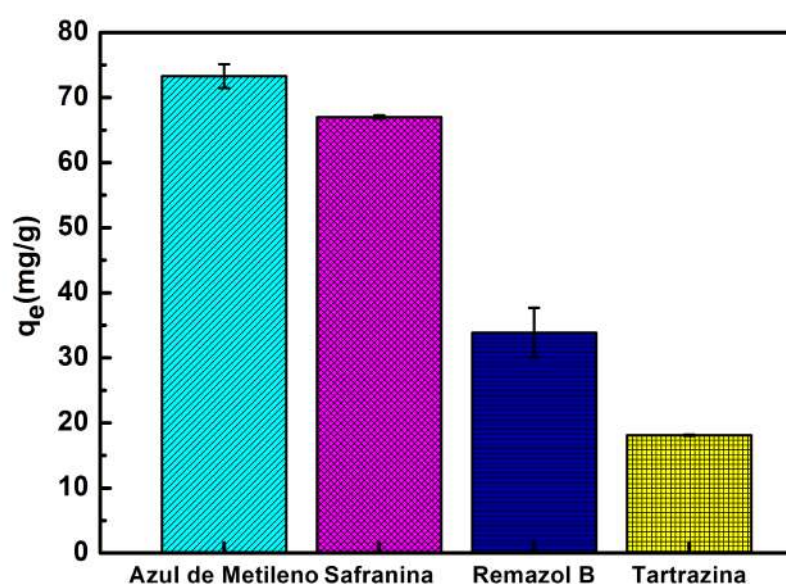
Parâmetros Termodinâmicos			
T (°C)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol.K)
20	-7,64		
30	-7,68	-23,74	-0,05
40	-6,79		
60	-5,61		

Fonte: Autoria Própria (2021).

4.4.8 Capacidade do CM-CMC para capturar outros corantes

Avaliamos também a capacidade do compósito magnético de carboximetilcelulose em remover outros poluentes do meio aquoso, testando quatro corantes diferentes, dois deles catiônicos (Azul de Metileno e Safranina) e os outros dois aniônicos (Remazol B e Tartrazina). Como pode ser visto na Fig. 98, a capacidade de adsorção foi maior para corantes catiônicos, sendo igual a 73,3 mg/g e 67,0 mg/g para o Azul de Metileno e a Safranina, respectivamente. Quanto aos corantes aniônicos, a capacidade de adsorção foi de aproximadamente 34,0 mg/g para o Remazol B e 18,1 mg/g para a Tartrazina. Estes são os resultados esperados devido à existência de repulsão eletrostática das cargas negativas do compósito com os ânions encontrados na estrutura molecular dos corantes Remazol B e Tartrazina.

Figura 98 – A capacidade de adsorção do CM-CMC na captura de outros corantes.



Fonte: Autoria própria (2021).

4.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi relatada a preparação e caracterização de um compósito magnético de carboximetilcelulose, que foi a seguir utilizado para a captura do corante azul de toluidina de meio aquoso. O compósito foi obtido com bom rendimento por um método de co-precipitação simples e os resultados de FTIR confirmaram a presença de bandas características tanto da CMC quanto das nanopartículas magnéticas. Através de uma análise do perfil de potencial zeta das partículas coloidais CM-CMC, foi possível mostrar que a maior eficiência na remoção do corante AT catiônico ocorreu em condições mais básicas, um indicativo de que o processo de adsorção ocorre através da atração eletrostática entre as nanopartículas e as moléculas de corante. Além disso, a capacidade máxima estimada de adsorção do material para as moléculas do corante AT dissolvidas em meio aquoso é de 100 mg/g, um valor competitivo quando comparado aos demais materiais adsorventes discutidos na literatura. Foi também estabelecido que o compósito CM-CMC pode ser reutilizado em pelo menos seis ciclos consecutivos de adsorção-dessorção sem perda significativa de capacidade de adsorção. Muito embora o uso de compósitos magnéticos contendo carboximetilcelulose como adsorventes de corantes catiônicos (como o azul de metileno) tenha sido discutido anteriormente na literatura, o compósito CM-CMC aqui investigado pode ser facilmente preparado com alto rendimento em gramas de CM-CMC e apresenta excelente capacidade de remover azul de toluidina de soluções aquosas. Comparando seu desempenho ao de outros adsorventes, este compósito aparece como um material promissor para a remoção de corantes catiônicos dissolvidos em meio aquoso.

5 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Ao longo desse trabalho, foi apresentada a preparação e caracterização de materiais como membranas compósitas e compósitos magnéticos modificados para serem aplicados na extração, purificação e sensoriamento de DNA e remoção de contaminantes em meios aquosos. Os materiais produzidos foram membranas de Poliestireno-Polipirrol, membrana da casca de ovo revestidas com nanopartículas de ouro e um compósito magnético de carboximetilcelulose.

1. Membranas de poliestireno-polipirrol (PS-PPI): As membranas de poliestireno foram preparadas pela técnica de eletrofiação e posteriormente revestidas com polipirrol pelo método de polimerização *in situ*. Essas membranas foram utilizadas com sucesso como uma nova plataforma para a extração e purificação de DNA a partir de meios aquosos e de amostras vegetais. Os resultados obtidos para a extração de DNA comercial de esperma de salmão dissolvidos em meios aquosos mostraram que o sistema proposto possui uma capacidade de 260 mg/g, valor conseguido em apenas 30 min de interação. Estudos com diferentes soluções alcalinas mostraram que conseguimos eluir 76,6% do DNA que estava adsorvido na membrana quando usamos uma solução de Tris-SDS, pH 8. Os resultados com o DNA comercial, permitiram usar a membrana de PS-PPI na purificação de DNA a partir de amostras de folhas de alface crespa. Para este último, acoplamos a membrana de PS-PPI em um sistema de coluna de centrifugação e, após a otimização do protocolo, constatamos que nosso sistema possui um ótimo rendimento de DNA, comparável a aquele obtido quando um kit comercial é utilizado. Deste modo, sugerimos que a membrana de PS-PPI pode encontrar aplicações práticas na extração e purificação de DNA a partir de amostras de vegetais. Assim, dentre as principais perspectivas relacionadas com a aplicação da membrana compósita podemos listar:

- Realizar experimentos com outras amostras reais, como aquelas obtidas a partir de fungos e bactérias;
- A presença do polímero condutor (polipirrol) na superfície das fibras da membrana pode proporcionar seu uso como uma plataforma para o sensoriamento de DNA.

2. Membranas da casca do ovo revestidas por nanopartículas de ouro (MCO-NPsAu): As membranas da casca de ovo foram removidas da casca por tratamento com ácido clorídrico e revestidas com nanopartículas de ouro previamente preparadas pelo método

de Turkevich, por meio de ultrasonicação. As membranas foram utilizadas com sucesso como uma bioplataforma sensorial para a detecção de ácidos nucleicos, onde foi utilizado como prova do conceito o patógeno *Leptospira interrogans*. Os resultados de biossensoriamento indicaram que o sistema por MCO-NPsAu/FAM-ssDNA é capaz de distinguir sondas de DNA complementar e não-complementar em um tempo de 120 min. Além disso, o sistema mostrou uma linearidade na recuperação da intensidade de emissão da fluorescência para concentrações de DNA alvo complementar na faixa de (2 a 200) nM. Experimentos de estabilidade mostraram que o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA pode ser utilizado por 30 dias quando estocado a baixa temperatura, sem perder sua aplicabilidade. Deste modo, sugerimos que a bioplataforma MCO-NPsAu pode encontrar aplicações práticas na detecção rápida e sensível de ácidos nucleicos por fluorescência. Dessa forma, dentre as principais perspectivas relacionadas com a aplicação da MCO-NPsAu temos:

- Verificar a resposta do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA quando utilizamos a plataforma para a detecção do DNA alvo em meios mais complexos, como o soro de sangue humano.
3. O compósito magnético de carboximetilcelulose (CM-CMC) se mostrou eficiente na remoção do corante azul de toluidina a partir de meios aquosos, com uma capacidade de 86,6 mg/g em pH natural, que é uma condição ótima, uma vez que dispensa a acidificação ou alcalinização do meio. Esse é um valor comparável ao obtidos com outros adsorventes usados na literatura para a mesma aplicação. Experimentos de reutilização mostrou que o material compósito pode ser utilizado por 6 ciclos consecutivos, sem perder de forma significativa sua capacidade. Assim, para esse projeto as principais perspectivas em relação a aplicação do CM-CMC, seriam:
- O uso do compósito para a remoção de contaminantes em amostras reais, que sejam provenientes de indústrias têxteis, ou de laboratórios de biologia molecular.
 - Realizar experimentos com outros corantes catiônicos e biomoléculas (como proteínas).

REFERÊNCIAS

- ABOUL-MAATY, N. A.-F.; ORABY, H. A.-S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, SpringerOpen, v. 43, n. 1, p. 1–10, 2019.
- ABRICA-GONZÁLEZ, P.; ZAMORA-JUSTO, J.; CHAVEZ-SANDOVAL, B. E.; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, G.; BALDERAS-LÓPEZ, J. Measurement of the optical properties of gold colloids by photoacoustic spectroscopy. *International Journal of Thermophysics*, Springer, v. 39, n. 8, p. 1–7, 2018.
- ABU-SALAH, K. M.; ANSARI, A. A.; ALROKAYAN, S. A. DNA-based applications in nanobiotechnology. *Journal of biomedicine and biotechnology*, Hindawi, v. 2010, 2010.
- AFFAT, S. S. Classifications, advantages, disadvantages, toxicity effects of natural and synthetic dyes: A review. *University of Thi-Qar Journal of Science*, v. 8, n. 1, p. 130–135, 2021.
- AHMADI, S.; KAMALADINI, H.; HADDADI, F.; SHARIFMOGHADAM, M. R. Thiol-capped gold nanoparticle biosensors for rapid and sensitive visual colorimetric detection of klebsiella pneumoniae. *Journal of Fluorescence*, Springer, v. 28, n. 4, p. 987–998, 2018.
- AHMED, J.; THAKUR, A.; GOYAL, A. Industrial wastewater and Its Toxic Effects. Royal Society of Chemistry, 2021.
- ALBERTI, G.; ZANONI, C.; MAGNAGHI, L. R.; BIESUZ, R. Gold and silver nanoparticle-based colorimetric sensors: new trends and applications. *Chemosensors*, MDPI, v. 9, n. 11, p. 305, 2021.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A. D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Essential cell biology*. [S.l.]: Garland Science, 2013.
- ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MEDINA-LLAMAS, J. C.; ANDRADE, C. A.; MELO, C. P. D. Hierarchical composite polyaniline–(electrospun polystyrene) fibers applied to heavy metal remediation. *ACS applied materials & interfaces*, ACS Publications, v. 7, n. 13, p. 7231–7240, 2015.
- ALEXANDER, P. J.; RAJANIKANTH, G.; BACON, C. D.; BAILEY, C. D. Recovery of plant DNA using a reciprocating saw and silica-based columns. *Molecular Ecology Notes*, Wiley Online Library, v. 7, n. 1, p. 5–9, 2007.
- ALI, F. Adsorption of Toluidine blue dye from industrial waste water on the remnants of tea leaf. *Int. J. ChemTech Res*, v. 10, p. 497–506, 2017.
- ALI, F.; KHAN, S. B.; SHAHEEN, N.; ZHU, Y. Z. Eggshell membranes coated chitosan decorated with metal nanoparticles for the catalytic reduction of organic contaminates. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier, v. 259, p. 117681, 2021.
- ALIHEIDARI, N.; ALIAHMAD, N.; AGARWAL, M.; DALIR, H. Electrospun nanofibers for label-free sensor applications. *Sensors*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 19, n. 16, p. 3587, 2019.

ALLEN, G. C.; FLORES-VERGARA, M.; KRASYNANSKI, S.; KUMAR, S.; THOMPSON, W. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature protocols*, Nature Publishing Group, v. 1, n. 5, p. 2320–2325, 2006.

ALMEIDA, H. N. et al. *Síntese e caracterização de compósitos fluorescentes de PANI/COBRE*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

ALPAT, S. K.; ÖZBAYRAK, Ö.; ALPAT, Ş.; AKÇAY, H. The adsorption kinetics and removal of cationic dye, Toluidine Blue O, from aqueous solution with turkish zeolite. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 151, n. 1, p. 213–220, 2008.

AMENAGHAWON, A. N.; ANYALEWECHI, C. L.; DARMOKOESOEMO, H.; KUSUMA, H. S. Hydroxyapatite-based adsorbents: Applications in sequestering heavy metals and dyes. *Journal of Environmental Management*, Elsevier, v. 302, p. 113989, 2022.

ANUSHREE, C.; PHILIP, J. Efficient removal of methylene blue dye using cellulose capped Fe_3O_4 nanofluids prepared using oxidation-precipitation method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 567, p. 193–204, 2019.

ARDILA-LEAL, L. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; QUEVEDO-HIDALGO, B. E. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 26, n. 13, p. 3813, 2021.

ASAL, M.; ÖZEN, Ö.; ŞAHINLER, M.; BAYSAL, H. T.; POLATOĞLU, İ. An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors. *Sensor Review*, Emerald Publishing Limited, 2018.

ASGARI, G.; DAYARI, A. Experimental dataset on acid treated eggshell for removing cyanide ions from synthetic and industrial wastewaters. *Data in brief*, Elsevier, v. 16, p. 442–452, 2018.

ATTALLAH, O. A.; AL-GHOBASHY, M. A.; NEBSEN, M.; SALEM, M. Y. Removal of cationic and anionic dyes from aqueous solution with magnetite/pectin and magnetite/silica/pectin hybrid nanocomposites: kinetic, isotherm and mechanism analysis. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 14, p. 11461–11480, 2016.

AYAWEI, N.; EBELEGI, A. N.; WANKASI, D. Modelling and interpretation of adsorption isotherms. *Journal of chemistry*, Hindawi, v. 2017, 2017.

AZMAT, M. A.; KHAN, I. A.; CHEEMA, H. M. N.; RAJWANA, I. A.; KHAN, A. S.; KHAN, A. A. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *Journal of Zhejiang University Science B*, Springer, v. 13, n. 4, p. 239–243, 2012.

BAGGE, M.; LÜBBERSTEDT, T. Functional markers in wheat: technical and economic aspects. *Molecular Breeding*, Springer, v. 22, n. 3, p. 319–328, 2008.

BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R.; INGLIS, C. *Molecular biology of the gene*. [S.l.]: San Francisco, CA, USA:: Pearson/Benjamin Cummings, 2008.

BALASUBRAMANIAN, S. K.; YANG, L.; YUNG, L.-Y. L.; ONG, C.-N.; ONG, W.-Y.; LIYA, E. Y. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*, Elsevier, v. 31, n. 34, p. 9023–9030, 2010.

- BARBOSA, J. d. A.; FRANÇA, C. A. de; GOUVEIA, J. J. d. S.; GOUVEIA, G. V.; COSTA, M. M. da; OLIVEIRA, H. P. de. Eudragit e100/poly (ethylene oxide) electrospun fibers for DNA removal from aqueous solution. *Journal of Applied Polymer Science*, Wiley Online Library, v. 136, n. 19, p. 47479, 2019.
- BEGUM, H. A.; MAHBUB, M. K. B. Effectiveness of carboxymethyl cellulose for the removal of methylene blue from aqueous solution. *Dhaka University Journal of Science*, v. 61, n. 2, p. 193–198, 2013.
- BELK, C.; MAIER, V. *Biology: Science for Life, with Physiology*. Pearson, 2013. ISBN 9780321767837. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=Oo4kygAACAAJ>>.
- BELK, C.; MAIER, V. *Biology: Science for Life, with Physiology*. Pearson, 2018. (Belk, Border and Maier, the Biology: Science for Life Series, 5th Edition Series). ISBN 9780134555430. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=gT5ctAEACAAJ>>.
- BENJELLOUN, M.; MIYAH, Y.; EVRENDILEK, G. A.; ZERROUQ, F.; LAIRINI, S. Recent advances in adsorption kinetic models: their application to dye types. *Arabian Journal of Chemistry*, Elsevier, v. 14, n. 4, p. 103031, 2021.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 28, n. 3, p. 325–347, 2010.
- BHATIA, D.; SHARMA, N. R.; SINGH, J.; KANWAR, R. S. Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Taylor & Francis, v. 47, n. 19, p. 1836–1876, 2017.
- BHATIA, S.; DAHIYA, R. Concepts and techniques of plant tissue culture science. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, Academic Press Cambridge, MA, p. 121–156, 2015.
- BRANDÃO, W. Q.; MEDINA-LLAMAS, J. C.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MELO, C. P. D. Polyaniline–polystyrene membrane for simple and efficient retrieval of double-stranded DNA from aqueous media. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 106, p. 104566–104574, 2016.
- BREBBIA, C. A.; TIEZZI, E.; CONTI, M. *Management of natural resources, sustainable development and ecological hazards*. [S.l.]: Wit Press, 2006. v. 99.
- BRETANHA, M. S.; DOTTO, G. L.; VAGHETTI, J. C.; DIAS, S. L.; LIMA, E. C.; PAVAN, F. A. Giombo persimmon seed (gps) an alternative adsorbent for the removal toluidine blue dye from aqueous solutions. *Desalination and Water Treatment*, Taylor & Francis, v. 57, n. 58, p. 28474–28485, 2016.
- BÜLBÜL, G.; HAYAT, A.; MUSTAFA, F.; ANDREESCU, S. DNA assay based on nanoceria as fluorescence quenchers (NanoCeraq DNA assay). *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- CAI, P.; HUANG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, H. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an alfisol. *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier, v. 38, n. 3, p. 471–476, 2006.

- CAI, Y.; YUAN, F.; WANG, X.; SUN, Z.; CHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, X.; YANG, S.; WANG, S. Synthesis of core-shell structured Fe_3O_4 @carboxymethyl cellulose magnetic composite for highly efficient removal of Eu (III). *Cellulose*, Springer, v. 24, n. 1, p. 175–190, 2017.
- CAMPOS, N. F.; BARBOSA, C. M.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, J. M.; DUARTE, M. M. Removal of naphthenic acids using activated charcoal: Kinetic and equilibrium studies. *Adsorption Science & Technology*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 36, n. 7-8, p. 1405–1421, 2018.
- CANTILLO, M. E. M. Linear and nonlinear optical characterization of plasmonic nanostructures of gold nanorods and metasurfaces. Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- CAO, S.; CHEN, J.; JIN, X.; WU, W.; ZHAO, Z. Enzyme-based biosensors: Synthesis and applications. *Eds.), Biosensor Nanomaterials, ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Wiley Online Library*, v. 10, n. 9783527635160, 2011.
- CARNERERO, J. M.; JIMENEZ-RUIZ, A.; CASTILLO, P. M.; PRADO-GOTOR, R. Covalent and non-covalent DNA-gold-nanoparticle interactions: New avenues of research. *ChemPhysChem*, Wiley Online Library, v. 18, n. 1, p. 17–33, 2017.
- CHANG, R.; GOLDSBY, K. *Química*. [S.l.]: AMGH Editora, 2013.
- CHAUHAN, R.; GOPINATH, S.; RAZDAN, P.; DELATTRE, C.; NIRMALA, G.; NATARAJAN, R. Thermal decomposition of expanded polystyrene in a pebble bed reactor to get higher liquid fraction yield at low temperatures. *Waste management*, Elsevier, v. 28, n. 11, p. 2140–2145, 2008.
- CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MEDINA-LLAMAS, J. C.; MAQUEIRA, L.; ANDRADE, C. A.; ALVES, K. G.; MELO, C. P. de. 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*, Elsevier, v. 281, p. 826–836, 2015.
- CHENG, T.; XU, C.; LEI, L.; LI, C.; ZHANG, Y.; ZHOU, S. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular ecology resources*, Wiley Online Library, v. 16, n. 1, p. 138–149, 2016.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, Elsevier, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.
- CHU, P. K.; LIU, X. *Biomaterials fabrication and processing handbook*. [S.l.]: CRC press, 2008.
- CHYTIL, M.; LIŠKOVÁ, K.; JANEČEK, J. The influence of counterions of different valency on carboxymethylcellulose viscoelastic behavior. *Rheology: Theory, Properties and Practical Applications. 1st ed. Hauppauge (NY): Nova Science Publishers*, 2014.
- CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. *Proteomic profiling and analytical chemistry: the crossroads*. [S.l.]: Elsevier, 2016.
- CORTHELL, J. T. *Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls*. [S.l.]: Academic Press, 2014.

COUNCIL, N. R. et al. *Polymer science and engineering: the shifting research frontiers*. [S.I.]: National Academies Press, 1994.

CRAIG, N. L.; GREEN, R. R.; GREIDER, C. C.; WOLBERGER, C.; STORZ, G. G. *Molecular biology: principles of genome function*. [S.I.]: Oxford University Press, USA, 2021.

DADA, A.; OLALEKAN, A.; OLATUNYA, A.; DADA, O. Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn_2^{+} unto phosphoric acid modified rice husk. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, v. 3, n. 1, p. 38–45, 2012.

DALL'OLIO, A.; DASCOLA, G.; VACARA, V.; BOCCHI, V. Resonance paramagnetique electronique et conductivité d'un noir d'oxypyrrrol electrolytique. *CR Acad. Sci. Paris*, v. 267, p. 433–435, 1968.

de Aguiar, M. F.; LEAL, A. N.; de Melo, C. P.; ALVES, K. G. Polypyrrole-coated electrospun polystyrene films as humidity sensors. *Talanta*, v. 234, p. 122636, 2021. ISSN 0039-9140. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914021005579>>.

DEMIRCI, S.; CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Surface modification of electrospun cellulose acetate nanofibers via RAFT polymerization for DNA adsorption. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 113, p. 200–207, 2014.

DEVATHA, C. P.; THALLA, A. K. Green synthesis of nanomaterials. In: *Synthesis of inorganic nanomaterials*. [S.I.]: Elsevier, 2018. p. 169–184.

DING, Q.; KANG, Z.; HE, X.; WANG, M.; LIN, M.; LIN, H.; YANG, D.-P. Eggshell membrane-templated gold nanoparticles as a flexible sers substrate for detection of thiabendazole. *Microchimica Acta*, Springer, v. 186, n. 7, p. 1–9, 2019.

DONG, B.; YANG, M.; GE, S.; CAO, Y.; LI, B.; LU, Y. Synthesis and photoluminescence modulating of polypyrrole fluorescent nano-spheres/dots. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 28, p. 23737–23745, 2016.

DONG, J.; CARPINONE, P. L.; PYRGIOTAKIS, G.; DEMOKRITOU, P.; MOUDGIL, B. M. Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*, Hosokawa Powder Technology Foundation, v. 37, p. 224–232, 2020.

DOU, X.; WANG, Q.; LI, Z.; JU, J.; WANG, S.; HAO, L.; SUI, K.; XIA, Y.; TAN, Y. Seaweed-derived electrospun nanofibrous membranes for ultrahigh protein adsorption. *Advanced Functional Materials*, Wiley Online Library, v. 29, n. 46, p. 1905610, 2019.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. [S.I.], 1987.

DU, P.; LI, H.; MEI, Z.; LIU, S. Electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA hybridization with the amplification of Au nanoparticles and CdS nanoparticles. *Bioelectrochemistry*, Elsevier, v. 75, n. 1, p. 37–43, 2009.

DURAN, C.; OZDES, D.; GUNDOGDU, A.; SENTURK, H. B. Kinetics and isotherm analysis of basic dyes adsorption onto almond shell (*prunus dulcis*) as a low cost adsorbent. *Journal of Chemical & Engineering Data*, ACS Publications, v. 56, n. 5, p. 2136–2147, 2011.

DURNER, E. F. *Principles of horticultural physiology*. [S.I.]: CABI, 2013.

DUTTA, S.; GUPTA, B.; SRIVASTAVA, S. K.; GUPTA, A. K. Recent advances on the removal of dyes from wastewater using various adsorbents: A critical review. *Materials Advances*, Royal Society of Chemistry, 2021.

ELAHI, M. Y.; BATHAIE, S.; KAZEMI, S.; MOUSAVI, M. DNA immobilization on a polypyrrole nanofiber modified electrode and its interaction with salicylic acid/aspirin. *Analytical biochemistry*, Elsevier, v. 411, n. 2, p. 176–184, 2011.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, Elsevier, v. 184, p. 537–556, 2018.

ELECTROSPINNING of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer*, v. 49, n. 24, p. 5336–5343, 2008. ISSN 0032-3861. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386108008276>>.

ERASMUS, M.; CASON, E. D.; MARWIJK, J. van; BOTES, E.; GERICKE, M.; HEERDEN, E. van. Gold nanoparticle synthesis using the thermophilic bacterium *Thermus scotoductus* SA-01 and the purification and characterization of its unusual gold reducing protein. *Gold Bulletin*, Springer, v. 47, n. 4, p. 245–253, 2014.

ES-SAHEB, M.; ELZATAHRY, A. A.; SHERIF, E.; ALKARAKI, A. S.; KENAWY, E.-R. A novel electrospinning application for polyvinyl chloride nanofiber coating deposition as a corrosion inhibitor for Aluminum, Steel, and Brass in Chloride Solutions. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 7, n. 7, p. 5962–5976, 2012.

ESFAHANI, H.; PRABHAKARAN, M. P.; SALAHI, E.; TAYEBIFARD, A.; KEYANPOUR-RAD, M.; RAHIMIPOUR, M. R.; RAMAKRISHNA, S. Protein adsorption on electrospun zinc doped hydroxyapatite containing nylon 6 membrane: Kinetics and isotherm. *Journal of colloid and interface science*, Elsevier, v. 443, p. 143–152, 2015.

ESMAEILI, C.; HENG, L. Y.; CHIANG, C. P.; RASHID, Z. A.; SAFITRI, E.; MARUGAN, R. S. P. M. A DNA biosensor based on kappa-carrageenan-polypyrrole-gold nanoparticles composite for gender determination of arowana fish (*scleropages formosus*). *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, v. 242, p. 616–624, 2017.

FADEL, M.; FADEEL, D. A.; IBRAHIM, M.; HATHOUT, R. M.; EL-KHOLY, A. I. One-step synthesis of polypyrrole-coated gold nanoparticles for use as a photothermally active nano-system. *International Journal of Nanomedicine*, Dove Press, v. 15, p. 2605, 2020.

FAN, H.; MA, X.; ZHOU, S.; HUANG, J.; LIU, Y.; LIU, Y. Highly efficient removal of heavy metal ions by carboxymethyl cellulose-immobilized Fe_3O_4 nanoparticles prepared via high-gravity technology. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 213, p. 39–49, 2019.

FAUST, S. D.; ALY, O. M. *Adsorption processes for water treatment*. [S.l.]: Elsevier, 2013.

FEBRIANTO, J.; KOSASIH, A. N.; SUNARSO, J.; JU, Y.-H.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: a summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 162, n. 2, p. 616–645, 2009.

FOLARIN, O. M.; SADIKU, E. R.; MAITY, A. Polymer-noble metal nanocomposites. *Academic Journals*, 2011.

FRIAR, E. A. Isolation of DNA from plants with large amounts of secondary metabolites. *Methods in enzymology*, Elsevier, v. 395, p. 1–12, 2005.

FU, Y.; SU, Y.-S.; MANTHIRAM, A. Sulfur-polypyrrole composite cathodes for lithium-sulfur batteries. *Journal of the Electrochemical Society*, The Electrochemical Society, v. 159, n. 9, p. A1420–A1424, 2012.

GAD, S. Polymers. In: WEXLER, P. (Ed.). *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Third edition. Oxford: Academic Press, 2014. p. 1045–1050. ISBN 978-0-12-386455-0. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012386454300912X>>.

GEE, S.; JOHNSON, B.; SMITH, A. Optimizing electrospinning parameters for piezoelectric pvdf nanofiber membranes. *Journal of membrane science*, Elsevier, v. 563, p. 804–812, 2018.

GERMAN, N.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Formation of polyaniline and polypyrrole nanocomposites with embedded glucose oxidase and gold nanoparticles. *Polymers*, MDPI, v. 11, n. 2, p. 377, 2019.

GHOSH, R.; PAUL, S.; GHOSH, S. K.; ROY, A. An improved method of DNA isolation suitable for PCR-based detection of begomoviruses from jute and other mucilaginous plants. *Journal of Virological Methods*, Elsevier, v. 159, n. 1, p. 34–39, 2009.

GONZALES, F. P.; SILVA, S. H. D.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi metarhizium anisopliae and Aspergillus nidulans with methylene blue and toluidine blue. *Photochemistry and photobiology*, Wiley Online Library, v. 86, n. 3, p. 653–661, 2010.

GORZA, F. D.; PEDRO, G. C.; SILVA, R. J. da; MEDINA-LLAMAS, J. C.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MELO, C. P. de. Electrospun polystyrene-(emeraldine base) mats as high-performance materials for dye removal from aqueous media. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Elsevier, v. 82, p. 300–311, 2018.

GOSWAMI, L.; SARMA, N. S.; CHOWDHURY, D. Determining the ionic and electronic contribution in conductivity of polypyrrole/au nanocomposites. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, v. 115, n. 40, p. 19668–19675, 2011.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in polymer science*, Elsevier, v. 32, n. 8-9, p. 876–921, 2007.

GUO, L.; LI, G.; LIU, J.; MA, S.; ZHANG, J. Kinetic and equilibrium studies on adsorptive removal of toluidine blue by water-insoluble starch sulfate. *Journal of Chemical & Engineering Data*, ACS Publications, v. 56, n. 5, p. 1875–1881, 2011.

GUPTA, K. R. *Urban development debates in the new millennium: studies in revisited theories and redefined praxes*. [S.l.]: Atlantic Publishers & Dist, 2004. v. 3.

HABIBA, U.; AFIFI, A. M.; SALLEH, A.; ANG, B. C. Chitosan/(polyvinyl alcohol)/zeolite electrospun composite nanofibrous membrane for adsorption of Cr_6^{+} , Fe_3^{+} and Ni_2^{+} . *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 322, p. 182–194, 2017.

HAMDAOUI, O.; NAFFRECHOUX, E. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon: Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 147, n. 1-2, p. 381–394, 2007.

HAO, Y.; YANG, M.; LI, W.; QIAO, X.; ZHANG, L.; CAI, S. A photoelectrochemical solar cell based on ZnO/dye/polypyrrole film electrode as photoanode. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, Elsevier, v. 60, n. 4, p. 349–359, 2000.

HARADA, N.; NAKAMURA, J.-i.; UYAMA, H. Single-step fabrication and environmental applications of activated carbon-containing porous cellulose beads. *Reactive and Functional Polymers*, Elsevier, v. 160, p. 104830, 2021.

HASANPOUR, M.; HATAMI, M. Application of three dimensional porous aerogels as adsorbent for removal of heavy metal ions from water/wastewater: A review study. *Advances in Colloid and Interface Science*, Elsevier, p. 102247, 2020.

HAWKINS, T. L.; O'CONNOR-MORIN, T.; ROY, A.; SANTILLAN, C. DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, v. 22, n. 21, p. 4543, 1994.

HE, J.-H.; LIU, Y.; MO, L.-F.; WAN, Y.-Q.; XU, L. *Electrospun nanofibres and their applications*. [S.l.]: ISmithers Shawbury, UK, 2008.

HE, Z.; YIN, H.; CHANG, C.-C.; WANG, G.; LIANG, X. Interfacing DNA with gold nanoparticles for heavy metal detection. *Biosensors*, MDPI, v. 10, n. 11, p. 167, 2020.

HEEGER, A.; AG, M.; SHIRAKAWA, H. The Nobel Prize in Chemistry, 2000: Conductive polymers, kungl. Vetenskapsakademien, The Royal Swedish Academy Of Science, Sweden, 2000.

HEIKRUJAM, J.; KISHOR, R.; MAZUMDER, P. B. The chemistry behind plant DNA isolation protocols. *Biochemical Analysis Tools–Methods for Bio-Molecules Studies*, v. 8, 2020.

HENRY, R. *Molecular Markers in Plants*. [S.l.]: Wiley, 2012. ISBN 9780470959510.

HO, Y.-S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process biochemistry*, Elsevier, v. 34, n. 5, p. 451–465, 1999.

HOLZINGER, M.; GOFF, A. L.; COSNIER, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Frontiers in chemistry*, Frontiers Media SA, v. 2, p. 63, 2014.

HOU, Y.; ZHANG, L.; CHEN, L.; LIU, P.; HIRATA, A.; CHEN, M. Raman characterization of pseudocapacitive behavior of polypyrrole on nanoporous gold. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Royal Society of Chemistry, v. 16, n. 8, p. 3523–3528, 2014.

HU, L.-L.; HU, B.; SHEN, L.-M.; ZHANG, D.-D.; CHEN, X.-W.; WANG, J.-H. Polyethyleneimine–iron phosphate nanocomposite as a promising adsorbent for the isolation of DNA. *Talanta*, Elsevier, v. 132, p. 857–863, 2015.

HUANG, C.; NIU, H.; WU, J.; KE, Q.; MO, X.; LIN, T. Needleless electrospinning of polystyrene fibers with an oriented surface line texture. *Journal of nanomaterials*, Hindawi, v. 2012, 2012.

HUANG, M.; DU, L.; FENG, J.-X. Photochemical synthesis of silver nanoparticles/eggshell membrane composite, its characterization and antibacterial activity. *Science of Advanced Materials*, American Scientific Publishers, v. 8, n. 8, p. 1641–1647, 2016.

- IDAN, I. J.; ABDULLAH, L. C.; CHOONG, T. S.; JAMIL, S. N. A. B. M. Equilibrium, kinetics and thermodynamic adsorption studies of acid dyes on adsorbent developed from kenaf core fiber. *Adsorption Science & Technology*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 36, n. 1-2, p. 694–712, 2018.
- INGLIS, P. W.; PAPPAS, M. d. C. R.; RESENDE, L. V.; GRATTAPAGLIA, D. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and rna from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 13, n. 10, p. e0206085, 2018.
- ISMAIL, M.; AKHTAR, K.; KHAN, M.; KAMAL, T.; KHAN, M. A.; ASIRI, A. M.; SEO, J.; KHAN, S. B. Pollution, toxicity and carcinogenicity of organic dyes and their catalytic bio-remediation. *Current pharmaceutical design*, Bentham Science Publishers, v. 25, n. 34, p. 3645–3663, 2019.
- ISMAIL, M.; FADZIL, M.; ROSMADI, N.; RAZALI, N.; DAUD, A. M. Acid treated corn stalk adsorbent for removal of alizarin yellow dye in wastewater. In: IOP PUBLISHING. *Journal of Physics: Conference Series*. [S.l.], 2019. v. 1349, n. 1, p. 012105.
- ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and surface forces*. [S.l.]: Academic press, 2011.
- JANATA, J.; JOSOWICZ, M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. *Nature materials*, Nature Publishing Group, v. 2, n. 1, p. 19–24, 2003.
- JANG, N.-H. The coordination chemistry of DNA nucleosides on gold nanoparticles as a probe by sers. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Korean Chemical Society, v. 23, n. 12, p. 1790–1800, 2002.
- JAVADIAN, H.; VAHEDIAN, P.; TOOSI, M. Adsorption characteristics of Ni (II) from aqueous solution and industrial wastewater onto polyaniline/HMS nanocomposite powder. *Applied Surface Science*, Elsevier, v. 284, p. 13–22, 2013.
- JOSHI, S.; GARG, V.; SAINI, J.; KADIRVELU, K. Removal of toulidine blue O dye from aqueous solution by silica-iron oxide nanoparticles. *Materials Focus*, American Scientific Publishers, v. 7, n. 1, p. 140–146, 2018.
- JR, M. A. M.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. d. C.; NOGUEIRA, A. F. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química, 2012.
- KANDISA, R. V.; SAIBABA, K. N.; SHAIK, K. B.; GOPINATH, R. et al. Dye removal by adsorption: a review. *Journal of bioremediation and Biodegradation*, OMICS International, v. 7, n. 6, 2016.
- KARP, G. *Biologia celular y molecular: conceptos y experimentos (6a)*. [S.l.]: McGraw Hill Mexico, 2011.
- KARUNAKARAN, C.; BHARGAVA, K.; BENJAMIN, R. *Biosensors and bioelectronics*. [S.l.]: Elsevier, 2015.
- KASVI. *Conheça a técnica de PCR, suas aplicações e princípios*. 2018. <https://kasvi.com.br/3-etapas-pcr/>. Acessado em 23/01/2022.

- KATHERESAN, V.; KANSEDO, J.; LAU, S. Y. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. *Journal of environmental chemical engineering*, Elsevier, v. 6, n. 4, p. 4676–4697, 2018.
- KAVITA, V. DNA biosensors-a review. *J. Bioeng. Biomed. Sci*, v. 7, n. 2, p. 222, 2017.
- KHAN, Z. H. *Nanomaterials and their applications*. [S.l.]: Springer, 2018.
- KIRBY, K.; COOK, E. Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd, v. 104, n. 1, p. 254, 1967.
- KULKARNI, V.; SHAW, C. Use of Polymers and Thickeners in Semisolid and Liquid Formulations. In: _____. [S.l.: s.n.], 2016. p. 43–69. ISBN 9780128010242.
- KUMAR, P.; AGNIHOTRI, R.; WASEWAR, K. L.; USLU, H.; YOO, C. Status of adsorptive removal of dye from textile industry effluent. *Desalination and Water Treatment*, Taylor & Francis, v. 50, n. 1-3, p. 226–244, 2012.
- LAFI, R.; REZMA, S.; HAFIANE, A. Removal of toluidine blue from aqueous solution using orange peel waste (OPW). *Desalination and water treatment*, Taylor & Francis, v. 56, n. 10, p. 2754–2765, 2015.
- LAHMARA, A.; HATTABA, Z.; ZERDOUMB, R.; BOUTEMINEA, N.; DJELLABIA, R.; FILALIA, N.; GUERFIA, K. Dynamic sorption of hexavalent chromium using sustainable low-cost eggshell membrane. *DESALINATION AND WATER TREATMENT*, DESALINATION PUBL 36 WALCOTT VALLEY DRIVE,, HOPKINTON, MA 01748 USA, v. 181, p. 289–299, 2020.
- LAI, M. Y.; OOI, C. H.; LAU, Y. L. Validation of SYBR green I based closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for diagnosis of knowlesi malaria. *Malaria journal*, BioMed Central, v. 20, n. 1, p. 1–6, 2021.
- LAKSHMIPRIYA, T.; GOPINATH, S. C. An introduction to biosensors and biomolecules. In: *Nanobiosensors for biomolecular targeting*. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 1–21.
- LAVANYA, R.; ARUN, V. Standardization of DNA extraction protocol and screening of begomovirus in chilli and tomato plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Springer, v. 126, n. 4, p. 343–349, 2019.
- LEAL, A. N. R. et al. *Uso da membrana de poliacrilonitrila-polipirrol-polianilina para a remoção do corante Remazol Black B: estudo de adsorção, dessorção, cinético e termodinâmica*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Pernambuco, 2021.
- LELLIS, B.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, Elsevier, v. 3, n. 2, p. 275–290, 2019.
- LEONEL, A. G.; MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A.; CAIRES, A.; CARVALHO, S. M.; KRAMBROCK, K.; OUTON, L. E. F.; ARDISSON, J. D. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles/carboxymethyl cellulose core-shell nanohybrids for killing cancer cells in vitro. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, v. 132, p. 677–691, 2019.

- LI, C.; SUN, C.; CHEN, W.; PAN, L. Electrochemical thin film deposition of polypyrrole on different substrates. *Surface and Coatings Technology*, Elsevier, v. 198, n. 1-3, p. 474–477, 2005.
- LI, H.; ROTHBERG, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 101, n. 39, p. 14036–14039, 2004.
- LI, J.; XIE, H.; LI, Y. Fabrication of gold nanoparticles/polypyrrole composite-modified electrode for sensitive hydroxylamine sensor design. *Journal of Solid State Electrochemistry*, Springer, v. 16, n. 2, p. 795–802, 2012.
- LI, X.; JIANG, L.; ZHAN, Q.; QIAN, J.; HE, S. Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 332, n. 2-3, p. 172–179, 2009.
- LI, X.; ZHANG, J.; GU, H. Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Langmuir*, ACS Publications, v. 27, n. 10, p. 6099–6106, 2011.
- LIM, J.; YEAP, S. P.; CHE, H. X.; LOW, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale research letters*, Springer, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2013.
- LIMA, E. C.; ROYER, B.; VAGHETTI, J. C.; SIMON, N. M.; CUNHA, B. M. da; PAVAN, F. A.; BENVENUTTI, E. V.; CATALUÑA-VESES, R.; AIROLDI, C. Application of Brazilian pine-fruit shell as a biosorbent to removal of reactive red 194 textile dye from aqueous solution: kinetics and equilibrium study. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 155, n. 3, p. 536–550, 2008.
- LIMA, E. M. de A.; HOLANDA, V. N.; RATKOVSKI, G. P.; SILVA, W. V. da; NASCIMENTO, P. H. do; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. de; MELO, C. P. de. A new biocompatible silver/polypyrrole composite with in vitro antitumor activity. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 128, p. 112314, 2021.
- LIN, J.; WANG, L. Comparison between linear and non-linear forms of pseudo-first-order and pseudo-second-order adsorption kinetic models for the removal of methylene blue by activated carbon. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, Springer, v. 3, n. 3, p. 320–324, 2009.
- LIU, C.; OMER, A.; OUYANG, X.-k. Adsorptive removal of cationic methylene blue dye using carboxymethyl cellulose/k-carrageenan/activated montmorillonite composite beads: Isotherm and kinetic studies. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, v. 106, p. 823–833, 2018.
- LIU, H.; DING, X.; ZHOU, G.; LI, P.; WEI, X.; FAN, Y. Electrospinning of nanofibers for tissue engineering applications. *Journal of Nanomaterials*, Hindawi Publishing Corp., v. 2013, p. 3, 2013.
- LIU, L.; CHANG, S.; WANG, Y.; ZHAO, H.; WANG, S.; ZHENG, C.; DING, Y.; REN, S.; ZHANG, J.; GUO, Y.-R. Facile fabrication of ion-imprinted Fe_3O_4 /carboxymethyl cellulose magnetic biosorbent: removal and recovery properties for trivalent La^{3+} ions. *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 41, p. 25258–25265, 2021.

- LIU, Z.; SU, X. A novel fluorescent DNA sensor for ultrasensitive detection of helicobacter pylori. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 87, p. 66–72, 2017.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. Molecular cell biology 4th edition. National Center for Biotechnology Information's Bookshelf, 2000.
- LOO, A. H.; SOFER, Z.; BOUŠŤ, D.; ULBRICH, P.; BONANNI, A.; PUMERA, M. Carboxylic carbon quantum dots as a fluorescent sensing platform for DNA detection. *ACS applied materials & interfaces*, ACS Publications, v. 8, n. 3, p. 1951–1957, 2016.
- LU, C.-H.; YANG, H.-H.; ZHU, C.-L.; CHEN, X.; CHEN, G.-N. A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie*, Wiley Online Library, v. 121, n. 26, p. 4879–4881, 2009.
- LU, X.; ZHOU, J.; ZHAO, Y.; QIU, Y.; LI, J. Room temperature ionic liquid based polystyrene nanofibers with superhydrophobicity and conductivity produced by electrospinning. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, v. 20, n. 10, p. 3420–3424, 2008.
- LUCENA-AGUILAR, G.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. M.; BARBERÁN-ACEITUNO, C.; CARRILLO-AVILA, J. A.; LÓPEZ-GUERRERO, J. A.; AGUILAR-QUESADA, R. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 14, n. 4, p. 264–270, 2016.
- MA, H.; LI, Z.; XUE, N.; CHENG, Z.; MIAO, X. A gold nanoparticle based fluorescent probe for simultaneous recognition of single-stranded DNA and double-stranded DNA. *Microchimica Acta*, Springer, v. 185, n. 2, p. 1–6, 2018.
- MACIEL, B. G.; SILVA, R. J. da; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MEDINA-LLAMAS, J. C.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; MELO, C. P. de. Magnetic extraction and purification of DNA from whole human blood using a γ -Fe₂O₃@Chitosan@Polyaniline hybrid nanocomposite. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 197, p. 100–108, 2018.
- MAGHSOUDI, A. S.; HASSANI, S.; MIRNIA, K.; ABDOLLAHI, M. Recent advances in nanotechnology-based biosensors development for detection of arsenic, lead, mercury, and cadmium. *International Journal of Nanomedicine*, Dove Press, v. 16, p. 803, 2021.
- MALAYERI, F. H.; SOHRABI, M.; GHOURCHIAN, H. Magnetic multi-walled carbon nanotube as an adsorbent for toluidine blue o removal from aqueous solution. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Iranian Nanotechnology Society, v. 8, n. 2, p. 79–86, 2012.
- MALHOTRA, B. D.; ALI, M. A. Nanomaterials in biosensors: Fundamentals and applications. *Nanomaterials for biosensors*, Elsevier, p. 1, 2018.
- MALINOWSKA, S.; GNIADK, M.; RAPECKI, T.; KUREK, E.; STOJEK, Z.; DONTEN, M. Polypyrrole–gold nanostructured composite, active and durable electrocatalytic material. *Journal of Solid State Electrochemistry*, Springer, v. 18, n. 11, p. 3049–3055, 2014.
- MANDELA, N. Lighting your way to a better future. *Speech delivered at the launch of Mindset Network. Planetarium, University of Witwatersrand, Johannesburg, South Africa*, v. 16, 2003.

MASEL, R. I. *Principles of adsorption and reaction on solid surfaces*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1996. v. 3.

MATERSKA, M.; OLSZÓWKA, K.; CHILCZUK, B.; STOCHMAL, A.; PECIO, Ł.; PACHOLCZYK-SIENICKA, B.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; MASULLO, M. Polyphenolic profiles in lettuce (*lactuca sativa* L.) after $CaCl_2$ treatment and cold storage. *European Food Research and Technology*, Springer, v. 245, n. 3, p. 733–744, 2019.

MATSUMOTO, M.; KANEKO, K.; HARA, M.; MATSUI, M.; MORITA, K.; MARUYAMA, T. Covalent immobilization of gold nanoparticles on a plastic substrate and subsequent immobilization of biomolecules. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 38, p. 23409–23417, 2021.

MCCONNELL, E. M.; NGUYEN, J.; LI, Y. Aptamer-based biosensors for environmental monitoring. *Frontiers in chemistry*, Frontiers Media SA, v. 8, p. 434, 2020.

MEDEIROS, E. S.; FILHO, J. O.; MATTOSO, L. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 7, n. 2, p. 62–77, 2012.

MEDINA-LLAMAS, J. C.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; ANDRADE, C. A. S.; ALVES, K. G. B.; MELO, C. P. de. Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science*, Elsevier, v. 434, p. 167–174, 2014.

MISHRA, A. K. Conducting polymers: concepts and applications. *Journal of Atomic, Molecular, Condensed Matter and Nano Physics*, v. 5, n. 2, p. 159–193, 2018.

MODY, V. V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H. R. Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 2, n. 4, p. 282, 2010.

MOGHA, N. K.; SAHU, V.; SHARMA, R. K.; MASRAM, D. T. Reduced graphene oxide nanoribbon immobilized gold nanoparticle based electrochemical DNA biosensor for the detection of mycobacterium tuberculosis. *Journal of Materials Chemistry B*, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 31, p. 5181–5187, 2018.

MOHAMMED, I.; AFAGWU, C. C.; ADJEI, S.; KADAFUR, I. B.; JAMAL, M. S.; AWOTUNDE, A. A. A review on polymer, gas, surfactant and nanoparticle adsorption modeling in porous media. *Oil & Gas Science and Technology–Revue d'IFP Energies nouvelles*, EDP Sciences, v. 75, p. 77, 2020.

MOOSAVI, S.; LAI, C. W.; GAN, S.; ZAMIRI, G.; PIVEHZHANI, O. A.; JOHAN, M. R. Application of efficient magnetic particles and activated carbon for dye removal from wastewater. *ACS omega*, ACS Publications, v. 5, n. 33, p. 20684–20697, 2020.

MORSY, S. A. G. Z.; TAJUDIN, A. A.; ALI, M.; MOHAMAD, S.; SHARIFF, F. M. Current development in decolorization of synthetic dyes by immobilized laccases. *Frontiers in microbiology*, Frontiers, p. 2350, 2020.

MUBARAK, N. M.; KHALID, M.; WALVEKAR, R.; NUMAN, A. *Contemporary Nanomaterials in Material Engineering Applications*. [S.l.]: Springer, 2021.

- MUÑOZ-BERBEL, X.; GODINO, N.; LACZKA, O.; BALDRICH, E.; MUÑOZ, F. X.; CAMPO, F. J. d. Impedance-based biosensors for pathogen detection. In: *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems*. [S.l.]: Springer, 2008. p. 341–376.
- MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.
- NAGRAIK, R.; SETHI, S.; SHARMA, A.; KUMAR, D.; KUMAR, D.; KUMAR, A. P. Ultrasensitive nanohybrid electrochemical sensor to detect lipI32 gene of leptospira interrogans. *Chemical Papers*, Springer, v. 75, n. 10, p. 5453–5462, 2021.
- NAIM, A. F. A.; EL-SHAMY, A. G. A new reusable adsorbent of polyvinyl alcohol/magnesium peroxide (PVA/ MgO_2) for highly selective adsorption and dye removal. *Materials Chemistry and Physics*, Elsevier, v. 270, p. 124820, 2021.
- NALWA, H. S. *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices, Ten-Volume Set*. [S.l.]: Academic Press, 2000. v. 1.
- NAMBIAR, S.; YEOW, J. T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 26, n. 5, p. 1825–1832, 2011.
- NASCIMENTO, K. T. do; RATKOVSKI, G. P.; PEDRO, G. d. C.; GORZA, F. D.; SILVA, R. J. da; MELO, C. P. de. Intrinsically conductive polymers hybrid bilayer films for the fluorescence molecular diagnosis of the zika virus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 208, p. 112120, 2021.
- NASCIMENTO, R. F. d.; LIMA, A. C. A. d.; VIDAL, C. B.; MELO, D. d. Q.; RAULINO, G. S. C. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. 2020.
- NEJATI, K.; DADASHPOUR, M.; GHARIBI, T.; MELLATYAR, H.; AKBARZADEH, A. Biomedical applications of functionalized gold nanoparticles: a review. *Journal of Cluster Science*, Springer, p. 1–16, 2021.
- NIU, C.; KEBEDE, H.; AULD, D. L.; WOODWARD, J. E.; BUROW, G.; WRIGHT, R. J. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 16, 2008.
- NIZAM, N. U. M.; HANAFIAH, M. M.; MAHMOUDI, E.; HALIM, A. A.; MOHAMMAD, A. W. The removal of anionic and cationic dyes from an aqueous solution using biomass-based activated carbon. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2021.
- OGHOLBEYG, A. B.; KIANVASH, A.; HAJALILOU, A.; ABOUZARI-LOTF, E.; ZAREB-KOHAN, A. Cytotoxicity characteristics of green assisted-synthesized superparamagnetic maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, Springer, v. 29, n. 14, p. 12135–12143, 2018.
- OH, H. H.; KO, Y.-G.; UYAMA, H.; PARK, W. H.; CHO, D.; KWON, O. H. Fabrication and characterization of thermoresponsive polystyrene nanofibrous mats for cultured cell recovery. *BioMed research international*, Hindawi, v. 2014, 2014.

OKSUZ, E.; MALHAN, S.; UNAL, S.; ARSLAN, H.; METAN, G.; KAVUNCUBASI, S.; DEPARTMENT, R. *Health Technology Assessment Report on the Rapid Molecular Diagnostic Tests Used for Identifying the Causing Agent in the Blood Sample in Sepsis*. [S.l.: s.n.], 2019. ISBN 978-975-590-672-0.

OSMUNDSON, T. W.; EYRE, C. A.; HAYDEN, K. M.; DHILLON, J.; GARBELOTTO, M. M. Back to basics: An evaluation of naoh and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Molecular ecology resources*, Wiley Online Library, v. 13, n. 1, p. 66–74, 2013.

ÖZER, B. O.; ÇETE, S. Development of a novel biosensor based on a polypyrrole–dodecylbenzene sulphonate (ppy–dbs) film for the determination of amperometric cholesterol. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, Taylor & Francis, v. 45, n. 4, p. 824–832, 2017.

PARK, S.; CHOI, K. S.; LEE, D.; KIM, D.; LIM, K. T.; LEE, K.-H.; SEONWOO, H.; KIM, J. Eggshell membrane: Review and impact on engineering. *Biosystems engineering*, Elsevier, v. 151, p. 446–463, 2016.

PATRICK, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*. [S.l.]: Oxford university press, 2013.

PEDRO, G. C.; GORZA, F. D.; SILVA, R. J. da; NASCIMENTO, K. T. do; MEDINA-LLAMAS, J. C.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; MELO, C. P. de. A novel nucleic acid fluorescent sensing platform based on nanostructured films of intrinsically conducting polymers. *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, v. 1047, p. 214–224, 2019.

PEÑA-BAHAMONDE, J.; NGUYEN, H. N.; FANOURAKIS, S. K.; RODRIGUES, D. F. Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences. *Journal of nanobiotechnology*, Springer, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2018.

PIASKOWSKI, K.; ŚWIDERSKA-DĄBROWSKA, R.; ZARZYCKI, P. K. Dye removal from water and wastewater using various physical, chemical, and biological processes. *Journal of AOAC International*, Oxford University Press, v. 101, n. 5, p. 1371–1384, 2018.

PIRO, B.; MATTANA, G.; ZRIG, S.; ANQUETIN, G.; BATTAGLINI, N.; CAPITAO, D.; MAURIN, A.; REISBERG, S. Fabrication and use of organic electrochemical transistors for sensing of metabolites in aqueous media. *Applied Sciences*, MDPI, v. 8, n. 6, p. 928, 2018.

PLAZINSKI, W.; RUDZINSKI, W. Kinetics of adsorption at solid/solution interfaces controlled by intraparticle diffusion: a theoretical analysis. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, v. 113, n. 28, p. 12495–12501, 2009.

POH, T. Y.; ALI, N.; AOGÁIN, M. M.; KATHAWALA, M. H.; SETYAWATI, M. I.; NG, K. W.; CHOTIRMALL, S. H. Inhaled nanomaterials and the respiratory microbiome: clinical, immunological and toxicological perspectives. *Particle and fibre toxicology*, BioMed Central, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2018.

POSIK, P. A. *A análise de DNA por eletroforese*. 2016.

QIE, L.; YUAN, L.-X.; ZHANG, W.-X.; CHEN, W.-M.; HUANG, Y.-H. Revisit of polypyrrole as cathode material for lithium-ion battery. *Journal of The Electrochemical Society*, The Electrochemical Society, v. 159, n. 10, p. A1624–A1629, 2012.

RADWAN, S. H.; AZZAZY, H. M. Gold nanoparticles for molecular diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, Taylor & Francis, v. 9, n. 5, p. 511–524, 2009.

RAHAMAN, M.; ALDALBAHI, A.; ALMOIQLI, M.; ALZAHLY, S. Chemical and electrochemical synthesis of polypyrrole using carrageenan as a dopant: Polypyrrole/multi-walled carbon nanotube nanocomposites. *Polymers*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 10, n. 6, p. 632, 2018.

RAJAK, A.; SANDI, A.; HAPIDIN, D. A.; MUNIR, M. M.; ISKANDAR, F. et al. Fabrication of Electrospun Nanofiber from Waste Expanded Polystyrene for Aerosol Filtration Application. *Advanced Science Letters*, American Scientific Publishers, v. 23, n. 6, p. 5729–5732, 2017.

RAMESAN, M. Synthesis, characterization, and conductivity studies of polypyrrole/copper sulfide nanocomposites. *Journal of applied polymer science*, Wiley Online Library, v. 128, n. 3, p. 1540–1546, 2013.

RAMOS-SONO, D.; LAUREANO, R.; RUEDA, D.; GILMAN, R. H.; ROSA, A. L.; RUIZ, J.; LEÓN, R.; SHEEN, P.; ZIMIC, M. An electrochemical biosensor for the detection of Mycobacterium tuberculosis DNA from sputum and urine samples. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 15, n. 10, p. e0241067, 2020.

RANA, K.; MITTAL, J.; NARANG, J.; MISHRA, A.; PUDAKE, R. N. Graphene based electrochemical DNA biosensor for detection of False Smut of Rice (*Ustilaginoidea virens*). *The plant pathology journal*, The Korean Society of Plant Pathology, v. 37, n. 3, p. 291, 2021.

RÁPÓ, E.; TONK, S. Factors affecting synthetic dye adsorption; desorption studies: A review of results from the last five years (2017–2021). *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 26, n. 17, p. 5419, 2021.

RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. *Sensing and bio-sensing research*, Elsevier, v. 16, p. 19–31, 2017.

RATKOVSKI, G. P. et al. Desenvolvimento de compósitos e suas aplicações para sensoriamento, remediação ambiental, purificação de DNA, e atividade antitumoral e bactericida. Universidade Federal de Pernambuco, 2020.

RAUF, M.; QADRI, S. M.; ASHRAF, S.; AL-MANSOORI, K. M. Adsorption studies of toluidine blue from aqueous solutions onto gypsum. *Chemical engineering journal*, Elsevier, v. 150, n. 1, p. 90–95, 2009.

RAVICHANDRAN, R.; SUNDARRAJAN, S.; VENUGOPAL, J. R.; MUKHERJEE, S.; RAMAKRISHNA, S. Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, The Royal Society, v. 7, n. Suppl 5, p. S559–S579, 2010.

REDDY, P. R.; RAJU, N. Gel-electrophoresis and its applications. *Gel Electrophoresis-Principles and basics*, InTech, p. 15–32, 2012.

REIS, E. d. S.; GORZA, F. D.; PEDRO, G. d. C.; MACIEL, B. G.; SILVA, R. J. da; RATKOVSKI, G. P.; MELO, C. P. de. (Maghemite/Chitosan/Polypyrrole) nanocomposites for the efficient removal of Cr (VI) from aqueous media. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier, v. 9, n. 1, p. 104893, 2021.

REVIEW, T. *Princeton Review AP Biology Prep, 2021: 3 Practice Tests + Complete Content Review + Strategies & Techniques*. Random House Children's Books, 2020. (College Test Preparation). ISBN 9780525569817. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=awfhDwAAQBAJ>>.

REYNOLDS, J. R.; THOMPSON, B. C.; SKOTHEIM, T. A. *Conjugated Polymers: Properties, Processing, and Applications*. [S.l.]: CRC Press, 2019.

RIOS-DONATO, N.; PEÑA-FLORES, A.; KATIME, I.; LEYVA-RAMOS, R.; MENDIZÁBAL, E. Kinetics and thermodynamics of adsorption of red dye 40 from acidic aqueous solutions onto a novel chitosan sulfate. *Afinidad*, v. 74, n. 579, 2017.

RNJAK-KOVACINA, J.; WEISS, A. S. Increasing the pore size of electrospun scaffolds. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 17, n. 5, p. 365–372, 2011.

ROCHA, H. D. d. et al. Membranas poliméricas para remediação ambiental: ação bactericida e remoção de corantes orgânicos e metais pesados. Universidade Federal de Pernambuco, 2021.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. In: *Plant molecular biology manual*. [S.l.]: Springer, 1989. p. 73–83.

ROHWERDER, M. Conducting polymers for corrosion protection: a review. *International Journal of Materials Research*, Carl Hanser Verlag, v. 100, n. 10, p. 1331–1342, 2009.

SAEED, A. A.; SÁNCHEZ, J. L. A.; O'SULLIVAN, C. K.; ABBAS, M. N. DNA biosensors based on gold nanoparticles-modified graphene oxide for the detection of breast cancer biomarkers for early diagnosis. *Bioelectrochemistry*, Elsevier, v. 118, p. 91–99, 2017.

SAHU, S. K.; THANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Notices*, Hindawi, v. 2012, 2012.

SALEH, T. A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, Elsevier, v. 20, p. 101067, 2020.

SALOMÃO, P. E. A. Produção e aplicação de biossensores: Uma Breve Revisão. *Research, Society and Development*, Grupo de Pesquisa Metodologias em Ensino e Aprendizagem em Ciências, v. 7, n. 3, p. e1373282, 2018.

SAMSAMI, S.; MOHAMADIZANIANI, M.; SARRAFZADEH, M.-H.; RENE, E. R.; FIROOZBAHR, M. Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: Overview and perspectives. *Process safety and environmental protection*, Elsevier, v. 143, p. 138–163, 2020.

SAMSURI, N. D.; MUKHTAR, W. M.; RASHID, A. R. A.; DASUKI, K. A.; YUSSUF, A. A. R. H. A. Synthesis methods of gold nanoparticles for localized surface plasmon resonance (LSPR) sensor applications. In: EDP SCIENCES. *EPJ Web of Conferences*. [S.l.], 2017. v. 162, p. 01002.

SANKHYAN, A.; RAO, V. *Human Origins, Genome and People of India: Genomic, Palaeontological and Archaeological Perspectives*. [S.l.]: New Delhi (India): Allied Publishers, 2007.

- SANTOS, R.; LOPES, U. V.; CLEMENT, D.; PIRES, J. L.; LIMA, E. M.; MESSIAS, T. B.; GRAMACHO, K. P. A protocol for large scale genomic DNA isolation for cacao genetics analysis. *African Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 7, p. 814–820, 2014.
- SANTOS, R. F.; ANDRADE, C. A.; SANTOS, C. G. dos; MELO, C. P. de. Visible luminescence in polyaniline/(gold nanoparticle) composites. *Journal of nanoparticle research*, Springer, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2013.
- SAOUDI, B.; JAMMUL, N.; ABEL, M.-L.; CHEHIMI, M. M.; DODIN, G. Dna adsorption onto conducting polypyrrole. *Synthetic Metals*, Elsevier, v. 87, n. 2, p. 97–103, 1997.
- SAOUDI, B.; JAMMUL, N.; CHEHIMI, M. M.; MCCARTHY, G. P.; ARMES, S. P. *Adsorption of DNA onto polypyrrole–silica nanocomposites*. [S.l.]: Elsevier, 1997. 269–273 p.
- SARSBY, R. W. *Geosynthetics in civil engineering*. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2006.
- SASSO, C.; BENEVENTI, D.; ZENO, E.; CHAUSSY, D.; PETIT-CONIL, M.; BELGACEM, N. Polypyrrole and polypyrrole/wood-derived materials conducting composites: a review. *BioResources*, v. 6, n. 3, 2011.
- SELVAMUTHU, D.; DAS, D. *Introduction to statistical methods, design of experiments and statistical quality control*. [S.l.]: Springer, 2018.
- SELVAN, T.; SPATZ, J. P.; KLOK, H.-A.; MÖLLER, M. Gold–polypyrrole core–shell particles in diblock copolymer micelles. *Advanced Materials*, Wiley Online Library, v. 10, n. 2, p. 132–134, 1998.
- SHARMA, G. K.; JAMES, N. R. Electrospinning: The technique and applications.
- SHARMA, S.; KUMAR, P.; GAMBHIR, G.; KUMAR, R.; SRIVASTAVA, D. Assessment of genetic diversity in lettuce (*Lactuca sativa* L.) germplasm using RAPD markers. *3 Biotech*, Springer, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2018.
- SHARMA, S. K. *Green Chemistry for dyes removal from waste water: research trends and applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015.
- SHI, R.; LEWIS, R. S.; PANTHEE, D. R. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *Plos one*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 13, n. 12, p. e0203011, 2018.
- SHI, R.; PANTHEE, D. R. A novel plant DNA extraction method using filter paper-based 96-well spin plate. *Planta*, Springer, v. 246, n. 3, p. 579–584, 2017.
- SHI, Y.; PENG, L.; YU, G. Nanostructured conducting polymer hydrogels for energy storage applications. *Nanoscale*, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 30, p. 12796–12806, 2015.
- SHINDHAL, T.; RAKHOLIYA, P.; VARJANI, S.; PANDEY, A.; NGO, H. H.; GUO, W.; NG, H. Y.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on advances in the practices and perspectives for the treatment of dye industry wastewater. *Bioengineered*, Taylor & Francis, v. 12, n. 1, p. 70–87, 2021.
- SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J.; MACDIARMID, A. G.; CHIANG, C. K.; HEEGER, A. J. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene,(CH) x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, Royal Society of Chemistry, n. 16, p. 578–580, 1977.

SHOWN, I.; GANGULY, A.; CHEN, L.-C.; CHEN, K.-H. Conducting polymer-based flexible supercapacitor. *Energy Science & Engineering*, Wiley Online Library, v. 3, n. 1, p. 2–26, 2015.

SHRIVASTAVA, A. *Introduction to plastics engineering*. [S.l.]: William Andrew, 2018.

SIKA, K. C.; KEFELA, T.; ADOUKONOU-SAGBADJA, H.; AHOTON, L.; SAIDOU, A.; BABA-MOUSSA, L.; BAPTISTE, L. J.; KOTCONI, S. O.; GACHOMO, E. W. A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. *Plant Gene*, Elsevier, v. 1, p. 43–45, 2015.

SILVA, G. A. O. d.; ARAÚJO, C. R. M.; GONSALVES, A. d. A. Evaluation of eggshell membrane as an alternative biopolymeric matrix for delivery of nimesulide. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, Departamento de Farmácia, Facultad de Ciencias, Universidade Nacional da . . . , v. 50, n. 2, p. 550–570, 2021.

SILVA, R. J. da; MOJICA-SÁNCHEZ, L. C.; GORZA, F. D.; PEDRO, G. C.; MACIEL, B. G.; RATKOVSKI, G. P.; ROCHA, H. D. da; NASCIMENTO, K. T. do; MEDINA-LLAMAS, J. C.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E. et al. Kinetics and thermodynamic studies of methyl orange removal by polyvinylidene fluoride-pedot mats. *Journal of Environmental Sciences*, Elsevier, v. 100, p. 62–73, 2021.

SILVA, R. J. da; PEDRO, G. C.; GORZA, F. D.; MACIEL, B. G.; RATKOVSKI, G. P.; MOJICA-SÁNCHEZ, L. C.; MEDINA-LLAMAS, J. C.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MELO, C. P. de. DNA purification Using a Novel γ -Fe₂O₃/PEDOT Hybrid Nanocomposite. *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, p. 338762, 2021.

SINDEN, R. R. *DNA structure and function*. [S.l.]: Elsevier, 2012.

SINGH, B.; SINGH, A. K. *Marker-assisted plant breeding: principles and practices*. [S.l.]: Springer, 2015.

SINGH, K.; KUMAR, A.; MISHRA, P.; GUPTA, S. P. Binding aspects of carboxymethyl cellulose onto polymeric surface from its aqueous solutions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, Taylor & Francis, v. 42, n. 12, p. 1733–1746, 2021.

SITARAM, S. P.; STOFFER, J. O.; O'KEEFE, T. J. Application of conducting polymers in corrosion protection. *Journal of Coatings Technology*, Springer, v. 69, n. 866, p. 65–69, 1997.

SITTHICHAI, S.; PILAPONG, C.; THONGTEM, T.; THONGTEM, S. Cmc-coated Fe₃O₄ nanoparticles as new mri probes for hepatocellular carcinoma. *Applied Surface Science*, Elsevier, v. 356, p. 972–977, 2015.

SOLTANI, A.; FARAMARZI, M.; PARSA, S. A. M. A review on adsorbent parameters for removal of dye products from industrial wastewater. *Water Quality Research Journal*, IWA Publishing, v. 56, n. 4, p. 181–193, 2021.

SONG, C.; WANG, G.-Y.; KONG, D.-M. A facile fluorescence method for versatile biomolecular detection based on pristine α -Fe₂O₃ nanoparticle-induced fluorescence quenching. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 68, p. 239–244, 2015.

SOOD, A.; ARORA, V.; SHAH, J.; KOTNALA, R.; JAIN, T. K. Ascorbic acid-mediated synthesis and characterisation of iron oxide/gold core-shell nanoparticles. *Journal of Experimental Nanoscience*, Taylor & Francis, v. 11, n. 5, p. 370–382, 2016.

- SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A. A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 16, n. 2, p. 251, 2012.
- SRINIVASAN, B.; TUNG, S. Development and applications of portable biosensors. *Journal of laboratory automation*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 20, n. 4, p. 365–389, 2015.
- ŠTEFÚNOVÁ, V.; LANCÍKOVÁ, V.; BEŽO, M.; ŽIAROVSKÁ, J.; RAŽNÁ, K.; TEREŇ, M. et al. The effect of DNA isolation and its applicability in the PCR analysis of lettuce (*lactuca sativa* L.). *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, Slovak University of Agriculture in Nitra, v. 16, n. 4, p. 99–102, 2013.
- SU, H.; LI, S.; JIN, Y.; XIAN, Z.; YANG, D.; ZHOU, W.; MANGARAN, F.; LEUNG, F.; SITHAMPARANATHAN, G.; KERMAN, K. Nanomaterial-based biosensors for biological detections. *Advanced Health Care Technologies*, Dove Press, v. 3, p. 19–29, 2017.
- SU, W.-F. *Principles of polymer design and synthesis*. [S.l.]: Springer, 2013.
- SUJA, P.; RESHMI, C.; SAGITHA, P.; SUJITH, A. Electrospun nanofibrous membranes for water purification. *Polymer reviews*, Taylor & Francis, v. 57, n. 3, p. 467–504, 2017.
- SUO, H.; XU, L.; XUE, Y.; QIU, X.; HUANG, H.; HU, Y. Ionic liquids-modified cellulose coated magnetic nanoparticles for enzyme immobilization: Improvement of catalytic performance. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 234, p. 115914, 2020.
- SYAIFUDIN, M. Gel electrophoresis: The applications and its improvement with nuclear technology. In: AIP PUBLISHING LLC. *AIP Conference Proceedings*. [S.l.], 2021. v. 2331, n. 1, p. 050008.
- TAMARI, F.; HINKLEY, C. S. Extraction of DNA from plant tissue: review and protocols. *Sample preparation techniques for soil, plant, and animal samples*, Springer, p. 245–263, 2016.
- TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Hindawi, v. 2009, 2009.
- TANG, Y.; REN, Y.; SHI, X. Bifunctional mesoporous zirconium phosphonates for delivery of nucleic acids. *Inorganic chemistry*, ACS Publications, v. 52, n. 3, p. 1388–1397, 2013.
- TEH, C. M.; MOHAMED, A. R. Roles of titanium dioxide and ion-doped titanium dioxide on photocatalytic degradation of organic pollutants (phenolic compounds and dyes) in aqueous solutions: A review. *Journal of Alloys and Compounds*, Elsevier, v. 509, n. 5, p. 1648–1660, 2011.
- THOMPSON, M. M.; HRABAK, E. M. Capture and storage of plant genomic DNA on a readily available cellulose matrix. *Biotechniques*, Future Science, v. 65, n. 5, p. 285–287, 2018.
- TSAI, W.; YANG, J.; LAI, C.; CHENG, Y.; LIN, C.; YEH, C. Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource technology*, Elsevier, v. 97, n. 3, p. 488–493, 2006.

- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, Royal Society of Chemistry, v. 11, p. 55–75, 1951.
- TYAGI, H.; KUSHWAHA, A.; KUMAR, A.; ASLAM, M. A facile pH controlled citrate-based reduction method for gold nanoparticle synthesis at room temperature. *Nanoscale research letters*, Springer, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2016.
- UDDIN, M. J.; AMPIAW, R. E.; LEE, W. Adsorptive removal of dyes from wastewater using a metal-organic framework: A review. *Chemosphere*, Elsevier, v. 284, p. 131314, 2021.
- UYAR, T.; BESENBACHER, F. Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer*, Elsevier, v. 49, n. 24, p. 5336–5343, 2008.
- UZMA, N.; SALAR, B. K. M.; KUMAR, B. S.; AZIZ, N.; DAVID, M. A.; REDDY, V. D. Impact of organic solvents and environmental pollutants on the physiological function in petrol filling workers. *International journal of environmental research and public health*, Molecular Diversity Preservation International, v. 5, n. 3, p. 139–146, 2008.
- VASILIEV, V. V.; MOROZOV, E. V. *Advanced mechanics of composite materials and structural elements*. [S.l.]: Newnes, 2013.
- VEGA-VELA, N. E.; SÁNCHEZ, M. I. C. Isolation of high-quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns. *Agronomía Colombiana*, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, v. 29, n. 3, p. 349–357, 2011.
- VERMA, V.; GOYAL, M.; KALA, D.; GUPTA, S.; KUMAR, D.; KAUSHAL, A. Recent advances in the diagnosis of leptospirosis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, IMR Press, v. 25, n. 9, p. 1655–1681, 2020.
- VIEGAS, R. M.; CAMPINAS, M.; COSTA, H.; ROSA, M. J. How do the hsdm and boyd's model compare for estimating intraparticle diffusion coefficients in adsorption processes. *Adsorption*, Springer, v. 20, n. 5-6, p. 737–746, 2014.
- VITAMIN, P. Formulation and physical characterization of microemulsions based carboxymethyl cellulose as vitamin c carrier. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, v. 19, n. 1, p. 275–283, 2015.
- VLAD, M.; ANDRONESCU, E.; GRUMEZESCU, A. M.; FICAI, A.; VOICU, G.; BLEOTU, C.; CHIFIRIUC, M. C. Carboxymethyl-cellulose/ Fe_3O_4 nanostructures for antimicrobial substances delivery. *Bio-Medical Materials and Engineering*, IOS Press, v. 24, n. 3, p. 1639–1646, 2014.
- WANG, L.; TANG, B.; ZHOU, J.; ZHAO, H.; CHEN, W.; WANG, J. Sunlight-driven photothermal effect of composite eggshell membrane coated with graphene oxide and gold nanoparticles. *Applied Sciences*, MDPI, v. 9, n. 20, p. 4384, 2019.
- WANG, M.-m.; WANG, L. Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose/organic montmorillonite nanocomposites and its adsorption behavior for Congo Red dye. *Water Science and Engineering*, Elsevier, v. 6, n. 3, p. 272–282, 2013.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. et al. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953.

WEI, Q.; ZHANG, P.; LIU, T.; PU, H.; SUN, D.-W. A fluorescence biosensor based on single-stranded DNA and carbon quantum dots for acrylamide detection. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 356, p. 129668, 2021.

WIKIFARMER. *Lettuce Plant Wiki. Info Uses*. 2021. <<https://wikifarmer.com/lettuce-plant-wiki-info-uses/>>. Acessado em 23/06/2021.

WOLFE, K. A.; BREADMORE, M. C.; FERRANCE, J. P.; POWER, M. E.; CONROY, J. F.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. *Electrophoresis*, Wiley Online Library, v. 23, n. 5, p. 727–733, 2002.

WORCH, E. *Adsorption technology in water treatment: fundamentals, processes, and modeling*. [S.l.]: Walter de Gruyter, 2012.

WU, Q.; CARLSON, K.; CHENG, Q.; WANG, X.; LI, Z. Interactions between Cationic Dye Toluidine Blue and Fibrous Clay Minerals. *Crystals*, MDPI, v. 11, n. 6, p. 708, 2021.

XIA, X.; ZHOU, Z.; WU, S.; WANG, D.; ZHENG, S.; WANG, G. Adsorption removal of multiple dyes using biogenic selenium nanoparticles from an escherichia coli strain overexpressed selenite reductase csrf. *Nanomaterials*, MDPI, v. 8, n. 4, p. 234, 2018.

XIN, Y.; LI, C.; LIU, J.; LIU, J.; LIU, Y.; HE, W.; GAO, Y. Adsorption of heavy metal with modified eggshell membrane and the in situ synthesis of Cu–Ag/modified eggshell membrane composites. *Royal Society Open Science*, The Royal Society, v. 5, n. 9, p. 180532, 2018.

XU, J.; CHEN, D.; YANG, Y.; GONG, H.; GAO, W.; XIAO, H. A one step method for isolation of genomic DNA using multi-amino modified magnetic nanoparticles. *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 6, p. 3324–3332, 2021.

XU, W.; CHEN, Y.; ZHANG, W.; LI, B. Fabrication of graphene oxide/bentonite composites with excellent adsorption performances for toluidine blue removal from aqueous solution. *Advanced Powder Technology*, Elsevier, v. 30, n. 3, p. 493–501, 2019.

XUE, K.; XU, Y.; SONG, W. One-step synthesis of 3D dendritic gold@polypyrrole nanocomposites via a simple self-assembly method and their electrocatalysis for H₂O₂. *Electrochimica acta*, Elsevier, v. 60, p. 71–77, 2012.

YAN, J.-K.; MA, H.-L.; CAI, P.-F.; WU, J.-Y. Highly selective and sensitive nucleic acid detection based on polysaccharide-functionalized silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier, v. 134, p. 17–21, 2015.

YANG, S.-P.; CHEN, S.-R.; LIU, S.-W.; TANG, X.-Y.; QIN, L.; QIU, G.-H.; CHEN, J.-X.; CHEN, W.-H. Platforms formed from a three-dimensional Cu-based zwitterionic metal–organic framework and probe ss-DNA: Selective fluorescent biosensors for human immunodeficiency virus 1 ds-DNA and sudan virus rna sequences. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 87, n. 24, p. 12206–12214, 2015.

YANG, X.; WEI, S.; LIU, B.; GUO, D.; ZHENG, B.; FENG, L.; LIU, Y.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; LUO, L.; HUANG, D. A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*lactuca sativa*. l) varieties. *Horticulture research*, Nature Publishing Group, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2018.

- YASEEN, D.; SCHOLZ, M. Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. *International journal of environmental science and technology*, Springer, v. 16, n. 2, p. 1193–1226, 2019.
- YE, J.; WANG, B.; XIONG, J.; SUN, R. Enhanced fluorescence and structural characteristics of carboxymethyl cellulose/Eu (III) nano-complex: Influence of reaction time. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 135, p. 57–63, 2016.
- YOLA, M. L.; EREN, T.; ATAR, N. A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@Au nanoparticles decorated graphene oxide. *Electrochimica Acta*, Elsevier, v. 125, p. 38–47, 2014.
- ZENNIFER, A.; SENTHILVELAN, P.; SETHURAMAN, S.; SUNDARAMURTHI, D. Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier, v. 256, p. 117561, 2021.
- ZHANG, R.-C.; SUN, D.; ZHANG, R.; LIN, W.-F.; MACIAS-MONTERO, M.; PATEL, J.; ASKARI, S.; MCDONALD, C.; MARIOTTI, D.; MAGUIRE, P. Gold nanoparticle-polymer nanocomposites synthesized by room temperature atmospheric pressure plasma and their potential for fuel cell electrocatalytic application. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- ZHAO, X.; CLIFFORD, A.; POON, R.; MATHEWS, R.; ZHITOMIRSKY, I. Carboxymethyl cellulose and composite films prepared by electrophoretic deposition and liquid-liquid particle extraction. *Colloid and Polymer Science*, Springer, v. 296, n. 5, p. 927–934, 2018.
- ZHOU, W.; HU, K.; KWEE, S.; TANG, L.; WANG, Z.; XIA, J.; LI, X. Gold nanoparticle aggregation-induced quantitative photothermal biosensing using a thermometer: a simple and universal biosensing platform. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 92, n. 3, p. 2739–2747, 2020.
- ZHOU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, S.; DENG, L. An ultrasensitive fluorescence detection template of pathogenic bacteria based on dual catalytic hairpin DNA walker@ gold nanoparticles enzyme-free amplification. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier, v. 277, p. 121259, 2022.
- ZIRAK, M.; ABDOLLAHIYAN, A.; EFTEKHARI-SIS, B.; SARAEI, M. Carboxymethyl cellulose coated Fe₃O₄@SiO₂ core-shell magnetic nanoparticles for methylene blue removal: equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies. *Cellulose*, Springer, v. 25, n. 1, p. 503–515, 2018.

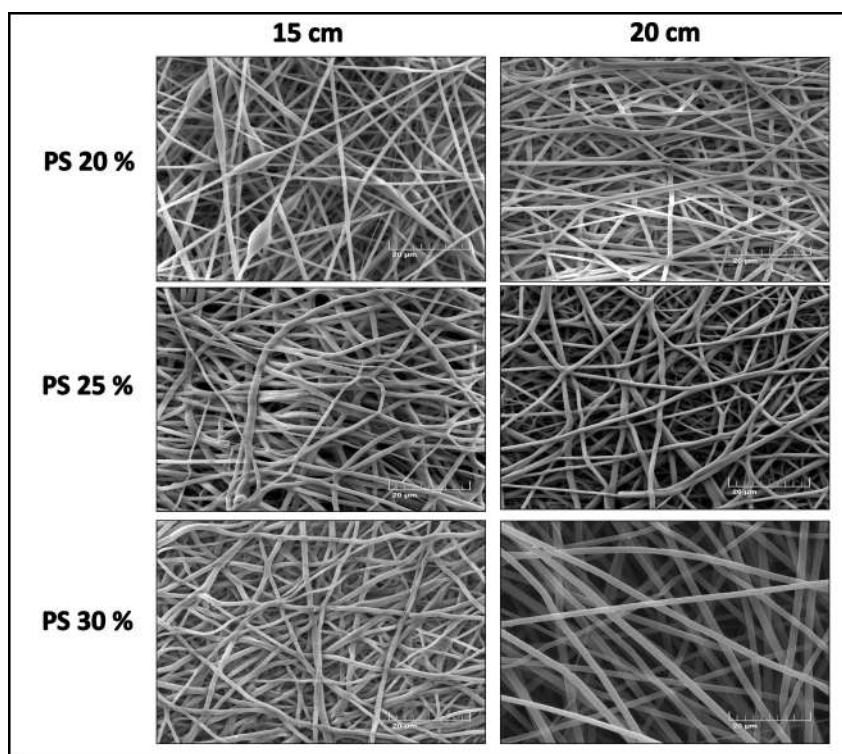
APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLEMENTARES DE PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA MEMBRANA PS-PPI

A.1 PREPARAÇÃO DA MEMBRANA

A.1.1 Otimização do processo de eletrofiação

Para escolher os melhores parâmetros do processo de fabricação da membrana de PS por eletrofiação, foram examinadas diferentes concentrações da solução de poliestireno, assim como foi variada a distância entre a agulha e o coletor. Os resultados desses experimentos são mostrados na Fig. 99. Por exemplo, quando foi usada uma solução de 20% de PS, ejetada a uma distância de 15 cm, uma membrana frágil foi obtida, com a presença de pequenos grânulos dispostos ao longo das fibras. Por outro lado, quando a distância foi aumentada para 20 cm, os grânulos não aparecem, mas os diâmetros das fibras são irregulares. Uma boa uniformidade no diâmetro das fibras foi conseguida apenas quando usada uma solução de 30%, ejetada a uma distância de 20 cm.

Figura 99 – Variações de parâmetros (concentração e distância) para otimização do processo de fabricação a membrana de PS.

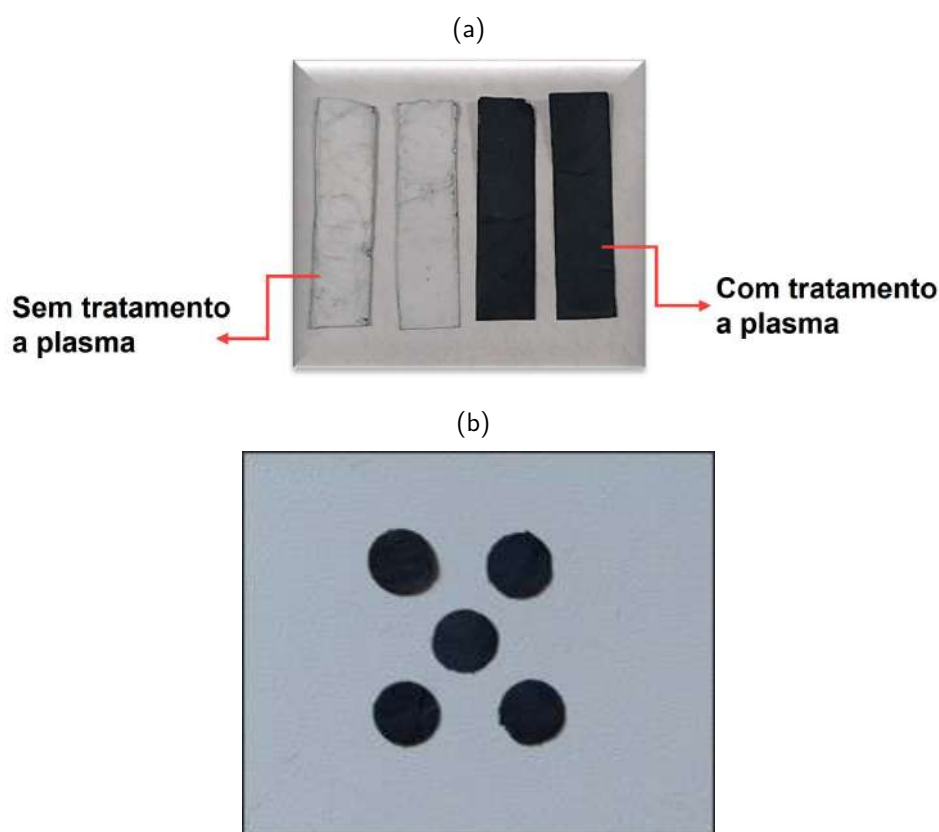


Fonte: Autoria própria (2021).

A.1.2 Testes de revestimento da membrana com polipirrol e da versatilidade da membrana

O revestimento da membrana pelo polipirrol foi testado quando a membrana não foi submetida a nenhum tratamento prévio a plasma. Como pode ser visto na Fig. 100a, o tratamento a plasma possibilitou a deposição uniforme do polipirrol na superfície da membrana, o que não ocorreu para o caso da membrana não previamente tratada. Na Fig. 100b, são apresentadas imagens dos círculos da membrana PS-PPi cortados com o auxílio de um molde, onde pode ser facilmente percebido que a membrana pode tomar outras formas, sem que seja prejudicada sua integridade.

Figura 100 – Diferença da membrana de PS após o revestimento do polipirrol sem e com o tratamento a plasma (a). Membranas cortadas em círculos (b).

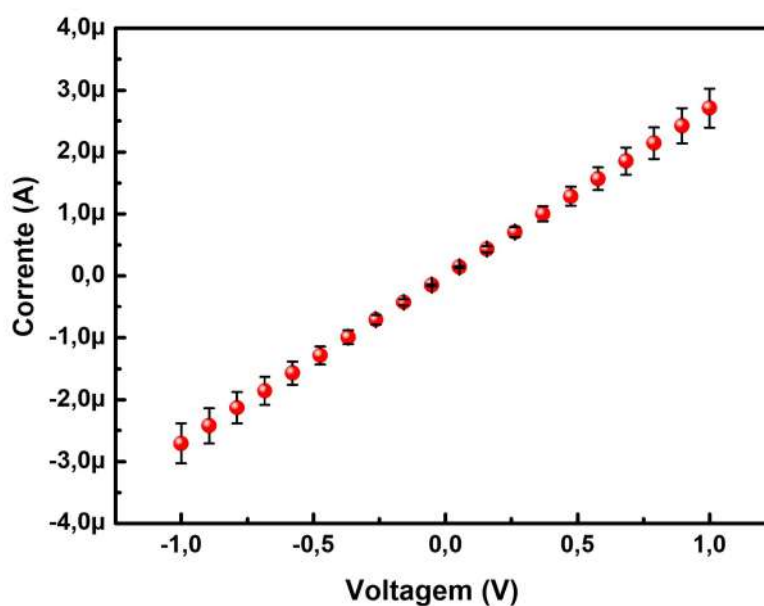


Fonte: Autoria própria (2021).

A.1.3 Caracterização elétrica da membrana de PS-PPI

Para uma avaliação do comportamento elétrico das membranas de PS-PPI, medimos sua resistividade. Para isso, um micrômetro digital foi usado para medir em três pontos diferentes a espessura de três tiras individuais de PS-PPI, com um valor médio estimado em $(0,119 \pm 0,003)$ mm. Em seguida, uma tensão na faixa de -1,0 V a 1,0 V foi aplicada em cada tira, por meio de duas sondas metálicas separadas por 2 cm, usando um SourceMeter Series 2400 (Keithley, EUA). As curvas $I \times V$ correspondentes (Fig. 101), obtidas em triplicata, em temperatura ambiente e umidade ambiente próxima a 50%, confirmam que as membranas apresentam comportamento ôhmico linear. A resistividade correspondente foi estimada como sendo da ordem de $(15,6 \pm 3,2) \Omega.m$.

Figura 101 – Comportamento elétrico da membrana PS-PPI.

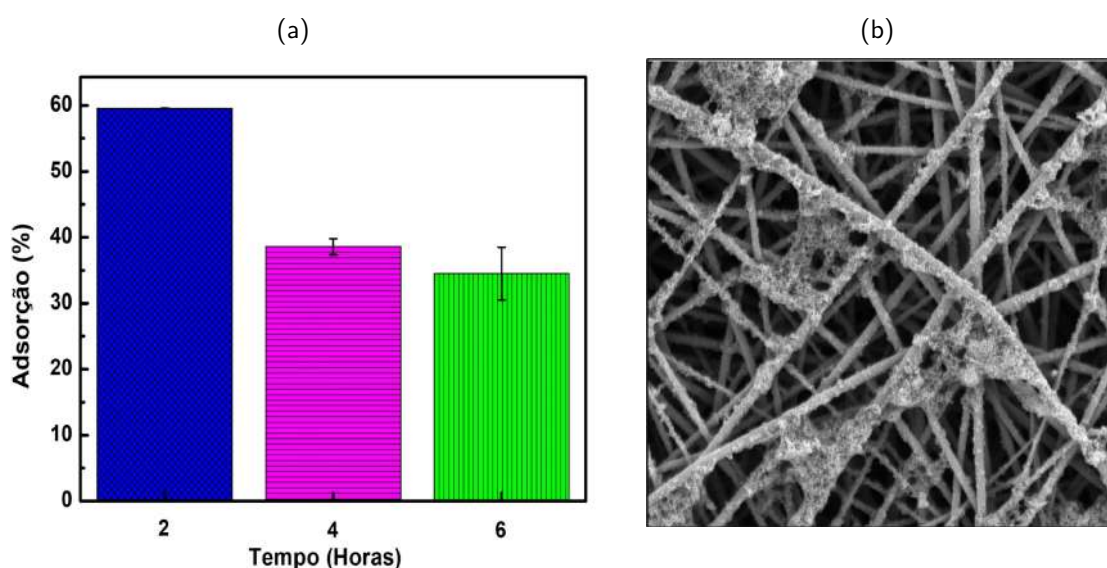


Fonte: Autoria própria (2021).

A.1.4 Taxa de adsorção de DNA após a interação com a membrana de PS-PPi preparada em diferentes tempos de polimerização.

Foi também examinado como a taxa de adsorção do DNA pelas membranas de PS-PPi era afetada quando diferentes tempos de polimerização (2, 4 e 6 h) eram adotados. Para isso, as membranas foram expostas a uma solução de DNA (com uma concentração de 50 mg/L e pH 2,8) durante uma hora. O resultado correspondente é mostrado na Fig. 102a, onde pode ser visto que a maior taxa de adsorção, em torno de 59%, é obtida para uma polimerização de 2 h. À medida que o tempo de polimerização aumenta, essa taxa diminui, atingindo um valor de apenas 34% para um tempo de 6 h. Podemos sugerir que isso se deve ao fato de que o aumento do tempo de polimerização provoca aglomeração do polipirrol na superfície da membrana (ver Fig. 102b), diminuindo assim a área superficial livre e, conseqüentemente, a possibilidade de interação com as cadeias de DNA.

Figura 102 – Taxa de adsorção de DNA pela membrana de PS-PPi para diferentes tempos de polimerização (a). MEV da membrana de PS-PPi após 6 h de polimerização (b).

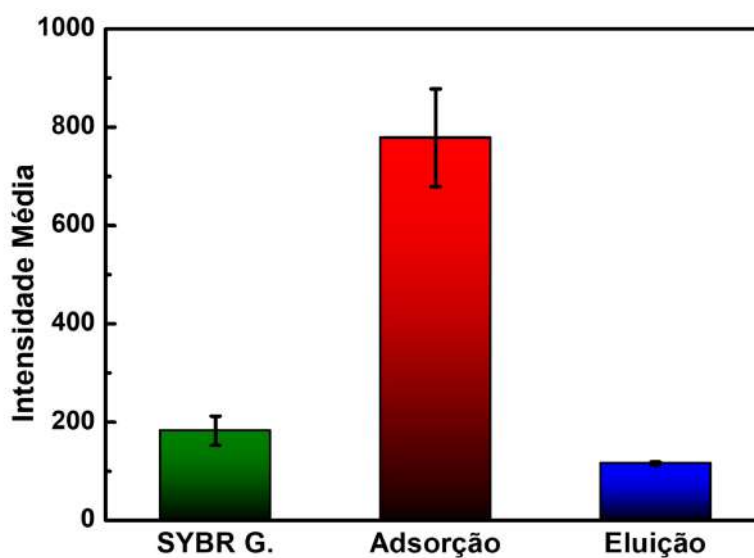


Fonte: Autoria própria (2021).

A.1.5 Experimento de Microscopia de Fluorescência

Na Fig. 103, é mostrada a intensidade de fluorescência média para uma membrana de PS-PPi ao interagir com o corante SYBR Green (SG), após a adsorção de DNA marcado com o corante SG e depois do processo de eluição. Esse experimento reforça a conclusão de que conseguimos tanto capturar o DNA pela membrana quanto obter sua subsequente liberação.

Figura 103 – Intensidade média de fluorescência do corante SYBR Green após o processo de adsorção e eluição do DNA pela membrana de PS-PPi.



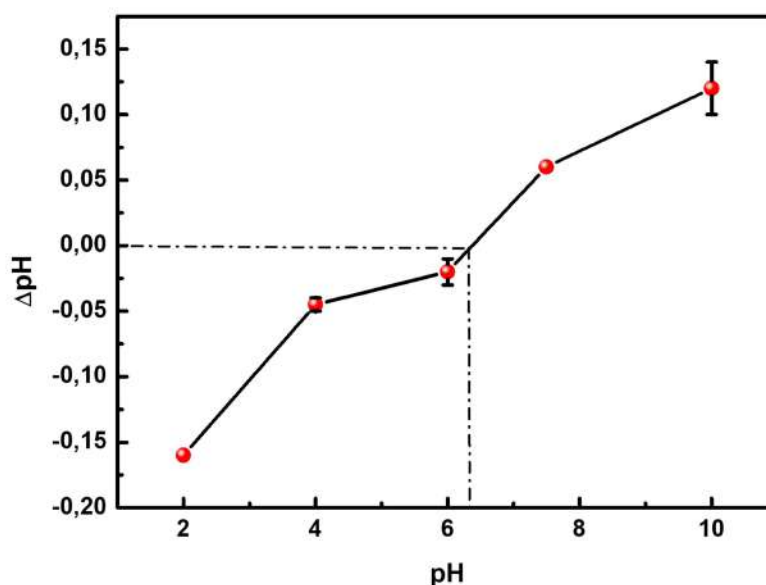
Fonte: Autoria própria (2021).

APÊNDICE B – RESULTADOS COMPLEMENTARES DA APLICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO

B.1 DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CARGA ZERO DA MCO-NPSAU

É bem conhecido que o pH na carga de ponto zero (pH_{zpc}) é um parâmetro importante para a compreensão do comportamento da superfície do adsorvente. Em valores de pH abaixo do pH_{zpc} do adsorvente, a superfície é carregada positivamente, e para valores acima de pH_{zpc} , a superfície do adsorvente é carregada negativamente (XIN et al., 2018). Na Fig. 104, é mostrado o gráfico gerado para o experimento do ponto de carga zero com a membrana MCO-NPsAu.

Figura 104 – Ponto de carga zero da MCO-NPsAu.



Fonte: Autoria própria (2021).

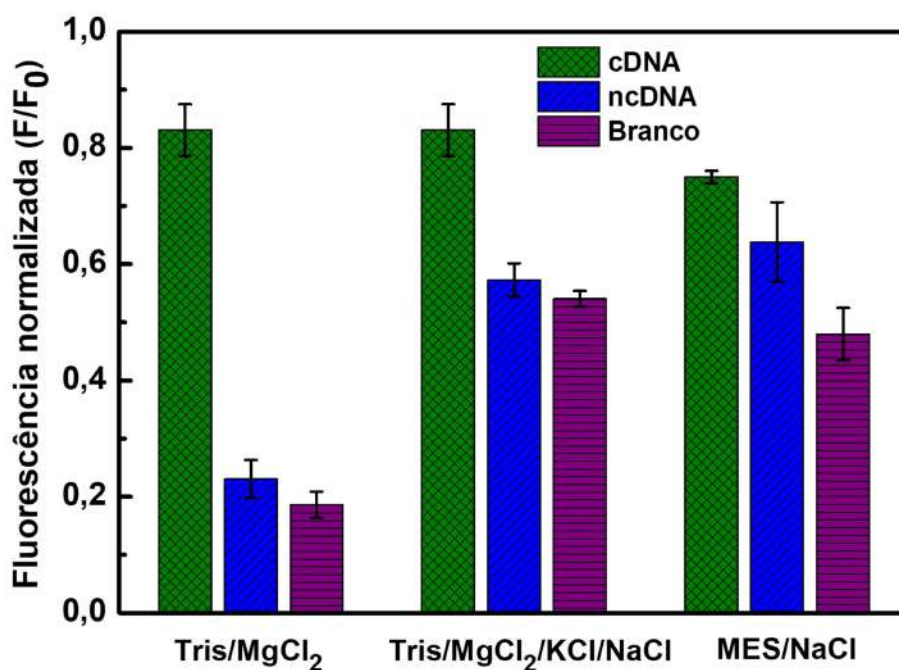
Pelo gráfico, é possível ver que o pH_{pcz} da membrana se encontra entre 6,0 e 6,5. Esse resultado comprova que muito embora no pH 7,4 (que foi o valor adotado no processo de imobilização da sonda FAM-ssDNA) a membrana esteja negativamente carregada, mesmo nesta condição ela foi capaz de imobilizar a sonda de FAM-ssDNA, reforçando o mecanismo de imobilização pelas nucleobases. Por essa razão, a presença do sal (MgCl_2) na solução de Tris/HCl foi essencial para que o ssDNA conseguisse se aproximar da membrana revestida com as nanopartículas de ouro (carregada negativamente) e assim possibilitar que ocorresse a imobilização.

B.2 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE BIOSSENSORIAMENTO

B.2.1 Avaliação de diferentes tampões de hibridização

Usando a membrana MCO-NPsAu, o primeiro experimento de biossensoriamento consistiu em analisarmos qual meio tamponado teria uma melhor eficiência de hibridização do FAM-ssDNA com o seu alvo complementar. Para isso, testamos três diferentes tampões (Tris/MgCl₂ (10 mM), pH 7,4; Tris-HCl, pH 7,8 (contendo 100 mM NaCl, 15 mM MgCl₂ e 5 mM KCl) e o MES, pH 7,4 (contendo 0,15 M de NaCl). O tampão de imobilização (Tris/MgCl₂, pH 7,4) foi mantido fixo. Todos os testes iniciais foram realizados a uma concentração de 75 nM, num período de 3 h (tanto a imobilização, quanto a hibridização). Os resultados podem ser vistos na Fig. 105.

Figura 105 – Recuperação da fluorescência em diferentes tampões.



Fonte: Autoria própria (2021).

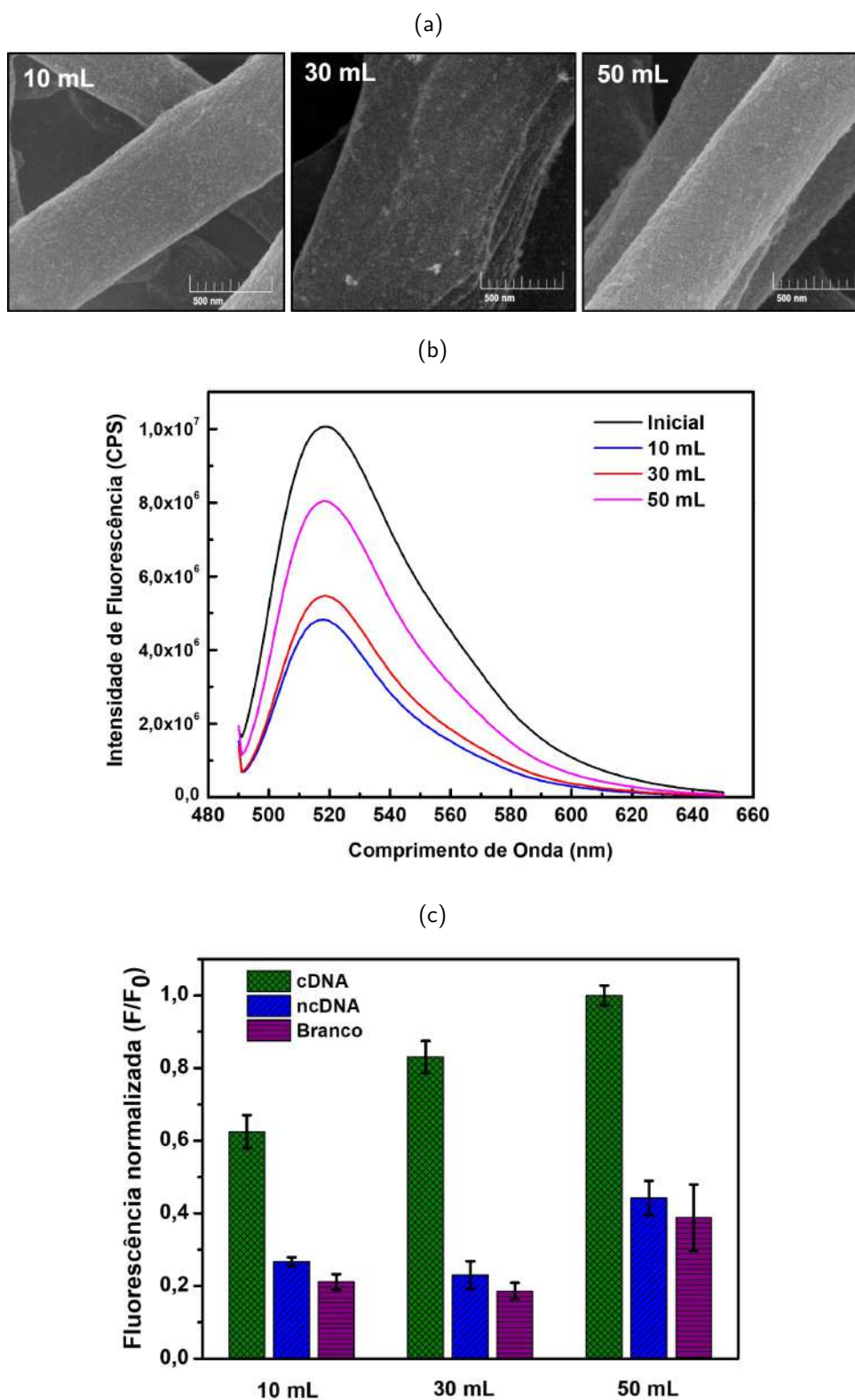
Como pode ser percebido, após a interação do sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA com as fitas de DNA complementar (cDNA) ocorreu uma grande eficiência na recuperação da fluorescência. Deve ser também observado que quando os tampões de Tris/MgCl₂/KCl/NaCl e MES/NaCl foram usados na interação com o não complementar e com o branco (ou seja, quando o sistema MCO-NPsAu/FAM-ssDNA interage apenas com o tampão sem DNA

alvo presente), também ocorreu um grande retorno da fluorescência, o que não aconteceu quando usado o tampão de Tris/MgCl₂. Esse resultado mostra que os tampões de Tris/MgCl₂/KCl/NaCl e MES/NaCl não são adequados para o uso no processo de biossensoriamento, uma vez que é mínima a diferença entre complementar e não complementar. Sugere-se que uma baixa concentração de sal, como no caso do Tris/MgCl₂ (10 mM), pode ser mais favorável para que o DNA possa se adaptar a uma conformação estendida nas NPsAu, expondo as bases de DNA à superfície das nanopartículas, fortalecendo assim a adsorção, com sua dessorção ocorrendo apenas na presença do cDNA. Para um alto teor de sal, como no caso dos outros tampões, as cargas internas do DNA podem se tornar mais próximas de modo a resultar em estruturas mais compactas na superfície das NPsAu, o que provoca a redução do número de pontos de contato, dessa forma facilitando a dessorção do FAM-ssDNA.

B.2.2 Teste de biossensoriamento para diferentes preparações da membrana MCO-NPsAu

Em um experimento adicional, o protocolo de reconhecimento do cDNA alvo foi aplicado para as membranas preparadas com diferentes volumes de nanopartículas de ouro (10, 30, e 50 mL). O resultado desse teste foi mostrado na Seção 3.4.2.1 do Capítulo 3, através de imagens MEV, quando a membrana modificada por 30 mL da solução coloidal de NPsAu foi escolhida para os experimentos subsequentes. As imagens MEV das membranas em uma maior magnificação (100 Kx) podem ser vistas na Fig. 106a, juntamente com o resultado de imobilização (Fig. 106b) e do reconhecimento de fitas complementares, não complementares e o branco (Fig. 106c). Através dos espectros de fluorescência do FAM-ssDNA antes e após a interação com o conjunto de membranas preparadas, é possível observar que em todos os casos houve uma diminuição do pico máximo (518 nm), com valores médios de fluorescência de 56,2%, 50,6%, e 21,1% para as membranas preparadas usando 10, 30, e 50 mL de NPsAu, respectivamente. O baixo valor apresentado pela variação de 50 mL provavelmente se deve ao fato de que o excesso de nanopartículas depositadas na membrana leva a uma diminuição da área superficial, prejudicando assim a imobilização das moléculas de FAM-ssDNA.

Figura 106 – Imagens MEV a uma magnificação de 100 Kx para a MCO-NPsAu preparada por diferentes volumes de NPsAu (a). Espectros de fluorescência após a imobilização das sondas de FAM-ssDNA nas membranas (b). Ensaios de sensoriamento (c).



Fonte: Autoria própria (2021).

Os ensaios de biossensoriamento (Fig. 106c) mostraram que em todas as variações de

preparação a membrana resultante possui capacidade de diferenciação entre as fitas complementares e não complementares através do retorno da fluorescência. Como pode ser observado, quando usamos a membrana preparada com 50 mL da solução de NPsAu, ocorreu uma maior liberação das sondas de FAM-ssDNA na detecção de alvos ncDNA, o que se deve a que, provavelmente, nesta condição a maior proximidade das nanopartículas dispostas nas fibras da membrana pode fazer com que as sondas não sejam imobilizadas de forma correta, ou seja, que nem todas as nucleobases do ssDNA foram imobilizados nas NPsAu, o que facilita a sua liberação.

APÊNDICE C – TRABALHO EM PROCESSO DE FINALIZAÇÃO: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO OURO/POLIPIRROL

C.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, nanocompósitos híbridos do tipo metal-polímero, em particular nanopartículas metálicas (NPs) incorporadas em uma matriz polimérica condutora, têm atraído muita atenção para investigações acadêmicas e industriais (ZHANG et al., 2017). Isso se deve a que a combinação desses materiais pode criar uma sinergia que possibilita novas características, que não estão presentes em cada um dos componentes separadamente (ALMEIDA et al., 2019).

Os polímeros condutores (PCs) têm sido extensivamente estudados devido à possibilidade de serem aplicados em uma variedade de campos. Entre os PCs, o polipirrol (PPi) é amplamente utilizado devido a sua alta condutividade elétrica, fácil preparação, boa estabilidade ambiental e grande variedade de possíveis aplicações (LI; XIE; LI, 2012; MALINOWSKA et al., 2014). As nanopartículas metálicas têm também recebido muita atenção devido à possibilidade de suas diversas aplicações na ciência dos materiais e na medicina. Em especial, as nanopartículas de ouro são muito usadas por causa das suas propriedades ópticas, elétricas, catalíticas e de biocompatibilidade únicas. Dentre exemplos de compósitos que usam PCs-NPsAu podemos destacar um biossensor de glicose baseado em uma mistura de NPsAu e polianilina condutora com glicose oxidase e Nafion, ou um imunossensor micro-potenciométrico de hemoglobina (Hb) baseado em um compósito NPsAu-PPi sintetizado eletroquimicamente e que mostrou grande potencial como um dispositivo barato e portátil para o monitoramento do diabetes (XUE; XU; SONG, 2012)..

Neste estudo, serão apresentados resultados preliminares de um procedimento de otimização da síntese de etapa única para formação do compósito Au/polipirrol. O material híbrido obtido exibiu propriedades fluorescentes na região do azul, e serão também mostrados os resultados do potencial zeta e tamanho de partícula pela técnica de DLS, análises espectroscópicas de FTIR e UV-Vis, morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV), transmissão com varredura (STEM) e fluorescência. Serão ainda apresentados os resultados de testes iniciais de caracterização por óptica não-linear usando a técnica de varredura Z de abertura fechada e aberta. Por fim, para que o material seja utilizado em futuras aplicações biológicas, realizamos um ensaio de citotoxicidade do material de modo a avaliar sua biocompatibilidade.

C.2 MATERIAIS E MÉTODOS

C.2.1 Materiais

O cloreto de ouro III trihidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), o pirrol 98% ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$), e o 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTS) 95% ($\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) foram obtidos da Sigma Aldrich (EUA), enquanto o etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) foi adquirido da EMSURE – Merck (Alemanha). Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, com exceção do monômero pirrol, que foi destilado a vácuo antes do uso.

C.2.2 Preparação do compósito Au/Polipirrol

Para a otimização das propriedades físico-químicas dos compósitos híbridos de Au/Polipirrol, implementamos um planejamento fatorial (2^3) em que variamos as concentrações dos reagentes utilizados no processo de síntese: 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTS), pirrol e cloreto de ouro (HAuCl_4). Para cada reagente, foram atribuídos dois níveis, relativos à menor (-) e à maior (+) concentração escolhida (listados na Tabela 17). No planejamento fatorial, todas as combinações dos dois níveis com os três fatores foram examinadas, totalizando 8 experimentos, como mostrado na Tabela 18, que foram sintetizados em duplicatas. A escolha dos níveis dos fatores foi baseada no procedimento proposto por Andrade et al. (2011), com algumas modificações, como o tipo de monômero e agente metálico utilizados para a obtenção do compósito Au/Polipirrol.

Tabela 16 – Planejamento fatorial 2^3 : Fatores e níveis adotados no planejamento para a síntese do compósito de Au/Polipirrol

Fatores	Nível de Concentração (mM)	
	-	+
MPTS	$1,6 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-2}$
Pirrol	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$
HauCl₄	$3,6 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$

Fonte: Autoria Própria (2021).

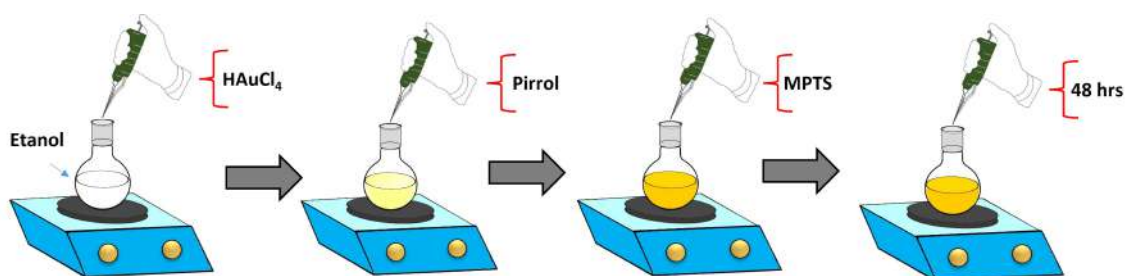
Tabela 17 – Matriz de coeficiente de contraste do planejamento 2^3 para a síntese do compósito Au/Polipirrol.

Experimento	MPTS	Pirrol	HAuCl ₄
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fonte: Autoria Própria (2021).

O compósito de Au/Polipirrol foi sintetizado pelo método de oxidação química *in situ* do monômero pirrol. Para isso, usando um balão de fundo redondo foi adicionado 10 mL de etanol, em seguida o cloreto de ouro III, o pirrol e, por fim, o MPTS. As concentrações dos reagentes obedeceram ao planejamento fatorial mostrado na Tabela 17. A mistura reacional foi deixada interagir durante 48 h à 25 °C e na ausência de luz, sendo após isso a mistura armazenada para a obtenção do compósito. Na Fig. 107, é mostrada a sequência de etapas de adição dos reagentes usados na síntese.

Figura 107 – Representação da preparação da síntese do compósito Au-PPI.



Fonte: Autoria própria (2021).

Após a obtenção do compósito, fizemos uma relação entre as medidas de fluorescência e de seu potencial zeta e tamanho, a fim de conseguir uma melhor resposta entre os experimentos propostos. Esses dados foram submetidos a uma análise estatística com o uso do software Statística 10 (Statsoft, EUA).

C.2.3 Métodos de caracterização

As medidas de fluorescência de emissão na faixa de 300 nm – 550 nm do compósito Au/Polipirrol foram realizadas usando um espectrofotômetro de fluorescência FluoroLog-3 (Horiba, EUA), com varreduras na faixa de comprimentos de onda de excitação 290 nm – 400 nm. O potencial zeta e o tamanho médio hidrodinâmico do compósito Au/Polipirrol foram determinados utilizando o equipamento Nanobrook Omni Particle Analyzer (Brookhaven Instruments), do Departamento de Química Fundamental da UFPE (Laboratório de Compostos Híbridos, Interfaces e Coloides). Para as análises, as amostras foram diluídas em etanol, onde uma alíquota de 40 μL de amostra foi adicionada em 2 mL de etanol e homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta. A partir dessa diluição, usamos um total de 700 μL e 2 mL para análise do potencial zeta e do tamanho médio do compósito, respectivamente.

O espectro de absorção na região do UV-Vis do compósito foi obtido no intervalo de 300 nm a 800 nm, usando o acessório F-3031 (inclui um módulo eletrônico DM303) acoplado a um espectrofluorímetro (Fluoromax-Plus - HORIBA), que permite coletar espectros de absorbância de amostras fluorescentes.

O espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi obtido no intervalo de (4000 – 400) cm^{-1} , usando um espectrofotômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão) com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras. As amostras foram preparadas da seguinte forma: uma alíquota de 30 μL foi adicionada em uma placa petri, e após a evaporação do solvente, raspamos o pó formado com o auxílio de uma espátula. Após isso, o pó foi homogeneizado juntamente com 50 mg de KBr para a posterior formação da pastilha.

A morfologia do compósito foi obtida usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) e varredura por transmissão (STEM) MIRA3 (TESCAN, República Tcheca) do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco. Para isso, 0,5 mg do compósito foi disperso em 2 mL de etanol e em seguida 10 μL foi depositado em um *stub* contendo uma fita de carbono, após a evaporação do etanol, o *stub* foi levado para metalização, quando uma camada de ouro com 10 nm de espessura foi depositada. Para a análise STEM, 2 μL do compósito foi diluído em 1 mL de etanol, sendo posteriormente 7 μL dessa diluição depositado no *grid*.

C.2.4 Análise das propriedades óticas não lineares

As propriedades óticas não lineares do compósito Au/Polipirrol foram investigadas por um conjunto de testes com auxílio da técnica de varredura Z (CANTILLO, 2017), utilizando um sistema de laser de femtosegundo. Para isso, volumes na faixa entre 5 e 80 μL do compósito concentrado foram adicionados a 1 mL de etanol. Como referência em branco (etanol sem o compósito), as propriedades NLO de solventes também foram avaliadas usando a técnica de varredura Z. Neste processo, a cubeta foi movida ao longo da direção de propagação (z) de um feixe de laser focalizado, com a posição do ponto focal sendo tomada como $z = 0$. Para a solução de amostra, a transmitância normalizada “1” indica que não há propriedades óticas não lineares.

C.2.5 Análise de citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade foram realizados com o objetivo de analisar a biocompatibilidade do compósito Au/Polipirrol frente a células mamárias, e de células de carcinoma cervical humano. Essas avaliações foram realizadas pelo aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação de Ciências de Materiais, Elton Marlon de Araújo Lima, através de uma colaboração com o Laboratório de Biologia Celular de Patógenos (Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE), sob a responsabilidade da Professora Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.

Para a realização dos ensaios de biocompatibilidade foram utilizados quatro modelos celulares: o macrófago J774 (ATCC® TIB-67™), Vero (ATCC® CCL-81™), fibroblastos (ATCC® PCS-201-012™) e a HeLa (ATCCR CCL-2™). O protocolo utilizado para os ensaios foi semelhante a aquele apresentado por Elton em seu trabalho (LIMA et al., 2021). Basicamente, as células Vero e macrófagos (concentração de 5×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 100 μL de um meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina- solução de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). Os fibroblastos e células HeLa foram cultivados nas mesmas condições para os macrófagos e células Vero, exceto pelo uso de meio DMEM (Sigma-Aldrich, EUA). Após a adesão, as células foram incubadas em meio de cultura apropriado na ausência (células controle não tratadas) ou na presença de diferentes concentrações (na faixa (31,2–500) $\mu\text{g/mL}$) do composto NPsAu/Polipirrol por 48 h. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas e

reincubadas em meio de cultura RPMI fresco, sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, EUA), contendo 5 mg/mL de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2, Brometo de 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, EUA) e cultivado por um período adicional de 3 h a 37 °C. Em seguida, as células foram solubilizadas em 100 μ L de uma solução acidificada de isopropanol (0,04 M HCl + isopropanol absoluto), para dissolver o corante formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplaca (Bio-Rad®, Califórnia, EUA) a 540 nm. Cada análise foi realizada em quadruplicata, em dois experimentos independentes.

Os valores das absorbâncias coletadas nos ensaios de biocompatibilidade foram analisados pelo uso do programa SPSS 18.0 (IBM, EUA), pela avaliação da regressão linear e determinação da concentração citotóxica de 50% (CC50), que é aquela para a qual a viabilidade celular é reduzida em 50%. A significância foi definida a partir de valores de $p < 0,05$, no qual foram considerados o teste de ANOVA e o Pós-teste de Dunnett no GraphPadPrism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA).

C.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao longo dos últimos anos, a fluorescência de compósitos de metal-polímero condutor tem sido investigada pelo grupo de Polímeros Não-Convencionais. Um dos primeiros desses nanocompósitos a ser sintetizado foi o de Au/Polianilina, para o qual foi possível mostrar que havia uma sinergia na interação entre as cadeias da polianilina e nanopartículas de ouro, do que resulta um grande aumento da emissão de fluorescência (SANTOS et al., 2013). Desde então, outros compósitos semelhantes foram preparados como o Cu/Polianilina (ALMEIDA et al., 2019), Ag/Polianilina (RATKOVSKI et al., 2020), e o Ag/Polipirrol (LIMA et al., 2021), que também apresentaram propriedades fluorescentes. Neste trabalho foi preparado o compósito de Au/Polipirrol, para o qual foi investigada a possível presença de fluorescência.

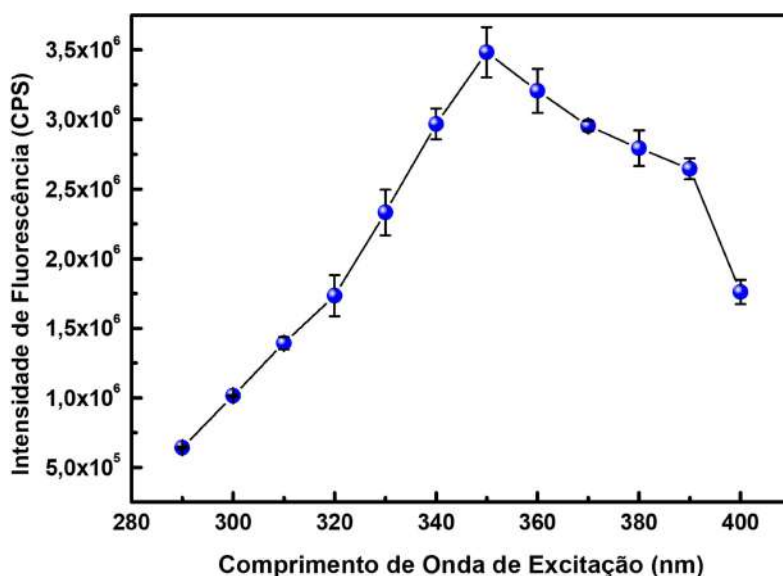
C.3.1 Planejamento Fatorial 2^3

C.3.1.1 Medidas de espectroscopia de fluorescência

Para dar início às análises, realizamos medidas de fluorescência para todas as amostras do compósito preparadas de acordo com as combinações apresentadas na Tabela 17. Para isso, o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi varrido no intervalo de 290 nm a 400 nm, quando foi observado um comportamento de emissão de fluorescência semelhante para todas as amostras. Na Fig. 108, é mostrado um exemplo dessas medidas, onde como pode ser visto, existe uma dependência da resposta de emissão de fluorescência com a mudança do λ_{exc} , com a sua maior intensidade sendo observada em 350 nm.

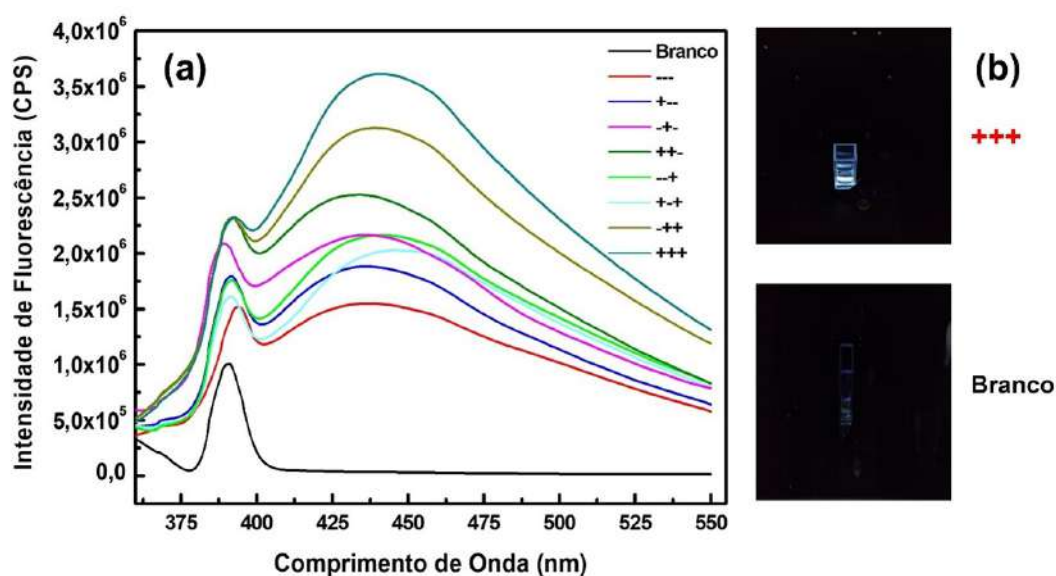
Na Fig. 109, é mostrado o conjunto de espectros de emissão coletados em um total de oito experimentos do planejamento fatorial, além da amostra branco, ou seja, quando o solvente puro era usado. Após a excitação no comprimento de onda de 350 nm, pode ser visto que a amostra 8 (+++), que corresponde a utilização de HAuCl_4 , Pirrol e MPTS no nível de concentração superior (+) em cada caso, foi aquela que exibiu a maior intensidade de fluorescência, com o pico máximo de emissão em torno de 441 nm, ou seja, na região do visível na cor azul. Valores semelhantes foram encontrados na literatura (DONG et al., 2016) quando nanoesferas de Polipirrol foram preparadas e exibiram um pico de emissão mais intenso em 441 nm no comprimento de onda de excitação de 350 nm. Ainda na Fig. 109, são apresentadas as imagens da cubeta contendo a amostra 8 (+++) e a amostra branco.

Figura 108 – Intensidade de fluorescência do composto Au/Polipirrol para diferentes comprimentos de onda de excitação (Amostra +++).



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 109 – Espectro de emissão do composto Au/Polipirrol para $\lambda_{exc} = 350$ nm (a). Imagens da cubeta contendo a amostra 8 (+++) e a amostra branco.



Fonte: Autoria própria (2021).

Na Tabela 18 estão apresentadas as intensidades máximas de fluorescência de todas as amostras do planejamento fatorial e suas replicatas correspondentes, para uma excitação com $\lambda_{exc} = 350$ nm, que é aquela para a qual o composto apresentou maior emissão de fluorescência.

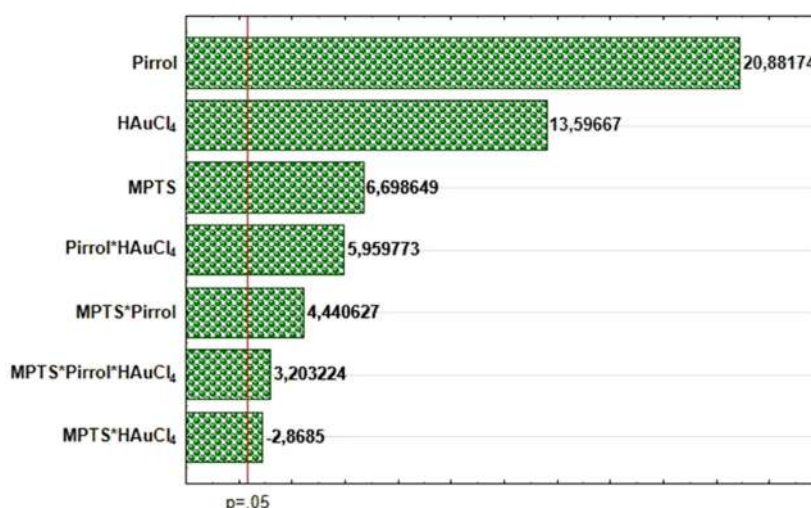
Tabela 18 – Planejamento fatorial e intensidade de fluorescência dos compósitos Au/Polipirrol.

Exp.	MPTS	Pirrol	HAuCl ₄	Média	Erro
1	-	-	-	$1,54 \times 10^6$	$1,35 \times 10^4$
2	+	-	-	$1,91 \times 10^6$	$2,56 \times 10^4$
3	-	+	-	$2,16 \times 10^6$	$1,12 \times 10^4$
4	+	+	-	$2,65 \times 10^6$	$1,18 \times 10^5$
5	-	-	+	$2,16 \times 10^6$	$9,65 \times 10^3$
6	+	-	+	$1,98 \times 10^6$	$4,48 \times 10^4$
7	-	+	+	$3,03 \times 10^6$	$1,09 \times 10^5$
8	+	+	+	$3,55 \times 10^6$	$6,29 \times 10^4$

Fonte: Autoria Própria (2021).

A partir dos dados de intensidade de fluorescência coletados, foi possível analisar estatisticamente as contribuições de cada reagente utilizado na síntese do compósito Au/Polipirrol. Na Fig. 110, é apresentado o gráfico de Pareto para a intensidade de fluorescência, onde se mostra que os efeitos mais significativos (com 95% de confiança) estão relacionados ao monômero Pirrol, do HAuCl₄ e do MPTS, com valores positivos para todas as variáveis, um resultado que confirma que a intensidade da fluorescência é favorecida quando o compósito é sintetizado com a maior concentração de pirrol, HAuCl₄, e do MPTS.

Figura 110 – Representação gráfica da análise estatística para a intensidade de fluorescência dos compósitos de Au/Polipirrol: Gráfico de Pareto.

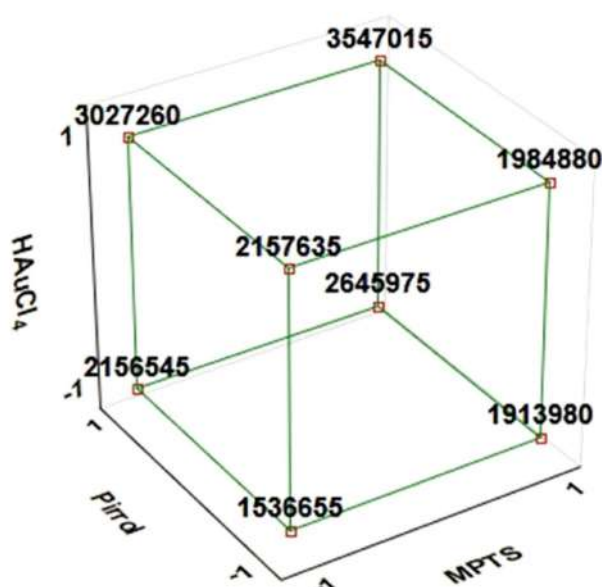


Fonte: Autoria própria (2021).

Para uma melhor compreensão dos efeitos, as respostas de intensidade de fluorescência de todas as combinações do planejamento fatorial foram representadas em um gráfico cúbico. Como observado na Fig. 111, os maiores valores de intensidade de fluorescência foram obtidos

quando uma maior concentração de Pirrol, HAuCl_4 e MPTS (+++) foi utilizada, o que pode ser visto no vértice do cubo onde há o maior valor de intensidade de fluorescência (3547015 CPS).

Figura 111 – Representação gráfica da análise estatística para a intensidade de fluorescência dos compósitos de Au/Polipirrol: gráfico cúbico.



Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.1.2 Medida do Potencial Zeta

A medida de potencial zeta (PZ) do compósito foi feita para todas as amostras do planejamento fatorial, a fim de auxiliar na previsão da estabilidade da dispersão das amostras. Além disso, foi possível verificar quais variáveis de síntese seriam as mais importantes para que soluções mais estáveis fossem obtidas. Quanto maior o valor absoluto do PZ, maior será a estabilidade eletrostática da dispersão, uma vez que quanto mais as partículas carregadas se repelem, menor a sua coalescência. As respostas das medidas de potencial zeta das amostras do planejamento fatorial são mostradas na Tabela 19. Como pode ser visto, as amostras exibiram um valor absoluto de PZ positivo para todas as amostras, esse resultado está de acordo com a literatura que mostra que compósitos de Au-Polipirrol podem apresentar um valor de 36,3 mV (FADEL et al., 2020), um pouco mais alto, mas ainda assim comparável com os valores obtidos para o planejamento fatorial de preparação do compósito Au/Polipirrol, como visto na

Tabela 20.

Observando os resultados, verifica-se que os maiores valores de PZ foram obtidos quando as condições de síntese usadas foram aquelas com níveis inferiores e superiores dos componentes usados na reação (MPTS, Pirrol, HAuCl_4), ou seja, que os experimentos 1 e 8, são as soluções mais estáveis e que mostraram menor e maior valor de intensidade de fluorescência. Também é possível concluir que as nanopartículas de ouro devem manter uma forte interação com as cadeias poliméricas do polipirrol, uma vez que há uma diminuição do potencial zeta quando a quantidade pirrol é mantida no nível superior e a quantidade de ouro adicionada na solução se encontra no nível inferior. Por exemplo, quando se compara os experimentos 3 e 7, nota-se que a variação da concentração de Au do nível superior para o inferior torna o potencial zeta menor, passando de 25,27 mV para 15,59 mV.

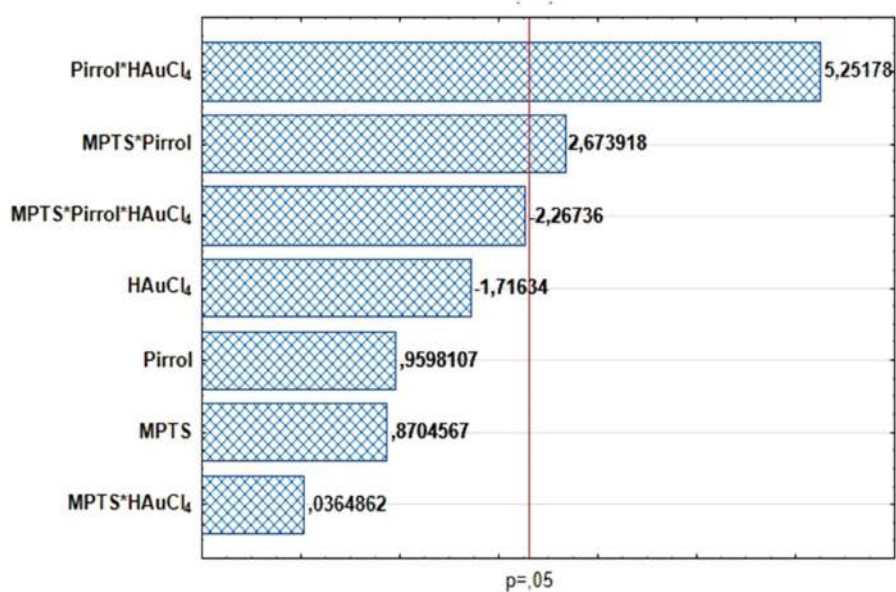
Tabela 19 – Planejamento fatorial e medidas de potencial zeta (mV) dos compósitos Au/Polipirrol.

Exp.	MPTS	Pirrol	HAuCl_4	Média	Erro
1	-	-	-	31,09	0,22
2	+	-	-	24,20	1,07
3	-	+	-	15,59	1,78
4	+	+	-	25,29	4,52
5	-	-	+	15,53	0,90
6	+	-	+	16,37	0,38
7	-	+	+	25,27	3,21
8	+	+	+	27,48	2,99

Fonte: Autoria Própria (2021).

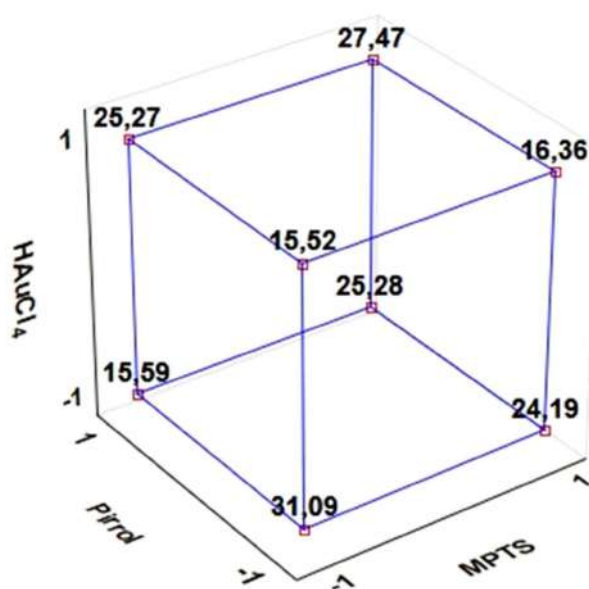
Os dados obtidos de PZ para as amostras do planejamento fatorial foram usados para gerar um gráfico de Pareto (Fig. 112) e verificou-se que a interação entre o pirrol e o HAuCl_4 e o MPTS com o HAuCl_4 são estatisticamente as mais significativas para a estabilidade da solução, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Além disso, o gráfico cúbico, representado na Fig. 113, mostra que os maiores valores foram obtidos para os experimentos 1 e 8, as quais foram utilizados os níveis inferiores (-) e superiores (+) da concentração de MPTS, Pirrol e HAuCl_4 .

Figura 112 – Representação gráfica da análise estatística para o potencial zeta do compósito Au/- Polipirrol: Gráfico de Pareto.



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 113 – Representação gráfica da análise estatística para o potencial zeta do compósito Au/- Polipirrol: Gráfico cúbico.



Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.1.3 Análise do tamanho de partícula

O valor do tamanho médio de partícula do compósito de Au/Polipirrol foi estimado através por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Lembrando que essa técnica está relacionada ao diâmetro hidrodinâmico da partícula (conjunto composto pelo MPTS, polipirrol e nanopartícula de ouro). Os resultados apresentados na Tabela 20. Quase todos os valores de tamanho médio encontrados para o compósito, estão de acordo com alguns materiais encontrados na literatura, onde o valor obtido foi de aproximadamente 215 nm (FADEL et al., 2020).

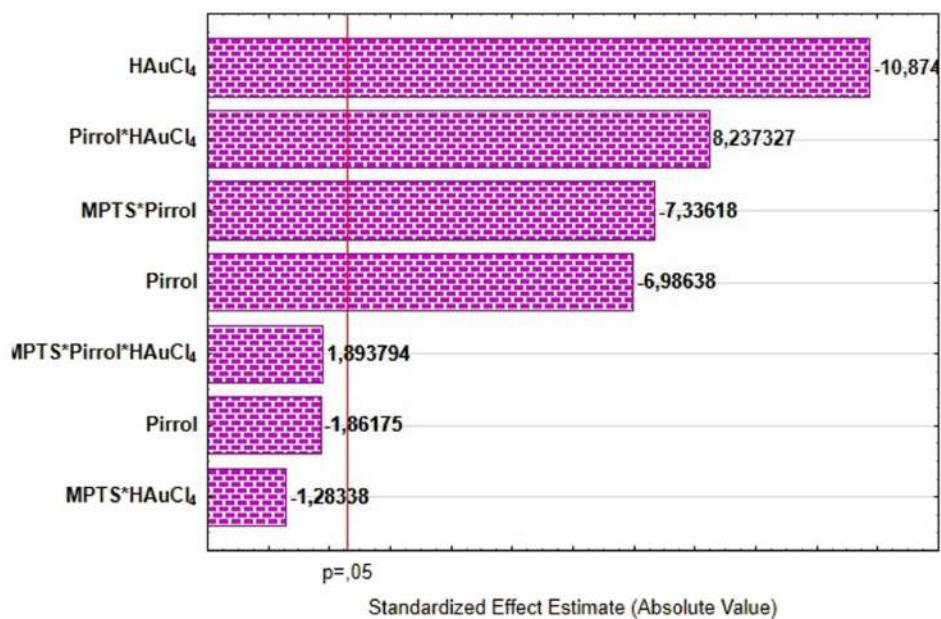
Tabela 20 – Planejamento fatorial e diâmetro médio de partículas dos compósitos Au/Polipirrol..

Exp.	MPTS	Pirrol	HAuCl ₄	Média	Erro
1	-	-	-	429,32	32,2
2	+	-	-	351,70	20,24
3	-	+	-	541,36	1,50
4	+	+	-	224,68	0,33
5	-	-	+	222,96	33,88
6	+	-	+	309,64	2,81
7	-	+	+	252,71	5,36
8	+	+	+	198,43	7,07

Fonte: Autoria Própria (2021).

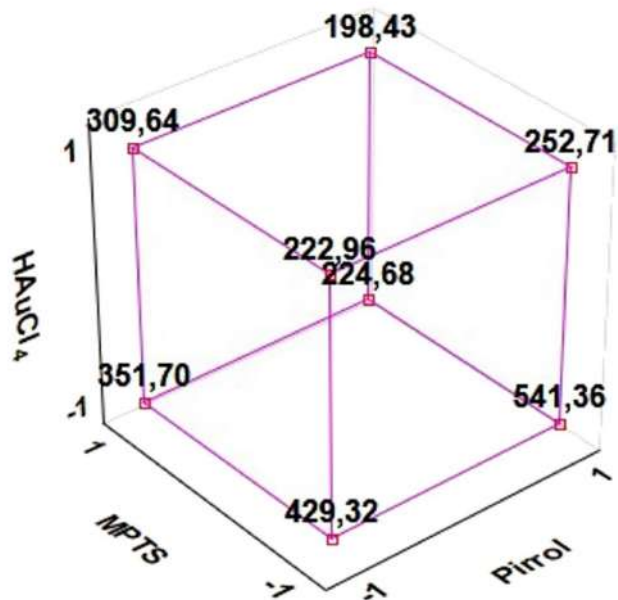
Pela análise do gráfico de Pareto, foi possível examinar quais reagentes eram os estatisticamente mais significativos para a obtenção do diâmetro médio das partículas do material compósito. Como pode ser visto na Fig. 114, o HAuCl₄ apresentou uma influência estatística significativa, ao nível de confiança de 95%. Como esse efeito foi negativo, quando o HAuCl₄ é utilizado em seu nível inferior (-), com os outros mantidos fixos, houve um aumento no diâmetro médio do compósito (ver experimentos 1 e 5). A interação entre o Pirrol e HAuCl₄ também se mostrou estatisticamente significativa, agora com um valor positivo, e nesse caso pode ser notado que quando esses fatores são usados em seus níveis superiores ocorreu uma diminuição do diâmetro hidrodinâmico do compósito (experimentos 1 e 7), um resultado que corrobora os maiores valores de intensidade de fluorescência (Tabela 18).

Figura 114 – Gráfico de Pareto para o diâmetro médio das partículas dos Compósitos Au/Polipirrol.



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 115 – Gráfico cúbico para o diâmetro médio das partículas dos Compósitos Au/Polipirrol.

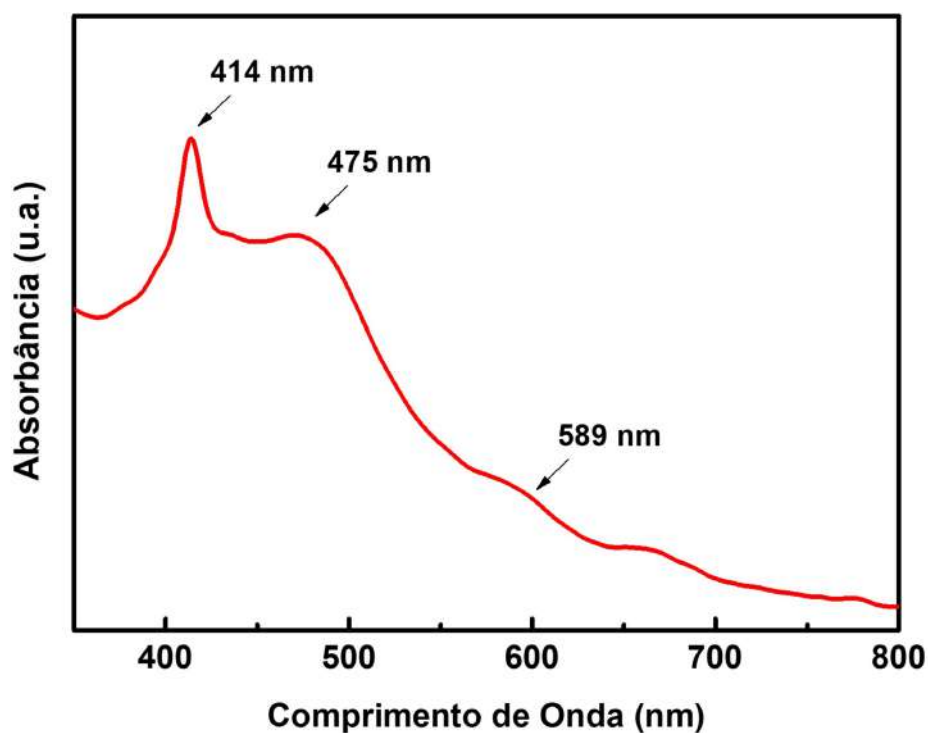


Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.2 Espectroscopia no Ultravioleta - Visível (UV-Vis)

A espectroscopia no UV-Vis foi utilizada para verificar a formação do composto Au/-Polipirrol (Fig. 116). A absorbância em $\lambda = 414$ nm é característica do estágio inicial da oxidação do pirrol (GERMAN; RAMANAVICIENE; RAMANAVICIUS, 2019), mostrando que existem ainda monômeros que não foram polymerizados enquanto que a banda de absorção em 475 nm indica a transição $\pi - \pi^*$ do polipirrol. A pequena elevação observada em 596 nm pode ser atribuída ao pico de absorção das NPsAu que é característico da banda de absorção da ressonância dos plásmons de superfície.

Figura 116 – Espectro de UV-Vis do composto de Au/Polipirrol.

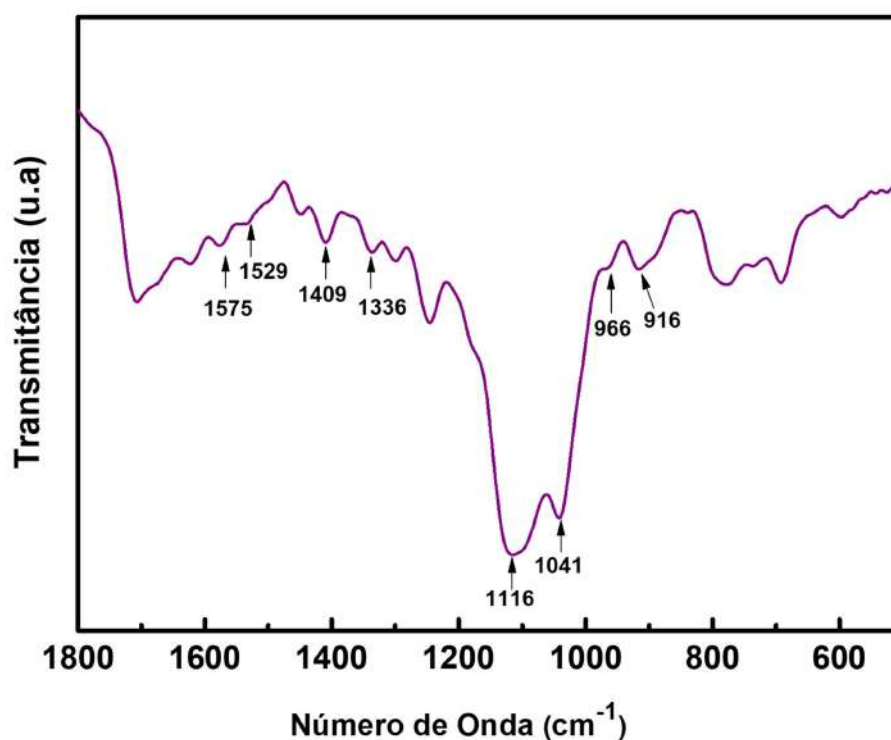


Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) do composto Au/Polipirrol preparado é mostrado na Fig. 117. Os picos em 1529 e 1575 cm^{-1} podem ser atribuídos à vibração típica do anel de polipirrol. Os dois picos em 1409 e 1339 cm^{-1} correspondem ao estiramento C-N e à vibração no plano =C-H. O pico próximo a 1116 cm^{-1} surge devido às vibrações do anel do pirrol. A banda de bipolaron característica em 1246 cm^{-1} indicou a formação do polipirrol (SELVAN et al., 1998). Os picos próximos às posições em 1041, 966 e 916 cm^{-1} podem ser atribuídos à vibração no plano =C-H, C- C vibração de deformação fora de fase e à vibração fora do plano =C-H, respectivamente, confirmando a polimerização do pirrol (GOSWAMI; SARMA; CHOWDHURY, 2011).

Figura 117 – Espectro de FTIR do composto Au/Polipirrol.

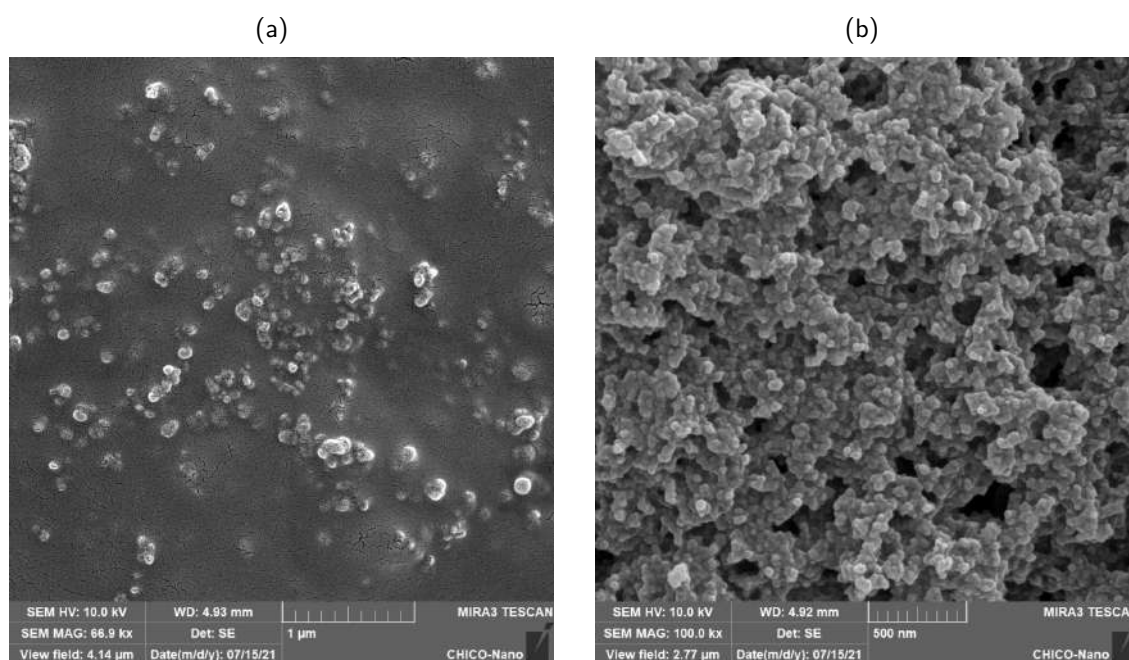


Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de varredura por transmissão e fluorescência

A morfologia do compósito de Au/Polipirrol foi analisada através de imagens de MEV em diferentes magnificações, como mostrado na Fig. 118. Como pode ser visto, o compósito possui uma forma esférica (Fig. 118a). Na Fig. 118b, é mostrado um aglomerado em uma imagem do compósito retirada de uma outra região.

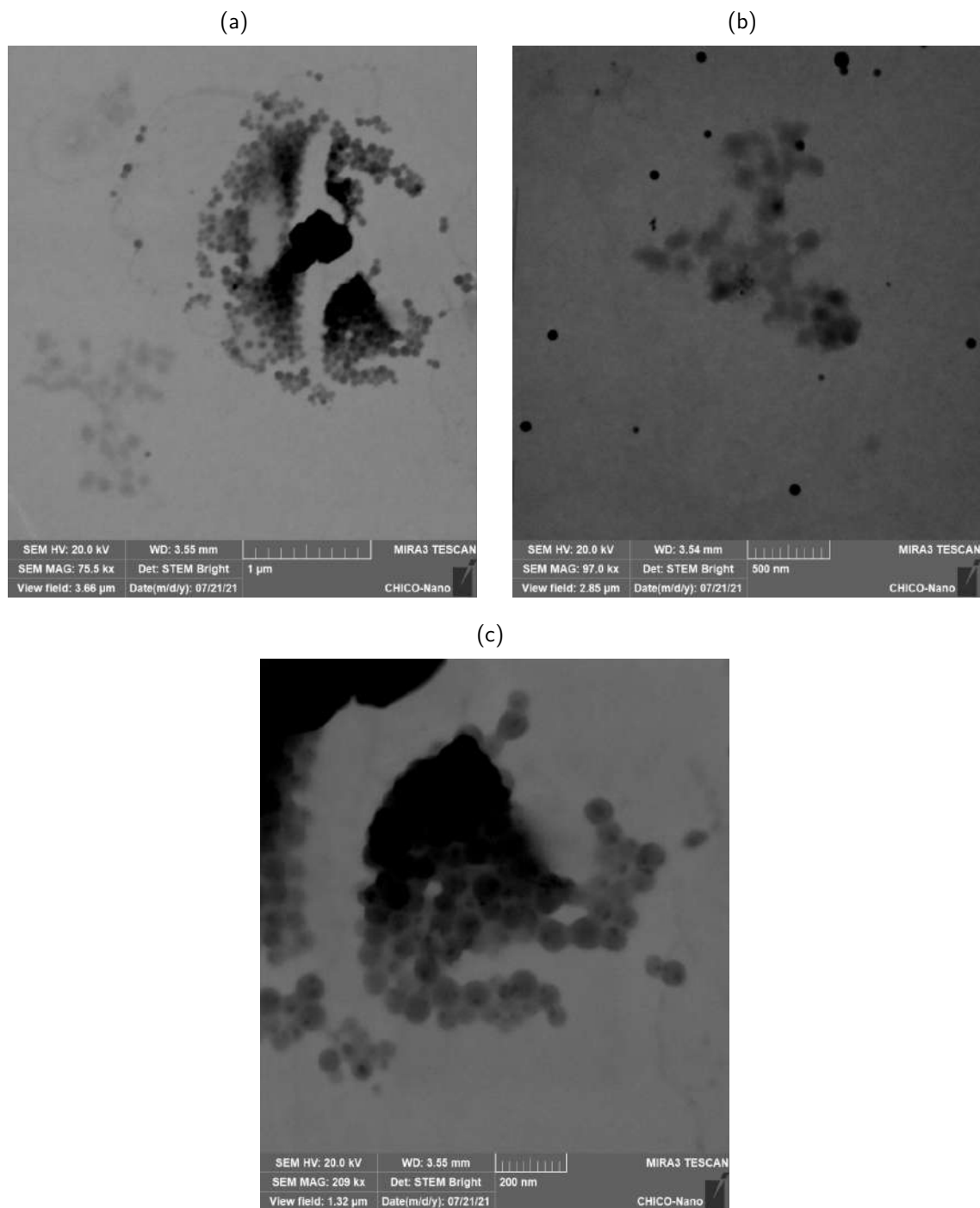
Figura 118 – Imagens de MEV do compósito Au/polipirrol em diferentes magnificações: 66,9 kx (a) e 100 kx (b).



Fonte: Autoria própria (2021).

Os resultados das imagens STEM, mostrados nas Figs. 119a, 119b e 119c, indicaram que as nanopartículas de ouro apresentam formato esférico e são monodispersas, formando o núcleo para o crescimento do envoltório de polipirrol. A polimerização do pirrol em polipirrol e a redução de AuCl_4^- em nanopartículas de ouro ocorrem instantânea e simultaneamente após a adição de monômeros de pirrol (FADEL et al., 2020). Nessa reação são formados conjuntos isolados tipo núcleo-casca, que acabam se aglomerando, resultando em uma matriz polimérica com as nanopartículas metálicas incorporadas no seu interior, o que pode ser visto na Figura 119b. Na Fig. 119c, é apresentado o compósito com mais detalhes e de forma mais isolada; nesta região, pode ser visto um ponto escuro no meio (núcleo) e ao redor um envoltório (casca).

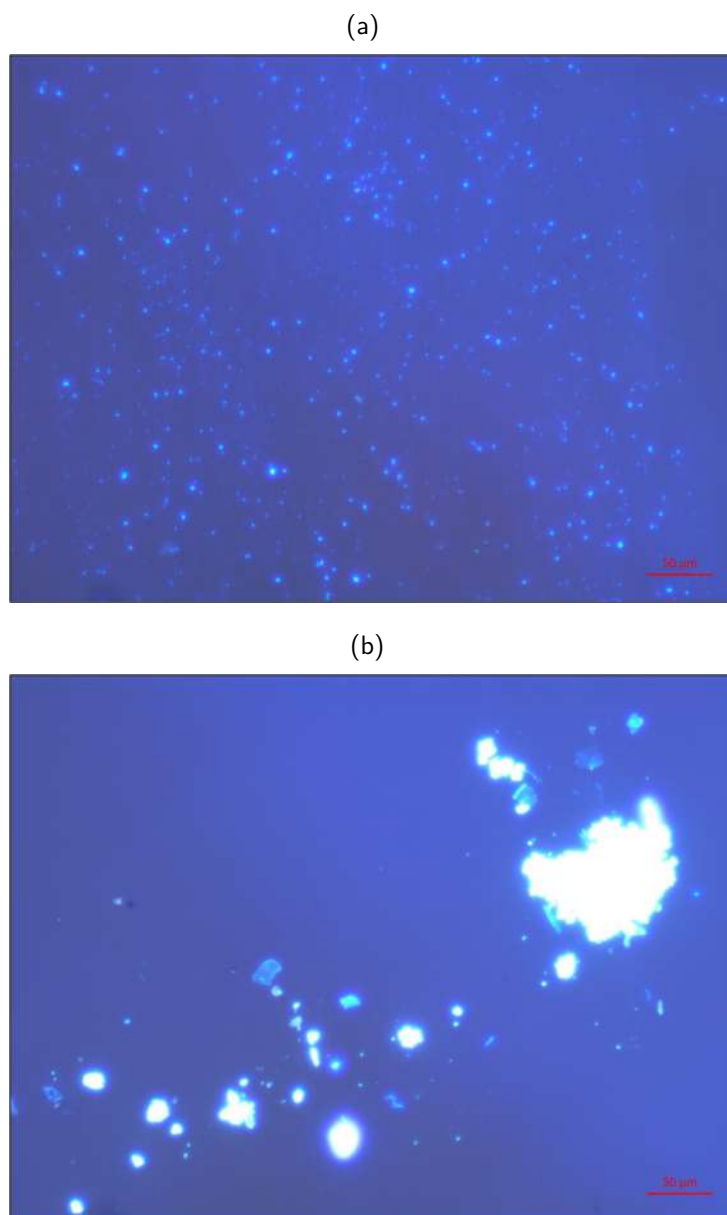
Figura 119 – Imagens de STEM do compósito Au/polipirrol em diferentes magnificações: 75,5 kx (a), 97 kx (b) e 209 kx (c).



Fonte: Autoria própria (2021).

Nas Figs. 120a e 120b, são mostradas imagens capturadas pelo microscópio de fluorescência, onde o compósito pode ser visualizado através dos pontos e aglomerados brilhantes.

Figura 120 – Imagens capturadas pelo microscópio de fluorescência em diferentes regiões.



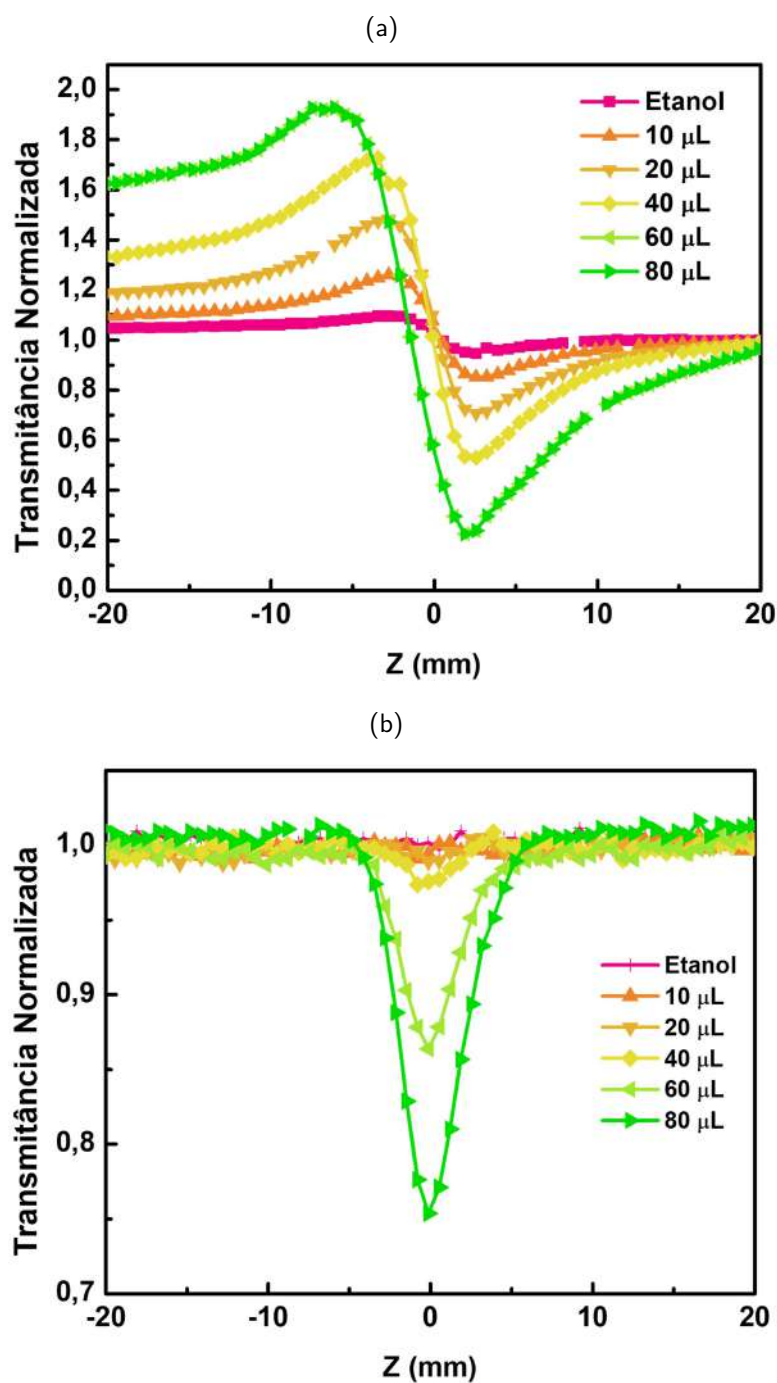
Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.5 Propriedades de óptica não-linear

Para a medição da não-linearidade óptica do compósito Au/Polipirrol (Experimento 8: +++), a técnica de varredura Z foi utilizada. As imagens da Fig. 121 mostram a transmitância normalizada em função da posição Z do compósito Au/Polipirrol para diferentes diluições, onde pode ser visto que os perfis característicos das curvas de varredura Z de abertura aberta (Fig. 121a) e fechada (Fig. 121b) foram obtidos. Muito embora esses resultados tenham se mostrado promissores, futuramente esses experimentos terão que ser refeitos para o aprimoramento das

medidas. Por exemplo, na Fig. 121a as curvas deveriam partir do ponto 1,0 em $Z = -20$ mm e ser finalizada exatamente no ponto 1,0 em $Z = 20$ mm, um problema que pode estar relacionado com a alta potência do laser utilizado, ou até mesmo com o alinhamento do sistema óptico. Após o aprimoramento das medidas, o coeficiente de refração não linear e o coeficiente de absorção não linear poderão ser estimados da melhor forma.

Figura 121 – Técnica de varredura Z em abertura aberta (a) e fechada (b) para o compósito Au/-Polipirrol.

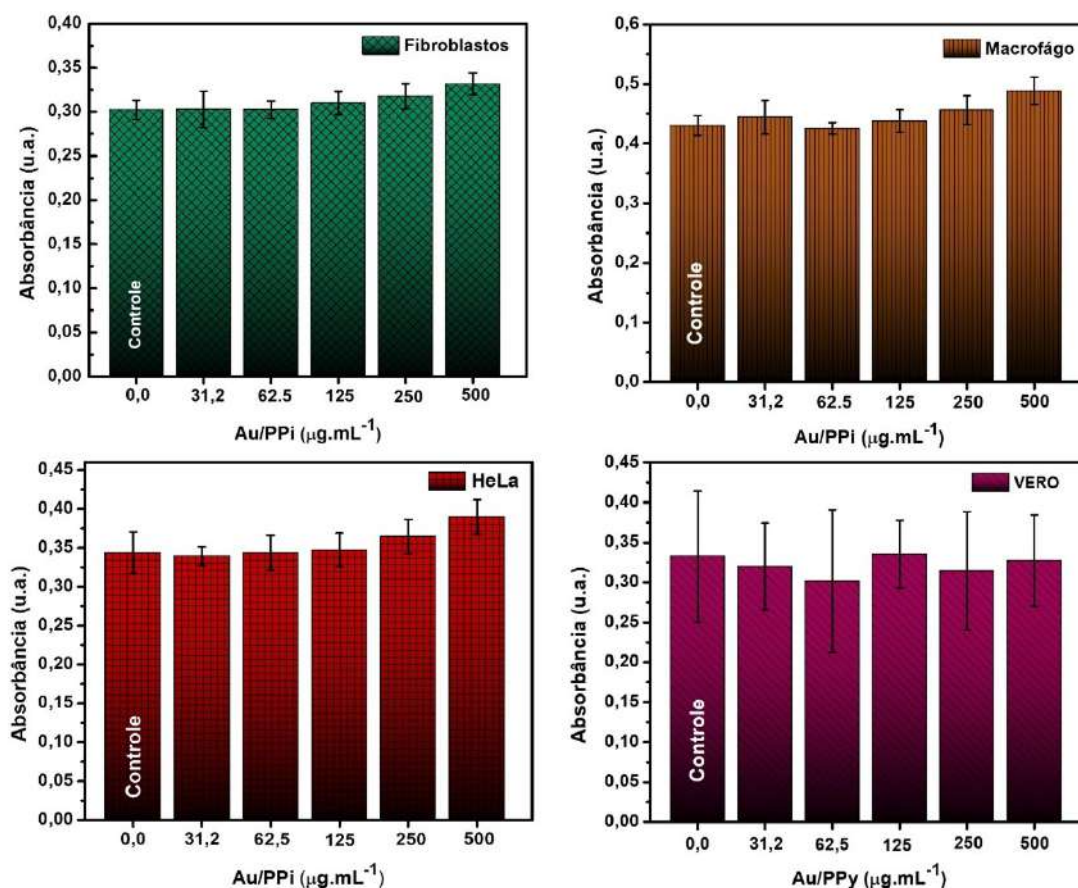


Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.6 Ensaios de citotoxicidade do compósito Au/Polipirrol

Foram realizados ensaios de citotoxicidade para a amostra 8 do compósito Au/Polipirrol, aquela que apresentou uma maior resposta de intensidade de fluorescência, boa estabilidade como visto pela análise de potencial zeta, e o menor diâmetro. Para isso, foram utilizadas quatro linhagens de células (Fibroblastos, macrófagos, HeLa (células de carcinoma cervical humano) e Vero). Os resultados se encontram mostrados na Fig. 122. Como pode ser visto, após 48 h as diferentes concentrações testadas (31,2 a 500 $\mu\text{g/mL}$) do compósito Au/Polipirrol não demonstraram efeito tóxico para as quatro linhagens de células investigadas, não havendo diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle. Este resultado mostra haver uma boa biocompatibilidade do compósito Au/Polipirrol com células de mamífero e células de carcinoma cervical humano, sugerindo ser esse material seguro para aplicações biomédicas.

Figura 122 – Efeito do Au/Polipirrol sobre células de mamíferos (Fibroblastos, células Vero e macrófagos) e sobre células de carcinoma cervical humano (Hela).



Fonte: Autoria própria (2021).

C.3.7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a síntese de um material compósito híbrido Au/Polipirrol foi discutida. O material foi preparado através de uma reação redox simultânea entre o metal e o polímero condutor. A otimização da síntese foi realizada pela utilização de um planejamento fatorial, estratégia que foi fundamental no processo de escolha das melhores condições. Os resultados obtidos revelaram que a variação das concentrações iniciais dos reagentes (MPTS, Pirrol e HAuCl_4) resultam no aparecimento de efeitos significativos sobre a intensidade de fluorescência, dentre os experimentos realizados, 8 (+ + +) foi aquele para a qual foram obtidos os melhores valores de intensidade de fluorescência, após a excitação em 350 nm. Desse modo, sugerimos que a fluorescência identificada no compósito é resultado de uma interação sinérgica entre as propriedades da superfície das nanopartículas de Au e as cadeias poliméricas que as envolvem por completo. Para confirmar a composição e morfologia do compósito foram utilizadas as técnicas de UV-Vis, FTIR, MEV, STEM.

Por sua vez, resultados preliminares de ensaios em óptica não linear mostraram que o compósito possui propriedades de absorção e refração não linear, sendo que ainda se faz necessário a realização de mais ensaios para melhoria das respostas.

Ensaio de citotoxicidade do compósito Au/Polipirrol foram realizados para 4 tipos de linhagens celulares. Os resultados mostraram que o material proposto é biocompatível, uma vez que a viabilidade das células testadas não foi afetada pela ação do compósito. Como consequência, é razoável supor ser possível utilizar o material em aplicações biológicas.

APÊNDICE D – TRABALHOS EM ANDAMENTO

Nesta seção, será apresentado um resumo de alguns projetos futuros.

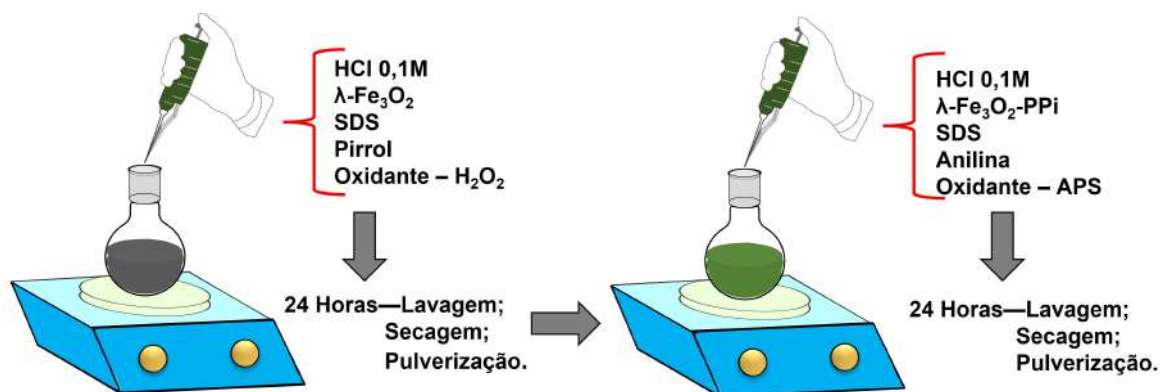
D.1 USO DO COMPÓSITO MAGNÉTICO DE POLIPIRROL – POLIANILINA PARA O BIOSSENSORIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE FUNGOS

Neste primeiro projeto, um material magnético revestido por uma bicamada de polímeros condutores (polipirrol-polianilina) foi preparado para ser utilizado no biossensoriamento de ácidos nucleicos. Além disso, uma prova do conceito foi realizada para o uso desse material na extração e purificação de DNA a partir de amostras de fungos.

D.1.1 Preparação e caracterização por espectroscopia UV-Visível e FTIR do λ - Fe_2O_3 /PPi-PANI

▪ Preparação

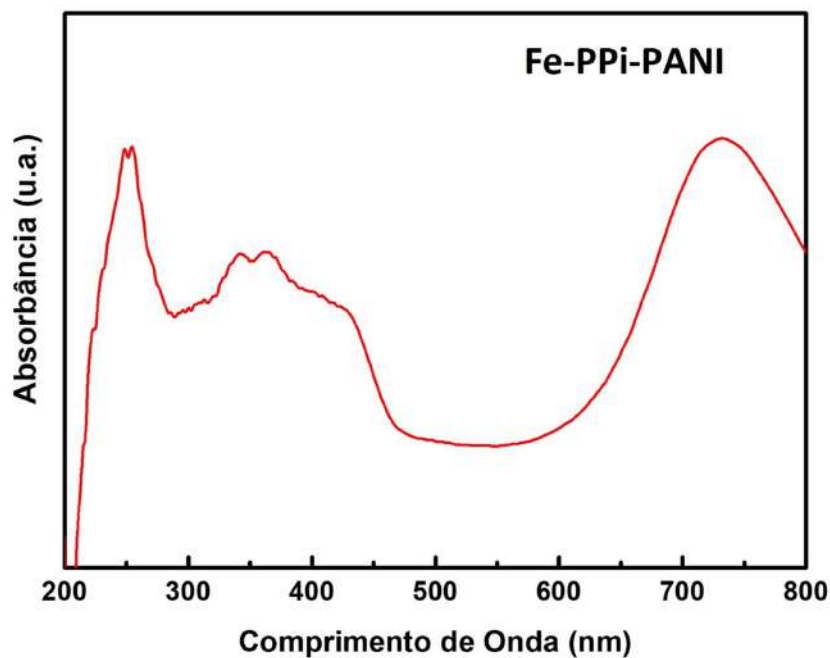
Figura 123 – Etapas de preparação do compósito.



Fonte: Autoria própria (2021).

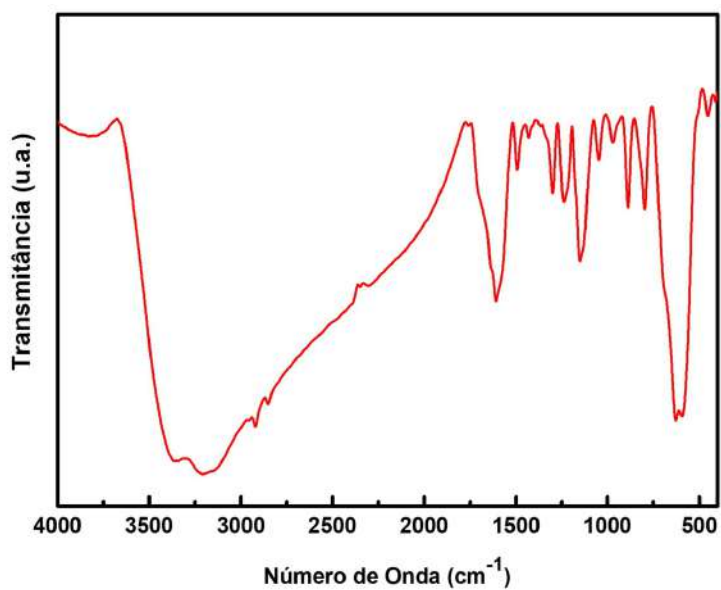
- **Caracterização: Espectroscopia UV-Vis e FTIR**

Figura 124 – Espectro UV-Vis das nanopartículas magnéticas de polipirrol-polianilina.



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 125 – Espectro FTIR das nanopartículas magnéticas de polipirrol-polianilina.

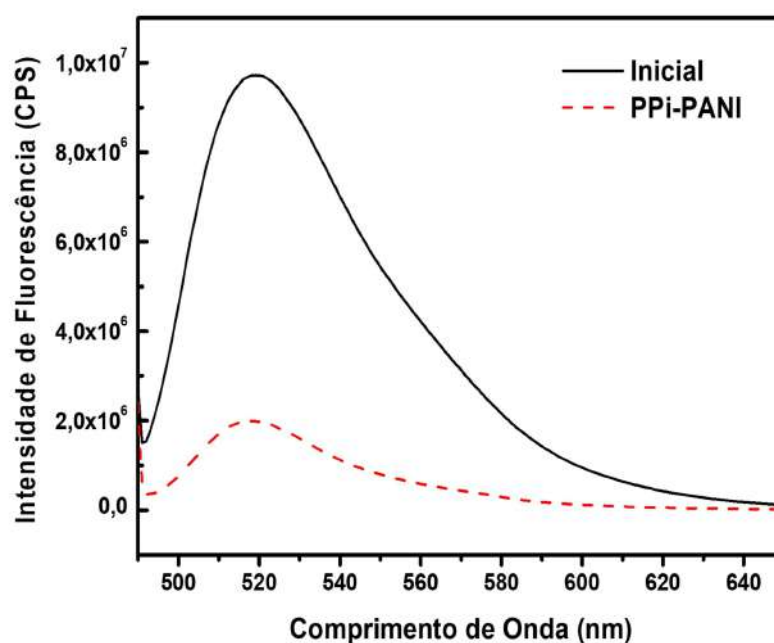


Fonte: Autoria própria (2021).

D.1.2 Ensaios de biossensoriamento de DNA usando o nanocompósito magnético de Polipirrol-Polianilina

Para os ensaios de biossensoriamento com o material proposto, sondas de DNA do patógeno *Leptospira Interrogans* marcadas com um fluoróforo FAM foram utilizadas como prova do conceito. O princípio do processo de biossensoriamento é semelhante a aquele mostrado no Capítulo 3. Na Fig. 126, é mostrado o espectro de emissão da sonda de FAM-ssDNA antes e depois da interação do compósito.

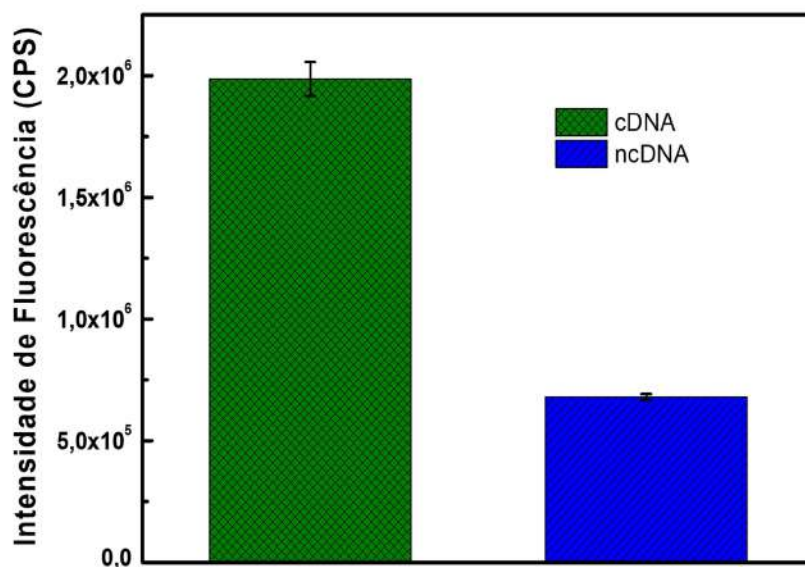
Figura 126 – Espectro de emissão de fluorescência antes e depois da interação com o nanocompósito magnético de PPI-PANI.



Fonte: Autoria própria (2021).

Por sua vez, na Fig. 127 se mostra que é possível diferenciar o alvo complementar do não-complementar. Dessa forma, sugerimos que esse material é promissor para ser usado como plataforma de biossensoriamento. Como perspectiva, se faz necessário realizar toda a análise de cinética de imobilização da sonda FAM-ssDNA, e cinética de hibridização, e variação da concentração do alvo complementar, além da análise de estabilidade, entre outros.

Figura 127 – Recuperação da fluorescência após a interação do sistema NPsM/PPi-PANI/FAM-ssDNA com o seu alvo complementar (cDNA) e não complementar (ncDNA).

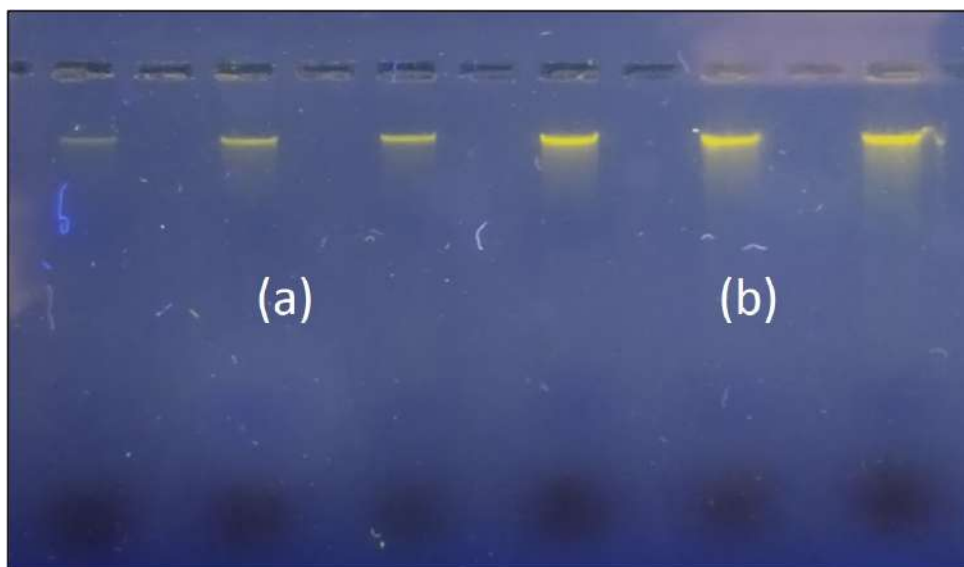


Fonte: Autoria própria (2021).

D.2 EXPERIMENTO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE FUNGOS USANDO O NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO DE POLIPIRROL-POLIANILINA

O material compósito λ -Fe₂O₃/PPi-PANI foi também utilizado para a purificação de DNA a partir de amostras de fungos (*Colletotrichum* e *Lasiodiplodia*), fornecidos pelo laboratório de Fungos do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O protocolo utilizado nos testes foi semelhante a aquele usado na extração e purificação de amostras vegetais, com algumas modificações, como, por exemplo, o não uso da centrífuga e uma solução de ligação. Na Fig.128, são mostradas as bandas de eletroforese, em triplicata, após a purificação do DNA a partir das amostras dos fungos do gênero *Colletotrichum* (a) e *Lasiodiplodia* (b). Para esse projeto, a perspectiva é otimizar o protocolo, de modo a resolver questões de contaminação por proteínas, observada pela razão $A_{260/280}$. Além de realizar estudos de adsorção utilizando um sistema modelo de DNA de esperma de Salmão.

Figura 128 – Bandas de eletroforese após a extração de DNA a partir de amostras de fungos.

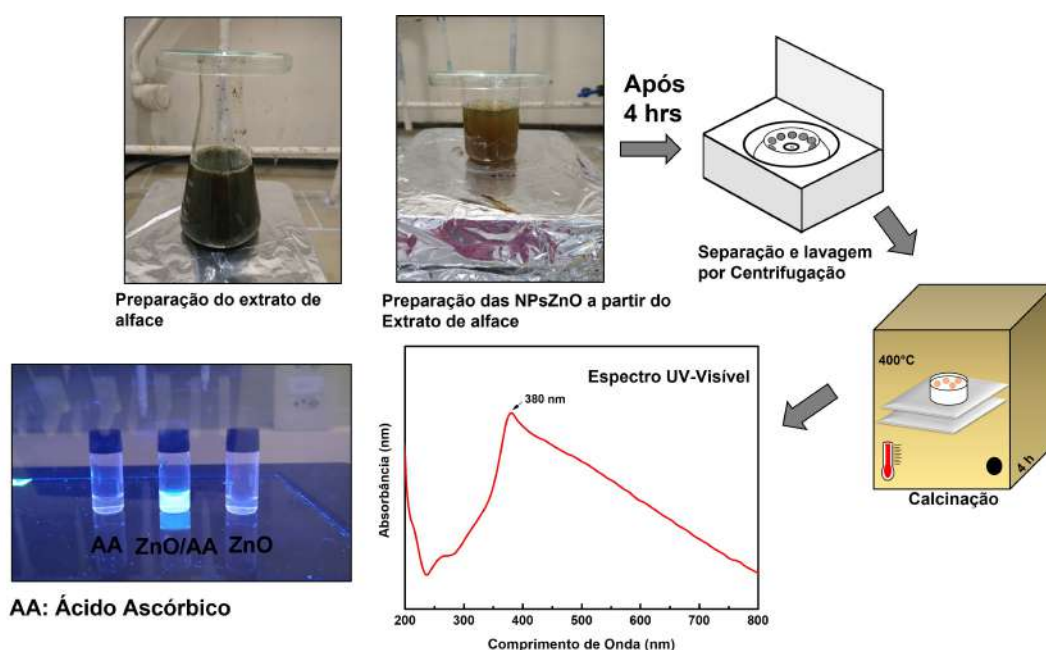


Fonte: Autoria própria (2021).

D.3 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO A PARTIR DE SÍNTESE VERDE PARA DETECÇÃO FLUORESCENTE DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Neste projeto, nanopartículas de óxido de zinco foram sintetizadas usando o extrato de folhas de alface. A partir do espectro UV-Vis correspondente, verificamos que conseguimos obter com sucesso as nanopartículas de óxido de zinco. Após a preparação, secagem, e calcinação, 0,5 mg do pó obtido foi diluído em 500 μL de água deionizada e, em seguida, 500 μL de ácido ascórbico (0,1 M) foi adicionado ao frasco. Após isso, o frasco foi levado para um transiluminador e a amostra apresentou uma alta fluorescência, como mostrado na Fig. 129. Dessa forma, o resultado promissor mostrou que podemos seguir com o projeto e, em uma perspectiva de trabalhos futuros, poderemos caracterizar as nanopartículas de zinco por diversas técnicas, além de investigar o fenômeno fluorescente e montar um sensor de ácido ascórbico.

Figura 129 – Etapas de preparação e espectro UV-Vis das nanopartículas de óxido de zinco e prova do conceito com o ácido ascórbico.

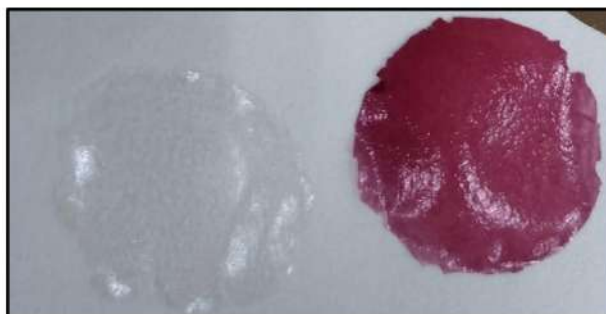
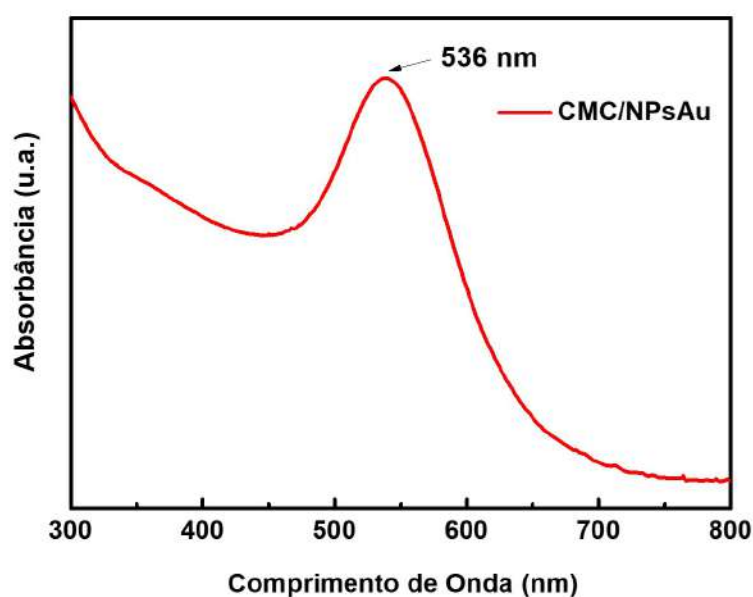


Fonte: Autoria própria (2021).

D.4 PREPARAÇÃO DE FILMES COMPÓSITOS DE CARBOXIMETILCELULOSE-NPSAU USANDO O ÁCIDO CÍTRICO COMO REDUTOR E RETICULADOR

Neste próximo projeto, um filme de carboximetilcelulose foi preparado juntamente com as nanopartículas de ouro, com o ácido cítrico sendo usado como redutor do precursor do ouro e, além disso, podendo servir como agente reticulador. A reticulação das cadeias da CMC torna o material passível a ser utilizado em meios aquosos, sem que haja sua dissolução. Para esse projeto, a perspectiva será aprimorar o método de preparação, avaliando a concentração de ácido cítrico na solução. Além disso, temos que avaliar a possibilidade de futuras aplicações do filme de CMC-NPsAu, como sensoriamento de glicose, ou de ácidos nucleicos.

Figura 130 – Espectro UV-Vis e a foto do compósito CMC-NPsAu. Além do filme de CMC sem a presença das NPsAu.



Fonte: Autoria própria (2021).

APÊNDICE E – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Artigo Publicado

Biomaterials and Biosystems 7 (2022) 100060

Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials and Biosystems

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbiosy

Use of polypyrrole-polystyrene membranes for extracting DNA from plant tissues

Winnie Q. Brandão^a, Romário J. da Silva^b, Lizeth C. Mojica-Sánchez^b, Bruna G. Maciel^a, Gabriela P. Ratkovski^b, Celso P. de Melo^{a,b,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Brazil
^b Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Electrospinning
 Polypyrrole
 Salmon sperm DNA, DNA plant extraction,
 Lettuce leaves

ABSTRACT

We describe the preparation of a membrane composed of polypyrrole-polystyrene (PPy-PS) and its application in DNA extraction. We adopted the electrospinning technique to prepare polystyrene (PS) membranes, which we used as substrates for incorporating polypyrrole chains through an *in situ* chemical procedure. As a model system, we initially investigated the use of PPy-PS membranes for the extraction of salmon sperm DNA from aqueous solutions. These studies have shown that the PPy-PS membrane has a maximum adsorption capacity of 236.0 mg of DNA per gram of PPy after 30 min of exposure to a DNA solution (100 mg/L). We incorporated the PPy-PS membranes into centrifugation columns, which we used to carry out experiments for extracting and purification of DNA from curly lettuce leaves. The protocol was initially optimized by first examining the most appropriate concentration of the three components of the lysis buffer (Tris/HCl, NaCl, and EDTA-Na). We then investigated the most adequate volumes of the concentrated surfactant solution (SDS 20%) and that used in the protein and polysaccharide precipitation step (5 M potassium acetate, pH 6.3), factors that directly influence the quality and quantity of the fraction of DNA obtained. For curly lettuce leaves, both in their mature and young stages, the yield and purity of the DNA purified using the PPy-PS membrane were comparable to those obtained using a commercial kit. In both cases, the collected DNA samples presented excellent integrity and quality. These results are suggestive that these composite membranes are competitive with the commercial kits available for the extraction and purification of DNA from plants.

2. Artigos em processo de submissão

- Winnie Q. Brandão, Bruna G. Maciel, Elton M. de Araújo Lima, Lizeth C. Mojica-Sánchez, Romário J. da Silva, Celso P. de Melo. Use of a carboxymethylcellulose magnetic composite for removal of toluidine blue dye from aqueous media.
- Andressa N. R. Leal, Maurício F. de Aguiar, Winnie Q. Brandão, Hérica D. da Rocha, Iranildo J. da Cruz Filho, Celso P. de Melo. Use of Hybrid Polyacrylonitrile/Polypyrrole/Polyaniline Nonwoven Mats for Removal of Remazol Black B Dye.

3. Depósitos de Patentes Nacionais



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 018159 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO REVESTIDA COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO BIOPLATAFORMA SUSTENTÁVEL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Resumo: A presente invenção descreve o uso de membranas da casca do ovo de galinha (MCO) modificadas pela deposição de nanopartículas de ouro (NPsAu) como uma bioplatforma sustentável para a imobilização e subsequente detecção de sequências de DNA de patógenos, como a *Leptospira interrogans*. O princípio de detecção se baseia na imobilização direta das cadeias de fita simples de DNA marcadas com um fluoróforo (FAM-ssDNA) através de interações entre as nucleobases do ssDNA e as nanopartículas de ouro, de forma esférica. A hibridização ocorre após o sistema (MCO-NPsAu/FAM-ssDNA) entrar em contato a sequência de DNA alvo complementar (cDNA), quando a interação é então enfraquecida e ocorre a dessorção do dsDNA (cadeias de fita dupla de DNA), o que leva ao aparecimento de um forte sinal de fluorescência. Este tipo de biossensores pode vir a se tornar uma excelente alternativa de dispositivos simples, eficientes e sensíveis para o diagnóstico precoce de doenças, o que facilitaria a tomada de decisões médicas rápidas pelos profissionais de saúde e, consequentemente, o tratamento da doença em seu estágio inicial. Adicionalmente, essa metodologia de rápida identificação de patógenos pode ser de grande valor para a diminuição de custos na agricultura e nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

Figura a publicar: 5

4. Artigos em preparação

- Andressa N. R. Leal*, Winnie Q. Brandão*, Maurício F. de Aguiar, Dionísio G. Kór, Lizeth C. Mojica-Sánchez, Elton M. de Araújo Lima, Celso P. de Melo, Yeda M. B. de Almeida. Preparação de nanopartículas de óxido de zinco a partir de síntese verde para detecção fluorescente de ácido ascórbico.

- Andressa N. R. Leal, Maurício F. de Aguiar, Winnie Q. Brandão, Celso P. de Melo, Yeda M. B. de Almeida. Síntese de membranas superhidrofóbicas para captura de óleo.
- Romário J. da Silva, Lizeth C. Mojica-Sánchez, Winnie Q. Brandão, Celso P. de Melo. Membrana de PVDF revestidas com nanopartículas de prata para uso em atividade antimicrobiana.
- Mojica-Sánchez, L.C., Ratkovski, G.P., Silva, R.J, Maciel, B. G., Brandão, Q. W., Melo, C.P., Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles (AgFeO_2) as hybrid platforms for the development of diagnostic sensors.
- Jainaldo Alves da Costa, Winnie Queiroz Brandão, Pollyanna Michelle da Silva, Danilo Gustavo Rodrigues Silva, Celso Pinto de Melo, Thiago Henrique Napoleão, Patrícia Maria Guedes Paiva. Síntese verde de nanopartículas de prata usando extrato de folhas de *Euphorbia hirta* L. e avaliação de sua atividade antimicrobiana e antioxidante.

5. Patente em Preparação

- Andressa N. R. Leal, Winnie Q. Brandão, Dionísio G. Kór, Maurício F. de Aguiar, Lizeth C. Mojica-Sánchez, Elton M. de Araújo Lima, Celso P. de Melo, Yeda M. B. de Almeida. Preparação de nanopartículas de óxido de zinco a partir de síntese verde para detecção fluorescente de ácido ascórbico.