

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Departamento de Farmacociências

Curso de Bacharelado em Química Medicinal

Vinícius Klein Flach

**Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Óxido de Ferro para Extração de Ácido
Desoxirribonucleico**

Porto Alegre

2025

Vinícius Klein Flach

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Óxido de Ferro para Extração de Ácido Desoxirribonucleico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Medicinal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química Medicinal.

Orientadora: Profa. Dra. Monique Deon

Co-orientador: Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Porto Alegre
2025

Catálogo na Publicação

Flach, Vinícius Klein

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Óxido de Ferro para Extração de Ácido Desoxirribonucleico / Vinícius Klein Flach. -- 2025.

47 p. : il., tab. ; 30 cm.

Monografia (trabalho de conclusão de curso) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Curso de Química Medicinal, 2025.

Orientador(a): Profa. Dra. Monique Deon ;
coorientador(a): Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib.

1. Nanopartículas magnéticas. 2. Extração de DNA. 3. Extração em fase sólida. 4. Magnetita . 5. PCR em tempo real. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço à UFCSPA por todos os anos de aprendizagem e por proporcionar um espaço essencial para a realização deste trabalho. Agradeço também às agências de fomento, FAPERGS e CNPq, pelo apoio financeiro para a execução desta pesquisa.

Expresso minha imensa gratidão à minha orientadora, Profa. Dra. Monique Deon, por toda a dedicação, pelas contribuições ao desenvolvimento deste estudo e pelas palavras de conforto e incentivo nos momentos necessários. Agradeço também ao meu coorientador, Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib, pelo apoio constante ao longo dessa trajetória, bem como aos doutorandos Luiz Carlos Ferreira e Mônica Silva, pelo auxílio no laboratório de biologia molecular.

Ao Laboratório de Química 320 e ao Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, deixo meu sincero agradecimento às técnicas, que sempre estiveram presentes para me orientar durante as práticas laboratoriais.

Agradeço igualmente aos meus colegas Luis Felipe Vasconcelos, Ana Laura Nery, Magáli Moreira e Carolina Machado da Química Medicinal por todos esses anos de parceria, amizade e pelas discussões que contribuíram para os achados deste trabalho.

Estendo meu agradecimento aos membros da minha família, meu irmão Guilherme, minha mãe Débora, minhas irmãs Tailini e Elisa, e ao meu namorado Sanklei, que em todos os momentos estiveram ao meu lado, sempre torcendo e desejando o meu melhor. Agradeço também ao meu pai Arnildo, em memória, que hoje não está aqui para acompanhar esta conquista, mas que teve um papel fundamental no início da minha jornada acadêmica e permanece presente comigo em cada passo que dou.

Por fim, agradeço aos meus amigos Leonardo, Luiz, Gustavo e Thalís, cuja amizade tornou até os dias mais difíceis, mais leves e divertidos. A eles e aos demais amigos que cruzaram meu caminho e trouxeram ainda mais significado a essa jornada, expresso meu sincero muito obrigado.

Resumo

Novas metodologias de extração de DNA têm surgido para substituir o uso de reagentes tóxicos e reduzir o trabalho laboratorial. As nanopartículas de óxido de ferro (MNPs), especialmente as magnéticas, permitem o isolamento dessa biomolécula de forma rápida e eficiente. Neste trabalho, MNPs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} e posteriormente funcionalizadas com PEG, SDS e APTES. As amostras foram caracterizadas por TEM, SEM, FT-IR e TGA e aplicadas na extração em fase sólida de DNA. A eficiência de extração foi avaliada por PCR em tempo real do gene *BRAF*. As MNPs apresentaram propriedades magnéticas, diâmetro entre 10 e 30 nm e resultado positivo a respeito da funcionalização para SDS e APTES. As amostras de MNPs permitiram a amplificação do DNA, sendo o tempo de dessorção de 10 min o mais eficiente (*cycle threshold*, $\text{Ct} = 23$). O aumento do volume de extração, entretanto, não promoveu aumento na recuperação do DNA, o que fortalece o uso de condições miniaturizadas, com menor consumo de reagentes e produção de resíduos. Os resultados obtidos comprovam a eficiência das MNPs na extração de ácidos nucleicos, demonstram o potencial da nanociência no desenvolvimento de materiais funcionais e sustentáveis, e abrem perspectivas para a otimização das condições experimentais e o aprimoramento de sistemas de extração de alto desempenho.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas; óxido de ferro; magnetita; extração de DNA; extração em fase sólida; PCR em tempo real.

Abstract

New methodologies for DNA extraction have emerged as alternatives to replace toxic reagents and reduce laboratory workload. Iron oxide nanoparticles (MNPs), especially magnetic ones, enable the rapid and efficient isolation of this biomolecule. In this study, MNPs were synthesized by the coprecipitation method of Fe^{2+} e Fe^{3+} ions and subsequently functionalized with PEG, SDS, and APTES. The samples were characterized by TEM, SEM, FT-IR, and TGA, and applied to solid-phase DNA extraction. Extraction efficiency was evaluated by real-time PCR of the *BRAF* gene. The MNPs exhibited magnetic properties, particle diameters ranging from 10 to 30 nm, and positive results for SDS and APTES functionalization. MNPs samples enabled DNA amplification, with a desorption time of 10 min being the most efficient (cycle threshold, $C_t = 23$). However, increasing the extraction volume did not improve DNA recovery, reinforcing the advantages of miniaturized conditions with lower reagent consumption and waste generation. The results confirm the efficiency of MNPs in nucleic acid extraction, highlight the potential of nanoscience in the development of functional and sustainable materials, and open perspectives for optimizing experimental conditions and improving high-performance extraction systems.

Key-words: Magnetic nanoparticles; iron oxide; magnetite; DNA extraction; solid-phase extraction; real-time PCR.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura química do DNA.	13
Figura 2 – Modelo do arranjo cristalino do tipo espinélio inverso da magnetita.	17
Figura 3 – Metodologias de síntese <i>bottom-up</i> e <i>top-down</i>	18
Figura 4 – Estabilidade do sistema coloidal.	20
Figura 5 – Estrutura molecular do PEG.	20
Figura 6 – Estrutura molecular do SDS.	21
Figura 7 – Estrutura molecular do APTES.	22
Figura 8 – Metodologia de extração.	27
Figura 9 – Exposição das MNPs ao campo magnético.	28
Figura 10 – SEM das MNPs sintetizadas em dias diferentes.	29
Figura 11 – TEM das MNPs não funcionalizadas.	30
Figura 12 – Espectro de infravermelho das dispersões de nanopartículas.	31
Figura 13 – Perfil de difração da amostra de MNPs comparado ao padrão cristalográfico do JCPDS da magnetita.	32
Figura 14 – Perda de massa observada através da TGA para cada uma das amostras de MNPs.	34
Figura 15 – Curva de amplificação.	35
Figura 16 – Curva de <i>melting</i> para as amostras de extração e controles.	37

Lista de tabelas

Tabela 1 – Perda de massa das amostras em diferentes faixas de temperatura durante a TGA, bem como a perda de massa total e a porcentagem de massa orgânica presente em cada amostra.	33
Tabela 2 – Condições de extração para cada amostra e os seus respectivos Ct	36

Lista de Siglas e Abreviações

APTES 3-aminopropiltrietoxissilano

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

CN_{Nano} controle negativo da extração

CN_{PCR} controle negativo da PCR

CP_{PCR} controle positivo da PCR

Ct limiar do ciclo, do inglês *Cycle Threshold*

DNA ácido desoxirribonucleico

FT-IR espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

JCPDS *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*

LPE extração em fase líquida

MNPs nanopartículas de óxido de ferro

MNPs-APTES MNPs estabilizadas por APTES

MNPs-PEG MNPs estabilizadas por PEG

MNPs-SDS MNPs estabilizadas por SDS

PCR reação em cadeia da polimerase

PEG polietilenoglicol

PLGA poli(ácido láctico-co-glicólico)

PVA álcool polivinílico

RNA ácido ribonucleico

SDS dodecil sulfato de sódio

SEM microscopia eletrônica de varredura

SPE extração em fase sólida

TEM microscopia eletrônica de transmissão

TGA análise termogravimétrica

T_m temperatura de *melting*

UFCSPA Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul

XRD difração de raios X

Sumário

1	Introdução	11
2	Revisão Bibliográfica	13
2.1	Ácido Desoxirribonucleico (DNA)	13
2.2	Metodologias de Extração	14
2.3	Nanotecnologia	15
2.4	Metodologias de Síntese das MNPs	17
2.5	Agentes Estabilizantes	19
2.5.1	Polietilenoglicol (PEG)	20
2.5.2	Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	21
2.5.3	3-aminopropiltrietoxissilano (APTES)	22
2.6	Caracterização das Nanopartículas	22
3	Objetivos	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	Metodologia	24
4.1	Síntese das Nanopartículas de Magnetita	24
4.2	Funcionalização das Nanopartículas	24
4.3	Caracterização das Nanopartículas	25
4.4	Preparo das Amostras para Extração de DNA	25
4.4.1	Obtenção do DNA a partir do sangue total	25
4.4.2	Amostras para Extração	26
4.5	Extração em Fase Sólida com Emprego de Nanopartículas Magnéticas	26
4.6	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real	27
5	Resultados e Discussão	28
5.1	Síntese e Caracterização das MNPs	28
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	29
5.1.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	29
5.1.3	Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	30
5.1.4	Difração de Raios X (XRD)	32
5.1.5	Análise Termogravimétrica (TGA)	33
5.2	Extração do DNA	35
6	Conclusão e Perspectivas	38
6.1	Conclusão	38
6.2	Perspectivas	39
	Referências	40

1 Introdução

Pequenas mudanças no material genético humano podem gerar grandes consequências biológicas, estando muitas vezes associadas a doenças genéticas complexas. O ácido desoxirribonucleico (DNA) juntamente com o ácido ribonucleico (RNA) são os protagonistas quando se trata de armazenamento de informação genética. Por isso, o estudo da estrutura química e da constituição dos ácidos nucleicos, bem como o sequenciamento destas macromoléculas, é de extrema importância para o entendimento das doenças genéticas. [1]

A eficiência das técnicas de estudo dos ácidos nucleicos depende diretamente das técnicas de extração e purificação dessas biomoléculas. Existe, portanto, a necessidade de criar estratégias de extração que sejam eficientes e específicas para o DNA, promovendo a extração de concentrações mais elevadas de DNA e com uma menor presença de interferentes no produto da extração. Entretanto, os métodos convencionais de extração dos ácidos nucleicos costumam envolver grande quantidade de tempo, reagentes tóxicos ou em grande quantidade e acabam por ser técnicas consideradas complexas. [2]

Os métodos de extração podem ser divididos em extração em fase líquida (LPE) e extração em fase sólida (SPE). Os de fase líquida, tendem a fazer a extração pela diferença das propriedades químicas entre os componentes da extração, enquanto a extração em fase sólida utiliza as interações entre o DNA e o material adsorvente para promover a separação. [2] Além disso, a LPE demanda um grande número de amostras, tempo de extração elevado e o uso de solventes tóxicos, resultando em baixa pureza e risco de degradação da amostra. Por isso, técnicas de SPE surgem para aprimorar a extração dos ácidos nucleicos, com tempos de extração mais curtos e com maior pureza, bem como a simplificação do trabalho laboratorial. [3] Os materiais mais comumente utilizados como fase extratora na SPE são baseados em sílica, nanopartículas metálicas e polímeros. [4–6]

A nanociência entra como uma área capaz de potencializar a biologia molecular, especialmente em casos de extração de ácidos nucleicos, tendo em vista que já existem nanopartículas capazes de isolar o DNA de matrizes biológicas. [7, 8] As nanopartículas, objeto de estudo da nanociência, são caracterizadas por serem materiais que possuem pelo menos uma de suas dimensões menor do que 100 nm. Um dos tipos de nanopartículas mais utilizados são as nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos, tendo como principais metais precursores o ferro, o ouro e a prata. [9]

A principal diferença entre as nanopartículas e o “*bulk*” envolve as suas propriedades físico-químicas diferenciadas, já que as nanopartículas possuem uma alta razão área-volume, ao contrário dos demais objetos. Devido a essa característica, as nanopartículas tendem a sofrer mudanças nas suas propriedades ópticas, magnéticas e eletrônicas de acordo com os grupos funcionais ou átomos que estarão presentes na sua superfície. Além disso, pode-se afirmar que mudanças na

morfologia e tamanho dessas nanopartículas também afetam o seu comportamento. [10]

Dessa forma, é de extrema necessidade controlar a formação das nanopartículas a fim de evitar qualquer mudança indesejada nas suas propriedades. Por isso, o uso de agentes estabilizantes, como polímeros ou tensoativos, vem sendo essencial durante a síntese das nanopartículas. [11] Como exemplos de polímeros utilizados na síntese de nanopartículas pode-se citar o polietilenoglicol (PEG) e álcool polivinílico (PVA). [12,13] Já como um tensoativo possível tem-se o dodecil sulfato de sódio (SDS). [14] A presença desse tipo de agente promove uma maior estabilidade às nanopartículas e ainda permite interações mais específicas com outras moléculas, uma vez que cada agente estabilizante possui grupos funcionais distintos em sua estrutura. [11]

As nanopartículas de óxido de ferro (MNPs) são exemplos de nanomateriais que, em sua maioria, apresentam propriedades magnéticas e se beneficiam do uso de agentes estabilizantes tanto para aumentar a estabilidade dos coloides quanto para direcionar as interações com outras moléculas, tornando-as mais seletivas frente ao analito de escolha. Essas nanopartículas são frequentemente estudadas devido a sua grande biocompatibilidade com as células do corpo humano e por serem um material considerado não tóxico. As suas aplicações vão desde o diagnóstico até o tratamento de doenças, sendo comumente utilizadas em liberação de fármacos, ressonância magnética, rastreamento de células e extração de ácidos nucleicos. [5, 15]

O óxido de ferro possui diferentes formas de cristalização, sendo as formas magnetita (Fe_3O_4), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) as mais conhecidas. Na formação de nanopartículas, as formas magnetita e maghemita são as mais recorrentes na literatura. [16] Um comportamento das MNPs que permite essas diversas aplicações é seu ferrimagnetismo, o qual é responsável por possibilitar a fácil manipulação dos coloides através da aplicação de campos magnéticos externos. [16]

Existe uma grande variedade de metodologias de síntese das MNPs e cada uma delas foi desenvolvida em condições distintas a fim de controlar a morfologia e o tamanho desses materiais. Os métodos que já estão sendo utilizados para sintetizar esses coloides são o sol-gel [17], o solvotérmico [18], o por microemulsão [19], o por decomposição térmica [20] e o de coprecipitação [12, 14].

O método de coprecipitação é um dos métodos de síntese de MNPs mais utilizado nos dias atuais. [16] Esse método consiste em uma precipitação em conjunto dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa a partir da adição de uma solução básica, muitas vezes sendo hidróxido de amônio ou de sódio. Esse método continua sendo um dos métodos de síntese mais utilizados devido ao seu manejo acessível, podendo ser facilmente empregado em larga escala, bem como vantagens relacionadas a uniformidade do sistema coloidal, com nanopartículas em sua maioria esféricas e com tamanho entre 10 e 100 nm. [16]

Sendo assim, considerando a necessidade de desenvolver metodologias alternativas para a extração de ácidos nucleicos, este trabalho propõe a utilização de MNPs como material extrator de DNA, como base em trabalhos já reportados na literatura [5, 21]. Essas nanopartículas foram escolhidas por apresentarem propriedades magnéticas e capacidade de funcionalização,

características que podem aumentar a eficiência do processo de extração da biomolécula. As MNPs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação e estabilizadas com diferentes agentes, a fim de avaliar a influência das condições de síntese nas propriedades físico-químicas das nanopartículas e, consequentemente, na sua capacidade de isolamento do DNA.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Os ácidos nucleicos possuem uma estrutura que está diretamente associada com a sua função. Essas macromoléculas são compostas por uma cadeia longa de nucleotídeos responsáveis por armazenar toda a informação genética dos seres vivos. Dependendo da sequência em que esses nucleotídeos estão dispostos nessas biomoléculas, diferentes proteínas serão sintetizadas. Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada, um grupo fosfato e um açúcar. No DNA, as bases nitrogenadas complementares se associam por meio de ligações de hidrogênio, enquanto os desoxirribonucleotídeos são unidos em uma mesma fita por ligações fosfodiéster, o que possibilita a formação da estrutura de dupla hélice do DNA. Todas essas estruturas podem ser observadas, respectivamente, nas Figuras 1a, 1b, 1c e 1d. [22]

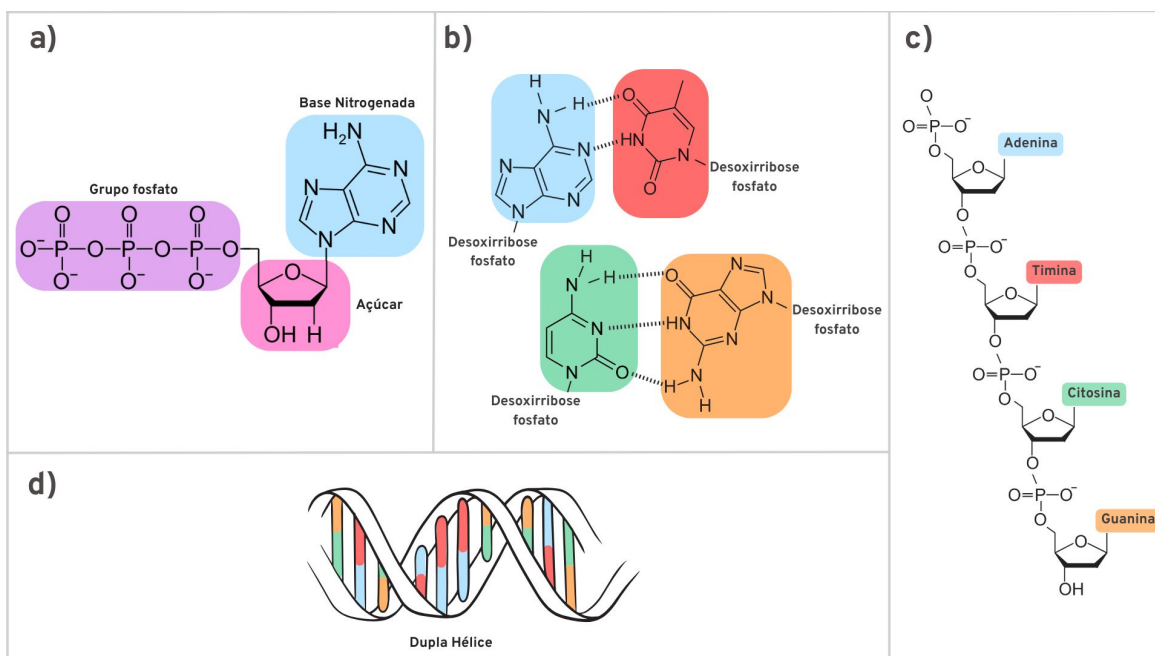


Figura 1 – Estrutura química do DNA. a) Estrutura química de um nucleotídeo; b) Ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas complementares; c) Ligações fosfodiéster entre diferentes nucleotídeos; d) Modelo da dupla hélice do DNA.

Técnicas com o propósito de sequenciar, amplificar ou detectar o DNA surgem para aperfeiçoar as metodologias mais antigas de estudo dos ácidos nucleicos. Uma das técnicas bastante conhecida e utilizada para amplificar o DNA é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica promove a amplificação exponencial do DNA que gera cópias suficientes para análises posteriores. Muitas áreas do conhecimento passaram a utilizar dessa tecnologia para aprimorar os seus trabalhos, sendo utilizadas em testes de paternidade, medicina forense, processos industriais, bem como no diagnóstico de doenças genéticas. [22]

A PCR convencional é uma técnica que permite a amplificação de até 1 milhão de cópias de DNA ao fim dos seus 20 ciclos. Cada um dos ciclos é constituído por três etapas, sendo a primeira a desnaturação da dupla fita (em 95 °C), a segunda o anelamento dos primers (entre 45-65 °C) e a última sendo a etapa de extensão da cadeia de DNA (entre 68-72 °C). O equipamento responsável por fazer a mudança de temperatura é o termociclador. Nesse tipo de reação, é necessário a presença da sequência-alvo do DNA, da DNA polimerase termoestável, do tampão, de *primers*, desoxirribonucleotídeos e uma concentração adequada de Mg^{2+} . [22]

Uma técnica mais recente de amplificação é a PCR em tempo real, que possibilita o acompanhamento da amplificação durante todos os ciclos, não somente ao final da reação, como acontece na PCR convencional. [22] Diversos são os estudos que utilizam da PCR em tempo real para detectar e quantificar a presença de DNA em suas amostras e se houve amplificação do gene de interesse. [23–25] Além disso, a utilização dessas biomoléculas amplificadas para estudos posteriores na área da biotecnologia também estão em evidência nos dias atuais. [26]

2.2 Metodologias de Extração

Previamente às etapas de amplificação, são necessárias etapas de extração e isolamento do DNA. Uma das primeiras metodologias capaz de extrair ácidos nucleicos envolvendo baixo custo e com alto nível de pureza era baseada na lise das células com auxílio de uma base, seguida por uma centrifugação em um gradiente de densidade de CsCl e brometo de etídio. Porém, uma de suas desvantagens é a utilização de brometo de etídio, um reagente mutagênico forte. [27]

Outro método importante dentro das metodologias clássicas é a extração com fenol e clorofórmio. Ele é baseado na separação de fases, onde o DNA permanece solúvel na porção aquosa (sobrenadante) e o restante da célula é encontrado como um precipitado. [27] Entretanto, mesmo sendo acessível e de fácil manuseio laboratorial, devido ao fenol ser um reagente tóxico, outras técnicas de extração vem sendo desenvolvidas para diminuir esses problemas recorrentes nas técnicas clássicas. [24, 28]

Além das técnicas de LPE, começam a ser desenvolvidas também metodologias de SPE. Em ambas metodologias, é de extrema necessidade escolher a fase extratora e a solução dessorvente adequadamente, pois isso irá influenciar diretamente na eficiência de extração. [29] Existem mecanismos a nível molecular comuns para que ocorra a extração dos analitos na SPE. Eles geralmente estão associados a trocas iônicas, adsorção, exclusão por tamanho, interações de fase

reversa/normal ou a combinação de algumas delas. Interações eletrostáticas, de complexação e de van der Waals são comumente relacionadas com mecanismos de adsorção, enquanto ligações de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo estão relacionadas a mecanismos de fase normal. [29]

Umas das principais fases extratoras no estado sólido é a sílica, que permite a adsorção do DNA a sua superfície após um período de incubação. [27] Em um estudo para compreender as interações entre a sílica e o DNA, foram preparadas partículas de sílica com polipirrol funcionalizadas com grupos amino e carboxílico. [30] Foi reportado que as partículas não funcionalizadas não eram capazes de adsorver o DNA, enquanto as funcionalizadas tinham capacidade de adsorção. Devido a isso, constatou-se que mudanças na superfície da sílica eram importantes e que a adsorção do analito foi promovida principalmente pelas interações eletrostáticas com o grupo amino e pelas ligações de hidrogênio com os grupos carboxílicos.

Outro maneira de realizar uma SPE é utilizando uma coluna de extração. Um estudo preparou sua coluna de fase sólida, contendo (trimetoxisilil)propil metacrilato (TMSPM) funcionalizado com diferentes concentrações de tetrametil ortosilicato (TMOS) para isolar o material genético de algumas amostras. [31] A amostra perpassa a coluna, o DNA adsorve na superfície da fase sólida e com um pequeno volume de solvente de dessorção o DNA é dessorvido da coluna. Essa metodologia permitiu a extração tanto de amostras pré-purificadas quanto de amostras de sangue, uma matriz conhecida por ser complexa.

A utilização de nanopartículas como uma fase sólida extratora possui diversas vantagens em relação aos materiais mais clássicos da SPE. As técnicas de SPE que utilizam materiais não porosos em escalas maiores, como na micrométrica, por exemplo, apresentam limitações associadas às suas dimensões, o que dificulta a interação entre o analito e a superfície do material. As nanopartículas, por sua vez, permitem extrações com alta eficiência e com uma rápida cinética de extração por possuírem uma grande razão área-volume, e por consequência uma vasta área superficial capaz de realizar interações químicas com os analitos investigados. [29]

Entretanto, a manipulação e a separação das nanopartículas durante a etapa de extração constituem uma limitação frequente para o uso desse material como fase extratora, uma vez que nanopartículas não magnéticas, embora apresentem vantagens como controle de tamanho, morfologia e área superficial, demandam etapas adicionais de separação, como centrifugação ou filtração. [32] Dessa forma, as MNPs ganham destaque, pois suas propriedades magnéticas possibilitam fácil manipulação do sistema de extração por meio da aplicação de um campo magnético externo.

2.3 Nanotecnologia

A nanociência em conjunto com a nanotecnologia buscam entender os comportamentos dos materiais com tamanho entre 1 e 100 nm, já que eles não se comportam de acordo com as leis físicas propostas para materiais em escalas maiores. Devido a pequenas oscilações no sistema em que os nanomateriais estão inseridos, podem haver mudanças significativas nas suas pro-

priedades. [33] Por conta disso, a nanotecnologia possui aplicações diversas, como na entrega direcionada de fármacos [34], em biossensores [35], na filtração e purificação de água [36], além do uso em técnicas de extração e isolamento de analitos [8, 29].

Em relação às nanopartículas, todas as suas propriedades dependem significativamente do seu tamanho, da morfologia e da topografia superficial. [33] Até o presente momento, esforços consideráveis têm sido realizados para encontrar métodos eficientes para gerar e caracterizar nanopartículas com tamanho altamente uniforme e alta pureza. Muitas metodologias avaliam diferentes condições de síntese para conseguir controlar a morfologia das nanopartículas, variando, por exemplo, a temperatura, a concentração dos materiais de partida, os agentes redutores utilizados, promovendo a adição de agentes estabilizantes e aplicando técnicas baseadas em irradiação. [37, 38]

As nanopartículas metálicas representam uma classe importante de nanomateriais utilizados em diversas áreas da ciência. Dentro dessa classe, metais nobres, como ouro, prata e platina, e metais como ferro, cobre, alumínio e zinco, bem como seus respectivos óxidos, ganham destaque em função de suas propriedades ópticas, como emissão de fluorescência por *quantum dots* e materiais plasmônicos, e de suas propriedades magnéticas, como o ferrimagnetismo e o superparamagnetismo. [39]

Propriedades magnéticas das nanopartículas são desejadas em diversas áreas da ciência devido a sua fácil manipulação com um campo magnético externo. Esse tipo de nanopartícula é geralmente composta por metais como ferro, níquel e cobalto ou uma liga metálica entre eles. Também é muito comum a utilização de óxidos desses metais para formar nanopartículas, sendo o mais comum o óxido de ferro. Entretanto, as MNPs são pouco estáveis em contato com o ar atmosférico, pois sofrem diversas reações de oxidação com o O₂, que podem ocasionar a perda de suas propriedades magnéticas. [40]

As propriedades magnéticas das MNPs dependem diretamente da estrutura cristalina do material. Dentre as diferentes fases de cristalização possíveis para os óxidos de ferro, a magnetita é a ferrita que costuma apresentar maior resposta magnética. [41] Seu arranjo cristalino é do tipo espinélio inverso (Figura 2), na qual os íons Fe³⁺ estão localizados nos sítios tetraédricos, coordenados a quatro átomos de oxigênio, enquanto os íons Fe²⁺ e Fe³⁺, distribuídos em igual proporção, ocupam os sítios octaédricos da estrutura cristalina, cada um coordenado por seis átomos de oxigênio. Além disso, em razão do empacotamento cúbico compacto do íons O²⁻ e, por consequência, a formação de duas subredes de sítios tetraédricos e octaédricos, a rede de Bravais da magnetita corresponde a uma estrutura cúbica de face centrada. [42, 43]

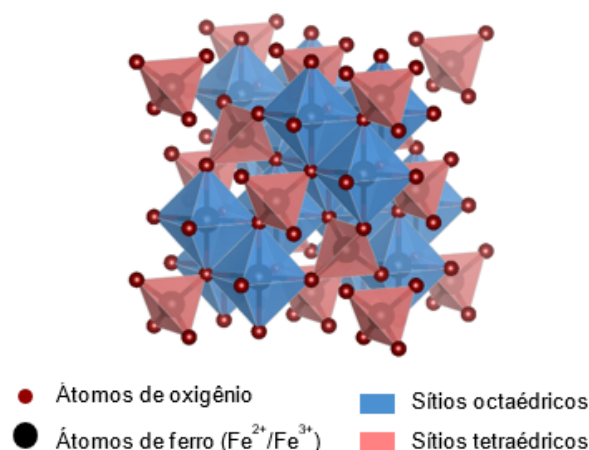


Figura 2 – Modelo do arranjo cristalino do tipo espinélio inverso da magnetita. [43]

Devido ao magnetismo das MNPs e sua biocompatibilidade, elas possuem aplicações dentro da área de ressonância magnética, sendo capazes de localizar alguns tumores específicos quando funcionalizadas. [44] Além disso, atualmente sabe-se que a entrega não seletiva de alguns medicamentos causa uma série de efeitos colaterais indesejáveis e por isso estudos vêm sendo feitos para a entrega de fármacos em órgãos específicos. [45] Uma pesquisa co-encapsulou a cisplatina e as MNPs em uma plataforma de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) funcionalizada com quitosana e PVA. [46] Esse sistema foi direcionado para células tumorais específicas e teve sua citotoxicidade confirmada, além de apresentar resultados mais promissores do que aqueles que utilizam da cisplatina na forma livre.

Outra área de aplicação das MNPs envolve a biologia molecular, onde as MNPs são capazes de isolar DNA de diferentes amostras biológicas. Em um estudo onde as MNPs foram funcionalizadas com quatro diferentes compostos — sílica, quitosana, 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) e tris(hidroximetil)aminometano — observou-se que nanopartículas funcionalizadas com sílica, quitosana e tris possuem maior capacidade de isolar o DNA plasmidial do que aquelas livres ou funcionalizadas com APTES. [21] Além do mais, outro estudo mostrou que MNPs estabilizadas com PEG conseguiram fazer a extração de DNA genômico de bactérias *E. coli* na presença de uma solução tampão. [5] Em resultados da eletroforese, quando essas mesmas nanopartículas foram dispostas para isolar o DNA em uma solução de água ultra-pura, sem a presença de uma solução tampão, não houve aparição de uma banda no gel, indicando que a extração do material genético não ocorreu.

2.4 Metodologias de Síntese das MNPs

As nanopartículas podem ser obtidas através de dois tipos de métodos, o método *top-down*, quando os coloides são obtidos a partir de materiais de maior tamanho e *bottom-up*, que parte de estruturas menores, como átomos e moléculas (Figura 3). As abordagens de *bottom-up* são

amplamente baseadas em abordagens químicas tradicionais, apresentando vantagens associadas à baixa demanda de energia e menor consumo de recursos, quando comparadas aos métodos de *top-down*. Além disso, oferecem maior precisão, uma vez que permitem distribuir os átomos no espaço de forma mais controlada. [33]

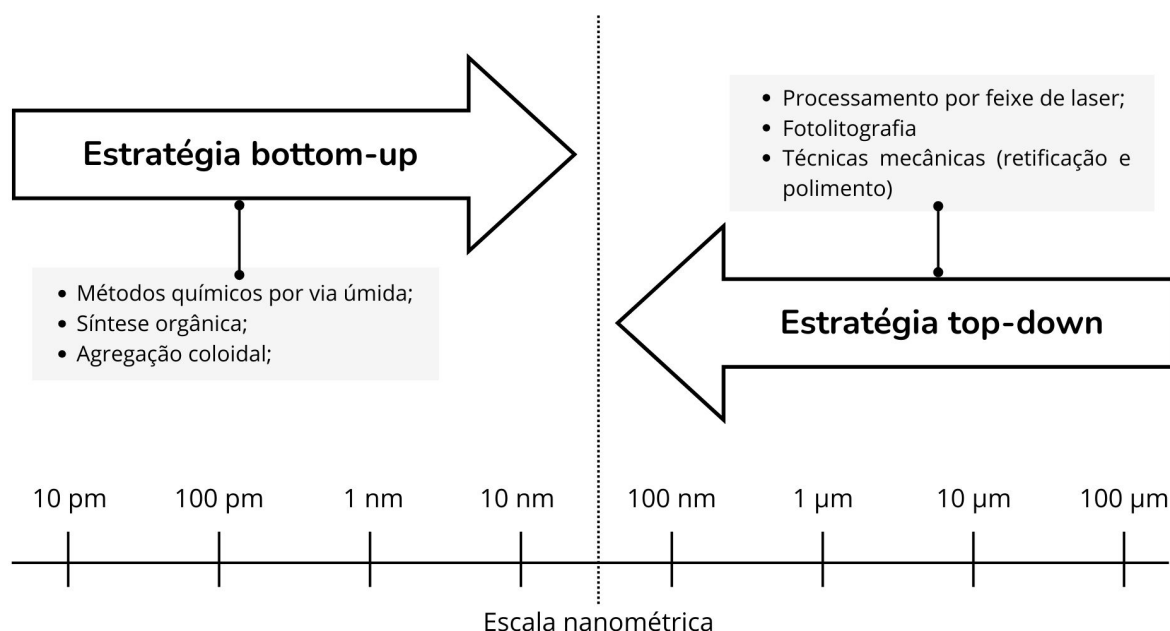


Figura 3 – Metodologias de síntese *bottom-up* e *top-down* (Figura adaptada da referência [33]).

As metodologias de síntese *bottom-up* já estabelecidas na literatura envolvem o método por decomposição térmica, a síntese por microemulsões, a sol-gel, a solvotérmica e o método por coprecipitação. A primeira é uma das metodologias que utiliza um meio orgânico com alta temperatura de ebulição, como éter fenílico ou éter difenílico, para formação de nanopartículas, enquanto as demais podem empregar meios aquosos ou orgânicos, dependendo das condições da síntese. [47]

Foi demonstrado que MNPs com tamanho aproximado de 20 nm podem ser sintetizadas por decomposição térmica a temperaturas em torno de 265 °C. [48] A síntese foi realizada em meio de éter fenílico, com adição do precursor de ferro, o acetilacetato de ferro (III), juntamente de álcool, de oleilamina e de ácido oleico, gerando nanopartículas monodispersas e de tamanho controlado. Outro estudo, que usou do mesmo precursor metálico e uma temperatura aproximada de 280 °C, relatou a formação de MNPs monodispersas estabilizadas por trietilenoglicol com aplicação em hipertermia magnética devido ao aumento de temperatura das nanopartículas quando expostas a radiofrequência de 20 MHz. [49]

Outra metodologia responsável por formar MNPs é a coprecipitação, que geralmente envolve dois sais de ferro, um com o ferro no estado de oxidação +2 e outro no estado +3. Em um estudo, foi aplicada uma estequiometria 1:2 de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ com a formação das

MNPs ocorrendo quando a solução aquosa desses dois íons entrou em contato com uma base NaOH. [50] O PEG foi o polímero utilizado para estabilizar as MNPs, que em sequência foram sonificadas em um banho de ultrassom. Além do mais, as nanopartículas sintetizadas demonstraram baixa citotoxicidade nos testes de viabilidade celular e citotoxicidade realizadas em células hepatoma G2.

A fim de avaliar novos parâmetros na síntese de MNPs, um trabalho desenvolveu uma metodologia de síntese por coprecipitação dos íons de ferro assistida por ultrassom e por uma bobina magnética. [51] Em uma estequiometria de 3:2, o $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados, juntamente da base KOH, em um balão de reação em atmosfera de argônio para a formação das nanopartículas. Após o tempo de reação, as MNPs foram expostas ao banho ultrassônico e ao campo magnético alternado gerado pela bobina. Foi observado que há uma diminuição no tamanho da nanopartícula quando sonificadas e quando há presença de um campo magnético externo, sendo capaz de gerar nanopartículas com tamanho de 6 nm.

2.5 Agentes Estabilizantes

Como na nanoescala existe uma grande razão área-volume, entende-se que os coloides podem interagir com uma diversidade de compostos químicos dependendo da composição de sua superfície. Devido a sua elevada área superficial, um sistema coloidal tende a formar aglomerados de nanopartículas para diminuir a energia superficial do sistema. A aglomeração ocorre por meio das colisões entre os coloides, seguida de uma adesão superficial, causada por interações como as forças de van der Waals e interações eletrostáticas. Esse processo pode ser ainda mais significativo na ausência de uma estabilização adequada (Figura 4a). [52]

Na síntese de MNPs, a aglomeração de nanopartículas se torna ainda mais evidente devido às interações magnéticas que podem ocorrer dentro do próprio sistema coloidal. Por isso, o uso de agentes estabilizantes faz-se necessário para impedir que ocorra a formação de aglomerados coloidais (Figura 4b). Estudos vêm utilizando diferentes agentes estabilizantes como forma de entender o comportamento e a estabilidade das nanopartículas frente a diferentes parâmetros, como pH e temperatura por exemplo. [53]

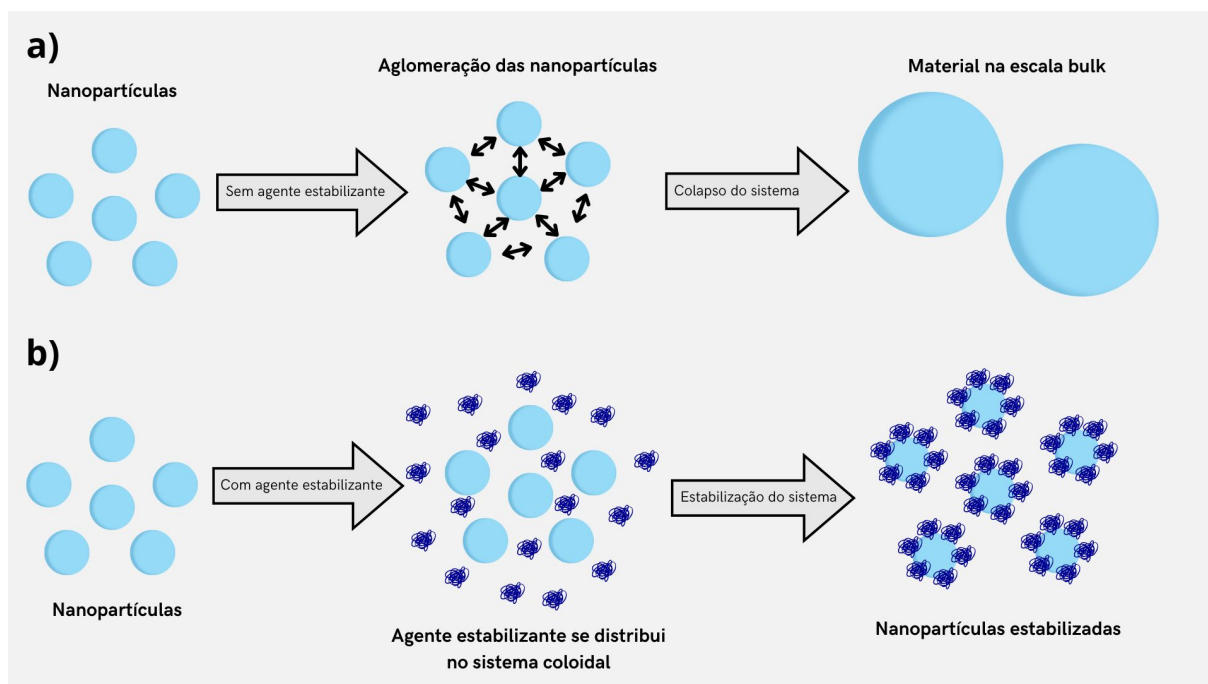


Figura 4 – Estabilidade do sistema coloidal. 3a) Representação da aglomeração de nanopartículas na ausência de agente estabilizante, levando ao colapso do sistema coloidal e formação de material na escala bulk; 3b) Representação da ação de um agente estabilizante, que se distribui no sistema coloidal e promove a estabilização das nanopartículas, impedindo sua aglomeração.

2.5.1 Polietilenoglicol (PEG)

A estrutura do polímero PEG consiste em unidades repetidas de etileno glicol, com massa molecular variável, geralmente inferior a 20.000 g/mol (Figura 5). Devido à sua estrutura com caráter parcialmente apolar, o PEG é frequentemente utilizado em formulações que requerem a passagem por membranas lipídicas. [54] Além disso, é amplamente empregado como tensoativo, especialmente nas áreas da cosmetologia e na síntese de nanopartículas.

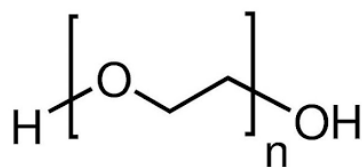


Figura 5 – Estrutura molecular do PEG.

Na síntese de nanopartículas o PEG tem como papel fundamental a estabilização coloidal. Por isso, trabalhos envolvendo diferentes tipos de nanopartículas já propuseram diferentes rotas de síntese com a presença desse agente estabilizante. Em um trabalho, com objetivo de desenvolver nanopartículas capazes de encapsular metotrexato e direcioná-lo a células tumorais, foram desenvolvidas nanopartículas de prata estabilizadas com PEG. [55] Nesse caso, resultou-se em

nanopartículas estáveis, com formato esférico e com tamanho de 12 nm capazes de aumentar a citotoxicidade frente às células tumorais testadas em comparação àquelas sem a presença do estabilizante.

Além disso, o PEG possui relevância significativa como um agente estabilizante na síntese de MNPs. Foi reportado que as MNPs estabilizadas por PEG monodispersas foram sintetizadas e que permaneceram estáveis por mais de 30 dias em temperatura ambiente, sem nenhum aparecimento de precipitado. [56] Além do mais, essas mesmas nanopartículas tiveram suas propriedades magnéticas levemente reduzidas devido a funcionalização, tendo relação direta com a diminuição do tamanho promovida pelo polímero. [57]

2.5.2 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

O SDS é um tensoativo muito comumente utilizado para formação de micelas em ambientes aquosos devido a sua estrutura anfifílica (Figura 6). Além disso, quando associado a fármacos ou macromoléculas ele é capaz de promover um aumento na lipofilicidade dos compostos, que consequentemente permitirá a passagem por barreiras lipídicas presente em diversas regiões dos organismos com maior facilidade. [58]

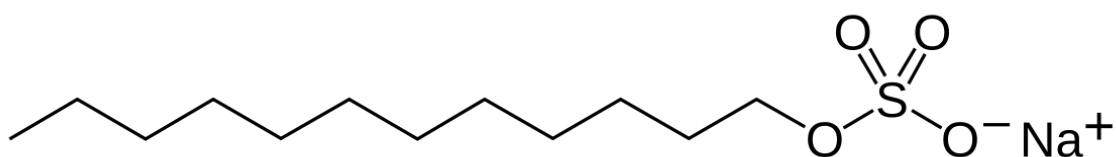


Figura 6 – Estrutura molecular do SDS.

Na síntese de MNPs, foi constatado que o uso de diferentes concentrações de SDS influenciam na morfologia das nanopartículas, sendo capaz de gerar coloides nanoesféricos, nanocúbic e nanoagulhas. [14] Além do mais, o SDS possibilitou a formação de uma monodispersão com uma boa distribuição de tamanho, confirmadas pela microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Em outra pesquisa realizada para a formação de nanopartículas de prata também estabilizadas com SDS, observou-se a formação de nanopartículas estáveis de formato esférico com aproximadamente 50 nm, após revestir com PEG as nanopartículas já estabilizadas por SDS. [59] Foram feitos também testes de toxicidade com essas nanopartículas e os resultados indicaram baixa citotoxicidade em queratinócitos, células da camada mais externa da pele.

2.5.3 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES)

O APTES é um organosilano (Figura 7) muito utilizado para funcionalizar superfícies contendo hidroxilas, grupos que conseguem interagir com facilidade com o silano e formar uma ligação covalente. Por conta disso, o APTES é muito utilizado na área dos biossensores criando uma camada de comunicação entre o sensor e a biomolécula, uma vez que muitas das biomoléculas não conseguem se ligar diretamente ao biossensor. [60]

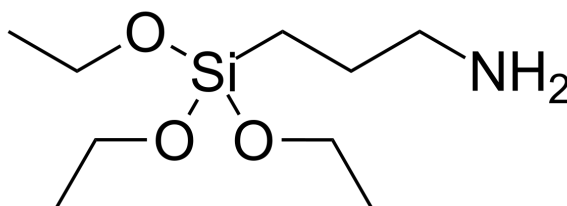


Figura 7 – Estrutura molecular do APTES.

Em relação às nanopartículas, existe a possibilidade de formação de MNPs estabilizadas por APTES, com funcionalização decorrente do enxerto de grupos amino na superfície da nanopartícula, o que amplia significativamente as possibilidades de interações com diferentes substâncias. [61] Nesse sentido, uma pesquisa observou que a síntese com esse agente estabilizante promoveu a formação de MNPs esféricas com diâmetro de 15 nm, com alta magnetização e com o aparecimento de uma camada muito fina de APTES em sua superfície, verificada pelo tamanho similar entre a MNPs e o cristalito. [62]

2.6 Caracterização das Nanopartículas

Após a obtenção das nanopartículas, torna-se essencial realizar sua caracterização para que seja possível compreender suas propriedades físico-químicas, estruturais e morfológicas. Por isso, as técnicas de TEM, microscopia eletrônica de varredura (SEM), difração de raios X (XRD), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e análise termogravimétrica (TGA) são empregadas para identificar características como morfologia, estrutura cristalina e determinação de grupos funcionais presentes na superfície. [63]

A técnica TEM se baseia na aplicação de um feixe de elétrons sobre uma fina camada de nanopartículas. Parte desses elétrons emitidos conseguem atravessar a amostra com pouca ou nenhuma dispersão, sendo assim chamados de elétrons de transmissão. Após atravessarem a amostra, os elétrons alcançam uma lente eletromagnética que é capaz de ampliar a informação obtida, gerando uma imagem com padrões claros e escuros, que revelam uma visão detalhada da estrutura interna das nanopartículas estudadas. [64] Outra técnica de microscopia que auxilia na caracterização é a SEM. A técnica se baseia na varredura da amostra por um feixe de elétrons, gerando sinais como elétrons secundários, retroespalhados e raios X, que trazem informações sobre topografia, composição e estrutura cristalina. [63]

A técnica XRD permite a obtenção de informações referentes à estrutura atômica disposta na amostra, uma vez que o comprimento de onda do raio X é comparável às distâncias interatômicas. Através da XRD é possível identificar a posição dos átomos, seu arranjo espacial na célula unitária e o espaçamento entre os planos atômicos. Em um difratograma, a intensidade dos picos está relacionada ao número atômico e à posição dos átomos na célula unitária, enquanto posicionamento do pico tem relação com o tamanho e a forma da célula unitária. [65]

A aplicação da FT-IR permite identificar os grupos funcionais presentes na estrutura da amostra. Essa análise baseia-se na excitação das moléculas por meio da exposição a radiação no comprimento de onda do infravermelho. Cada ligação química dos grupos funcionais absorve energia em quantidade específica e vibra de diferentes maneiras. Por isso, cada grupo funcional possui um padrão vibracional próprio, o que permite a caracterização do composto com base no posicionamento característico de suas bandas no espectro de absorção. [66]

Outra técnica capaz de avaliar a funcionalização das nanopartículas é a TGA. De acordo com a perda de massa após o aquecimento da amostra até altas temperaturas, a termogravimetria permite visualizar a presença de compostos voláteis, orgânicos e inorgânicos na amostra, tendo em vista que cada espécie apresenta uma faixa característica de decomposição térmica. [67] O emprego da análise é bastante recorrente principalmente em estudos que buscam verificar a adsorção de compostos na superfície das nanopartículas. [68,69]

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar nanopartículas de magnetita com diferentes agentes estabilizantes, como PEG, SDS e APTES, e avaliar a sua influência na extração de DNA.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho envolvem:

- Sintetizar nanopartículas de magnetita pelo método de coprecipitação, utilizando diferentes agentes estabilizantes (PEG, SDS e APTES);
- Caracterizar os sistemas de nanopartículas por meio das técnicas de SEM, TEM, XRD, TGA e FT-IR;
- Aplicar as nanopartículas de magnetita na extração de DNA de amostras aquosas; e
- Verificar o impacto dos agentes estabilizantes na eficiência de extração do DNA.

4 Metodologia

4.1 Síntese das Nanopartículas de Magnetita

A síntese por coprecipitação das nanopartículas de óxido de ferro foi adaptada de uma metodologia previamente reportada na literatura. [68] Inicialmente, uma solução estoque de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mol L^{-1} foi preparada em um béquer contendo 10 mL de uma solução de HCl $5,45 \text{ mol L}^{-1}$, enquanto a solução estoque de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L^{-1} foi preparada em 25 mL de água purificada em um sistema Milli-Q. Em sequência, realizou-se o preparo de 50 mL da solução básica de NH_4OH $1,28 \text{ mol L}^{-1}$, a qual foi aquecida até uma temperatura de 80°C . O pH da solução básica foi sempre medido ao fim dessa etapa. Em concomitância, em um balão de fundo redondo foram adicionados 1 mL da solução de Fe^{2+} e 4 mL da solução de Fe^{3+} , que também foram aquecidas até 80°C . Assim que as soluções atingiram a temperatura desejada, o aquecimento foi desligado e a solução básica foi imediatamente adicionada dentro do balão de fundo redondo em um fluxo de aproximadamente 6 mL min^{-1} sob constante agitação. Para controlar o fluxo de adição do NH_4OH foi utilizada uma bureta de 50 mL e um cronômetro. Após o término dessa etapa, a solução foi deixada em agitação constante por 5 min. Em seguida, a dispersão com as nanopartículas foi exposta a um banho de ultrassom por mais 30 min. As nanopartículas, então, foram precipitadas com o auxílio de um ímã para que a lavagem das mesmas pudesse ocorrer. Realizaram-se as lavagens com água ultrapurificada em um sistema Milli-Q (água Milli-Q), que foram finalizadas no momento em que o pH das nanopartículas estivesse próximo de 7. Ao final, as nanopartículas foram dispersas em 40 mL de água e distribuídas em porções iguais de 10 mL dentro de quatro tubos. Essas dispersões foram distribuídas dessa forma para posteriores caracterizações e funcionalizações.

4.2 Funcionalização das Nanopartículas

Para a funcionalização das nanopartículas foram utilizados o PEG, o SDS e o APTES como os agentes estabilizantes/funcionalizantes. O método foi adaptado da mesma referência utilizada para sintetizar as MNPs (Seção 4.1). [68] Primeiramente, com o auxílio de um ímã, as MNPs foram separadas do restante da dispersão e o sobrenadante removido. Foram preparadas soluções de 6% (m/m) dos agentes estabilizantes em 10 mL de água, que logo foram adicionadas sobre as nanopartículas para a modificação superficial das mesmas. Além disso, para melhorar a funcionalização, a dispersão foi sonicada por 8 min. Por fim, com o intuito de remover o excesso de agente estabilizante, foram realizadas lavagens até o pH neutro. As amostras obtidas após o processo de funcionalização foram denominadas MNPs-PEG, MNPs-APTES e MNPs-SDS para as MNPs funcionalizadas por PEG, APTES e SDS, respectivamente.

4.3 Caracterização das Nanopartículas

Após a síntese, tornou-se necessária a caracterização das nanopartículas para que seja possível compreender suas propriedades físico-químicas, estruturais e morfológicas. Inicialmente, foram utilizadas alíquotas da dispersão coloidal ainda não funcionalizada para realizar as análises de microscopia eletrônica. Um microscópio Zeiss EVO 10, operando na tensão de 15 kV, foi utilizado para fazer a caracterização por SEM. O preparo da amostra consistiu na dispersão das MNPs em 1 mL de isopropanol, com seguida adição de 1 ou 2 gotas dessa dispersão em uma lâmina de silício. A lâmina foi fixada com uma fita dupla face condutora de carbono.

Em sequência, também foram realizados testes de TEM utilizando o microscópio JEM 1400 Flash, com capacidade máxima de tensão igual a 120 kV. Nesse caso, as MNPs foram também dispersas em 1 mL de isopropanol e adicionadas 1 ou 2 gotas dessa dispersão sobre uma grade de cobre recoberta com carbono. Ambos equipamentos de microscopia estavam disponíveis para uso no Centro de Microscopia e Microanálises BR-Sul, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Após essas caracterizações, fez-se necessária a secagem das nanopartículas em uma estufa a 70 °C para as caracterizações subsequentes que exigem amostras na forma de pó. A análise por XRD foi realizada com as MNPs no difratômetro Rigaku Ultima IV, no Centro de Nanociência e Nanotecnologia (CNANO) da UFRGS, utilizando como fonte $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154056$ nm) a uma voltagem de 40 kV com uma corrente de 20 mA.

Foram feitas também análises com as MNPs, MNPs-PEG, MNPs-SDS e MNPs-APTES para caracterizá-las quanto a sua superfície. A avaliação por TGA foi realizada utilizando o equipamento TGA-50, marca SHIMADZU disponível no Laboratório de Altas Pressões e Materiais Avançados da UFRGS. As análises foram feitas em uma célula de platina, sob atmosfera de argônio, com um fluxo de argônio de 50 mL min⁻¹. A taxa de aumento da temperatura foi de 20 °C min⁻¹, com início a temperatura ambiente e fim aos 900 °C. A massa inicial das amostras variou de 3 a 8 mg.

O preparo para as análises por FT-IR iniciou com a secagem das MNPs em uma estufa a 70 °C e do KBr a 100 °C. Após isso, 1 mg das MNPs foi triturado em conjunto com 150 mg de KBr para, em seguida, formar a pastilha com auxílio de uma prensa. A amostra foi analisada no espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier, marca SHIMADZU, modelo IR PRESTIGE21, disponível na Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

4.4 Preparo das Amostras para Extração de DNA

4.4.1 Obtenção do DNA a partir do sangue total

O material biológico foi coletado no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, com extração do DNA do sangue total de voluntários efetivamente participantes como autores deste es-

tudo de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA (5.235.870). A extração de DNA do sangue total foi realizada através do *Salting-out*, um método convencional, [70] com algumas pequenas adaptações.

Inicialmente, foi feita a coleta de sangue em um tubo *vacutainer* que continha EDTA 15% para garantir a conservação do material biológico. Em sequência, 4 mL de sangue foram transferidos para um tubo Falcon, em que foram adicionados 5 mL do reagente TKM1 (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,6; KCl 10 mmol L⁻¹; MgCl₂ 10 mmol L⁻¹; EDTA 2 mmol L⁻¹) e 200 µL de Nonidet P-40. A solução foi agitada por inversão e centrifugada a 3000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante pôde ser descartado, o *pellet* contendo o DNA passou por lavagens com 5 mL de TKM1 e foi novamente centrifugado (foram realizadas 3 a 4 repetições desse processo). Com o *pellet* já limpo, para ressuspendê-lo utilizou-se 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,6; KCl 10 mmol L⁻¹; MgCl₂ 10 mmol L⁻¹; EDTA 2 mmol L⁻¹; NaCl 0,4 mmol L⁻¹) e em seguida a solução foi transferida para um *eppendorf* de 1,5 mL. Foram adicionados também ao *eppendorf* 50 µL de SDS 10%, no qual foi incubado a 55 °C por 10 a 20 min. Após o período de incubação, foram adicionados 300 µL de NaCl 6 mol L⁻¹ com posterior agitação e centrifugação a 12.000 rpm durante 15 min em uma microcentrífuga. Logo após essa etapa, o sobrenadante contendo DNA foi resgatado e o *pellet* de proteínas descartado. Em seguida, foram adicionados dois volumes de etanol 100% à temperatura ambiente ao *eppendorf* e o tubo foi invertido várias vezes para promover a precipitação do DNA. Com isso, foi possível remover o DNA da solução utilizando uma pipeta de Pasteur e também realizar lavagens com gotas de etanol 70% gelado. Ao final, o DNA foi ressuspendido em 500 µL de TE (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹; EDTA 1 mmol L⁻¹; pH 8,0).

4.4.2 Amostras para Extração

O DNA utilizado para a fortificação foi obtido a partir da metodologia adaptada da extração convencional proposta na literatura [70] (Seção 4.4.1). A amostra foi preparada a partir da fortificação de água mili-Q com o DNA extraído do sangue total. O método de extração convencional possibilitou a obtenção de uma amostra fortificada com DNA com uma concentração de 188,95 ng µL⁻¹. Essa amostra foi utilizada como fonte de DNA para realizar a SPE baseada nas MNPs (Seção 4.5).

4.5 Extração em Fase Sólida com Emprego de Nanopartículas Magnéticas

Com as nanopartículas já dispersas, foi retirada uma alíquota de 10 µL da dispersão, cuja concentração era de 27 mg mL⁻¹ (correspondendo a 0,27 mg de MNPs) e transferida para um *eppendorf*. Nesse mesmo recipiente, também foram adicionados 75 µL de água mili-Q e 15 µL da amostra de DNA (188 ng µL⁻¹), como observado na Figura 8. Em seguida, com auxílio do vortex, a solução foi agitada por 30 s e em sequência deixada em repouso a temperatura ambiente por 3 min. Ao final da etapa de extração, as MNPs foram precipitadas com um ímã

e o sobrenadante descartado. Subsequentemente, as MNPs foram lavadas com etanol 70% a temperatura ambiente para eliminar qualquer tipo de DNA que não esteja adsorvido a superfície das MNPs. Para remover o excesso de etanol advindo das lavagens, as amostras foram expostas a um banho seco a 55 °C até evaporação total do álcool.

Após isso, ao *epENDORF*, adicionou-se 50 μL de TE para promover a dessorção do DNA da superfície das MNPs. Para essa etapa de dessorção foram selecionados dois tempos, um de 3 min (Amostra 1 e 3) e outro de 10 min (Amostra 2). A etapa completa foi feita sob agitação constante à temperatura ambiente. A Amostra 3 foi submetida a todas as mesmas etapas da Amostra 1, entretanto os volumes de MNPs, DNA e de água utilizados foram cinco vezes maior (50 μL , 75 μL e 325 μL , respectivamente). Além disso, a fim de garantir a não contaminação das MNPs com material biológico durante a sua síntese, foi incluído um controle negativo da extração (CN_{Nano}), onde foram adicionados 10 μL de MNPs e 75 μL de água mili-Q, sem adição da amostra de DNA. O CN_{Nano} passou pelas mesmas etapas de extração e dessorção das demais amostras. Por fim, as MNPs novamente foram precipitadas e o sobrenadante foi transferido para outro *epENDORF* para ser analisado posteriormente na PCR em tempo real.

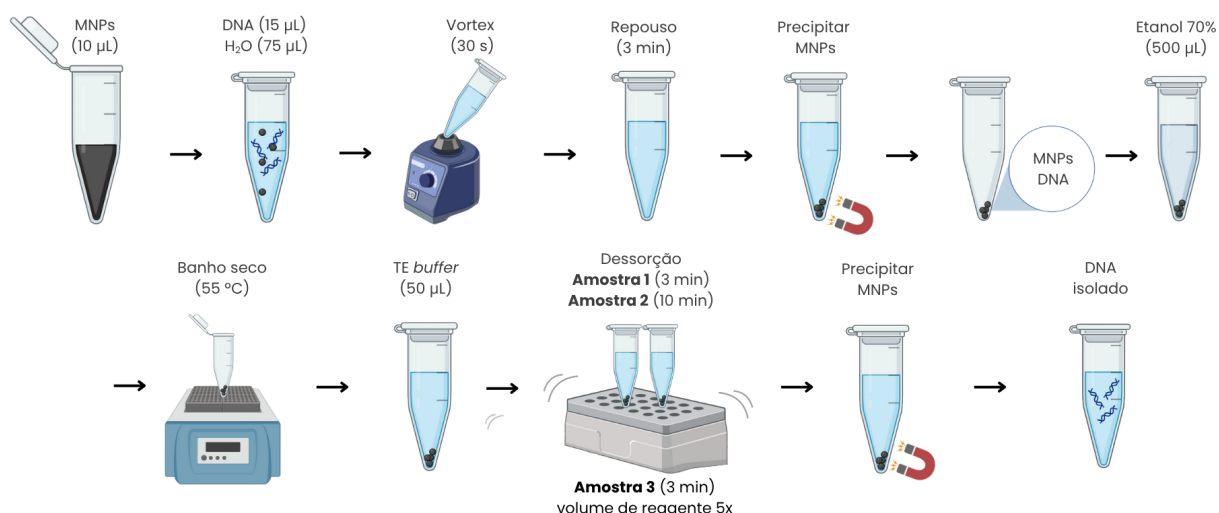


Figura 8 – Metodologia de extração.

O mesmo processo de extração mostrado na Figura 8 foi utilizado para extração com as MNPs funcionalizadas, com o tempo de dessorção de 10 min definido para todas as amostras. Foram adicionados 0,3 mg de MNPs em cada extração, correspondendo a uma concentração final de 3 mg mL^{-1} na mistura reacional (volume total de 100 μL). Os testes foram realizados todos em duplicata, tendo também um controle negativo para cada uma das amostras de MNPs.

4.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A fim de avaliar a presença de DNA nas amostras após a etapa de extração, foi escolhido o gene *BRAF* como sendo o gene alvo para promover a amplificação do DNA extraído. O preparo

das amostras foi realizado utilizando como reagentes um *primer* direto e um *primer* reverso do gene *BRAF*, além do PowerUpTM SYBRTM Green (Applied Biosystems). Em cada um dos poços de amplificação, foram adicionados 0,5 μL de cada um dos primers e também 7,5 μL de SYBRTM. Foram realizados testes em triplicata para a Amostra 1, Amostra 2, Amostra 3, CN_{Nano}, controle negativo da PCR (CN_{PCR}) e controle positivo da PCR (CP_{PCR}). Em seguida, foram adicionados 6,5 μL de cada uma das amostras em seus respectivos poços de amplificação. Para o controle positivo, foi adicionado 1 μL de uma amostra contendo 10 ng μL^{-1} de DNA e 5,5 μL de água mili-Q. Por fim as amostras foram amplificadas e analisadas em um Step One Plus, marca Thermo Fischer.

5 Resultados e Discussão

5.1 Síntese e Caracterização das MNPs

Por meio do método de coprecipitação, foi possível sintetizar MNPs, que apresentam coloração preta e resposta ao campo magnético. Durante a síntese, a coloração da solução contendo os precursores de ferro passou da coloração marrom claro para o preto característico das dispersões de MNPs. Através da Figura 9, observa-se que após a aproximação de um ímã, as MNPs precipitam em resposta ao campo magnético aplicado, o que indica a presença de características magnéticas nesses coloides.

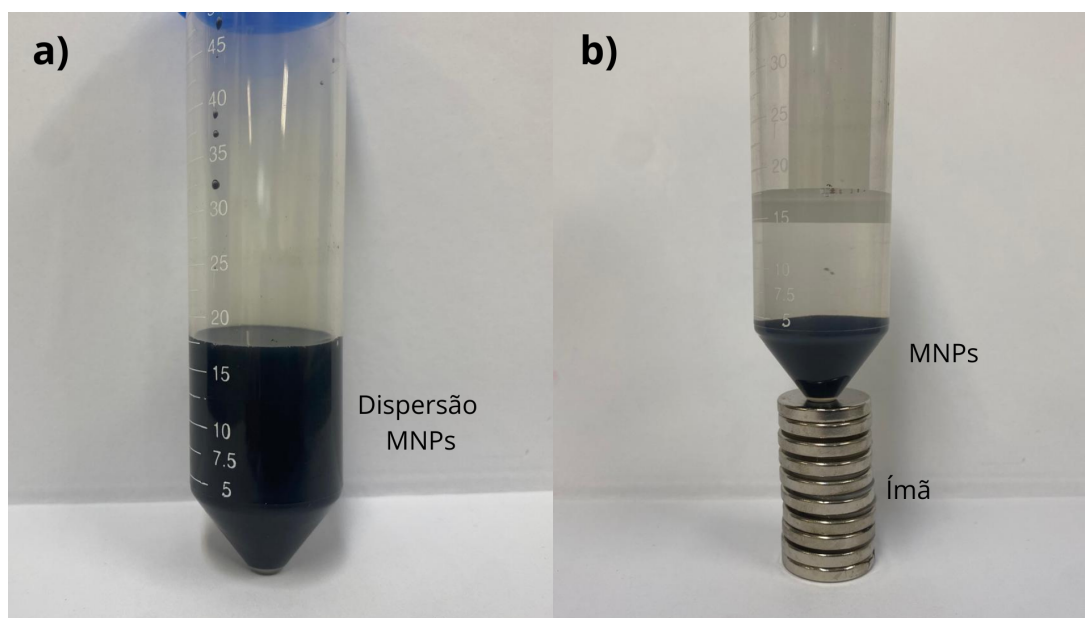


Figura 9 – Exposição das MNPs ao campo magnético. a) MNPs em dispersão, antes de serem expostas ao campo magnético do ímã. b) MNPs precipitadas após a exposição ao campo magnético do ímã.

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Com o intuito de avaliar a morfologia das nanopartículas foram realizadas análises por SEM e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 10. Foram analisadas três amostras de MNPs sintetizadas em dias distintos, correspondendo às Figuras 10a, 10b e 10c.

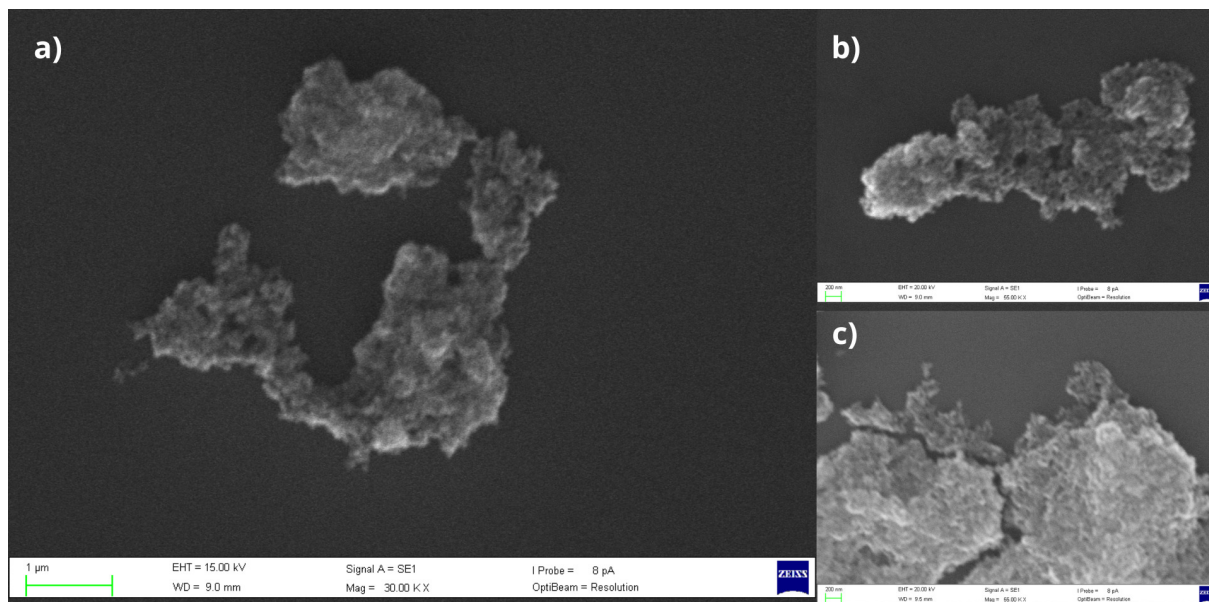


Figura 10 – SEM das MNPs sintetizadas em dias diferentes.

Através das imagens de microscopia, observa-se a presença de MNPs na forma de aglomerados de coloides, característica recorrente das nanopartículas magnéticas. A observação de agregados em análises microscópicas é atribuída à existência de interações magnéticas entre as partículas, que, após a secagem da amostra, tendem a se agregar a fim de diminuir sua energia superficial. [71]

Por outro lado, a técnica SEM não permitiu caracterizar as nanopartículas quanto à sua morfologia e tamanho, uma vez que o microscópio eletrônico de varredura não possui resolução compatível com o tamanho das MNPs obtidas neste trabalho, o que impossibilita a visualização detalhada. Para contornar essa limitação, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A fim de caracterizar a morfologia das MNPs foram realizadas análises de TEM. Através das microscopias (Figura 11) é possível verificar a sobreposição e a formação de aglomerados de MNPs, que possivelmente tem relação com o preparo de amostra para a análise. [68] Durante o preparo, uma gota de MNPs foi adicionada sobre a grade, permitindo que, após a secagem das MNPs, devido às suas propriedades magnéticas, houvesse a formação de aglomerados. Tam-

bém há indicativos na literatura que a utilização de agentes funcionalizantes pode diminuir a aglomeração observada nas microscopias. [71]

Além disso, por meio da TEM foi observado um sistema polidisperso com o diâmetro dos coloides variando de 10 a 30 nm, resultado que está de acordo com o que já foi reportado na literatura para esse método de síntese. [68] Tendo em vista essa característica, o tamanho reduzido das MNPs implica em um aumento significativo da sua razão área-volume, o que garante uma maior área superficial e, por consequência, favorece a adsorção de biomoléculas como o DNA a sua superfície. [72]

Ademais, quanto à morfologia, percebe-se que a maioria das MNPs possuem um formato assimétrico, o que pode estar relacionado às características do próprio método de coprecipitação, no qual pequenas variações nos parâmetros reacionais influenciam no modo de crescimento cristalino e podem induzir a formação de estruturas anisotrópicas. Estudos apontam que variações no tipo de precursor de ferro, nas proporções estequiométricas entre os reagentes, no pH, na temperatura ou no uso de determinados agentes estabilizantes afetam diretamente o processo de nucleação e, por consequência, a morfologia das MNPs. [73, 74]

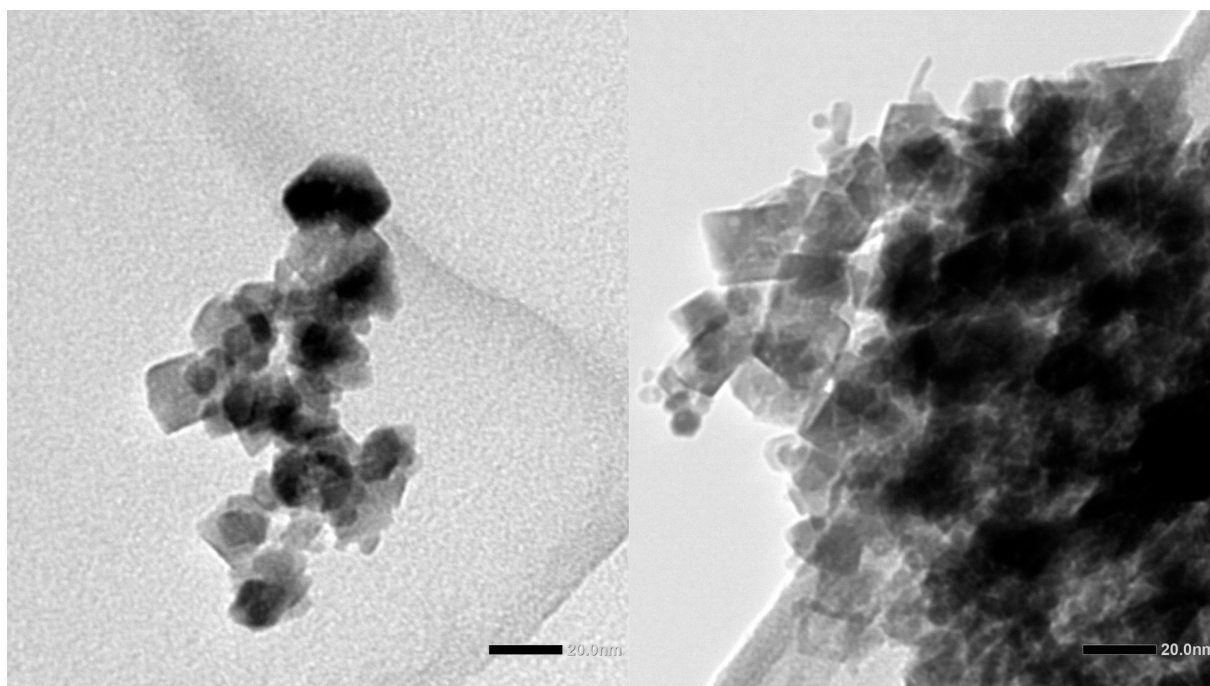


Figura 11 – TEM das MNPs não funcionalizadas.

5.1.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de FT-IR foi utilizada para caracterizar o óxido de ferro e avaliar se houve a funcionalização das nanopartículas com os agentes estabilizantes PEG, SDS e APTES. A Figura 12 contém o espectro de infravermelho dos materiais MNPs, MNPs-PEG, MNPs-SDS e MNPs-APTES.

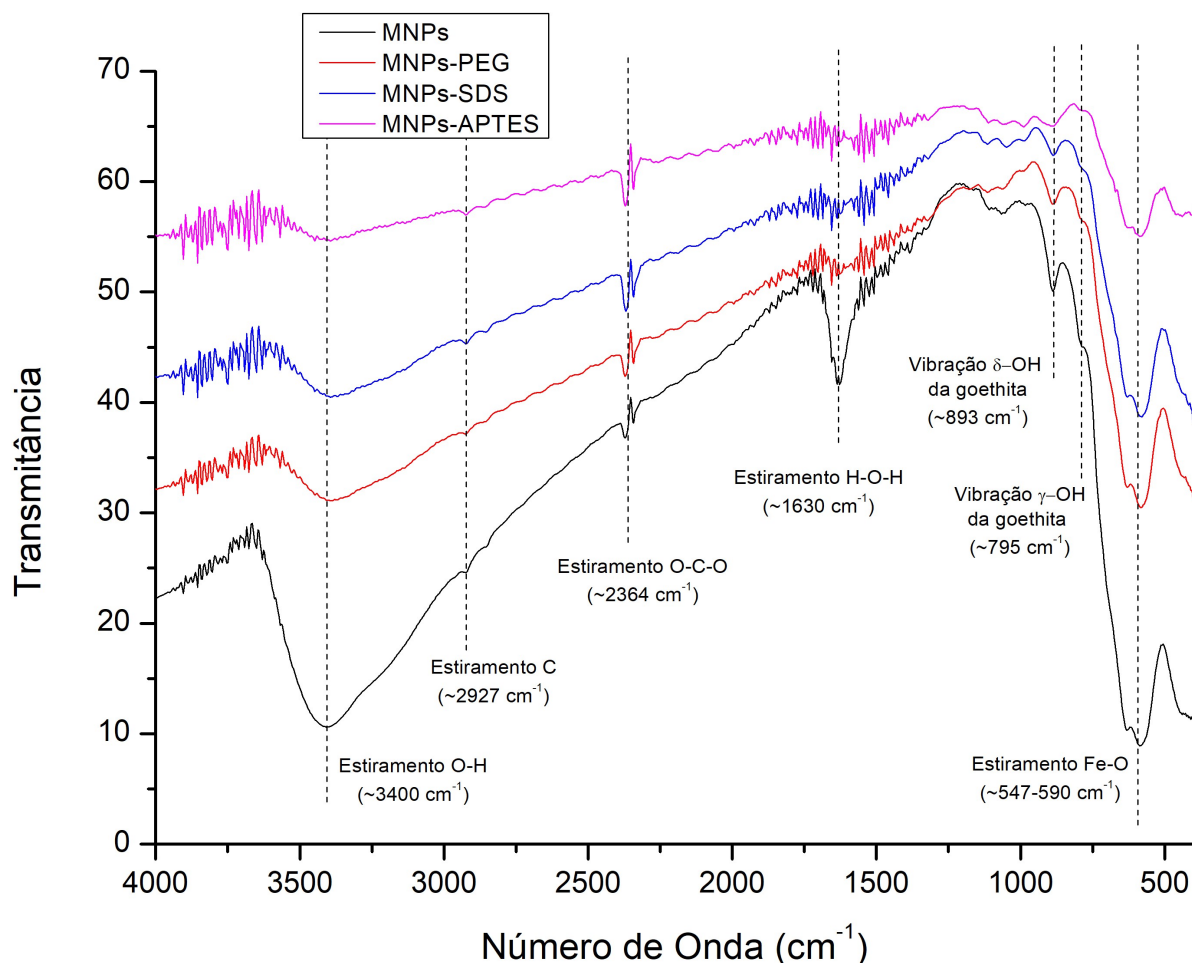


Figura 12 – Espectro de infravermelho das dispersões de nanopartículas.

Através dos espectros de infravermelho obtidos, percebe-se que em todos os materiais há uma banda em aproximadamente 3400 cm^{-1} que pode estar relacionada aos estiramentos O-H tanto da água quanto da superfície da magnetita. Percebe-se também outra banda em 1630 cm^{-1} que representa o estiramento H-O-H também referente a presença de água na amostra. Outro estiramento comum entre todos os materiais é o estiramento em 2364 cm^{-1} relacionado às vibrações O-C-O do CO_2 do ar no ambiente, não relacionado à síntese das MNPs.

As bandas entre $547\text{--}590\text{ cm}^{-1}$ presentes em todos os espectros das nanopartículas correspondem às vibrações Fe-O características dos compostos de magnetita. [75] Essa banda também foi fundamental para confirmar a formação das MNPs. Além disso, estudos presentes na literatura apontam também que as bandas que aparecem em 893 cm^{-1} e 795 cm^{-1} estão relacionadas com os grupamentos hidroxila ($\delta\text{-OH}$ e $\gamma\text{-OH}$, respectivamente) da goethita, outra forma de cristalização do óxido de ferro, o que sugere a obtenção de uma mistura de óxidos. [76, 77]

Em relação a funcionalização das MNPs, tanto para o PEG quanto para o SDS e o APTES, os espectros da Figura 12 não apresentam informações significativas que confirmem a presença dos estabilizantes na superfície da nanopartícula. Entretanto, observa-se um sinal fraco em

2927 cm^{-1} que pode representar os estiramentos assimétricos C-H dos agentes estabilizantes. Contudo, essa banda é fraca e poderia ser resultado de uma contaminação dos reagentes de síntese ou até mesmo de uma interferência na aquisição dos espectros, possivelmente associada a efeitos de linha de base não compensados, observados na forma de ruído. Além do mais, a banda também está presente no espectro relacionado as MNPs não funcionalizadas, as quais não possuem em sua estrutura química grupos C-H. Isso contribui para a hipótese de que os dados devem ser interpretados com cautela, pois podem não refletir adequadamente o resultado do processo de funcionalização.

5.1.4 Difração de Raios X (XRD)

A fim de determinar a estrutura cristalina das nanopartículas, foi empregada a técnica de XRD, que permitiu a obtenção do difratograma apresentado na Figura 13. O perfil de difração correspondente à amostra foi comparado com o padrão cristalográfico da magnetita, tendo como referência o arquivo do *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS), ficha nº 19.0629. [78]

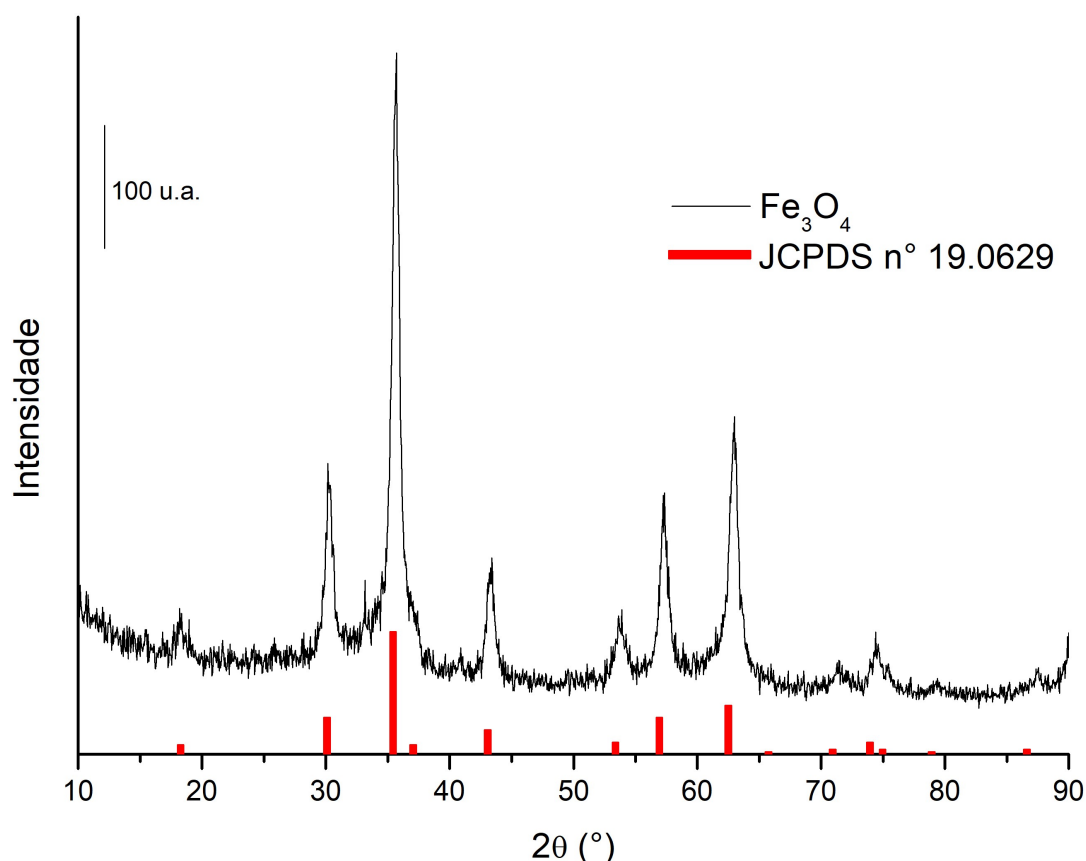


Figura 13 – Perfil de difração da amostra de MNPs comparado ao padrão cristalográfico do JCPDS da magnetita.

Ao analisar o difratograma, observa-se que as nanopartículas da amostra correspondem à fase magnetita, uma vez que as posições angulares (2θ) dos picos de difração apresentam con-

cordância com aquelas do padrão de referência (JCPDS, ficha n° 19-0629). [78] Além disso, verifica-se que as intensidades relativas dos picos seguem a mesma proporção observada no padrão cristalográfico, com a presença de um pico de maior intensidade em aproximadamente 35,5° (2 θ), característica importante do perfil de difração da magnetita. Esses resultados confirmam a identificação da fase cristalina como sendo a magnetita.

Além disso, o difratograma permite verificar a predominância da fase magnetita em relação à fase goethita, mencionada anteriormente na Seção 5.1.3, na qual foram observadas bandas características dessa fase no espectro de infravermelho (Figura 12). O perfil de difração da amostra não apresenta picos adicionais de intensidade significativa que indiquem a presença de goethita ou de outras fases cristalinas na amostra de MNPs. Assim, pode-se confirmar que a presença da fase goethita é residual em relação à fase magnetita, o que evidencia a eficiência da metodologia de síntese na formação majoritária de nanopartículas de magnetita, sendo essa forma de cristalização essencial para sua aplicação na extração de DNA.

5.1.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

Com o intuito de avaliar a ocorrência de funcionalização das MNPs, a TGA foi empregada, cujas curvas de perda de massa estão apresentadas na Figura 14. Através dos resultados, observa-se que as perdas de massa que ocorrem até aproximadamente 150 °C estão relacionadas à água adsorvida à superfície ou também a solventes voláteis residuais advindos da síntese. Para todas as amostras essa perda de massa correspondeu a menos do que 5,7% como observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Perda de massa das amostras em diferentes faixas de temperatura durante a TGA, bem como a perda de massa total e a porcentagem de massa referente aos componentes orgânicos presente em cada amostra.

Amostra	Perda de Massa (%)			Massa Total Perdida(%)	Conteúdo Orgânico (%)
	35-150 °C	150-600 °C	600-900 °C		
MNPs	2,81	3,70	0,57	7,08	0,00
MNPs-APTES	3,74	7,05	0,83	11,62	3,61
MNPs-PEG	4,86	4,09*	*	8,95*	**
MNPs-SDS	5,64	5,05	0,68	11,37	1,46

* A análise termogravimétrica referente às MNPs-PEG foi realizada somente até 342 °C devido a uma intercorrência instrumental.

** Não foi possível estimar a massa orgânica presente nas MNPs-PEG, uma vez que os dados de perda de massa não estão disponíveis para toda a faixa de temperatura analisada.

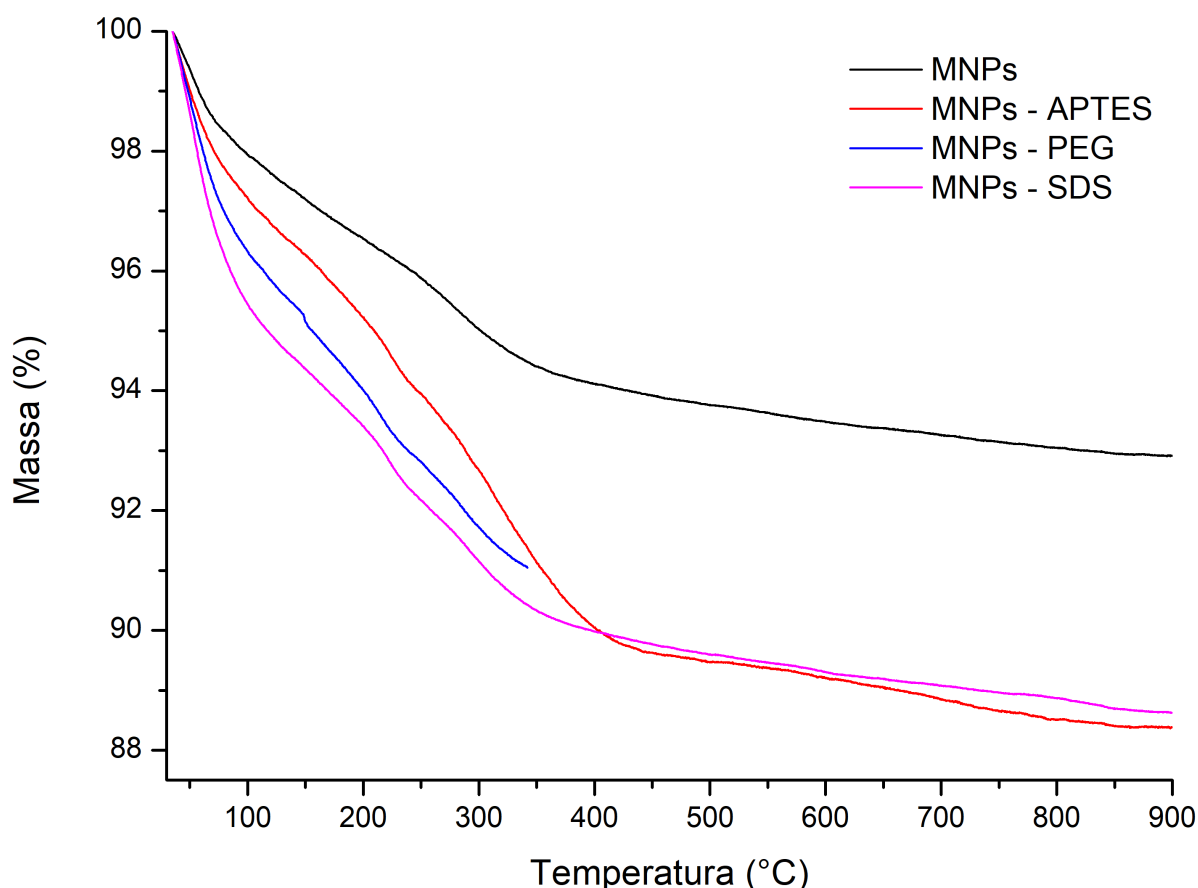


Figura 14 – Perda de massa observada através da TGA para cada uma das amostras de MNPs.

As perdas de massa totais foram comparadas com o objetivo de avaliar a funcionalização das amostras. Por meio da Tabela 1, é notável a diferença de massa total perdida entre as MNPs funcionalizadas e a amostra não funcionalizada, o que fortalece a hipótese de que a maior porcentagem de perda de massa nas amostras MNPs-SDS, MNPs-PEG e MNPs-APTES está relacionada a sua funcionalização. Da mesma forma, outros autores também apontam uma diminuição mais significativa da massa total em amostras funcionalizadas com compostos orgânicos do que em amostras de nanopartículas não funcionalizadas. [69, 79]

A respeito da funcionalização das MNPs, a porcentagem de componentes orgânicos foi estimada a partir da diferença de massa perdida acima de 150 °C entre as amostras funcionalizadas e não funcionalizadas (Tabela 1). Para as amostras de MNPs-APTES e MNPs-SDS foi verificada a presença de conteúdo orgânico, uma vez que, acima de 150 °C, ambas possuem uma maior queda de massa do que a amostra de MNPs não funcionalizada. Dessa forma, considerando que as MNPs não possuem grupos orgânicos em sua estrutura, a porcentagem de conteúdo orgânico estimada pode estar relacionada à funcionalização por APTES e SDS.

A fração orgânica correspondente às MNPs-PEG não pôde ser estimada com exatidão neste estudo devido a uma intercorrência instrumental que impediu a continuidade da análise de perda de massa para essa amostra acima de 342 °C. Contudo, mesmo sem a avaliação completa da

faixa de temperatura, verifica-se através da Figura 14 que a amostra de MNPs-PEG apresenta uma maior perda de massa do que as MNPs não funcionalizadas até aproximadamente 342 °C, o que sugere também a sua funcionalização.

5.2 Extração do DNA

As MNPs foram avaliadas quanto ao seu potencial de extração de DNA e os extratos obtidos após as etapas de extração foram amplificados e analisados pela PCR, no qual gerou as curvas de amplificação apresentadas na Figura 15. Além disso, foram avaliadas três diferentes condições de extração, que estão descritas na Tabela 2.

Vale ressaltar que a curva de amplificação é construída baseada nos valores do sinal de fluorescência (ΔRn) e do ciclo de amplificação da PCR. Entende-se que o limiar do ciclo, do inglês *Cycle Threshold* (Ct) está relacionado com a quantidade mínima de gene necessária para que seja detectada a fluorescência daquela amostra. Por isso, quanto menor for o Ct para determinada amostra, maior é a quantidade de gene alvo disponível para a amplificação. Além disso, diferenças nos valores de Ct entre amostras permitem comparar a quantidade de DNA presente, sendo possível identificar qual amostra possui maior ou menor quantidade do gene alvo. [80]

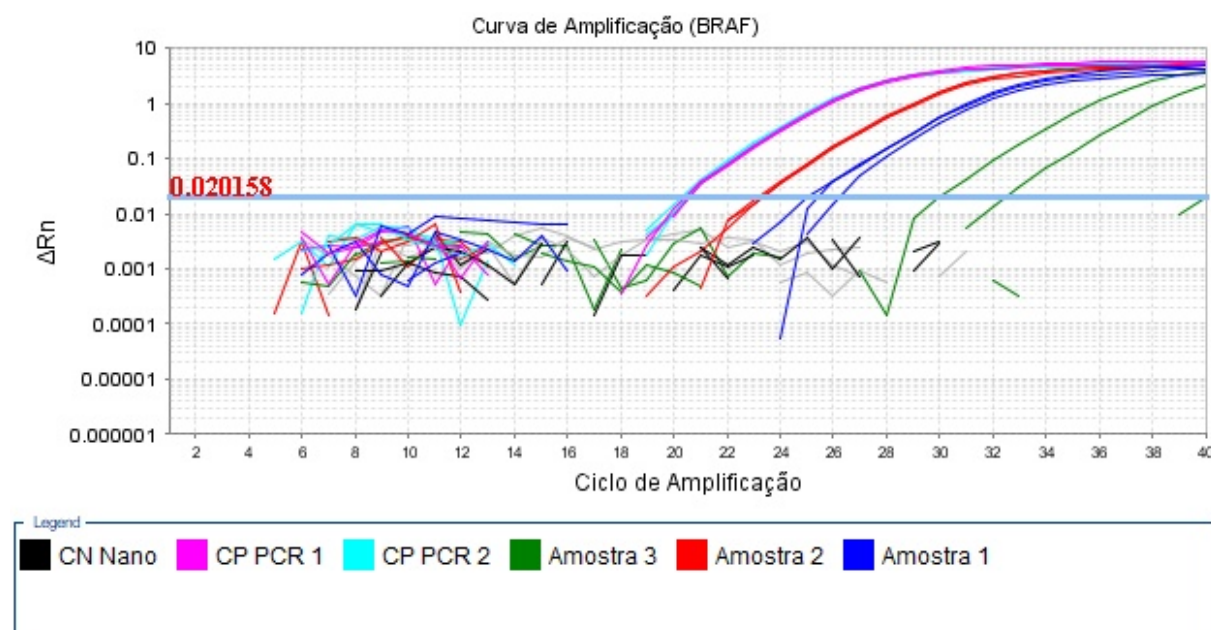


Figura 15 – Curva de amplificação para a Amostra 1, Amostra 2, Amostra 3 e controles.

Por meio da Figura 15 e também da Tabela 2 é possível confirmar a amplificação do gene *BRAF* em todas as amostras de extração. As replicatas de extração da Amostra 2 foram as primeiras a amplificar, com início da amplificação logo após o ciclo 23. As replicatas da Amostra 1 amplificaram em ciclos mais tardios, ocorrendo após o ciclo 25. Em relação à Amostra 3,

Tabela 2 – Condições de extração para cada amostra e os seus respectivos Ct

Amostra	Volume de Extração Final (μL)	Tempo de Dessorção (min)	Ct
1	100	3	25
2	100	10	23
3	500	3	30 e 32

apenas duas das três replicatas apresentaram amplificação, ambas iniciando o processo em ciclos ainda mais tardios, uma após o ciclo 30 e a outra após o ciclo 32.

A diferença entre os valores de Ct para a Amostra 1 e para a Amostra 2 pode ser atribuída aos diferentes tempos de dessorção empregados para cada uma das amostras. Como observado na Figura 15, o Ct da Amostra 2 é menor do que o Ct da Amostra 1, o que pode indicar uma maior quantidade de gene *BRAF* disponível e, consequentemente, uma maior concentração de DNA na Amostra 2. Estudos apontam que variações no tempo, no pH, na temperatura e na força iônica podem afetar diretamente a quantidade de DNA desorvido da superfície de nanopartículas, uma vez que essas são condições que permitem um enfraquecimento das interações entre o DNA e as nanopartículas, necessária para o processo de dessorção do DNA. [81, 82]

Além do mais, como foi observado na curva de amplificação, a Amostra 3, cujo volume de reagente foi aumentado cinco vezes, teve um Ct ainda menor do que as demais, com uma das replicatas não amplificando. O aumento do volume não proporcionou um aumento na concentração de DNA após a dessorção, mesmo que nesse caso, a quantidade inicial de MNPs e DNA era muito maior do que a usada para as amostras 1 e 2.

Por isso, da mesma forma que o tempo de dessorção foi determinante para observar uma diferença entre as amostras 1 e 2, o volume aumentado da Amostra 3 também se mostrou um parâmetro significativo. É encontrado na literatura que concentrações excessivas de material adsorvente podem diminuir os sítios capazes de promover a adsorção e, por isso, diminuir a eficiência da adsorção. [83]

Assim, um maior tempo de extração (10 min) e menor volume total de extração (100 μL) foram as condições mais favoráveis para o processo de extração neste estudo. Entretanto, é importante destacar que condições experimentais podem ainda ser otimizadas para melhorar a eficiência de extração, mesmo em volumes maiores ou tempos de dessorção distintos.

Outra informação relevante que evidencia a eficiência do processo de extração envolve a observação do comportamento dos controles negativos e positivos na curva de amplificação (Figura 15). Por meio da análise da curva de amplificação, percebe-se que o CN_{Nano} (controle negativo) não amplificou durante os ciclos da PCR, indicando que nessa amostra não há presença de material genético. Isso confirma que as MNPs sintetizadas não estão contaminadas com DNA. Além disso, os controles CN_{PCR} e CP_{PCR} apresentaram resultados negativos e positivos, respectivamente, o que, portanto, comprova o funcionamento adequado da PCR.

Ao comparar os resultados observados, percebe-se que a miniaturização do sistema de extração proporcionou maior eficiência na extração do ácido nucleico em relação à amostra com

volume aumentado. Tal desfecho é de extrema relevância tendo em vista que a diminuição do consumo de reagentes e da geração de resíduos torna o método experimental mais sustentável e econômico. Além disso, a redução de volume favoreceu o contato entre as nanopartículas e o DNA, promovendo o isolamento da biomolécula alvo.

Outro resultado que deve ser considerado é a análise da curva de *melting*, que complementa os dados obtidos na curva de amplificação. A análise da curva de *melting* permite avaliar se a amplificação observada durante os ciclos da PCR corresponde ao gene alvo. Em uma PCR em tempo real que utiliza fluoróforos intercalantes (como o SYBRTM green, por exemplo), a curva de *melting* é gerada após todos os ciclos de amplificação, quando o equipamento aumenta gradualmente a temperatura para promover a dissociação do DNA fita dupla. Essa análise avalia a variação da fluorescência em função do aumento da temperatura (Figura 16). A temperatura de *melting* (T_m) é atingida quando aproximadamente 50% do DNA fita dupla é dissociado em DNA fita simples. [84]

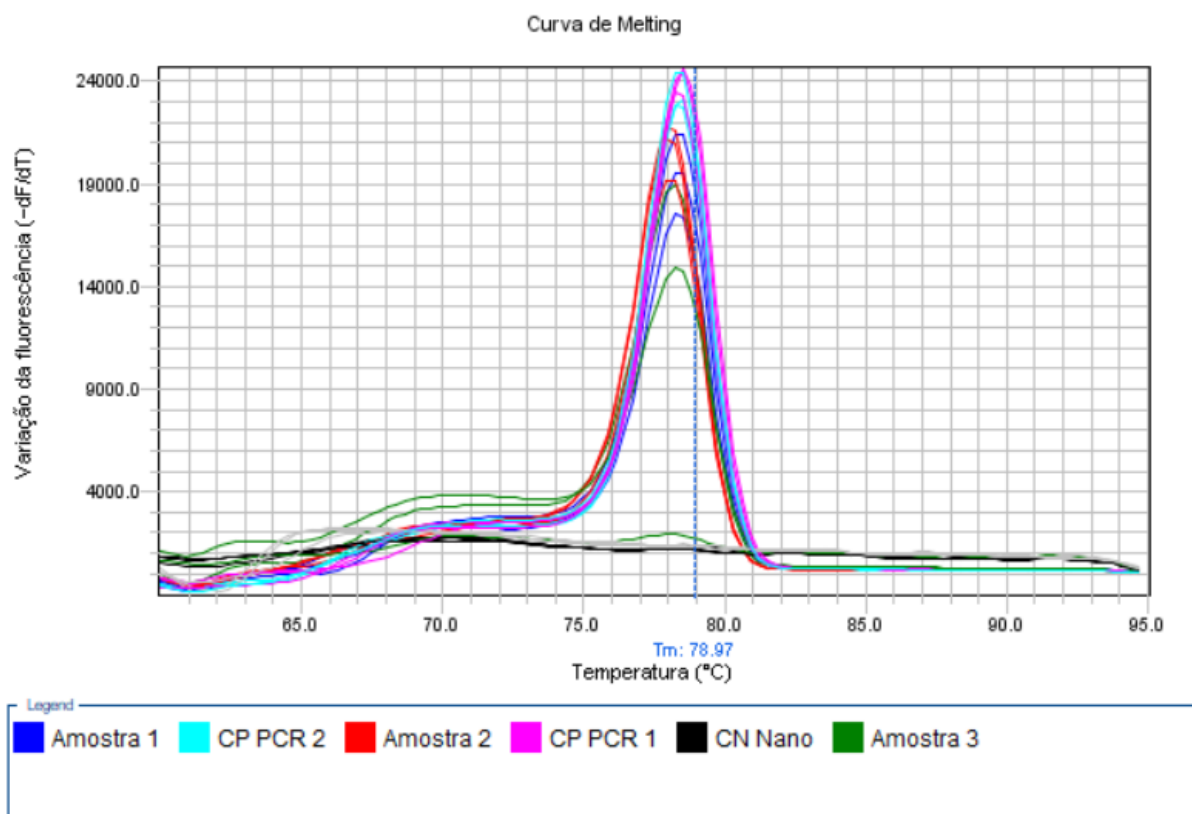


Figura 16 – Curva de *melting* para as amostras de extração e controles.

Além disso, cada sequência amplificada terá um valor de T_m específico de acordo com a composição de nucleotídeos e também com o tamanho do fragmento. Assim, cada gene apresenta um pico característico, e a presença de picos adicionais pode indicar a amplificação não específica ou a formação de dímeros de *primers*. [84] Dessa forma, ao observar a curva de *melting* ilustrada na Figura 16, pode-se concluir que a amplificação do gene *BRAF* ocorreu de forma

específica, uma vez que cada amostra apresenta um único pico de dissociação. Caso fossem observados picos adicionais, isso indicaria apenas a ocorrência de amplificação não específica, sem invalidar os resultados de extração, mas apontando para a necessidade de ajustes nas condições da PCR para confirmar a especificidade do gene alvo.

Quanto ao estudo que visava avaliar a influência dos agentes estabilizantes PEG, SDS e APTES no processo de extração do DNA, o procedimento experimental foi conduzido conforme descrito na Seção 4.5. No entanto, durante a análise dos extratos por PCR, notou-se uma amplificação nos controles negativos da extração, indicando possível contaminação por material genético em etapas anteriores a PCR. Essa ocorrência impossibilitou a obtenção de resultados confiáveis quanto ao desempenho das MNPs-PEG, MNPs-SDS e MNPs-APTES na extração do DNA. Assim, a investigação da influência desses agentes estabilizantes permanece como uma perspectiva para estudos futuros, buscando a otimização do protocolo experimental e o controle mais rigoroso de contaminações.

6 Conclusão e Perspectivas

6.1 Conclusão

Com base nos resultados e análises obtidos ao longo desse trabalho, conclui-se que o método de coprecipitação permitiu a obtenção de MNPs polidispersas, com diâmetro variando de 10 a 30 nm, com morfologia assimétrica e também apresentando resposta magnética ao campo magnético externo. Tais características foram constatadas através das técnicas de caracterização TEM e SEM. Além disso, a caracterização estrutural por XRD, através da comparação com o padrão cristalográfico do JCPDS, confirmou a formação predominante da fase magnetita, demonstrando o sucesso do método de coprecipitação na síntese de nanopartículas de magnetita.

Em relação a funcionalização das MNPs, foi observada a presença dos agentes estabilizantes SDS e APTES nas amostras analisadas por TGA, com 1,46% e 3,61% da massa total, correspondendo as porções orgânicas das amostras MNPs-SDS e MNPs-APTES, respectivamente. Portanto, a TGA indicou a funcionalização de ambos os sistemas, e, ainda que a análise tenha sido limitada por uma intercorrência instrumental, os resultados também sugerem a modificação superficial das MNPs-PEG.

A eficiência das MNPs como material extrator de DNA foi comprovada por meio da PCR em tempo real. Diferentes parâmetros de extração, como volume total e tempo de dessorção, foram avaliados. Observou-se que a dessorção por 10 min e um volume total de 100 μ L de extração favoreceram a eficiência de extração do DNA. Além disso, o resultado negativo do CN_{Nano} na PCR em tempo real descarta a possibilidade de contaminação das MNPs com DNA durante o processo de síntese. Em contrapartida, a influência dos funcionalizantes na captura do ácido nucleico não pôde ser avaliada devido a uma contaminação das amostras de MNPs-PEG,

MNPs-SDS e MNPs-APTES nas etapas anteriores à PCR, inviabilizando a coleta de dados confiáveis após a amplificação.

Contudo, o emprego das MNPs na extração de DNA representa um avanço significativo na área da biologia molecular, tendo em vista que esse nanomaterial apresenta benefícios relacionados à baixa toxicidade de reagentes. A miniaturização do sistema de extração também contribui para a redução do consumo de reagentes e da geração de resíduos. Além disso, devido à facilidade sintética, à resposta magnética e ao aumento da razão área-volume das MNPs estudadas, o nanomaterial torna o processo de extração menos laborioso e mais eficiente no isolamento da biomolécula, quando comparado as técnicas convencionais. Dessa forma, este estudo evidencia o potencial das MNPs como uma alternativa promissora para o isolamento de DNA, reunindo características que as tornam relevantes tanto na ciência dos materiais quanto em aplicações biotecnológicas.

6.2 Perspectivas

Em trabalhos futuros, pretende-se otimizar tanto os parâmetros de síntese quanto os de extração. Entende-se que condições diferenciadas na síntese, como escolha dos precursores dos íons metálicos, da base, da temperatura e da atmosfera reacional, influenciam diretamente o tamanho e a morfologia dos coloides afetando, conseqüentemente, suas propriedades físico-químicas. Por isso, otimizá-los seria de extrema importância para manter a estabilidade coloidal e também minimizar variações nas propriedades intrínsecas do nanomaterial.

Da mesma forma, como visto nos resultados deste trabalho, as condições utilizadas durante a etapa de extração do material genético também influenciam a eficiência das MNPs como material extrator, devendo, portanto, ser otimizadas. Uma vez que o impacto do uso dos agentes estabilizantes não pôde ser avaliado neste trabalho, tem-se também como objetivo futuro aprimorar o processo de isolamento do DNA aumentando a especificidade das MNPs com a utilização desses agentes. Além disso, seria de grande relevância validar o método experimental de extração quanto a sua confiabilidade e reprodutibilidade.

Outro ponto de interesse para estudos futuros seria o isolamento do DNA de amostras mais complexas, como a urina e o sangue, para assim, avaliar a seletividade do método. Além disso, o uso de agentes estabilizantes e funcionalizantes, pode ser uma alternativa promissora para aumentar a seletividade das MNPs nesse tipo de matriz, uma vez que esses agentes controlam o tipo de interação intermolecular que acontecerá na superfície da nanopartícula. Portanto, a avaliação do papel dos agentes estabilizantes seguirá sendo um dos principais focos de pesquisa para esse trabalho.

Referências

- [1] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora, 2022.
- [2] X. Ye and B. Lei, “The current status and trends of DNA extraction,” *BioEssays*, vol. 45, no. 8, p. 2200242, 2023.
- [3] P. Li, M. Li, D. Yue, and H. Chen, “Solid-phase extraction methods for nucleic acid separation. a review,” *Journal of Separation Science*, vol. 45, no. 1, pp. 172–184, 2022.
- [4] N. Rohland, I. Glocke, A. Aximu-Petri, and M. Meyer, “Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing,” *Nature Protocols*, vol. 13, no. 11, pp. 2447–2461, 2018.
- [5] L. Vanyorek, Á. M. Ilosvai, E. Szőri-Dorogházi, C. Váradi, F. Kristály, Á. Prekob, B. Fiser, T. Varga, Z. Kónya, and B. Viskolcz, “Synthesis of iron oxide nanoparticles for DNA purification,” *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 42, no. 5, pp. 693–700, 2021.
- [6] W. Cao, C. J. Easley, J. P. Ferrance, and J. P. Landers, “Chitosan as a polymer for ph-induced DNA capture in a totally aqueous system,” *Analytical Chemistry*, vol. 78, no. 20, pp. 7222–7228, 2006.
- [7] A. Bhati, A. Varghese, G. Rajan, V. Sridhar, Y. Mohan, S. Pradeep, S. Babu, N. Kaikkolante, M. Sarma, S. Arun, *et al.*, “An effective method for saliva stabilization and magnetic nanoparticles based DNA extraction for genomic applications,” *Analytical Biochemistry*, vol. 624, p. 114182, 2021.
- [8] J. H. Min, M.-K. Woo, H. Y. Yoon, J. W. Jang, J. H. Wu, C.-S. Lim, and Y. K. Kim, “Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid,” *Analytical Biochemistry*, vol. 447, pp. 114–118, 2014.
- [9] V. V. Mody, R. Siwale, A. Singh, and H. R. Mody, “Introduction to metallic nanoparticles,” *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, vol. 2, no. 4, pp. 282–289, 2010.
- [10] A. Hernando, P. Crespo, and M. García, “Metallic magnetic nanoparticles,” *The Scientific World Journal*, vol. 5, no. 1, pp. 972–1001, 2005.
- [11] A. Abdelkawi, A. Slim, Z. Zinoune, and Y. Pathak, “Surface modification of metallic nanoparticles for targeting drugs,” *Coatings*, vol. 13, no. 9, p. 1660, 2023.

- [12] A. Gorospe, S. Buenviaje, Y. Edañol, R. Cervera, and L. Payawan, “One-step co-precipitation synthesis of water-stable poly(ethylene glycol)-coated magnetite nanoparticles,” *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 1191, no. 1, p. 012059, 2019.
- [13] S. Kayal and R. Ramanujan, “Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 30, no. 3, pp. 484–490, 2010.
- [14] L. Shen, Y. Qiao, Y. Guo, S. Meng, G. Yang, M. Wu, and J. Zhao, “Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles,” *Ceramics International*, vol. 40, no. 1, pp. 1519–1524, 2014.
- [15] D. Ling and T. Hyeon, “Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications,” *Small*, vol. 9, no. 9-10, pp. 1450–1466, 2013.
- [16] T. Girardet, P. Venturini, H. Martinez, J.-C. Dupin, F. Cleymand, and S. Fleutot, “Spinel magnetic iron oxide nanoparticles: properties, synthesis and washing methods,” *Applied Sciences*, vol. 12, no. 16, p. 8127, 2022.
- [17] H. Cui, Y. Liu, and W. Ren, “Structure switch between α -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃ and Fe₃O₄ during the large scale and low temperature sol–gel synthesis of nearly monodispersed iron oxide nanoparticles,” *Advanced Powder Technology*, vol. 24, no. 1, pp. 93–97, 2013.
- [18] Y. Chen, J. Zhang, Z. Wang, and Z. Zhou, “Solvothermal synthesis of size-controlled monodispersed superparamagnetic iron oxide nanoparticles,” *Applied Sciences*, vol. 9, no. 23, p. 5157, 2019.
- [19] A. B. Chin and I. I. Yaacob, “Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart’s procedure,” *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 191, no. 1-3, pp. 235–237, 2007.
- [20] W. Glasgow, B. Fellows, B. Qi, T. Darroudi, C. Kitchens, L. Ye, T. M. Crawford, and O. T. Mefford, “Continuous synthesis of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles via thermal decomposition,” *Particuology*, vol. 26, pp. 47–53, 2016.
- [21] J. R. Sosa-Acosta, J. Silva, L. Fernández-Izquierdo, S. Díaz-Castañón, M. Ortiz, J. C. Zuaznabar-Gardona, and A. Díaz-García, “Iron oxide nanoparticles (IONPs) with potential applications in plasmid DNA isolation,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 545, pp. 167–178, 2018.
- [22] A. Zaha, H. B. Ferreira, L. M. Passaglia, *et al.*, *Biologia molecular básica*, vol. 3. Mercado Aberto, 2000.
- [23] J.-T. Chang, Y.-C. Chen, Y.-C. Chou, and S.-R. Wang, “Quantitative detection of residual porcine host cell DNA by real-time PCR,” *Biologicals*, vol. 42, no. 2, pp. 74–78, 2014.

- [24] L. C. F. Neto, M. S. Alves, J. Prichula, G. Agnes, T. F. de Oliveira, D. Trentin, and J. Merib, "An affordable and semiautomated approach as a novel strategy for the extraction of DNA using magnetic ionic liquids followed by real time-polymerase chain reaction," *Analytical Methods*, vol. 15, no. 30, pp. 3752–3757, 2023.
- [25] A. Genc, F. Eroglu, and I. S. Koltas, "Detection of plasmodium vivax by nested PCR and real-time PCR," *The Korean Journal of Parasitology*, vol. 48, no. 2, p. 99, 2010.
- [26] A. Lovatt, "Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products," *Reviews in Molecular Biotechnology*, vol. 82, no. 3, pp. 279–300, 2002.
- [27] C. W. Price, D. C. Leslie, and J. P. Landers, "Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 17, pp. 2484–2494, 2009.
- [28] X. Wang, M. Liu, F. Peng, and X. Ding, "Hydrophobic magnetic deep eutectic solvent: synthesis, properties, and application in DNA separation," *Journal of Chromatography A*, vol. 1659, p. 462626, 2021.
- [29] S. Erarpat, S. Bodur, and S. Bakirdere, "Nanoparticles based extraction strategies for accurate and sensitive determination of different pesticides," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 52, no. 6, pp. 1370–1385, 2022.
- [30] B. Saoudi, N. Jammul, M. M. Chehimi, G. P. McCarthy, and S. P. Armes, "Adsorption of DNA onto polypyrrole–silica nanocomposites," 1997.
- [31] J. Wen, C. Guillo, J. P. Ferrance, and J. P. Landers, "DNA extraction using a tetramethyl orthosilicate-grafted photopolymerized monolithic solid phase," *Analytical Chemistry*, vol. 78, no. 5, pp. 1673–1681, 2006.
- [32] W. A. Khan, M. B. Arain, and M. Soylak, "Nanomaterials-based solid phase extraction and solid phase microextraction for heavy metals food toxicity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 145, p. 111704, 2020.
- [33] F. C. Adams and C. Barbante, "Nanoscience, nanotechnology and spectrometry," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 86, pp. 3–13, 2013.
- [34] J. Kreuter, "Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 47, no. 1, pp. 65–81, 2001.
- [35] J. Li, R. Yuan, Y. Chai, and X. Che, "Fabrication of a novel glucose biosensor based on Pt nanoparticles-decorated iron oxide-multiwall carbon nanotubes magnetic composite," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 66, no. 1-2, pp. 8–14, 2010.

- [36] T. Pradeep *et al.*, “Noble metal nanoparticles for water purification: a critical review,” *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 24, pp. 6441–6478, 2009.
- [37] S. Cheong, J. D. Watt, and R. D. Tilley, “Shape control of platinum and palladium nanoparticles for catalysis,” *Nanoscale*, vol. 2, no. 10, pp. 2045–2053, 2010.
- [38] A. Abedini, A. A. A. Bakar, F. Larki, P. S. Menon, M. S. Islam, and S. Shaari, “Recent advances in shape-controlled synthesis of noble metal nanoparticles by radiolysis route,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 11, pp. 1–13, 2016.
- [39] S. Barcikowski, S. Kundu, C. Rehbock, and W. A. Kues, “Inorganic nanoparticles in reproduction biology: Opportunities and challenges,” *ChemPlusChem*, p. e202400554, 2025.
- [40] A. Mittal, I. Roy, and S. Gandhi, “Magnetic nanoparticles: An overview for biomedical applications,” *Magnetochemistry*, vol. 8, no. 9, p. 107, 2022.
- [41] I. Fatimah, G. Fadillah, and S. P. Yudha, “Synthesis of iron-based magnetic nanocomposites: a review,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 14, no. 8, p. 103301, 2021.
- [42] F. G. da Silva, J. Depeyrot, A. Campos, R. Aquino, D. Fiorani, and D. Peddis, “Structural and magnetic properties of spinel ferrite nanoparticles,” *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 19, no. 8, pp. 4888–4902, 2019.
- [43] M. Deon, *Sistemas combinados de magnetita e sílica: mobilidade magnética e porosidade elaboradas para bioaplicações*. Tese (doutorado em química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/200950>. Acesso em: 05 de dezembro de 2025.
- [44] C. Rümenapp, B. Gleich, and A. Haase, “Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics,” *Pharmaceutical Research*, vol. 29, pp. 1165–1179, 2012.
- [45] A. Włodarczyk, S. Gorgoń, A. Radoń, and K. Bajdak-Rusinek, “Magnetite nanoparticles in magnetic hyperthermia and cancer therapies: Challenges and perspectives,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 11, p. 1807, 2022.
- [46] J. Ibarra, D. Encinas, M. Blanco, S. Barbosa, P. Taboada, J. Juárez, and M. A. Valdez, “Co-encapsulation of magnetic nanoparticles and cisplatin within biocompatible polymers as multifunctional nanoplatforms: synthesis, characterization, and in vitro assays,” *Materials Research Express*, vol. 5, no. 1, p. 015023, 2018.
- [47] A.-G. Niculescu, C. Chircov, and A. M. Grumezescu, “Magnetite nanoparticles: Synthesis methods—a comparative review,” *Methods*, vol. 199, pp. 16–27, 2022.
- [48] S. Sun and H. Zeng, “Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, no. 28, pp. 8204–8205, 2002.

- [49] D. Maity, S. Kale, R. Kaul-Ghanekar, J.-M. Xue, and J. Ding, "Studies of magnetite nanoparticles synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in tri(ethylene glycol)," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, no. 19, pp. 3093–3098, 2009.
- [50] H. Mohammadi, E. Nekobahr, J. Akhtari, M. Saeedi, J. Akbari, and F. Fathi, "Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles by co-precipitation method coated with bio-compatible compounds and evaluation of in-vitro cytotoxicity," *Toxicology Reports*, vol. 8, pp. 331–336, 2021.
- [51] M. J. Eskandari and I. Hasanzadeh, "Size-controlled synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles via an alternating magnetic field and ultrasonic-assisted chemical co-precipitation," *Materials Science and Engineering: B*, vol. 266, p. 115050, 2021.
- [52] S. P. Yeap, J. Lim, B. S. Ooi, and A. L. Ahmad, "Agglomeration, colloidal stability, and magnetic separation of magnetic nanoparticles: collective influences on environmental engineering applications," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 19, pp. 1–15, 2017.
- [53] M. Lattuada and T. A. Hatton, "Functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles," *Langmuir*, vol. 23, no. 4, pp. 2158–2168, 2007.
- [54] H.-J. Jang, C. Y. Shin, and K.-B. Kim, "Safety evaluation of polyethylene glycol (PEG) compounds for cosmetic use," *Toxicological Research*, vol. 31, pp. 105–136, 2015.
- [55] Z. Muhammad, A. Raza, S. Ghafoor, A. Naeem, S. S. Naz, S. Riaz, W. Ahmed, and N. F. Rana, "PEG capped methotrexate silver nanoparticles for efficient anticancer activity and biocompatibility," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 91, pp. 251–255, 2016.
- [56] J. Yang, P. Zou, L. Yang, J. Cao, Y. Sun, D. Han, S. Yang, Z. Wang, G. Chen, B. Wang, *et al.*, "A comprehensive study on the synthesis and paramagnetic properties of PEG-coated Fe₃O₄ nanoparticles," *Applied Surface Science*, vol. 303, pp. 425–432, 2014.
- [57] A. Mukhopadhyay, N. Joshi, K. Chattopadhyay, and G. De, "A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome C," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 4, no. 1, pp. 142–149, 2012.
- [58] M. F. Vitha, A. J. Dallas, and P. W. Carr, "Study of water-sodium dodecyl sulfate micellar solubilization thermodynamics for several solute homolog series by headspace gas chromatography," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, no. 12, pp. 5050–5062, 1996.
- [59] I. Pinzaru, D. Coricovac, C. Dehelean, E.-A. Moacă, M. Mioc, F. Baderca, I. Sizemore, S. Brittle, D. Marti, C. D. Calina, *et al.*, "Stable PEG-coated silver nanoparticles—a comprehensive toxicological profile," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 111, pp. 546–556, 2018.

- [60] M. Sypabekova, A. Hagemann, D. Rho, and S. Kim, “3-aminopropyltriethoxysilane (AP-TES) deposition methods on oxide surfaces in solution and vapor phases for biosensing applications,” *Biosensors*, vol. 13, no. 1, p. 36, 2022.
- [61] W. Zhang and E. P. Lai, “Chemical functionalities of 3-aminopropyltriethoxy-silane for surface modification of metal oxide nanoparticles,” *Silicon*, vol. 14, no. 12, pp. 6535–6545, 2022.
- [62] M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macêdo, M. Nakamura, and H. E. Toma, “Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 279, no. 2-3, pp. 210–217, 2004.
- [63] E. A. Campos, D. V. B. S. Pinto, J. I. S. d. Oliveira, E. d. C. Mattos, and R. d. C. L. Dutra, “Synthesis, characterization and applications of iron oxide nanoparticles-a short review,” *Journal of Aerospace Technology and Management*, vol. 7, no. 3, pp. 267–276, 2015.
- [64] K. R. Hurley, H. L. Ring, H. Kang, N. D. Klein, and C. L. Haynes, “Characterization of magnetic nanoparticles in biological matrices,” 2015.
- [65] A. Ali, Y. W. Chiang, and R. M. Santos, “X-ray diffraction techniques for mineral characterization: A review for engineers of the fundamentals, applications, and research directions,” *Minerals*, vol. 12, no. 2, p. 205, 2022.
- [66] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy,” *Photosynthesis Research*, vol. 101, pp. 157–170, 2009.
- [67] H. Seifi, T. Gholami, S. Seifi, S. M. Ghoreishi, and M. Salavati-Niasari, “A review on current trends in thermal analysis and hyphenated techniques in the investigation of physical, mechanical and chemical properties of nanomaterials,” *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 149, p. 104840, 2020.
- [68] S. Arsalani, Y. Hadadian, E. E. Mazon, E. J. Guidelli, E. Kava, A. P. Ramos, A. J. Gualdi, T. Z. Pavan, O. Baffa, and A. A. Carneiro, “Uniform size PEGylated iron oxide nanoparticles as a potential theranostic agent synthesized by a simple optimized coprecipitation route,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 564, p. 170091, 2022.
- [69] P. Cheah, P. Brown, J. Qu, B. Tian, D. L. Patton, and Y. Zhao, “Versatile surface functionalization of water-dispersible iron oxide nanoparticles with precisely controlled sizes,” *Langmuir*, vol. 37, no. 3, pp. 1279–1287, 2021.
- [70] D. K. Lahiri and J. I. Nurnberger Jr, “A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies,” *Nucleic acids research*, vol. 19, no. 19, p. 5444, 1991.

- [71] E. E. Herbei, D. L. Buruiana, A. C. Muresan, V. Ghisman, N. L. Bogatu, V. Basliu, C.-I. Vasile, and L. Barbu-Tudoran, "Tailored magnetic Fe₃O₄-based core-shell nanoparticles coated with TiO₂ and SiO₂ via co-precipitation: Structure-property correlation for medical imaging applications," *Diagnostics*, vol. 15, no. 15, p. 1912, 2025.
- [72] L. Abarca-Cabrera, P. Fraga-García, and S. Berensmeier, "Bio-nano interactions: binding proteins, polysaccharides, lipids and nucleic acids onto magnetic nanoparticles," *Biomaterials research*, vol. 25, no. 1, p. 12, 2021.
- [73] S. Majidi, F. Zeinali Sehrig, S. M. Farkhani, M. Soleymani Goloujeh, and A. Akbarzadeh, "Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 44, no. 2, pp. 722–734, 2016.
- [74] H. Fatima, D.-W. Lee, H. J. Yun, and K.-S. Kim, "Shape-controlled synthesis of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles with different iron precursors and capping agents," *RSC advances*, vol. 8, no. 41, pp. 22917–22923, 2018.
- [75] M. Stoia, R. Istrate, and C. Păcurariu, "Investigation of magnetite nanoparticles stability in air by thermal analysis and FTIR spectroscopy," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 125, no. 3, pp. 1185–1198, 2016.
- [76] H. Fan, B. Song, and Q. Li, "Thermal behavior of goethite during transformation to hematite," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 98, no. 1, pp. 148–153, 2006.
- [77] H. Ruan, R. Frost, and J. T. Klopogge, "The behavior of hydroxyl units of synthetic goethite and its dehydroxylated product hematite," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 57, no. 13, pp. 2575–2586, 2001.
- [78] B. Y. Yu and S.-Y. Kwak, "Assembly of magnetite nanocrystals into spherical mesoporous aggregates with a 3-d wormhole-like pore structure," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 20, no. 38, pp. 8320–8328, 2010.
- [79] F. Kunc, M. Gallerneault, O. Kodra, A. Brinkmann, G. P. Lopinski, and L. J. Johnston, "Surface chemistry of metal oxide nanoparticles: NMR and TGA quantification," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 414, no. 15, pp. 4409–4425, 2022.
- [80] D. G. Ginzinger, "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream," *Experimental hematology*, vol. 30, no. 6, pp. 503–512, 2002.
- [81] J. Xu, D. Chen, Y. Yang, H. Gong, W. Gao, and H. Xiao, "A one step method for isolation of genomic DNA using multi-amino modified magnetic nanoparticles," *RSC advances*, vol. 11, no. 6, pp. 3324–3332, 2021.

- [82] A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziółkowski, and E. Malinowska, “Comparative evaluation of different surface coatings of Fe_3O_4 -based magnetic nano sorbent for applications in the nucleic acids extraction,” *International journal of molecular sciences*, vol. 23, no. 16, p. 8860, 2022.
- [83] S. Bakhtiari, M. Salari, M. Shahrashoub, A. Zeidabadinejad, G. Sharma, and M. Sillanpää, “A comprehensive review on green and eco-friendly nano-adsorbents for the removal of heavy metal ions: synthesis, adsorption mechanisms, and applications,” *Current Pollution Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1–39, 2024.
- [84] F. E. Ahmed, M. M. Gouda, L. A. Hussein, N. C. Ahmed, P. W. Vos, and M. A. Mohammad, “Role of melt curve analysis in interpretation of nutrigenomics’ microrna expression data,” *Cancer genomics & proteomics*, vol. 14, no. 6, pp. 469–481, 2017.