



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

BRUNA GOMES MACIEL

**APLICAÇÃO DE NANOESTRUTURAS
PARA REMEDIAÇÃO AMBIENTAL, EXTRAÇÃO DE DNA,
SUPERCAPACITOR E DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Recife

2022

BRUNA GOMES MACIEL

**APLICAÇÃO DE NANOESTRUTURAS
PARA REMEDIAÇÃO AMBIENTAL, EXTRAÇÃO DE DNA,
SUPERCAPACITOR E DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciência de materiais.

Área de concentração: Materiais não metálicos.

Orientador: Celso Pinto de Melo

Coorientadores: Eduardo Henrique Lago Falcão
Lizeth Carolina Mojica-Sanchez

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecária Nataly Soares Leite Moro, CRB4-1722

M152a Maciel, Bruna Gomes
Aplicação de nanoestruturas para remediação ambiental, extração de DNA, supercapacitor e detecção de ácidos nucleicos / Bruna Gomes Maciel. – 2022.
179 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. Nanocompósito magnético. 3. Remoção de corantes. 4. Extração DNA. 5. Nanopartículas de ouro. I. Melo, Celso Pinto de (orientador). II. Título.

620.19

CDD (23. ed.)

UFPE- CCEN 2023 - 177

BRUNA GOMES MACIEL

**APLICAÇÃO DE NANOESTRUTURAS PARA REMEDIAÇÃO AMBIENTAL,
EXTRAÇÃO DE DNA, SUPERCAPACITOR E DETECÇÃO DE ÁCIDOS
NUCLEICOS**

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: 07/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Yêda Medeiros Bastos de Almeida (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Severino Alves Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Clarissa de Almeida Olivati (Examinadora Externa)
Universidade Estadual Paulista

Prof^a. Dr^a. Marystela Ferreira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de São Carlos

Dedico esse trabalho aos meus pais Edilene e Noé por todo amor e dedicação. À minha irmã Maria Eduarda por todo companheirismo e apoio. Ao meu noivo Romário por todo amor, paciência, insistência, apoio e por acreditarem em mim quando estava desanimada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a mainha (Edilene Gomes) e a painho (Noé Ferreira) pela minha criação, pelos esforços realizados, por me apoiarem nesse caminho incompreendido por muitos, e por todo amor.

A minha irmã Maria Eduarda, por me incentivar, por escutar as reclamações de cansaço, mas também as pequenas conquistas da pesquisa, pela calma transmitida e toda partilha.

Ao meu noivo Romário, iniciamos no mestrado e aqui estamos concluindo mais uma etapa, de muitas que virão. Grata por seu amor, incentivo, paciência, por tudo que estamos construindo, pelos debates na pesquisa e o companheirismo nos turnos de doze horas.

Aos meus familiares de sangue por me lembrar que existe vida além do laboratório e todos os momentos de comemoração. Em memória a minha avó Maria, ao meu avô Gercino, e aos meus tios Reginaldo e Edson, como queria vocês presentes fisicamente na conclusão dessa etapa. E a minha segunda família, da Silva Santos, os vizinhos que me acompanham desde criança, e confirmam que existe laços verdadeiros além do sangue.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração, que me afastava do mundo acadêmico e ajudou a manter a sanidade. A Gabi que de colega de pesquisa, se tornou amiga, vizinha de apartamento, e dupla no crossfit, abandonamos 157% do sedentarismo, e se tornou o momento de descontração e evolução.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, em especial a Kênia Barros por ter me orientado na iniciação científica e me apresentar com toda calma e gentileza o mundo da pesquisa. Ao meu orientador Celso P. de Melo pelos ensinamentos, conselhos, e contribuições na pesquisa e na vida. E aos coorientadores Eduardo Falcão e Lizeth Sanchez pelas contribuições e discussões.

Aos amigos encontrados durante toda essa trajetória acadêmica, desde a graduação até o fim do doutorado.

Aos meus colegas de laboratório pelas colaborações, convivência e risadas.

A UFPE que foi minha segunda casa desde o início do ensino superior, e ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais (PGMTR), pela oportunidade de crescimento profissional.

A FACEPE pela bolsa concedida para realização desse trabalho.

Aos Departamentos de Química Fundamental, Engenharia mecânica, aos técnicos, a Ingrid da secretaria de materiais por todo suporte nas pesquisas realizadas.

E a minha psicóloga que contribuiu bastante me ajudando a manter a sanidade nesse período de doutorado, que por si só já é complicado, e teve um extra acentuado com a pandemia.

Assim, com o coração cheio de alegria agradeço a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a conclusão dessa etapa, pois a concretização desse trabalho só foi possível devido um trabalho em equipe.

RESUMO

Neste trabalho, abordamos a preparação e caracterização de materiais nanoestruturados e sua aplicação em diferentes áreas, como na remoção de contaminantes, extração e purificação de DNA, sensoriamento do patógeno de *Leishmania*, e supercapacitor. Inicialmente, sintetizamos o nanocompósito magnético (NCM) de óxido de ferro/quitosana/polianilina (γ -Fe₂O₃/Qui/Pani), que foi devidamente caracterizado por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), curvas de magnetização e difração de raios-X (DRX). Esse nanocompósito foi então aplicado para a remoção de corantes (alaranjado de metila (AM), índigo carmim (IC) e rodamina B (RB)) dispersos em meio aquoso. Para isso, analisamos o efeito de variações em parâmetros como o valor do pH do meio, a concentração de corante e o tempo de interação, o que nos permitiu o ajuste dos dados a diferentes modelos usados na descrição das isotermas e da cinética do processo de adsorção dos contaminantes. Ao utilizarmos 2 mg de NCM, a capacidade de adsorção foi de 147 mg para o AM, de 126 mg para o IC, e 80 mg para a rodamina, valores considerados promissores face o desempenho de outros materiais adsorventes descritos na literatura. Examinamos ainda a influência da variação de temperatura sobre a adsorção, o que nos permitiu estabelecer que o processo ocorre de maneira espontânea e é de natureza endotérmica. Esse mesmo nanocompósito foi também usado para a extração de DNA em amostras de natureza complexa, como sangue humano. Nessa etapa, foram otimizados diferentes parâmetros, como a quantidade de NCM a ser utilizada, o volume de solução tampão adequado para promover a dessorção, sendo então os resultados obtidos comparados com aqueles resultantes do uso de kits comerciais baseados em sistemas de coluna (membranas) e partículas. Em paralelo, iniciamos duas linhas de trabalho adicionais. A primeira diz respeito ao desenvolvimento de uma plataforma formada por um substrato de vidro funcionalizado e nanopartículas (NPs) de ouro que possa ser utilizada para testes de diagnóstico. Para isso, implementamos estudos de funcionalização de substratos de vidro pela deposição em fase vapor de grupos tiolados e aminados, que foram em seguida colocados para interagir com NPs de ouro para a formação de filmes nanoestruturados. Através da espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e de microscopia eletrônica de varredura (MEV-STEM) foi possível acompanhar as etapas. A seguir, realizamos provas de conceitos para a detecção de ácido nucleico por meio da imobilização de sondas tioladas de DNA do patógeno de *Leishmania infantum* que demonstra o potencial dessa pesquisa. Já o segundo projeto foi voltado para eletrodos

de dispositivos de armazenamento de energia com base em membranas de casca de ovo (MCO), que foram desmineralizadas e submetidas a uma ponteira ultrassônica com a posterior incorporação de nanoestruturas de carbono (NEC) como nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT), e em seguida a adição de poli(3,4-etilenodioxitiofeno) poliestireno sulfonato (PEDOT:PSS). Aqui, nosso objetivo foi o de melhorar as propriedades de condução elétrica e armazenamento de energia pelo fenômeno de dupla camada elétrica (EDC) e pseudocapacitância (PsC), em dispositivos de armazenamento de energia, como supercapacitores orgânicos.

Palavras-chave: nanocompósito magnético; remoção de corantes; extração DNA; nanopartículas de ouro; detecção de ácido nucleico; supercapacitor.

ABSTRACT

In this work, we approach the preparation and characterization of nanostructured materials and their application in different areas, such as contaminant removal, DNA extraction and purification, sensing of the Leishmania pathogen, and supercapacitor. Initially, we synthesized the magnetic nanocomposite (MNC) of iron oxide/chitosan/polyaniline (γ -Fe₂O₃/Chi/Pani), which was properly characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), magnetization curves and X-ray diffraction (XRD). This nanocomposite was then applied to remove dyes (methyl orange (AM), indigo carmine (IC) and rhodamine B (RB)) dispersed in an aqueous medium. For this, we analyzed the effect of variations in parameters such as the pH value of the medium, the dye concentration and the interaction time, which allowed us to adjust the data to different models used in the description of the isotherms and the kinetics of the process of adsorption of contaminants. When using 2 mg of MNC, the adsorption capacity was 147 mg for AM, 126 mg for IC, and 80 mg for rhodamine, values considered promising compared to the performance of other adsorbent materials described in the literature. We also examined the influence of temperature variation on adsorption, which allowed us to establish that the process occurs spontaneously and is endothermic in nature. This same nanocomposite was also used to extract DNA from samples of a complex nature, such as human blood. In this step, different parameters were optimized, such as the amount of MNC to be used, the volume of adequate buffer solution to promote desorption, and the results obtained were then compared with those resulting from the use of commercial kits based on column systems (membranes) and particles. In parallel, we started two additional lines of work. The first concerns the development of a platform formed by a functionalized glass substrate and gold nanoparticles (NPs) that can be used for diagnostic tests. For this, we implemented functionalization studies of glass substrates by the vapor-phase deposition of thiolated and amine groups, which were then placed to interact with gold NPs to form nanostructured films. Through spectroscopy in the ultraviolet and visible region (UV-Vis) and scanning electron microscopy (SEM-STEM) it was possible to follow the steps. Next, we performed proofs of concepts for the detection of nucleic acid through the immobilization of thiolated probes of DNA from the Leishmania infantum pathogen, which demonstrates the potential of this research. The second project was aimed at the

electrodes for energy storage devices based on eggshell membranes (MCO) that were demineralized and subjected to an ultrasonic tip with the subsequent incorporation of carbon nanostructures (NEC) as multilayer carbon nanotubes (MWCNT), and then the addition of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate (PEDOT: PSS). Here, our objective was to improve the electrical conduction and energy storage properties by the phenomenon of electrical double layer (EDC) and pseudocapacitance (PsC), in energy storage devices such as organic supercapacitors.

Keywords: magnetic nanocomposite; dye removal; DNA extraction; gold nanoparticles; nucleic acid detection; supercapacitor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura da molécula de quitosana.	30
Figura 2 –	Estrutura química dos estados de oxidação da polianilina. .	31
Figura 3 –	Representação da síntese das NPs γ -Fe ₂ O ₃ /Qui, e posterior polimerização, resultando no NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani.	33
Figura 4 –	Representação esquemática dos experimentos para estudos de adsorção dos corantes pelo nanocompósito γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani em modo batelada.	38
Figura 5 –	Representação esquemática dos experimentos para estudos de dessorção dos corantes, e reutilização do nanocompósito γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para ciclos sucessivos. ..	40
Figura 6 –	Espectros infravermelho do NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (a), das NPs γ -Fe ₂ O ₃ /Qui (b) e da Quitosana (c).	41
Figura 7 –	Curvas TGA das NPs γ -Fe ₂ O ₃ /Qui (a) e do NCM (b).	42
Figura 8 –	Difratogramas das NPs γ -Fe ₂ O ₃ /Qui (a) e do NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (b).	43
Figura 9 –	Curvas de magnetização das NPs γ -Fe ₂ O ₃ /Qui e do NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani.	44
Figura 10 –	Estrutura química dos corantes alaranjado de metila (a), índigo carmin (b), e rodamina B (c).	45
Figura 11 –	Efeito da variação de pH para os corantes alaranjado de metila (triângulo), índigo carmin (quadrado), e rodamina (círculo). Concentração de 20mg/L. Quantidade de NCM 2 mg para volume de 15 mL.	46
Figura 12 –	Espectros UV-Vis antes (linha contínua) e após a interação com as nanopartículas γ -Fe ₂ O ₃ /Qui (linha tracejada) e com o nanocompósito (linha traço ponto) para o corante alaranjado de metila (a), índigo carmin (b) e rodamina B (c). Concentração inicial 20 mg/L.	47
Figura 13 –	Potencial zeta do NCM.	48
Figura 14 –	Mecanismo proposto para interação entre os corantes examinados e o NCM.	49
Figura 15 –	Efeito do tempo de interação na porcentagem de adsorção dos corantes alaranjado de metila (triângulo), índigo carmin (quadrado), e rodamina (círculo).	50
Figura 16 –	Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção do corante alaranjado de metila com o NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para os modelos cinéticos: de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b), Morris-Weber (c), e ajuste dos modelos cinéticos junto aos dados experimentais (d).	52
Figura 17 –	Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção do corante índigo carmin com o NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para os modelos cinéticos: de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b), Morris-Weber (c), e ajuste dos modelos cinéticos junto aos dados experimentais (d).	53
Figura 18 –	Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção do corante rodamina B com o NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para os modelos cinéticos: de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-	53

	segunda ordem (b), Morris-Weber (c), e ajuste dos modelos cinéticos junto aos dados experimentais (d).	
Figura 19 –	Efeito da concentração inicial do corante alaranjado de metila (a), índigo carmim (b), e rodamina B (c) em relação a porcentagem (%) e capacidade de adsorção (qe) do NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani.	55
Figura 20 –	Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção de AM com o NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani usando os modelos de Langmuir (a), Freundlich (b), Temkin (c), e isotermas de adsorção dos valores experimentais e teóricos (d).	57
Figura 21 –	Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção de IC com o NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani usando os modelos de Langmuir (a), Freundlich (b), Temkin (c), e isotermas de adsorção dos valores experimentais e teóricos (d).	57
Figura 22 –	Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção de RB com o NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani usando os modelos de Langmuir (a), Freundlich (b), Temkin (c), e isotermas de adsorção dos valores experimentais e teóricos (d).	58
Figura 23 –	Efeito da temperatura em relação a capacidade de adsorção do NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para diferentes concentrações dos corantes alaranjado de metila (a), do índigo carmim (b), e da rodamina B (c).	60
Figura 24 –	Ajustes lineares da isoterma de Langmuir para adsorção do corante AM pelo NCM à temperatura de 10 (a), 20 (b), 30 (c), e 50 °C (d).	61
Figura 25 –	Ajustes lineares da isoterma de Langmuir para adsorção do corante IC pelo NCM à temperatura de 10 (a), 20 (b), 30 (c), e 50 °C (d).	62
Figura 26 –	Ajustes lineares da isoterma de Langmuir para adsorção do corante RB pelo NCM à temperatura de 10 (a), 20 (b), 30 (c), e 50 °C (d).	63
Figura 27 –	Ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir em função da temperatura para o alaranjado de metila (a), índigo carmim (b), e rodamina B (c).	65
Figura 28 –	Percentual de dessorção de AM pelo NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para diferentes soluções (a), e respectivos espectros UV-Vis (b), cinética de dessorção (c), e reutilização (d).	66
Figura 29 –	Percentual de dessorção de IC pelo NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para diferentes soluções (a), e respectivos espectros UV-Vis (b), cinética de dessorção (c), e reutilização (d).	67
Figura 30 –	Percentual de dessorção de RB pelo NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para diferentes soluções (a), e respectivos espectros UV-Vis (b), cinética de dessorção (c), e reutilização (d).	68
Figura 31 –	Estrutura dos nucleotídeos (a), e representação da cadeia dupla hélice do DNA (b).	73
Figura 32 –	Esquema representativo do processo de extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue.	79

Figura 33 –	Representação dos processos de PCR convencional e em tempo real.	80
Figura 34 –	Equipamentos e acessórios que compõem um sistema de eletroforese de configuração horizontal.	83
Figura 35 –	Etapas do procedimento para uma corrida de eletroforese em gel de agarose.	84
Figura 36 –	Dessorção do DNA a partir de amostra de sangue humano usando o NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani para as soluções: 1- glicina/NaOH pH 8,9; 2- Tris/HCl/0,5 mmol L ⁻¹ EDTA pH 9,0; 3- Tris/HCl/1 mmol L ⁻¹ EDTA pH 8,0; 4- Tris/SDS pH 8,0; 5- Tris/HCl pH 8,0; 6- Citrato de sódio/Ác. cítrico pH 6,6; 7- Na ₂ HPO ₄ /Ác. cítrico pH 7,1; e 8- fosfato monobásico/bibásico pH 7,8 (a), e espectros UV-Vis das soluções analisadas (b).	86
Figura 37 –	I) Espectros UV-Vis para adsorção de DNA em função da quantidade utilizada de NCM γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (a), e γ -Fe ₂ O ₃ /Pani (b), II) Rendimento dos materiais γ -Fe ₂ O ₃ /Pani (círculo) e γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (quadrado).	88
Figura 38 –	Comparação do volume de eluição em relação a concentração de DNA para os NCMs γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (a), e γ -Fe ₂ O ₃ /Pani (b).	89
Figura 39 –	Rendimento de DNA extraído usando os NCMs γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (a), e γ -Fe ₂ O ₃ /Pani (b) para eluições sucessivas.	90
Figura 40 –	Rendimento e pureza de DNA genômico extraído de sangue humano por diversos adsorventes de fase sólida.	91
Figura 41 –	Curvas de amplificação PCR em tempo real para amostras de DNA obtidas a partir de sangue humano com vários adsorventes de fase sólida (a), e sem realizar eluição (b). ...	93
Figura 42 –	Eletroforese após PCR das amostras sem eluição γ -Fe ₂ O ₃ /Pani (1), γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (2), KCPM5 (3), amostras eluídas γ -Fe ₂ O ₃ /Pani (4), γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani (5), KCM1 (6), KCM2 (7), KCAPM6 (8), KCPM3 (9), KCPM4 (10), KCPM5 (11).	94
Figura 43 –	Representação esquemática das principais etapas de limpeza e funcionalização via fase-vapor dos substratos de vidro.	99
Figura 44 –	Representação esquemática da síntese das NPs de Au.	100
Figura 45 –	Representação esquemática da deposição das NPs de Au sobre as lamínulas funcionalizadas.	100
Figura 46 –	Representação esquemática do procedimento de imobilização das sondas ssDNA-SH, e hibridização.	102
Figura 47 –	Diagrama simplificado de Perrin-Jablonski. As linhas tracejadas se referem aos processos não radiativos e as linhas contínuas aos processos radiativos.	103
Figura 48 –	Distinção entre os estados singleto e tripleto.	103
Figura 49 –	Espectro UV-Vis da solução coloidal das nanopartículas de ouro.	108
Figura 50 –	Imagens STEM das NPs Au sintetizadas (a), de maior magnificação (b), e histograma de distribuição de tamanho	109

	das nanopartículas obtido da média de 350 NPs Au de diferentes micrografias STEM (c).	
Figura 51 –	Ângulo de contato para as lamínulas de vidro após o processo de limpeza (a), funcionalizadas (b) e recobertas com filme de NPs Au (c).	110
Figura 52 –	Imagens MEV das lamínulas de vidro funcionalizadas com MPTS e APTES pelo período de 2 h I) e 4 h II), e tempo de contato com a solução de NPs de Au de 4h (a, d), 6h (b, e), 12h (c, f).	111
Figura 53 –	Imagens AFM das superfícies das lamínulas de vidro analisadas com 2h de funcionalização I), e período para formação do filme das NPs de Au seguida de sua imagem topográfica de 4h (a), 6h (b), e 8h (c).	112
Figura 54 –	Imagens AFM das superfícies das lamínulas de vidro analisadas com 4h de funcionalização II), e período para formação do filme das NPs de Au seguida de sua imagem topográfica de 4h (d), 6h (e), 8h (f), 12h (g).	113
Figura 55 –	Espectros UV-Vis das lâminas-NPs Au antes e após a imobilização da sonda tiolada (ssDNA-SH).	114
Figura 56 –	Espectros de emissão de fluorescência da solução de ssDNA-SH (50 nmol) sob diferentes condições: antes e após a interação com a plataforma lâmina-NPs Au.	115
Figura 57 –	Espectros de emissão de fluorescência das diferentes soluções de ssDNA-FAM (50 nmol) antes e após a interação com a plataforma lâmina-NPs Au/ssDNA-SH: antes da interação (a), e após a interação com a plataforma para amostra não complementar (NC-ssDNA-FAM) (b), e amostra complementar (C-ssDNA-FAM) (c).	116
Figura 58 –	Histogramas com as percentagens de sonda imobilizada (I) e ssDNA complementar, (C) e não complementar (NC) após interação com as plataformas lâminas-NPs Au em função dos diferentes bloqueadores analisados.	118
Figura 59 –	Esquema ilustrativo de um dispositivo de armazenamento eletrolítico baseado no mecanismo de EDLC.	122
Figura 60 –	Esquema representativo dos diferentes mecanismos de armazenamento pseudocapacitivos: eletrossorção (a), intercalação (b) e oxirredução (c).	123
Figura 61 –	Principais etapas do processo de preparação das membranas MCO e a incorporação de PICs.	126
Figura 62 –	Representação esquemática do método adotado para a fabricação dos dispositivos supercapacitores flexíveis de estado sólido baseados nos eletrodos proteicos compósitos nanoestruturados (a) e uma imagem do dispositivo (b).	127
Figura 63 –	Representação esquemática da configuração experimental adotada para a caracterização eletroquímica dos dispositivos.	130
Figura 64 –	Os espectros FTIR da MCO pura (a), com a incorporação de nanotubos de carbono MCO/MWCNT (b), e de nanotubos e PEDOT:PSS MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (c).	132

Figura 65 –	Espectros de UV-Vis: da MCO pura (a), com a incorporação de nanotubos de carbono MCO/MWCNT (b), e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (c).	133
Figura 66 –	As micrografias de MEV da superfície das membranas MCO in natura (a), após o processo de desreticulação por estresse mecânico ultrassom e sua reconstituição (b), e os eletrodos de MCO com a incorporação de nanotubos de carbono MCO/MWCNT (c), e PEDOT:PSS MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (d).	134
Figura 67 –	As curvas de voltametria cíclica em diferentes taxas de varredura para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/MWCNT (a) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (b).	135
Figura 68 –	Curvas galvanométricas obtidas a diferentes valores de corrente para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/MWCNT (a) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (b).	135
Figura 69 –	As curvas de voltametria cíclica com uma taxa de varredura de 50 mV.s^{-1} (a), e as curvas galvanométricas obtidas com corrente de $0,5 \text{ mA}$ (b), para os dispositivos preparados com os eletrodos MCO/MWCNT e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS.	137
Figura 70 –	(a) A impedância elétrica dos dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii) (no detalhe, a impedância elétrica para a membrana MCO pura); (b) O ângulo de fase em função da frequência para os dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii).	138
Figura 71 –	(a) A capacitância volumétrica em função da densidade de corrente aplicada para os dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii); (b) O diagrama de Ragone para os dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCN MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii).	140
Figura 72 –	Eficiência de retenção da capacitância (carga-descarga) dos dispositivos SCs preparados com eletrodos MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (a), e variação da resistência elétrica dos dispositivos SCs para dobramento de 0° a 180° para 1000 ciclos consecutivos de dobramentos, respectivamente (b).	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros cinéticos para adsorção de corantes com o nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$	51
Tabela 2 –	Parâmetros de isotermas para os modelos de Langmuir, Freundlich e Temkin correspondentes a adsorção de corantes através do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$	59
Tabela 3 –	Parâmetros termodinâmicos para adsorção dos corantes AM, IC e RB com o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$	64
Tabela 4 –	Rendimento comparativo do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ com materiais descritos na literatura.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Alaranjado de metila
APS	Persulfato de amônio
APTS	(3-Aminopropil) trietoxisilano
BSA	Albumina de soro bovino
C₀	Concentração inicial
C_f	Concentração final
CI	Conversão interna
C-ssDNA-FAM	DNA complementar marcado com 6-Carboxifluoresceína
CSI	Cruzamento intersistema
Cy 5	cianidina 5
COVID-19	Coronavírus-19
CTAB	Brometo de cetrimônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfatos
DRX	Difração de raios-X
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDLC	Dupla camada elétrica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAM	6-Carboxifluoresceína
FRET	Transferência de energia de ressonância de Forster
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
IC	Índigo carmim
IFI	Imunofluorescência Indireta
m	Massa do adsorvente
MCO	Membrana de casca de ovo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-STEM	Microscopia eletrônica de varredura de transmissão
MPTS	(3-Mercaptopropil) trimetoxisilano
MW	Morris-Weber
MWCNT	Nanotubos de carbono multicamadas
NC-ssDNA-FAM	DNA não complementar marcada com 6-Carboxifluoresceína
NCM	Nanocompósito magnético

NEC	Nanoestruturas de carbono
NPs	Nanopartículas
NLO	Óptica Não-Linear
OMT	Óxidos metálicos de transição
Pani	Polianilina
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEDOT:PSS	Poli(3,4-etilenodioxitiofeno) poliestireno sulfonato
PET	Transferência de elétrons fotoinduzida
pH	Potencial hidrogeniônico
PIC	Polímeros condutores intrínsecos
PNC	Polímeros não-convencionais
PPy	polipirrol
PPO	Pseudo-Primeira Ordem
PsC	Pseudocapacitância
PSO	Pseudo-Segunda Ordem
pKa	Constante de dissociação
q_e	Capacidade de adsorção no equilíbrio
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Qui	Quitosana
R²	Coeficiente de correlação
RB	Rodamina B
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
S₀	Estado singleto fundamental
S₁	Estado singleto excitado
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERS	Espalhamento Raman intensificado por Superfície
ssDNA	DNA de fita simples
ssDNA-SH	DNA de fita simples tiolado
SPR	Ressonância de plasmons de superfície
t	Tempo
T₁	Estado tripleto

TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
TGA	Análise termogravimétrica
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UV-Vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível
V	Volume
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons por raios-X

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔG	Variación da energia livre de Gibbs
ΔH	Variación de entalpia
ΔRn	Fluorescência normalizada na qPCR
ΔS	Variación de entropia
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghemita
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$	Óxido de ferro/quitosana/polianilina
λ	Comprimento de onda
σ	Condutividade
ζ	Potencial zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	APLICAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO γ-Fe₂O₃/QUI/PANI PARA A REMOÇÃO DE CORANTES EM SISTEMA AQUOSO.....	26
2.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1.1	Polímeros	29
2.1.1.1	Quitosana	29
2.1.1.2	Polianilina	30
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.2.1	Materiais	32
2.2.1.1	Síntese do nanocompósito magnético γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani	32
2.2.2	Métodos de caracterização	33
2.2.2.1	Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Visível)	33
2.2.2.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	34
2.2.2.3	Análise Termogravimétrica (TGA)	35
2.2.2.4	Difração de raios-X (DRX)	35
2.2.2.5	Curvas de magnetização	35
2.2.2.6	Potencial zeta (ζ)	36
2.2.2.7	Experimentos de adsorção	37
2.2.2.8	Experimentos de termodinâmica	39
2.2.2.9	Estudos de dessorção e reutilização do nanocompósito γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani	39
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
2.3.1	Caracterização do nanocompósito	40
2.3.1.1	Espectroscopia no infravermelho	40
2.3.1.2	Análise termogravimétrica	41
2.3.1.3	Difração de raios-X	42
2.3.1.4	Curvas de magnetização	43
2.3.2	Experimentos de adsorção	44
2.3.2.1	Efeito do pH e mecanismo de adsorção	44
2.3.2.2	Efeito da variação do tempo de interação	49
2.3.2.3	Cinética de adsorção.....	50
2.3.2.4	Efeito da concentração inicial de corante	54
2.3.2.5	Isotermas de adsorção	55
2.3.3	Parâmetros termodinâmicos	59
2.3.4	Estudos de dessorção e reutilização do nanocompósito γ-Fe₂O₃/Qui/Pani	65
2.3.5	Comparação do NCM γ-Fe₂O₃/Qui/Pani com outros adsorventes encontrados na literatura	68
2.4	CONCLUSÃO	70
3	USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO γ-Fe₂O₃/QUI/PANI PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO: UM ESTUDO COMPARATIVO	71
3.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	71
3.1.1	Ácidos nucleicos	72

3.1.1.1	Quantificação da concentração de ácidos nucleicos por espectroscopia UV-Vis	73
3.1.2	Métodos de extração de DNA	75
3.1.2.1	Tipos de amostras usadas para a extração de DNA	76
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	77
3.2.1	Materiais	77
3.2.1.2	Síntese do nanocompósito magnético γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani	77
3.2.1.3	Condições de coleta, armazenamento da amostra biológica e determinação da concentração e pureza do DNA	77
3.2.1.4	Protocolo para a extração de DNA de amostras de sangue humano utilizando o nanocompósito magnético γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani	78
3.2.2	Métodos	79
3.2.2.1	Reação em cadeia da polimerase	79
3.2.2.2	Eletroforese	82
3.2.2.3	Otimização da extração de DNA utilizando os NCMs γ -Fe ₂ O ₃ /Pani e γ -Fe ₂ O ₃ /Qui/Pani	85
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.3.1	Otimização do processo de extração do DNA de amostras de sangue humano através do uso dos NCMs	85
3.3.1.1	Eluição	86
3.3.1.2	Determinação da quantidade mais adequada de nanocompósito a ser utilizada	87
3.3.1.3	Volume de eluição	88
3.3.2	Estudo comparativo do rendimento dos NCMs e de kits comerciais na extração do DNA de amostras de sangue	90
3.3.2.1	Análises de biologia molecular (qPCR e eletroforese)	91
3.4	CONCLUSÃO	94
4	LÂMINAS DE VIDRO RECOBERTAS COM NPS Au COMO PLATAFORMAS DE SENSORIAMENTO PARA LEISHMANIA VISCERAL	95
4.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	95
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	97
4.2.1	Materiais	97
4.2.1.1	Preparação dos substratos de vidro	98
4.2.1.2	Processo de funcionalização das lâminas	98
4.2.1.3	Síntese das nanopartículas de ouro	99
4.2.1.4	Imobilização da sonda de ssDNA-SH na superfície do substrato lâmina-NPs Au	101
4.2.2	Métodos de caracterização	102
4.2.2.1	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível .	102
4.2.2.2	Espectroscopia de fluorescência	102
4.2.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV/STEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM)	106
4.2.2.4	Ângulo de contato	106
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4.3.1	Caracterização das NPs de Au	107
4.3.2	Características das lâminas de vidro e deposição das NPs Au	109
4.3.3	Imobilização das sondas de ssDNA-SH	114

4.4	CONCLUSÃO	118
5	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS PROTEICAS COMPÓSITAS NANOESTRUTURADAS E SEU USO COMO ELETRODOS PARA SUPERCAPACITORES ORGÂNICOS FLEXÍVEIS	120
5.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	120
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	125
5.2.1	Materiais	125
5.2.1.1	Preparação do substrato de MCO	125
5.2.1.2	Preparação dos eletrodos flexíveis de MCO a partir da incorporação dos nanotubos de carbono e do polímero PEDOT:PSS	126
5.2.2	Métodos de caracterização	126
5.2.2.1	Preparação e caracterização das propriedades elétricas dos dispositivos supercapacitores orgânicos flexíveis de estado sólido	126
5.2.2.2	Caracterização dos eletrodos	127
5.2.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	128
5.2.2.4	Caracterização eletroquímicas dos dispositivos	128
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
5.3.1	Caracterização dos eletrodos MCO/MWCNT- PEDOT:PSS	131
5.3.2	Caracterização eletroquímica dos SC baseados em MCO/NEC/PEDOT	134
5.3.3	Ensaio de ciclabilidade e estabilidade mecânica	140
5.4	CONCLUSÃO	142
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	143
	REFERÊNCIAS	146
	APÊNDICE A -PROTOS DOS KITS COMERCIAIS	163
	APÊNDICE B – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	166

1 INTRODUÇÃO

Nesta tese, são apresentados os resultados obtidos durante a realização do meu projeto de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais (PGMTR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todo o trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física (DF) da UFPE.

O objetivo principal do trabalho foi o desenvolvimento ou aplicação de materiais nanoestruturados, como nanocompósitos magnéticos, nanotubos de carbono em multicamadas, nanopartículas de ouro, e polímeros condutores e suas aplicações, como adsorventes para a remoção dos corantes alaranjado de metila, índigo carmim e rodamina B, em protocolo de extração e purificação de DNA de sangue humano, assim como em plataformas de sensoriamento, e dispositivos para o armazenamento de energia.

Desse modo, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar o nanocompósito magnético $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, comprovando a síntese através de técnicas de caracterização, como espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X, e curvas de magnetização.
- Estabelecer os parâmetros físico-químicos, cinéticos e termodinâmicos, ao utilizar o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ como adsorvente para a remoção dos corantes alaranjado de metila, índigo carmim, e rodamina B em meios aquosos.
- Otimizar o protocolo de extração e purificação de DNA de uma amostra complexa, como sangue humano.
- Utilizar técnicas de biologia molecular, como eletroforese e reação em cadeia da polimerase, para avaliar a qualidade e rendimento da fração de DNA extraído.
- Comparar o rendimento de DNA extraído de sangue humano utilizando os NCMs desenvolvidos no laboratório com o obtido pelo uso de kits comerciais.
- Funcionalização dos substratos de vidros com grupos tióis e aminos por fase vapor.
- Imobilizar DNA tiolado de fita simples sobre o substrato e verificar sua aplicabilidade em testes de diagnóstico por fluorescência ou ressonância de plásmons na detecção do oligonucleotídeos de *Leishmania infantum*.
- Sintetizar NPs de Au e caracterizar sua estrutura e tamanho através de microscopias de varredura e de transmissão e espectroscopia UV-Vis.

- Determinar um novo processo para obtenção de eletrodos orgânicos flexíveis baseado em ultrassonicação.
- Estudar as características eletroquímicas do novo dispositivo composto por membrana de ovo, nanotubos de carbono multicamadas e PEDOT.

Esta tese está estruturada em seis capítulos, que serão apresentados da seguinte forma:

- ❖ O primeiro capítulo é a apresentação dos trabalhos realizados.
- ❖ Em seguida, são descritos a síntese e as caracterizações do nanocompósito magnético $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e sua aplicação para a remoção de corantes dissolvidos em meios aquosos.
- ❖ Após isso, otimizamos a síntese do NCM para abranger sua aplicação em extração e purificação de DNA de sangue humano, e a comparação dos resultados obtidos com o do uso de kits comerciais.
- ❖ Começamos também o desenvolvimento de uma plataforma de detecção para *Leishmania infantum*, e apresentamos a síntese e caracterização das NPs de Au, os procedimentos estabelecidos para a limpeza e funcionalização das lâminas de vidro, e os resultados preliminares para a imobilização covalente de sondas de DNA tioladas.
- ❖ Iniciamos a síntese de um novo material compósito formado pela incorporação de nanotubos de carbono multicamadas e PEDOT em membranas da casca do ovo, e realizamos caracterizações para sua aplicação em dispositivos de armazenamento de energia, como supercapacitores.
- ❖ Por fim, no Capítulo seis, apresentamos as conclusões e perspectivas gerais do trabalho.

Ao final, apresentamos ainda dois apêndices, onde são feitas uma breve descrição dos protocolos dos kits comerciais utilizados nos experimentos de extração e purificação de DNA (Apêndice A) e listados os artigos, patentes, e comunicações científicas associadas com este trabalho de doutorado (Apêndice B).

2 APLICAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO γ -Fe₂O₃/QUI/PANI PARA A REMOÇÃO DE CORANTES EM SISTEMAS AQUOSOS

2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Como recurso essencial para a vida no planeta, a água está presente em todas as atividades dos seres humanos, desde o uso pessoal e doméstico até a utilização em grandes quantidades na indústria, na agricultura e pecuária. Desde os anos 80, o consumo de água vem aumentando cerca de 1 % ao ano devido ao crescimento populacional e às mudanças no padrão de consumo (United Nations Educational and Organization 2019). Mesmo assim, uma parte significativa da população mundial ainda não tem acesso aos direitos básicos de água e saneamento, um problema agravado pelo crescente descarte de águas residuais não tratadas no meio ambiente (Connor 2019).

A poluição de recursos hídricos pode ocorrer pelo despejo de efluentes brutos oriundos de uma fonte localizada, como uma fábrica, ou deslocalizada, como no descarte de esgotos domésticos ou contaminação por resíduos da agricultura. Diferentes processos industriais podem dar origem a uma quantidade significativa de resíduos prejudiciais ao meio ambiente. Ao serem inadequadamente lançados em meios aquosos, poluentes como metais pesados, corantes, medicamentos, e outros compostos orgânicos podem gerar problemas que vão da redução da penetração da luz na superfície, dificultando a fotossíntese e afetando a vida aquática, até a manifestação de efeitos tóxicos em animais e seres humanos, principalmente se incorporados à cadeia alimentar (Salleh, Mahmoud et al. 2011, Zhou, Lu et al. 2019).

Os corantes são resíduos importantes das indústrias têxtil, alimentícia, e de cosméticos (Tkaczyk, Mitrowska et al. 2020). Sua composição aromática complexa lhes confere cor, por conta da absorção seletiva da luz no sistema conjugado de um grupo cromóforo central. As diferentes estruturas químicas possíveis pela presença de diferentes grupos aromáticos substituídos possibilitam a existência de uma grande variedade de cores. Esses grupos podem ser classificados como auxocrômicos (doadores de elétrons, como o grupo NH) ou antiauxocrômicos (aceitadores de elétrons, como o grupo C=O, por exemplo) (Zanoni and Yamanaka 2016).

Os corantes podem ser naturais ou sintéticos. De um modo geral, os corantes sintéticos são aqueles a causar maiores preocupações como poluentes, devido à alta estabilidade e ao fato de não serem biodegradáveis. Eles costumam ser classificados tanto

de acordo com a sua estrutura química quanto pelo modo que se fixam aos tecidos, de modo que um mesmo corante pode ter diversas nomenclaturas. Com relação a sua estrutura química, os corantes podem apresentar um ou mais grupos funcionais, como azo ($-N=N-$), sulforosos (SO_3^-), nitro (NO_2^-), antraquinona, arilmetano, xanteno, entre outros (Zanoni and Yamanaka 2016).

O alaranjado de metila é um corante aniônico, usado principalmente em indústrias têxteis, de papel, gráfica, ou como indicador de pH, pois em meio básico é laranja e no meio ácido é vermelho (Al-Qaradawi and Salman 2002, Haque, Jun et al. 2011, Iwuozor, Ighalo et al. 2021). Por sua vez, o índigo carmim é obtido por sulfonação do corante índigo, extraído de vegetais desde a antiguidade. Já o corante índigo carmim continua a ser um dos corantes mais utilizados, em especial por conferir a cor azul aos jeans (Zanoni and Yamanaka 2016, Oliveira, Bennici et al. 2020), e por ser utilizado como aditivo em comprimidos e cápsulas, e como corante em itens de confeitaria, bebidas, cosméticos, e em diagnósticos médicos (Barka, Assabbane et al. 2008, Secula, Crețescu et al. 2011, Harrache, Abbas et al. 2019). Por sua vez, a rodamina B é um corante catiônico amplamente usado nas indústrias têxtil, papel, tintas (canetas esferográficas, carimbos), lasers de corante, fogos de artifícios, coloração em ensaios biológicos, e como marcador fluorescente (Salleh, Mahmoud et al. 2011, Soylak, Unsal et al. 2011, Ovando-Medina, Dávila-Guzmán et al. 2018, Saigl 2021, Al-Gheethi, Azhar et al. 2022).

No enfrentamento do problema da contaminação das águas, existem diversos processos físicos, químicos e biológicos (sob condições aeróbicas e anaeróbicas), tais como fotodegradação, catálise, filtros biológicos, flotação, adsorção, e processos oxidativos avançados, que podem ser utilizados em um tratamento prévio que busque minimizar/eliminar os impactos negativos da presença de poluentes (Athanasakou, Romanos et al. 2012, Bhatia, Sharma et al. 2017, Katheresan, Kansedo et al. 2018, Carvalho, Amaral et al. 2020). Se faz necessário, no entanto, avaliar as vantagens e desvantagens de cada método, de modo a estabelecer qual seria a alternativa mais apropriada para a remoção do contaminante que se deseja tratar.

Em especial, merecem destaque os processos baseados na adsorção, tanto pelo fácil manuseio dos materiais envolvidos e simplicidade das metodologias correspondentes, quanto pela menor quantidade de resíduos gerados (Shaban, Abukhadra et al. 2018). A adsorção é um processo de transferência de massa de um gás ou de um líquido, denominado de adsorvato, que adere à superfície de um material com capacidade para sua retenção, o adsorvente.

Por apresentarem maior área superficial, materiais nanoestruturados têm sido usados em processo de adsorção para a obtenção de maiores percentuais de remoção de contaminantes. Nos últimos anos, o grupo de Polímeros Não Convencionais vem atuando nessa linha de pesquisa, fazendo uso de materiais como membranas (Alcaraz-Espinoza, Chávez-Guajardo et al. 2015, Gorza, Pedro et al. 2018, da Rocha, Reis et al. 2020, da Silva, Mojica-Sánchez et al. 2021) e nanocompósitos poliméricos (Chávez-Guajardo, Medina-Llamas et al. 2015, Reis, Gorza et al. 2021).

Por sua vez, dentre os materiais usados como adsorventes magnéticos, merecem destaque as nanopartículas de óxido de ferro com a superfície modificada pela incorporação de materiais inorgânicos, como sílica ou polímeros (Zhang, Zhang et al. 2006, Sun, Deng et al. 2014), por permitirem um maior rendimento do material alvo como resultado da adição de grupos funcionais.

Embora diversos materiais possam ser utilizados como adsorventes, a exemplo do carvão ativado e de resíduos biológicos, como celulose, lignina, pó de café, e cascas de vegetais (Iqbal and Ashiq 2007, Yagub, Sen et al. 2014, Liu, Gao et al. 2015, Li, Li et al. 2019, Soltaninejad and Maleki 2021), o uso de polímeros orgânicos (como a polianilina) e biopolímeros (como a quitosana) aparece como uma interessante alternativa sustentável e ecológica. A quitosana é um material biodegradável que possui em sua estrutura grupos funcionais hidroxila (OH) e amina (NH_2), que podem ser obtidos através da desacetilação da quitina e se apresenta como uma matéria prima versátil para diversas aplicações (Ma, Xia et al. 2021). Ao ser associada em compósitos com partículas magnéticas, a quitosana pode ser usada como um eficiente material compósito para a remoção de poluentes presentes em águas residuárias (Hu, Bin et al. 2021).

No presente trabalho, a proposta foi ampliar a gama de aplicações do nanocompósito (NCM) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ sintetizado no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais (PNC), examinando sua utilização para a remoção dos corantes alaranjado de metila, índigo carmim, e rodamina B. Para isso, avaliamos a influência da mudança do potencial hidrogeniônico (pH) do meio, do tempo de interação, da concentração inicial do corante, o que nos permitiu examinar os mecanismos de adsorção e o efeito da variação da temperatura do meio.

2.1.1 Polímeros

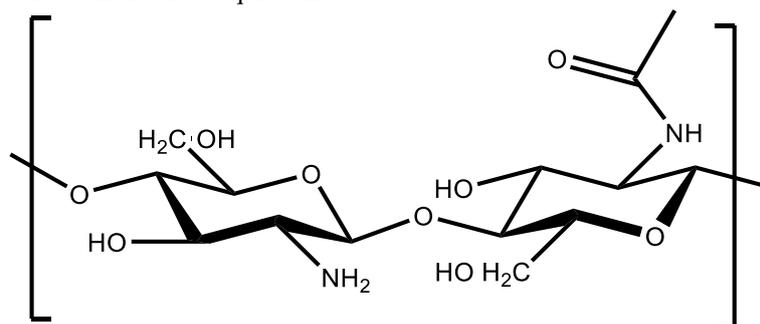
Polímeros orgânicos são macromoléculas formadas por unidades menores, os monômeros, e compostos basicamente por átomos de carbono que se ligam a outros átomos de carbono ou de outros elementos, como oxigênio, flúor, nitrogênio, através de ligações covalentes (Nicholson 2017). Os polímeros se constituem em uma classe de materiais versáteis com propriedades diferenciadas como flexibilidade, densidade, resistência a ataque químico, a depender da sua composição. Eles são usualmente classificados como polímeros naturais, dos quais celulose, borracha, enzimas, e ácidos nucleicos são exemplos importantes, ou polímeros sintéticos, aqueles produzidos em laboratório.

De maneira geral, polímeros não conduzem eletricidade, sendo materiais isolantes. Em 1977, porém, foi descoberta uma nova classe de materiais, posteriormente denominada de polímeros condutores intrínsecos (PIC), que tem como característica elevada condutividade elétrica, que se deve à presença de defeitos estruturais (sólitons, pólarons e bipólarons) que podem se deslocar ao longo da cadeia, e aos quais estão associados estados eletrônicos cujas energias estão localizadas na região do gap entre as bandas de valência e de condução. De um modo geral, a estrutura química de polímeros condutores é constituída de ligações π conjugadas, isso é, um sistema em que existe uma alternância de ligações C-C simples e duplas (Bower 2002).

A seguir, será apresentada uma breve abordagem sobre o biopolímero quitosana e o polímero condutor polianilina, materiais usados neste trabalho.

2.1.1.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo formado por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (Fig. 1), que são unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (Muzzarelli 1983, Jhaveri, Raichura et al. 2021). Essa molécula é um derivado catiônico obtido através da hidrólise alcalina da quitina que apresenta solubilidade em soluções ácidas, enquanto a presença do grupo amino, que permite a sua funcionalização, aumenta ainda mais as possibilidades de sua aplicação (Le Dung, Milas et al. 1994).

Figura 1 - Estrutura da molécula de quitosana.

Fonte: Schematics Arts (2022)

Inúmeros fatores, como a fonte de obtenção da quitina e a adoção de diferentes processos de desmineralização e desacetilação, podem contribuir para que a quitosana venha ser obtida com massa molecular e grau de desacetilação variados, características que influenciam diretamente em suas propriedades físico-químicas (Chandy and Sharma 1990). De uma maneira geral, a quitosana tem propriedades interessantes, como boa biocompatibilidade, propriedades mucoadesivas, e ação antibacteriana (Bakshi, Selvakumar et al. 2020). Essas características fazem com que a quitosana venha a fazer parte da composição de vários materiais com aplicações em setores diversos, como na agricultura, na área farmacêutica (cosméticos, liberação de fármacos, agente ativo no processo de cicatrização) (Dodane and Vilivalam 1998, Shariatinia 2019), no tratamento de água, em biotecnologia e embalagem de alimentos (Yi, Wu et al. 2005, Rinaudo 2006, Fonseca-García, Jiménez-Regalado et al. 2021).

2.1.1.2 Polianilina

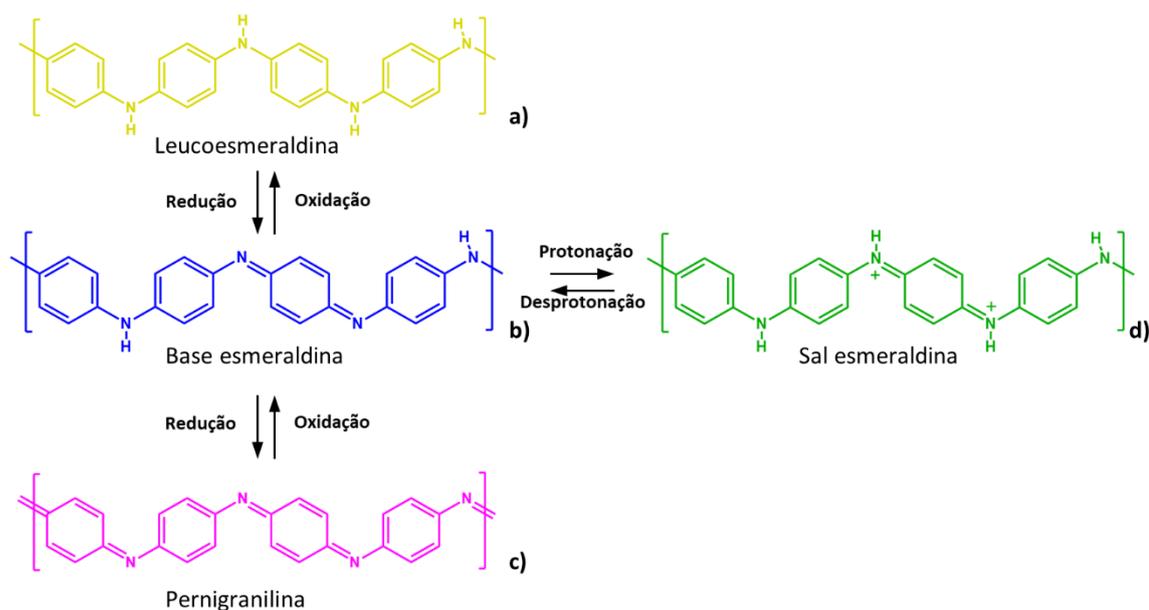
Até a década de 70 do século passado, era de conhecimento comum que os polímeros seriam materiais isolantes. No entanto, a descoberta da nova classe denominada de polímeros condutores abriu a possibilidade de obtenção de materiais poliméricos com elevada condutividade elétrica, induzida por dopagem, ou seja, o tratamento com agentes oxidantes ou redutores. No início dessa década, ao usar uma quantidade exagerada de catalisador na reação de síntese de poliacetileno, um colaborador do professor Hideki Shirakawa, da Universidade de Tóquio, obteve o material sob a forma de filmes. Em 1977, Alan Heeger e Alan MacDiarmid implementaram estudos de dopagem desses filmes, que confirmaram a ocorrência de uma elevada condutividade elétrica nesse tipo de polímeros (Faez, Reis et al. 2000). Por essa descoberta, os três pesquisadores dividiram o Prêmio Nobel de Química de 2000.

A polianilina se destaca entre os polímeros condutores intrínsecos, por suas características de baixo custo de produção, facilidade de síntese, e possibilidade de alteração de seu estado de oxidação através da variação do pH do meio, o que influencia diretamente no valor de sua condutividade.

A condutividade (σ) da Pani varia de acordo com o grau de oxidação de sua cadeia, de modo que ela pode ser obtida em três formas isolantes (leucoesmeraldina, pernigranilina, e base esmeraldina, que apresentam cores distintas, como amarelo, violeta e azul, respectivamente), e uma forma condutora, denominada sal esmeraldina, que contém os nitrogênios protonados e tem uma coloração verde (ver Fig. 2). O processo de dopagem interfere diretamente não apenas sobre a condutividade, mas também sobre a morfologia da cadeia polimérica (Skotheim and Reynolds 2007).

Nos polímeros condutores, o transporte de carga ocorre por conta da existência de defeitos conformacionais que podem se deslocar ao longo da cadeia polimérica. Esses defeitos, que são chamados de pólarons, correspondem a deformações conformacionais na cadeia polimérica. Sua presença está associada ao aparecimento de estados eletrônicos na região do *band gap*, e esses defeitos podem se tornar carregados (bipólarons) pela adição ou remoção de elétrons na cadeia polimérica por meio da exposição a agentes oxirredutores. Como o sistema é conjugado, ao ser aplicado um campo elétrico, esses defeitos podem se mover com relativa facilidade ao longo da cadeia polimérica, ocasionando um efetivo transporte de carga no material (Inzelt 2008).

Figura 2 - Estrutura química dos estados de oxidação da polianilina.



2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

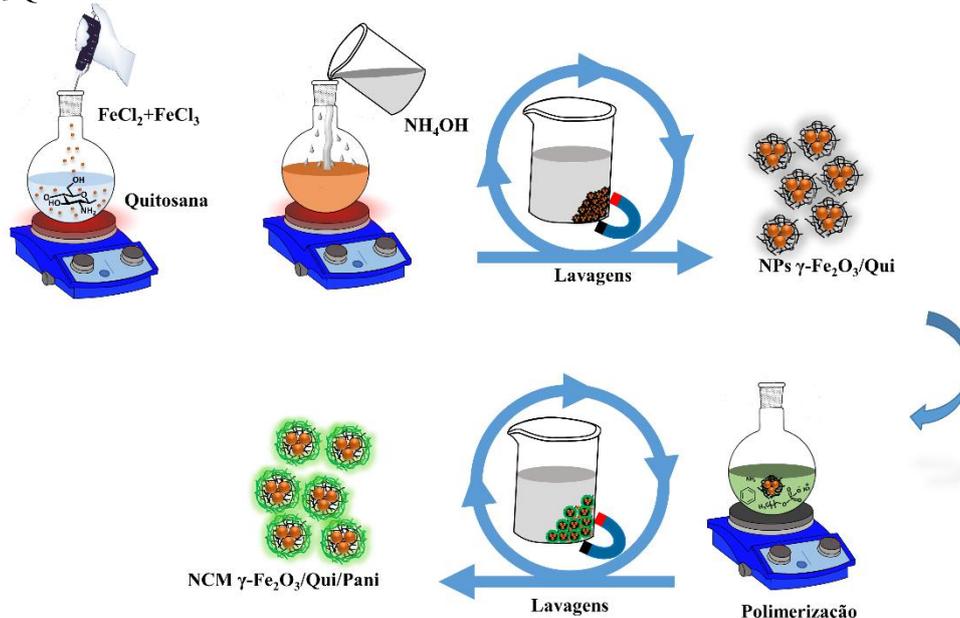
Os reagentes ácido acético, cloreto de ferro III, alaranjado de metila, índigo carmim, e rodamina B foram adquiridos da Dinâmica (Brasil), enquanto o cloreto de ferro II, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio (APS), quitosana (baixa massa molecular e grau de desacetilação 75 - 85 %) foram obtidos da Sigma (EUA). Ácido clorídrico (HCl), álcool metílico, hidróxido de amônio (NH₄OH), e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Química Moderna (Brasil), e a anilina, da Nuclear (Brasil). Esses reagentes foram utilizados sem purificação adicional, exceto a anilina, que foi destilada antes do uso. Em todos os experimentos, usamos água deionizada obtida após passagem por um sistema de purificação Synergy (Millipore, EUA).

2.2.1.1 Síntese do nanocompósito magnético γ -Fe₂O₃/Qui/Pani

As nanopartículas de γ -Fe₂O₃/Qui foram sintetizadas seguindo o método de coprecipitação (Laurent, Forge et al. 2008). Inicialmente, adicionamos 250 mg de quitosana em 100 mL de ácido acético 1 % (v/v), que permaneceu sob agitação de 1000 rpm por 24 h a uma temperatura de 40 °C. Após esse período, foi gotejada uma solução de 20 mL de água deionizada com 0,4 mol L⁻¹ de cloreto de ferro III e 0,2 mol L⁻¹ de cloreto ferroso, com a interação ocorrendo por uma hora, quando foi adicionado 15 mL de hidróxido de amônio 28 % (v/v), com a reação sendo mantida por 30 min. Ao final, o produto obtido foi lavado com 0,03 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio e por três vezes com água deionizada, e seco a 60 °C por 36 h (Jiang, Cheng et al. 2015).

Para obter as nanopartículas de γ -Fe₂O₃/Qui revestidas com polianilina, adotamos o seguinte procedimento: 100 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹, 2,1 g de SDS, 60 mg das NPs de γ -Fe₂O₃/Qui e 138 μ L de anilina foram colocados em um balão de fundo redondo de 250 mL, que foi mantido sob agitação por 15 min. Em seguida, foi adicionado lentamente 20 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ com 1,5 mmol L⁻¹ de persulfato de amônio, com o sistema permanecendo sob agitação por 24 h na temperatura de 21 °C. O material sólido resultante foi separado magneticamente e lavado três vezes com metanol e três vezes com água deionizada, em seguida foi seco em estufa a 60 °C por 24 h (Medina-Llamas, Chávez-Guajardo et al. 2014), como esquematicamente representado na Fig. 3.

Figura 3 - Representação da síntese das NPs γ -Fe₂O₃/Qui, e posterior polimerização, resultando no NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani.



Fonte: Schematics Arts (2022)

2.2.2 Métodos de caracterização

2.2.2.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Visível)

Apenas uma região limitada do espectro eletromagnético pode ser detectada pelo olho humano. Além do espectro visível, existem outros tipos de radiação, como infravermelho, microondas, rádio, ultravioleta, e raios-X. Nesse trabalho utilizamos algumas técnicas baseadas no uso desses tipos de radiação.

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica que permite a identificação e a quantificação das espécies moleculares presentes em uma dada amostra. A absorção ou emissão da radiação eletromagnética pelas moléculas se dá em energias características, de modo que com a coleta do espectro da amostra se faz possível identificar as espécies presentes. Por sua vez, a quantificação da concentração da espécie pode ser estimada a partir da medida da intensidade do sinal absorvido (Skoog, West et al. 2006).

A quantidade de luz absorvida por uma espécie pode ser descrita pela Lei de Lambert-Beer, que expressa a relação entre a concentração (c) do absorvente em mol/L, o caminho ótico (b) percorrido pela radiação em cm, e a constante de proporcionalidade, também chamada de absorvidade (ϵ), na forma (Atkins, Jones et al. 2006)

$$A = \log \frac{I_0}{I} = abc = \epsilon bc \quad (1)$$

Para aplicar a Lei de Lambert-Beer, inicialmente é medida a transmitância, que é a razão entre a intensidade da radiação transmitida (I), isto é, após a luz passar através da amostra, e da radiação incidente (I_0), como

$$A = -\text{Log } T, \text{ onde } T = \frac{I}{I_0} . \quad (2)$$

A absorção de energia por uma molécula está associada à ocorrência de transições eletrônicas. Se as moléculas se encontram inicialmente no estado de menor energia, o chamado estado fundamental, a amostra absorve energia ao ser exposta à radiação, do que resulta a ascensão de elétrons para níveis de maior energia, os estados excitados. A tendência de um sistema é retornar ao estado mais estável através da emissão de fótons.

Os experimentos de adsorção de corantes no NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /Quitosana/Polianilina foram acompanhados por meio da técnica de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível, na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 800 nm, fazendo uso de uma cubeta de quartzo de 1 cm em um espectrofotômetro UV-VIS UV-2600 (Schimadzu, Japão). Nesses ensaios, todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.2.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica de absorção que consiste na passagem de radiação infravermelha através da amostra, com parte da energia sendo absorvida e outra transmitida. Essa técnica, que permite a identificação de grupos funcionais, é muito utilizada na identificação da composição química dos materiais. A região do infravermelho é dividida em três sub-regiões, o infravermelho próximo (14000 a 4000 cm^{-1}), médio (4000 a 400 cm^{-1}), e distante (400 a 40 cm^{-1}).

Para que ocorra absorção da radiação, é necessária a variação do momento de dipolo elétrico da molécula, que está relacionado com a frequência de vibração ou rotação da molécula analisada. Desse modo, quando ocorre uma mudança significativa do momento de dipolo, mais intensa será a banda de absorção. Quando a molécula absorve a radiação, sua vibração pode envolver uma mudança no comprimento de onda, é denominado estiramento. Quando a mudança é relacionada ao ângulo da ligação é chamada de flexão, que pode ocorrer no plano ou fora dele, sendo então chamada respectivamente de simétrica ou assimétrica (Stuart 2004, Khan, Khan et al. 2018).

O termo Transformada de Fourier se refere a um método matemático de processamento de sinal quando um espectrômetro utiliza um interferômetro, o que

permite a diminuição do tempo para aquisição dos dados e a melhora da qualidade dos espectros. O tipo de interferômetro mais utilizado é o de Michelson, que contém um espelho fixo e um móvel.

Para confirmar a estrutura do NCM, realizamos análises como espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, no intervalo médio de 4000 - 400 cm^{-1} no espectrofotômetro IRTracer-100 (Schimadzu, Japão), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr).

2.2.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Em uma análise térmica (TA), o parâmetro mais importante a ser variado é a temperatura, o que torna possível relacionar com as propriedades físicas do material. Para realizar medidas de análise térmica, é necessário ter cuidado com alguns parâmetros, principalmente, a massa, a taxa de aquecimento, e o gás de purga (Menczel and Prime 2009).

Existem diversas análises térmicas, e neste trabalho foi usada a análise termogravimétrica (TGA), onde a amostra é inserida em um sistema que tem a temperatura e atmosfera controladas, com o monitoramento da variação de massa do material em função da temperatura ou do tempo. A perda de massa observada no TGA pode informar sobre a composição e a estabilidade térmica (Menczel and Prime 2009).

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas no equipamento TGA-50H (Shimadzu, Japão) do Departamento de Química Fundamental, com a amostra em pó sendo colocada em um cadinho de platina sob atmosfera de nitrogênio (100 mL/min), na faixa de temperatura de 23 °C a 1000 °C.

2.2.2.4 Difração de raios-X (DRX)

A estrutura cristalina das NPs e do NCM foi determinada através da utilização de um difratômetro modelo D5000 (Siemens, Alemanha), com raios-X emitidos pelo cobre ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), na faixa de 10 ° - 90 °.

2.2.2.5 Curvas de magnetização

As propriedades magnéticas do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ foram examinadas a partir das curvas de magnetização, obtidas pelo uso de um Sistema de Medição de Propriedade Física (PPMS, do inglês Physical Property Measurement System, Quantum Design, EUA), enquanto as propriedades magnéticas das NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ foram obtidas pelo uso

de um magnetômetro de amostra vibrante (Microsense EV7, EUA), ambos equipamentos do Departamento de Física da UFPE.

2.2.2.6 Potencial zeta (ζ)

A medida do potencial zeta, também chamado de eletrocinético, é uma técnica que determina a diferença de potencial na interface eletrizada, isso é, na superfície do sólido - líquido ou líquido - gás (Salopek, Krasic et al. 1992).

O potencial zeta varia de acordo com as mudanças realizadas na solução, de modo a ser possível acompanhar as modificações decorrentes da carga de superfície frente à variação de pH, da natureza e concentração de eletrólitos na solução e do solvente utilizado (Delgado, González-Caballero et al. 2005).

Quando um material sólido entra em contato com um líquido, ocorre a formação de uma carga interfacial, o que quebra a neutralidade do sistema, isto é, próximo à interface, a carga líquida é diferente de zero. Consequentemente, em torno do material ocorre a adsorção de contraíons de equilíbrio no líquido, originando a dupla camada elétrica (EDLC) (Sze, Erickson et al. 2003, Lima and Luz 2007). A dupla camada elétrica é composta por duas camadas denominadas compacta e difusa. Na camada compacta, os contraíons não se movimentam devido à forte atração eletrostática, enquanto os da camada difusa são móveis. O potencial zeta é um fenômeno eletrocinético que é determinado na fronteira dessas camadas (Sze, Erickson et al. 2003, De Vasconcelos, Pereira et al. 2005).

Por causa das cargas adquiridas, quando um campo elétrico (E) é aplicado, as partículas se movimentam em direção do eletrodo de carga oposta com velocidade (v) proporcional ao campo e a mobilidade eletroforética (μ_e), de acordo com

$$v = \mu_e E \quad (3)$$

Através da relação acima, o valor da mobilidade eletroforética pode ser obtida, com o potencial zeta sendo então determinado através dos modelos de Huckel e Helmholtz-Smoluchowski, que relacionam dois parâmetros K e R , onde K é a espessura da camada elétrica e R o raio cinético, através da equação 4 (Cerrutti 2005)

$$\mu_e = \left[\frac{\epsilon \zeta}{6\pi\eta} \right] KR \quad , \quad (4)$$

onde η é a viscosidade do meio, $\varepsilon=4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r$, com ε_0 e ε_r correspondendo à permissividade do vácuo e à constante dielétrica do meio.

O modelo de Huckel é utilizado no caso em que as partículas são esféricas e pequenas, com baixas concentrações de eletrólitos, assim $KR < 0$. Já o modelo de Helmholtz-Smoluchowski é utilizado quando $KR > 0$, isso é, para partículas de formas variadas e em altas concentrações, ou partículas coloidais dispersas em água ou líquidos polares.

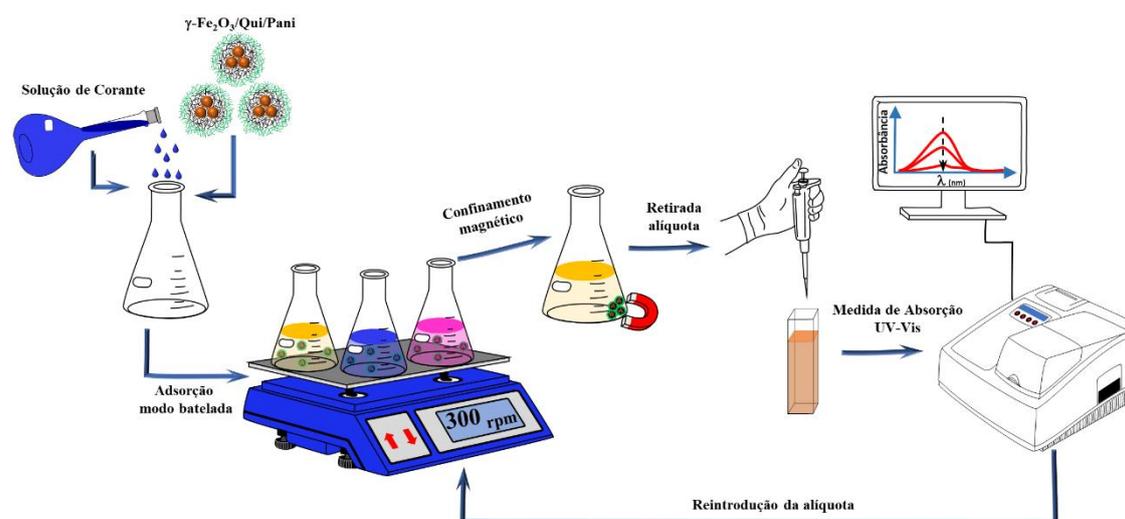
As medidas de potencial zeta foram realizadas usando um Litesizer 500 (Anton Paar, Áustria) aplicando o modelo de Helmholtz-Smoluchowski. Para realizar essas análises, inicialmente o solvente (água) teve o pH ajustado com HCl ou NaOH 1mol L⁻¹ até atingir os pHs de trabalho, 2, 3, 4, 6, 8 e 10. Em seguida, foi adicionado no erlenmeyer 2 mg do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani e 15 mL da solução com pH ajustado, com a interação deixada ocorrer por três horas no agitador orbital.

2.2.2.7 Experimentos de adsorção

Para começar a aplicação do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani para a remoção dos corantes alaranjado de metila (AM), índigo carmim (IC), e rodamina B (RB), foi necessário estabelecer inicialmente os melhores parâmetros de trabalho, como o valor do pH, o tempo de interação, e a concentração inicial de cada corante.

Para isso, primeiramente foi preparada uma solução estoque de 300 mg/L de cada um dos corantes. O ajuste do pH das soluções de corante foi realizado usando a quantidade apropriada das soluções de HCl ou de NaOH. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de vidro contendo 2 mg do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani, aos quais foram adicionados 15 mL da solução de corante com concentração conhecida, com a interação ocorrendo sob agitação contínua de 300 rpm (Fig. 4).

Figura 4 - Representação esquemática dos experimentos para estudos de adsorção dos corantes pelo nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ em modo batelada.



Fonte: Schematics Arts (2022)

Devido a suas diferenças estruturais e químicas, cada corante apresenta uma absorvância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) específica, que foi determinada pelo uso de um espectrofotômetro UV-Vis, com a variação da concentração sendo estimada pela medida da absorvância antes e após a interação com o NCM. Isso nos permitiu observar que, para o caso do alaranjado de metila, a absorção é dependente do pH da solução (sendo em torno de 510 nm, para os pHs 2 e 3, e de 464 nm, para a faixa de pHs de 4 a 10), enquanto se mantém constante para o índigo carmin e rodamina B, para os quais o comprimento de absorção máxima ocorre em 610 e 554 nm, respectivamente.

O primeiro estudo realizado foi a análise da porcentagem de adsorção do NCM quando o valor do pH do meio era variado no intervalo de 2 a 10. Usando uma solução de corante com concentração inicial de 20 mg/L, esses experimentos foram realizados no modo batelada, pelo uso de um agitador orbital a 300 rpm, por um período de 24 h. Após a determinação do valor de pH que correspondia à absorção máxima, passamos a avaliar a eficiência de remoção quando utilizadas diferentes concentrações iniciais dos corantes. Para o índigo carmin e a rodamina B, foram examinadas concentrações iguais a 1, 5, 10, 20, 30, 40, e 50 mg/L, enquanto para o alaranjado de metila foi necessário o uso de concentrações maiores (75, 85, 100, 125 e 150 mg/L). Em todos os casos, o tempo de interação foi variado no intervalo de 15 a 420 min.

Para cada corante, a porcentagem de adsorção foi calculada através da fórmula

$$\text{Adsorção (\%)} = \frac{C_f - C_i}{C_f} * 100 \quad , \quad (5)$$

onde C_i e C_f correspondem à concentração inicial e final (mg/L) da solução antes e após a interação com o NCM.

A capacidade de adsorção em cada instante (q_t), em mg/g, é determinada por meio da quantidade de corante adsorvida em mg por unidade de massa do material adsorvente (g) utilizado, através da relação

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{m}, \quad (6)$$

onde C_0 e C_t correspondem a concentração inicial e no tempo determinado, V é o volume de solução utilizada (L), e m é a massa do adsorvente em g.

2.2.2.8 Experimentos de termodinâmica

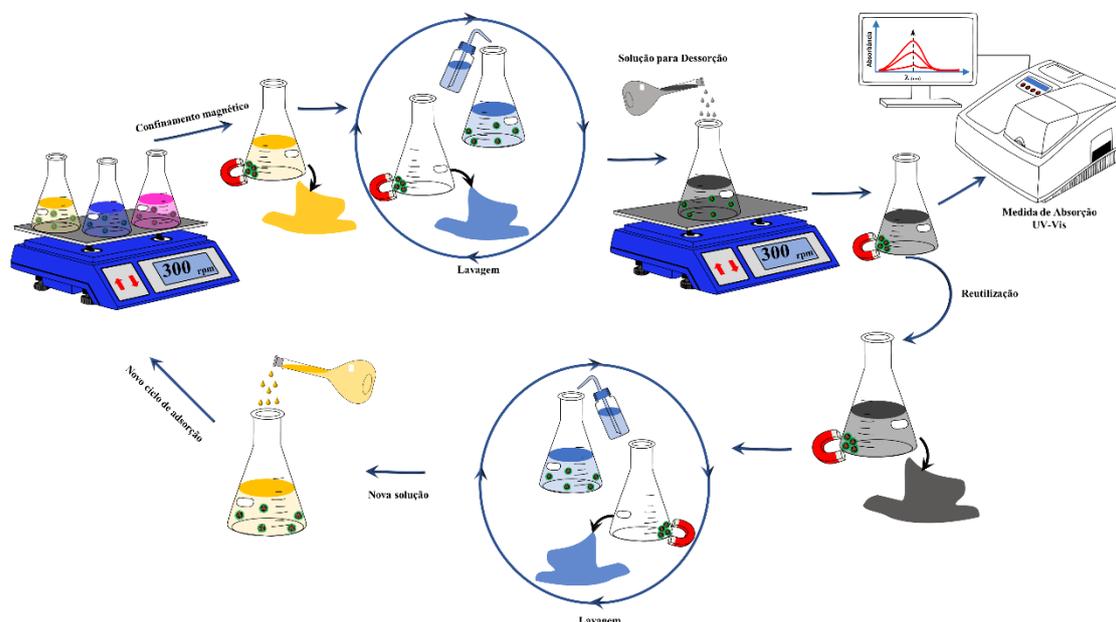
Analizamos o efeito da diminuição (10 °C, 20 °C) e do aumento da temperatura (30 °C, 50 °C) em relação à temperatura ambiente (~ 25 °C) sobre o processo de adsorção dos corantes pelo NCM, de modo a obter informações para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos correspondente às variações da entalpia (ΔH), entropia (ΔS), e energia de Gibbs (ΔG). Para isso, colocamos 2 mg do NCM em 15 mL da solução de corante em diferentes concentrações iniciais sob agitação a 300 rpm, durante 300 min de interação. Como cada interação ocorre de maneira distinta, a concentração do corante alaranjado metila foi variada entre 10 mg/L - 85 mg/L, a do índigo carmim entre 20 mg/L - 50 mg/L, e da rodamina B na faixa de 10 mg/L - 70 mg/L.

2.2.2.9 Estudos de dessorção e reutilização do nanocompósito γ -Fe₂O₃/Qui/Pani

De modo a examinar a possibilidade de reutilização do nanocompósito na captura dos corantes de interesse, implementamos ciclos consecutivos de adsorção/dessorção (Fig. 5). Os experimentos de adsorção foram realizados utilizando os parâmetros otimizados anteriormente, ou seja, adicionamos 2 mg de NCM e 15 mL da solução de corante com concentração inicial de 30 mg/L em um erlenmeyer, deixando a interação ocorrer por 300 min. Em seguida, após confinarmos o NCM magneticamente, a absorção da solução foi analisada na região do UV-Vis. Para a etapa de dessorção, o NCM foi lavado com água deionizada, sendo em seguida adicionados 15 mL de SDS 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, com o sistema permanecendo sob agitação por 180 min no caso do alaranjado de metila e 300 min para o índigo e a rodamina. A quantidade de corante dessorvido é determinada pela relação (Riaz, Ahmed et al. 2020)

$$\text{Dessorção (\%)} = \frac{\text{Quantidade de corante dessorvido}}{\text{Quantidade de corante adsorvido}} * 100 \quad (7)$$

Figura 5 - Representação esquemática dos experimentos para estudos de dessorção dos corantes, e reutilização do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ para ciclos sucessivos.

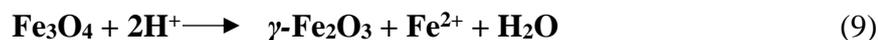
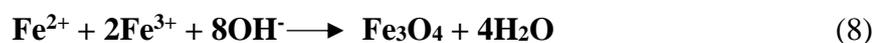


Fonte: Schematics Arts (2022)

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização do nanocompósito

Como descrito na Seção 2.2.1.1, as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ foram sintetizadas de acordo com o método de co-precipitação, que consiste na obtenção das nanopartículas a partir de duas fontes de sais ferro. Essa reação favorece a formação da magnetita (Fe_3O_4), que é instável e na presença do oxigênio se transforma em maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), de acordo com as reações (Laurent, Forge et al. 2008).

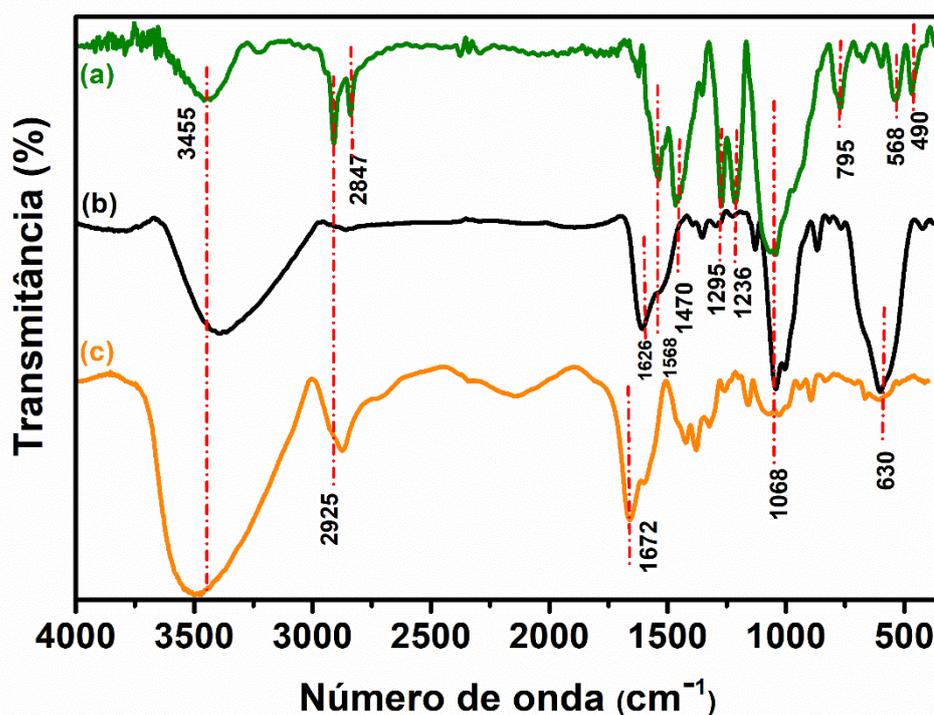


2.3.1.1 Espectroscopia no infravermelho

A determinação da composição das nanopartículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ e o seu revestimento pelas cadeias de polianilina, examinamos a presença dos grupos funcionais característicos nos espectros de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Na Fig. 6, podemos observar nos espectros: i) a banda de absorção em 630 cm^{-1} ,

característica do estiramento do ferro com o oxigênio (Fe-O) (Alibeigi and Vaezi 2008), ii) o pico em 795 cm^{-1} , relacionado com a vibração (C-H) fora do plano aromático, iii) os picos em 1068 cm^{-1} e 1236 cm^{-1} , atribuídos à vibração de alongamento do C-O, iv) o pico em 1295 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de amina aromática, v) em 1470 cm^{-1} , relativo ao estiramento (C-C) do anel benzenóide (Janaki, Oh et al. 2012), vi) os picos em 1568 cm^{-1} e 1626 cm^{-1} , atribuídos aos estiramentos amina e à vibração (C=C) do anel quinóide, vii) uma banda larga na faixa de 3400 cm^{-1} , relacionada aos estiramentos -NH e -OH (Tanhaei, Ayati et al. 2015, Gemeay, Elsharkawy et al. 2018, Salama and Hesemann 2018), e viii) bandas em 2925 cm^{-1} e 2847 cm^{-1} , correspondentes à vibração de alongamento C-H (Thach, Nguyen et al. 2020). Importante ressaltar que assim é possível observar todas as bandas das substâncias usadas no nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$.

Figura 6 - Espectros infravermelho do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ (a), das NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ (b) e da Quitosana (c).



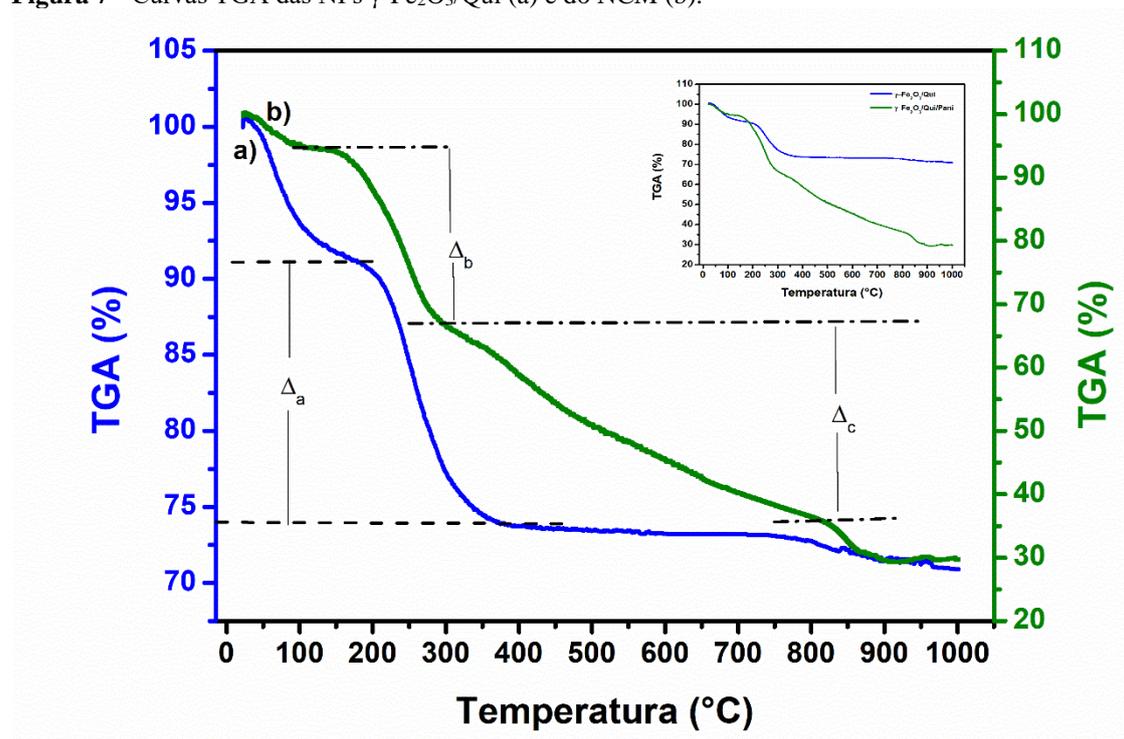
Fonte: A autora (2022)

2.3.1.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica permitiu avaliar o revestimento das nanopartículas. Realizamos as curvas de TGA para os dois materiais (NPs de óxido de ferro/quitosana antes e após seu revestimento com Pani). Ao analisar a Fig. 7 para as NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ (curva a), é possível observar dois eventos: um primeiro, da temperatura inicial até 150°C ,

provavelmente relacionado com a água presente na amostra, e um segundo (Δ_a), na faixa de 150 °C - 400 °C, com perda de massa de aproximadamente 20 % e que correspondente à decomposição da parte orgânica do material, no caso, a quitosana (Hernández, Zamora-Mora et al. 2009). Por outro lado, a curva b, relacionada ao NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, apresenta três estágios: i) perda de água de 6 %, ii) desacetilação da quitosana (Δ_b) com perda acentuada de 31 %, e degradação da polianilina (Δ_c) correspondente a 27 % na faixa de 400 - 800 °C (Kannusamy and Sivalingam 2013).

Figura 7 - Curvas TGA das NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ (a) e do NCM (b).

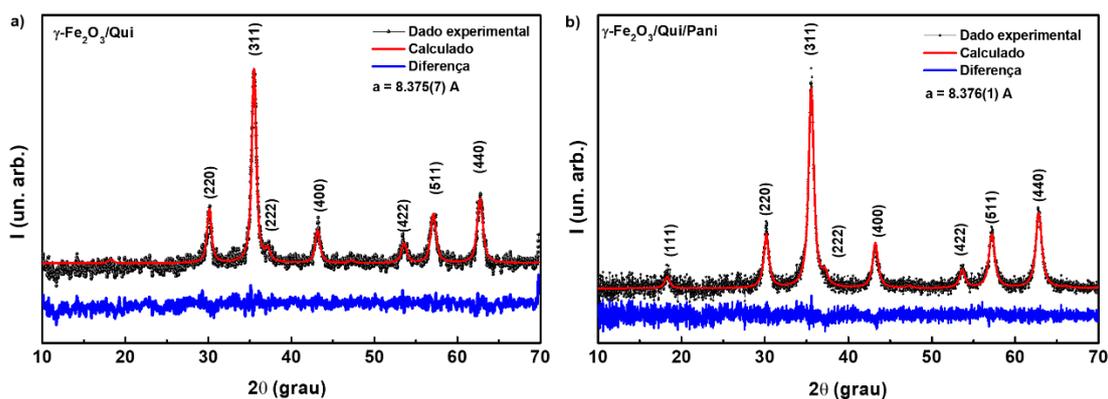


Fonte: A autora (2022)

2.3.1.3 Difração de raios-X

As amostras foram caracterizadas por DRX, como mostrado na Fig. 8, onde podem ser observados os principais picos de difração e os respectivos índices de Bragg (2 2 0), (3 1 1), (2 2 2), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), (4 4 0), de acordo com a base de dados OCD 1010369.

Figura 8 - Difratogramas das NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ (a) e do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ (b).



Fonte: A autora (2022)

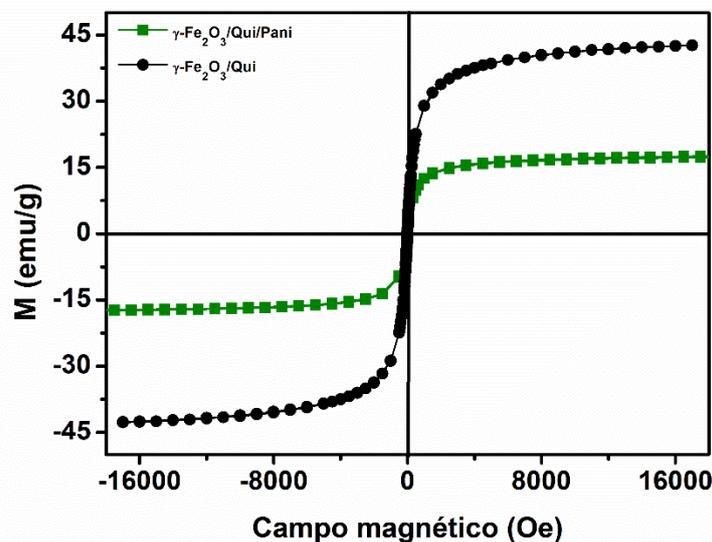
Uma maneira de identificar a fase do óxido de ferro é através do parâmetro de rede correspondente. Ao compararmos o valor teórico para a magnetita (Fe_3O_4), 8,396 Å, e da maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), 8,374 Å, com os obtidos para as NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$, 8,375 Å e do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, 8,376 Å, podemos ver que a melhor correspondência é com a fase maghemita. Mesmo assim, para uma conclusão definitiva seriam necessárias análises adicionais, como espectroscopia de fotoelétrons por raios-X (XPS) ou de Mossbauer (Fonnum, Johansson et al. 2005, Hernández, Zamora-Mora et al. 2009, Salikhov, Savchenko et al. 2015).

2.3.1.4 Curvas de magnetização

Investigamos as propriedades magnéticas das NPs e do NCM pela determinação das curvas de magnetização correspondentes, mostradas na Fig. 9. Como pode ser observado, as NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ apresentam maior magnetização (42 emu/g), valor que se reduz para 18 emu/g para o NCM, uma diferença que está relacionada com o fato de que o revestimento com a polianilina não contribui para a magnetização. Vale ressaltar que, mesmo com esse valor mais baixo de magnetização, o nanocompósito responde rapidamente à ação de um ímã, permitindo sua fácil separação do meio. Por sua vez, o comportamento superparamagnético observado tanto para as NPs quanto para o NCM

demonstra a inexistência de magnetização remanescente ou coercividade após a retirada do campo magnético (Alibeigi and Vaezi 2008).

Figura 9 - Curvas de magnetização das NPs γ -Fe₂O₃/Qui e do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani



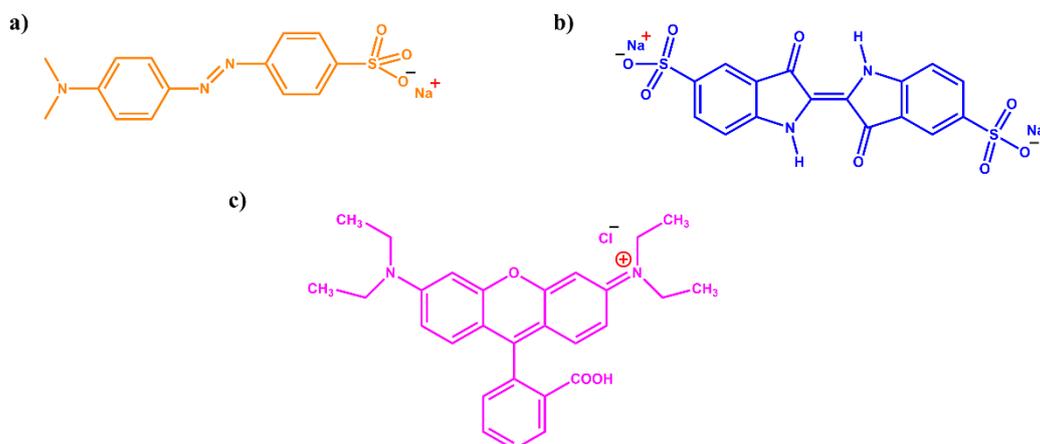
Fonte: A autora (2022)

2.3.2 Experimentos de adsorção

2.3.2.1 Efeito do pH e mecanismo de adsorção

Nas análises de adsorção, primeiramente realizamos a variação do pH da solução aquosa de cada corante na faixa de 2 a 10, uma vez que o nível de acidez/alcalinidade afeta a carga da superfície tanto do adsorvente como do adsorvato. Os corantes alaranjado de metila (AM) e índigo carmim (IC) são aniônicos, enquanto a rodamina B (RB) é um corante catiônico (Fig. 10). Em cada caso, a quantidade de material adsorvido foi determinada a partir da quantidade de corante remanescente na solução após a interação.

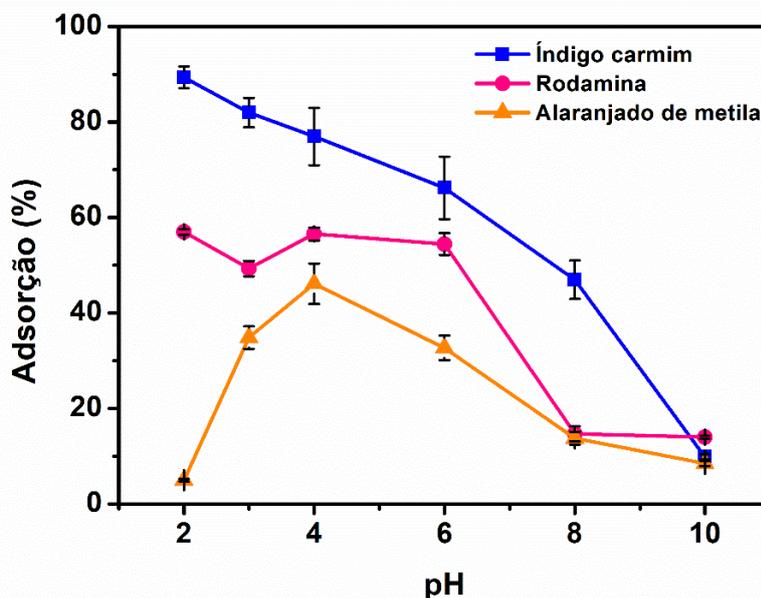
Figura 10 - Estrutura química dos corantes alaranjado de metila (a), índigo carmim (b), e rodamina B (c).



Fonte: Schematics Arts (2022)

Na Fig. 11, pode ser observado que para o alaranjado de metila ocorre uma diferença significativa no valor da porcentagem de adsorção (de 5 % para 46 %), quando o pH do meio é variado de 2 para 4, situação em que a captura é maximizada. Já para o corante índigo carmim, a eficiência de 89 % observada para o pH 2 passa a se tornar menor a partir do pH 6, chegando a aproximadamente 10 % no pH 10. Por sua vez, para a rodamina B a quantidade adsorvida pelo nanocompósito não apresenta mudanças bruscas na faixa de pH entre 2 e 6. De uma maneira geral, podemos observar que para os corantes estudados, a eficiência de remoção diminui significativamente conforme aumenta a alcalinidade do meio.

Figura 11 - Efeito da variação de pH para os corantes alaranjado de metila (triângulo), índigo carmim (quadrado), e rodamina (círculo). Concentração de 20mg/L. Quantidade de NCM 2 mg para volume de 15 mL.



Fonte: A autora (2022)

Esses resultados sugerem que o processo de adsorção dos corantes pelo nanocompósito ocorre com a contribuição de diferentes mecanismos, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e empilhamento π - π , uma vez que o adsorvente interage tanto com corantes aniônicos (o caso do alaranjado de metila e do índigo carmim), como com a rodamina B, um corante catiônico.

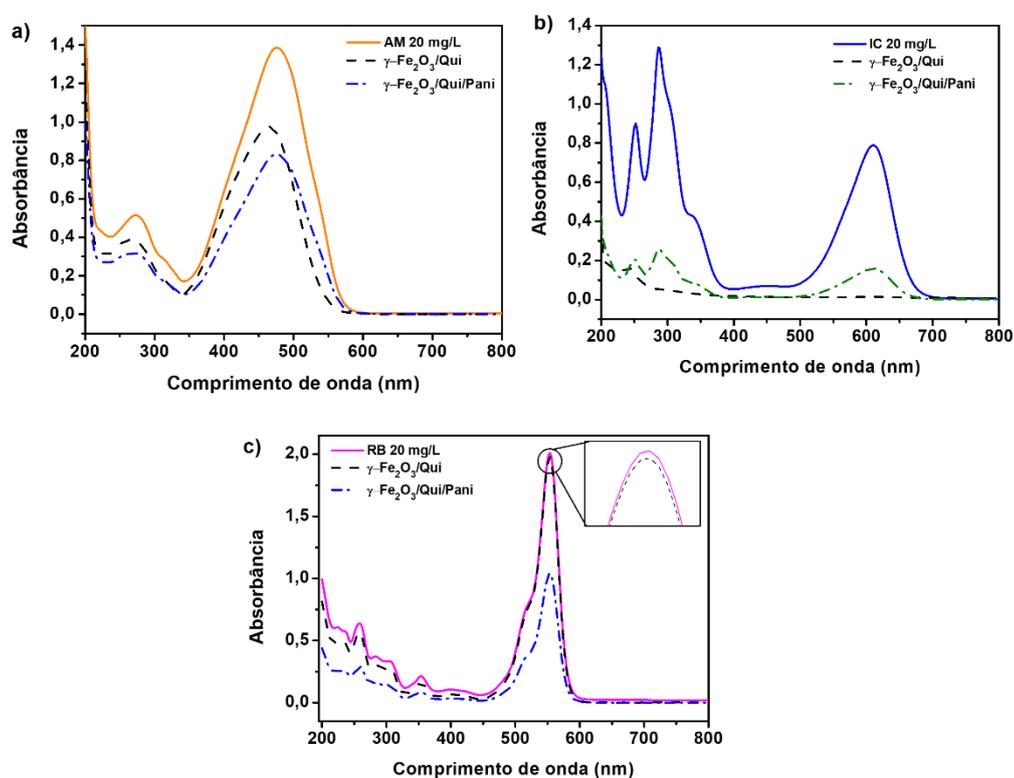
Em pH 2, a molécula do alaranjado de metila encontra-se carregada positivamente por conta da protonação do átomo de nitrogênio, ocorrendo repulsão eletrostática entre o adsorvente e o adsorvato. Como a constante de dissociação (pK_a) desse corante é 3,46 (Tanhaei, Ayati et al. 2015), a partir desse valor de pH do meio a molécula possui carga negativa, de modo que para o pH 3 (próximo do pK_a) observa-se um acréscimo da adsorção para 30 %, que passa para 41 % no pH 4.

Quando em solução, o índigo carmim exibe uma carga negativa, enquanto o nanocompósito é positivamente carregado, de modo que a adsorção ocorre através de interação eletrostática (Yaşar, Deligöz et al. 2011).

Já para a captura do corante rodamina B, dois mecanismos podem estar envolvidos: 1) empilhamento π - π pela interação entre as moléculas da rodamina e as cadeias de polianilina contidas no adsorvente, 2) formação de ligações de hidrogênio entre o nitrogênio da anilina e o grupo amina no corante (Ovando-Medina, Dávila-Guzmán et al. 2018).

Com a finalidade tanto de compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de adsorção, quanto de comparar a eficiência das NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ e do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ na captura de contaminantes, realizamos experimentos em que 2 mg de cada adsorvente eram colocados em contato com soluções de mesma concentração (20 mg/L) dos corantes, na melhor condição de pH encontrada para cada corante. Para o alaranjado de metila, os resultados indicam que enquanto as NPs conseguem adsorver 29 % do material, essa taxa sobe para 39 % com o NCM, um acréscimo na adsorção que pode ser atribuído ao maior nível de contribuição das interações $\pi\text{-}\pi$ no último caso (Fig. 12a). Já para o índigo carmim (Fig. 12b), muito embora as nanopartículas tenham se mostrado capazes de adsorver todo o contaminante presente, a solução se tornava amarelada ao final do processo. Enquanto o NCM leva a uma taxa de remoção de 80 %, sem que sejam notadas alterações no meio. Enquanto para a rodamina houve uma surpreendente discrepância no percentual de adsorção, com as NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ removendo apenas 1,6 % do corante, e o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ apresenta uma taxa bem maior de captura (50 %). Mais uma vez, atribuímos a diferença ao papel desempenhado pelas interações $\pi\text{-}\pi$.

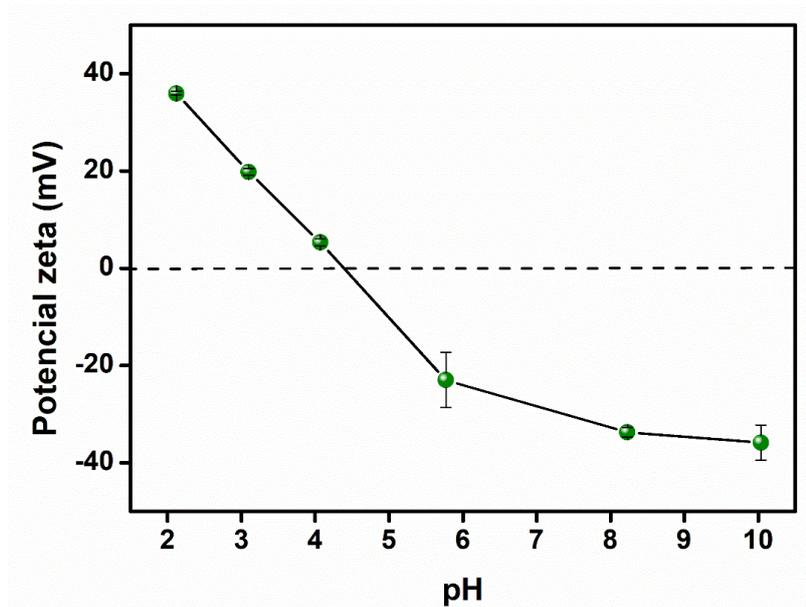
Figura 12 - Espectros UV-Vis antes (linha contínua) e após a interação com as nanopartículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$ (linha tracejada) e com o nanocompósito (linha traço-ponto) para o corante alaranjado de metila (a), índigo carmim (b) e rodamina B (c). Concentração inicial 20 mg/L.



Fonte: A autora (2022)

O pH do meio pode interferir na estrutura do corante e na carga superficial do adsorvente (NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani). Por isso, realizamos a análise de potencial zeta para descobrir o ponto de carga zero do NCM. Na Fig. 13, observa-se que em pHs ácido o NCM possui carga superficial positiva, e o ponto de carga zero quase foi atingido no pH 4,40. Já a partir do pH 6, a carga superficial é negativa. Quando avaliamos a carga superficial e o melhor percentual de remoção mediante as alterações de pH, observamos que a interação com os corantes aniônicos alaranjado de metila e índigo carmim tem a contribuição eletrostática, e a prevalência da interação π para a rodamina.

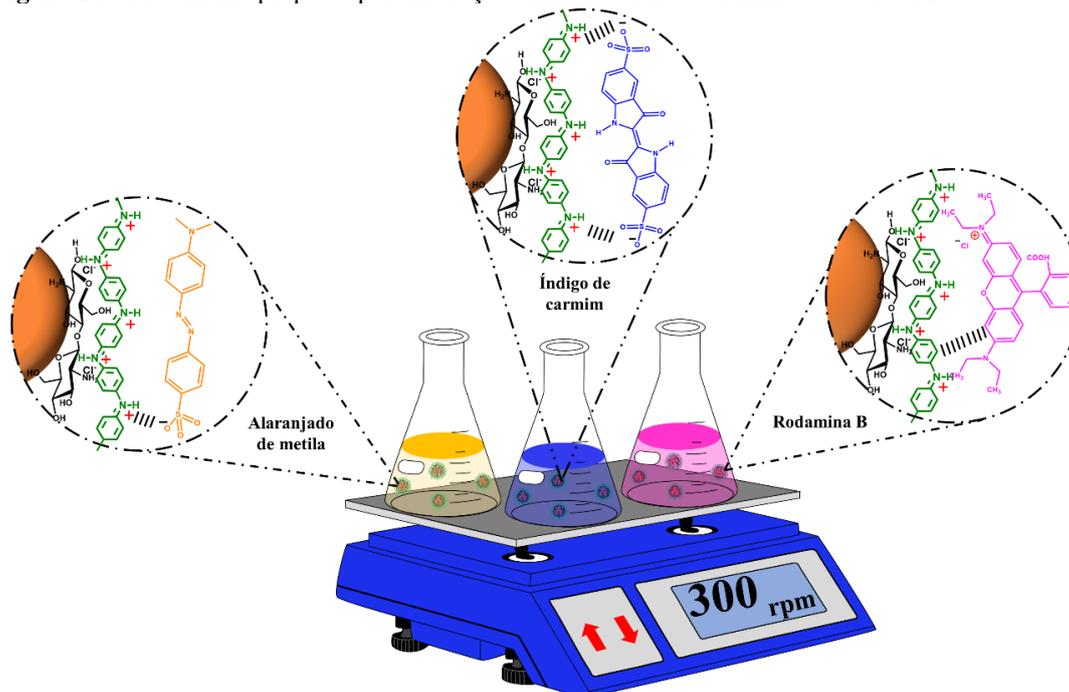
Figura 13 - Potencial zeta do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani.



Fonte: A autora (2022)

Assim, após essas análises (variação de pH, espectros UV-VIS para adsorção dos corantes com as NPs de γ -Fe₂O₃/Qui e do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani, e o potencial zeta), o mecanismo de interação está ilustrado na Fig. 14.

Figura 14 - Mecanismo proposto para interação entre os corantes examinados e o NCM.

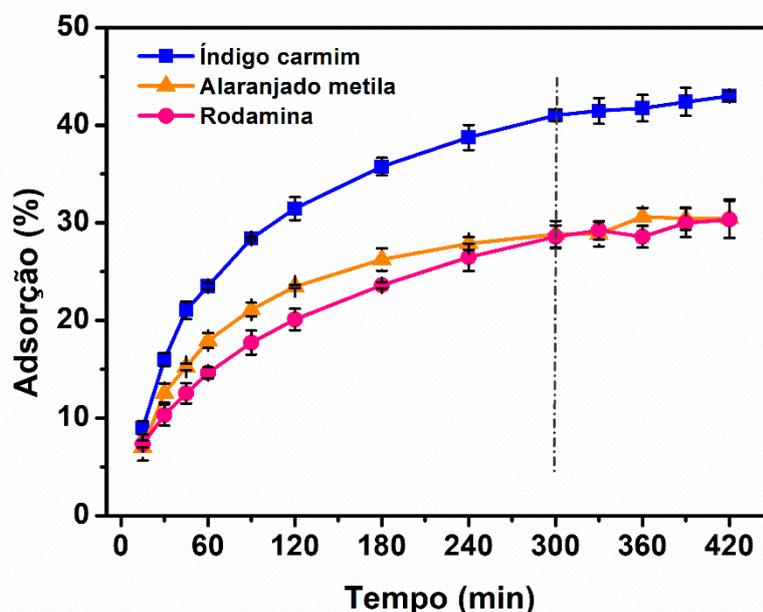


Fonte: Schematics Arts (2022)

2.3.2.2 Efeito da variação do tempo de interação

Para estudar a cinética do processo de adsorção de cada um dos corantes (AM, IC, RB) pelo NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, investigamos o tempo de interação necessário para que seja atingido o equilíbrio, quando a concentração do poluente na solução não mais diminui. Os resultados correspondentes são mostrados na Fig. 15, onde se pode observar que a taxa de remoção é de 41 % para o índigo, e de 29 % para o alaranjado de metila e para rodamina, após 300 min de interação. No começo da interação entre o NCM e os corantes, os locais ativos de interação do NCM estão disponíveis em maior número. Contudo, no decorrer do processo, esses sítios vão sendo ocupados, o que torna mais lenta a adsorção.

Figura 15 - Efeito do tempo de interação na porcentagem de adsorção dos corantes alaranjado de metila (triângulo), índigo carmim (quadrado), e rodamina (círculo).



Fonte: A autora (2022)

2.3.2.3 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção corresponde à progressiva transferência de massa do adsorvato do meio líquido para o adsorvente em função do tempo de interação, com a taxa de adsorção sendo dependente da concentração do adsorvato, e da superfície do adsorvente (Kajjumba, Emik et al. 2018).

Os dados experimentais obtidos podem ser então comparados com a previsão de diferentes modelos cinéticos, de modo a identificar quais os tipos de mecanismo (físico, químico, difusão) envolvidos na interação entre o adsorvente e o adsorvato. Os três modelos mais examinados na literatura são o de Pseudo-Primeira-Ordem (PPO) – também conhecido como modelo de Lagergren, Pseudo-Segunda-Ordem (PSO), e Morris-Weber (MW) (Lagergren 1898, Weber and Morris 1963, Wu, Tseng et al. 2009, Kajjumba, Emik et al. 2018). Em suas formas linearizadas, eles podem ser expressos como:

PPO

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad , \quad (10)$$

onde k_1 é a constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira-ordem (min^{-1}); q_e e q_t capacidade de adsorção expressa em (mg do adsorvato/g do adsorvente);

PSO

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad , \quad (11)$$

onde K_2 é a constante da taxa de adsorção de pseudo-segunda-ordem;

MW

$$q_t = k_{id}(t)^{0,5} + c \quad , \quad (12)$$

onde K_{id} é o coeficiente de difusão intrapartícula, e C é a constante relacionada com a resistência à difusão.

A partir dos resultados de tempo de interação entre os corantes alaranjado de metila, índigo carmim e rodamina pelo nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ (Fig. 15), podemos extrair informações como a obtenção dos parâmetros cinéticos correspondentes aos modelos de pseudo-primeira-ordem, pseudo-segunda-ordem e Morris-Weber. Os ajustes lineares para os modelos (Figs. 16 - 18) possibilitou os cálculos dos parâmetros listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos para adsorção de corantes com o nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$.

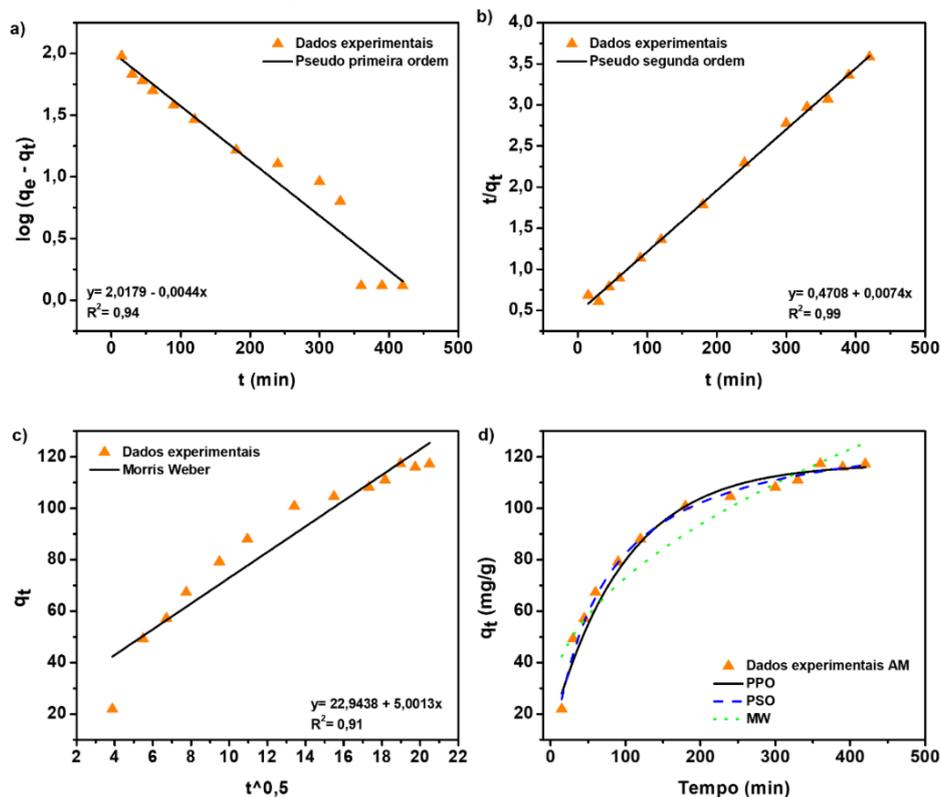
		Pseudo-primeira-ordem			Pseudo-segunda-ordem			Morris-Weber	
Corante	$q_e \text{ exp}$ (mg/g)	K_1 (min^{-1})	q_e (mg/g)	R^2	K_2 (mg.min/g)	q_e (mg/g)	R^2	K_{id} (min^{-1})	R^2
Alaranjado de metila	147	$1,01 \times 10^{-2}$	104,2	0,942	$1,16 \times 10^{-4}$	135,1	0,997	5,00	0,914
Índigo carmim	126	$9,90 \times 10^{-3}$	163,0	0,946	$7,13 \times 10^{-5}$	193,4	0,999	7,37	0,953
Rodamina B	80	$4,77 \times 10^{-3}$	64,2	0,988	$1,31 \times 10^{-4}$	85,0	0,992	3,30	0,983

Fonte: A autora (2022)

Tomando por base os valores do coeficiente de correlação (R^2) correspondente, podemos concluir que o processo de adsorção entre o NCM e os corantes alaranjado de metila, índigo carmim, e rodamina B pode ser descrito com o modelo de pseudo-segunda-ordem (0,997, 0,999 e 0,992, respectivamente). As capacidades de adsorção ($q_e \text{ exp}$) medidas para o corante AM e RB são as que mais se aproximam do valor previsto pelos diferentes modelos. Para o corante aniônico índigo carmim, muito embora o valor de R^2 seja maior para o modelo de PSO, os valores correspondentes para os modelos PPO e MW (0,946 e 0,953, respectivamente) são também significativos, em uma indicação de que provavelmente mais de um mecanismo de adsorção está envolvido. Um comportamento

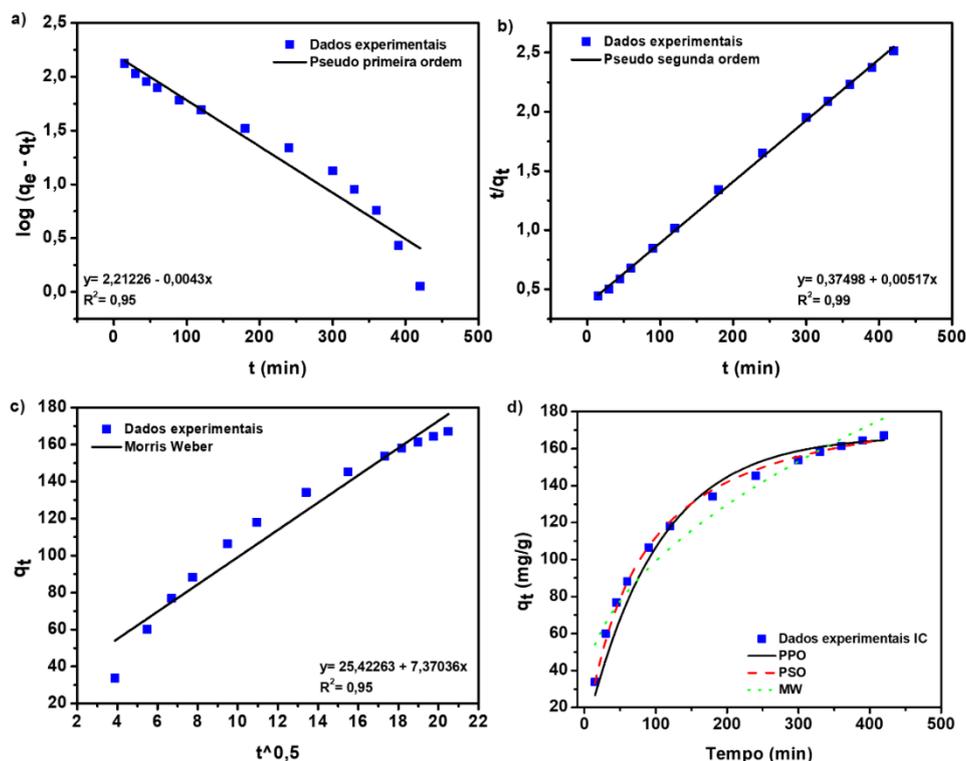
similar é também observado para caso da rodamina B, em que os valores de 0,988 e 0,983 são encontrados para os modelos PPO e MW, respectivamente.

Figura 16 - Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção do corante alaranjado de metila com o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ para os modelos cinéticos: de pseudo-primeira-ordem (a), pseudo-segunda-ordem (b), Morris-Weber (c), e ajuste dos modelos cinéticos junto aos dados experimentais (d).



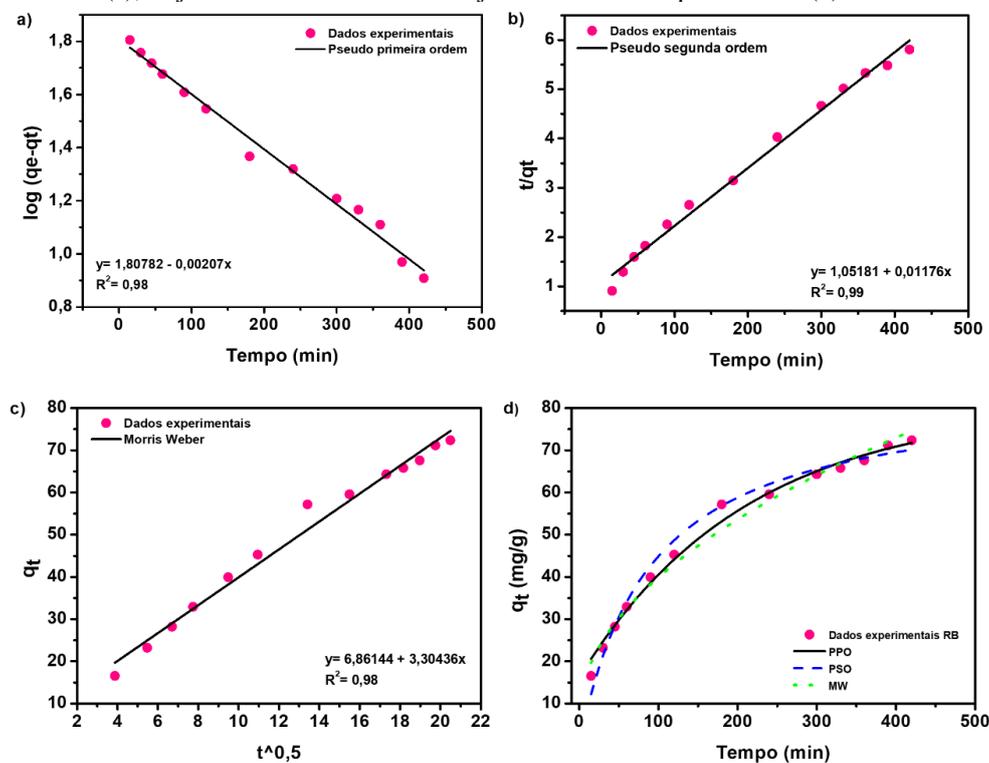
Fonte: A autora (2022)

Figura 17 - Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção do corante índigo carmim com o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ para os modelos cinéticos: de pseudo-primeira-ordem (a), pseudo-segunda-ordem (b), Morris-Weber (c), e ajuste dos modelos cinéticos junto aos dados experimentais (d).



Fonte: A autora (2022)

Figura 18 - Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção do corante rodamina B com o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ para os modelos cinéticos: de pseudo-primeira-ordem (a), pseudo-segunda-ordem (b), Morris-Weber (c), e ajuste dos modelos cinéticos junto aos dados experimentais (d).

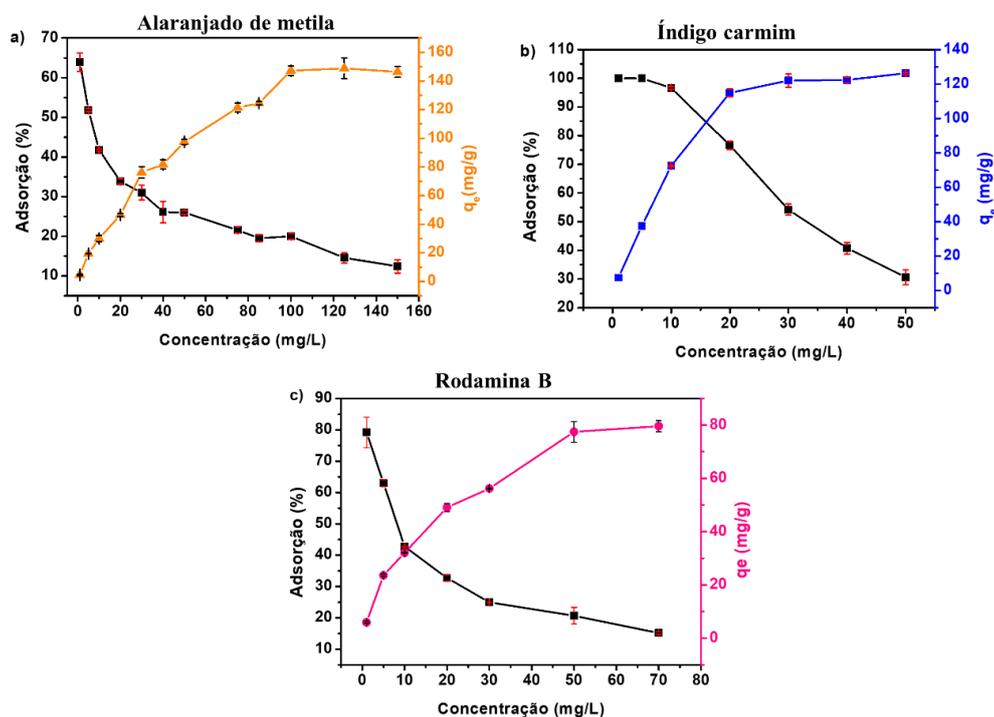


Fonte: A autora (2022)

2.3.2.4 Efeito da concentração inicial de corante

Para estudar o efeito da concentração inicial de cada corante, adotamos os melhores parâmetros de trabalho anteriormente identificados, ou seja, um valor de pH 4 para o alaranjado de metila, 2 para o índigo, e 6 para a rodamina, com o mesmo tempo de equilíbrio (300 min) em todos os casos, e usando soluções com diferentes concentrações iniciais, na faixa 1 - 150 mg/L para o alaranjado de metila, 1 - 50 mg/L para o índigo, e 1 - 70 mg/L para rodamina B. Os resultados obtidos para a porcentagem de adsorção e a capacidade de adsorção (q_e) são apresentados na Fig. 19. É possível observar que a porcentagem de adsorção diminuiu à medida que aumenta a concentração inicial. Para o alaranjado de metila, a porcentagem de remoção é igual a 64 %, 31 %, 21,6 %, e 12,4 % para as concentrações de 1, 30, 75, e 150 mg/L, respectivamente, enquanto para essas concentrações o valor de q_e aumenta progressivamente, correspondendo a 4,5, 76, 121,4, e 147 mg/g, respectivamente. Já para o índigo carmim, um comportamento semelhante é observado, com a maior capacidade de adsorção alcançando o valor de 126 mg/g a partir de uma concentração inicial igual a 30 mg/L. Finalmente, a maior capacidade de adsorção obtida para a rodamina foi de 80 mg/g. O desempenho mostra a dependência da saturação da superfície com a concentração inicial e indica que para concentrações baixas os sítios estão disponíveis para adsorção, enquanto para concentrações maiores existe a relação com a força motriz e a transferência de massa entre as fases (Salleh, Mahmoud et al. 2011).

Figura 19 - Efeito da concentração inicial do corante alaranjado de metila (a), índigo carmim (b), e rodamina B (c) em relação a porcentagem (%) e capacidade de adsorção (q_e) do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani.



Fonte: A autora (2022)

2.3.2.5 Isotermas de adsorção

Os modelos de isotermas de adsorção são ferramentas úteis para possibilitar um melhor entendimento do processo de interação entre o adsorvente e o adsorvato. Os ensaios para a determinação dos valores da concentração no equilíbrio (C_e) e da capacidade de adsorção (q_e) foram realizados à temperatura constante. Dentre os diversos modelos de adsorção com dois ou mais parâmetros disponíveis na literatura, neste trabalho decidimos ajustar os dados experimentais de acordo com os modelos de Langmuir, Freundlich e Temkin.

O modelo de Langmuir admite que o adsorvato interage com o adsorvente de maneira homogênea, resultando na formação de uma monocamada, com o processo ocorrendo em locais definidos (Bansal and Goyal 2005, Faust and Aly 2013). Sua forma linearizada pode ser escrita como

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{bq_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad , \quad (13)$$

onde C_e é a concentração no equilíbrio do adsorvato em mg/L, q_e é a capacidade de adsorção expressa em mg/g (mg do adsorvato, nesse caso o corante por g de NCM), b é

a constante de Langmuir, e q_m é quantidade máxima de moléculas adsorvidas (mg/g). Pela representação gráfica de C_e/q_e versus C_e , é possível calcular o valor da constante de Langmuir b e a quantidade máxima adsorvida q_m .

O modelo sugerido por Freundlich é aplicável aos casos em que a adsorção ocorre em superfícies heterogêneas (com um sítio podendo conter mais de uma molécula), resultando na adsorção em multicamada (Ho, Porter et al. 2002, Foo and Hameed 2010). Em sua forma linear pode ser expressa como

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad , \quad (14)$$

onde K_f é a constante de capacidade de adsorção de Freundlich, e n a constante relacionada à heterogeneidade da superfície. Os valores dessas constantes podem ser obtidos através da regressão linear do gráfico $\log q_e$ versus $\log C_e$.

Já o modelo de Temkin admite que o calor de adsorção de todas as moléculas na camada deve diminuir linearmente com a cobertura da superfície do adsorvente, por conta de interações indiretas no sistema adsorvente/adsorvato (Ayawei, Ebelegi et al. 2017). Sua equação linearizada é expressa como

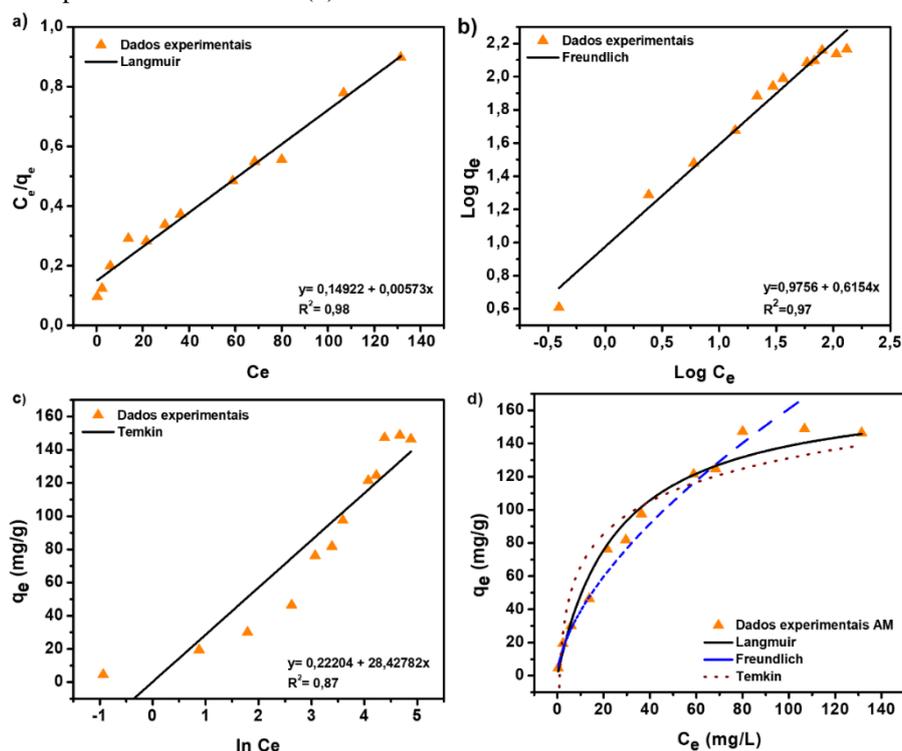
$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \quad , \quad (15)$$

onde B está relacionada ao calor de adsorção representado por, $B = \frac{RT}{b}$, R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K), e A corresponde a constante de equilíbrio de ligação (Kumar and Kirthika 2009).

A qualidade do ajuste linear pode ser avaliada pelo valor correspondente do coeficiente de correlação (R^2), com os melhores ajustes se aproximando de 1,0. Para o modelo de Freundlich, quando o valor do fator n é inferior a 1, o adsorvente tem maior afinidade pelo solvente, sendo igual a 1 corresponde ao caso em que a energia é igual para os sítios de adsorção, e superior a 1, quando a interação adsorvente-adsorvato é mais forte (Nascimento, Lima et al. 2014).

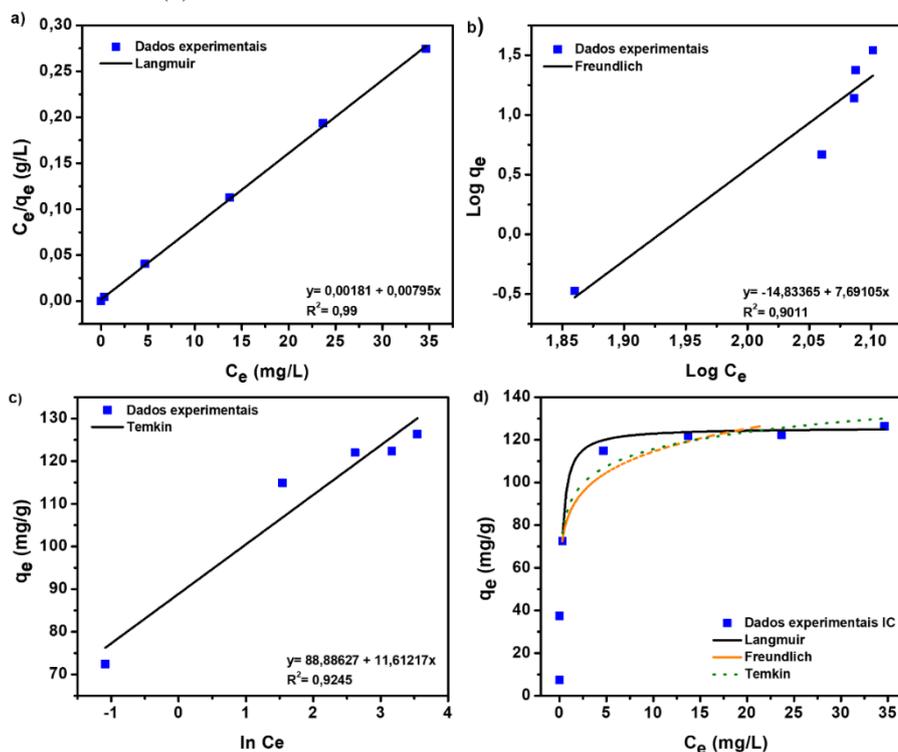
Nas Figs. 20 - 22, apresentamos os ajustes lineares dos dados experimentais para os modelos de isotermas estudados para o alaranjado de metila, índigo carmim, e rodamina B.

Figura 20 - Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção de AM com o NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani usando os modelos de Langmuir (a), Freundlich (b), Temkin (c), e isotermas de adsorção dos valores experimentais e teóricos (d).



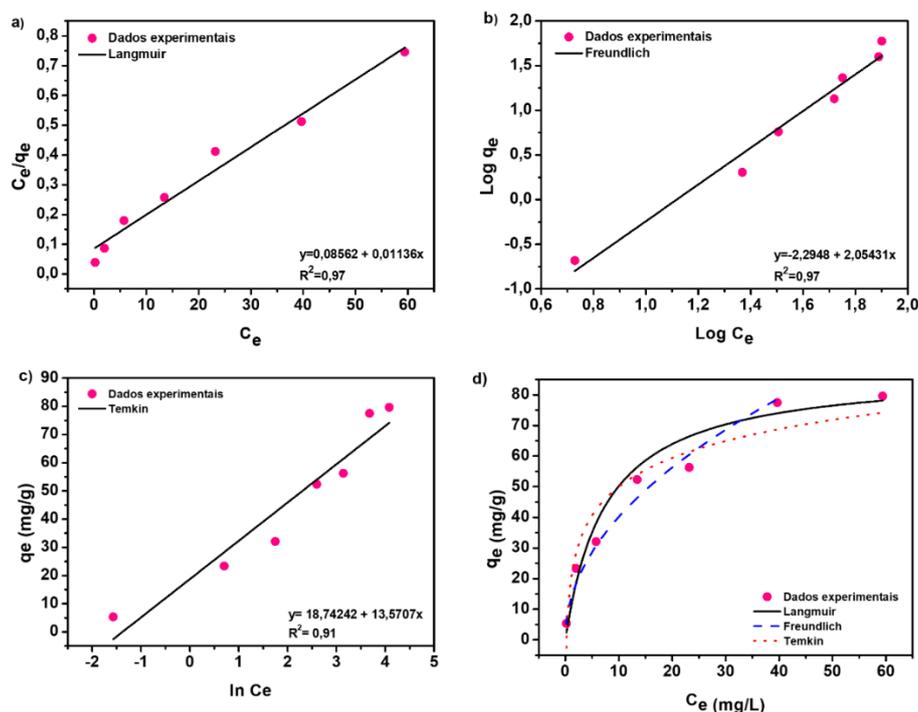
Fonte: A autora (2022)

Figura 21 - Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção de IC com o NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani usando os modelos de Langmuir (a), Freundlich (b), Temkin (c), e isotermas de adsorção dos valores experimentais e teóricos (d).



Fonte: A autora (2022)

Figura 22 - Ajustes lineares dos dados experimentais para adsorção de RB com o NCM γ - Fe_2O_3 /Qui/Pani usando os modelos de Langmuir (a), Freundlich (b), Temkin (c), e isotermas de adsorção dos valores experimentais e teóricos (d).



Fonte: A autora (2022)

A partir dos valores da inclinação e do intercepto obtidos nos ajustes lineares, se torna possível calcular os valores das constantes e capacidade máxima (q_m), mostrados na Tabela 2. Ao observar os resultados dos coeficientes de correlação para o alaranjado de metila, nota-se que apesar da proximidade entre os modelos de Langmuir e Freundlich, o valor teórico previsto pelo primeiro (174,5 mg/g) é mais próximo daquele obtido experimentalmente (147 mg/g). O valor de 1,625 obtido para o fator n do modelo de Freundlich indica uma maior interação entre o adsorvente e o adsorvato. Por sua vez, para o índigo carmim o processo é descrito melhor pelo modelo de Langmuir ($R^2 = 0,999$), sendo o valor teórico igual ao experimental, indicando que nesse caso a adsorção ocorre em monocamada. Já para a rodamina B, um comportamento semelhante ao observado para o alaranjado de metila com maior proximidade entre o valor calculado (88 mg/g) e o experimental (80 mg/g) ocorre para o modelo de Langmuir.

Tabela 2 - Parâmetros de isotermas para os modelos de Langmuir, Freundlich e Temkin correspondentes a adsorção de corantes através do nanocompósito γ -Fe₂O₃/Qui/Pani.

Corante	q _e exp (mg/g)	Langmuir			Freundlich			Temkin	
		q _m (mg/g)	b (mg/L)	R ²	K _F (mg/g)	n	R ²	A	R ²
Alaranjado de metila	147	174,5	0,038	0,980	9,453	1,625	0,975	1,139	0,874
Índigo carmim	126	125,8	4,393	0,999	1,46x10 ⁻¹⁵	0,13	0,901	4,00x10 ⁵⁵	0,925
Rodamina B	80	88,0	0,133	0,972	5,07 x10 ⁻³	0,49	0,972	2,063	0,914

Fonte: A autora (2022)

2.3.3 Parâmetros termodinâmicos

O efeito da variação de temperatura sobre o processo de adsorção é uma informação de grande relevância para o entendimento dos mecanismos de interação entre o adsorvente e o adsorvato. Para estimar os valores de parâmetros termodinâmicos do processo, como a variação de entalpia (ΔH), da energia livre de Gibbs (ΔG) e da entropia (ΔS), implementamos experimentos a diferentes temperaturas (10, 20, 30, e 50 °C), usando concentrações variadas do corante na faixa entre 10 mg/L e 85 mg/L.

Se o processo ocorre através da absorção ($\Delta H > 0$) ou liberação de calor ($\Delta H < 0$), o sistema é caracterizado como sendo endotérmico ou exotérmico, respectivamente. A variação da energia livre possibilita identificar se o processo acontece de maneira espontânea ($\Delta G < 0$) ou não ($\Delta G > 0$). Por sua vez, a entropia de adsorção está associada ao grau de aleatoriedade do processo.

As Eqs. (16 - 18), que permitem calcular esses parâmetros, estão associadas com a constante K_L das isotermas de Langmuir (Doke and Khan 2013). A variação de energia livre de Gibbs com a temperatura pode ser expressa como

$$\Delta G_t = -RT \ln K_L \quad , \quad (16)$$

onde R é a constante universal dos gases (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹), T é a temperatura na escala absoluta (Kelvin), e $\ln K_L$ corresponde ao logaritmo da constante de Langmuir para cada temperatura. Já a variação de entalpia pode ser obtida através da relação entre o valor da constante de Langmuir na temperatura final (K_{tf}) e inicial (K_{ti}) na forma

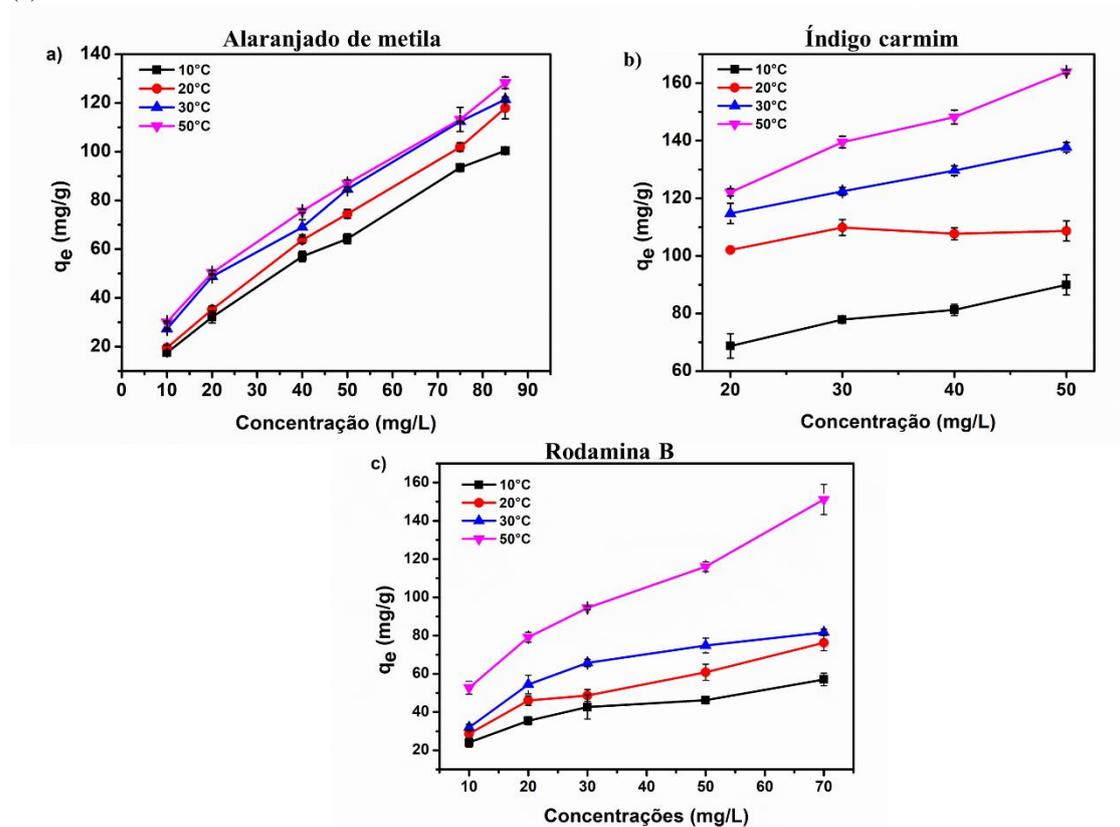
$$\ln K_{tf} - \ln K_{ti} = - \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_f} - \frac{1}{T_i} \right) \quad . \quad (17)$$

Por fim, é possível obter a variação de entropia do sistema pela relação

$$\Delta S = - \frac{\Delta G - \Delta H}{T} \quad (18)$$

No processo de adsorção entre o nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e os corantes alaranjado de metila, índigo carmim, e rodamina B, pode ser observado (Fig. 23) que ocorre um aumento na capacidade de adsorção (q_e) diante o aumento da temperatura, um efeito que pode estar relacionado com o aumento da mobilidade das moléculas devido ao fato de que o aumento da energia cinética leva a uma maior frequência nas colisões entre as moléculas do corante e do NCM. Por exemplo, para o caso do AM pode ser notada uma maior proximidade entre as curvas de variação de temperatura (30 °C – 50 °C), com o aumento de temperatura levando a uma maior capacidade de adsorção. Para o corante IC (Fig. 23b) na concentração de 50 mg/L, à temperatura de 10 °C, o valor da q_e é de 90 mg/g, enquanto para 50 °C esse valor sobe para 163 mg/g. Com relação à rodamina, o comportamento é similar ao observado para o índigo, onde as curvas são mais distintas, observando um acréscimo significativo de 70 mg/g na q_e , quando a temperatura é elevada de 30 para 50 °C.

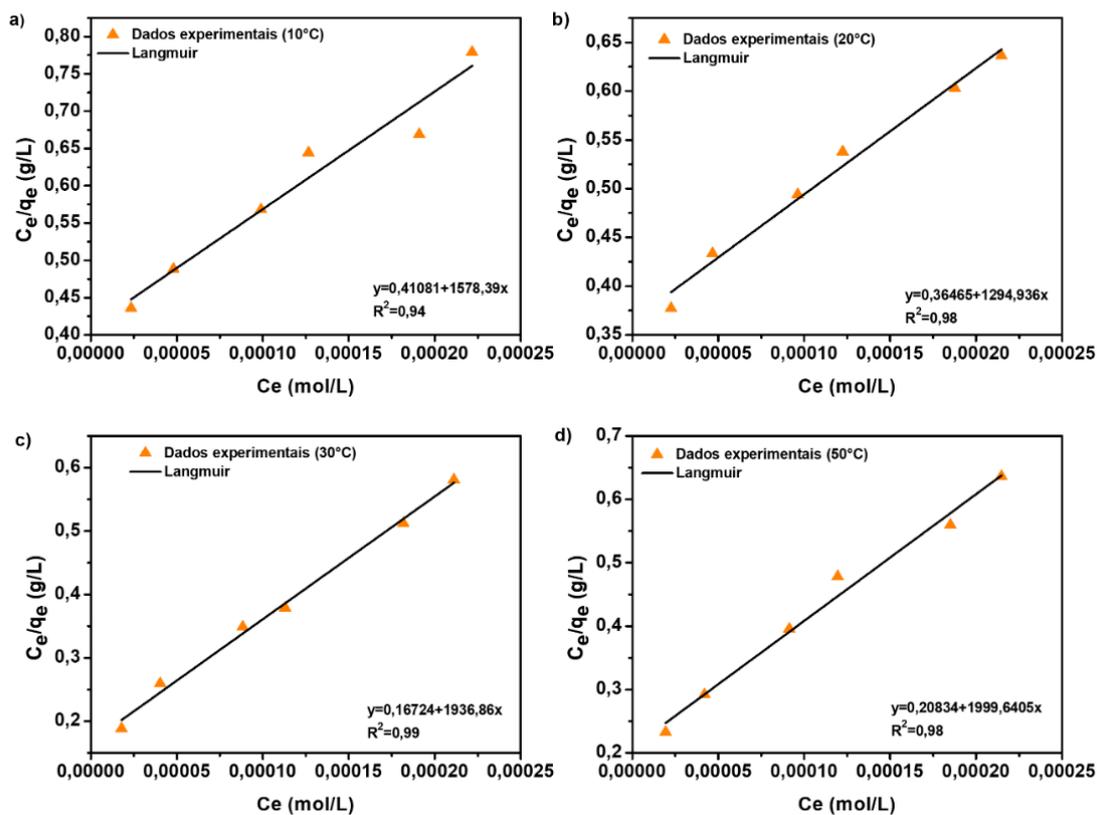
Figura 23 - Efeito da temperatura em relação a capacidade de adsorção do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ para diferentes concentrações dos corantes alaranjado de metila (a), do índigo carmim (b), e da rodamina B (c).



Fonte: A autora (2022)

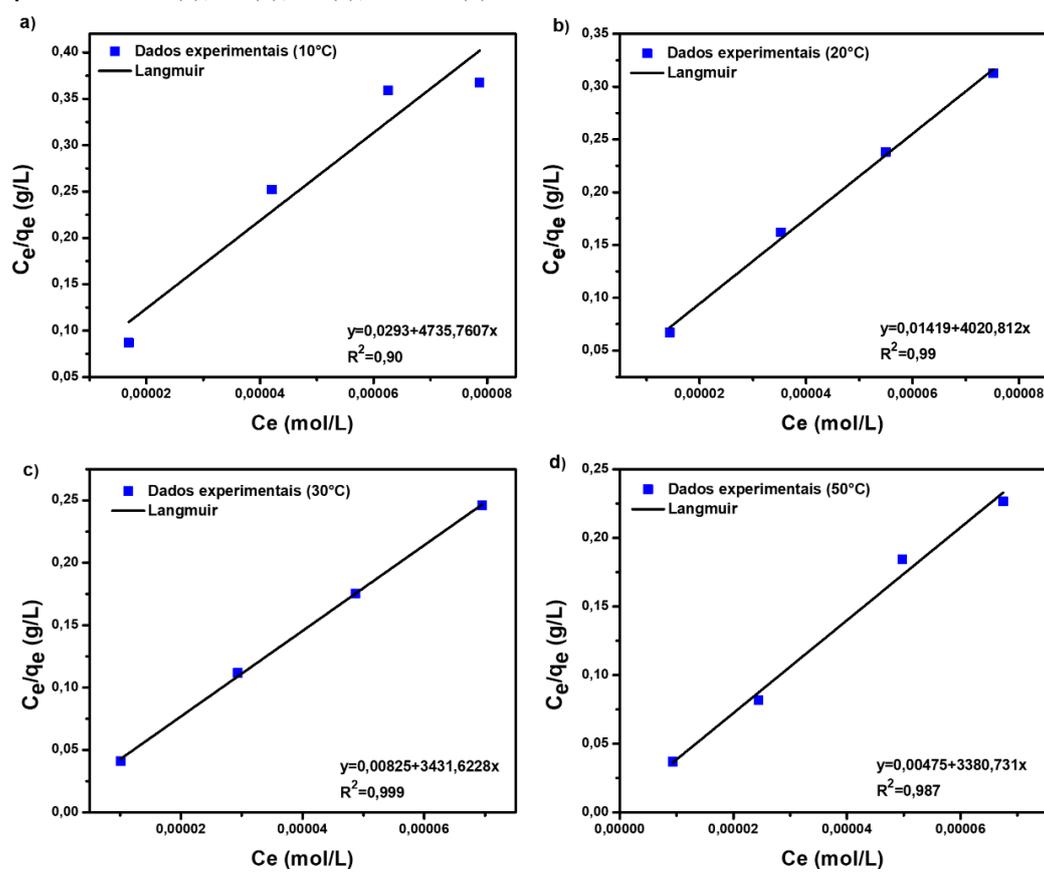
A partir desses dados experimentais, e usando as Eqs. 16 - 18, é possível calcular os parâmetros termodinâmicos. O valor da constante K_L é determinado a partir da inclinação da curva $C_e/q_e \times C_e$ (Figs. 24 - 26) para cada temperatura trabalhada (10, 20, 30 e 50 °C).

Figura 24 - Ajustes lineares da isoterma de Langmuir para adsorção do corante AM pelo NCM à temperatura de 10 (a), 20 (b), 30 (c), e 50 °C (d).



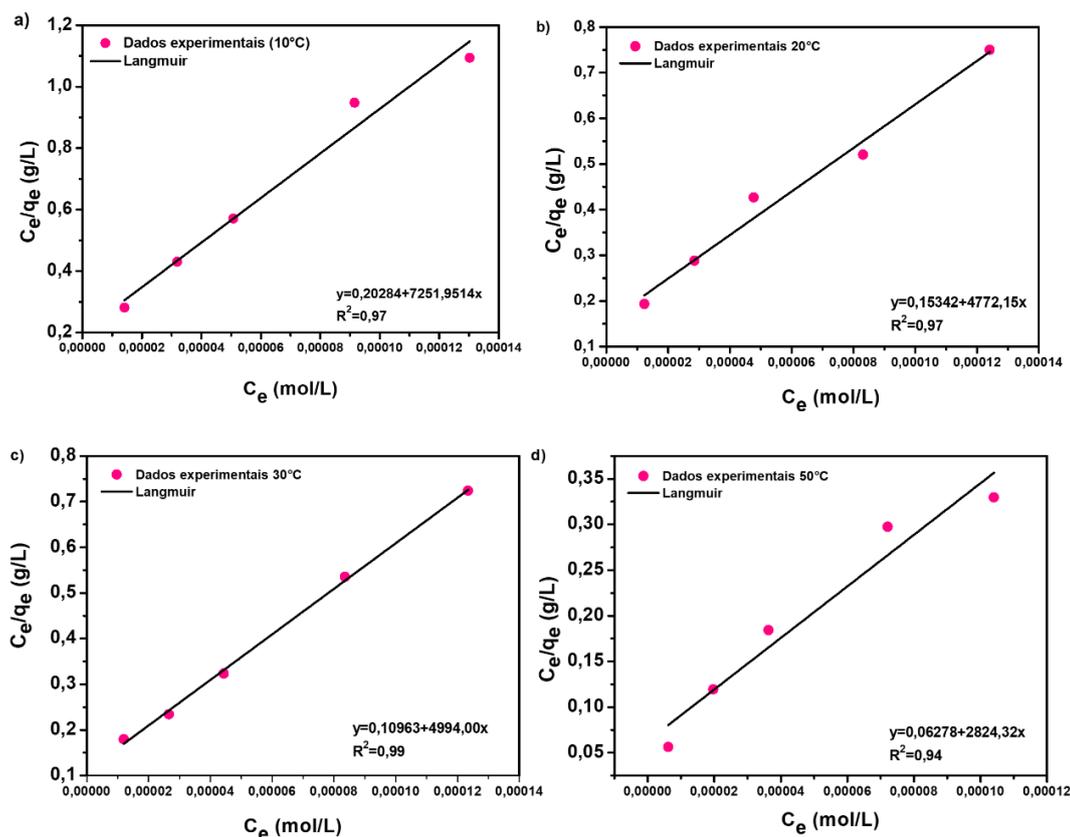
Fonte: A autora (2022)

Figura 25 - Ajustes lineares da isoterma de Langmuir para adsorção do corante IC pelo NCM à temperatura de 10 (a), 20 (b), 30 (c), e 50 °C (d).



Fonte: A autora (2022)

Figura 26 - Ajustes lineares da isoterma de Langmuir para adsorção do corante RB pelo NCM à temperatura de 10 (a), 20 (b), 30 (c), e 50 °C (d).



Fonte: A autora (2022)

Na Tabela 3, listamos os valores obtidos para esses parâmetros termodinâmicos. Como pode ser observado, em cada uma das temperaturas examinadas a variação de energia livre (ΔG) tem um valor negativo, em uma indicação de que o processo de adsorção ocorre de maneira espontânea. O processo de adsorção se torna mais eficiente com o aumento da temperatura (Fig. 23), por conta de sua natureza endotérmica, como revelado pela variação de entalpia, que é de 61,2 (kJ/mol) para o alaranjado de metila, 28,2 (kJ/mol) para o índigo carmim, e de 5,3 (kJ/mol) para a Rodamina. Por sua vez, o grau de aleatoriedade na adsorção pode ser avaliado pelo valor da variação da entropia, que é positiva, 24,8 (J/mol K) para o caso do índigo carmim e 72,6 (J/mol K) para o caso da rodamina, o que indica a ocorrência de afinidade no sistema adsorvente-adsorvato (Nascimento, Lima et al. 2014).

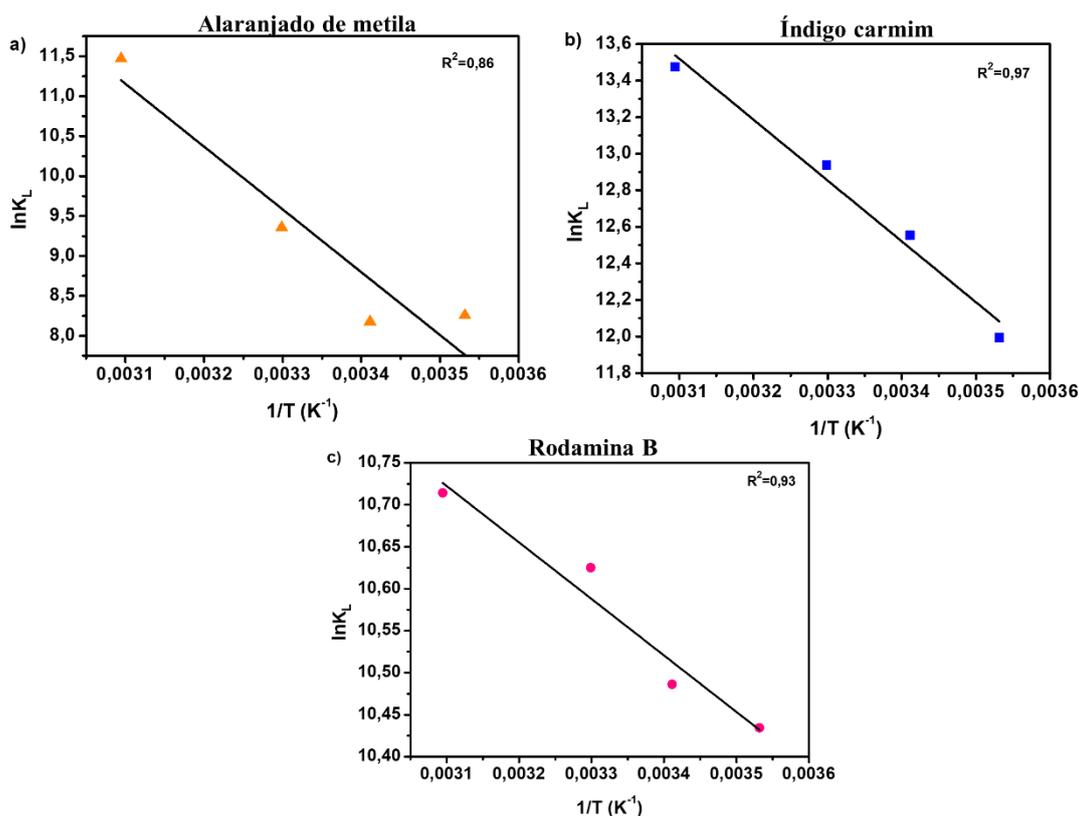
Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos para adsorção dos corantes AM, IC e RB com o NCM γ - Fe_2O_3 /Qui/Pani

Corante	T (°C)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol K)
Alaranjado de metila	10	-19,4	61,2	-93,9
	20	-19,9		
	30	-23,6		
	50	-30,8		
Índigo carmim	10	-28,2	28,2	24,8
	20	-30,6		
	30	-32,6		
	50	-36,2		
Rodamina B	10	-24,6	5,3	72,6
	20	-25,6		
	30	-26,8		
	50	-28,8		

Fonte: A autora (2022)

Pode ser visto na Fig. 27, o ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir (K_L) em função da variação da temperatura.

Figura 27 - Ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir em função da temperatura para o alaranjado de metila (a), índigo carmim (b), e rodamina B (c).



Fonte: A autora (2022)

2.3.4 Estudos de dessorção e reutilização do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$

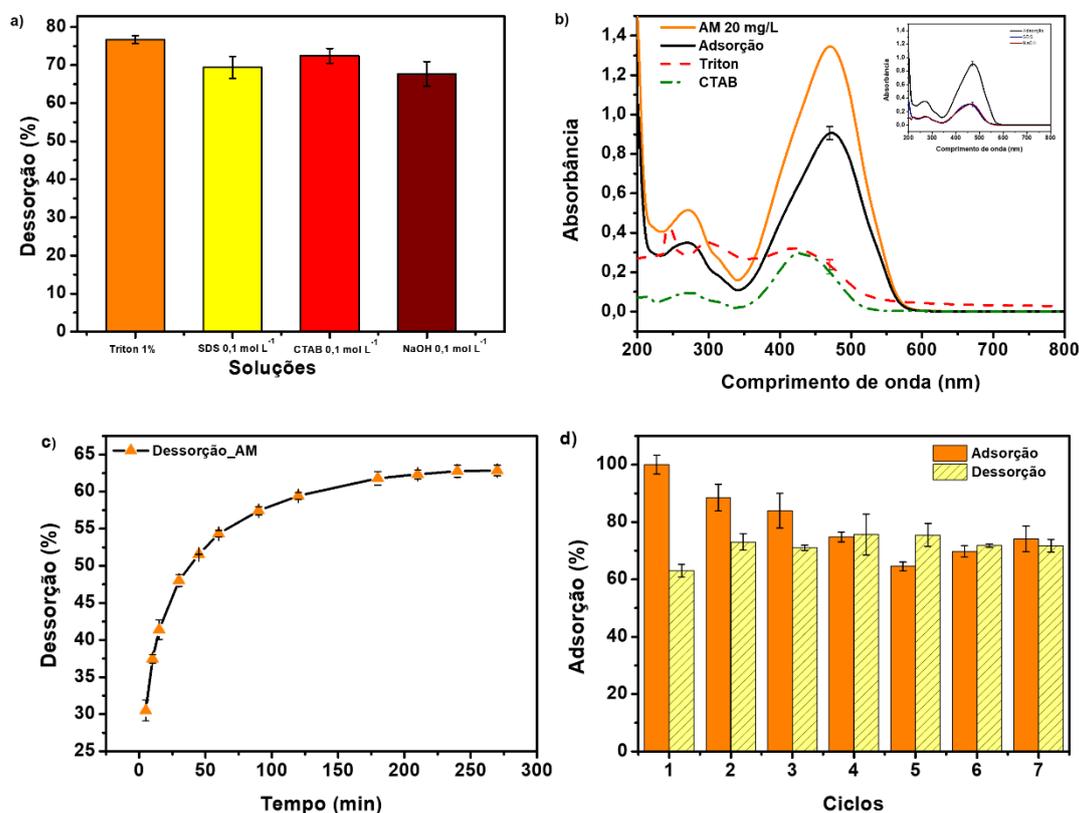
Examinamos a dessorção do material capturado, de modo a avaliar a possibilidade de recuperação dos contaminantes adsorvidos, e estabelecer a viabilidade do adsorvente ser reutilizado em alguns ciclos sucessivos. Para isso, testamos o uso de quatro soluções de eluição diferentes, incluindo surfactantes de natureza neutra, aniônica, e catiônica, a diferentes valores de pH do meio: a) Triton 1 % (v/v) - pH 4,2, b) SDS 0,1 mol L⁻¹ - pH 6,0, c) Brometo de cetrimônio (CTAB) 0,1 mol L⁻¹, pH 9,0, e d) NaOH 0,1 mol L⁻¹, pH 13,1.

Para o corante alaranjado de metila, como mostrado na Fig. 28, a dessorção ocorreu de maneira significativa para cada uma das quatro soluções de surfactantes testadas. Esses resultados nos surpreenderam, uma vez que há novamente a indicação de que diversos mecanismos estão envolvidos nos processos de adsorção e de dessorção, com a liberação do contaminante adsorvido podendo ocorrer por meio de processos de troca iônica ou pela ocorrência da redução/desprotonação da polianilina. Ao observar os espectros de UV-Vis correspondentes (Fig. 28b), percebe-se que, quando utilizamos as

soluções de Triton e CTAB, ocorre o deslocamento da banda de absorção para menores comprimentos de onda, possivelmente devido a interações entre os materiais.

Assim, utilizamos a solução de SDS como eluente para a reutilização do NCM em ciclos consecutivos de adsorção/dessorção do alaranjado de metila. Na Fig. 28c, é mostrada a cinética de dessorção, pode ser observado que após 45 min de interação ocorre a liberação de 50 % do material capturado, com esse percentual subindo para 62 % em 180 min. Ao implementarmos ciclos consecutivos de adsorção (5 h) e dessorção (3 h), verificamos que o material responde muito bem por no mínimo sete ciclos, com a porcentagem de adsorção se mantendo na faixa de 70 %.

Figura 28 - Percentual de dessorção de AM pelo NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ para diferentes soluções (a), e respectivos espectros UV-Vis (b), cinética de dessorção (c), e reutilização (d).

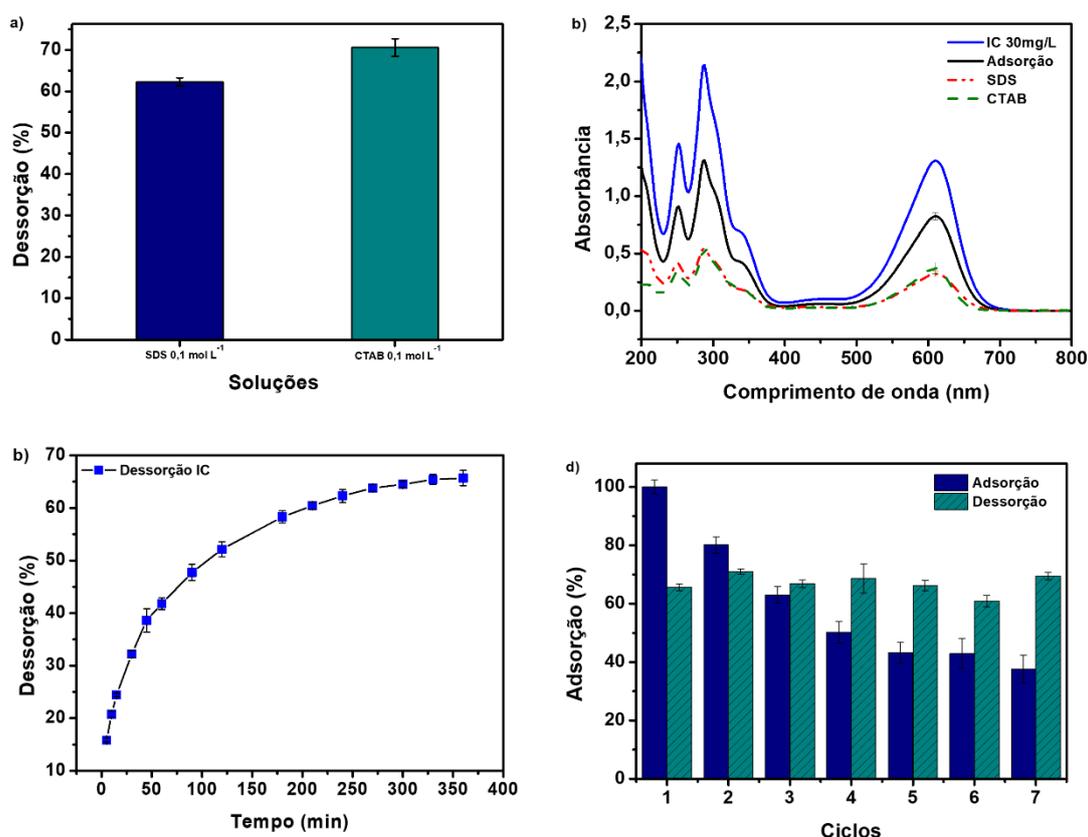


Fonte: A autora (2022)

Nas Figs. 29 e 30, são apresentados os resultados para os experimentos de dessorção realizados para o índigo carmim e a rodamina B, respectivamente. Para o primeiro corante, são mostrados apenas os resultados das soluções de SDS e CTAB, uma vez que a solução de Triton não foi capaz de remover o corante do NCM. Por sua vez, a solução de NaOH provavelmente ocasionou a degradação do corante, tornando a solução esverdeada logo nos primeiros minutos de interação e, em seguida, transparentes. Mais

análises se fazem necessárias para melhor investigar a natureza da interação entre as moléculas de índigo carmim com a base alcalina. Em termos da cinética de dessorção, a liberação de 65 % do corante adsorvido índigo carmim ocorre em cerca de 300 min (5 h). Nos experimentos de reutilização do NCM para a captura do índigo carmim, a porcentagem de remoção diminui progressivamente, atingindo 50 % no quarto ciclo, chegando a 37 % no sétimo ciclo.

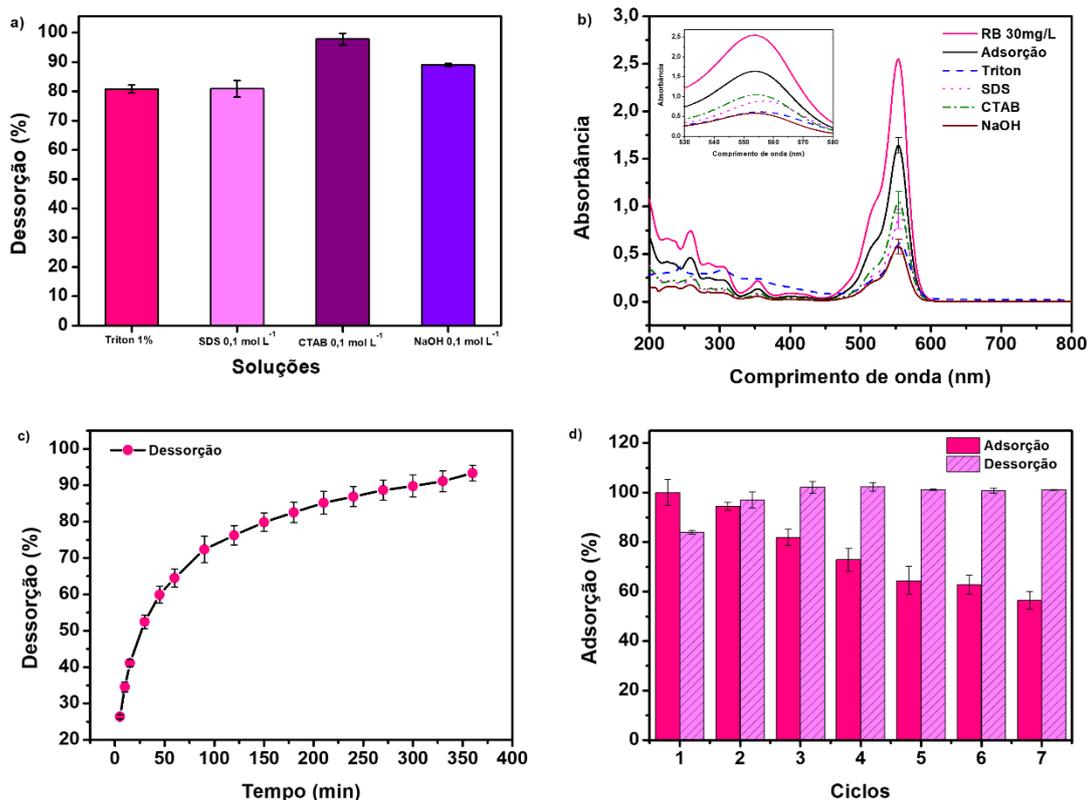
Figura 29 - Percentual de dessorção de IC pelo NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ para diferentes soluções (a), e respectivos espectros UV-Vis (b), cinética de dessorção (c), e reutilização (d).



Fonte: A autora (2022)

Já para o caso da rodamina B, para sua dessorção do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ pode ser usada qualquer uma das soluções testadas, com uma taxa de liberação superior a 80 %. Nós optamos por trabalhar com a solução de SDS devido seu caráter neutro, com uma liberação de 90 % do material adsorvido após 300 min de interação. Ao longo de sete ciclos de reutilização, ocorre uma progressiva diminuição da porcentagem de adsorção a cada ciclo, alcançando 56 % no sétimo ciclo.

Figura 30 - Percentual de dessorção de RB pelo NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani para diferentes soluções (a), e respectivos espectros UV-Vis (b), cinética de dessorção (c), e reutilização (d).



Fonte: A autora (2022)

2.3.5 Comparação do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani com outros adsorventes encontrados na literatura

Como pode ser visto nos dados listados na Tabela 4, a capacidade do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani de remover os corantes alaranjado de metila, índigo carmim e rodamina B é competitiva em relação a outros adsorventes similares descritos na literatura. Deve ser ressaltado que o NCM pode ser obtido em uma síntese fácil e suas características magnéticas possibilitam uma fácil separação do meio através de um ímã (dispensando assim o uso de uma centrífuga, por exemplo).

No caso do corante alaranjado de metila, a capacidade de adsorção do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani (147 mg/g) em 300 min de interação é superior à de partículas de quitosana (89,3 mg/g em 720 min) (Huang, Liu et al. 2017), do nanocompósito kapok-polianilina (136,7 mg/g em 360 min) (Gapusan and Balela 2020), em relação ao nanocompósito de Fe₃O₄-óxido de grafeno-pani (Lv, Zhang et al. 2020) esse apresenta resultado superior 181 mg/g, porém não cita qual o tempo requerido para a obtenção dessa capacidade.

Já para o corante aniônico índigo carmim, podemos ver que os adsorventes membrana de PVDF revestida de quitina (Gopi, Balakrishnan et al. 2017) e óxido de grafeno-Pani (Gemeay, Elsharkawy et al. 2018) apresentam uma capacidade inferior quando comparado ao NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani. Por sua vez, nanofibras de poliacrilonitrila (Yazdi, Ivanic et al. 2018) têm maior capacidade de adsorção, contudo a superfície de interação é distinta do adsorvente que utilizamos, e a capacidade de adsorção das partículas de polianilina (Yaşar, Deligöz et al. 2011) é de 169 mg/g, porém o tempo requerido é longo (48 h).

Em uma busca na literatura sobre dados para a adsorção de rodamina B, encontramos resultados inferiores para capacidade de adsorção quando utilizados os adsorventes óxido de ferro-hemoglobina (Essandoh, Garcia et al. 2021), biomassa de carbono-quitosana e enxofre (Vigneshwaran, Sirajudheen et al. 2021), e compósito MoO₃/polianilina (Dhanavel, Nivethaa et al. 2016). Já o nanocompósito de hidroxiapatita Ag-quitosana (Li, Iqbal et al. 2018) apresenta uma maior capacidade de adsorção (128 mg/g), mas a reutilização possibilita apenas para três ciclos de adsorção/dessorção. Assim, o valor obtido neste trabalho é intermediário, quando comparado ao de outros materiais.

Tabela 4 - Rendimento comparativo do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani com materiais descritos na literatura.

Adsorvente	pH	q _e (mg/g)	Tempo de adsorção (min)	Ref.
Alaranjado de metila				
Partículas de quitosana protonada	6	89,3	720	(Huang, Liu et al. 2017)
Compósito alumina-quitosana	6	42,0	90	(Zhang, Zhou et al. 2012)
Nanoadsorventes de polianilina	10	75,9	60	(Tanzifi, Hosseini et al. 2017)
Nanocompósito de fibra de kapok-polianilina	4	136,7	360	(Gapusan and Balela 2020)
Nanocompósito de Fe ₃ O ₄ -óxido de grafeno-pani	-	181,0	-	(Lv, Zhang et al. 2020)
NCM γ-Fe₂O₃/Qui/Pani	4	147,0	300	Este trabalho
Índigo carmim				
Nanofibras de poliacrilonitrila-nanopartícula	5	154,5	25	(Yazdi, Ivanic et al. 2018)

de óxido de ferro- ácido 3-mercaptopropiônico				
Membrana PVDF com quitina	-	72,6	-	(Gopi, Balakrishnan et al. 2017)
Óxido de grafeno-pani	2	88,7	120	(Gemeay, Elsharkawy et al. 2018)
Partícula de polianilina	-	169,0	2.880	(Yaşar, Deligöz et al. 2011)
NCM γ-Fe₂O₃/Qui/Pani	2	126,0	300	Este trabalho
Rodamina B				
Óxido de ferro-hemoglobina	9	19,7	1.440	(Essandoh, Garcia et al. 2021)
Biomassa de carbono- quitosana e enxofre	8	40,9	120	(Vigneshwaran, Sirajudheen et al. 2021)
Nanocompósito de hidroxiapatita Ag-quitosana	7	127,6	120	(Li, Iqbal et al. 2018)
Compósito MoO ₃ /polianilina	3	36,4	60	(Dhanavel, Nivethaa et al. 2016)
NCM γ-Fe₂O₃/Qui/Pani	4-6	80,0	300	Este trabalho

Fonte: A autora (2022)

2.4 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, sintetizamos o NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani, que apresentou uma boa capacidade de adsorção para os corantes alaranjado de metila (147 mg/g), índigo carmim (126 mg/g), e rodamina (80 mg/g). Apesar das diferenças nas estruturas químicas e nos mecanismos de interação adsorvente-adsorvato envolvidos (interação eletrostática, empilhamento π , ligação de hidrogênio), o tempo estimado para o equilíbrio do processo foi o mesmo, cerca de 300 min (5 h). Mostramos ainda ser possível a utilização do compósito NCM por sete ciclos consecutivos de adsorção/dessorção. Assim, os resultados obtidos sugerem que o NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani é um material promissor na captura de corantes, e apto a ser incorporado a tecnologias eficientes de remoção de poluentes.

3 USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO γ -Fe₂O₃/QUI/PANI PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO: UM ESTUDO COMPARATIVO

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Há mais de dois anos, enfrentamos uma situação antes inimaginável, a pandemia causada pela disseminação do coronavírus. A gravidade e extensão da doença COVID-19 mostraram à população a importância da ciência, tornando de amplo conhecimento a existência de testes moleculares de diagnóstico, como a reação em cadeia da polimerase. Menos evidente, porém, é o fato de que até que se chegue à etapa final do diagnóstico, diversas etapas intermediárias, igualmente relevantes, devem ser implementadas com bastante cuidado e acurácia, uma vez que seus resultados podem vir a interferir diretamente com a qualidade da detecção final, ou seja, o reconhecimento da presença ou ausência do patógeno. A partir das amostras coletadas dos pacientes, o primeiro procedimento a ser feito é a extração de cadeias de ácidos nucleicos, seja o ribonucleico (RNA) ou o desoxirribonucleico (DNA).

A extração e purificação de DNA genômico são etapas de grande importância em vários protocolos de diagnóstico, na biologia molecular e em análises clínicas e genéticas. Existem diversos métodos que podem ser utilizados para realizar a extração de DNA genômico, desde aqueles baseados no uso de solventes orgânicos até os que envolvem a utilização de adsorventes sólidos, como membranas, partículas e nanopartículas magnéticas (Chacon-Cortes, Griffiths 2014). Em cada caso, a escolha do método mais adequado a ser usado deve ter por base a consideração de fatores como a natureza da amostra a ser analisada, a qualidade e o rendimento da fração de DNA a ser obtida, bem como a disponibilidade de equipamentos e a experiência do operador, além dos custos envolvidos (Chacon-Cortes, Griffiths 2014).

Apesar dos avanços conseguidos nos diferentes métodos de extração, é permanente a necessidade de modificação e aperfeiçoamento de protocolos para que ocorra a redução no tempo de extração, no volume de amostra de partida, e na perda de material durante a manipulação envolvida, além da eliminação da necessidade de uso de reagentes tóxicos como o brometo de etídio e a guanidina, que prejudicam o operador e o meio ambiente. É também de interesse a possibilidade de que as etapas de purificação de DNA venham a ser feitas em pontos primários de atendimentos, especialmente em áreas remotas e mais

pobres (Ramirez-Solis, Rivera-Perez et al. 1992, Tan and Yiap 2009, Ali, Rampazzo et al. 2017).

A extração de DNA pode ser feita a partir de diferentes tipos de amostras biológicas, no entanto sendo o sangue o fluido mais utilizado em diagnósticos e na ciência forense. De uma maneira geral, é requerido que a amostra de partida possua qualidade elevada, ou seja, não contenha contaminantes ou interferentes que comprometam a análise.

O objetivo deste trabalho foi o de aprofundar os estudos para a otimização da extração de DNA a partir de amostras de sangue humano, utilizando os nanocompósitos γ -Fe₂O₃/Qui/Pani e γ -Fe₂O₃/Pani desenvolvidos em nosso laboratório. Para chegar a esse objetivo, tivemos como base os trabalhos anteriores do grupo de Polímeros Não-Convencionais (PNC) que analisaram a síntese e caracterização dos NCMs, assim como os estudos de adsorção em um sistema modelo baseado no uso de soluções aquosas de DNA de esperma de salmão. Como marco de referência para estabelecermos o grau de eficácia, rendimento e pureza do DNA genômico, realizamos um estudo comparativo de nossos resultados com aqueles resultantes do uso de seis kits disponíveis no mercado, e que são baseados na utilização tanto de membranas quanto de partículas.

3.1.1 Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são macromoléculas biológicas formadas por longas sequências de pequenas unidades denominadas como nucleotídeos. Eles se apresentam em duas formas básicas distintas: o ácido desoxirribonucleico (DNA), que tem uma estrutura de cadeia dupla, e o ácido ribonucleico (RNA), que consiste em uma fita simples (Alberts et al. 2018). Essas moléculas são essenciais para os organismos vivos, por serem responsáveis pela transmissão da informação genética e a síntese de proteínas (Brown et al. 2014).

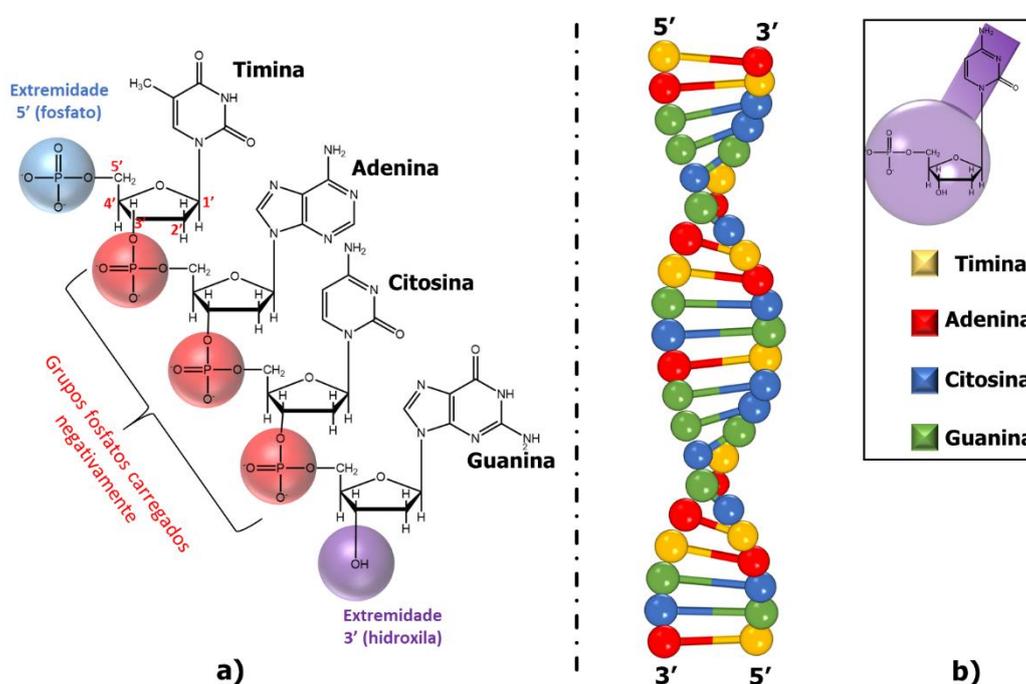
Por sua vez, os nucleotídeos são moléculas que resultam da união de três grupos: fosfato, que confere uma carga negativa à molécula, pentose (monossacarídeo com cinco átomos de carbono), e uma base nitrogenada (Fig. 31a). As bases nitrogenadas, que são moléculas heterocíclicas, podem ser pirimídicas, contendo uma estrutura cíclica (citosina, timina, no caso do DNA, e uracila, no caso do RNA), ou púricas, compostas por dois anéis, como a adenina e a guanina.

Em 1953, com base nos resultados de difração de raios-X obtidos por Rosalind Franklin, James D. Watson e Francis Crick sugeriram que a estrutura da molécula de DNA consistiria em uma dupla hélice. Por essa descoberta, que foi um marco para a

ciência, eles dividiram o Prêmio Nobel de Medicina de 1962 com Maurice Wilkins, colaborador de Franklin.

A estrutura em hélice dupla (Fig. 31b) resulta da especificidade das ligações entre as bases nitrogenadas. A adenina se liga apenas à timina (por duas ligações de hidrogênio), e a guanina com a citosina (por três ligações de hidrogênio). A estabilidade da fita dupla de DNA se deve às múltiplas interações de empilhamento entre os pares de bases e ligações de hidrogênio. Por conta de suas diferentes polaridades, as bases nitrogenadas com características hidrofóbicas ficam posicionadas na parte interior da hélice, enquanto, devido à sua maior hidrofiliicidade, a pentose e o fosfato ocupam a região mais externa (Lehninger Cox 2011).

Figura 31 - Estrutura dos nucleotídeos (a), e representação da cadeia dupla hélice do DNA (b).



Fonte: Schematics Arts (2022)

3.1.1.1 Quantificação da concentração de ácidos nucleicos por espectroscopia UV-Vis

Por ser uma técnica rápida e de relativo baixo custo, a espectroscopia no UV-Vis (que é descrita na Seção 2.2.2.1) é amplamente utilizada para a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre a composição de materiais diversos, inclusive biomoléculas, como ácidos nucleicos e proteínas.

Os ácidos nucleicos apresentam uma banda de absorção centrada no comprimento de onda de 260 nm, que é associada às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis heterocíclicos das bases nitrogenadas. Embora a absorção observada em 260 nm seja o somatório daquelas

envolvendo as diversas bases nitrogenadas, tanto as pirimídicas (citosina, timina) quanto as purínicas (adenina, guanina), é possível diferenciar aquelas que se devem a cadeias de DNA de fitas simples ou duplas, bem como as associadas as cadeias de RNA (Schmid 2001, Medina-Llamas 2015). Para isso, deve ser analisada a absorvância dos nucleotídeos isolados na mesma concentração, pois a absorvância tomada como igual a 1 é observada para uma solução de DNA fita dupla com concentração igual a 50 µg/mL, enquanto esse valor corresponde a concentrações de 33 µg/mL para uma solução de DNA fita simples e de 40 µg/mL para o caso de soluções de RNA. Essas diferenças nas intensidades da absorvância estão relacionadas com o grau de interação das ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou dipolo-dipolo entre as bases nitrogenadas (Medina-Llamas 2015).

Como vimos, independentemente do método de extração utilizado, a qualidade da amostra de partida é essencial para que a extração de DNA seja bem-sucedida. Uma vez que a presença de contaminantes pode ter origens diversas, como aqueles associados a componentes celulares, proteínas, RNA, carboidratos, ou a reagentes utilizados nas etapas de lise, interação e lavagem (como o fenol e sais).

É possível estimar o grau de pureza de uma dada amostra ao avaliar quantitativa e qualitativamente os ácidos nucleicos presentes, pela determinação da intensidade da absorção nos comprimentos de onda de 230 nm, 260 nm, e 280 nm. A pureza de uma amostra pode ser inferida pelo valor da razão das intensidades 260 nm/280 nm ($A_{260/280}$), com o valor aceitável para uma amostra considerada como pura estando no intervalo 1,8 - 2,0. Um valor inferior estaria relacionado à contaminação por proteínas, que absorvem luz em 280 nm, enquanto um valor superior indicaria a presença de RNA (Scientific 2010). Como uma medida auxiliar, pode ser obtida a razão da absorvância 260 nm/230 nm, cujo valor ideal se encontra na faixa de 2,3 - 2,4, com desvios indicando uma possível contaminação por fenol, compostos aromáticos, carboidratos, sais caotrópicos (cloridrato ou tiocianato de guanidina), EDTA, surfactantes, ou partículas sólidas suspensas (Toledo 2017, Toledo 2021).

Uma vez obtida a curva de absorção na região do UV-Vis, e determinado o valor da concentração, é possível calcular o rendimento do DNA extraído da amostra pela relação (Qiagen 2014).

$$\text{Rendimento} = \text{Concentração} * \text{Volume de eluição} \quad (19)$$

3.1.2 Métodos de extração de DNA

A extração de DNA pode ser realizada por diversos métodos, que são geralmente classificados em dois grupos: I) extração líquido-líquido, que inclui o método bastante utilizado, a extração com solventes orgânicos (usualmente fenol e clorofórmio) e II) extração em fase sólida, um procedimento baseado no uso de materiais adsorventes que tenham afinidade pelas cadeias de ácido nucleico.

O método fenol-clorofórmio, o primeiro a ser desenvolvido para a extração de ácidos nucleicos (Barnett and Larson 2012, Sakyi, Kumi et al. 2017), foi bastante usado para a obtenção de amostras de boa qualidade. Todavia, além de demorado, esse procedimento é baseado no uso de solventes orgânicos nocivos ao manipulador. Mesmo quando de alta pureza, esses solventes podem conter interferentes capazes de impedir ou dificultar o uso subsequente de outras técnicas de biologia molecular, como, por exemplo, a amplificação por PCR (Ramirez-Solis, Rivera-Perez et al. 1992, Jakovski, Ajanovska et al. 2015). Outras metodologias também usadas são as de alta concentração de sal (*salting-out*), que atua como agente desnaturante das proteínas, e SDS-proteinase K, usados como reagentes principais para ruptura da membrana celular e precipitação das proteínas, respectivamente (Wang, Hirayasu et al. 1994, Sakyi, Kumi et al. 2017).

A introdução das técnicas de extração de fase sólida permitiu uma redução tanto do tempo de operação quanto da quantidade de interferentes no processo, com a captura do DNA geralmente envolvendo sua adsorção em um substrato sólido. Para isso, inicialmente membranas de sílica eram bastante utilizadas em colunas de centrifugação. Ainda assim, não apenas continuava a existir uma perda de DNA durante as etapas do processamento, como também havia a necessidade de uso de reagentes tóxicos (por exemplo, a guanidina) e de uma centrífuga para possibilitar a extração. A abordagem da extração em fase sólida com a utilização de partículas magnéticas permitiu uma significativa melhoria no processo, como a diminuição da quantidade de solvente a ser usada, uma vez que a separação das partículas se dá pela aplicação de um campo magnético externo (através de um ímã), cartão FTA¹ e, mais recentemente, uso de dispositivos microfluídicos (Gan, Gu et al. 2017, Tang, Yang et al. 2017).

¹ Funciona como um cartão de armazenamento de amostras, onde acontece o processo de ruptura celular, com a proteção do ácido nucleico, até o momento de retirada do papel para purificação e aplicações futuras.

3.1.2.1 Tipos de amostras usadas para a extração de DNA

A extração de DNA pode ser feita a partir de diversos tipos de amostras, como saliva, cabelo, dentes, ossos (Lodha, Ansari et al. 2017), sangue, urina, sêmen (Tobe, Swaran et al. 2017), e tecidos. Como mencionado, essa é uma técnica essencial em diferentes áreas de aplicação, como medicina forense, investigações criminais, genotipagem (Wagner, Flegel et al. 2017), sequenciamento (Al-Shuhaib 2017), e determinação do polimorfismo (Lahiri and Nurnberger Jr 1991).

Apesar das diferenças que podem ser observadas entre os protocolos de extração, a complexidade das amostras requer a adoção de uma mesma sequência de passos essenciais: I) a lise celular, que consiste no rompimento da membrana celular e consequente liberação do DNA, II) a ligação do DNA ao material utilizado, III) a remoção de contaminantes por meio de sucessivas lavagens e, por último, a IV) eluição do DNA, geralmente feita em água livre de nucleases ou pelo uso de uma solução tampão que preserve sua integridade.

O sangue, tecido responsável pelo transporte de oxigênio no organismo, é constituído por uma fase líquida e outra sólida. A fase sólida é caracterizada pela presença dos eritrócitos (células vermelhas), leucócitos (as células brancas, responsáveis pela defesa do organismo), e as plaquetas, que atuam no processo de coagulação sanguínea. Já a fase líquida corresponde ao plasma, uma amostra complexa composta por 90 % de água e 10 % de proteínas, gorduras, sais, minerais e hormônios (Maria Helena L. Souza 2006, Kalendar, Boronnikova et al. 2021). O tecido sanguíneo é a principal fonte de extração de DNA genômico, por conta da significativa quantidade de DNA presente nas células nucleadas (leucócitos) (Jung, Klotzek et al. 2003).

Tanto a qualidade do DNA extraído a partir de amostras de sangue, como o correspondente rendimento, estão relacionados a diversos fatores. Assim, por exemplo, um menor rendimento pode ser causado por uma baixa quantidade de leucócitos ou inadequada duração das etapas de lise ou de ligação, e o tempo de armazenamento (por exemplo, um maior rendimento é obtido a partir de amostras de sangue recentemente coletadas que daquelas obtidas há mais tempo e que sofreram congelamento). Apenas amostras com um padrão mínimo de qualidade tornam possível a realização subsequente de procedimentos como sequenciamento, teste de paternidade, análises forenses, diagnóstico de doenças, entre outros.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Os reagentes agarose, corantes blue/orange e diamond, glicina, proteinase K, Tris-Acetate-EDTA (TAE) 40 X and tris (hidroximetil) aminometano (Tris) foram obtidos da Promega (EUA). Acetato de potássio (CH_3COOK) comprado da Applichem (Alemanha). Persulfato de amônio, quitosana (massa molecular 50.000 - 190.000 e grau de desacetilação 75 - 85 %), cloreto de ferro II tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), dodecil sulfato de sódio foram adquiridos da Sigma (EUA). Os seguintes reagentes foram adquiridos de fornecedores brasileiros: cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Dinâmica), Triton X-100 (Vetec), ácido acético, ácido clorídrico, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), cloreto de sódio (NaCl), e metanol (CH_3OH) (Química Moderna), enquanto a anilina, fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e bibásico (Na_2HPO_4) foram adquiridos da Nuclear. A anilina foi o único dos reagentes adquiridos a ser destilado antes do uso. Em todas as análises, a água utilizada era de alta resistividade e obtida após passagem por um sistema Synergy (Millipore, EUA).

3.2.1.2 Síntese do nanocompósito magnético $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /Qui/Pani

A preparação do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /Qui/Pani foi realizada conforme descrito na Seção 2.2.1.1, com a alteração de que a temperatura de polimerização adotada foi de aproximadamente 5 °C.

3.2.1.3 Condições de coleta, armazenamento da amostra biológica e determinação da concentração e pureza do DNA

Amostras de sangue humano foram obtidas de voluntários e armazenadas em tubos de coleta a vácuo com EDTA, e guardadas sob refrigeração (2 °C – 8 °C). Na etapa de comparação do desempenho dos NCMs com os kits de extração de DNA, a mesma amostra de sangue foi usada em cada caso.

A concentração do DNA extraído foi estimada por espectroscopia no ultravioleta-visível por meio do uso de um espectrofotômetro Nanodrop 2000 C (Thermo Scientific, EUA). A presença das bandas de DNA foi confirmada por meio de experimentos de eletroforese realizadas em uma cuba horizontal K33-15H (Kasvi, Brasil), com o gel de eletroforese sendo submetido ao final do processo a um transiluminador UV MB-16 (Maestrogen, EUA). Por fim, a amostra de DNA obtida foi

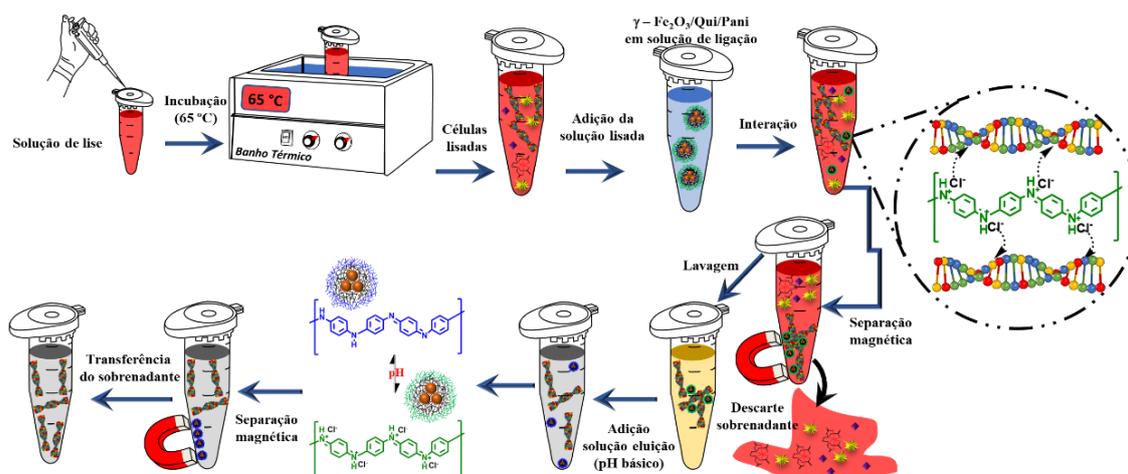
submetida a uma reação em cadeia da polimerase usando o termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA).

3.2.1.4 Protocolo para a extração de DNA de amostras de sangue humano utilizando o nanocompósito magnético $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$

Para realizar a lise, se faz necessário adicionar 5 μL de proteinase K (26 mg/mL) e 500 μL da solução de água/triton X-100 1 % (v/v) a 100 μL de sangue em um microtubo de 2 mL, que é submetido ao vórtex por 15 s e, em seguida, incubado a 65 °C por 10 min em banho-maria (BM100, Yamato Scientific, Japão). Ao final da etapa de lise, a amostra de sangue apresentará uma coloração preta. Após o período de incubação, 1,2 mL da solução de glicina/HCl/NaCl pH 3,3 é inserido no microtubo e o NCM ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$) adicionado, com a interação sendo promovida por contínuas inversões manuais durante 10 min. O NCM é então confinado magneticamente com o auxílio de um ímã, e o sobrenadante descartado (uma etapa que requer cuidado especial, devido à cor escura da solução). Para a remoção de detritos celulares, são realizadas lavagens que consistem em adicionar 900 μL da solução (1 mL de acetato de potássio/Tris/EDTA e 1,7 mL de etanol) ao NCM, agitar o sistema por 30 s no vórtex, e mais uma vez confinar o nanocompósito, retirando o sobrenadante, sendo esse procedimento repetido por quatro vezes no total. Para a eluição do DNA extraído, 100 μL - 200 μL da solução tampão de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, com pH 7,8, devem ser adicionados ao microtubo contendo o NCM, que é então submetido ao vórtex por 15 s e incubado durante 10 min. Finalmente, o NCM é magneticamente separado, e a fração de DNA armazenada em um microtubo limpo. A representação esquemática da metodologia é apresentada na Fig. 32.

No estudo de comparação com o desempenho de kits comerciais, o protocolo recomendado por cada fornecedor foi rigorosamente seguido, como descrito no Apêndice A.

Figura 32 - Esquema representativo do processo de extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue.



Fonte: Schematics Arts (2022)

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Reação em cadeia da polimerase

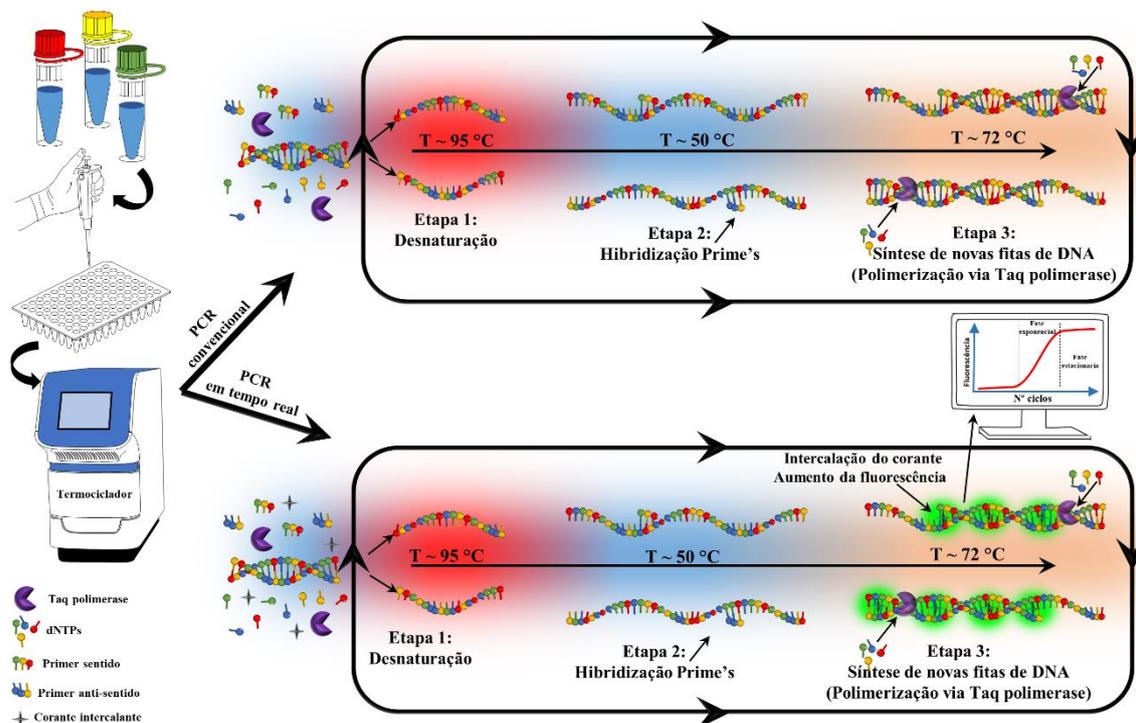
Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica largamente utilizada em biologia molecular por permitir a amplificação de segmentos específicos de uma cadeia de ácidos nucleicos (Mullis 1990). Em 1993, Mullis foi agraciado com o Prêmio Nobel em Química.

A amplificação do material alvo ocorre de maneira exponencial ao longo de sucessivos ciclos de operação. A etapa inicial envolve o aquecimento da amostra a 95 °C, para que haja a desnaturação da fita dupla do DNA. Em seguida ocorre o anelamento (isto é, a hibridização) dos iniciadores, que são um par de oligonucleotídeos sintéticos, chamados de primers – o que acontece entre 40 °C - 60 °C – com as fitas simples obtidas na primeira etapa. Por fim, ocorre a terceira etapa, com a extensão das cadeias sintetizadas a 72 °C por meio da enzima Taq polimerase, que funciona como um catalisador termoestável para a reação. O produto resultante da PCR é denominado amplicon. Como a técnica de PCR é altamente sensível, se faz importante que a etapa inicial da extração de ácidos nucleicos seja realizada corretamente, de modo a fornecer uma suspensão pura da amostra alvo (DNA, RNA) (Bartlett and Stirling 2003).

Na PCR convencional, a amplificação permite a obtenção da informação qualitativa acerca da presença ou ausência da sequência específica alvo da análise. Por sua vez, na PCR em tempo real (qPCR), o processo de amplificação é monitorado continuamente com a concentração da sequência alvo sendo acompanhada pela medida

da fluorescência de um fluoróforo, o que possibilita a quantificação do resultado obtido. Independente do processo adotado, é necessário otimizar as condições para evitar a ocorrência de contaminação cruzada ou a formação de dímeros (O'Connell 2002). Na Fig. 33 estão representados os processos de PCR convencional e em tempo real.

Figura 33 - Representação dos processos de PCR convencional e em tempo real.



Fonte: Silva (2019)

Por sua grande confiabilidade, a técnica de PCR em tempo real representou um avanço significativo para a área. Na qPCR, o sinal fluorescente é detectado em cada um dos cerca de 40 ciclos do processo. A intensidade do sinal de fluorescência de cada poço (ou seja, do microtubo onde a reação é realizada) se correlaciona com a quantidade de material alvo naquele instante.

Na qPCR, a amplificação se dá em quatro etapas. Na fase inicial, denominada linha de base, a mudança no sinal de fluorescência é mínima, uma vez que não existe ainda uma quantidade significativa de amplicons; porém, essa fase é importante por permitir que seja diferenciado o sinal de fluorescência do sinal de fundo. A segunda fase, chamada de exponencial, onde a amplificação máxima acontece, tem sua duração determinada pela concentração e qualidade desejada do alvo. A terceira fase, a linear, ocorre quando a amplificação começa a decair, com a eficiência da reação diminuindo até que seja atingida a quarta e última fase, o platô (Dorak 2007).

O corante sybr green é uma molécula bastante utilizada nos ensaios de PCR em tempo real por conta da facilidade de manuseio, baixo custo, apresentar boa relação sinal-ruído na fluorescência, e demandar a utilização de apenas um par de *primers*. A intensidade de sua fluorescência aumenta cerca de 2.000 vezes quando ele se liga a cadeias de fita dupla de ácido nucleico para formar um complexo DNA - corante (Dorak 2007).

Para monitorar a PCR em tempo real, é necessário o uso de três corantes (moléculas fluorescentes). O corante doador, conhecido como repórter, é monitorado durante o experimento. O segundo corante é a molécula aceitadora e, por fim, um corante de referência é usado para normalizar o sinal dos poços. Desse modo, é necessário dividir a intensidade da fluorescência do corante repórter pelo da referência, e subtrair o valor de fundo (ruído), do que resulta o valor da fluorescência normalizada do corante doador (ΔR_n). De modo geral, o resultado é expresso em um gráfico onde o eixo x corresponde ao número de ciclos, e o eixo y é o logaritmo do ΔR_n (Dorak 2007).

Algumas regras devem ser observadas para a realização de um bom ensaio de PCR em tempo real. Uma delas é a construção de uma curva padrão a partir do uso de concentrações conhecidas do material alvo, seja amplicons, *primers*, RNA ou plasmídeos. Para uma reação ser considerada ideal, isto é, apresentar 100 % de eficiência, é necessário que duas moléculas sejam sintetizadas a partir da desnaturação da cadeia dupla de DNA.

O sucesso do processo de amplificação por PCR pode ser aferido por meio da técnica de eletroforese, que permite avaliar se de fato o material alvo apresenta uma banda única com o tamanho esperado, não havendo a ocorrência de bandas inespecíficas e rastros do material alvo (Bartlett and Stirling 2003).

Em cada reação de PCR em tempo real, foram utilizados 10 μ L da master mix sybr green (solução de sais, os DNTPs (desoxinucleotídeo trifosfatos), e enzima), 1,5 μ L *primer β -actina forward* (10 pmol) CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC e 1,5 μ L *reverse* CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT, 5,5 μ L de água livre de nuclease e, por fim, 1,5 μ L da amostra a ser amplificada. Os reagentes utilizados nesta etapa foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies (EUA). No termociclador StepOnePlus, é feito um aquecimento inicial a 95 °C por vinte segundos, em seguida são realizados 40 ciclos a uma temperatura de 95 °C por 3 s, que é reduzida a 60 °C por trinta segundos. A intensidade da fluorescência correspondente é registrada ao final de cada ciclo de amplificação.

3.2.2.2 Eletroforese

A qualidade do DNA extraído foi estimada através de experimentos de eletroforese e da reação em cadeia da polimerase (PCR), técnicas padrão da biologia molecular.

A eletroforese é uma técnica de separação de macromoléculas que se baseia na migração diferenciada de biomoléculas carregadas que, quando submetidas a um campo elétrico externo, se deslocam na direção de um polo (negativo ou positivo, a depender de sua carga), através de um meio poroso. Embora a eletroforese seja usada desde o começo do século XX, sua forma moderna surgiu em 1937 com o sucesso de Arne Tiselius em obter o fracionamento de proteínas séricas. Em 1949, Linus Pauling e colaboradores realizaram um desenvolvimento importante, o fracionamento da hemoglobina S (Hb S) através da eletroforese em papel filtro. Quando usada no fracionamento de hemoglobinas, proteínas séricas e lipoproteínas, essa técnica demandava 12 a 18 horas para a finalização dos experimentos (Naoum 2010). A eletroforese se tornou um procedimento indispensável para a análise de ácidos nucleicos, por permitir a separação, purificação e determinação do tamanho de cada fragmento (Bartlett and Stirling 2003).

Embora materiais como o gel de amido e o de poliacrilamida tenham sido bastante usados na técnica de eletroforese, eles apresentavam algumas desvantagens. Por exemplo, o gel de amido demanda 15 h de operação e requer o uso de refrigeração. A técnica de eletroforese experimentou grandes avanços com a descoberta do gel de agarose. Seu uso permitiu a análise de diferentes amostras (soro, plasma, hemoglobinas) em um mesmo gel (Jeppson, Laurell et al. 1979).

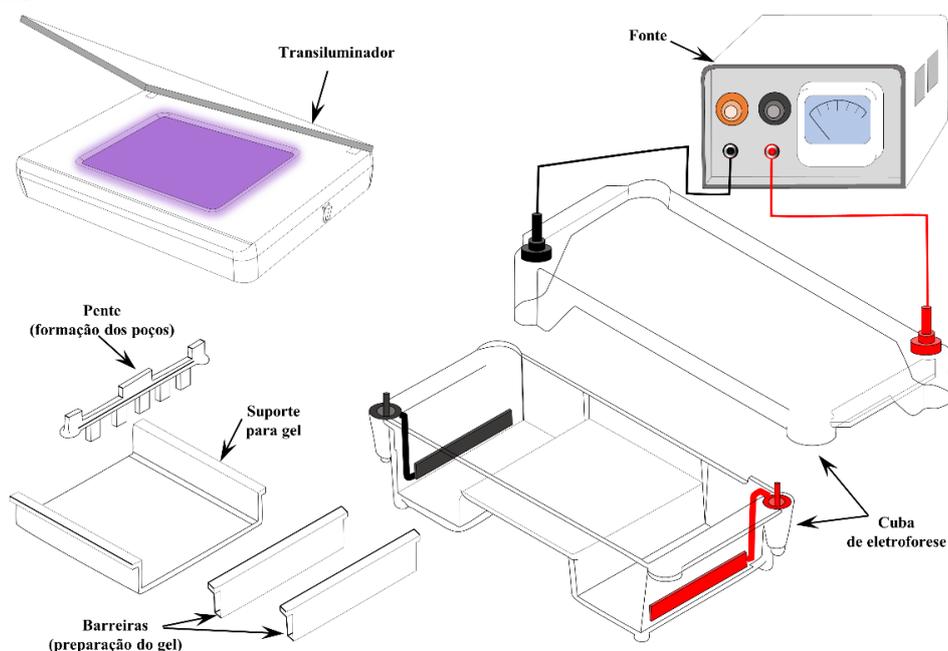
A agarose é um polissacarídeo extraído de algas, e o uso de seu gel permite a separação de DNA em uma ampla faixa (200 - 50.000 pares de base, pb), sendo que, por meio de campos elétricos pulsados, se torna possível separar fragmentos de DNA de até 10 Mpb. A concentração de agarose influencia na porosidade do gel e, conseqüentemente, a concentração a ser utilizada depende do tamanho da molécula que se deseja separar, uma vez que a separação de fragmentos grandes não ocorrerá em uma matriz de poros pequenos. O tamanho da molécula também interfere na mobilidade, com os fragmentos pequenos da molécula se deslocando mais rapidamente (Barril and Nates 2012, Possik 2016).

Deve ser notado que a utilização do gel de poliacrilamida, formado a partir da polimerização da acrilamida e da bis-acrilamida, torna possível separar com alta resolução até mesmo os fragmentos menores de DNA, na faixa de 300 - 500 pb. Contudo,

por ser uma neurotoxina, a acrilamida traz riscos de segurança para o manipulador. Além disso, seu uso demanda a utilização de nucleotídeos marcados, o que torna seu manuseio mais difícil quando comparado com o envolvido no uso do gel de agarose.

A eletroforese pode ser realizada nas configurações horizontal (Fig. 34) ou vertical, que são comumente usadas para DNA e proteínas, respectivamente. Para realizar um experimento de eletroforese se faz necessário um sistema composto por: 1- uma cuba específica, com um eletrodo em cada extremidade, onde uma solução tampão é adicionada para fechar o circuito elétrico, 2- o gel (agarose, poliacrilamida), que é o suporte de fracionamento, 3- a fonte de tensão, e 4- um transiluminador que permite a visualização das bandas (Naoum 2010).

Figura 34 - Equipamentos e acessórios que compõem um sistema de eletroforese de configuração horizontal.



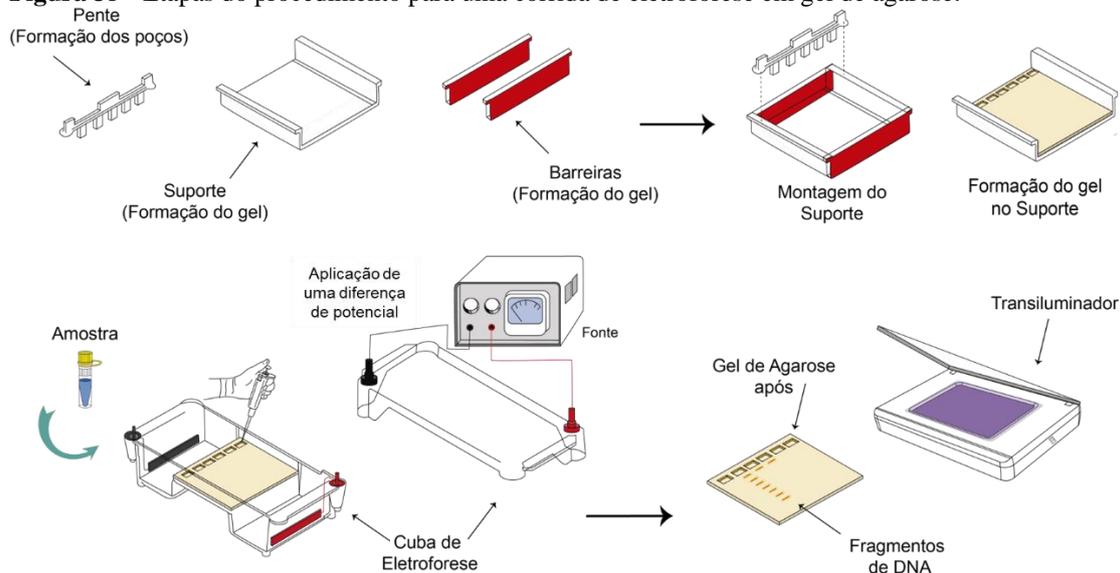
Fonte: Silva (2019)

Além desse sistema, são necessários alguns materiais como a solução tampão, um corante marcador e um corante que confira densidade à amostra, de modo a garantir que ela entre no poço (isto é, a cavidade formada no gel) e ali permaneça. As soluções tampões mais utilizadas são Tris Acetato EDTA (TAE) e Tris Borato EDTA (TBE). A escolha de qual tampão usar depende do tamanho dos fragmentos que se pretende separar e identificar. Independente da solução tampão escolhida, é necessário que ela seja adicionada na quantidade correta, pois, se usada de maneira insuficiente poderá haver o ressecamento do gel, e em caso de excesso, haverá uma redução no valor da corrente.

Um corante marcador fluorescente geralmente é adicionado ao gel durante seu preparo. Esses marcadores, como, por exemplo, brometo de etídio, sybr green, sybr safe, gelred, e diamond, são também conhecidos como intercalantes, uma vez que se ligam entre as bases nitrogenadas das cadeias de DNA, o que leva a um aumento na intensidade de fluorescência. O outro corante a ser utilizado (por exemplo, o blue orange) deve proporcionar densidade à amostra de DNA, de forma a garantir que ela entre no poço, permitindo assim o monitoramento da eletroforese.

O procedimento de eletroforese em gel é realizado em quatro etapas (Fig. 35): preparação do gel, inserção da amostra, a corrida eletroforética e a visualização do resultado. A comparação do tamanho dos fragmentos se faz pelo uso de uma amostra padrão que contém diferentes tamanhos conhecidos de fragmentos.

Figura 35 - Etapas do procedimento para uma corrida de eletroforese em gel de agarose.



Fonte: Ratkosvik (2020)

Nos experimentos de eletroforese, a formação do gel foi obtida pela mistura de 1 g de agarose com 100 mL de TAE 0,5 X, que foi ao micro-ondas por 1 min. Após a solução esfriar (cuidado deve ser tomado para que não ocorra a gelificação), 10 μ L do corante *diamond* é adicionado, com a solução sendo então transferida para o recipiente onde o gel será acomodado. Após a gelificação, o gel de agarose formado é transferido para a cuba de eletroforese e recoberto com uma solução de TAE 0,5X. Na adição da amostra, são usados 2 μ L do corante *blue orange* e 8 μ L do DNA extraído em cada poço. A princípio, uma tensão de 60 V é aplicada até que ocorra a saída da amostra do poço, quando então ela é aumentada para 100 V.

3.2.2.3 Otimização da extração de DNA utilizando os NCMs γ -Fe₂O₃/Pani e γ -Fe₂O₃/Qui/Pani

A eluição do DNA capturado foi realizada pelo uso de diferentes soluções tampão, que apresentam distintos valores de pH. O objetivo dessa análise foi o de verificar a eficácia de liberação do DNA mediante o uso de pHs básico para proporcionar a desprotonação das cadeias de Pani. De posse dos resultados de eluição com as diversas soluções trabalhadas, buscamos examinar se todo o DNA capturado teria sido desorvido com apenas um processo de eluição, e se o volume de solução utilizado fora suficiente. Para isso, utilizamos três volumes distintos de solução tampão (100, 150 e 200 μ L) e três processos consecutivos de eluição.

Para melhor examinar a eficiência dos NCMs γ -Fe₂O₃/Qui/Pani e γ -Fe₂O₃/Pani na extração de DNA a partir de amostras de sangue humano, realizamos análises usando diferentes quantidades (4, 8, 12 e 16 mg) de cada um dos nanocompósitos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Otimização do processo de extração do DNA de amostras de sangue humano através do uso dos NCMs

Em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do DF-UFPE, foram estabelecidas as melhores condições para o uso de NCM de natureza polimérica para a extração de DNA dissolvido em meio aquoso. No presente trabalho, esses NCMs foram usados para a extração de DNA genômico de amostras biológicas complexas, como o sangue humano (Seção 3.2.1.4).

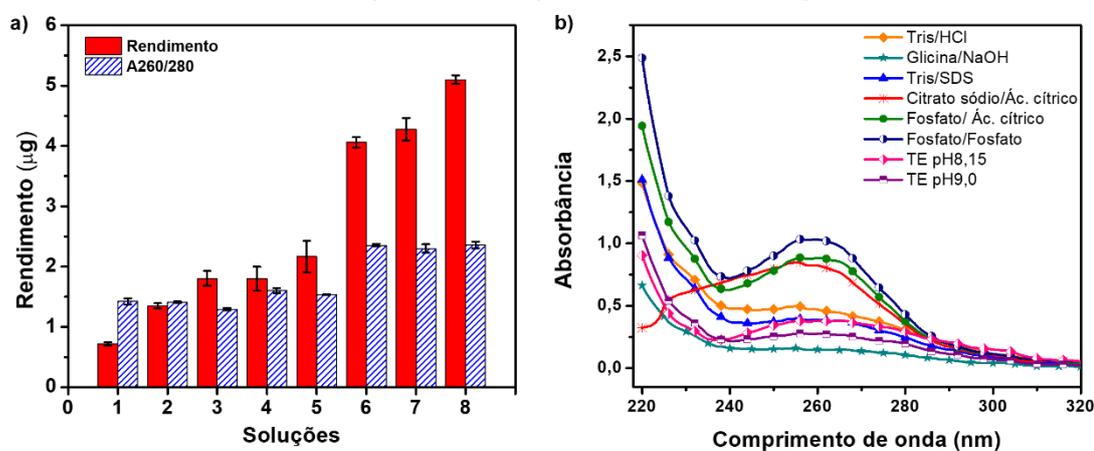
Tendo em vista a complexidade da amostra, na primeira etapa do processo de extração foi usada uma solução de Triton 1 % com proteinase K, para promover a ruptura da membrana celular e degradação de proteínas a uma temperatura de 65 °C. Ao final dessa fase, uma cor preta no sangue lisado atesta a eficiência desse processo (comparativamente, uma cor verde-escura é obtida em outras metodologias). Uma solução de glicina/HCl/NaCl é usada na etapa de extração do DNA para facilitar a interação entre as partículas do NCM e as cadeias do DNA, com o sal sendo adicionado para favorecer a precipitação de proteínas. O procedimento de lavagem é feito para a remoção dos restos celulares, enquanto etanol é adicionado para promover a precipitação do DNA que é liberado pela interação com a solução de fosfato/fosfato pH 7,8.

3.3.1.1 Eluição

Seguindo o procedimento descrito na Seção 3.2.2.3, testamos diversas soluções-tampão, com diferentes pHs, para descobrir qual a melhor a ser usada na eluição do DNA extraído: 1- glicina/NaOH pH 8,9; 2- Tris/HCl/0,5 mmol L⁻¹ EDTA pH 9,0; 3- Tris/HCl/1 mmol L⁻¹ EDTA pH 8,0; 4- Tris/SDS pH 8,0; 5- Tris/HCl pH 8,0; 6- Citrato de sódio/Ác. cítrico pH 6,6; 7- Na₂HPO₄/Ác. cítrico pH 7,1; e 8- fosfato monobásico e bibásico (NaHPO₄/Na₂HPO₄) pH 7,8.

Nessas análises, foram utilizados 4 mg do NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani, para um volume de 100 μ L de cada solução de eluição. Como mostrado na Fig. 36a, dentre as soluções avaliadas, as de número 6 a 8 foram aquelas a apresentar o melhor rendimento. Contudo, quando analisada a absorção no comprimento de onda de 260 nm (Fig. 36b), a solução citrato de sódio/ácido cítrico pH 6,6 exibe uma banda larga para comprimentos de ondas menores, o que provavelmente se deve à presença de interferentes na amostra. Em relação à razão 260/280, um indicativo da qualidade da amostra, ela é inferior a 1,8 para as soluções 1 a 5, possivelmente devido ao teor de proteínas ainda presentes. Já para as soluções de 6 a 8, essa razão está um pouco maior que o desejável (em torno de 2,3, quando o limite superior esperado é 2,0). No entanto, esses valores da razão 260/280 podem ser ainda ajustados em otimizações futuras. Diante disso, nos experimentos seguintes de extração de DNA de amostras de sangue, a solução utilizada foi a de número oito (NaHPO₄/Na₂HPO₄ pH 7,8), aquela que apresentou melhor rendimento.

Figura 36 - Dessorção do DNA a partir de amostra de sangue humano usando o NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani para as soluções: 1- glicina/NaOH pH 8,9; 2- Tris/HCl/0,5 mmol L⁻¹ EDTA pH 9,0; 3- Tris/HCl/1 mmol L⁻¹ EDTA pH 8,0; 4- Tris/SDS pH 8,0; 5- Tris/HCl pH 8,0; 6- Citrato de sódio/Ác. cítrico pH 6,6; 7- Na₂HPO₄/Ác. cítrico pH 7,1; e 8- fosfato monobásico/bibásico pH 7,8 (a), e espectros UV-Vis das soluções analisadas (b).



Fonte: A autora (2022)

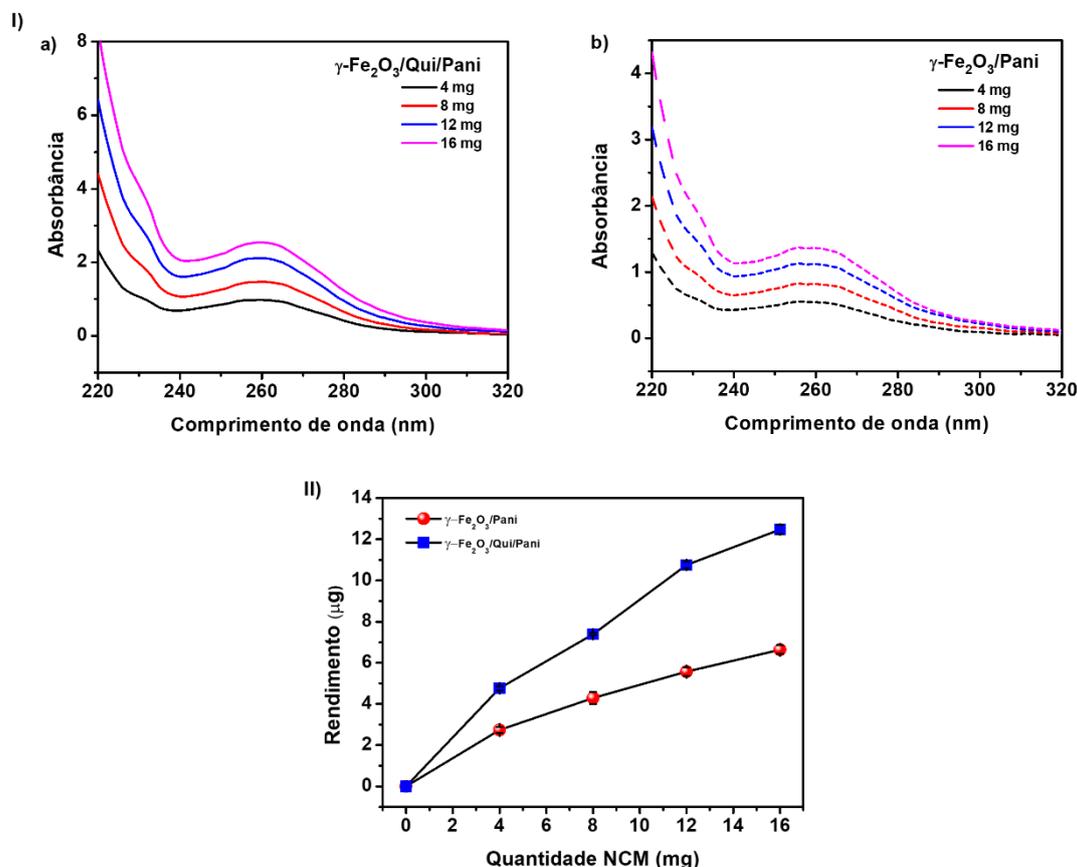
Uma vez encontrada a melhor solução para promover a eluição do DNA, em seguida avaliamos a quantidade de material a ser utilizado.

3.3.1.2 Determinação da quantidade mais adequada de nanocompósito a ser utilizada

Como parte da investigação do desempenho dos NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$, examinamos como o rendimento da fração de DNA obtido seria afetado pelo uso de diferentes quantidades desses nanocompósitos.

Os espectros UV-Vis correspondentes são mostrados na Fig. 37. Como pode ser observado na Fig. 37-I, para os dois materiais, quando uma quantidade de nanocompósito entre 4 e 16 mg é usada, a banda de absorção está centrada em 260 nm, característica da presença de DNA. Por sua vez, o rendimento aumenta substancialmente quando a quantidade de nanocompósito usada se torna maior (Fig. 37-II). Ao usarmos 4 mg do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$, o rendimento obtido é de $(2,74 \pm 0,14)$ μg de DNA, um valor que passa para $(6,64 \pm 0,20)$ μg quando 16 mg são utilizados. Para quantidades semelhantes do NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, o rendimento passa de $(4,76 \pm 0,10)$ μg para $(12,47 \pm 0,22)$ μg . Esse resultado é um indicativo de que o uso de dois materiais que contém cargas positivas (nesse caso grupos amins), como quitosana e polianilina, levou a uma maior extração de DNA. Diante desses resultados, adotamos o valor de 16 mg para a quantidade de NCM a ser usada nos experimentos seguintes.

Figura 37 - I) Espectros UV-Vis para adsorção de DNA em função da quantidade utilizada de NCM γ - Fe_2O_3 /Qui/Pani (a), e γ - Fe_2O_3 /Pani (b), II) Rendimento dos materiais γ - Fe_2O_3 /Pani (círculo) e γ - Fe_2O_3 /Qui/Pani (quadrado).

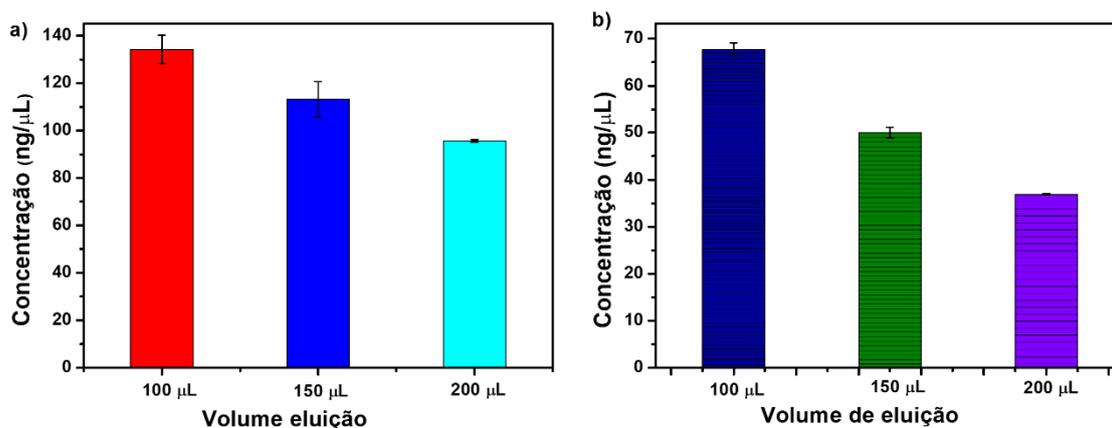


Fonte: A autora (2022)

3.3.1.3 Volume de eluição

Na análise do processo de eluição, examinamos como a quantidade de solução tampão utilizada (100, 150 e 200 μL) estaria relacionada com a variação da concentração e do rendimento de DNA obtido. Ao analisar a Fig. 38, verificamos que com o aumento do volume da solução tampão de 100 para 200 μL ocorre a diminuição da concentração de DNA, de 134 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para 96 $\text{ng}/\mu\text{L}$ quando usado o NCM γ - Fe_2O_3 /Qui/Pani. Entretanto, com relação ao rendimento total, observamos um acréscimo de 13 μg para 19 μg no intervalo analisado (100 - 200 μL), um resultado esperado, uma vez que quando é utilizado um maior volume de solução tampão mais íons se fazem disponíveis para a troca iônica.

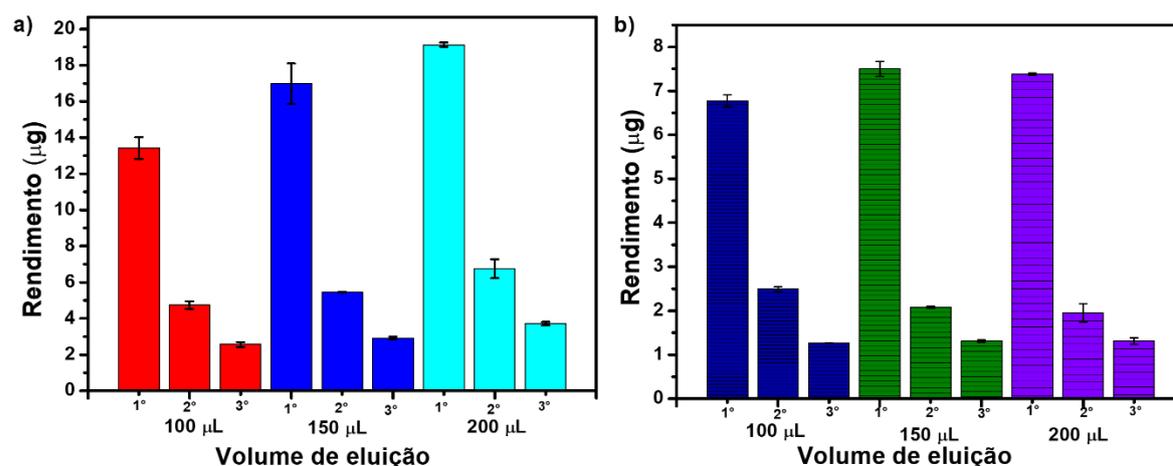
Figura 38 - Comparação do volume de eluição em relação a concentração de DNA para os NCMs γ -Fe₂O₃/Qui/Pani (a), e γ -Fe₂O₃/Pani (b).



Fonte: A autora (2022)

A seguir, para cada um dos dois NCMs, realizamos experimentos em que o rendimento do DNA extraído era progressivamente aumentado pela implementação de três eluições sucessivas, cada uma delas usando o mesmo volume inicial de solução. Essas eluições múltiplas foram realizadas para diferentes volumes iniciais da solução de eluição (100 μ L, 150 μ L e 200 μ L). Como mostrado na Fig. 39, em cada caso a primeira eluição resulta em maior liberação de DNA, com uma progressiva redução sendo observada nas eluições seguintes. Para o NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani, utilizando 100 μ L da solução de eluição (NaHPO₄/Na₂HPO₄ pH 7,8), o rendimento em cada eluição corresponde a 13,4 μ g, 4,7 μ g e 2,6 μ g, respectivamente. Esse resultado indica que quando realizado apenas uma etapa de eluição não se faz possível liberar todo o DNA adsorvido pelo NCM γ -Fe₂O₃/Qui/Pani, de modo que se torna desejável a realização de sucessivas eluições. Em relação ao rendimento total, com 100 μ L de solução de eluição obtivemos 20,7 μ g de DNA, porém ao utilizar 200 μ L de solução há um acréscimo de 8,8 μ g de DNA, totalizando o rendimento em 29,6 μ g. Desse modo, para protocolos em que se deseja uma maior quantidade de DNA, o volume da solução tampão pode ser aumentado. Já para o NCM γ -Fe₂O₃/Pani (Fig.39b), não há diferença no rendimento geral, que se mantém em torno de 10,5 μ g para os três volumes analisados (100 μ L, 150 μ L e 200 μ L).

Figura 39 - Rendimento de DNA extraído usando os NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ (a), e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ (b) para eluições sucessivas.



Fonte: A autora (2022)

Como conclusão, esses experimentos permitiram estabelecer que se faz possível aumentar o rendimento final do processo de extração pela realização de múltiplas eluições sucessivas.

3.3.2 Estudo comparativo do rendimento dos nanocompósitos magnéticos e de kits comerciais na extração do DNA de amostras de sangue

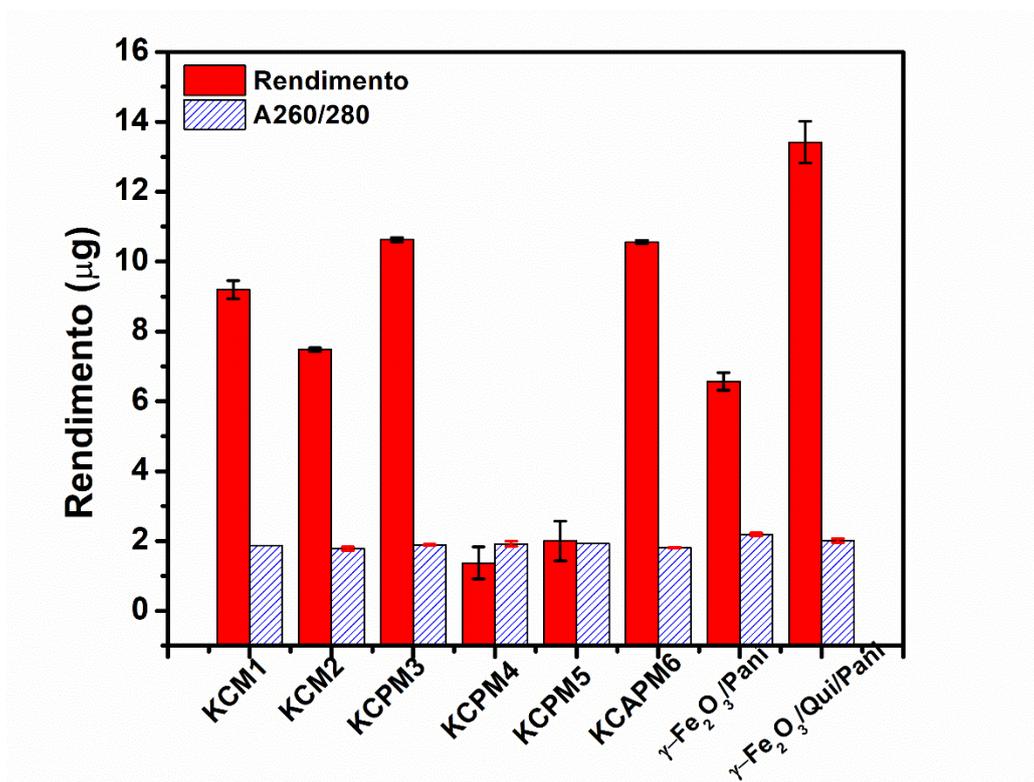
O rendimento obtido pela utilização dos NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ na extração de DNA de amostras de sangue humano foi comparado ao obtido com o uso de seis diferentes kits comerciais (KC) que foram denominados de acordo com o tipo de adsorvente utilizado, isto é, M para membrana, PM para partículas magnéticas e APM para o caso de um kit de processo automático que faz uso de PM. No decorrer do texto, são usadas as seguintes abreviações: KCM1, KCM2, KCPM3, KCPM4, KCPM5 e KCAPM6.

Dois desses kits (KCM1 e KCM2) correspondem a membranas usadas em colunas de centrifugação, enquanto os demais são baseadas no uso de partículas magnéticas, sendo que o KCAPM6 é usado em um processo de extração automática. Em cada caso, a mesma amostra de partida do sangue coletado foi usada, e o protocolo recomendado por cada kit comercial foi rigorosamente seguido. O mesmo volume de eluição (100 µL) foi usado em todas as extrações.

Os resultados obtidos para o rendimento e a razão 260/280 nesse estudo comparativo são mostrados na Fig. 40. Ao analisar os dados, observa-se que os NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ apresentam rendimento de 13 µg e 6,6 µg, um valor

competitivo com o dos kits KCM1 (9 µg), KCM2 (7,5 µg), KCPM3 e KCAPM6 (10,5 µg), enquanto os kits KCPM4 e KCPM5 apresentam menor rendimento (1,5 µg e 2,0 µg, respectivamente). Como mencionado anteriormente, o valor aceitável para a razão de absorvância 260/280 é na faixa 1,8 - 2,0. Na Fig. 40, é possível observar que os resultados são satisfatórios para todos os adsorventes examinados neste trabalho.

Figura 40 - Rendimento e pureza de DNA genômico extraído de sangue humano por diversos adsorventes de fase sólida.



Fonte: A autora (2022)

Algumas observações importantes devem ser ressaltadas: a) entre as vantagens comparativas do uso de materiais magnéticos está o fato de dispensar a utilização de micro centrífuga, o que facilita a análise em instalações com menos recursos, b) os kits de extração KCM2 e KCPM4 demandam o uso de compostos altamente tóxicos, como cloridrato e tiocianato de guanidina, e c) no kit KCPM5, o protocolo não é descrito de maneira clara e objetiva.

3.3.2.1 Análises de biologia molecular (qPCR e eletroforese)

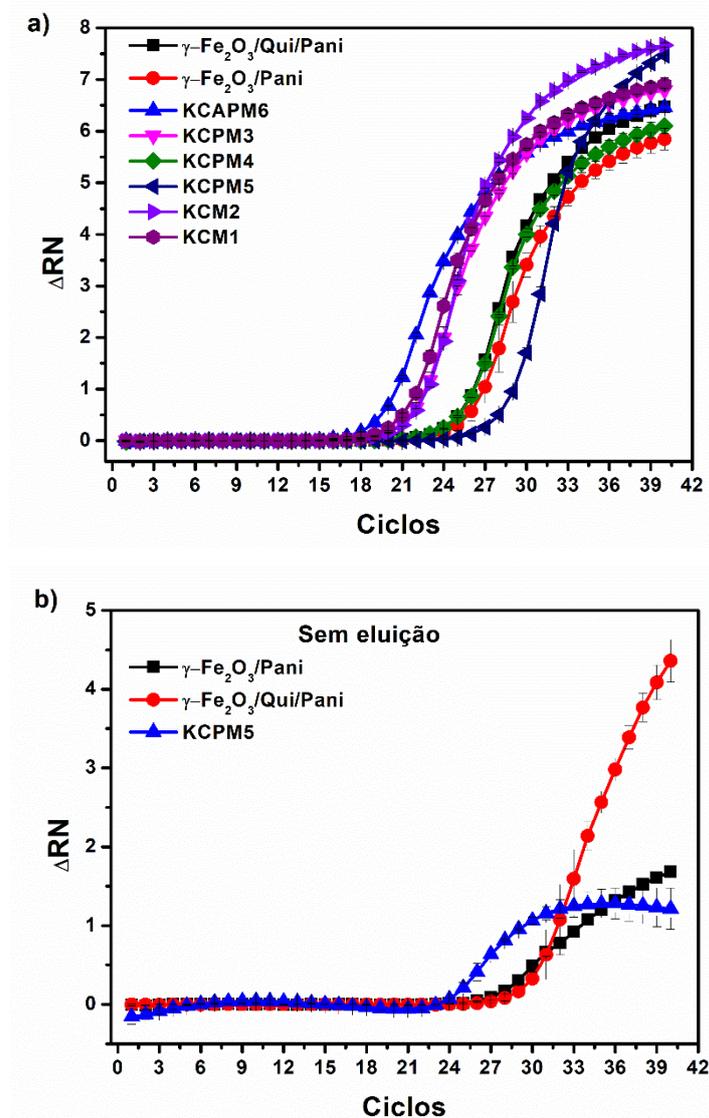
Um protocolo eficiente de extração de DNA deve resultar em um rendimento satisfatório de DNA com a qualidade adequada para uso em outros procedimentos de biologia molecular, como sequenciamento genético ou testes de diagnóstico. De modo a

avaliar a integridade da fração de DNA extraído por cada um dos métodos investigados, o material obtido em cada caso foi submetido a experimentos de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e de eletroforese. A reação em cadeia da polimerase apresenta alta sensibilidade e o excesso de alguns reagentes usados durante os procedimentos de extração e purificação, como solventes orgânicos e sais caotrópicos, pode chegar a inibir a amplificação (Gan, Gu et al. 2017). Assim, uma amplificação bem-sucedida pode servir de indicativo da boa qualidade do material extraído. Portanto, verificamos a qualidade de dois tipos de amostras: i) aquelas consistindo no DNA eluído em solução tampão após o processo de extração e purificação (Seção 3.2.2.3), e ii) aquela em que foi adicionada uma pequena quantidade do NCM ainda com o DNA adsorvido (isto é, sem que houvesse uma prévia eluição).

Na Fig. 41a são mostradas as curvas de amplificação para experimentos qPCR realizados com amostras eluídas obtidas pelo uso dos NCMs e dos kits comerciais. Como pode ser observado, a fase exponencial de amplificação teve início a partir do 20º ciclo para o kit KCAPM6, e 21º ciclo para o caso dos kits KCM1, KCM2 e KCPM3, no caso dos NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$, KCPM4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, ocorreu no 24º ciclo. Para o kit KCPM5, essa fase só se inicia no 27º ciclo. Esse comportamento distinto está relacionado com a quantidade e qualidade inicial de DNA introduzido, o que é consistente com o fato de que o kit KCPM5 apresenta o menor rendimento (2 μg).

Um experimento adicional de amplificação PCR (Fig. 41b) foi realizado com os NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ e o kit KCPM5, pelo uso direto de uma pequena quantidade do material adsorvente contendo o DNA capturado (isto é, sem que houvesse sido realizada uma eluição prévia). Nesse caso, observamos que o início da amplificação ocorre a partir do 24º ciclo, no caso do kit comercial, e do 29º, para os NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$. No entanto, para o kit e o nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$, a fase exponencial é pequena (poucos ciclos), o que possivelmente se deve à quantidade de material adicionado. Já para o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, a reação ainda está na fase exponencial; nesse caso, provavelmente devido à maior quantidade de DNA adsorvido, os reagentes não foram inteiramente consumidos, tornando necessária a realização de um número adicional de ciclos. Contudo, o importante a ser ressaltado é que esse tipo de protocolo, em que a eluição é dispensada resulta na diminuição do tempo total demandado para a extração, não interfere na qualidade da reação. Esse procedimento não pode ser implementado para adsorventes que estejam na forma de membranas.

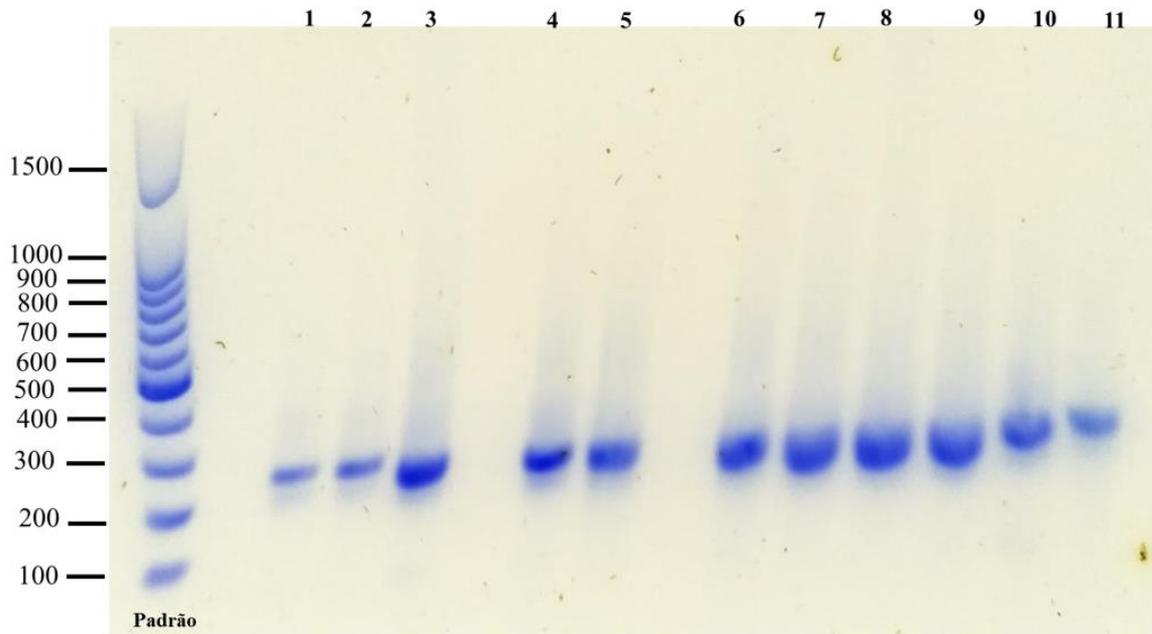
Figura 41 - Curvas de amplificação PCR em tempo real para amostras de DNA obtidas a partir de sangue humano com vários adsorventes de fase sólida (a), e sem realizar eluição (b).



Fonte: A autora (2022)

A qualidade dos amplicons após a reação de PCR e a distribuição de seus tamanhos foram estimadas em experimentos de eletroforese (Seção 3.2.2.2). Na Fig. 42, é possível observar a presença de uma banda nítida com tamanho aproximado de 300 pares de bases, que corresponde ao *primer* utilizado. Assim, o DNA extraído com os NCMs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ e com os kits comerciais possuem a qualidade requerida para aplicação em técnicas de biologia molecular.

Figura 42 - Eletroforese após PCR das amostras sem eluição $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ (1), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ (2), KCPM5 (3), amostras eluídas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ (4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ (5), KCM1 (6), KCM2 (7), KCAPM6 (8), KCPM3 (9), KCPM4 (10), KCPM5 (11).



Fonte: A autora (2022)

3.4 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi possível otimizar o protocolo de aplicação dos nanocompósitos magnéticos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ para a extração de DNA a partir do sangue humano, uma amostra de natureza complexa. Com isso, obtivemos a redução do tempo de análise, principalmente quando o NCM é adicionado diretamente na reação de PCR, isso é, sem que se faça a eluição prévia. É importante ressaltar que não utilizamos agentes desnaturantes como fenol e guanidina, e que na eletroforese não usamos brometo de etídio. Os resultados obtidos mostram claramente que o uso dos nanocompósitos magnéticos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ se mostra competitivo com relação a kits comercialmente disponíveis para a extração de DNA de amostras de sangue humano, resultando em uma boa quantidade de DNA com qualidade e integridade para uso em procedimentos subsequentes de biologia molecular.

4 LÂMINAS DE VIDRO RECOBERTAS COM NPS Au COMO PLATAFORMAS DE SENSORIAMENTO PARA LEISHMANIA VISCERAL

4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Dentre os diversos materiais que podem ser utilizados como suporte para a formação de estruturas e filmes, merece destaque o uso de substratos de vidro funcionalizados pela adição de grupos funcionais (como silanos e amins) em sua superfície. Neste trabalho, examinamos o uso de lâminas de vidros como substrato para a obtenção de uma plataforma de sensoriamento de baixo custo. Esses substratos são transparentes, o que torna possível a detecção de materiais biológicos pelo uso de técnicas espectroscópicas e por medidas de ressonância de plásmon (Doron-Mor, Barkay et al. 2004, Wang and Tang 2013), permitindo seu uso em metodologias diversas e para o sensoriamento de DNA, por exemplo.

De uma maneira geral, nanopartículas metálicas apresentam propriedades distintas daquelas exibidas por amostras *bulk* do mesmo material. O ouro, a prata, e o cobre são os metais mais utilizados na forma de nanopartículas como plataformas de sensoriamento, por suas propriedades ópticas especiais que permitem a utilização de técnicas como a Ressonância de Plásmon de Superfície (SPR), o Espalhamento Raman intensificado por Superfície (SERS), e Resposta Óptica Não-Linear (NLO). Por exemplo, através da análise da posição, largura e intensidade da banda de absorção da ressonância de plásmon de superfície é possível estimar a estrutura, tamanho, e estado de agregação das NPs Au (Liu, Atwater et al. 2007).

O método criado por Turkevich (Balasubramanian, Yang et al. 2010), que consiste na redução do ácido cloroáurico e sua estabilização por meio do citrato, é um dos mais usados para a síntese de nanopartículas de ouro. Uma vez obtidas as nanopartículas por meio da redução química, ocorre sua nucleação, com o crescimento *in situ* de nanopartículas esféricas com coloração vermelha (Zhao, Li et al. 2013).

Usualmente, as plataformas de biosensoriamento se baseiam na imobilização de biomoléculas específicas, como sondas de DNA, proteínas, anticorpos, e aptâmeros, para fazer o reconhecimento e detecção do analito alvo. Nos últimos anos, diversas técnicas de imobilização foram desenvolvidas com base na exploração da ação de três mecanismos possíveis (Nimse, Song et al. 2014): a) Adsorção física, que é um método simples baseado na interação eletrostática entre uma superfície eletricamente positiva e um alvo que possui cargas negativas, ou vice-versa, b) Imobilização covalente, que pode ocorrer através de

ligação covalente ou quimisorção, exemplo importante a interação tiol-metal, que se deve à forte afinidade do átomo de enxofre por metais nobres, como ouro, prata e cobre, e, por fim, a interação c) Biotina-estreptavidina, onde a biotina primeiramente é inserida usando um agente reticulador, e depois adicionada a estreptavidina (Nimse, Song et al. 2014).

O sensoriamento de DNA consiste na imobilização em um substrato de uma sonda (oligonucleotídeos) com uma sequência de DNA específica do patógeno de interesse, sendo a seguir realizado o processo de hibridização, que consiste no reconhecimento da sequência complementar. Diante disso, é importante ressaltar que é possível adaptar a metodologia a detecção de diferentes doenças mediante a mudança apropriada da sequência dos oligonucleotídeos.

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) afetam um número significativo de pessoas com baixa renda, com pouco ou nenhum acesso a serviços de saúde e que moram em áreas rurais ou favelas. Por essas razões, são mínimos os investimentos em pesquisa de fármacos, diagnóstico e tratamento de DTNs (Rosário, de Oliveira et al. 2017). Entre as DTNs estão enfermidades como dengue, doença de chagas, filariose linfática (elefantíase), esquistossomose, leishmaniose, hanseníase, raiva humana, escabiose (sarna), oncocercose ("cegueira dos rios"), malária, entre outras ((OPAS) 2022, Meurer and Coimbra 2022).

No presente trabalho, utilizamos sondas específicas para a leishmaniose visceral. A transmissão da leishmaniose se dá pela picada de insetos chamados flebotomíneos, conhecidos como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros nomes, a depender da região. Quando contaminados pelos parasitas *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, ou *Leishmania amazonensis*, esses insetos transmitem a leishmaniose tegumentar, doença que pode se manifestar de maneira cutânea ou nas mucosas. Por sua vez, quando contaminados com *Leishmania chagasi*, transmitem a leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, a forma mais grave da doença, que leva à morte mais de 90 % dos pacientes não tratados. A leishmaniose visceral tem como sintomas febre de longa duração, perda de peso, astenia, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e do baço), anemia, dentre outras manifestações (Brasil 2006, Brasil 2019).

Para o tratamento da doença seja bem-sucedido, é de suma importância que seu diagnóstico seja realizado com prontidão. O diagnóstico pode ser feito através de exames imunológicos (mais conhecidos como sorológicos), parasitológicos e moleculares. Os testes sorológicos são realizados após a coleta de sangue, com a análise podendo ser feita através de Imunofluorescência Indireta (IFI) ou ensaios imunoenzimáticos, dos quais

ELISA é o mais conhecido. Por sua vez, enquanto o teste parasitológico é realizado após punção aspirativa da medula óssea, no teste molecular a detecção ocorre pelo uso de uma reação em cadeia da polimerase (Brasil 2006).

Entre 2001 e 2020, foram notificados 68 mil casos de leishmaniose visceral em treze países. Apenas em 2020, mais de 39,7 mil casos de leishmaniose cutânea e mucosa ocorreram na América Latina e no Caribe ((OPAS) 2022).

Infelizmente, com as crises sanitária, econômica e social associadas à pandemia da covid-19, o diagnóstico e tratamento de doenças que já eram esquecidas tiveram seus desafios em muito aumentados (Negligenciadas 2021)

A proposta inicial deste trabalho foi preparar um substrato de vidro, por meio de sua limpeza e posterior funcionalização com grupos tios e aminos, para que seja possível a formação de um filme de nanopartículas de ouro, e depois realizar as caracterizações necessárias. A segunda etapa do trabalho corresponde ao uso desse substrato modificado para a imobilização de sondas tioladas de DNA do parasita *Leishmania chagasi*, causador da leishmaniose visceral, e sua hibridização com a sonda complementar. O objetivo final do trabalho seria a obtenção de uma plataforma de sensoriamento em que a interação entre a plataforma e os oligonucleotídeos seja acompanhada por espectroscopia de fluorescência e UV-vis.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Cloreto de ouro III hidratado (HAuCl_4), (3-aminopropil) trietoxissilano (APTS), (3-mercaptopropil) trimetoxissilano (MPTS) obtidos através da Sigma (EUA). Ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), acetona, etanol, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), cloreto de sódio (NaCl), e tolueno foram provenientes da Química Moderna (Brasil). As lâminas de microscopia de 26 mm x 76 mm foram adquiridas da Kasvi (Brasil), o Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) e água livre de nucleases da Promega (EUA), o citrato de sódio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), da Nuclear (Brasil) e, por fim, o Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), da Thermo Fisher Scientific (EUA).

A sequência de oligonucleotídeos de imobilização trabalhada foi adquirida da Integrated DNA Technologies (IDT, EUA) 5'-SH-(CH_2)₆-TTA CAC CAA CCC CCA GTT TC/3Cy5/3' (ssDNA-SH) marcada com o fluoróforo cianidina. Enquanto os oligonucleotídeos marcadas com o fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) usados na

etapa de hibridização são da Thermo Fisher Scientific (EUA). A molécula alvo abreviada como (C-ssDNA-FAM) tem a sequência 5'FAM-GAA ACT GGG GGT TGG TGT AA-3' e a molécula não-alvo (NC-ssDNA-FAM) apresenta a sequência é 5'FAM-GCC TGG ATA TAA ACG TAC ATG-3'. Nos experimentos correspondentes, usamos água deionizada obtida através de um sistema de purificação Synergy (Millipore, EUA).

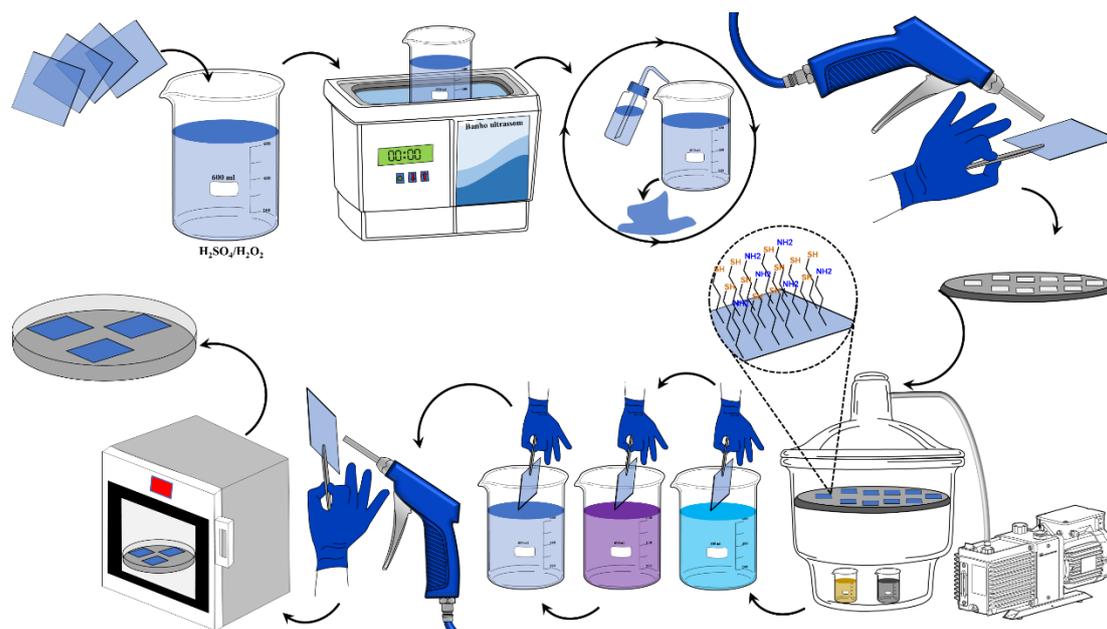
4.2.1.1 Preparação dos substratos de vidro

Inicialmente, as lâminas de microscopia foram cortadas em tiras com dimensões de 1,0 cm x 2,5 cm. Para eliminar a sujeira e presença de matéria orgânica das lâminas, adotamos um procedimento de limpeza com base no uso de solução piranha, peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico P.A. (H_2O_2/H_2SO_4), na proporção 1:2. Quando a solução atinge a temperatura ambiente, o béquer com as lâminas é colocado em um banho ultrassom (USC 1450, Unique, Brasil) durante uma hora. Após esse tempo, as lâminas são lavadas com água deionizada até que o pH se torne igual ao da água utilizada. Em seguida, as lâminas são colocadas no ultrassom por 10 minutos para cada etapa, isto é, duas vezes com água deionizada, uma vez com etanol, e em seguida com acetona, sendo por fim as lâminas secas com jato de ar.

4.2.1.2 Processo de funcionalização das lâminas

O procedimento de funcionalização foi feito por fase vapor, usando um dessecador contendo dois béqueres, cada um com 1 mL de MPTS e 1 mL APTS. As lâminas são colocadas em um suporte dentro do dessecador e, em seguida, a bomba de vácuo é ligada por um período de 120 min ou 240 min, tempo necessário para a deposição ocorrer de forma uniforme e homogênea. Após a funcionalização, as lâminas são lavadas uma por uma em tolueno, etanol e água, sendo logo depois secas com jato de ar e colocadas na estufa na temperatura de 110 °C, por 15 minutos. Na Fig. 43, o protocolo adotado para a funcionalização da superfície das lâminas de vidro é apresentado de forma esquemática.

Figura 43 - Representação esquemática das principais etapas de limpeza e funcionalização via fase-vapor dos substratos de vidro.



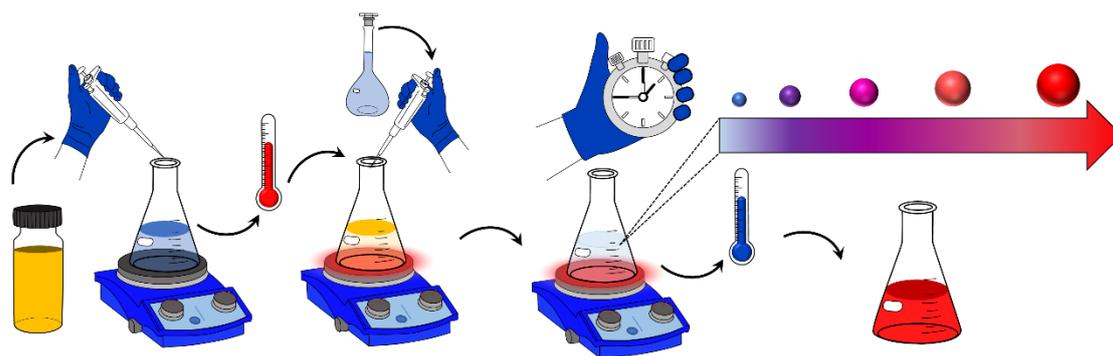
Fonte: Schematics Arts (2022)

4.2.1.3 Síntese das nanopartículas de ouro

Para iniciar a síntese das nanopartículas de ouro, se faz necessário um cuidado prévio com a vidraria a ser utilizada. Por essa razão, toda ela foi lavada com uma solução de água régia, ácido clorídrico com ácido nítrico (HCl:HNO₃), na proporção 3:1, respectivamente, que é mantida em contato por uma hora. Após esse tempo, a vidraria é lavada com água destilada.

As nanopartículas foram preparadas de acordo com o método de Turkevich (Balasubramanian, Yang et al. 2010, De Souza, Nogueira et al. 2019). Em um erlenmeyer colocado sobre uma placa agitadora e aquecedora, é adicionado 50 mL de água deionizada e 85 µL de partículas de ouro na concentração 0,147 mol L⁻¹. Quando a solução entra em ebulição, acrescentamos 2,5 mL de citrato de sódio 1 %, deixando a interação ocorrer por 15 minutos sob temperatura de 100 °C, e em seguida por mais 15 minutos sem utilizar temperatura, como representado na Fig. 44.

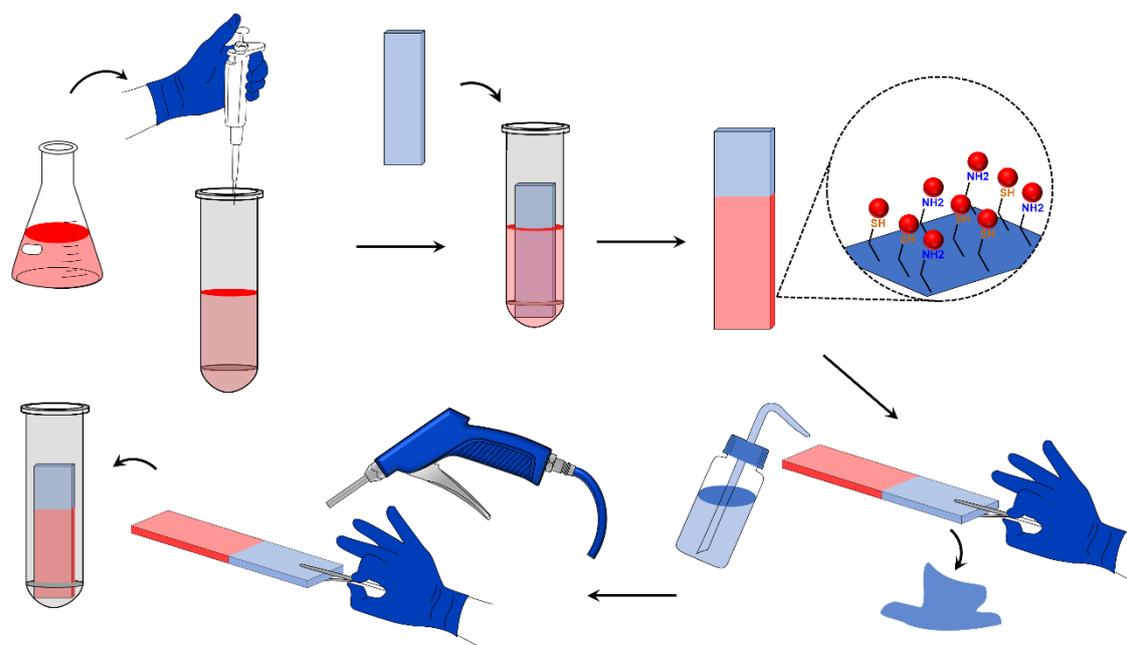
Figura 44 - Representação esquemática da síntese das NPs de Au.



Fonte: Schematics Arts (2022)

Para iniciar o processo de imobilização das sondas, é necessário a interação entre as NPs de ouro e o substrato funcionalizado de modo que ocorra a formação de um filme homogêneo. Então, em um microtubo foi adicionado 1 mL da solução coloidal de Au e inseridas as lâminas funcionalizadas, com o sistema permanecendo sob agitação de 50 rpm nos intervalos de 4, 6, 8 e 12 horas para determinar o melhor tempo de interação para formação do filme das NPs de Au. Após esse tempo, a lâmina é retirada, lavada com água deionizada, e seca com jato de ar. As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica.

Figura 45 - Representação esquemática da deposição das NPs de Au sobre as lamínulas funcionalizadas.



Fonte: Schematics Arts (2022)

4.2.1.4 Imobilização da sonda de ssDNA-SH na superfície do substrato lâmina-NPs Au

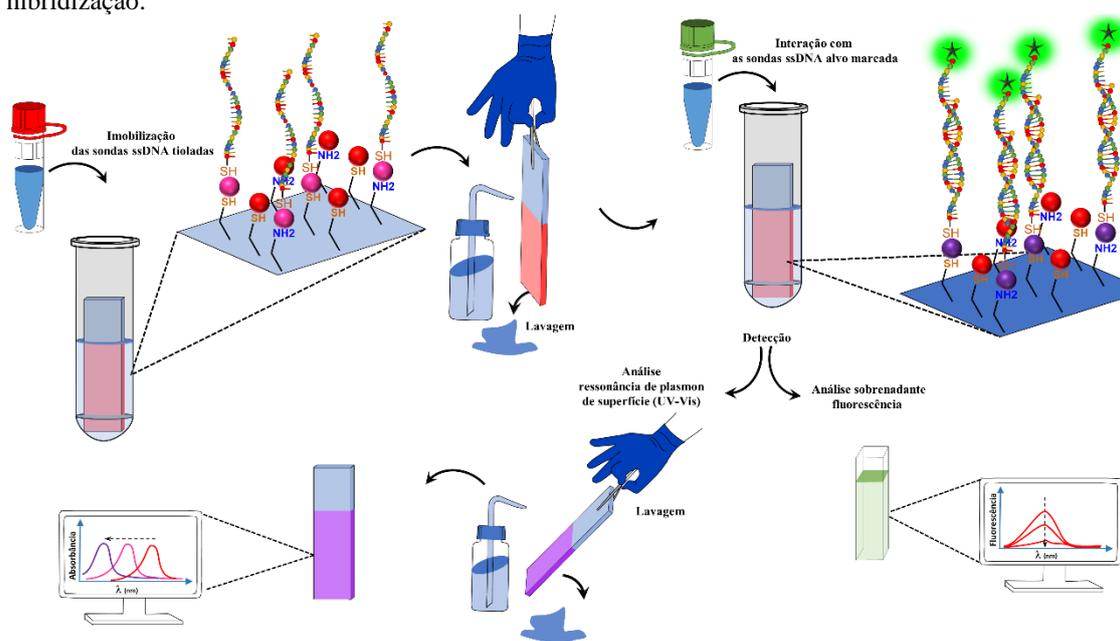
Para a imobilização dos oligonucleotídeos escolhidos, preparamos primeiramente uma solução estoque com concentração de 2000 ng/ μ L, através da diluição com água livre de nuclease. Posteriormente, as soluções estoques foram diluídas para as concentrações de trabalho.

Para utilizar a sonda tiolada, foi necessário realizar um protocolo de redução para quebrar a ligação ditiol (S=S), uma vez que a sonda adquirida vem na forma protegida, de modo a evitar a oxidação do grupo tiol. O protocolo utilizado para a redução da ligação ditiol fez uso de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) em excesso de cem vezes em relação à concentração molar de sonda (Wiederschain 2011).

Inicialmente, foi preparado 1 mL da sonda ssDNA-SH com concentração de 50 nmol no tampão Tris-HCl/1 mmol L⁻¹ de EDTA/0,1 mol L⁻¹ de NaCl pH 8,4. Essa solução foi então colocada em um microtubo de 2 mL, onde em seguida os substratos funcionalizados com as NPs Au foram também introduzidos. Posteriormente, os microtubos foram colocados sob agitação constante em um orbital a 300 rpm, para que ocorresse a interação entre os grupos tiol das sondas com a superfície das NPs Au. Após a interação com as sondas de DNA, a plataforma foi retirada com a ajuda de uma pinça, para que fosse medida a fluorescência do sobrenadante.

Devido à modificação das sondas de DNA com o fluoróforo, as amostras preparadas apresentam uma elevada fluorescência ao serem excitadas em $\lambda = 620$ nm. Como a intensidade de fluorescência do meio líquido é reduzida à medida que o ssDNA-SH é imobilizado na superfície das NPs Au, ao medirmos a supressão progressiva da fluorescência se torna possível quantificar de maneira simples o processo de imobilização das ssDNA-SH. O processo de imobilização da sonda na superfície das NPs Au e o bioreconhecimento (via hibridização) são mostrados de forma esquemática na Fig. 46.

Figura 46 - Representação esquemática do procedimento de imobilização das sondas ssDNA-SH, e hibridização.



Fonte: Schematics Arts (2022)

4.2.2 Métodos de caracterização

4.2.2.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível

Para observar a banda de ressonância de plásmons das nanopartículas de ouro em sua interação com os oligonucleotídeos, utilizamos um espectrofotômetro UV-Vis UV-2600 (Schimadzu, Japão). Já a medida da concentração da solução estoque de DNA foi realizada pelo uso de um espectrofotômetro Nanodrop 2000 C (Thermo Scientific, EUA).

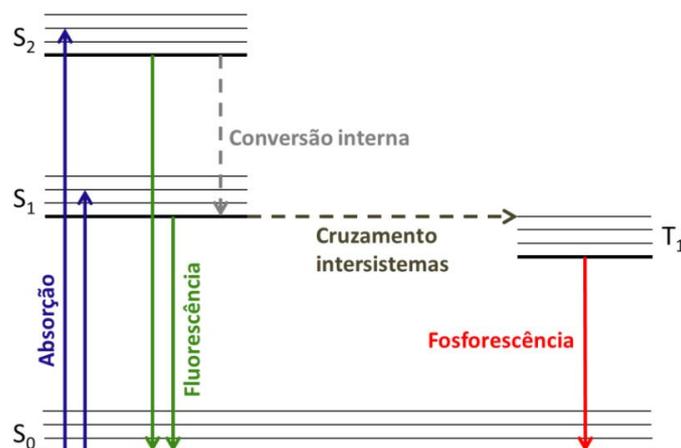
4.2.2.2 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é um processo fotoluminescente em que uma molécula, após absorver um pulso de radiação eletromagnética, passa para um de seus estados excitados e então relaxa de maneira rápida para seu estado fundamental, com a perda do excesso de energia ocorrendo pela emissão de fótons (Skoog, West et al. 2006). Gabriel Stokes foi o primeiro investigador a usar a expressão fluorescência, ao observar o fenômeno de emissão do efeito da luz ultravioleta sobre o quartzo, em 1852 (Valeur 2001).

O tempo de vida da espécie excitada é variável, o que se deve aos diferentes mecanismos que podem fazer a molécula perder o excesso de energia e retornar ao estado fundamental, dos quais os mais comuns são a absorção de fótons, a conversão interna (CI), a fluorescência, o cruzamento intersistema (CSI) e a fosforescência (Valeur 2001).

Esses processos podem ser representados por meio do diagrama originalmente proposto por Jablonski e depois aperfeiçoado por Perrin (Fig. 47).

Figura 47 - Diagrama simplificado de Perrin-Jablonski. As linhas tracejadas se referem aos processos não radiativos e as linhas contínuas aos processos radiativos.

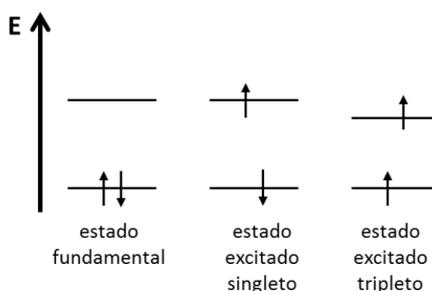


Fonte: Lakowicz (2006)

A multiplicidade de um determinado estado eletrônico é dada por $2S+1$, onde S é seu spin total. No estado de energia mais baixa, os dois elétrons de um dado orbital estão com seus spins emparelhados, resultando um estado de spin total nulo, correspondendo, portanto, à multiplicidade 1 (singleto). No caso em que os dois spins tenham a mesma orientação, o spin total será igual a 1 e a multiplicidade 3, o que corresponde a um estado tripleto (Fig. 48) (Valeur 2001).

Um diagrama de Perrin-Jablonski mostra os diferentes níveis de energia para uma molécula fotoluminescente. Cada agrupamento de linhas horizontais indica os diferentes níveis vibracionais de um dado estado eletrônico. Os níveis S caracterizam os estados singleto, com S_0 representando o estado singleto fundamental e S_1 e S_2 os dois primeiros estados singleto excitados.

Figura 48 - Distinção entre os estados singleto e tripleto.



Fonte: Figura adaptada de Valeur (2001)

Quando a amostra absorve radiação, as moléculas passam do estado fundamental para um estado excitado. Eventualmente, esse excesso de energia é perdido através de processos de desexcitação que podem ser de natureza radiativa (ou seja, com a emissão de radiação) ou não-radiativa. Em um processo não-radiativo, a perda de energia pode ocorrer por meio de um relaxamento vibracional, por conversão interna, ou pelo cruzamento intersistemas. No relaxamento vibracional, o sistema decai de um nível vibracional excitado para outro de mais baixa energia e mesma multiplicidade. Por exemplo, no caso de soluções, o excesso de energia das moléculas no estado excitado é perdido através de colisões com as moléculas do solvente. Já na conversão interna, a molécula excitada está no menor nível vibracional do estado S excitado, e a molécula pode ir para o estado S de menor energia; assim, é mais provável que ocorra a transição sem emissão de radiação de S₂ para S₁, devido à menor diferença de energia. Mas, se a diferença energética for grande, a desativação para o estado fundamental pode vir a ocorrer pela emissão de radiação na forma de fluorescência. Nos dois casos anteriores, a dissipação de energia ocorre entre estados de mesma multiplicidade. No entanto, no caso do cruzamento intersistema, a conversão ocorre entre um estado singleto e outro tripleto, desde que seus níveis vibracionais tenham a mesma energia. Embora esse tipo de transição seja proibido em primeira ordem, efeitos de ordem superior, como a interação spin-órbita, podem levar a transições em que haja a mudança de multiplicidade. De fato, o processo de cruzamento intersistema pode acontecer de modo rápido ($10^{-7} - 10^{-9}$ s), competindo com os sistemas de conversão interna e de fluorescência (Valeur 2001, Lakowicz 2006).

Já os processos radiativos podem acontecer de duas maneiras distintas, por fosforescência ou por fluorescência. A fluorescência é um processo de desexcitação que ocorre rapidamente, com a transição acontecendo entre estados de mesma multiplicidade, como, por exemplo, quando o elétron decai do estado singleto excitado (S₁) para o estado singleto fundamental (S₀). Por sua vez, a fosforescência envolve uma transição proibida entre um estado tripleto (T₁) e o singleto fundamental; assim, comparativamente a um processo de fluorescência, o tempo de vida de um estado fosforescente é maior (na faixa $10^3 - 10^0$ s), com sua taxa radiativa sendo mais baixa. O processo de emissão por fluorescência ocorre rapidamente, em segundos, enquanto um processo de fosforescência pode ocorrer em minutos ou até horas após a excitação. Com isso, os processos de fosforescência podem enfrentar a competição por parte de processos não radiativos, como o relaxamento vibracional ou o cruzamento intersistema (Skoog, West et al. 2006).

Como mostrado em um diagrama de Perrin-Jablonski (Fig. 47), por conta da ocorrência dos processos não radioativos a energia emitida em um processo fotoluminescente é menor que a energia de absorção. Conseqüentemente, o comprimento de onda de emissão é maior que o da absorção, uma diferença no espectro, originalmente percebida por George Stokes no caso de moléculas fluorescentes em solução, que se tornou conhecida como deslocamento Stokes (Murthy and Virk 2014).

A fluorescência é o fenômeno luminescente mais comum, encontrando aplicações em diversos campos, como na biofísica e bioquímica, em técnicas de biologia molecular, testes de diagnósticos, análises forenses, de sensoriamento, genética, em biotecnologia, e no sequenciamento de DNA, entre outros (Lakowicz 2006). A emissão de fluorescência por uma molécula é dependente de diversos fatores, como sua estrutura e rigidez, a natureza do solvente utilizado, o pH e variações na temperatura ou viscosidade do meio. Em certa medida, a influência desses fatores sobre o sinal luminescente de uma dada molécula demonstra a elevada sensibilidade da espectroscopia de fluorescência, que pode ser detectada em uma ampla faixa de concentrações (Skoog, West et al. 2006).

É importante observar que diferentes processos podem levar à redução da intensidade ou mesmo supressão total da fluorescência, em um processo conhecido como “*quenching*”. Dois dos mais importantes mecanismos envolvidos no quenching do sinal luminescente são a transferência de energia de ressonância de Forster (FRET) e a transferência de elétrons fotoinduzida (PET). Para que ocorra a transferência de energia entre duas moléculas vizinhas se faz necessário uma proximidade entre elas, que permita a ocorrência de interações coulombianas do tipo dipolo-dipolo de longo alcance ou a sobreposição orbital intermolecular que possibilite a troca de elétrons e interações de ressonância de carga de curto alcance (Valeur 2001). Se essas moléculas têm energias de excitação relativamente próximas, uma delas pode vir a agir como doadora, com a outra sendo a receptora. Ao ser excitada, após absorver radiação em comprimentos de onda específicos, a molécula doadora termina por transferir energia para a molécula aceitadora, do que resulta a redução ou extinção de sua fluorescência, com o conseqüente aumento da emissão da molécula aceitadora. Para que a transferência de energia de ressonância de Forster seja eficiente, é necessário que a molécula doadora e a aceitadora estejam relativamente próximas, a uma distância na faixa de 10 Å a 100 Å.

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro FluoroLog- 3 (Horiba, EUA). Para o oligonucleotídeo marcado com cianidina 5 (Cy 5), foram coletados espectros de emissão na faixa de (640 – 800) nm, e o comprimento de

onda de excitação em 663 nm, enquanto para as sequências marcadas com 6-carboxifluoresceína (FAM), a emissão foi examinada entre (490 – 650) nm, com a excitação fixada em 517 nm.

4.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/STEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para acompanhar a morfologia dos filmes das NPs de ouro formado sobre o substrato de vidro funcionalizado, foi utilizado o microscópio eletrônico FEG-SEM MIRA3 LM (Tescan, República Tcheca) do Departamento de Física da UFPE. As lamínulas foram colocadas sobre um suporte metálico (*stub*) contendo fita de carbono, sendo recobertas com uma fina camada de ouro-paládio por uma metalizadora SC7620 (Quorum Technologies, Inglaterra) no Departamento de Engenharia Mecânica da UFPE.

No microscópio eletrônico de varredura é possível acoplar detectores, esses ampliam o campo de aplicação possibilitando a análise de composição e mapeamento do material. Há diferentes configurações de detectores, por exemplo, espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), espectrômetro dispersivo de comprimento de onda (WDS), e microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM).

Em relação ao módulo de transmissão, o objetivo foi obter o diâmetro das nanopartículas de ouro. Para isso, foi usado um microscópio eletrônico de varredura (FEG-SEM MIRA3 LM, Tescan, República Tcheca) que pertence ao programa de Ciência de Materiais. A preparação do material foi realizada acrescentando etanol às nanopartículas de ouro e gotejando no grid de holly carbono (grade de cobre para MET recoberta por um filme de carbono). A estimativa da distribuição do tamanho das NPs Au foi feita a partir das micrografias STEM, as quais foram tratadas com o programa ImageJ.

Par auxiliar na descrição da estrutura superficial dos filmes formados com o decorrer do tempo as lamínulas, foram analisadas no microscópio de força atômica WET-SPM (Shimadzu, Japão) do Departamento de Química da UFPE. Os dados obtidos foram processados usando o programa Gwyddion.

4.2.2.4 Ângulo de contato

A molhabilidade de uma superfície sólida pode ser caracterizada através de medidas do ângulo de contato após a deposição de uma gota sobre a superfície. O líquido gotejado, geralmente água, pode se comportar como uma gota esférica de ângulo definido ou se espalhar na superfície, o resultado depende das forças interfaciais envolvidas

(sólido-líquido, líquido-vapor e sólido-vapor). Assim, três comportamentos podem ser observados a depender do ângulo, isso é o material pode ser caracterizado como hidrofílico ($\theta < 90^\circ$), hidrofóbica ($90^\circ \leq \theta \leq 150^\circ$), ou superhidrofóbica ($\theta \geq 150^\circ$) (Silva 2015).

A molhabilidade da superfície dos substratos, foi analisada para as lamínulas limpas, funcionalizadas (MPTS e APTS), e com as nanopartículas de ouro, em diferentes pontos da superfície, através de um analisador de ângulo de contato CAM 100 (KSV, Finlândia).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

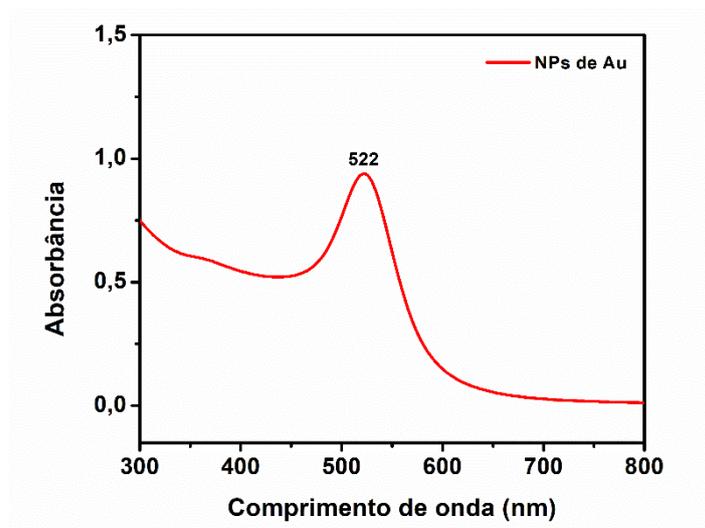
4.3.1 Caracterização das NPs de Au

A síntese das nanopartículas de ouro foi realizada usando como precursor o ácido tetracloroáurico (Au^{+3}) com o citrato de sódio sendo usado como agente redutor, conforme descrito na Seção 4.2.1.3.

Como as nanopartículas de ouro possuem alta energia de superfície, há a necessidade de usar o agente redutor citrato de sódio para reduzir essa energia, pois os íons citratos são adsorvidos na superfície das NPs Au, gerando repulsão eletrostática entre elas, consequentemente evitando sua aglomeração. Contudo, é importante destacar que a concentração de citrato de sódio interfere no tamanho e distribuição das nanopartículas de ouro (Liu 2012).

Seguindo essa metodologia, obtivemos uma solução coloidal estável de NPs de Au com coloração vermelha intensa. Foi observada a presença de uma banda de ressonância de plásmons (Fig. 49) das NPs Au, centrada no comprimento de onda em 522 nm, resultante da excitação dos elétrons livres na superfície do metal e que está diretamente relacionada ao tamanho e forma das nanopartículas (McFarland, Haynes et al. 2004, Gross 2008).

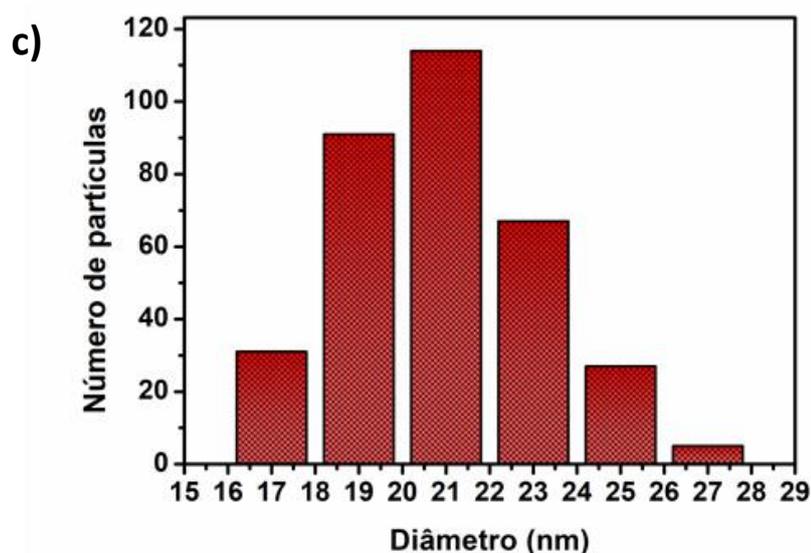
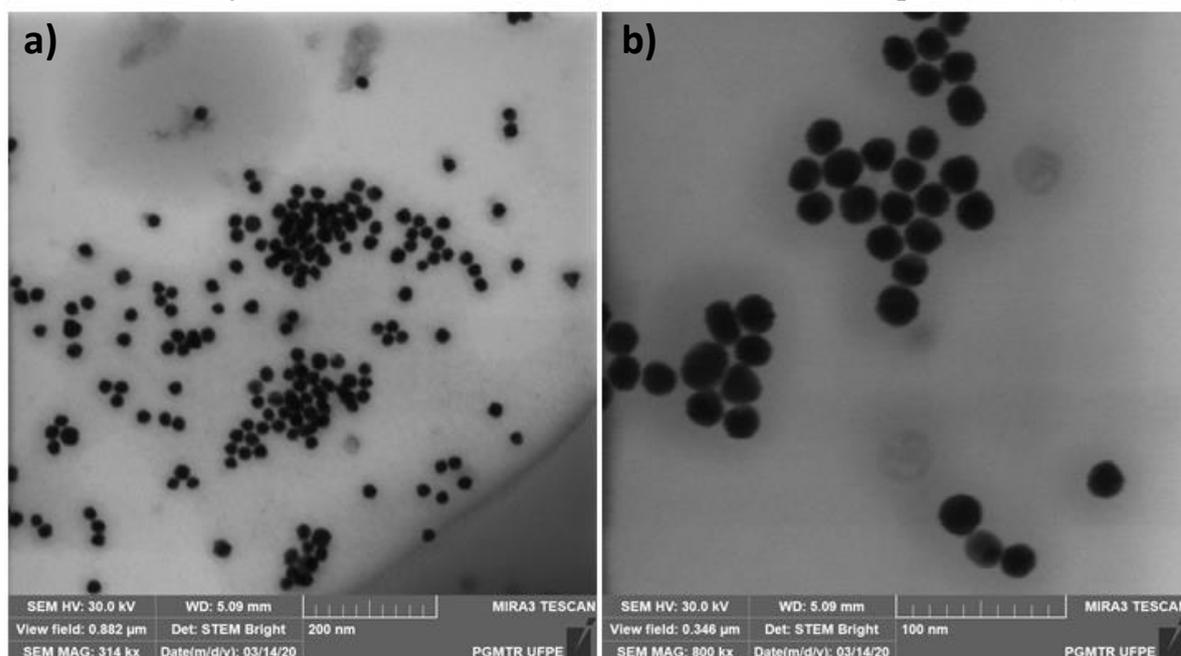
Figura 49 - Espectro UV-Vis da solução coloidal das nanopartículas de ouro.



Fonte: A autora (2022)

Para avaliar a morfologia e o tamanho das NPs Au sintetizadas, usamos a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV/STEM). Na Fig. 50, são mostradas as micrografias das NPs Au (que apresentam um formato esférico) e o histograma de distribuição do tamanho de partículas (Fig. 50c), que exibe uma distribuição de tamanho entre 17 nm e 27 nm, com tamanho médio de 21 nm.

Figura 50 - Imagens STEM das NPs Au sintetizadas (a), de maior magnificação (b), e histograma de distribuição de tamanho das nanopartículas obtido da média de 350 NPs Au de diferentes micrografias STEM (c).



Fonte: A autora (2022)

4.3.2 Características das lâminas de vidro e deposição das NPs Au

Há diversas maneiras de implementar a limpeza de substratos de vidro. Neste trabalho, para a retirada de impurezas e de matéria orgânica e promover a deposição da monocamada de silano na superfície de modo uniforme e homogêneo, realizamos a lavagem das lâminas com solução de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico. Por sua vez, foi realizada a funcionalização com mercapto e amino silanos (MPTS e APTS,

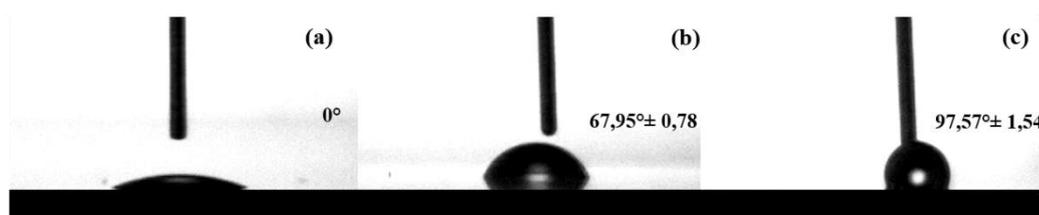
respectivamente), com a finalidade de promover a adesão das NPs Au na superfície do vidro e, deste modo, favorecer a formação de uma monocamada uniforme.

A monocamada de silano pode ser obtida através de imersão em fase líquida ou por deposição em fase vapor. Para o processo de fase líquida, existe uma dependência com o tempo de exposição e o tempo de cura após a silanização (Halliwell and Cass 2001).

Escolhemos realizar a funcionalização (tióis e aminas) via deposição por fase vapor. Após retirar as lamínulas do dessecador, a lavagem com tolueno foi realizada com a intenção de retirar os silanos não aderidos corretamente (Cras, Rowe-Taitt et al. 1999).

Para avaliar de maneira qualitativa a modificação da superfície funcionalizada, utilizamos a microscopia de varredura e a de força atômica. Em relação a uma avaliação quantitativa das modificações realizadas nas lamínulas, utilizamos o ângulo de contato. Através das medidas de ângulo de contato (Fig. 51), observamos que antes e após o processo de lavagem das lamínulas o ângulo permanece o mesmo (0°), indicando que a superfície é bastante hidrofílica. Já ao realizar a funcionalização com MPTS e APTS, observa-se uma mudança para $\sim 68^\circ$, indicando que houve alteração na superfície, que se faz menos hidrofílica. Ao recobrir a lamínula funcionalizada com NPs Au, há um acréscimo em torno de 30° , o que mostra que a superfície se encontra hidrofóbica, o que mais uma vez confirma a modificação. Com isso, verificamos a eficácia e reprodutibilidade do processo de funcionalização e formação do filme das NPs Au.

Figura 51 - Ângulo de contato para as lamínulas de vidro após o processo de limpeza (a), funcionalizadas (b) e recobertas com filme de NPs Au (c).



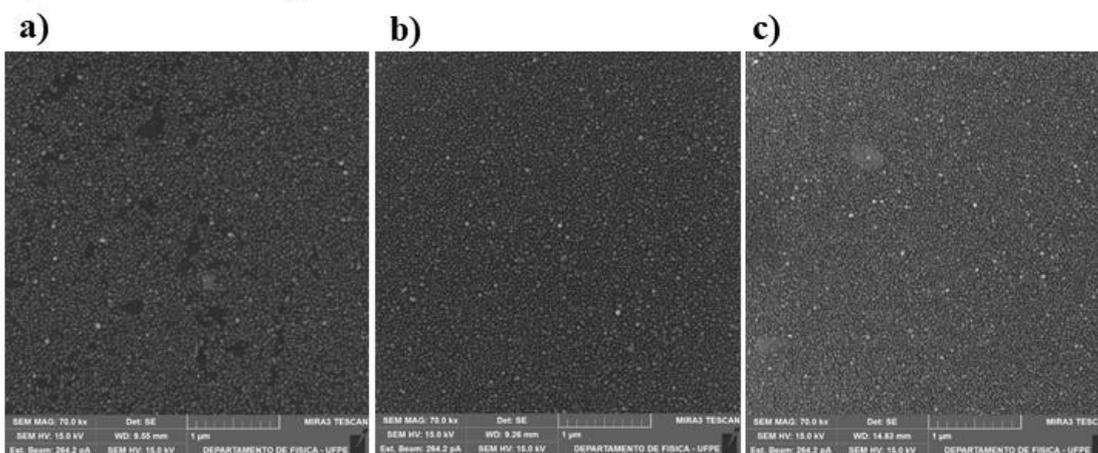
Fonte: A autora (2022)

Através das análises morfológicas de microscopia eletrônica de varredura e de força atômica (Figs. 52 - 54), é possível visualizar o comportamento mediante o tempo de funcionalização e de deposição das NPs Au, e que mesmo após o processo de funcionalização não ocorre modificação na morfologia das NPs Au. Como também, é possível observar que para o tempo de deposição de 4 horas ainda há espaço sem a deposição das NPs Au, mostrando que para esse intervalo de tempo não ocorreu o

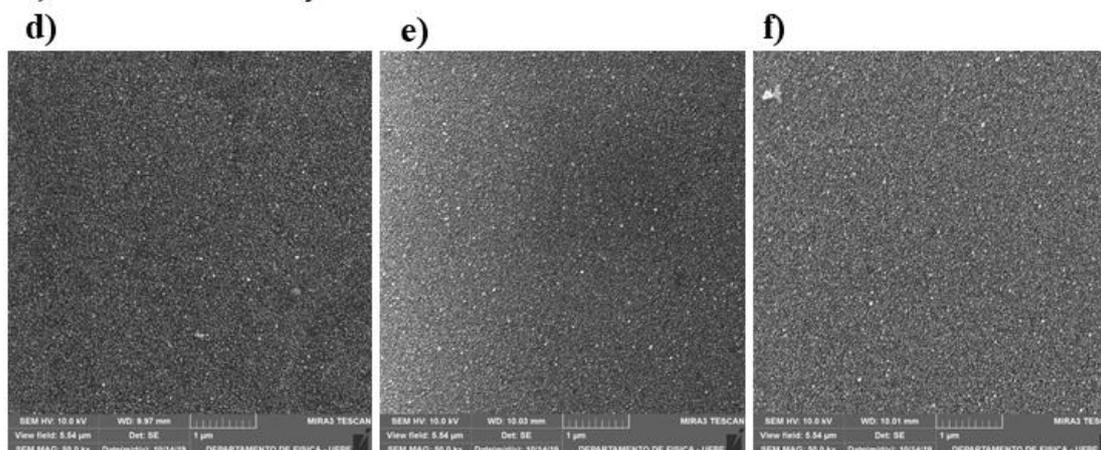
completo recobrimento da superfície do substrato. Por outro lado, a partir do tempo de 6 horas pode-se notar uma maior uniformidade da camada de NPs Au, sendo que a partir do tempo de 12 horas começam a ser observados pontos de aglomeração das NPs Au. Desse modo, os melhores tempos para os quais se observa uma camada consideravelmente uniforme e sem a presença significativa de aglomeração corresponderam a 6 e 8 horas. Assim, de modo a otimizar o protocolo de sensoriamento, adotamos o tempo de funcionalização de 2 h, e de 6 horas para formação da monocamada de NPs Au sobre o substrato a ser usado como plataforma de sensoriamento.

Figura 52 - Imagens MEV das lamínulas de vidro funcionalizadas com MPTS e APTES pelo período de 2 h I) e 4 h II), e tempo de contato com a solução de NPs de Au de 4 h (a, d), 6 h (b, e), 12 h (c, f).

I) 2h funcionalização



II) 4h funcionalização

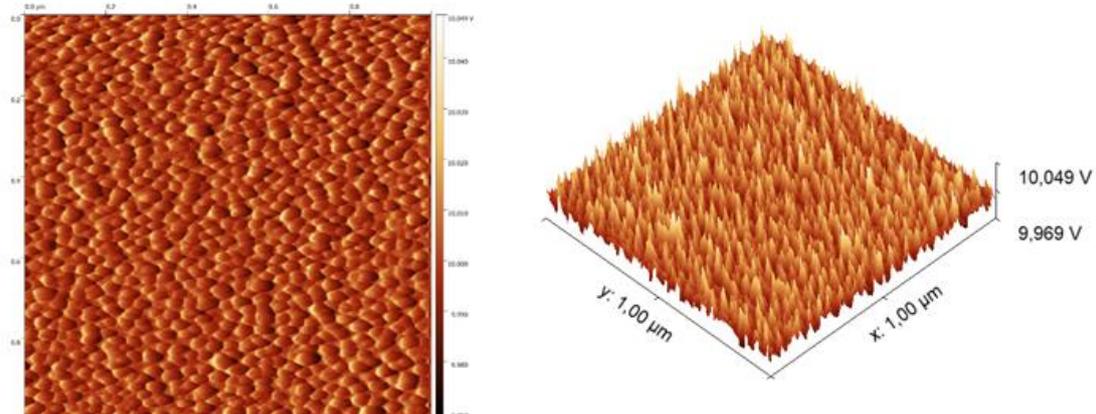


Fonte: A autora (2022)

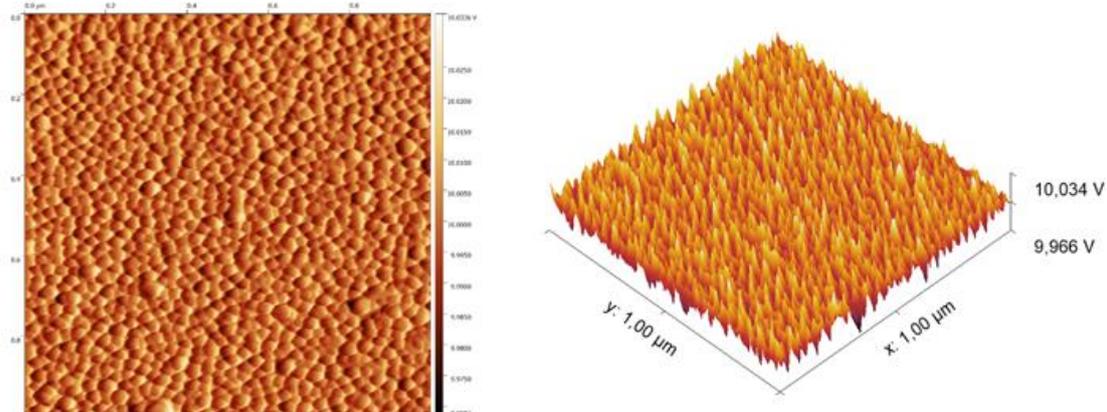
Figura 53 - Imagens AFM das superfícies das lamínulas de vidro analisadas com 2 h de funcionalização I), e período para formação do filme das NPs de Au seguida de sua imagem topográfica de 4 h (a), 6 h (b), e 8 h (c).

I) 2h funcionalização

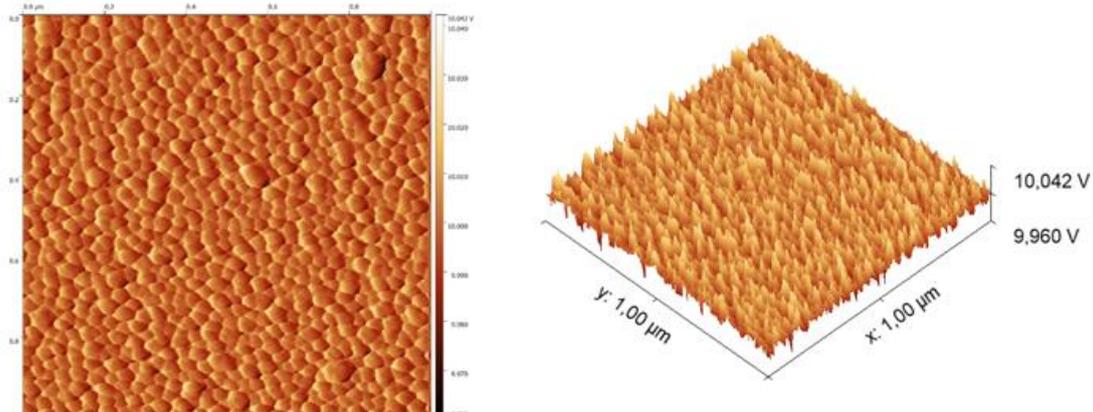
a) 4h NPs Au



b) 6h NPs Au



c) 8h NPs Au

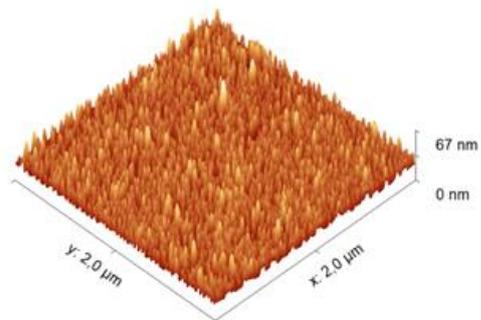
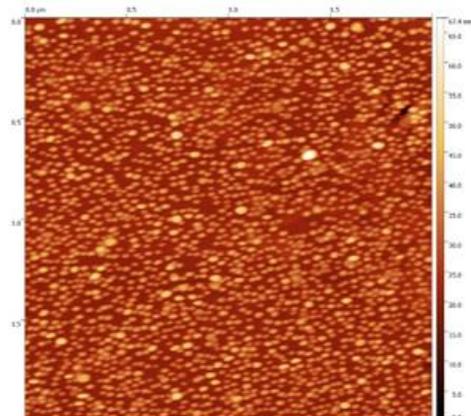


Fonte: A autora (2022)

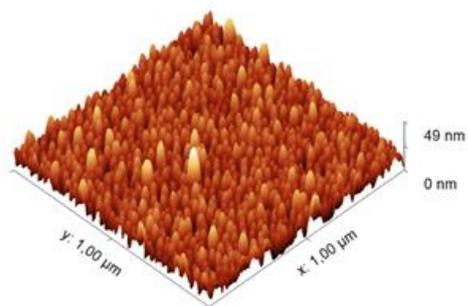
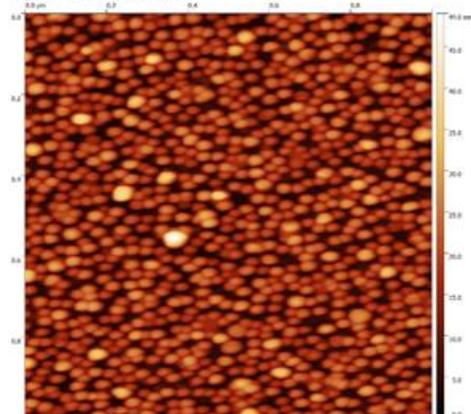
Figura 54 - Imagens AFM das superfícies das lamínulas de vidro analisadas com 4 h de funcionalização II), e período para formação do filme das NPs de Au seguida de sua imagem topográfica de 4 h (d), 6 h (e), 8 h (f), 12 h (g).

II) 4h funcionalização

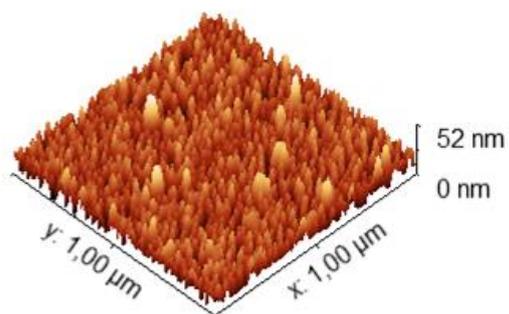
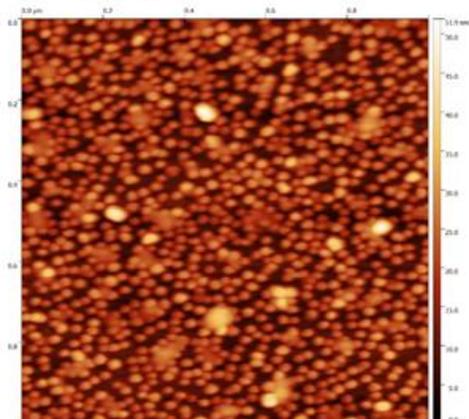
d) 4h NPs Au



e) 6h NPs Au



f) 8h NPs Au



Fonte: A autora (2022)

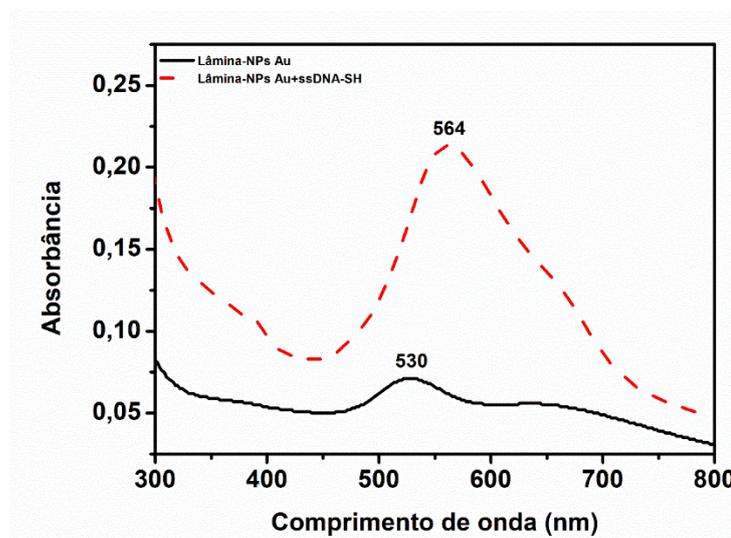
4.3.3 Imobilização das sondas de ssDNA-SH

Após termos conseguido o domínio e a reprodutibilidade das diferentes etapas de preparação do substrato (lâminas de vidro), desde a limpeza, funcionalização por meio da formação da monocamada de tióis e aminas no decorrer de 2 horas, e a deposição das NPs Au (8 h), iniciamos a prova de conceito da plataforma de sensoriamento, com a imobilização da sonda (ssDNA-SH) do patógeno *Leishmania infantum*.

A observação da banda de plásmons das NPs Au após a sua imobilização na forma de filmes é muito importante, pois a posição do pico de absorção máxima e sua intensidade dependem fortemente de alterações no índice de refração na superfície da nanopartícula (Fang, Chen et al. 2014). Assim, essa propriedade apresentada por nanopartículas de metais nobres pode ser aproveitada, por exemplo, em um transdutor plasmônico, permitindo a detecção de eventos de ligação em sua superfície.

Conforme pode ser observado na Fig. 55, após a imobilização de sondas de ssDNA-SH na superfície do filme de NPs Au, a banda de ressonância de plásmons, antes centrada em 530 nm (lâmina-NPs Au), passa a ser em 564 nm, ou seja, apresenta um deslocamento de 34 nm para as lâminas com a sonda imobilizada (lâmina-NPs Au + ssDNA-SH). Essa mudança no comprimento de onda de absorção máximo indica o sucesso da formação de uma camada biológica na superfície do filme, o que se dá pela conjugação das sondas de ssDNA-SH com a plataforma (Schneider, Jahr et al. 2013, Fang, Chen et al. 2014, Thavanathan, Huang et al. 2014).

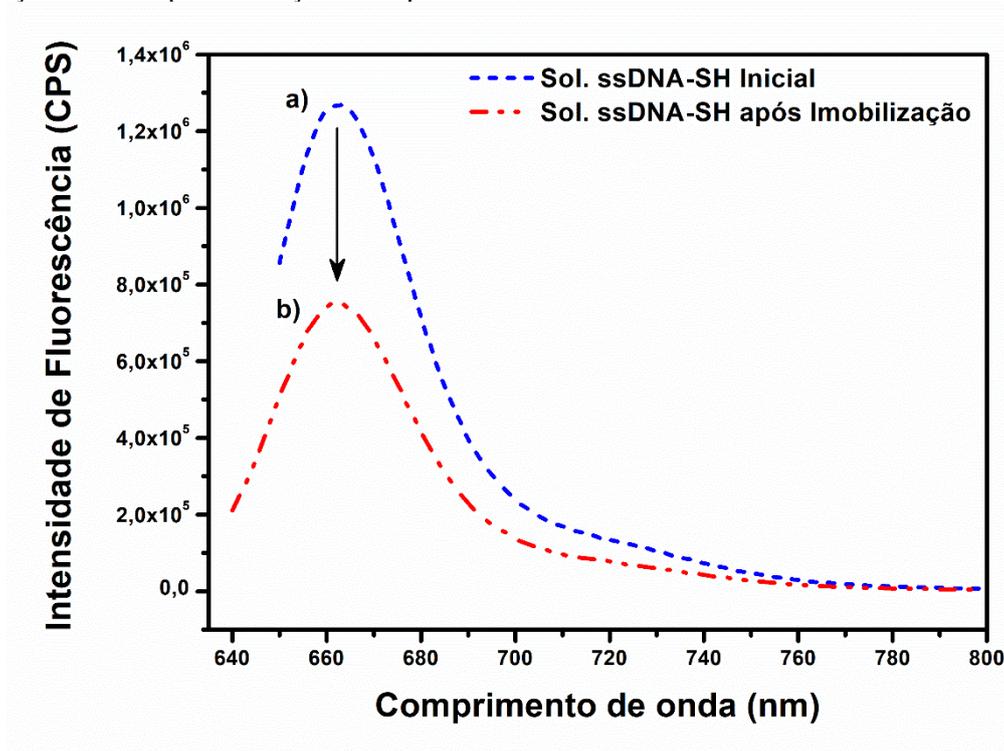
Figura 55 - Espectros UV-Vis das lâminas-NPs Au antes e após a imobilização da sonda tiolada (ssDNA-SH).



Fonte: A autora (2022)

O uso da espectroscopia de fluorescência é outra maneira de acompanhar o processo de imobilização e hibridização dos oligonucleotídeos através de medidas indiretas, por meio da medida da fluorescência da solução de imobilização antes e após a interação com a plataforma lâmina-NPs Au. Para isso, utilizamos sondas de DNA marcadas com cianidina, e observamos o sinal característico desse corante fluorescente em 663 nm. Como pode ser observado na Fig. 56, existe uma boa eficiência para a imobilização da sonda ssDNA-SH, levando a uma redução da fluorescência de aproximadamente 45 % (curva b) em relação à solução inicial (curva a). A diminuição da fluorescência na solução de imobilização demonstra novamente que o revestimento da superfície das lâminas de vidro com o filme de nanopartículas de Au é efetivo para a imobilização de sondas de DNA funcionalizadas com grupos tiol em sua extremidade.

Figura 56 - Espectros de emissão de fluorescência da solução de ssDNA-SH (50 nmol) sob diferentes condições: antes e após a interação com a plataforma lâmina-NPs Au.

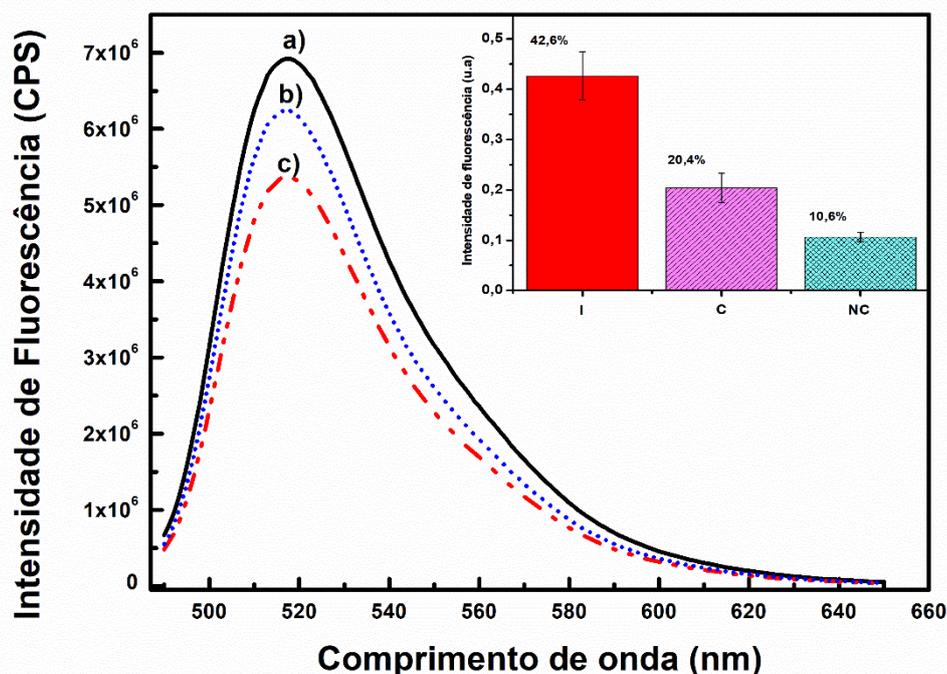


Fonte: A autora (2022)

Com o processo de imobilização otimizado, realizamos um experimento de prova de conceito para verificar a viabilidade do uso das lâminas-NPs Au como uma plataforma de sensoriamento para a detecção de uma sequência de oligonucleotídeos específica, no caso a *Leishmania infantum*. Para isso, a plataforma (com a sonda imobilizada) foi colocada em contato com soluções de ssDNA-FAM com fitas

totalmente complementares (C-ssDNA-FAM) e com soluções de ssDNA-FAM com fitas inteiramente não complementares (NC-ssDNA-FAM). Neste procedimento, 1mL de uma solução de C-ssDNA-FAM e NC-ssDNA-FAM, nas concentrações de 50 nmol, foram colocadas para interagir com a plataforma lâmina-Nps Au/ssDNA-SH, por 120 min em temperatura ambiente ($\sim 21\text{ }^{\circ}\text{C}$), em um orbital sob agitação constante de 300 rpm. Posteriormente, as plataformas foram retiradas e os sobrenadantes das soluções foram analisados por espectroscopia de fluorescência. Como é mostrado na Fig. 57, quando a plataforma é colocada na presença da sonda de DNA alvo complementar, ocorre uma diminuição significativa na fluorescência da solução. Esse fato se deve à ocorrência de um processo de hibridização, que leva à retirada da sonda C-ssDNA-FAM da solução, uma vez formado o DNA de dupla cadeia. Em contrapartida, esse processo não ocorre quando a plataforma é posta em contato com cadeias de ssDNA não complementares. Com isso, a identificação molecular de agentes infecciosos *Leishmania infantum* se dará pelo reconhecimento do DNA alvo através de sua hibridização com a sonda, o que ocasionará a redução do sinal de fluorescência do analito.

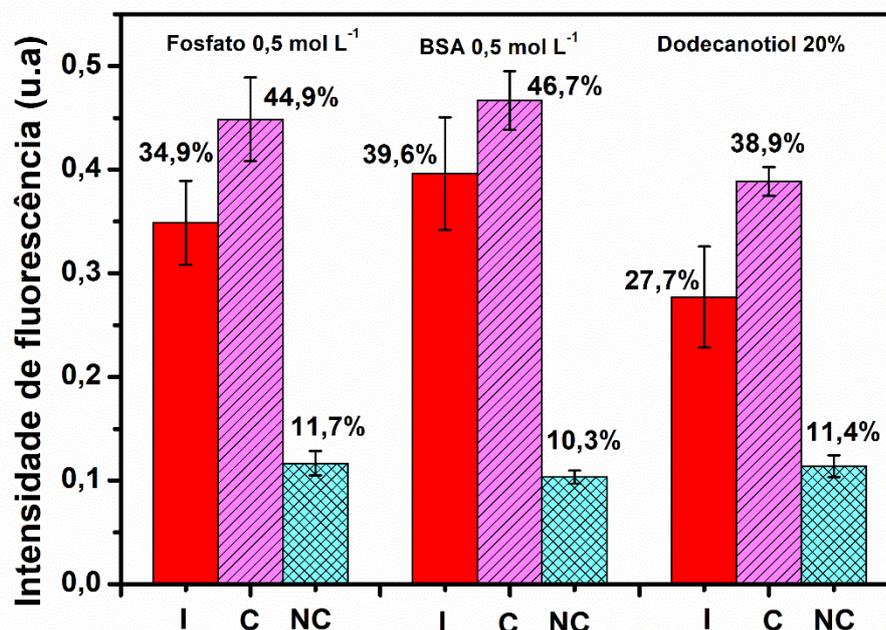
Figura 57 - Espectros de emissão de fluorescência das diferentes soluções de ssDNA-FAM (50 nmol) antes e após a interação com a plataforma lâmina-NPs Au/ssDNA-SH: antes da interação (a), e após a interação com a plataforma para amostra não complementar (NC-ssDNA-FAM) (b), e amostra complementar (C-ssDNA-FAM) (c).



Fonte: A autora (2022)

Com o objetivo de encontrar as melhores condições para que as lâminas de vidro-NPs Au fossem usadas como uma plataforma para a detecção de ácidos nucleicos, passamos a investigar o efeito da variação de diferentes parâmetros. Por exemplo, a inclusão de moléculas bloqueadoras poderia fazer com que os sítios ativos remanescentes após a etapa de imobilização não viessem a interferir no protocolo de hibridização, pela minimização da absorção de sondas por meio de ligações inespecíficas. Para esse tipo de ensaio, utilizamos três diferentes moléculas bloqueadoras: o fosfato bifásico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), a proteína albumina de soro bovino-BSA ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e o dodecanotiol (20 %). Neste procedimento, 1mL de uma solução bloqueadora foi colocada para interagir com a plataforma lâmina-Nps Au/ssDNA-SH por 18 h. Na sequência, é feita a etapa de lavagem, na qual as lâminas foram retiradas e inseridas em outro microtubo contendo 1mL da solução tampão Tris-HCl/EDTA/NaCl por 1 h, sob agitação constante de 300 rpm. Terminado o processo de lavagem, as plataformas foram colocadas para interagir com 1 mL de uma solução de C-ssDNA-FAM e NC-ssDNA-FAM, nas concentrações de 50 nmol, por 120 min sob agitação de 300 rpm. Quando comparamos os resultados mostrados na Fig. 57 com os da Fig. 58, podemos observar que o ensaio levou a uma melhor sensibilidade (ou seja, uma maior diferença entre a resposta positiva, quando a plataforma é exposta a sequências complementares e resposta negativa, quando ela é submetida à presença de sequências não complementares). Como já mencionado, para uma maior eficiência no processo de hibridização é importante que ocorra a máxima saturação dos sítios ativos. Foi também possível observar que a eficiência no bloqueio dos sítios foi a mesma para as moléculas de fosfato e BSA, uma vez que para esses bloqueadores os resultados entre as respostas positivas e negativas foram equivalentes. No entanto, acreditamos que do ponto de vista experimental o uso de moléculas simples como a de fosfato bibásico é menos trabalhoso e de menor custo.

Figura 58 - Histogramas com as percentagens de sonda imobilizada (I) e ssDNA complementar, (C) e não complementar (NC) após interação com as plataformas lâminas-NPs Au em função dos diferentes bloqueadores analisados.



Fonte: A autora (2022)

As provas de conceito iniciais se mostram muito promissoras. Ainda assim, se faz necessária a otimização de parâmetros relacionados com a hibridização, cinética de imobilização, eficiência de hibridização, e otimização das soluções tampão utilizadas, além de estudos de especificidade e seletividade, a fim de garantir uma melhor relação (diferença de sinal) entre amostras positivas e negativas.

4.4 CONCLUSÃO

Nesta etapa do trabalho, foi possível estabelecer os procedimentos de limpeza e funcionalização das lâminas de vidro, através do uso de uma solução contendo ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, enquanto a funcionalização com MPTS e APTS foi realizada por deposição em fase vapor no intervalo de duas horas. Com base no método de Turkevich, foi possível preparar de forma reprodutível nanopartículas de ouro estáveis, com tamanho médio de 21 nanômetros e 8 h para formação de um filme uniforme sobre o substrato funcionalizado.

Os resultados obtidos são de especial interesse, pois pretendemos usar os conhecimentos adquiridos sobre o processo de hibridização na interface sólido-líquido para o estudo e desenvolvimento de um sistema modelo equivalente para o diagnóstico

molecular. Nesse caso, no entanto, a detecção do processo de hibridização sonda/alvo, com a formação de um segmento de DNA de dupla cadeia, passaria a ser monitorada tanto por alterações na banda de ressonância de plásmons de superfície da NPsAu como pela análise da intensidade fluorescência das soluções alvo. Para que isso ocorra, a otimização dos processos de detecção envolvidos deve ser implementada, o que requer uma completa investigação do efeito da variação de importantes parâmetros, tais como tempo de bloqueadores, cinética de hibridização, limite de detecção e seletividade. Com isso, esperamos ser possível obter uma plataforma de sensoriamento ainda mais eficiente.

5 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS PROTEICAS COMPÓSITAS NANOESTRUTURADAS E SEU USO COMO ELETRODOS PARA SUPERCAPACITORES ORGÂNICOS FLEXÍVEIS

5.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nas últimas décadas, com o aumento do interesse pelo uso de energias renováveis, tem ocorrido a busca pelo desenvolvimento de dispositivos inovadores para o armazenamento de energia, como os de natureza eletroquímica. Dentre esses, os supercapacitores orgânicos merecem destaque, por apresentarem vantagens competitivas como baixo custo, leveza e flexibilidade, com elasticidade adequada para poderem ser moldados de acordo com cada uso específico.

Supercapacitores são dispositivos eletrônicos capazes de armazenar quantidade de energia por unidade de área, volume ou massa bem maior que a dos capacitores eletrolíticos convencionais. Um supercapacitor tem um design de construção distinto, em que são utilizados eletrodos de grande área superficial e um separador isolante poroso muito fino impregnado de uma solução eletrolítica. Neles, o mecanismo de armazenamento de carga pode ser físico, por meio da formação de uma dupla camada elétrica (EDLC), ou químico (Pseudo-capacitância, PsC), envolvendo reações de oxido-redução de óxidos metálicos ou polímeros intrinsecamente condutores. Entre as principais vantagens desses dispositivos estão sua alta densidade de potência, longo tempo de vida, grande estabilidade térmica, e rápido ciclo de carga-descarga, além de serem mais amigáveis ecologicamente que as baterias.

Novos segmentos tecnológicos emergentes, até então não imaginados, como os recentes avanços nas áreas da eletrônica flexível, implantes médicos, sistemas de sensoriamento remoto, internet das coisas (IoT) e dispositivos vestíveis, por exemplo, resultaram desse desenvolvimento acelerado de dispositivos eletrônicos inovadores. Da mesma forma, na área das energias renováveis há acentuado interesse em dispositivos de armazenamento de energia que supram as necessidades da eletrônica móvel e de conectividade. Em especial, existe uma intensa procura por métodos simples, rápidos e econômicos que sejam baseados no uso de nanomateriais e tornem viável o mais amplo uso de supercapacitores orgânicos.

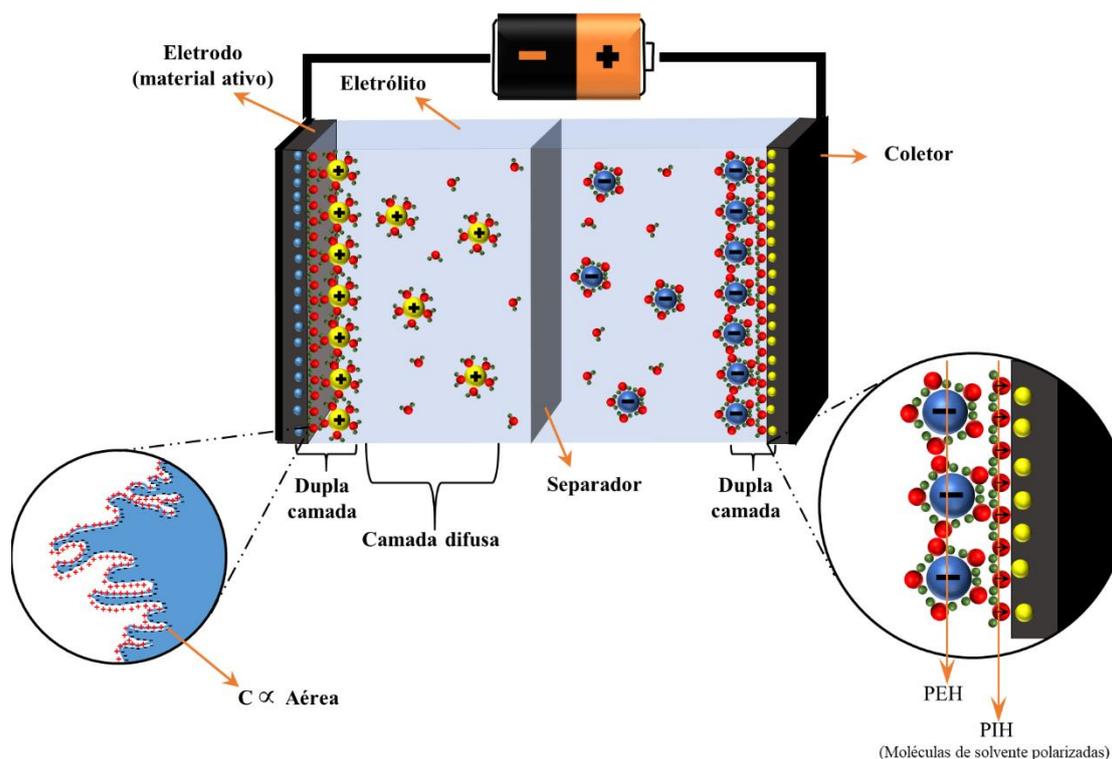
A membrana de casca de ovo (MCO) é material que pode ser usado como uma matriz flexível para a preparação de dispositivos. Ela é uma membrana semipermeável composta por uma rede fibrosa biopolimérica, que é essencial para a formação da casca

do ovo, ao fornecer uma plataforma não mineralizada que, enquanto permitindo a mineralização do carbonato de cálcio, preserva a clara de ovo no interior ao agir como uma barreira antimicrobiana natural e reguladora de umidade e da permeação de gases. Globalmente, uma larga quantidade de ovos é consumida a cada dia, com a grande maioria das cascas sendo descartadas no lixo comum. Ocorre que a MCO exibe não apenas uma estrutura microporosa altamente flexível e quimicamente estável, mas também a presença de muitos grupos funcionais distintos. Isso, por sua vez, possibilita a mais fácil incorporação de materiais nanoestruturados, após a desmineralização do componente calcário da casca. Nesse contexto, as membranas de casca de ovo aparecem como uma promissora plataforma funcional para a produção de eletrônicos orgânicos e sustentáveis de alto desempenho.

A preparação de eletrodos compósitos flexíveis a partir de membranas proteicas permite a incorporação de nanoestruturas de carbono (NEC) e polímeros intrinsecamente condutores (PIC) como materiais ativos. Por suas excelentes propriedades de condução elétrica e transferência de carga, esses materiais podem participar de processos de armazenamento de energia pelos fenômenos de dupla camada elétrica e de pseudo-capacitância, permitindo sua utilização em dispositivos de armazenamento de energia como os supercapacitores orgânicos.

Os processos tipo EDLC ocorrem principalmente em nanoestruturas de carbono (NEC), como o grafeno e nanotubos de carbono, nas quais o acúmulo de carga se dá na interface do material com o eletrólito. Nesses processos, ao ser aplicado uma diferença de potencial entre dois eletrodos separados por um meio saturado de íons, ocorre um deslocamento de cargas desse meio para as regiões carregadas na superfície da NEC, resultando em um acúmulo local de carga. Dessa forma, a área superficial disponível da NEC é um dos parâmetros limitantes para que seja obtida uma alta capacitância específica em um SC. Na Fig. 59 é ilustrado de forma simplificada o mecanismo de armazenamento por dupla camada em um dispositivo supercapacitor.

Figura 59 - Esquema ilustrativo de um dispositivo de armazenamento eletrolítico baseado no mecanismo de EDLC.

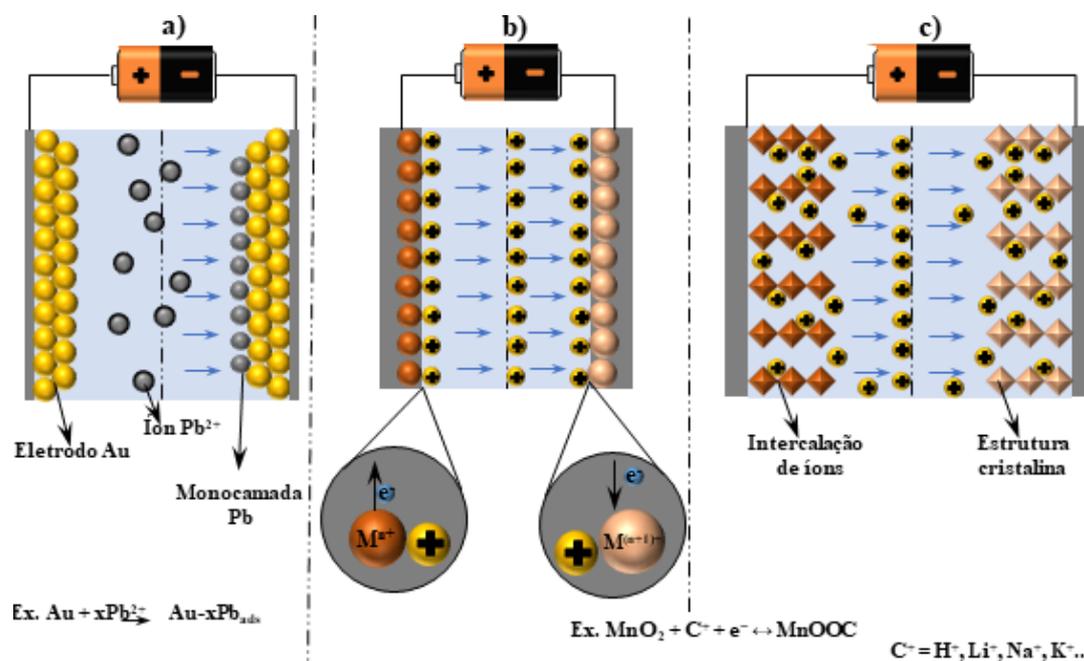


Fonte: Silva (2019)

Por sua vez, a PsC é um fenômeno de armazenamento de carga de natureza química (faradaico), onde há a transferência de elétrons na interface eletrodo-eletrólito desses dispositivos (ou seja, a passagem de carga através da superfície do eletrodo – difusão de íons ao longo do eletrodo). O processo PsC tem sua origem em reações de oxirredução, eletrossorção ou intercalação, a depender dos materiais utilizados na fabricação dos eletrodos (Costentin and Savéant 2019). Essas reações, que são rápidas e reversíveis (permitindo os ciclos de carga-descarga), não geram subprodutos, resultando em um maior tempo de vida do dispositivo (Conway 1999). Outra característica importante dos processos PsC é que eles ocorrem somente em conjunto com os mecanismos EDLC. Dessa maneira, todo dispositivo pseudo-capacitivo possui também obrigatoriamente uma parcela de armazenamento EDLC, com sua capacitância total a soma dessas duas contribuições. Os materiais que exibem PsC são usualmente os óxidos de metais de transição (RuO_2 , IrO_2 , Fe_3O_4 , MnO_2 , TiS_2) e PICs, que geralmente fazem parte da composição do material usado no eletrodo condutor ou se fazem presentes na forma de compósitos. No caso específico dos polímeros condutores, as reações redox ocorrem ao longo da conjugação $\pi - \pi^*$ da cadeia polimérica. Em um processo de oxidação de um PIC (como em uma dopagem tipo p), as espécies aniônicas que são

inseridas ao longo da extensão lateral da cadeia se comportam como contra-íons, do que resulta o armazenamento de carga. Essa incorporação durante o processo de oxirredução e a remoção/adição de íons permite que sejam obtidos altos valores na capacitância específica desses materiais, em semelhança ao que ocorre em uma reação do tipo bateria, porém com maior estabilidade e reversibilidade eletroquímica (Conway 1999). Na Fig. 60 são apresentados de forma simplificada os possíveis mecanismos de armazenamento por PsC em um dispositivo supercapacitor.

Figura 60 - Esquema representativo dos diferentes mecanismos de armazenamento pseudo-capacitivos: eletrossorção (a), intercalação (b) e oxirredução (c).



Fonte: Silva (2019)

Os PICs formam uma importante classe de materiais pseudo-capacitivos que, diferentemente dos óxidos metálicos de transição (OMT), possuem alta condutividade, boa flexibilidade e leveza. Por tais razões, polímeros como polipirrol (PPy) (Lima, Alcaraz-Espinoza et al. 2018), polianilina (Pani) (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018), e poli (3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) (Lee, Jin et al. 2019) têm sido considerados como potenciais candidatos para uso em supercapacitores flexíveis com bom desempenho em termos de potência e densidade de energia. Por outro lado, os PICs sofrem uma quantidade considerável de estresse mecânico durante o processo de carga/descarga, do que resulta a degradação do dispositivo e a consequente redução em sua capacitância e seu ciclo de vida (Han and Dai 2019).

Por apresentarem uma peculiar combinação de características especiais como flexibilidade, estabilidade eletroquímica, baixo custo, reversibilidade dos processos de troca de carga, facilidade de processamento, boa condutividade elétrica, possibilidade de alteração de suas propriedades por meio de dopagem, e a facilidade de combinação com diversos materiais, os polímeros condutores têm encontrado um número crescente de distintas aplicações (Lövenich 2014, Hryniewicz, Lima et al. 2019, Kavitha, Elavarasan et al. 2022, Pavel, Lakard et al. 2022).

No presente trabalho, utilizamos como material eletroativo um polímero condutor intrínseco derivado do politiofeno, o poli(3,4-etilenodioxitiofeno), mais conhecido como PEDOT. Esse polímero, que resulta da polimerização do monômero 3,4-etilenodioxitiofeno foi obtido pela primeira vez em 1988. Durante o processo de polimerização, o PEDOT apresenta cargas positivas, que precisam ser estabilizadas pela adição de contra íons, como os derivados da dissolução de ácidos sulfônicos (Lövenich 2014). Esse problema foi solucionado através da junção do PEDOT com o polímero estabilizante poliestireno sulfonato (PSS). Essa suspensão (PEDOT:PSS) apresenta propriedades especiais como condutividade ajustável, elevada estabilidade térmica, e boa transparência óptica (que permite sua atuação como camada de transporte de buracos em dispositivos orgânicos, por exemplo, celulares solares), além de uma boa solubilidade em água. Essa última característica é muito importante, uma vez que uma das grandes limitações para uma aplicação mais generalizada dos PICs é a difícil solubilidade e processabilidade em meio aquoso (Shi, Liu et al. 2015, Fan and Ouyang 2019, Rahimzadeh, Naghib et al. 2020).

Uma estratégia para superar limitações do uso de PICs puros, como o estresse mecânico durante o processo de descarga de carga e flexibilidade), consiste em obter sua combinação em nanocompósitos binários com NECs. Entre as diversas vantagens do uso de compósitos PICs/NECs, merecem menção o notável aumento na estabilidade eletroquímica e boa condutividade dos eletrodos (Han and Dai 2019). De fato, os SCs preparados com base nesse tipo de nanocompósitos binários exibem maior capacidade de energia e menor resistência elétrica, do que resulta em uma maior taxa de transferência de carga, comparativamente a aqueles que fazem uso desses componentes separadamente (Alcaraz-Espinoza, de Melo et al. 2017, Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018).

O objetivo deste trabalho foi a preparação de eletrodos compósitos à base da MCO para uso em supercapacitores orgânicos flexíveis de estado sólido, ou outros dispositivos e sensores baseados na eletrônica orgânica. Para isso, se faz inicialmente necessário o

rompimento das ligações cruzadas das fibras proteicas da MCO por estresse mecânico para que seja possível a posterior incorporação de nanotubos de carbono e o polímero condutor PEDOT:PSS pela ultrassonicação com o uso de ponteira ultrassônica.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

As membranas de casca de ovo foram extraídas de ovos comprados no mercado local da cidade de Recife, Brasil. O ácido clorídrico, ácido nítrico, álcool metílico (CH₃OH), ácido fosfórico (H₃PO₄) e álcool etílico (C₂H₅OH) foram adquiridos da Dinâmica (Brasil). Nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT) com dimensões médias de 6 - 9 nm x 5 μm foram obtidos da CTNano (Brasil). O poli (álcool vinílico) - PVA (MW 86 - 145 kDa) e a suspensão do polímero condutor poli (3,4-etilenodioxítiofeno) com o poliestireno sulfonado (PEDOT:PSS) (Sigma Aldrich, EUA). Todos os reagentes eram de grau analítico e foram utilizados como recebidos, com exceção do nanotubo MWCNT, que foi submetido a um processo de funcionalização sob condição ácida. Em todos os experimentos, usamos água deionizada (condutividade de 18 MΩ) de um sistema de ultrapurificação (Millipore, EUA).

5.2.1.1 Preparação do substrato de MCO

As membranas de casca de ovo utilizadas como matriz para a preparação dos eletrodos foram obtidas através de um processo de limpeza, em que, inicialmente, elas foram imersas por um período de 30 min em uma solução de HCl 1mol L⁻¹ para a degradação da estrutura calcinada. Posteriormente, as MCO foram separadas e submetidas a um prolongado processo de lavagem com água ultrapura, até a completa remoção do ácido. Na sequência, as MCO foram cortadas em pequenas tiras e colocadas em um béquer de plástico com água ultrapura e deixadas repousar por 24 h.

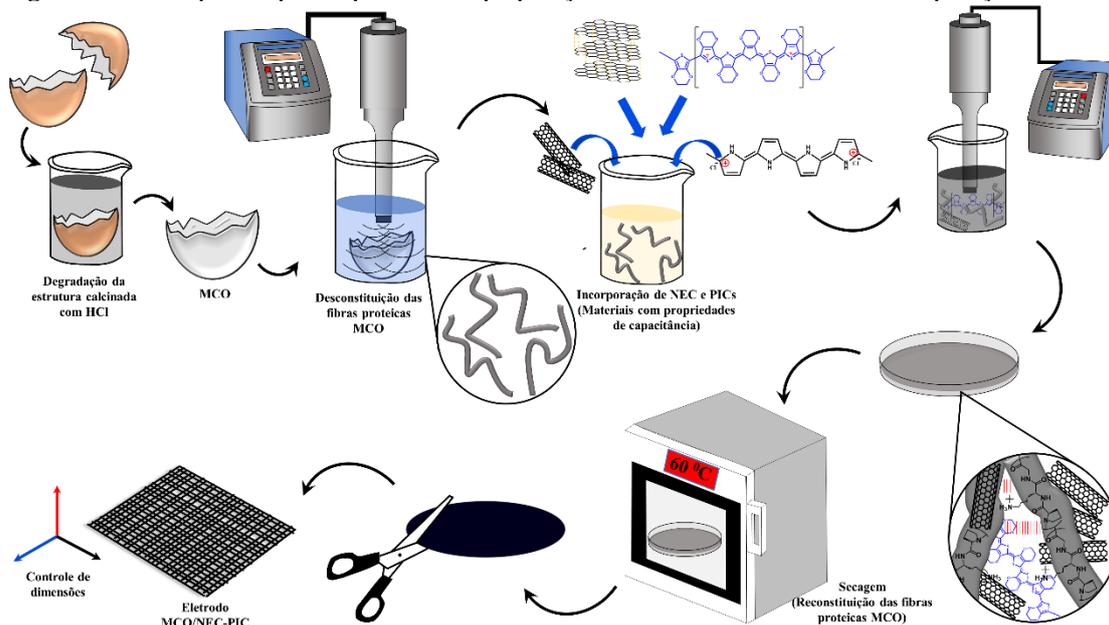
Após sua preparação, as MCO foram submetidas a um forte estresse mecânico pelo uso de uma ponteira ultrassônica Q500 (Qsonica, EUA), com uma amplitude de 60 % e um pulso variando entre 10 s por um período de 8 h. Durante esse processo, o béquer com as MCO foi mantido em um banho térmico de 10 °C, pelo uso de um controlador de temperatura FP 50 (Julabo, Alemanha) para evitar a degradação das fibras proteicas e a evaporação da água. Posteriormente, a suspensão proteica formada pelo processo de ultrassonicação foi transferida para um recipiente plástico e levada à estufa por 24 h, a

uma temperatura de 60 °C, para a evaporação da água e consequente formação/reconstituição da membrana MCO. Por fim, a membrana proteica obtida com maiores dimensões é umedecida com água e retirada do suporte plástico.

5.2.1.2 Preparação dos eletrodos flexíveis de MCO a partir da incorporação dos nanotubos de carbono e do polímero PEDOT:PSS

Para a incorporação de nanotubos nas MCO, após a etapa de desconstituição da membrana (com a suspensão das fibras proteicas) uma massa de 500 mg de nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT) foi adicionada. Em seguida, a suspensão de MCO e MWCNT foi novamente submetida à ultrassonicação a uma amplitude de 60 % e um pulso de 10 s durante um período de 30 min. Na sequência, a suspensão proteica com os MWCNT dispersos foi transferida para um recipiente plástico e levada à estufa por um período de 24 h, a uma temperatura na faixa de 60 °C para a formação do eletrodo composto MCO/MWCNT. Por fim, o eletrodo é umedecido com água e retirado do suporte plástico.

Figura 61 - Principais etapas do processo de preparação das membranas MCO e a incorporação de PICs.



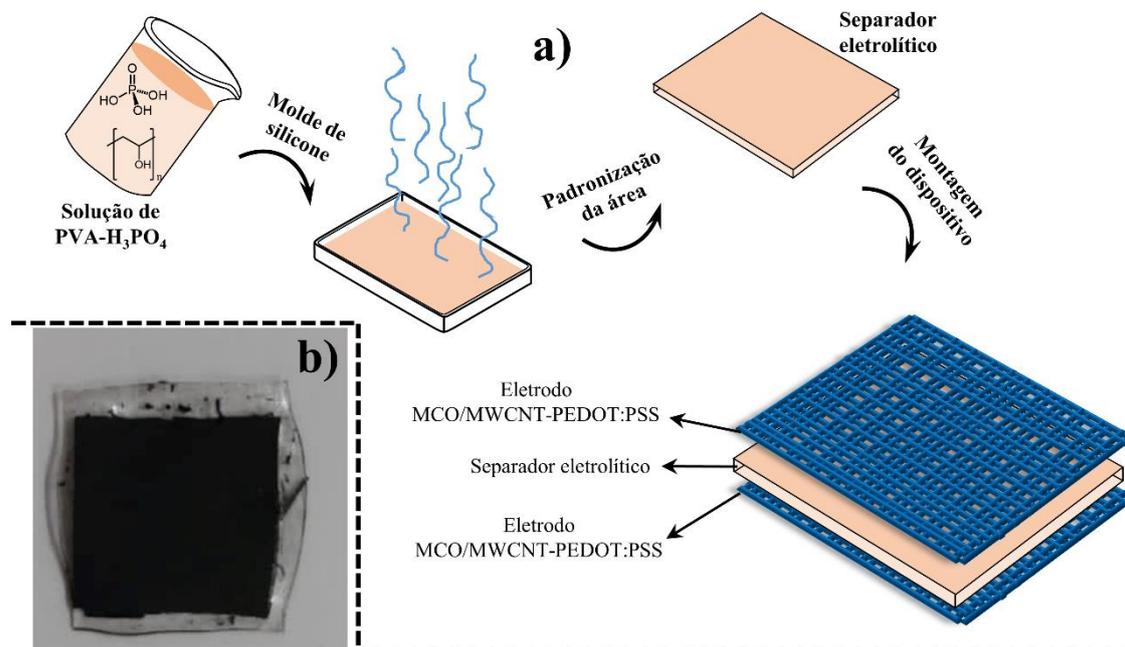
Fonte: Schematic arts (2022)

5.2.2 Métodos de caracterização

5.2.2.1 Preparação e caracterização das propriedades elétricas dos dispositivos supercapacitores orgânicos flexíveis de estado sólido

Para a fabricação dos dispositivos supercapacitores de estado sólido, foi utilizada a configuração simétrica de placas paralelas (Yang and Mai 2014), com os dois eletrodos separados por um gel semissólido de PVA - H_3PO_4 . A preparação desse gel separador polimérico semissólido saturado de eletrólito consistiu em primeiramente dispersar 1 g de PVA em 10 mL de água ultrapura, sob agitação magnética a 80 °C por 4 h. Após a dissolução do PVA, a solução é refrigerada até a temperatura ambiente, sendo em seguida adicionado 1 mL de H_3PO_4 e feita agitação magnética por 30 min. Posteriormente, um volume de 10 mL da solução foi transferido para uma placa petri de 9 mm de diâmetro e deixado repousar em condições ambientes por 72 h. Por fim, é obtido um filme translúcido e flexível, com uma espessura na faixa de 100 μm , que passou a ser utilizado como fonte de eletrólitos e separador sólido dos eletrodos de MCO modificados. Na Fig. 62 são ilustradas de forma esquemática as principais etapas seguidas para a fabricação dos diferentes SC.

Figura 62 - Representação esquemática do método adotado para a fabricação dos dispositivos supercapacitores flexíveis de estado sólido baseados nos eletrodos proteicos compostos nanoestruturados (a) e uma imagem do dispositivo (b).



Fonte: Adaptado de Silva (2019)

5.2.2.2 Caracterização dos eletrodos

A caracterização da composição dos eletrodos flexíveis nanoestruturados foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) usando pastilhas de KBr com pequenos pedaços do material, no intervalo de 4000 – 400 cm^{-1} usando um espectrômetro IR Tracer-100 (Shimadzu, Japão),

espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) utilizando um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão).

5.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia é uma técnica que permite a visualização de materiais não perceptíveis a olho nu devido a ampliação da imagem através das lentes. A microscopia é dividida em três seguimentos: a microscopia óptica, eletrônica ou de varredura por sonda. A diferença entre a microscopia óptica e eletrônica consiste na fonte de radiação, uma vez que na óptica o feixe emitido é de fóton, enquanto na eletrônica o feixe é de elétrons.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica bastante utilizada para obter características do material através de uma imagem tridimensional com alta resolução, além de fornecer informações da morfologia e da superfície da amostra. Nessa técnica a imagem é formada a partir da interação entre o feixe de elétrons incidente sobre a superfície da amostra, emitindo um sinal para o detector. Inicialmente, o feixe de elétrons é acelerado devido uma alta tensão criada entre o filamento e o ânodo, que é focalizado sobre a amostra por lentes eletromagnéticas (Dedavid, Gomes et al. 2007).

As características morfológicas dos eletrodos compósitos foram investigadas por MEV, por meio do uso de um microscópio Mira3-LM FEG (TESCAN, República Tcheca). As amostras preparadas foram submetidas ao processo de metalização, onde houve a deposição de uma fina camada de ouro utilizando um sistema de pulverização Quick Coater SC-701 (Sany Electron, Japão).

5.2.2.4 Caracterização eletroquímica dos dispositivos

Dentre as técnicas eletroquímicas, três são bastante utilizadas para análise de supercapacitores: espectroscopia de impedância elétrica (EIE), voltametria cíclica (CV) e carga/descarga galvanostática (GCD). As caracterizações eletroquímicas dos diferentes dispositivos SC foram realizadas adotando uma configuração de dois eletrodos paralelos, utilizando um potenciostato Autolab PGSTAT 302 N.

A voltametria cíclica é uma técnica eletroanalítica que estuda a estabilidade de um sistema, e fornece informações quantitativas e qualitativas através da tensão aplicada e medida a corrente no eletrodo. Nessa técnica são utilizados três eletrodos que são denominados de eletrodo de trabalho, referência e contra eletrodo. O processo consiste na varredura de potencial linear do eletrodo negativo para o positivo, e depois o contrário,

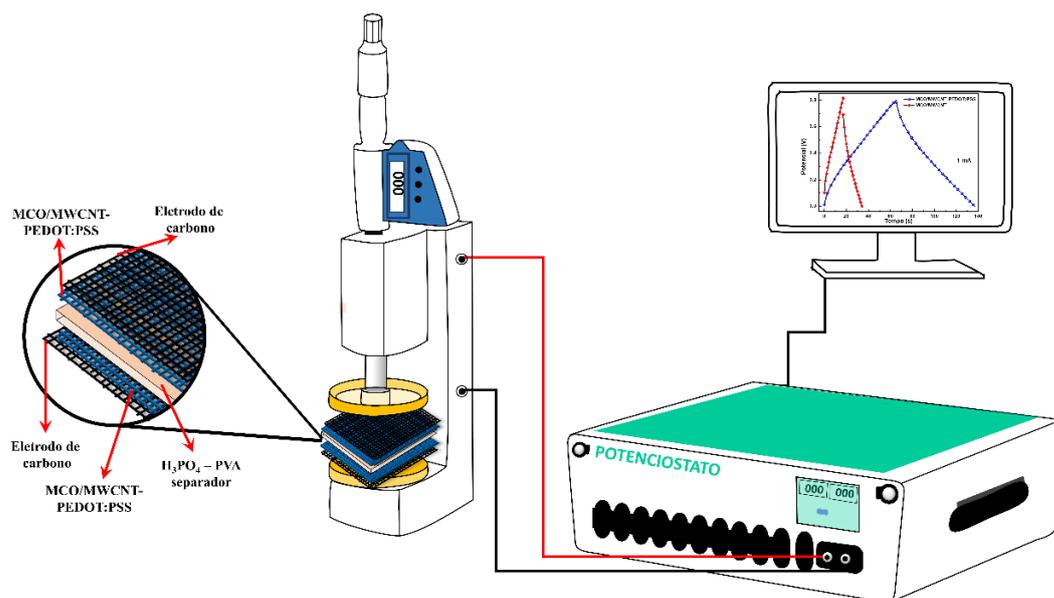
em velocidade constante no eletrodo de trabalho, e a corrente resultante é medida a cada potencial aplicado. Para que o processo de oxirredução ocorra de maneira significativa é necessária uma taxa de varredura extensa (Guy and Walker 2016, Dominko, Talian et al. 2021).

A impedância é uma medida da resistência do fluxo de corrente elétrica em um sistema. A espectroscopia de impedância (IS) realiza a análise do material através da aplicação de potencial ao eletrodo de trabalho medindo a corrente resultante. Variando a frequência do potencial elétrico aplicado, é possível calcular a impedância complexa, essa é composta pela parte real e imaginária do sistema e pode ser observado por meio do gráfico de Nyquist (Guy and Walker 2016).

Os ciclos de carga/descarga é o método mais usual para determinar a estabilidade, pois através das curvas de descarga com corrente constante é possível caracterizar os materiais (Long, Balducci et al. 2017). O processo é realizado do seguinte modo, inicialmente é aplicado no material uma densidade de corrente constante que ocasiona o aumento do potencial elétrico a um limite máximo, denominado de processo de carga. Em seguida, é aplicado a mesma densidade, mas em sentido contrário para ocorrer o processo de descarga do material (Kaur and Pal 2019).

Para realizar as caracterizações eletroquímicas dos dispositivos SC fabricados utilizamos a configuração de dois eletrodos, fazendo uso de um potenciostato Autolab PGSTAT 302 N. As curvas de voltametria cíclica (CV) foram realizadas com taxas de varredura entre 10 – 300 mV.s⁻¹. As análises galvanométricas (CGD) foram obtidas em uma faixa de potencial entre 0 – 0,8 V, com o uso de densidades de corrente variando entre 0,5 - 3 mA.cm⁻². Já as medidas de impedância elétrica dos dispositivos foram realizadas em um intervalo de frequência de 1 MHz a 1 mHz, sob um potencial de 10 mV de corrente alternada (CA). Na Fig. 63 é mostrada de forma esquemática a configuração adotada para a realização das caracterizações eletroquímicas.

Figura 63 - Representação esquemática da configuração experimental adotada para a caracterização eletroquímica dos dispositivos.



Fonte: Adaptado de Silva (2019)

Por capacitância, se entende a capacidade que um dispositivo possui de armazenar carga elétrica (Long, Balducci et al. 2017). A capacitância do dispositivo em função da área volumétrica foi calculada a partir dos dados da galvanometria, de acordo com (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018)

$$C_v = \frac{2 * D_{ar} * I}{V^2 * v} \quad (20)$$

onde V é a diferença de potencial (em Volts), após a queda de IR (associada à resistência interna dos dispositivos) (Stoller and Ruoff 2010), v é a área volumétrica do eletrodo (em cm^3), I é a corrente aplicada à descarga, e D_{ar} é a área sob a curva de descarga, obtida pela integração da curva de descarga.

Para a construção do diagrama de Ragone (Christen and Carlen 2000), a densidade de energia foi determinada de acordo com (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018),

$$E_D = \frac{C_{ar} * V^2}{2 * 3600} , \quad (21)$$

enquanto a densidade de potência é dada por (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018)

$$P_D = \frac{3600 * E_D}{\Delta t} \quad (22)$$

onde E_D é a densidade de energia dada em $W.h.cm^{-3}$, P_D a densidade de potência em $W.cm^{-3}$, V a diferença de potencial (em Volts), Δt o tempo de descarga do dispositivo, e C_V a capacitância calculada de acordo com a Eq. 20.

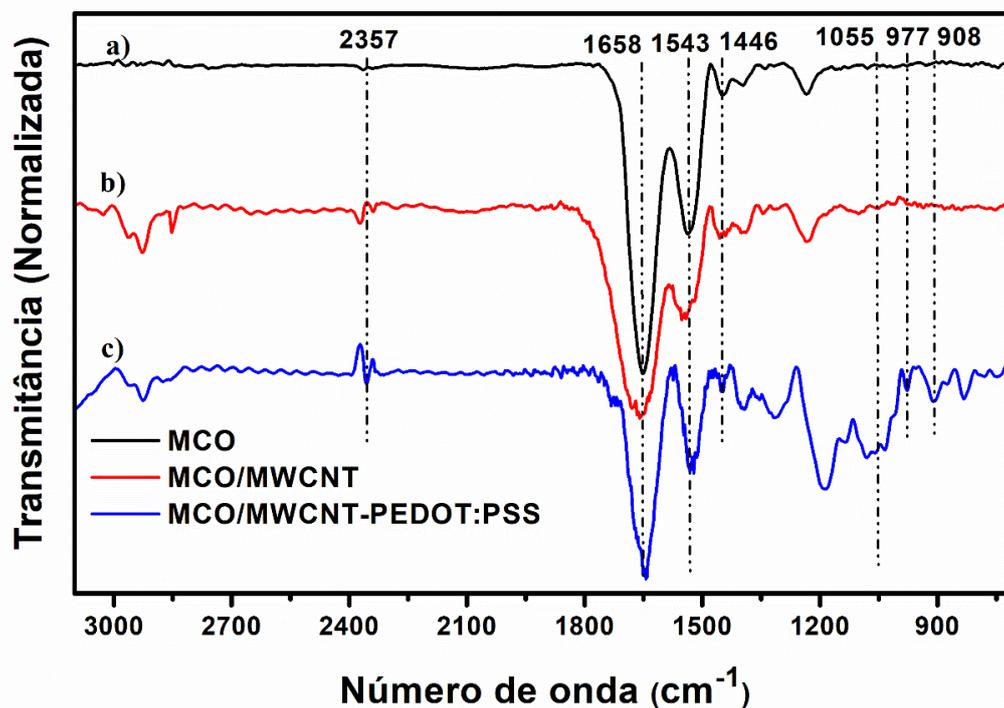
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização dos eletrodos MCO/MWCNT-PEDOT:PSS

A razão para a escolha da MCO como sendo o substrato flexível para a deposição dos materiais ativos (nanotubos e PEDOT:PSS) ocorreu devido à sua complexa arquitetura interna, como uma matriz hierárquica de fibras macroporosas. Além disso, por ser constituída de aminoácidos proteicos, a MCO possui uma grande variedade de grupos funcionais ativos capazes de estabelecer interações eletrostáticas e não covalentes com diferentes nanoestruturas ou moléculas. Essa característica química possibilita a eliminação de etapas adicionais de funcionalização desses materiais para interagirem com nanoestruturas.

Na Fig. 64 são mostrados os espectros FTIR dos diferentes eletrodos compósitos fabricados. Na curva (a), podem ser observados os picos das vibrações características da MCO, como o modo de alongamento em 1658 cm^{-1} da $C=O$ na amida I, e o modo de flexão em 1543 cm^{-1} , referente à ligação N-H na amida II (Hsieh, Chou et al. 2013, Liu, Luo et al. 2017). Já na curva (b), após a incorporação nos MWCNT na MCO há o aparecimento de um pico em 2357 cm^{-1} , que é associado ao estiramento O-H dos grupos carboxílicos fortemente ligados às nanoestruturas de carbono (associados com a funcionalização dos nanotubos) (Yee, Mubarak et al. 2018). Por fim, na curva (c), correspondente ao eletrodo em sua forma final, a presença do PEDOT é confirmada pela presença dos picos em 1055 cm^{-1} , 977 cm^{-1} , e 984 cm^{-1} , sendo a primeira referente à vibração de alongamento dos grupos etilenodioxilos e as duas últimas à vibração C-S do anel tiofeno (Cho, Wu et al. 2015, Xie, Xu et al. 2016). Deste modo, é possível afirmar que foi possível produzir as membranas MCO compósitas e incorporar as NECs, neste caso especificamente os MWCNT, e o polímero condutor PEDOT:PSS na MCO, obtendo eletrodos orgânicos flexíveis, como esperado.

Figura 64 - Os espectros FTIR da MCO pura (a), com a incorporação de nanotubos de carbono MCO/MWCNT (b), e de nanotubos e PEDOT:PSS MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (c).

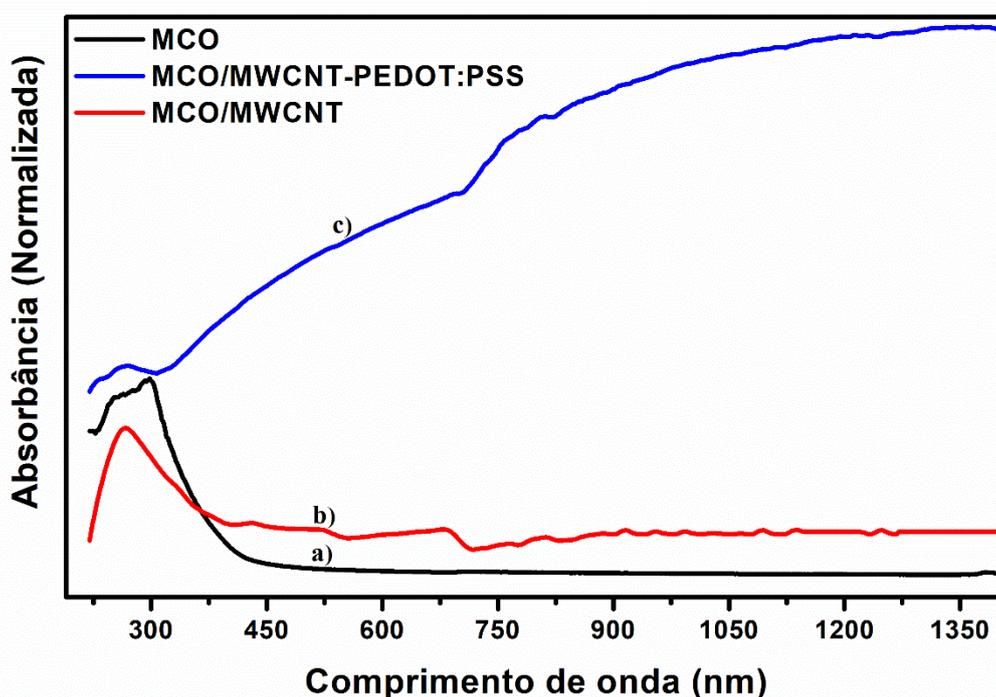


Fonte: A autora (2022)

Além de permitir a identificação da composição química de amostras, a espectroscopia UV-Vis permite acompanhar a modificação de propriedades adicionais de muitos polímeros condutores. Na Fig. 65 são mostrados os espectros de absorção para as membranas MCO pura (sem a incorporação de outros materiais), após o processo de preparação ultrassônico (curva a), e para os eletrodos proteicos compósitos MCO/MWCNT (curva b) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (curva c). Como pode ser observado, para a membrana MCO, mesmo após o processo de desconstituição/reconstituição por ultrassom, a banda de absorção característica centrada em 300 nm se manteve presente (Zhang, Li et al. 2014). Já com a incorporação dos MWCNT (Fig. 65b) à estrutura das MCO, verifica-se que apenas a banda das MCO é observada. Por outro lado, para os eletrodos com a incorporação da suspensão do polímero condutor PEDOT:PSS, é possível notar tanto a banda em 300 nm da MCO quanto uma ampla banda de absorção que se inicia na região visível e cobre toda a faixa NIR do equipamento (até 1400 nm). A presença dessa larga banda na região do infravermelho é característica da presença de uma grande quantidade de bipólaron na estrutura polimérica do PEDOT (Stepien, Roch et al. 2016, Li and Ma 2017), uma vez que, em seu estado neutro (ou seja, na forma reduzida, sem a presença de defeitos), o espectro do PEDOT apresenta uma banda bem definida em 600 nm, enquanto com a

cadeia parcialmente oxidada (com a presença de pólarons), há a formação de uma banda centrada em 900 nm (Massonnet, Carella et al. 2014, Stepien, Roch et al. 2016, Shi, Yao et al. 2017). Como essas condições não foram identificadas no espectro UV-Vis, podemos afirmar que o PEDOT incorporado não sofreu alteração em seu estado de oxidação durante o processo. Esses resultados estão em concordância com os resultados de FTIR, revelando que de fato foi possível a incorporação e eficiente dispersão de nanoestruturas de carbono e polímeros condutores na matriz proteica das membranas MCO.

Figura 65 - Espectros de UV-Vis: da MCO pura (a), com a incorporação de nanotubos de carbono MCO/MWCNT (b), e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (c).

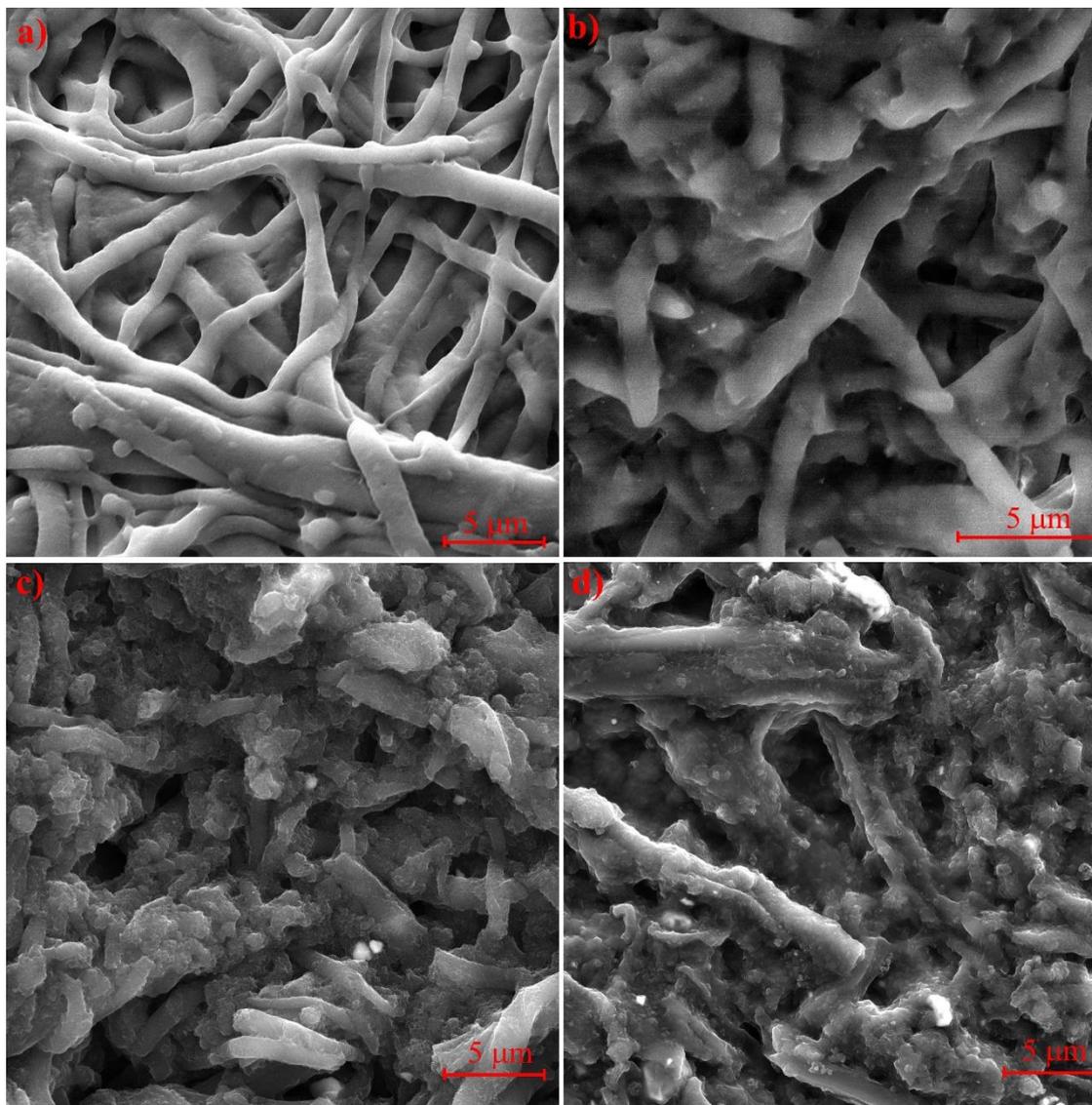


Fonte: A autora (2022)

As micrografias de MEV com alta ampliação obtidas para as membranas MCO *in natura* (Fig. 66a) e após o processo de desconstituição/reconstituição por ultrassom (Fig. 66b) mostram que a morfologia não é alterada de forma significativa. As fibras de proteínas são reticuladas e distribuídas aleatoriamente, com diâmetros na escala micrométrica e com a superfície das fibras sendo essencialmente lisa, sem evidência de uma topografia ou padrão peculiar. Para os eletrodos com a incorporação de MWCNT (Fig. 66c) é possível observar uma distribuição com grande uniformidade e quantidade dos nanotubos em toda a área da MCO. O mesmo comportamento de uniformidade na distribuição também é observado para os eletrodos com a incorporação de MWCNT-PEDOT:PSS (Fig. 66d). Contudo, visualmente, as micrografias indicam uma aparente

perda de porosidade para esses eletrodos, o que se justifica pelo fato de que o PEDOT:PSS adicionado esteja possivelmente preenchendo os poros.

Figura 66 - As micrografias de MEV da superfície das membranas MCO in natura (a), após o processo de desreticulação por estresse mecânico ultrassom e sua reconstituição (b), e os eletrodos de MCO com a incorporação de nanotubos de carbono MCO/MWCNT (c), e PEDOT:PSS MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (d).



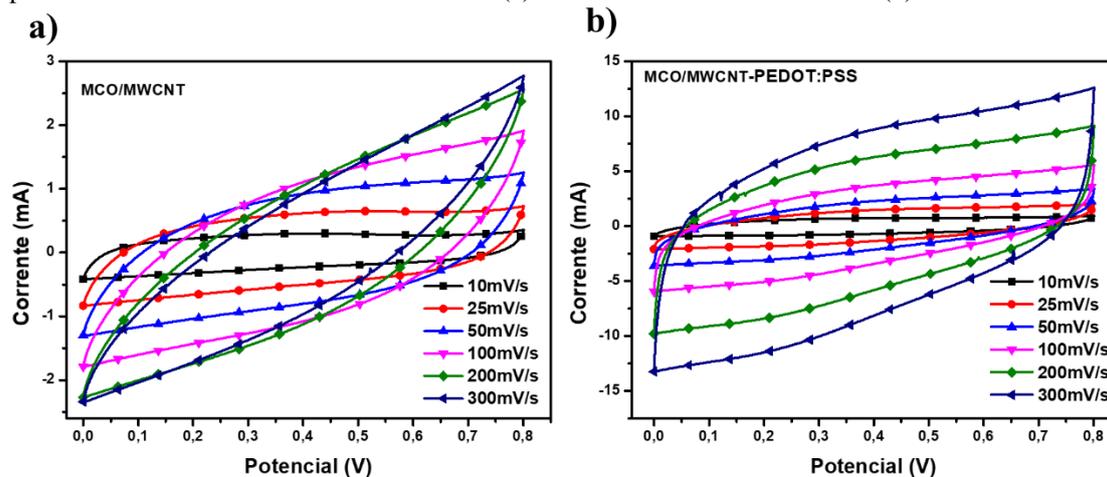
Fonte: A autora (2022)

5.3.2 Caracterização eletroquímica dos SC baseados em MCO/NEC/PEDOT

Após realizar as análises relativas às caracterizações química e morfológica dos eletrodos, examinamos o potencial de sua aplicação em dispositivos orgânicos. Para isso, em um sistema modelo, utilizamos as membranas MCO modificadas na preparação de supercapacitores simétricos, com os eletrodos consistindo em duas membranas MCO modificadas com MWCNT/PEDOT idênticas, com dimensões 2,0 cm x 2,0 cm, separadas

por um gel eletrólito sólido de (PVA + H₃PO₄). Para determinar suas características eletroquímicas, usando uma taxa de varredura variando na faixa de 10 mV.s⁻¹ a 300 mV.s⁻¹ obtivemos curvas de voltametria cíclica para os dispositivos preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (Fig. 67a) e os MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (Fig. 67b). Como esperado, em ambos os dispositivos ocorreu o armazenamento de carga, com as curvas CVs apresentando histerese (Marcelina, Syakir et al. 2017).

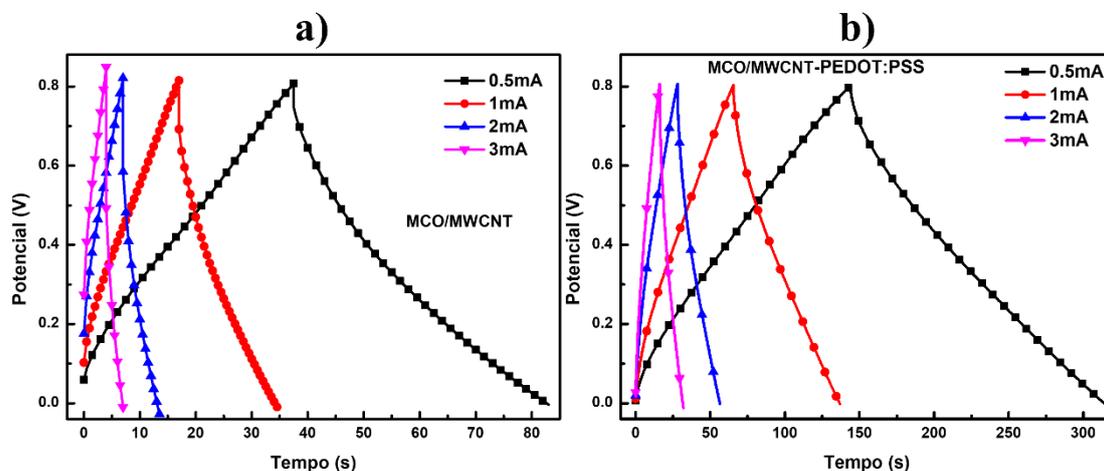
Figura 67 - As curvas de voltametria cíclica em diferentes taxas de varredura para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/MWCNT (a) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (b).



Fonte: A autora (2022)

Foram também realizadas análises de carga e descarga galvanostática (GCD) dos dispositivos. O que nos permitiu avaliar a capacitância dos dispositivos através do cálculo das áreas de descarga. O conjunto completo de curvas GCD obtidas para todos os dispositivos em diferentes densidades de corrente é mostrado na Fig. 68.

Figura 68 - Curvas galvanométricas obtidas a diferentes valores de corrente para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/MWCNT (a) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (b).

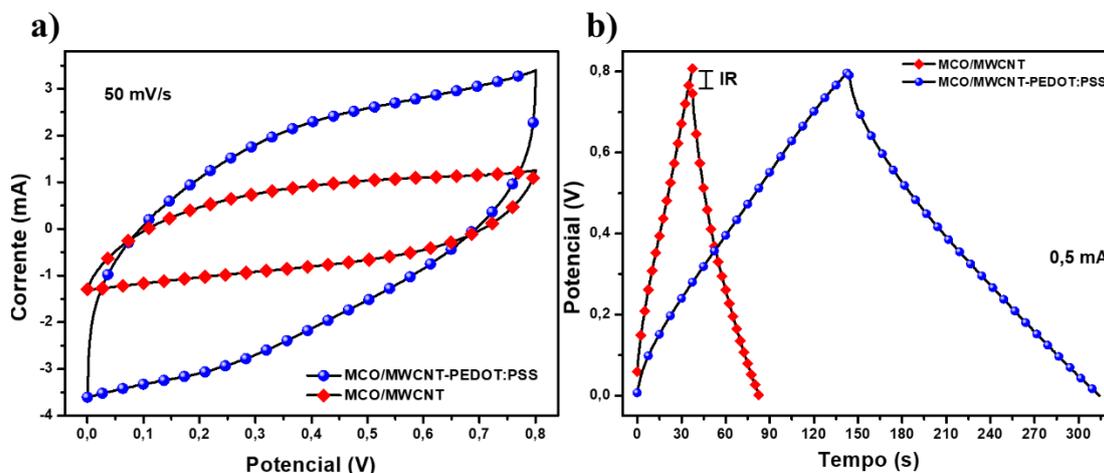


Fonte: A autora (2022)

Para efeito de comparação, na Fig. 69 são mostradas as curvas CV e de GCD coletadas para os diferentes dispositivos com as mesmas velocidades de varredura (50 mV.s^{-1}) e densidade de corrente ($0,5 \text{ mA}$), respectivamente. Nas curvas CV correspondentes (Fig. 69a), pode ser observado que os dispositivos preparados com os eletrodos MCO/MWCNT-PEDOT:PSS apresentaram uma maior área de histerese que aqueles em que os eletrodos MCO/MWCNT foram usados, indicando uma maior capacidade de armazenamento de carga. Isso está de acordo com o esperado, uma vez que os SC de MCO/MWCNT-PEDOT:PSS apresentam tanto o armazenamento não-faradaico, (EDLC) proveniente das nanoestruturas de carbono (MWCNT, neste caso específico), como o faradaico (pseudo-capacitância), intrínseco dos PICs por suas propriedades oxirredutivas (neste caso, especificamente o PEDOT) (Lota, Khomenko et al. 2004). Deve ser notado que a forma oblíqua da curva da CV dos SC de MCO/MWCNT revela ser alta a resistência interna do dispositivo, o que diminui a eficiência de transferência de carga e, conseqüentemente, a capacidade de armazenamento de energia.

Para as curvas GCD dos dois dispositivos (Fig. 69b), as curvas de carga/descarga tendem a segmentos retilíneos, ou seja, curvas com uma inclinação definida única, o que indica uma taxa de descarga constante. Contudo, ao compararmos as duas curvas podemos observar que para os dispositivos de MCO/MWCNT-PEDOT:PSS a queda ôhmica (IR) é muito pequena (isto é, a tensão inicial de descarga coincide com a tensão limite do processo de carregamento), ao contrário do que ocorre para os dispositivos MCO/MWCNT (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018). Essa pequena queda IR para os dispositivos de MCO/MWCNT-PEDOT:PSS é indicativo da ocorrência de uma perda desprezível associada a resistências internas, e de que há tanto uma boa difusão dos íons eletrolíticos como um rápido acúmulo de cargas na superfície de contato entre o gel eletrolítico e os eletrodos (Mei, Munteshari et al. 2018). Isso também confirma que os eletrodos orgânicos flexíveis baseados em MCO/NECs/PICs têm baixa resistência, o que é uma vantagem importante para dispositivos de SC. Portanto, esses SCs híbridos (NECs+PICs) produzidos a partir do processo de ultrassonicação de membranas proteicas aparecem como dispositivos eletroquímicos muito promissores para aplicações de armazenamento de energia (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018).

Figura 69 - As curvas de voltametria cíclica com uma taxa de varredura de 50 mV.s^{-1} (a), e as curvas galvanométricas obtidas com corrente de $0,5 \text{ mA}$ (b), para os dispositivos preparados com os eletrodos MCO/MWCNT e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS.



Fonte: A autora (2022)

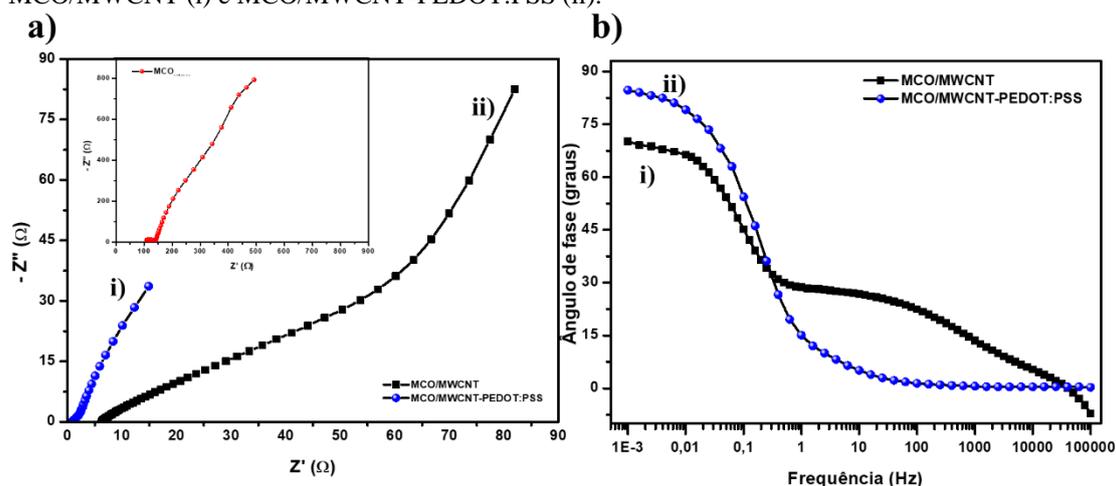
Deve-se notar também que, além das características lineares das curvas de descarga, os dispositivos preparados com eletrodos MCO modificados com MWCNT-PEDOT:PSS exibiram um maior tempo de descarga, portanto, um desempenho mais alto para armazenamento de energia devido à maior capacitância específica correspondente. Deste modo, as contribuições simultâneas dos processos EDLC, que estão associados aos derivados de carbono incorporados, e dos mecanismos de pseudo-capacitância, que se devem à fração MCO/PEDOT:PSS, fazem com que os dispositivos obtidos tenham um desempenho eletroquímico mais eficiente.

Na Fig. 70 são mostradas as medidas de impedância elétrica (Fig. 70a) e o comportamento do ângulo de fase (Fig. 70b) para os diferentes dispositivos utilizados. A medição da impedância das amostras expressa em termos de gráficos de Nyquist (Mei, Munteshari et al. 2018) (Fig. 70a) é capaz de fornecer informações sobre as propriedades elétricas desses dispositivos, com a resistência dos dispositivos podendo ser obtida a partir da interseção das curvas $-Z''(\Omega)$ com o eixo $Z'(\Omega)$. Como pode ser visto, a resistência dos diferentes dispositivos apresenta um valor na ordem de 1Ω para os dispositivos de MCO/MWCNT-PEDOT:PSS e de 8Ω para os de MCO/MWCNT, uma variação relativamente pequena dos valores que revela serem boas as propriedades elétricas correspondentes. Isso deve resultar da ótima dispersão e da interação sinérgica entre o PEDOT:PSS e os MWCNT incorporados nas membranas proteicas de MCO por meio do processo de ultrassonicação. Com relação à resistência elétrica, o valor insignificante da queda de IR observada (que é praticamente nula para os eletrodos

MCO/MWCNT-PEDOT:PSS) nas curvas GCD é uma consequência da alta condutividade dos eletrodos utilizados. Por outro lado, na região de baixas frequências pode ser observado que a pente é quase reta, em uma indicação da existência de um comportamento capacitivo. A principal diferença entre MCO/MWCNT-PEDOT:PSS e MCO/MWCNT se deve a que este último tipo de dispositivo possui uma menor pente, indicando um comportamento menos capacitivo.

Esse comportamento capacitivo pode ser claramente identificado pelas análises do ângulo de fase dos SCs em função da frequência (Fig. 70b). Como pode ser observado, é na região de baixas frequências se dá a interseção com o eixo Y, sendo esse ângulo de 84° e 70° graus para o dispositivo MCO/MWCNT-PEDOT:PSS e MCO/MWCNT, respectivamente. O aumento no valor do ângulo de fase (que deve ser próximo de 90° para um capacitor ideal) indica a melhora das propriedades capacitivas ao incluir o polímero condutor na membrana. Além disso, a partir desse mesmo gráfico é possível calcular o tempo de relaxação dielétrica (τ_0), ou seja, o tempo no qual pode ser operado um supercapacitor com pelo menos 50 % de carga. Os valores para o ângulo de fase a -45° oferecem um valor de 6 s para MCO/MWCNT-PEDOT:PSS e de 10 segundos para MCO/MWCNT. Isso indica que a amostra sem o polímero tem os processos cinéticos mais lentos devido a uma mais alta resistência a processos de transferência de carga.

Figura 70 - (a) A impedância elétrica dos dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii) (no detalhe, a impedância elétrica para a membrana MCO pura); (b) O ângulo de fase em função da frequência para os dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii).



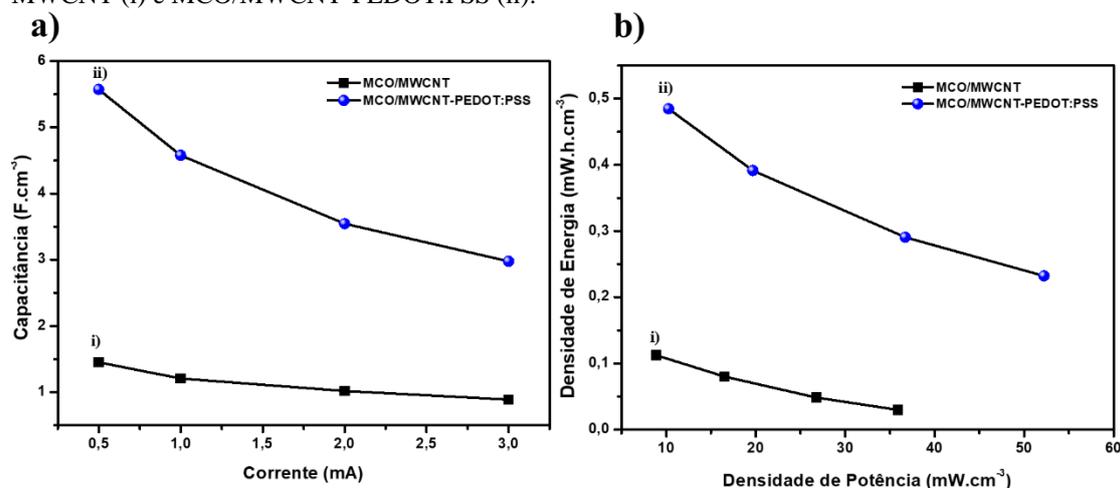
Fonte: A autora (2022)

Na Fig. 71a é mostrada a capacitância por área calculada a partir da Eq. 20 (Sen and De 2010) para os diferentes SCs. Para uma densidade de corrente de $0,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, os

dispositivos MCO/MWCNT e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS apresentaram o máximo valor de capacitância de 1,4 F.cm⁻³ e 5,5 F.cm⁻³, respectivamente. Contudo, a capacitância se reduz à medida que a densidade de corrente aplicada aumenta. No caso das duas exemplificações (MCO/MWCNT e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS), a capacitância passa de 1,4 F.cm⁻³ e 5,5 F.cm⁻³ para 0,88 F.cm⁻³ e 2,9 F.cm⁻³, respectivamente, quando a densidade aumenta de 0,5 mA.cm⁻² para 3 mA.cm⁻², ou seja, ocorre uma redução de mais 37 %. Esse comportamento pode estar associado a dois fatos. O primeiro se refere à velocidade dos processos de oxirredução (do PEDOT) responsáveis pela parte de armazenamento pseudo-capacitivo. Por serem esses processos lentos, em altas densidades de corrente nem todas as reações eletroquímicas acabam ocorrendo na totalidade de sítios disponíveis no eletrodo (Sarkar and Khan 2018). Em um segundo ponto, para elevadas densidades de corrente os íons eletrolíticos (H₃PO₄) não dispõem de tempo suficiente para penetrar ao longo dos poros e ter acesso aos sítios internos, levando a um acúmulo de carga apenas nos sítios dispostos na superfície dos eletrodos (Kularatna 2014).

Por meio do uso das Eqs. 21 e 22, pudemos estimar tanto a densidade de potência (DP) quanto a densidade de energia (DE) dos dispositivos MCO/MWCNT e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS, com as quais foram construídos os diagramas de Ragone correspondentes (Fig. 71b). É importante ressaltar que o diagrama de Ragone é uma ferramenta importante para a comparação das propriedades de armazenamento dos mais variados dispositivos (baterias, capacitores, células combustíveis, entre outros). Conceitualmente, nesse tipo de diagrama é mostrado para um dado dispositivo a quantidade de energia que pode ser armazenada (eixo Y), e a rapidez com que a energia pode ser fornecida (eixo X) (Kularatna 2014). Desse modo, como no caso da capacitância, no diagrama de Ragone vemos que a densidade de energia e a potência dos dispositivos (com corrente 0,5 mA) que utilizam os eletrodos de MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (DE = 0,49 mW.h.cm⁻³; DP = 10,26 mW.cm⁻³) apresentam os maiores valores, enquanto para os eletrodos MCO/MWCNT exibem valores menores (DE = 0,11 mW.h.cm⁻³; DP = 8,87 mW.cm⁻³).

Figura 71 - (a) A capacitância volumétrica em função da densidade de corrente aplicada para os dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii); (b) O diagrama de Ragone para os dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/MWCNT (i) e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (ii).



Fonte: A autora (2022)

5.3.3 Ensaios de ciclabilidade e estabilidade mecânica

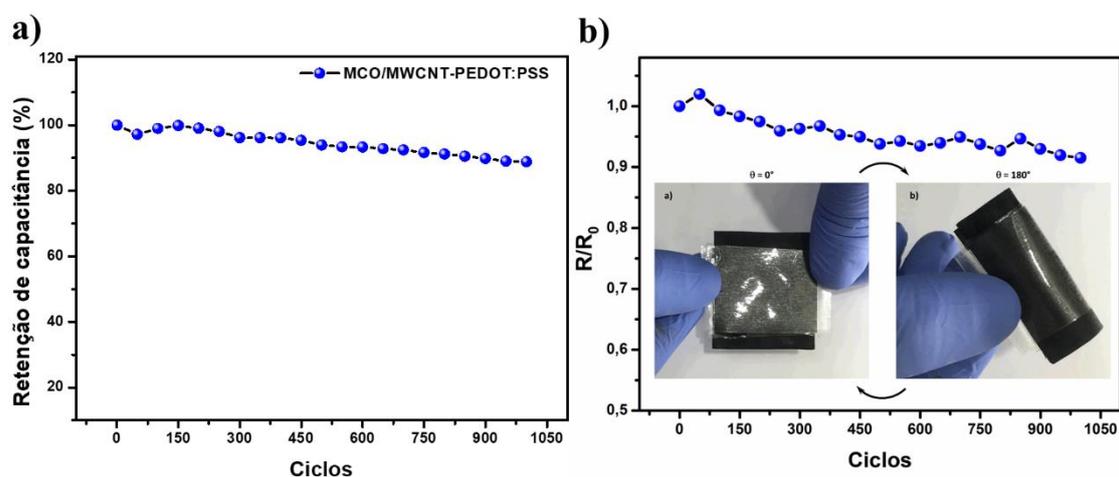
É sabido que o desempenho de um dispositivo SC não pode ser avaliado tendo apenas como base os valores dos parâmetros intrínsecos como acumulação de carga, como densidade de energia, capacitância específica e densidade de potência. De fato, outros fatores práticos de operação de um SC, como sua estabilidade a excessivos ciclos de trabalho (carga/descarga), e, no caso de dispositivos flexíveis (dobráveis), principalmente sua resistência mecânica a ensaios de sucessivas flexões, isto é, o quanto as mudanças conformacionais e tensões mecânicas a que o dispositivo é submetido influenciam seu desempenho elétrico. Um bom supercapacitor flexível deve ser capaz de preservar suas propriedades eletroquímicas sob um uso contínuo (repetidos ciclos de carga/descarga) e permanente estresse mecânico.

Por essas razões, realizamos ensaios para avaliar o desempenho do dispositivo modelo MCO/MWCNT-PEDOT:PSS, ao medir suas propriedades elétricas enquanto submetido a 1000 ciclos de carga/descarga com uma densidade de corrente de 3 mA.cm⁻², e a 1000 operações consecutivas de dobragem de 0 a 180 °. Na Fig. 72a é mostrado o comportamento capacitivo em função do número de ciclos de carga/descarga do SC. Como pode ser visto, a capacitância do dispositivo MCO/MWCNT-PEDOT:PSS é minimamente afetada pelos ciclos repetidos de carga/descarga, se mantendo superior a 89 % do seu valor inicial mesmo após os 1000 ciclos. Isso mostra que o dispositivo apresenta uma boa estabilidade e pode ser usado de forma prolongada, se comparado com outros

dispositivos SCs baseados em PEDOT, como aquele relatado por Sen e colaboradores (Sen and De 2010), que apresenta a retenção de 84 % da capacitância após 500 ciclos de carga/descarga. Enquanto isso, nos trabalhos de Fu (Fu, Li et al. 2016, Fu, Zhou et al. 2016), Tang (Tang, Han et al. 2014), Xie (Xie, Du et al. 2015), e Xu (Xu, Huang et al. 2014), são reportadas retenções na faixa de 80 % – 89 % para um número de 2000 ciclos. É possível também encontrar valores de retenção abaixo dos 70 % (Liu 2008, Suppes, Cameron et al. 2010, Pandey and Rastogi 2012, Hsu, Chen et al. 2013), e outros superiores a 95 % (Zhou, Han et al. 2014, Kurra, Wang et al. 2015, Qu, Cheng et al. 2016), mostrando uma maior estabilidade capacitiva desses dispositivos.

Do mesmo modo, nas análises de estabilidade de flexão (dobramento) do dispositivo (Fig. 72b), a resistência total do dispositivo MCO/MWCNT-PEDOT:PSS é pouco afetada mesmo após 1000 ciclos consecutivos. Assim, os resultados demonstram que os eletrodos compósitos de MCO preparados a partir do processo de ultrassonicação combinam boas características elétricas e uma resistência física com boa estabilidade, o que permite que venham a ser usados na preparação de dispositivos de armazenamento flexíveis, assim como em outras áreas da eletrônica orgânica. No detalhe da Fig. 56b é mostrado o SC de MCO/MWCNT-PEDOT:PSS em seu estado estendido (0°), e dobrado a 180° .

Figura 72 - Eficiência de retenção da capacitância (carga-descarga) dos dispositivos SCs preparados com eletrodos MCO/MWCNT-PEDOT:PSS (a), e variação da resistência elétrica dos dispositivos SCs para dobramento de 0° a 180° para 1000 ciclos consecutivos de dobramentos, respectivamente (b).



Fonte: A autora (2022)

5.4 CONCLUSÃO

Neste capítulo apresentamos um método novo, simples, e de baixo custo para a preparação de eletrodos orgânicos flexíveis a partir do processo de ultrassonicação de membranas proteicas da casca do ovo, com a incorporação de nanoestruturas de carbono e PEDOT:PSS. Os resultados apresentados demonstram que através dessa metodologia é possível estabelecer a área de trabalho requerida, delimitar a espessura, como também realizar a incorporação de diversos materiais capacitivos com apenas uma etapa.

Através das caracterizações químicas e morfológicas como espectroscopia de UV-Vis, FTIR, e MEV foi confirmada a incorporação das nanoestruturas de carbono e do polímero condutor a matriz proteica. Por sua vez, os resultados eletroquímicos mostraram que a membrana compósita apresenta ótimas características, como baixa resistência elétrica (1Ω e 8Ω para os dispositivos MCO/MWCNT e MCO/MWCNT-PEDOT:PSS, respectivamente) e de boa capacitância volumétrica de $1,4 \text{ F.cm}^{-3}$ para MCO/MWCNT e $5,5 \text{ F.cm}^{-3}$ para MCO/MWCNT-PEDOT:PSS.

É importante ressaltar que embora o processo de estresse mecânico por ultrassonicação tenha sido aplicado para a construção de eletrodos orgânicos flexíveis a serem usados em dispositivos de armazenamento de carga, ele pode ser adaptado de modo a encontrar aplicação em outros tipos de dispositivos, como baterias, sensores, e células solares.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ao longo deste trabalho, foram mostrados detalhes dos trabalhos de síntese e caracterização de diferentes materiais nanoestruturados, como o nanocompósito magnético óxido de ferro/quitosana/polianilina, membranas de casca de ovo com nanotubos de carbono multicamadas e PEDOT:PSS, e filmes de NPs de Au sobre os substratos de vidro funcionalizados. Foram também apresentadas as respectivas aplicações para a remoção de contaminantes, extração e purificação de DNA, armazenamento de energia e sensoriamento.

O nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ foi sintetizado por co-precipitação, a partir da polimerização das NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}$. O nanocompósito apresenta uma síntese fácil, e por conta de seu núcleo magnético pode ser separado do meio líquido pela ação de um ímã externo. Ele se mostrou promissor como um material abrangente para uso como adsorvente de fase sólida para a remoção de contaminantes de meio aquoso, assim como para a extração e purificação de DNA a partir de amostras de sangue humano.

Esse nanocompósito foi capaz de adsorver corantes aniônicos como alaranjado de metila e índigo carmim, bem como o corante catiônico rodamina B, com ótimos resultados para a capacidade de adsorção, que foi de 147 mg/g para o alaranjado de metila, 126 mg/g para o índigo carmim e 80 mg/g para rodamina. Acreditamos que as perspectivas de continuidade para essa linha de trabalho seja:

- Uso do NCM como adsorvente de outros contaminantes como, por exemplo, metais pesados, agrotóxicos.
- Uso do nanocompósito com uma amostra real para avaliar sua eficiência e possível incorporação a protocolos de tratamento de águas residuárias.

Quando aplicado na extração de DNA a partir de um meio complexo, como o sangue humano, o NCM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Qui}/\text{Pani}$ apresenta um rendimento excelente de 13 μg quando comparado com outros adsorventes. Tanto o valor do rendimento quanto da pureza são competitivos quando comparado com o de kits comerciais, que têm como agentes adsorventes membranas ou partículas. A qualidade do DNA extraído permitiu a realização bem-sucedida de análises de biologia molecular, como PCR e eletroforese. O NCM não inibiu a reação da PCR, sendo também possível aplicá-lo diretamente na reação, dispensando a etapa de eluição. Além disso, obtivemos amostras de DNA íntegras e de boa qualidade, sem a necessidade de usar reagentes tóxicos como fenol, guanidina e

brometo de etídio. Desse modo, acreditamos que as principais perspectivas dessa linha são:

- Desenvolver protocolos eficientes para extração de DNA de diferentes origens como cabelo, saliva, bactérias, sêmen, plantas.
- Avaliar a aplicação do NCM em protocolos de adsorção de outras biomoléculas como hormônios, proteínas, RNA.

Em seguida, estabelecemos um novo processo para a fabricação de eletrodos orgânicos flexíveis compostos por membrana de casca de ovo, nanotubos de carbono multicamadas e PEDOT, e demonstramos sua aplicabilidade utilizando na preparação de dispositivos supercapacitores. Além de ser uma metodologia simples, rápida e de baixo custo, por meio dessa rota é possível adicionar múltiplos materiais capacitivos em apenas uma única etapa, com controle da área, espessura, concentração de materiais ativos (capacitivos) dos eletrodos. Por meio de diferentes técnicas de caracterização, foi possível comprovar a estrutura morfológica e a composição química dos eletrodos compósitos, e caracterizações eletroquímicas que foram usadas para caracterizar as propriedades de armazenamento de carga dos dispositivos fabricados a partir desses novos eletrodos. Os resultados demonstraram que tais dispositivos possuem uma boa capacitância volumétrica, uma baixa resistência interna, boa estabilidade eletroquímica (ciclabilidade – carga/descarga) e mecânica (flexionamento de 0 – 180 °), e que confirmam a viabilidade da utilização desta nova metodologia para a obtenção de eletrodos com propriedades elétricas e mecânicas satisfatórias, que podem vir a serem utilizados em eletrônica orgânica. Com isso, temos como perspectivas para este trabalho:

- Otimização dos parâmetros de concentração de nanotubos de carbono multicamadas, concentração de PEDOT:PSS, espessura do eletrodo.
- Incorporação de outros polímeros condutores, como polipirrol e polianilina.
- Incorporação de outras nanoestruturas, como nanotubos de uma camada (SW), grafeno, MXenes, entre outros.
- Realizar a caracterização das propriedades mecânicas.

Por fim, iniciamos o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico molecular baseada na imobilização covalente de sondas de DNA tioladas. Buscamos neste trabalho o desenvolvimentos de novos protocolos simples, rápidos, e de baixo custo para o diagnóstico simplificado de doenças infecciosas ou genéticas em pontos primários

de atendimento (possibilitando, em especial, maneiras de prevenção ou tratamento dessas doenças ainda em um estágio inicial), para o monitoramento ambiental e para uma rápida identificação de patógenos pela indústria alimentar, uma vez que a plataforma tem caráter universal, ou seja, o elemento de sensoriamento genético (a sonda de DNA) pode ser facilmente trocada por outra referente a doença que se tem como objetivo detectar. Ou ainda usar aptâmeros para detecção de íons de metais pesados, moléculas organofosfatados entre outros. Além do mais, o atual mecanismo de detecção (ótico), pode ser adaptado para um mecanismo elétrico, por exemplo a resposta impedimétrica quando eletrodos são funcionalizados com esses filmes de NPs Au.

Atualmente, nesta metodologia conseguimos estabelecer um protocolo reprodutível de funcionalização da superfície com grupos tióis e aminas através da deposição por fase vapor utilizando MPTS e APTS. Posteriormente, foi possível estabelecer o método para formação do filme de NPs de Au sobre as lâminas funcionalizadas, e a imobilização de sondas tioladas para o sensoriamento de *Leishmania infantum*, por meio da interação Au-S. Os resultados obtidos demonstram que a plataforma pode ser usada como um sistema de detecção dual, fundamentado através das técnicas de espectroscopia UV-Vis e de fluorescência. Contudo, esse é um trabalho de natureza extensiva, sendo necessário realizar provas dos conceitos para a etapa de hibridização antes de otimizar o sistema. Além do mais, vale ressaltar que a escolha do protozoário da Leishmaniose se dá pelo fato de ser uma doença negligenciada a nível mundial, e a toxicidade elevada dos fármacos de segunda linha. Diante do apresentado, temos como perspectivas:

- Otimizar o processo de imobilização das sondas tioladas, descobrindo qual a melhor concentração de sonda para a plataforma, a cinética de imobilização.
- Continuar a etapa de adição dos bloqueadores, descobrir o melhor tempo de deposição.
- Estudar o procedimento de hibridização, como concentração, cinética, para que de posse das melhores condições, seja possível determinar os limites de detecção, seletividade e a estabilidade do sistema.
- Buscar a adaptação do mecanismo de detecção para medidas elétricas na busca de aumentar o limite de detecção da plataforma.

REFERÊNCIAS

- AL-GHEETHI, A. A., Q. M. AZHAR, P. S. KUMAR, A. A. YUSUF, A. K. AL-BURIAHI, R. M. S. R. MOHAMED and M. M. AL-SHAIBANI (2022). "Sustainable approaches for removing Rhodamine B dye using agricultural waste adsorbents: A review." *Chemosphere* 287: 132080.
- AL-QARADAWI, S. and S. R. SALMAN (2002). "Photocatalytic degradation of methyl orange as a model compound." *Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry* 148(1-3): 161-168.
- AL-SHUHAIB, M. B. S. A. (2017). "A universal, rapid, and inexpensive method for genomic DNA isolation from the whole blood of mammals and birds." *Journal of genetics* 96(1): 171-176.
- ALCARAZ-ESPINOZA, J. J., A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO, J. C. MEDINA-LLAMAS, C. A. S. ANDRADE and C. P. DE MELO (2015). "Hierarchical Composite Polyaniline–(Electrospun Polystyrene) Fibers Applied to Heavy Metal Remediation." *ACS Applied Materials & Interfaces* 7(13): 7231-7240.
- ALCARAZ-ESPINOZA, J. J., C. P. DE MELO and H. P. DE OLIVEIRA (2017). "Fabrication of highly flexible hierarchical polypyrrole/carbon nanotube on eggshell membranes for supercapacitors." *Acs Omega* 2(6): 2866-2877.
- ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. and H. P. DE OLIVEIRA (2018). "Flexible supercapacitors based on a ternary composite of polyaniline/polypyrrole/graphite on gold coated sandpaper." *Electrochimica Acta* 274: 200-207.
- ALI, N., R. d. C. P. RAMPAZZO, A. D. T. COSTA and M. A. KRIEGER (2017). "Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics." *BioMed research international* 2017.
- ALIBEIGI, S. and M. R. VAEZI (2008). "Phase transformation of iron oxide nanoparticles by varying the molar ratio of Fe²⁺: Fe³⁺." *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology* 31(11): 1591-1596.
- ATHANASEKOU, C., G. ROMANOS, F. KATSAROS, K. KORDATOS, V. LIKODIMOS AND P. FALARAS (2012). "Very efficient composite titania membranes in hybrid ultrafiltration/photocatalysis water treatment processes." *Journal of Membrane Science* 392: 192-203.
- ATKINS, P., L. JONES and L. LAVERMAN (2006). *Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*, Bookman Editora.
- AYAWEI, N., A. N. EBELEGI and D. WANKASI (2017). "Modelling and interpretation of adsorption isotherms." *Journal of Chemistry* 2017.
- BAKSHI, P. S., D. SELVAKUMAR, K. KADIRVELU and N. KUMAR (2020). "Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications." *International journal of biological macromolecules* 150: 1072-1083.

BALASUBRAMANIAN, S. K., L. YANG, L.-Y. L. YUNG, C.-N. ONG, W.-Y. ONG and E. Y. LIYA (2010). "Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles." *Biomaterials* 31(34): 9023-9030.

BANSAL, R. C. and M. GOYAL (2005). *Activated carbon adsorption*, CRC press.

BARKA, N., A. ASSABBANE, A. NOUNAH and Y. A. ICHOU (2008). "Photocatalytic degradation of indigo carmine in aqueous solution by TiO₂-coated non-woven fibres." *Journal of hazardous materials* 152(3): 1054-1059.

BARNETT, R. and G. LARSON (2012). A phenol–chloroform protocol for extracting DNA from ancient samples. *Ancient DNA*, Springer: 13-19.

BARRIL, P. and S. NATES (2012). "Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities." *Gel electrophoresis-Principles and basics*: 3-14.

BARTLETT, J. M. and D. STIRLING (2003). *PCR protocols*, Springer.

BHATIA, D., N. R. SHARMA, J. SINGH and R. S. KANWAR (2017). "Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47(19): 1836-1876.

BOWER, D. I. (2002). *An Introduction to Polymer Physics*, Cambridge University press.

BRASIL, M. d. S. (2006). *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*.

BRASIL, M. d. S. (2019). *Guia de Vigilância em Saúde: volume único*.

CARVALHO, J., F. AMARAL, L. FLORENCIO, M. KATO, T. DELFORNO and S. GAVAZZA (2020). "Microaerated UASB reactor treating textile wastewater: The core microbiome and removal of azo dye Direct Black 22." *Chemosphere* 242: 125157.

CERRUTTI, B. M. (2005). *Estabilização de suspensões aquosas de alumina pela adição de taninos e quitosana quaternizada*, Universidade de São Paulo.

CHACON-CORTES, D., & GRIFFITHS, L. R. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 1-9.

CHANDY, T. and C. P. SHARMA (1990). "Chitosan-as a biomaterial." *Biomaterials, artificial cells and artificial organs* 18(1): 1-24.

CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E., J. C. MEDINA-LLAMAS, L. MAQUEIRA, C. A. S. ANDRADE, K. G. B. ALVES and C. P. DE MELO (2015). "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* 281: 826-836.

CHO, W., J. WU, B. S. SHIM, W.-F. KUAN, S. E. MASTROIANNI, W.-S. YOUNG, C.-C. KUO, T. H. EPPS III and D. C. MARTIN (2015). "Synthesis and characterization of bicontinuous cubic poly (3, 4-ethylene dioxythiophene) gyroid (PEDOT GYR) gels." *Physical Chemistry Chemical Physics* 17(7): 5115-5123.

CHRISTEN, T. and M. W. CARLEN (2000). "Theory of Ragone plots." *Journal of power sources* 91(2): 210-216.

CONNOR, R. U., STEFAN; KONCAGÜL, ENGIN (2019). Relatório Mundial das Nações Unidas sobre Desenvolvimento dos Recursos Hídricos 2019 : Não deixar ninguém para trás, resumo executivo. U. W. W. A. Programme.

CONWAY, B. (1999). *Electrochemical capacitors based on pseudocapacitance. Electrochemical supercapacitors*, Springer: 221-257.

COSTENTIN, C. and J.-M. SAVÉANT (2019). "Energy storage: pseudocapacitance in prospect." *Chemical science* 10(22): 5656-5666.

CRAS, J., C. ROWE-TAITT, D. NIVENS and F. LIGLER (1999). "Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization." *Biosensors and bioelectronics* 14(8-9): 683-688.

DA ROCHA, H. D., E. S. REIS, G. P. RATKOVSKI, R. J. DA SILVA, F. D. S. GORZA, G. C. PEDRO and C. P. DE MELO (2020). "Use of PMMA/(rice husk ash)/polypyrrole membranes for the removal of dyes and heavy metal ions." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.

DA SILVA, R. J., L. C. MOJICA-SÁNCHEZ, F. D. GORZA, G. C. PEDRO, B. G. MACIEL, G. P. RATKOVSKI, H. D. DA ROCHA, K. T. DO NASCIMENTO, J. C. MEDINA-LLAMAS and A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO (2021). "Kinetics and thermodynamic studies of Methyl Orange removal by polyvinylidene fluoride-PEDOT mats." *Journal of Environmental Sciences* 100: 62-73.

DE SOUZA, C. D., B. R. NOGUEIRA and M. E. C. ROSTELATO (2019). "Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction." *Journal of Alloys and Compounds* 798: 714-740.

DE VASCONCELOS, C., M. PEREIRA and J. FONSECA (2005). "Polyelectrolytes in solution and the stabilization of colloids." *Journal of dispersion science and technology* 26(1): 59-70.

DEDAVID, B. A., C. I. GOMES and G. MACHADO (2007). *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*, EdiPUCRS.

DELGADO, A. V., F. GONZÁLEZ-CABALLERO, R. HUNTER, L. K. KOOPAL and J. LYKLEMA (2005). "Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC technical report)." *Pure and Applied Chemistry* 77(10): 1753-1805.

DHANAVEL, S., E. NIVETHAA, K. DHANAPAL, V. GUPTA, V. NARAYANAN and A. STEPHEN (2016). " α -MoO₃/polyaniline composite for effective scavenging of Rhodamine B, Congo red and textile dye effluent." *RSC advances* 6(34): 28871-28886.

DODANE, V. and V. D. VILIVALAM (1998). "Pharmaceutical applications of chitosan." *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1(6): 246-253.

DOKE, K. M. and E. M. KHAN (2013). "Adsorption thermodynamics to clean up wastewater; critical review." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(1): 25-44.

DOMINKO, R., S. D. TALIAN and A. VIZINTIN (2021). "Lithium sulfur batteries: Electrochemistry and mechanistic research."

DORAK, M. T. (2007). *Real-time PCR*, Taylor & Francis.

DORON-MOR, I., Z. BARKAY, N. FILIP-GRANIT, A. VASKEVICH and I. RUBINSTEIN (2004). "Ultrathin gold island films on silanized glass. Morphology and optical properties." *Chemistry of Materials* 16(18): 3476-3483.

ESSANDOH, M., R. A. GARCIA, V. L. PALOCHIK, M. R. GAYLE and C. LIANG (2021). "Simultaneous adsorption of acidic and basic dyes onto magnetized polypeptidylated-Hb composites." *Separation and Purification Technology* 255: 117701.

FAEZ, R., C. REIS, P. D. FREITAS, O. K. KOSIMA, G. RUGGERI and M. DE PAOLI (2000). "Polímeros condutores." *Química nova na escola* 11(1): 13-18.

FAN, Z. and J. OUYANG (2019). "Thermoelectric properties of PEDOT: PSS." *Advanced Electronic Materials* 5(11): 1800769.

FANG, W.-F., W.-J. CHEN and J.-T. YANG (2014). "Colorimetric determination of DNA concentration and mismatches using hybridization-mediated growth of gold nanoparticle probes." *Sensors and Actuators B: Chemical* 192: 77-82.

FAUST, S. D. and O. M. ALY (2013). *Adsorption processes for water treatment*, Elsevier.

FONNUM, G., C. JOHANSSON, A. MOLTEBERG, S. MØRUP and E. AKSNES (2005). "Characterisation of Dynabeads® by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy." *Journal of magnetism and magnetic materials* 293(1): 41-47.

FONSECA-GARCÍA, A., E. J. JIMÉNEZ-REGALADO and R. Y. AGUIRRE-LOREDO (2021). "Preparation of a novel biodegradable packaging film based on corn starch-chitosan and poloxamers." *Carbohydrate Polymers* 251: 117009.

FOO, K. Y. and B. H. HAMEED (2010). "Insights into the modeling of adsorption isotherm systems." *Chemical engineering journal* 156(1): 2-10.

FU, D., H. LI, X.-M. ZHANG, G. HAN, H. ZHOU and Y. CHANG (2016). "Flexible solid-state supercapacitor fabricated by metal-organic framework/graphene oxide hybrid interconnected with PEDOT." *Materials Chemistry and Physics* 179: 166-173.

FU, D., H. ZHOU, X. M. ZHANG, G. HAN, Y. CHANG and H. LI (2016). "Flexible solid-state supercapacitor of metal-organic framework coated on carbon nanotube film interconnected by electrochemically-codeposited PEDOT-GO." *ChemistrySelect* 1(2): 285-289.

GAN, W., Y. GU, J. HAN, C.-X. LI, J. SUN and P. LIU (2017). "Chitosan-modified filter paper for nucleic acid extraction and "in situ PCR" on a thermoplastic microchip." *Analytical chemistry* 89(6): 3568-3575.

GAPUSAN, R. B. and M. D. L. BALELA (2020). "Adsorption of anionic methyl orange dye and lead(II) heavy metal ion by polyaniline-kapok fiber nanocomposite." *Materials Chemistry and Physics* 243: 122682.

GEMEAY, A. H., R. G. ELSHARKAWY and E. F. ABOELFETOH (2018). "Graphene Oxide/Polyaniline/Manganese Oxide Ternary Nanocomposites, Facile Synthesis, Characterization, and Application for Indigo Carmine Removal." *Journal of Polymers and the Environment* 26(2): 655-669.

GOPI, S., P. BALAKRISHNAN, A. PIUS and S. THOMAS (2017). "Chitin nanowhisker (ChNW)-functionalized electrospun PVDF membrane for enhanced removal of Indigo carmine." *Carbohydrate Polymers* 165: 115-122.

GORZA, F. D. S., G. C. PEDRO, R. J. DA SILVA, J. C. MEDINA-LLAMAS, J. J. ALCARAZ-ESPINOZA, A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO and C. P. DE MELO (2018). "Electrospun polystyrene-(emeraldine base) mats as high-performance materials for dye removal from aqueous media." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 82: 300-311.

GROSS, S. (2008). *Colloidal dispersion of gold nanoparticles. Materials syntheses*, Springer: 155-161.

GUY, O. J. and K.-A. D. WALKER (2016). "Graphene functionalization for biosensor applications." *Silicon Carbide Biotechnology*: 85-141.

HALLIWELL, C. M. and A. E. CASS (2001). "A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces." *Analytical chemistry* 73(11): 2476-2483.

HAN, Y. and L. DAI (2019). "Conducting polymers for flexible supercapacitors." *Macromolecular chemistry and physics* 220(3): 1800355.

HAQUE, E., J. W. JUN and S. H. JHUNG (2011). "Adsorptive removal of methyl orange and methylene blue from aqueous solution with a metal-organic framework material, iron terephthalate (MOF-235)." *Journal of Hazardous materials* 185(1): 507-511.

HARRACHE, Z., M. ABBAS, T. AKSIL and M. TRARI (2019). "Thermodynamic and kinetics studies on adsorption of Indigo Carmine from aqueous solution by activated carbon." *Microchemical Journal* 144: 180-189.

HERNÁNDEZ, R., V. ZAMORA-MORA, M. SIBAJA-BALLESTERO, J. VEGA-BAUDRIT, D. LÓPEZ and C. MIJANGOS (2009). "Influence of iron oxide nanoparticles on the rheological properties of hybrid chitosan ferrogels." *Journal of Colloid and Interface Science* 339(1): 53-59.

HO, Y., J. PORTER and G. MCKAY (2002). "Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: copper, nickel and lead single component systems." *Water, air, and soil pollution* 141(1-4): 1-33.

HRYNIEWICZ, B. M., R. V. LIMA, L. F. MARCHESI and M. VIDOTTI (2019). "Impedimetric studies about the degradation of polypyrrole nanotubes during galvanostatic charge and discharge cycles." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 855: 113636.

HSIEH, S., H.-H. CHOU, C.-W. HSIEH, D.-C. WU, C.-H. KUO and F.-H. LIN (2013). "Hydrogen peroxide treatment of eggshell membrane to control porosity." *Food chemistry* 141(3): 2117-2121.

HSU, Y.-K., Y.-C. CHEN, Y.-G. LIN, L.-C. CHEN and K.-H. CHEN (2013). "Direct-growth of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) nanowires/carbon cloth as hierarchical supercapacitor electrode in neutral aqueous solution." *Journal of power sources* 242: 718-724.

HU, Q., L. BIN, P. LI, F. FU, G. GUAN, X. HAO and B. TANG (2021). "Highly efficient removal of dyes from wastewater over a wide range of pH value by a self-adaption adsorbent." *Journal of Molecular Liquids* 331: 115719.

HUANG, R., Q. LIU, J. HUO and B. YANG (2017). "Adsorption of methyl orange onto protonated cross-linked chitosan." *Arabian Journal of Chemistry* 10(1): 24-32.

Inzelt, G. (2008). *Conducting polymers: a new era in electrochemistry*, Springer Science & Business Media.

IQBAL, M. J. and M. N. ASHIQ (2007). "Adsorption of dyes from aqueous solutions on activated charcoal." *Journal of Hazardous Materials* 139(1): 57-66.

IWUOZOR, K. O., J. O. IGHALO, E. C. EMENIKE, L. A. OGUNFOWORA and C. A. IGWEGBE (2021). "Adsorption of methyl orange: A review on adsorbent performance." *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 4: 100179.

JAKOVSKI, Z., R. J. AJANOVSKA, A. STANKOV, G. PAVLOVSKI, V. POPOSKA and D. MARJANOVIC (2015). "Comparative study of two dna extraction methods in different tissues and conditions of degradation." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5: e403-e404.

JANAKI, V., B.-T. OH, K. SHANTHI, K.-J. LEE, A. RAMASAMY and S. KAMALAKANNAN (2012). "Polyaniline/chitosan composite: an eco-friendly polymer for enhanced removal of dyes from aqueous solution." *Synthetic Metals* 162(11-12): 974-980.

JEPPSON, J., C. LAURELL and B. FRANZÉN (1979). "Agarose gel electrophoresis." *Clinical chemistry* 25(4): 629-638.

JHAVERI, J., Z. RAICHURA, T. KHAN, M. MOMIN and A. OMRI (2021). "Chitosan Nanoparticles-Insight into Properties, Functionalization and Applications in Drug Delivery and Theranostics." *Molecules* 26(2): 272.

JIANG, X., J. CHENG, H. ZHOU, F. LI, W. WU and K. DING (2015). "Polyaniline-coated chitosan-functionalized magnetic nanoparticles: Preparation for the extraction and analysis of endocrine-disrupting phenols in environmental water and juice samples." *Talanta* 141: 239-246.

JUNG, M., S. KLOTZEK, M. LEWANDOWSKI, M. FLEISCHHACKER and K. JUNG (2003). "Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples." *Clinical chemistry* 49(6): 1028-1029.

KAJJUMBA, G. W., S. EMIK, A. ÖNGEN, H. K. ÖZCAN and S. AYDIN (2018). Modelling of adsorption kinetic processes—errors, theory and application. *Advanced sorption process applications*, IntechOpen.

KALENDAR, R., S. BORONNIKOVA and M. SEPPÄNEN (2021). Isolation and purification of DNA from complicated biological samples. *Molecular Plant Taxonomy*, Springer: 57-67.

KANNUSAMY, P. and T. SIVALINGAM (2013). "Chitosan–ZnO/polyaniline hybrid composites: polymerization of aniline with chitosan–ZnO for better thermal and electrical property." *Polymer Degradation and Stability* 98(5): 988-996.

KATHERESAN, V., J. KANSEDO and S. Y. LAU (2018). "Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: a review." *Journal of environmental chemical engineering* 6(4): 4676-4697.

KAUR, M. and K. PAL (2019). "Review on hydrogen storage materials and methods from an electrochemical viewpoint." *Journal of Energy Storage* 23: 234-249.

KAVITHA, N., M. ELAVARASAN, R. RAMACHANDRAN, S. UTHAYAKUMAR, A. CHANDRAMOHAN and K. DINAKARAN (2022). "Polymer nanohybrid composites as conductive platform for the electrochemical sensing of pathogens." *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*: 100316.

KHAN, S. A., S. B. KHAN, L. U. KHAN, A. FAROOQ, K. AKHTAR and A. M. ASIRI (2018). Fourier transform infrared spectroscopy: fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization. *Handbook of materials characterization*, Springer: 317-344.

KULARATNA, N. (2014). "Energy Storage Devices for Electronic Systems: Rechargeable Batteries and Supercapacitors Energy Storage Devices for Electronic Systems: Rechargeable Batteries and Supercapacitors." New Zealand: School of Engineering, The University of Waikato Hamilton.

KUMAR, P. S. and K. KIRTHIKA (2009). "Equilibrium and kinetic study of adsorption of nickel from aqueous solution onto bael tree leaf powder." *Journal of Engineering Science and Technology* 4(4): 351-363.

KURRA, N., R. WANG and H. N. ALSHAREEF (2015). "All conducting polymer electrodes for asymmetric solid-state supercapacitors." *Journal of Materials Chemistry A* 3(14): 7368-7374.

LAGERGREN, S. (1898). "Theorie der sogenannten adsorption gelöster Stoffe. Stockholm. Bihang till. K." *Sv. Vet. akad. handl* 24.

LAHIRI, D. K. and J. I. NURNBERGER JR (1991). "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies." *Nucleic acids research* 19(19): 5444.

LAKOWICZ, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer.

LAURENT, S., D. FORGE, M. PORT, A. ROCH, C. ROBIC, L. VANDER ELST and R. N. MULLER (2008). "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications." *Chemical Reviews* 108(6): 2064-2110.

LE DUNG, P., M. MILAS, M. RINAUDO and J. DESBRIÈRES (1994). "Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan." *Carbohydrate Polymers* 24(3): 209-214.

LEE, H. U., J.-H. JIN and S. W. KIM (2019). "Effect of gel electrolytes on the performance of a minimized flexible micro-supercapacitor based on graphene/PEDOT composite using pen lithography." *Journal of industrial and engineering chemistry* 71: 184-190.

LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON, and M.M. COX. (2011). *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Sarvier.

LI, J.-X. and Y.-X. MA (2017). "Study on Fabricating PEDOT Electrodes by Liquid Phase Depositional Polymerization of EDOT and Direct Patterning with 172 nm Vacuum Ultraviolet Radiation." *ACS Applied Energy Materials* 1(1): 134-142.

LI, J., H. LI, Z. YUAN, J. FANG, L. CHANG, H. ZHANG and C. LI (2019). "Role of sulfonation in lignin-based material for adsorption removal of cationic dyes." *International journal of biological macromolecules* 135: 1171-1181.

LI, L., J. IQBAL, Y. ZHU, P. ZHANG, W. CHEN, A. BHATNAGAR and Y. DU (2018). "Chitosan/Ag-hydroxyapatite nanocomposite beads as a potential adsorbent for the efficient removal of toxic aquatic pollutants." *International journal of biological macromolecules* 120: 1752-1759.

LIMA, R. M., J. J. ALCARAZ-ESPINOZA, F. A. DA SILVA JR and H. P. DE OLIVEIRA (2018). "Multifunctional wearable electronic textiles using cotton fibers with

polypyrrole and carbon nanotubes." *ACS applied materials & interfaces* 10(16): 13783-13795.

LIMA, R. M. F. and J. A. M. d. LUZ (2007). *Mobilidade eletroforética (eletroforese)*, CETEM/MCTI.

LIU, F.-J. (2008). "Electrodeposition of manganese dioxide in three-dimensional poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)–poly (styrene sulfonic acid)–polyaniline for supercapacitor." *Journal of Power Sources* 182(1): 383-388.

LIU, J. (2012). "Adsorption of DNA onto gold nanoparticles and graphene oxide: surface science and applications." *Physical chemistry chemical physics* 14(30): 10485-10496.

LIU, L., Z. Y. GAO, X. P. SU, X. CHEN, L. JIANG and J. M. YAO (2015). "Adsorption removal of dyes from single and binary solutions using a cellulose-based bioadsorbent." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 3(3): 432-442.

LIU, M., G. LUO, Y. WANG, R. XU, Y. WANG, W. HE, J. TAN, M. XING and J. WU (2017). "Nano-silver-decorated microfibrinous eggshell membrane: processing, cytotoxicity assessment and optimization, antibacterial activity and wound healing." *Scientific reports* 7(1): 1-14.

LIU, X., M. ATWATER, J. WANG and Q. HUO (2007). "Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58(1): 3-7.

LODHA, A., N. ANSARI, S. SHAH, M. RAO and S. K. MENON (2017). "Isolation of PCR ready-human DNA using copper nanoparticles from skeletal remains." *Forensic science international* 270: 146-152.

LONG, J., A. BALDUCCI, D. BELANGER, T. BROUSSE and W. SUGIMOTO (2017). *A Guideline for Reporting Performance Metrics with Electrochemical Capacitors: From Electrode Materials to Full Devices*, NAVAL RESEARCH LAB WASHINGTON DC WASHINGTON United States.

LOTA, K., V. KHOMENKO and E. FRACKOWIAK (2004). "Capacitance properties of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotubes composites." *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 65(2-3): 295-301.

LÖVENICH, W. (2014). "PEDOT-properties and applications." *Polymer Science Series C* 56(1): 135-143.

LV, C., J. ZHANG, G. LI, H. XI, M. GE and T. GOTO (2020). "Facile fabrication of self-assembled lamellar PANI-GO-Fe₃O₄ hybrid nanocomposites with enhanced adsorption capacities and easy recyclability towards ionic dyes." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 585: 124147.

MA, J., W. XIA, R. ZHANG, L. DING, Y. KONG, H. ZHANG and K. FU (2021). "Flocculation of emulsified oily wastewater by using functional grafting modified

chitosan: The effect of cationic and hydrophobic structure." *Journal of Hazardous Materials* 403: 123690.

MARCELINA, V., N. SYAKIR, S. WYANTUTI, Y. W. HARTATI and R. HIDAYAT (2017). Characteristic of thermally reduced graphene oxide as supercapacitors electrode materials. IOP conference series: materials science and engineering, IOP Publishing.

MARIA HELENA L. SOUZA, D. O. E. (2006). *Fundamentos da Circulação Extracorpórea*, Centro Editorial Alfa Rio.

MASSONNET, N., A. CARELLA, O. JAUDOUIN, P. RANNOU, G. LAVAL, C. CELLE and J.-P. SIMONATO (2014). "Improvement of the Seebeck coefficient of PEDOT: PSS by chemical reduction combined with a novel method for its transfer using free-standing thin films." *Journal of Materials Chemistry C* 2(7): 1278-1283.

MCFARLAND, A. D., C. L. HAYNES, C. A. MIRKIN, R. P. VAN DUYN and H. A. GODWIN (2004). "Color my nanoworld." *Journal of Chemical Education* 81(4): 544A.

MEDINA-LLAMAS, J. C. (2015). *Uso de nanocompósitos magnéticos de polianilina/maghemita e polipirrol/maghemita para recuperação de DNA presente em sistemas biológicos ou em meios aquosos*, Universidade Federal de Pernambuco.

MEDINA-LLAMAS, J. C., A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO, C. A. S. ANDRADE, K. G. B. ALVES and C. P. DE MELO (2014). "Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions." *Journal of Colloid and Interface Science* 434: 167-174.

MEI, B.-A., O. MUNTESHARI, J. LAU, B. DUNN and L. PILON (2018). "Physical interpretations of Nyquist plots for EDLC electrodes and devices." *The Journal of Physical Chemistry C* 122(1): 194-206.

MENCZEL, J. D. and R. B. PRIME (2009). *Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications*, John Wiley & Sons.

MEURER, I. R. and E. S. COIMBRA (2022). "Doenças tropicais negligenciadas e o seu contexto no Brasil." *HU Revista* 48.

MULLIS, K. B. (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction." *Scientific American* 262(4): 56-65.

MURTHY, K. and H. S. VIRK (2014). *Luminescence phenomena: an introduction*. Defect and diffusion fórum, Trans Tech Publ.

MUZZARELLI, R. A. (1983). "Chitin and its derivatives: new trends of applied research." *Carbohydrate Polymers* 3(1): 53-75.

NAOUM, P. C. (2010). *Eletroforeses: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas e DNA*. São Paulo: Editora Santos.

NASCIMENTO, R. F. D., A. C. A. D. LIMA, C. B. VIDAL, D. D. Q. MELO and G. S. C. RAULINO (2014). "Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais."

NEGLIGENCIADAS, F. S. B. d. E. d. D. I. e. (2021). "Carta Aberta do 6º Encontro Brasileiro de Movimentos Sociais de Luta contra Doenças Infecciosas e Negligenciadas." Retrieved 22/06/2022, from https://www.nhrbrasil.org.br/images/Carta_do_Forum_TextoFinal_Impress%C3%A3o.pdf.

NICHOLSON, J. W. (2017). *The chemistry of polymers*, Royal Society of Chemistry.

NIMSE, S. B., K. SONG, M. D. SONAWANE, D. R. SAYYED and T. KIM (2014). "Immobilization techniques for microarray: challenges and applications." *Sensors* 14(12): 22208-22229.

O'CONNELL, J. (2002). *Rt-PCR protocols*, Springer Science & Business Media.

OLIVEIRA, L. V., S. BENNICI, L. JOSIEN, L. LIMOUSY, M. A. BIZETO and F. F. CAMILO (2020). "Free-standing cellulose film containing manganese dioxide nanoparticles and its use in discoloration of indigo carmine dye." *Carbohydrate Polymers* 230: 115621.

(OPAS), O. P.-A. d. S. (2022). "<https://www.paho.org/pt/noticias/28-1-2022-doencas-tropicais-negligenciadas-opas-pede-fim-dos-atrasos-no-tratamento-nas>." Retrieved 22/06/2022.

OVANDO-MEDINA, V. M., N. E. DÁVILA-GUZMÁN, N. V. PÉREZ-AGUILAR, H. MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, I. D. ANTONIO-CARMONA, S. Y. MARTÍNEZ-AMADOR and A. DECTOR (2018). "A semi-conducting polypyrrole/coffee grounds waste composite for rhodamine B dye adsorption." *Iranian Polymer Journal* 27(3): 171-181.

PANDEY, G. and A. RASTOGI (2012). "Solid-state supercapacitors based on pulse polymerized poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) electrodes and ionic liquid gel polymer electrolyte." *Journal of the Electrochemical Society* 159(10): A1664.

PAVEL, I.-A., S. LAKARD and B. LAKARD (2022). "Flexible Sensors Based on Conductive Polymers." *Chemosensors* 10(3): 97.

POSSIK, P. A. (2016). *A análise de DNA por eletroforese*. https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia_molecular/testes_geneticos.pdf. Acessado em 18 de maio de 2022.

QIAGEN (2014). *MagAttract® HMW DNA Kit Handbook For isolation of high-molecular-weight DNA from blood, tissue, and bacteria for next generation sequencing application*.

QU, G., J. CHENG, X. LI, D. YUAN, P. CHEN, X. CHEN, B. WANG and H. PENG (2016). "A fiber supercapacitor with high energy density based on hollow graphene/conducting polymer fiber electrode." *Advanced materials* 28(19): 3646-3652.

RAHIMZADEH, Z., S. M. NAGHIB, Y. ZARE and K. Y. RHEE (2020). "An overview on the synthesis and recent applications of conducting poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT) in industry and biomedicine." *Journal of materials science* 55(18): 7575-7611.

RAMIREZ-SOLIS, R., J. RIVERA-PEREZ, J. D. WALLACE, M. WIMS, H. ZHENG and A. BRADLEY (1992). "Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples." *Analytical biochemistry* 201(2): 331-335.

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

REIS, E. D. S., F. D. GORZA, G. D. C. PEDRO, B. G. MACIEL, R. J. DA SILVA, G. P. RATKOVSKI and C. P. DE MELO (2021). "(Maghemite/Chitosan/Polypyrrole) nanocomposites for the efficient removal of Cr (VI) from aqueous media." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9(1): 104893.

RIAZ, Q., M. AHMED, M. N. ZAFAR, M. ZUBAIR, M. F. NAZAR, S. H. SUMRRA, I. AHMAD and A. HOSSEINI-BANDEGHARAEI (2020). "NiO nanoparticles for enhanced removal of methyl orange: equilibrium, kinetics, thermodynamic and desorption studies." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*: 1-20.

RINAUDO, M. (2006). "Chitin and chitosan: properties and applications." *Progress in polymer science* 31(7): 603-632.

ROSÁRIO, M. S., M. L. DE OLIVEIRA, C. DE ALMEIDA LIMA, M. A. VIEIRA, J. A. CARNEIRO and F. M. DA COSTA (2017). "Doenças tropicais negligenciadas: caracterização dos indivíduos afetados e sua distribuição espacial." *Revista Brasileira de Pesquisa Em Saúde/Brazilian Journal of Health Research* 19(3): 118-127.

SAIGL, Z. M. (2021). "Various Adsorbents for Removal of Rhodamine B Dye: A Review." *Indonesian Journal of Chemistry* 21(4): 1039-1056.

SAKYI, S. A., B. KUMI, R. D. EPHRAIM, K. O. DANQUAH, D. OSAKUNOR and D. BAIDOE-ANSAH (2017). "Modified DNA Extraction Technique for Use in Resource-Limited Settings: Comparison of Salting Out Methods versus QIAamp Blood Mini Kit." *Annals of Medical and Health Sciences Research* 7(3).

SALAMA, A. and P. HESEMANN (2018). "Synthesis of N-Guanidinium-Chitosan/Silica Hybrid Composites: Efficient Adsorbents for Anionic Pollutants." *Journal of Polymers and the Environment* 26(5): 1986-1997.

SALIKHOV, S., A. SAVCHENKO, I. GREBENNIKOV and E. YURTOV (2015). "Phase composition and structure of iron oxide nanopowders prepared by chemical means." *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics* 79(9): 1106-1112.

SALLEH, M. A. M., D. K. MAHMOUD, W. A. W. A. KARIM and A. IDRIS (2011). "Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: A comprehensive review." *Desalination* 280(1): 1-13.

SALOPEK, B., D. KRASIC and S. FILIPOVIC (1992). "Measurement and application of zeta-potential." *Rudarsko-geolosko-naftni zbornik* 4(1): 147.

SARKAR, A. and G. G. KHAN (2018). "Synthesis of BiFeO₃ nanoparticle anchored TiO₂-BiFeO₃ nano-heterostructure and exploring its different electrochemical aspects as electrode." *Materials Today: Proceedings* 5(3): 10177-10184.

SCHMID, F. X. (2001). "Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry." e LS.

SCHNEIDER, T., N. JAHR, J. JATSCHKA, A. CSAKI, O. STRANIK and W. FRITZSCHE (2013). "Localized surface plasmon resonance (LSPR) study of DNA hybridization at single nanoparticle transducers." *Journal of nanoparticle research* 15(4): 1-10.

SCIENTIFIC, T. (2010). *NanoDrop Nucleic Acid Technical Guide*.

SECULA, M. S., I. CREȚESCU and S. PETRESCU (2011). "An experimental study of indigo carmine removal from aqueous solution by electrocoagulation." *Desalination* 277(1-3): 227-235.

SEN, P. and A. DE (2010). "Electrochemical performances of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-NiFe₂O₄ nanocomposite as electrode for supercapacitor." *Electrochimica Acta* 55(16): 4677-4684.

SHABAN, M., M. R. ABUKHADRA, A. A. P. KHAN and B. M. JIBALI (2018). "Removal of Congo red, methylene blue and Cr(VI) ions from water using natural serpentine." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 82: 102-116.

SHARIATINIA, Z. (2019). "Pharmaceutical applications of chitosan." *Advances in Colloid and Interface Science* 263: 131-194.

SHI, H., C. LIU, Q. JIANG and J. XU (2015). "Effective approaches to improve the electrical conductivity of PEDOT: PSS: a review." *Advanced Electronic Materials* 1(4): 1500017.

SHI, W., Q. YAO, S. QU, H. CHEN, T. ZHANG and L. CHEN (2017). "Micron-thick highly conductive PEDOT films synthesized via self-inhibited polymerization: Roles of anions." *NPG Asia Materials* 9(7): e405-e405.

SILVA, R. J. d. (2015). *Formação de fotoprodutos de ácido salicílico e poli(cloridrato de alilamina) induzidos por radiação ultravioleta*. Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia.

SILVA, R. J. (2019) Desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados baseados em polímeros condutores e suas aplicações na purificação de DNA, remediação ambiental, e em dispositivos eletrônicos flexíveis. Universidade Federal de Pernambuco.

SKOOG, D. A., D. WEST, F. HOLLER and S. CROUCH (2006). "Fundamentos de Química Analítica, 8ª." São Paulo: Cengage Learning.

SKOTHEIM, T. A. and J. REYNOLDS (2007). Conjugated polymers: theory, synthesis, properties, and characterization, CRC press.

SOLTANINEJAD, V. and A. MALEKI (2021). "A green, and eco-friendly bionanocomposite film (poly (vinyl alcohol)/TiO₂/chitosan/chlorophyll) by photocatalytic ability, and antibacterial activity under visible-light irradiation." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 404: 112906.

SOYLAK, M., Y. E. UNSAL, E. YILMAZ and M. TUZEN (2011). "Determination of rhodamine B in soft drink, waste water and lipstick samples after solid phase extraction." Food and chemical toxicology 49(8): 1796-1799.

STEPIEN, L., A. ROCH, S. SCHLAIER, I. DANI, A. KIRIY, F. SIMON, M. V. LUKOWICZ and C. LEYENS (2016). "Investigation of the thermoelectric power factor of KOH-treated PEDOT: PSS dispersions for printing applications." Energy Harvesting and Systems 3(1): 101-111.

STOLLER, M. D. and R. S. RUOFF (2010). "Best practice methods for determining an electrode material's performance for ultracapacitors." Energy & Environmental Science 3(9): 1294-1301.

STUART, B. H. (2004). Infrared spectroscopy: fundamentals and applications, John Wiley & Sons.

SUN, N., C. DENG, Y. LIU, X. ZHAO, Y. TANG, R. LIU, Q. XIA, W. YAN and G. GE (2014). "Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: application to viral nucleic acid extraction from serum." Journal of Chromatography A 1325: 31-39.

SUPPES, G. M., C. G. CAMERON and M. S. FREUND (2010). "A polypyrrole/phosphomolybdic acid| poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)/phosphotungstic acid asymmetric supercapacitor." Journal of the Electrochemical Society 157(9): A1030.

SZE, A., D. ERICKSON, L. REN and D. LI (2003). "Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow." Journal of colloid and interface science 261(2): 402-410.

TAN, S. C. and B. C. YIAP (2009). "DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present." Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009.

TANG, P., L. HAN and L. ZHANG (2014). "Facile synthesis of graphite/PEDOT/MnO₂ composites on commercial supercapacitor separator membranes as flexible and high-

performance supercapacitor electrodes." *ACS applied materials & interfaces* 6(13): 10506-10515.

TANG, R., H. YANG, J. R. CHOI, Y. GONG, J. HU, T. WEN, X. LI, B. XU, Q. MEI and F. XU (2017). "based device with on-chip reagent storage for rapid extraction of DNA from biological samples." *Microchimica Acta* 184(7): 2141-2150.

TANHAEI, B., A. AYATI, M. LAHTINEN and M. SILLANPÄÄ (2015). "Preparation and characterization of a novel chitosan/Al₂O₃/magnetite nanoparticles composite adsorbent for kinetic, thermodynamic and isotherm studies of Methyl Orange adsorption." *Chemical Engineering Journal* 259: 1-10.

TANZIFI, M., S. H. HOSSEINI, A. D. KIADEHI, M. OLAZAR, K. KARIMIPOUR, R. REZAIEMEHR and I. ALI (2017). "Artificial neural network optimization for methyl orange adsorption onto polyaniline nano-adsorbent: Kinetic, isotherm and thermodynamic studies." *Journal of Molecular Liquids* 244: 189-200.

THACH, T.-L., T.-C. NGUYEN, A.-Q. VO, M.-T. DO, Q.-T. NGUYEN, T.-A. NGUYEN, L.-G. BACH and H. THAI (2020). "Assessment of the Role of Ginsenoside RB1 Active Substance in Alginate/Chitosan/Lovastatin Composite Films." *International Journal of Polymer Science* 2020: 5807974.

THAVANATHAN, J., N. M. HUANG and K. L. THONG (2014). "Colorimetric detection of DNA hybridization based on a dual platform of gold nanoparticles and graphene oxide." *Biosensors and Bioelectronics* 55: 91-98.

TKACZYK, A., K. MITROWSKA and A. POSYNIK (2020). "Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review." *Science of the total environment* 717: 137222.

TOBE, S. S., Y. C. SWARAN, L. DENNANY, U. SIBBING, K. S. JOHANN, L. WELCH and M. VENNEMANN (2017). "A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault." *International journal of legal medicine* 131(1): 87-94.

TOLEDO, M. (2017). DNA Analysis UV/VIS Spectrophotometer Application.

TOLEDO, M. (2021). Micro-Volume Measurement Creating Speed, Reliability and Sustainability.

UNITED NATIONS EDUCATIONAL, S. and C. Organization (2019). The United Nations World Water Development Report 2019.

VALEUR, B. (2001). *Molecular fluorescence: principles and applications*, Wiley-VCH.

VIGNESHWARAN, S., P. SIRAJUDHEEN, M. NIKITHA, K. RAMKUMAR and S. MEENAKSHI (2021). "Facile synthesis of sulfur-doped chitosan/biochar derived from tapioca peel for the removal of organic dyes: Isotherm, kinetics and mechanisms." *Journal of Molecular Liquids* 326: 115303.

WAGNER, F. F., W. A. FLEGEL, R. BITTNER and A. DÖSCHER (2017). "Molecular typing for blood group antigens within 40 min by direct polymerase chain reaction from plasma or serum." *British journal of haematology* 176(5): 814-821.

WANG, L., K. HIRAYASU, M. ISHIZAWA and Y. KOBAYASHI (1994). "Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS." *Nucleic Acids Research* 22(9): 1774.

WANG, Y. and L. TANG (2013). "Chemisorption assembly of Au nanorods on mercaptosilanized glass substrate for label-free nanoplasmon biochip." *Analytica chimica acta* 796: 122-129.

WEBER, W. J. and J. C. MORRIS (1963). "Kinetics of adsorption on carbon from solution." *Journal of the sanitary engineering division* 89(2): 31-60.

WIEDERSCHAIN, G. Y. (2011). *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, Springer Nature BV.

WU, F.-C., R.-L. TSENG, S.-C. HUANG and R.-S. JUANG (2009). "Characteristics of pseudo-second-order kinetic model for liquid-phase adsorption: A mini-review." *Chemical Engineering Journal* 151(1-3): 1-9.

XIE, Q., Y. XU, Z. WANG, C. XU, P. ZOU, Z. LIN, C. XU, C. YANG, F. KANG and C.-P. WONG (2016). "Vapor-phase polymerized poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) on a nickel nanowire array film: aqueous symmetrical pseudocapacitors with superior performance." *PloS one* 11(11): e0166529.

XIE, Y., H. DU and C. XIA (2015). "Porous poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) nanoarray used for flexible supercapacitor." *Microporous and Mesoporous Materials* 204: 163-172.

XU, K., X. HUANG, Q. LIU, R. ZOU, W. LI, X. LIU, S. LI, J. YANG and J. HU (2014). "Understanding the effect of polypyrrole and poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) on enhancing the supercapacitor performance of NiCo₂O₄ electrodes." *Journal of Materials Chemistry A* 2(39): 16731-16739.

YAGUB, M. T., T. K. SEN, S. AFROZE and H. M. ANG (2014). "Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review." *Advances in colloid and interface science* 209: 172-184.

YANG, P. and W. MAI (2014). "Flexible solid-state electrochemical supercapacitors." *Nano Energy* 8: 274-290.

YAŞAR, M., H. DELİGÖZ and G. GÜÇLÜ (2011). "Removal of Indigo Carmine and Pb(II) Ion from Aqueous Solution by Polyaniline." *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 50(9): 882-892.

YAZDI, M. G., M. IVANIC, A. MOHAMED and A. UHEIDA (2018). "Surface modified composite nanofibers for the removal of indigo carmine dye from polluted water." *RSC advances* 8(43): 24588-24598.

YEE, M. J., N. MUBARAK, M. KHALID, E. ABDULLAH and P. JAGADISH (2018). "Synthesis of polyvinyl alcohol (PVA) infiltrated MWCNTs buckypaper for strain sensing application." *Scientific reports* 8(1): 1-16.

YI, H., L.-Q. WU, W. E. BENTLEY, R. GHODSSI, G. W. RUBLOFF, J. N. CULVER and G. F. PAYNE (2005). "Biofabrication with chitosan." *Biomacromolecules* 6(6): 2881-2894.

ZANONI, M. V. and H. YAMANAKA (2016). "Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento." Ed. Cultura Acadêmica.

ZHANG, G., C. LI, X. ZHANG, X. GUO, Y. LIU, W. HE, J. LIU, H. WANG and Y. GAO (2014). "Biogenic synthesis of photocatalytically active ZnS/ESM composites." *RSC Advances* 4(26): 13569-13574.

ZHANG, J., Q. ZHOU and L. OU (2012). "Kinetic, Isotherm, and Thermodynamic Studies of the Adsorption of Methyl Orange from Aqueous Solution by Chitosan/Alumina Composite." *Journal of Chemical & Engineering Data* 57(2): 412-419.

ZHANG, Z., L. ZHANG, L. CHEN, L. CHEN and Q. H. WAN (2006). "Synthesis of novel porous magnetic silica microspheres as adsorbents for isolation of genomic DNA." *Biotechnology progress* 22(2): 514-518.

ZHAO, P., N. LI and D. ASTRUC (2013). "State of the art in gold nanoparticle synthesis." *Coordination Chemistry Reviews* 257(3-4): 638-665.

ZHOU, H., G. HAN, D. FU, Y. CHANG, Y. XIAO and H.-J. ZHAI (2014). "Petal-shaped poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)/sodium dodecyl sulfate-graphene oxide intercalation composites for high-performance electrochemical energy storage." *Journal of Power Sources* 272: 203-210.

ZHOU, Y., J. LU, Y. ZHOU and Y. LIU (2019). "Recent advances for dyes removal using novel adsorbents: A review." *Environmental Pollution* 252: 352-365.

APÊNDICE A - PROTOCOLOS DOS KITS COMERCIAIS USADOS PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA

A.1 Protocolos dos kits comerciais

A.1.1 KCM1 (Reliaprep)

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, adicionar 20 µL da solução de proteinase K, 200 µL de sangue, homogeneizar e inserir 200 µL de solução-tampão de lise celular (CLD), submeter ao vórtex no mínimo por 10 segundos. Incubar a 56 °C durante 10 minutos. Posteriormente, acrescentar 250 µL de solução-tampão de ligação (BBA) e misturar no vórtex por 10 s. Transferir o volume para uma coluna de ligação KCM1 e colocar na microcentrífuga por um minuto na velocidade máxima (usamos a 14000 x g), descartar o microtubo e inserir um limpo. Adicionar 500 µL da solução de lavagem (CWD) na coluna e centrifugar por 3 minutos a velocidade máxima, repetir o processo de lavagem por mais duas vezes. Transferir a coluna para um microtubo limpo e inserir entre 50 - 200 µL de água livre de nuclease à coluna, posteriormente centrifugar por 1 minuto e guardar o DNA extraído.

A.1.2 KCM2 (QIAamp)

Pipetar 20 µL de protease (ou proteinase K), 200 µL de sangue e 200 µL de tampão AL no fundo de um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, submeter ao vórtex por 15 s e incubar a 56 °C por 10 min. Depois disso, adicionar 200 µL de etanol (96 – 100 %) e misturar no vórtex por 15 s. Transferir o conteúdo do microtubo para a coluna de centrifugação KCM2 (evitar tocar na membrana), fechar o microtubo e centrifugar a 6000 x g durante 1 min. Em seguida, descartar o microtubo que contém o filtrado e inserir um microtubo limpo, colocar 500 µL da solução-tampão AW1, fechar a tampa e centrifugar durante 1 min a 6000 xg. Posteriormente, trocar o microtubo de 2 mL por um limpo e insere 500 µL de solução-tampão AW2, centrifugar na velocidade máxima por 3 min. Transferir a coluna de centrifugação para um microtubo limpo e centrifugar a velocidade máxima por 1 min. Colocar a coluna KCM2 em um microtubo limpo de 1,5 mL e adicionar 200 µL de tampão AE ou água destilada e incubar a temperatura ambiente (15 - 25 °C) por 5 min, depois centrifugar por 5 min.

A.1.3 KCPM3 (Magazorb)

Adicionar 20 μL de proteinase K em um microtubo de 2 mL, 200 μL de sangue homogeneizado, misturar delicadamente. Em seguida, inserir 20 μL de RNase (20 mg/mL) submeter por 15 s ao vórtex e incubar por 5 min. Após, colocar 200 μL da solução-tampão de lise, homogeneizar no vórtex por 15 s para então incubar a 56 °C durante 10 minutos. Acrescentar 500 μL da solução de ligação, agitar por 15s no vórtex, logo a seguir adicionar 20 μL do reagente KCPM3, agitar por 15 s. Em seguida, incubar o microtubo pelo período de 10 min (a cada 2 min a amostra deve ser homogeneizada por inversão). Após o tempo requerido, confinar as partículas com o auxílio de um ímã magnético e retirar o sobrenadante. A seguir, colocar 1 mL da solução tampão de lavagem, inverter o microtubo para dispersar as partículas, logo confinar as partículas, descartar o sobrenadante e realizar outra lavagem. Por fim, inserir 200 μL da solução tampão de eluição, incubar por 10 min (a cada 2 min inverter a amostra), confinar magneticamente as partículas, e armazenar o DNA extraído em um microtubo limpo.

A.1.4 KCPM4 (MagAttract)

Em um microtubo de 2 mL adicionar 20 μL de proteinase K, 200 μL de sangue, 4 μL de RNase A e 150 μL da solução-tampão AL, misturar no vórtex até obter uma solução homogênea. Esse microtubo pode ser incubado à temperatura ambiente (15 – 25 °C) durante 30 min ou submetido à 65 °C por 10 min. Após a incubação, adicionar ao microtubo 15 μL da suspensão de KCPM4, 280 μL de tampão MB. Submeter esse microtubo a uma microcentrifuga a 1400 rpm por 3 min. O tubo é colocado sobre uma base magnética por 1 minuto, e o sobrenadante descartado. Adicionar sobre as partículas magnéticas 700 μL da solução tampão MW1, e centrifugar durante 1 min a 1400 rpm, repetir esse procedimento mais uma vez. Em seguida, inserir 700 μL da solução tampão PE e centrifugar a 1400 rpm por 1 minuto, depois repetir por mais uma vez. Após, colocar 700 μL de água livre de nucleasse, incubar por um minuto, confinar as partículas magneticamente, retirar o sobrenadante e repetir esta etapa novamente. Para obter o DNA pode ser utilizado entre 100 - 200 μL da solução tampão AE e submeter a centrifuga em 1400 rpm durante 3 min.

A.1.5 KCPM5 (Dynabeads)

Em um tubo de microcentrífuga de 2 mL, adicionar 100 µL de sangue e 1 mL da solução tampão de lise de células vermelhas diluída previamente com água livre na proporção 1:5, incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Centrifugar o tubo a 200 × g durante 30 segundos, ao final dessa etapa deve conter um sedimento esbranquiçado ou acinzentado decantado no microtubo. Descartar o sobrenadante e de uma única vez pipetar 200 µL de KCPM5, incubar por 5 min. Em seguida, confinar magneticamente por um minuto, retirar o sobrenadante e evitar perturbação ao complexo (KCPM5/DNA). Inserir 1 mL da solução de lavagem diluída (1:10), submeter o tubo ao ímã por um minuto, descartar o sobrenadante, e repetir este processo por mais duas vezes. Adicionar 200 µL da solução tampão de ressuspensão e realizar a incubação a 65 °C por 5 min e, para finalizar, separar magneticamente e transferir o sobrenadante para um microtubo limpo.

APÊNDICE B - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

❖ Artigos publicados

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.

1. Introduction

Several molecular biology studies (such as cloning, identification of genotypes, and others in the genetic area) involve the extraction and purification of DNA as an initial stage [1]. This process is especially challenging when dealing with plant tissues due to the presence of a rigid cell wall and a large fraction of contaminants and secondary metabolites (polysaccharides and polyphenols, among other chemical compounds). These characteristics of plant tissues make the DNA extraction of vegetables more difficult and laborious than in the case of samples of animal origin. The isolation of good quality DNA samples relies on the adjustment of the extraction and purification procedures according to the degree of contaminants, as the presence of secondary metabolites can interfere with subsequent applications, such as amplification in a polymerase chain reaction (PCR) [2–5].

Currently, one can classify the different methodologies for isolating DNA from plants into three categories: standard CTAB method (cetyltrimethylammonium bromide), rapid DNA extraction methods,

and commercial DNA isolation kits [6]. The CTAB method, first proposed by Murray and Thompson in 1980 [7], has since been adapted to suit different applications [8–12]. Although it can be considered a standard method for producing high-quality DNA extracted from a wide variety of plants, the corresponding protocols are time-consuming, requiring many steps of centrifugation and incubation and the use of solvents such as phenol-chloroform, which are toxic and can contaminate the purified DNA [13]. Given the need to improve the extraction time and avoid the use of reagents harmful to human beings and the environment, the development of new protocols as an alternative has become essential.

Rapid extraction methods, which are generally based on the use of alkaline solutions (NaOH), Tris-HCl, and centrifugation processes for DNA purification, involve simple and fast procedures, at the cost in terms of efficiency, since the purity and yield of the material obtained are generally low [14,15].

More recently, commercial kits have become available for the efficient and simple extraction and purification of DNA from plants, result-

* Corresponding author at: Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Brazil.

E-mail address: celso.melo@ufpe.br (C.P. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2022.100060>

Received 29 April 2022; Received in revised form 25 July 2022; Accepted 26 July 2022

2666-5344/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/acaDNA purification using a novel γ -Fe₂O₃/PEDOT hybrid nanocomposite

Romário J. da Silva ^{c,1}, Graciela C. Pedro ^{a,1}, Filipe D.S. Gorza ^b, **Bruna G. Maciel ^a**,
 Gabriela P. Ratkovski ^c, Lizeth Carolina Mojica-Sánchez ^c, Juan C. Medina-Llamas ^{d,1},
 Alicia E. Chávez-Guajardo ^e, Celso P. de Melo ^{a,c,*}



^a Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR, 76801-974, Porto Velho, RO, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

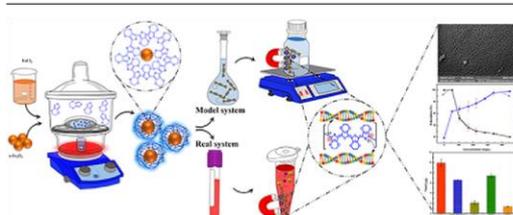
^d Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No.18, Instituto Politécnico Nacional, 98160, Zacatecas, Zac, Mexico

^e Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98058, Zacatecas, Zac, Mexico

HIGHLIGHTS

- The γ -NP/PEDOT nanocomposite exhibits a high capacity for fast DNA adsorption.
- The desorption of the adsorbed ss-DNA chains is simple and fast.
- The γ -NP/PEDOT nanocomposite can be used for enriching the extracted DNA fraction.
- The yield and purity of the DNA extracted are similar to those of commercial purification kits.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 11 February 2021
 Received in revised form
 10 June 2021
 Accepted 13 June 2021
 Available online 16 June 2021

Keywords:
 Magnetic nanocomposite
 Magnetic purification
 DNA
 Conducting polymers
 Escherichia coli
 Whole blood

ABSTRACT

We report the synthesis and characterization of a new hybrid magnetic composite formed by the enveloping of magnetic iron oxide nanoparticles (γ -NP) with chains of the conductive polymer PEDOT, and its use for the efficient separation of DNA molecules from complex biological samples, allowing the high yield separation of a pure and high-quality DNA fraction. The successful formation of the γ -NP/PEDOT composite was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, UV visible spectroscopy (UV–Vis), and magnetic hysteresis loop measurements. The nanocomposites showed an excellent capacity of DNA adsorption ($Q_e \sim 248$ mg/g) in a model system consisting of salmon sperm DNA. When the γ -NP/PEDOT was used in protocols to extract the DNA from complex samples, the corresponding yield was in the range of 6.4 μ g (blood) and 7.3 μ g (bacteria), as evaluated quality by UV–Vis, PCR analysis, and electrophoresis assays. We also established that the captured DNA does not need to be detached from the nanocomposite for use as seeding material in PCR amplification experiments. These results and the simplicity of the protocols indicate that the γ -NP/PEDOT composite is a promising DNA adsorbent, being competitive with the commercially available magnetic purification kits.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: celso.melo@ufpe.br, cpdemelo@gmail.com (C.P. de Melo).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338762>
 0003-2670/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There is an ever-increasing demand for reliable and efficient



(Maghemite/Chitosan/Polypyrrole) nanocomposites for the efficient removal of Cr (VI) from aqueous media

Edson da S. Reis^a, Filipe D.S. Gorza^{a,b}, Graciela da C. Pedro^a, **Bruna G. Maciel^a**,
Romário J. da Silva^a, Gabriela P. Ratkovski^c, Celso P. de Melo^{a,c,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR, 76801-974 Porto Velho, RO, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Magnetic nanocomposite
Chitosan
Polypyrrole
Conductive polymer
Water remediation

ABSTRACT

We report the preparation of a new hybrid magnetic nanocomposite (HMNC) based on maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), chitosan (Chi), and polypyrrole (PPY), and its use in water remediation protocols. We prepared the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles by a coprecipitation route in the presence of chitosan, whose role is to envelop the nanoparticles, easing the posterior incorporation of PPY chains. We characterized the resulting hybrid composites by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), infrared (FTIR) spectroscopy, water contact angle, and magnetic measurements. The $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Chi@PPY}$ HMNC exhibited spherical morphology, with an average diameter of 34 nm, and a saturation magnetization of 9.8 emu.g^{-1} . Due to this characteristic, these composites can be easily removed through the application of an external magnetic field. The HMNC showed their best capacity of removing Cr (VI) ions from aqueous media at pH 2.0, attaining a 100% degree of capture for concentrations below 10 mg.L^{-1} , with a maximum removal capacity (301.2 mg.g^{-1}) that is higher than those of other polypyrrole based materials discussed in the literature. Recycling studies showed that the HMNC presented excellent performance and could be reused in at least five consecutive adsorption/desorption cycles without significant losses in their original adsorption capacity. For allying high adsorbing characteristics to a simple manner of removal of the captured contaminant from aqueous media, this $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Chi@PPY}$ HMNC appears as a very promising platform for wastewater treatment.

1. Introduction

Water is an essential compound for life. The geographically uneven distribution of freshwater, which corresponds to less than 3% of the total water amount on our planet, causes a scarcity in several countries [1]. To compound the problem, the quality of the water available is currently a global concern issue due to contamination via the inadequate disposal of industrial and urban waste and extensive use of agricultural pesticides and fertilizers. According to the United Nations World Water Development Report [2], approximately 2 million tons of waste are discharged every year into water bodies. As a result, water remediation is one of the most relevant environmental challenges of the 21st-century.

Amongst the usual chemical contaminants present in effluents, heavy metals deserve special attention due to their high toxicity and the fact that their concentration can progressively increase in sediments

(geoaccumulation) and living organisms (bioaccumulation). Due to the possible biological magnification at successively higher levels of organisms in the human food chain [3,4], the remediation of water bodies became a priority in health promotion programs worldwide. In humans, the excess concentration of iron (Fe), cadmium (Cd), lead (Pb), copper (Cu), chromium (Cr), manganese (Mn), mercury (Hg), zinc (Zn), and other metal ions can cause a variety of problems, which range from an increase in blood pressure to the appearance of various types of cancer [5–7]. Chromium ions deserve special attention. In its oxidation state +6, this metal is usually found in the form of anions, such as $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, which is highly carcinogenic and can cause gastrointestinal disorders, skin irritations, among other problems [8–10]. Cr(VI) is usually absorbed by the liver and, after being reduced to Cr(III), can bind to different macromolecules, causing damage to the liver, kidneys, spleen, and bone marrow [9]. For these reasons, the World Health Organization (WHO)

Abbreviations: HMNC, hybrid magnetic nanocomposite; MNC, magnetic nanocomposite; Fe2O3, iron oxide; Chi, chitosan; PPY, polypyrrole; Cr, chromium.

* Corresponding author at: Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

E-mail address: celso.melo@ufpe.br (C.P. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104893>

Received 22 September 2020; Received in revised form 10 November 2020; Accepted 30 November 2020

Available online 13 December 2020

2213-3437/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Spinel Cobalt Ferrite Nanoparticles for Sensing Phosphate Ions in Aqueous Media and Biological Samples

Gabriela P. Ratkovski, Kamila T. O. do Nascimento, Graciela C. Pedro, Danilo R. Ratkovski, Filipe D. S. Gorza, Romário J. da Silva, **Bruna G. Maciel**, Lizeth C. Mojica-Sánchez, and Celso P. de Melo*

Cite This: *Langmuir* 2020, 36, 2920–2929

Read Online

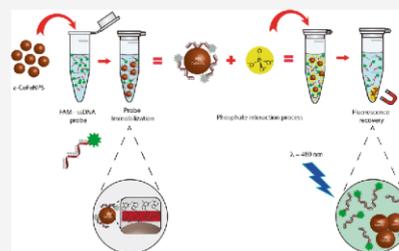
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Phosphate ions perform a variety of functions in metabolic processes and are essential for all living organisms. The determination of the concentration of phosphate ions is useful in clinical diagnosis of various diseases as an inadequate phosphate level could lead to many health problems. In the search for a cost-effective method of fast monitoring, we investigated the use of cobalt ferrite nanoparticles (CoFeNPs) in the selective recognition of phosphate ions dissolved in aqueous media and more complex samples, such as human blood serum. We prepared these NPs by a chemical coprecipitation route and subjected them to annealing at 600 °C for 1 h. The successful formation of the NPs was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, transmission electron microscopy, and hysteresis loop measurements. The NPs exhibited a ferrimagnetic behavior, a spinel-type crystalline structure, and hexagonal shape in the nanoscale range. We demonstrated that CoFeNPs containing immobilized fluorescent-labeled single-chain DNA (ssDNA*) probes can be applied for the fast selective detection of phosphate ions dissolved in a liquid medium. We have explored the fact that phosphate groups can displace ssDNA* probes attached to the nanoparticles, therefore causing a perceptible change in the fluorescence signal of the supernatant liquid. This detection method has been tested for the sensing of phosphate ions present both in aqueous solutions and in biological samples, with excellent selectivity and a low limit of detection (~1.75 nM).



INTRODUCTION

Phosphate groups are an essential component of all living organisms, performing a variety of functions in metabolic processes.¹ As examples of their ubiquity, one can cite their presence in phospholipids, molecules essential for the formation of cell membranes, in adenosine triphosphate, the power supply for all cellular processes, and in nucleic acids,^{2,3} as well as the role played by calcic phosphate salts in structures that confer mechanical rigidity to bones and teeth.³

It is important to develop methods for a practical assessment of the phosphate level in biological samples. An inadequate phosphate level in body fluids could lead to many health problems, and therefore, determining the concentration of phosphate ions is essential for the clinical diagnosis of various diseases, such as kidney failure,⁴ hypertension, vitamin D deficiency, bone disorders, and hyperparathyroidism.^{4,5} Hyperphosphatemia, that is, an elevated level (>45 mg L⁻¹) of phosphate in blood serum, could lead to the formation of calcium deposits in soft tissues, hypoparathyroidism, diabetic ketoacidosis, and tumor lysis syndrome.^{3,6,7} On the other hand, low levels of phosphate in the blood (hypophosphatemia) correspond to an electrolyte disorder that can cause bone

softening, heart and respiratory failure, and even coma. This syndrome, which has a positive diagnosis¹ when the phosphate concentration in blood serum becomes lower than 25 mg L⁻¹, is classified as severe^{8,9} when these levels are below 10 mg L⁻¹.

In addition, phosphate is commonly used in fertilizers as a precursor of phosphorus, an essential plant nutrient. However, their extensive use in agriculture makes phosphate ions an important contaminant of both soil and water. The World Health Organization recommends a maximum phosphate concentration of 1 mg L⁻¹ in drinking water.³ High phosphate levels in lakes and coastal water can induce excessive growth of plants and algae (eutrophication), disrupting aquatic life cycles,^{10–12} in a process that is accelerated by intensive animal husbandry and anthropogenic discharges into the environment.¹² Hence, there is also a need for practical sensors that

Received: September 26, 2019

Revised: February 28, 2020

Published: March 2, 2020



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jesJES
JOURNAL OF
ENVIRONMENTAL
SCIENCESwww.jesc.ac.cn

Kinetics and thermodynamic studies of Methyl Orange removal by polyvinylidene fluoride-PEDOT mats

Romário J. da Silva¹, Lizeith Carolina Mojica-Sánchez², Filipe D.S. Gorza¹, Graciela C. Pedro¹, **Bruna G. Maciel**¹, Gabriela P. Ratkovski², Hérica D. da Rocha¹, Kamila T.O. do Nascimento¹, Juan C. Medina-Llamas³, Alicia E. Chávez-Guajardo⁴, José J. Alcaraz-Espinoza⁵, Celso P. de Melo^{1,2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

² Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³ Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No.18, Instituto Politécnico Nacional, 98160 Zacatecas, Zac, Mexico

⁴ Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98058 Zacatecas, Zac, Mexico

⁵ Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, 09340, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2019

Revised 21 April 2020

Accepted 21 April 2020

Keywords:

Electrospinning

Composite mats

PEDOT

PdF mats

Dye removal

Water remediation

ABSTRACT

We report the preparation of poly(3,4-ethylene dioxathiophene) (PEDOT)-modified polyvinylidene fluoride electrospun fibers and their use as a novel adsorbent material for the removal of the anionic dye Methyl Orange (MO) from aqueous media. This novel adsorbent material can be used to selectively remove MO on a wide pH range (3.0–10.0), with a maximum capacity of 143.8 mg/g at pH 3.0. When used in a recirculating filtration system, the maximum absorption capacity was reached in a shorter time (20 min) than that observed for batch mode experiments (360 min). Based on the analyses of the kinetics and adsorption isotherm data, one can conclude that the predominant mechanism of interaction between the membrane and the dissolved dye molecules is electrostatic. Besides, considering the estimated values for the Gibbs energy, and entropy and enthalpy changes, it was established that the adsorption process is spontaneous and occurs in an endothermic manner. The good mechanical and environmental stability of these membranes allowed their use in at least 20 consecutive adsorption/desorption cycles, without significant loss of their characteristics. We suggest that the physical-chemical characteristics of PEDOT make these hybrid mats a promising adsorbent material for use in water remediation protocols and effluent treatment systems.

© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences.

Introduction

Nowadays, access to a good water supply is a major social problem. In the past decades, water consumption at a global level increased at a faster rate than population growth. The production of a large number of effluents contaminated by organic matter, heavy metal ions, hormones, dyes, and agrochemicals, among others, is inherent to many human activities, such as industries, mining, and agriculture. According to the World Health Organization (WHO), 2.1 billion people around the world did not have access to safe drinking water in 2017 (Organization, 2017). Each year, water contamination causes the death of 1.6 million people

(Schwarzenbach et al., 2010), including more than 360,000 children (Organization, 2017).

In 1865, William Perkin revolutionized the food, textile, cosmetic, paper, leather, and paint industries by preparing the first synthetic organic dyes (Sharma et al., 2011). Since then, the large-scale use of synthetic dyes has made these compounds a recurring contaminant of industrial waters. Most of these chemical residues are stable under light exposure and environmental oxidation (Gong et al., 2013) and do not undergo biodegradation processes, remaining reactive during years.

Azo dyes, which represent the class of compounds most used in textile and food processes (Sharma et al., 2011) and account for 50%–70% of the world production of synthetic dyes (Gong et al., 2013), are characterized by the presence of one or more azo groups (–N=N–) attached to aromatic rings, substituted by different radical groups (Khaniabadi et al., 2016). These compounds not

* Corresponding author.

E-mail address: celso@df.ufpe.br (C.P. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.034>

1001-0742/© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences.



Extraction of plasmid DNA by use of a magnetic maghemite-polyaniline nanocomposite



Romário Justino da Silva^a, **Bruna Gomes Maciel^a**, Juan Carlos Medina-Llamas^b,
Alicia Elizabeth Chávez-Guajardo^c, José Jarib Alcaraz-Espinoza^d, Celso Pinto de Melo^{a,d,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 18, Instituto Politécnico Nacional, 98160, Zacatecas, Zac, Mexico

^c Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98058, Zacatecas, Zac, Mexico

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords
Plasmid DNA
Magnetic nanocomposite
Magnetic purification
Conducting polymers
Escherichia coli

ABSTRACT

We describe the use of a hybrid magnetic nanocomposite (HMNC) for the extraction and purification of plasmid DNA (pDNA) from *Escherichia coli* aqueous solutions. The HMNC, which was synthesized via emulsion polymerization, was characterized by transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, UV-Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering and magnetic measurements. The results confirmed the incorporation of polyaniline (Pani) in its conducting form onto a core formed by the magnetic iron oxide, with the hybrid particles presenting an average size of (95 ± 30) nm and a saturation magnetization of 30 emu/g. The yield, purity and quality of the pDNA purified by using the Pani HMNC were evaluated by UV-Vis spectroscopy, agarose gel electrophoresis, and Polymerase Chain Reaction (PCR), respectively. An average yield of $\sim 6.9 \mu\text{g}$ was obtained in the DNA extraction process, with the collected material presenting a good purity (a A260/280 ratio in the 1.68–1.82 range) and an excellent quality, as confirmed by subsequent PCR assays. Hence, this HMNC appears as a promising material for use in pDNA purification protocols, and we suggest that this novel HMNC-based methodology can be of general interest and find widespread application in different biomedical procedures.

1. Introduction

Plasmid DNA (pDNA) are double-stranded extra-chromosomal DNA molecules of a relatively small size that can replicate autonomously from the chromosomal DNA. Existing in free form in the cytoplasm of prokaryotic cells, pDNA usually carry most of the bacterial genes linked to adaptive functions, such as conjugation, metabolic functions of degradation, resistance to antibiotics and to the presence of metal ions, as well as to virulence factors [1–5]. Currently, pDNA is an indispensable tool for genetic engineering, and it is one of the most used vectors in the field of recombinant DNA technology for the expression of proteins and hormones, such as insulin, interferon-gamma, platelet-derived growth factor (PDGF) [6], growth hormone [7], vaccines [8–10], and gene therapy [11], among others. The characteristic small size confers a high stability to the pDNA molecules, which can be transferred not only to all descending cells but can also act as vectors either in horizontal gene transfer or in induced transformations, those in which they are introduced into target host cells. As an abundant number of copies of

them exists in each single cell, in the case of expression systems a large amount of protein can be produced [12–15].

High purity and good integrity are essential requirements for a DNA sample to be used as starting material in most biotechnology procedures, and so there is a permanent search for the development of new efficient protocols for pDNA extraction from bacterial cells. Ideally, such novel methods should provide for simple and rapid isolation procedures that could result in a high yield of good quality DNA, with minimum presence of proteins, salts, RNA, and other contaminants [16,17]. Nowadays, the main protocols available for plasmid purification are based on either liquid phase (phenol-chloroform) or solid phase adsorption, such as porous silica and ion exchange chromatography (molecular exclusion, reverse phase). These protocols may involve the use of toxic solvents and are usually time consuming, for demanding many steps and a large number of repetitive centrifugations [18,19]. On the other hand, more recently several alternative adsorbents with the capacity to interact electrostatically with biomolecules of interest (such as total DNA and pDNA) have been investigated for use in simple, safer

* Corresponding author. Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.
E-mail address: celso@df.ufpe.br (C. Pinto de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.013>

Received 23 November 2018; Received in revised form 21 March 2019; Accepted 21 March 2019

Available online 24 March 2019

0003-2697/ © 2019 Published by Elsevier Inc.

❖ **Artigo submetido**

1. 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.

❖ **Artigos em preparação**

- **Bruna G. Maciel**, Romário J. da Silva, Graciela C. Pedro, Filipe D. S. Gorza, Alicia E. Chávez-Guajardo, Juan C. Medina-Llamas, José J. Alcaraz-Espinoza, Gabriela P. Ratkovski, Celso P. de Melo. DNA extraction from human blood using commercial kits and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$ and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Chi}/\text{Pani}$ magnetic nanocomposites: a comparative study.
- **Bruna G. Maciel**, Romário J. da Silva, Lizeth Carolina Mojica-Sánchez, Gabriela P. Ratkovski, Hérica D. da Rocha, Winnie Q. Brandão, Juan C. Medina-Llamas, Alicia E. Chávez-Guajardo, José J. Alcaraz-Espinoza, Eduardo H. L. Falcão, Celso P. de Melo. Application of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Chi}/\text{Pani}$ magnetic nanocomposite for removal of Methyl Orange, Indigo Carmine, and Rhodamine B Dyes.
- Romário J. da Silva, **Bruna G. Maciel**, Graciela C. Pedro, Filipe D.S. Gorza, Gabriela P. Ratkovski, Alicia E. Chávez-Guajardo, Juan C Medina-Llamas, José J. Alcaraz-Espinoza, Celso P. de Melo. Magnetic Retrieval of DNA from aqueous media using a maghemite-polythiophene hybrid nanocomposite.
- Filipe D.S. Gorza, Graciela C. Pedro, Romário J. da Silva, **Bruna G. Maciel**, Juan C. Medina-Llamas, Alicia E. Chávez-Guajardo, José J. Alcaraz-Espinoza, Celso P. de Melo. Poly (methyl methacrylate)/chitosan/polyaniline composite membranes applied to the retrieval of DNA from aqueous media and blood samples.
- Graciela C. Pedro, Filipe D.S. Gorza, Hérica D. da Rocha, Gabriela P. Ratkovski, Edson S. Reis, Romário J. da Silva, **Bruna G. Maciel**, Celso P. de Melo. Multiproposal use of the PEDOT/ Fe_2O_3 magnetic nanocomposite for simple “turn-on” detection of nucleic acids and efficient removal of heavy metal ions and dyes.
- Gabriela P. Ratkovski, Danilo, R. Ratkovski, Romário J. Da Silva, Edson da S. Reis, **Bruna G. Maciel**, Celso P. de Melo. Chitosan/Alginate beads/Polypyrrole encapsulated Cobalt Ferrite nanoparticles for Methylene Blue removal.
- Elton M. de Araújo Lima, Romário J. da Silva, Gabriela P. Ratkovski, **Bruna G. Maciel**, Alicia E. Chávez-Guajardo, Celso P. de Melo. use of novel hybrid

magnetic nanocomposites as a therapeutic platform for cutaneous leishmaniasis.

❖ Patentes



12/09/2022 870220082667
10:38
29409161925855685

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

Pais: 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 bioplataforma 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, conseqüentemente, 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

PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/09/2022 às 10:38, Petição 870220082667



11/09/2021 870210083867
19:36
29409161925842788

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 018053 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

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): PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS PROTÉICAS COMPÓSITAS NANOESTRUTURADAS E SEU USO COMO ELETRODOS PARA SUPERCAPACITORES ORGÂNICOS FLEXÍVEIS DE ESTADO SÓLIDO

Resumo: A presente invenção estende-se ao processo de obtenção de eletrodos compósitos flexíveis a partir de membranas protéicas, nanoestruturas de carbono (NEC) e polímeros intrinsecamente condutores (PIC), mas não somente esses, através da técnica de ultrassonicação e a seu uso como eletrodos na preparação de dispositivos supercapacitores orgânicos flexíveis de estado sólido, dentre outros dispositivos, e sensores baseados em eletrônica orgânica. A presente metodologia, que é baseada na obtenção de eletrodos orgânicos a partir de um processo simples, rápido e de baixo custo, tem como objetivo permitir a incorporação de NEC e PIC em uma matriz protéica de membranas de casca de ovo (MCO) para a preparação simplificada de dispositivos orgânicos flexíveis de armazenamento de energia com mecanismo de armazenamento híbrido (armazenamento dupla camada e pseudo-capacitivo), que podem ser usados nas tecnologias emergentes de eletrônicos vestíveis, internet das coisas, buffers em sistemas stop-go de veículos híbridos, dispositivos indutivos de transferência de energia sem fio, rede de sensores sem fio, para saúde, monitoramento industrial e ambiental, entre outros.

Figura a publicar: 1

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 11/09/2021 às 19:36, Petição 870210083867



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 026994 1

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

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

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/12/2020 às 10:39, Petição 870200162779

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 073701 5

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: Órgão Público

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): NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE ÓXIDO DE FERRO E POLITIOFENO E SEUS DERIVADOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS

Resumo: A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético híbrido (NCMH) composto por partículas magnéticas revestidas pelo polímero condutor politiofeno (Ptf), ou algum de seus derivados, como material adsorvente de fase sólida em uma série de metodologias para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas presentes em amostras biológicas ou em meios aquosos.

Figura a publicar: 8

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 067992 9

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: Órgão Público

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_cine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MEMBRANA COMPÓSITA POROSA DE POLIMETILMETACRILATO/QUITOSANA/POLIANILINA - PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E SEU USO PARA A EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Resumo: A extração e purificação de biomoléculas são etapas-chave em vários protocolos de biologia molecular. Em particular, a concentração de ácidos nucleicos de boa qualidade e alta produtividade é cada vez mais necessária em procedimentos envolvendo sequenciamento genético, diagnóstico de doenças e criminologia forense, entre outras aplicações. Neste contexto, na presente invenção, é relatada a preparação de uma nova membrana compósita porosa e seu uso em kits ou protocolos para extração, purificação e concentração de biomoléculas. A membrana compósita consiste de uma membrana de polímero não-condutor produzida através da técnica de eletrofição, que, posteriormente, é funcionalizada com o uso de um polissacarídeo catiônico e, em seguida, por um polímero condutor.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/09/2018 às 10:24, Petição 870180127246

❖ Resumos publicados em anais

- **MACIEL, BRUNA GOMES**; SILVA, R. J. ; PEDRO, G. C. ; GORZA, F. D. S. ; NASCIMENTO, K. T. O. ; Plautz, G. L. ; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, JOSÉ JARIB ; MELO, C. P. De. DNA extraction from human blood using commercial kits and γ -Fe₂O₃/Pani and γ -Fe₂O₃/Chi/Pani magnetic nanocomposites: a comparative study. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.
- **MACIEL, BRUNA GOMES**; SILVA, R. J. ; GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; MELO, C. P. De. Use of γ -Fe₂O₃/Chi/Pani nanocomposite for the multipurpose removal of water contaminants. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.
- SILVA, R. J.; **MACIEL, BRUNA GOMES**; GORZA, F. D. S.; PEDRO, G. C.; Plautz, G. L.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E; MEDINA-LLAMAS, J. C.; ALCARAZ-ESPINOZA, JOSÉ JARIB; MELO, C. P. De. Magnetic retrieval of dna from aqueous media using a γ -Fe₂O₃@Polythiophene nanocomposite. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.
- SILVA, R. J.; **MACIEL, BRUNA GOMES**; NASCIMENTO, K. T. O.; GORZA, F. D. S.; PEDRO, G. C.; REIS, E. S.; Plautz, G. L.; ROCHA, H. D.; ALCARAZ-ESPINOZA, JOSÉ JARIB; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E; MEDINA-LLAMAS, J. C.; MELO, C. P. De. Use of polyvinylidene fluoride-pedot mats for methyl orange removal: adsorption, desorption, kinetic and thermodynamic studies. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.
- GORZA, F. D. S.; PEDRO, G. C.; ROCHA, H. D.; SILVA, R. J.; **MACIEL, BRUNA GOMES**; MEDINA-LLAMAS, J. C.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E; ALCARAZ-ESPINOZA, JOSÉ JARIB; MELO, C. P. De. Use of poly (methyl methacrylate)/chitosan/polyaniline membranes for retrieval of DNA from aqueous media. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.
- PEDRO, G. C.; GORZA, F. D. S.; ROCHA, H. D.; REIS, E. S.; Plautz, G. L.; SILVA, R. J.; **MACIEL, BRUNA GOMES**; MELO, C. P. De. Application of γ -Fe₂O₃/PEDOT magnetic nanocomposites as efficient agents for the removal of heavy metal ions and organic dyes. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.
- PEDRO, G. C.; GORZA, F. D. S.; REIS, E. S.; ROCHA, H. D.; Plautz, G. L.; SILVA, R. J.; **MACIEL, BRUNA GOMES**; MELO, C. P. De. Use of Fe₂O₃/PEDOT magnetic nanocomposites for a simple turn-on fluorescent detection of nucleic acids. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.
- PLAUTZ, G. L.; NASCIMENTO, K. T. O.; PEDRO, G. C; SILVA, R. J.; REIS, E. S.; GORZA, F. D. S.; **MACIEL, BRUNA GOMES**; MELO, C. P. De. Sensing phosphate by Cobalt Ferrite nanoparticles (CoFe₂O₄ NPs). In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.

- NASCIMENTO, K. T. O.; PEDRO, G. C.; Plautz, G. L.; GORZA, F. D. S.; SILVA, R. J.; **MACIEL, BRUNA GOMES**; MELO, C. P. De. Use of intrinsically conductive polymer bilayer films for the fluorescence-based molecular diagnosis of the Zika virus. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. XVII Brazil MRS Meeting, 2018.