

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Luiz Carlos Ferreira Neto

**Investigação de metodologias
alternativas para a extração de
ácidos nucleicos.**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2022**

Luiz Carlos Ferreira Neto

Investigação de metodologias alternativas para a extração de ácidos nucleicos.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador(a): Dr. Josias de Oliveira Merib
Coorientador(a): Dr(a). Danielle da Silva Trentin

**Porto Alegre
2022**

Catálogo na Publicação

Ferreira Neto, Luiz Carlos

Investigação de metodologias alternativas para a extração de ácidos nucleicos. / Luiz Carlos Ferreira Neto. -- 2022.

62 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2022.

Orientador(a): Josias de Oliveira Merib ;
coorientador(a): Danielle da Silva Trentin.

1. Preparo de amostras. 2. DNA. 3. Amostras biológicas. 4. Líquidos iônicos magnéticos. I. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Inicialmente ao Dr. Josias de Oliveira Merib, professor, orientador e amigo, não apenas pelas infinitas conversas e ensinamentos ao longo de toda esta jornada, mas pela oportunidade de trabalho e por estar sempre disposto ao diálogo de forma sempre produtiva, com muita organização e com respeito.

Agradeço à amiga Camila Scheid por muitos e muitos momentos de aprendizado, por estar sempre disposta em ajudar, em revisar, em conversar, em ensinar. Agradeço também à colega e amiga Mônica Alves, colega de bancada e parceira ao longo de toda caminhada no mestrado.

Também agradeço à professora Danielle Trentin, Janira Prichula e ao Paulo Markus, pelas conversas e debates no início deste trabalho. E, à Grasiela Agnes, agradeço a toda assistência dentro do Laboratório de Biologia Molecular, por todos os momentos de aprendizado e auxílio que sempre propôs sem medir esforços.

Por fim, não poderia deixar de agradecer UFCSPA e o PPG Biociências por proporcionarem este período incrível de estudo e de muitos aprendizados. Também ao CNPq, Capes e FAPERGS pelo auxílio financeiro concedido.

Aos familiares e amigos que sempre torcem e vibram por mim.

Muito obrigado!

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), nos laboratórios Central Analítica, 301 do prédio 1 e Laboratório de Biologia Molecular, e contou com recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 ACIDOS NUCLEICOS	13
1.2 TECNICAS PARA ANÁLISE DE DNA.....	13
1.3 TECNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA	15
1.4 TECNICAS DE MICROEXTRAÇÃO.....	16
1.5 LÍQUIDOS IÔNICOS MAGNÉTICOS.....	19
1.6 LÍQUIDOS IÔNICOS MAGNÉTICOS COMO FASE EXTRATORA	20
1.7 APLICAÇÃO DE MILs NA EXTRAÇÃO DE DNA	22
1.8 JUSTIFICATIVA.....	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. METODOLOGIA	28
3.1 SÍNTESE DOS MLs	28
3.1.1 Reagentes	28
3.1.2 Procedimento Sintético	28
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MILs.....	29
3.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	30
3.3.1 Adaptação do sistema de extração	30
3.3.2 Plataforma de extração.....	31
3.3.3 Técnica de extração SDME-MIL	31
3.4 AMOSTRAS E PREPARO	33
3.4.1 Soluções.....	33
3.4.2 Obtenção do DNA utilizado para os testes do sistema proposto.....	33
3.5 ANÁLISES ENVOLVENDO QUBIT	34
3.6 PCR CONVENCIONAL.....	35
3.6.1 Instrumentação	35
3.6.2 Reagentes e padrões.....	35
3.6.3 Procedimento experimental	35
3.6.4 Eletroforese	35
4. RESULTADOS	36
4.1 SÍNTESE DOS MLs	36

4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MILs.....	36
4.3	EXTRAÇÕES UTILIZANDO QUBIT	40
4.4	EXTRAÇÕES DE SOLUÇÃO FORTIFICADA - PCR	41
4.5	APLICAÇÃO EM MATRIZES COMPLEXAS	42
5.	DISCUSSÃO.....	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MILs.....	44
5.2	TÉCNICA SDME-MIL NA EXTRAÇÃO DE DNA	44
5.3	NOVA ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO	45
5.4	ANÁLISES POR QUBIT	46
5.5	ANÁLISES ENVOLVENDO PCR CONVENCIONAL	47
6.	CONCLUSÕES.....	49
7.	REFERÊNCIAS	50
8.	CURRÍCULO LATTES.....	57
9.	APÊNDICE I	61

LISTA DE ABREVIATURAS

DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
IL	<i>Ionic liquids</i>
LPME	<i>Liquid-phase microextraction</i>
MIL	<i>Magnetic Ionic liquids</i>
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QTOF	<i>Quadrupole-time-of-flight</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SDME	<i>Single drop microextraction</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma ressaltando a divisão das técnicas de microextração	17
Figura 2. Estruturas químicas de líquidos iônicos magnéticos com o componente paramagnético no ânion	20
Figura 3. Estruturas químicas de MILs (a) monocatiônicas, (b) dicatiônicas e (c) tricatiônicas sintetizadas por Nacham <i>et al.</i>	20
Figura 4. Esquema de um procedimento de extração utilizando SDME e MILs como fases extratoras	22
Figura 5. Rota de síntese dos MILs a base de Cobalto, Manganês e Níquel....	29
Figura 6. Esquema utilizado para a adaptação no uso de magnetos.....	30
Figura 7. Plataforma de extração desenvolvida para este estudo.....	31
Figura 8. Esquema da técnica de SDME utilizando MILs como extrator.....	32
Figura 9. Primeiros MILs sintetizados neste estudo.....	36
Figura 10. Espectro de massa da porção aniônica [Ni(II)(hfacac) ₃ -], 1,0 ng/mL 1,0 ng/mL	37
Figura 11. Espectro de massa da porção catiônica [P ₆₆₆₁₄ ⁺], 1,0 ng/mL	37
Figura 12. Espectro de massa da porção aniônica [Mn(II)(hfacac) ₃ -], 1,0 ng/mL 1,0 ng/mL	38
Figura 13. Espectro de massa da porção catiônica [P ₆₆₆₁₄ ⁺], 1,0 ng/mL	38
Figura 14. Espectro de massa da porção aniônica [Co(II)(hfacac) ₃ -], 1,0 ng/mL 1,0 ng/mL	38
Figura 15. Espectro de massa da porção catiônica [P ₆₆₆₁₄ ⁺], 1,0 ng/mL	39
Figura 16. (a) MIL a base de Cobalto aderido em um magneto e, (b) MILs a base de Níquel e Manganês imersos em solução aquosa	39
Figura 17. Primeiros resultados positivos analisados por PCR/Eletroforese.....	41
Figura 18. Resultados positivos para todos os MILs em diferentes concentrações.....	42
Figura 19. Resultados observados em amostras biológicas	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações nas condições de extração ao longo do trabalho.....	32
Tabela 2. Primeiros dados de extração com análise por Qubit	40
Tabela 3. Resultados de análise por Qubit com amostras concentradas	40
Tabela 4. Resultados de análise por Qubit com método ajustado	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Aplicação de MILs na extração de DNA.	25
---	----

RESUMO

O presente trabalho teve como base a proposta da investigação de uma metodologia analítica alternativa para a extração de DNA. Como relatado em diversos estudos, a extração de DNA apresenta-se como um ponto crítico nas determinações dessa biomolécula em diversos tipos de amostras. Desta forma, a metodologia de extração baseada na microextração em gota única (SDME, (do inglês *single drop microextraction*) utilizando líquidos iônicos magnéticos (MILs, do inglês *magnetic ionic liquids*) como fase extratora foi proposta. Essa metodologia consiste em um procedimento experimental eficiente e ambientalmente correto de preparo de amostras, o qual apresenta baixo custo, consumo reduzido de solventes e simplicidade de aplicação. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia alternativa e com alta frequência analítica para a extração de DNA baseada em microextração com a aplicação de líquidos iônicos magnéticos. Foram sintetizados e caracterizados os MILs de $([P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-])$, $([P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-])$ e $([P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-])$ e utilizados como solvente de extração na técnica SDME seguido por análise utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) e eletroforese em gel. Além disso, um procedimento experimental no qual foram permitidas extrações simultâneas em várias amostras também foi proposto e avaliado. Em um primeiro momento, amostras aquosas fortificadas com quantidades conhecidas de DNA para verificar a viabilidade de extração. Após isso, foram realizadas extrações em amostras de saliva, sangue e urina sendo obtidos resultados bastante satisfatórios principalmente para as matrizes de sangue e saliva. O método desenvolvido se mostrou com alta frequência analítica e capaz de extrair DNA de amostras biológicas complexas. Adicionalmente, o método desenvolvido foi aplicado com sucesso na plataforma de extração projetada ao longo deste trabalho, ao passo que mostra um grande potencial para a investigações futuras em PCR em tempo real, bem como para o aprimoramento do aparato proposto.

Palavras-chave: preparo de amostras, DNA, amostras biológicas, líquidos iônicos magnéticos.

ABSTRACT

This study consists of an investigation of alternative analytical methodology for DNA extraction. According to numerous studies, DNA extraction is considered a critical point for the determination of this biomolecule in different types of samples. In particular, the extraction methodology based on single drop microextraction (SDME) using magnetic ionic liquids (MILs) as extraction phase was proposed. This methodology consists of an efficient and environmentally friendly sample preparation procedure, exhibiting low cost, reduced solvent consumption and simplicity of application. Therefore, the aim of this study was to develop an alternative methodology with high sample throughput for DNA extraction based on microextraction with the application of magnetic ionic liquids. The $([P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-])$, $([P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-])$ and $([P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-])$ MILs were used as extraction solvent in a SDME approach followed by analysis using polymerase chain reaction (PCR) and gel electrophoresis. An experimental workflow in which simultaneous extractions were capable to be performed was also proposed and evaluated. Firstly, aqueous samples were spiked with known amounts of DNA in order to evaluate the extraction feasibility. Following, extractions were performed using samples of saliva, blood and urine, with satisfactory results obtained especially for blood and saliva matrices. The method developed allowed for high-throughput and it was capable of extracting DNA from complex biological samples. Additionally, the method proposed in this study was successfully applied using an innovative extraction platform designed in this work, exhibiting great potential for further investigations in real-time PCR as well as suitable for the improvement of the proposed configuration.

Keywords: sample preparation, DNA, biological samples, magnetic ionic liquids.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS NUCLEICOS

O estudo a respeito da constituição e estrutura química dos ácidos nucleicos bem como a sequência destes determinando aspectos funcionais de genes apresenta-se de grande importância em diversas áreas da ciência. Os ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA) constituem-se como os protagonistas dos repositórios moleculares de informação genética. Nesse sentido, a estrutura e função de proteínas assim como de outros constituintes celulares, que definem aspectos fundamentais do metabolismo celular, resultam embrionariamente do patrimônio genômico celular [1].

Estruturalmente, a molécula de DNA é um polímero composto por unidades de desoxirribonucleotídeos, e constituída por um açúcar (a pentose desoxirribose), por uma base nitrogenada (podendo ser derivada das purinas – adenina e guanina, ou derivada das pirimidinas – citosina e timina) e um grupamento fosfato. Os desoxirribonucleotídeos, na molécula de DNA, formam cadeias unidas por ligações covalentes (pontes fosfodiéster) e, a ligação entre a pentose e a base nitrogenada denominada ligação glicosídica [1, 2].

Particularmente em relação ao DNA, a análise e determinação dessa biomolécula pode ser investigada de formas qualitativas e quantitativas e, aplicada para inúmeros objetivos tais como na identificação de micro-organismos patogênicos, avaliações genéticas de populações ancestrais, análises de DNA em biópsias entre outros [3], sendo particularmente útil em análises forenses, em diagnóstico clínico e na pesquisa acadêmica. Para a análise desta biomolécula, existem uma grande variedade de técnicas que podem ser empregadas;

1.2 TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE DNA

Diversas técnicas são descritas para análise de ácidos nucleicos que envolvem detecção de presença e ausência, e avaliação quantitativa de sequências conhecidas e determinação de sequências desconhecidas. Ensaio moleculares que utilizam técnicas de amplificação são descritos como padrão-

ouro por muitos protocolos para pesquisa e diagnóstico de patologias de diversas etiologias. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que realiza uma amplificação exponencial *in vitro* de sequências de ácidos nucleicos e, simbolicamente, reproduz um processo semelhante ao de replicação do DNA que ocorre nas células [1-3].

A técnica da PCR consiste em uma reação de termociclagem composta por três etapas principais: i) a desnaturação, onde se emprega uma alta temperatura (95 °C) para que a dupla fita de DNA seja desnaturada, ii) o anelamento dos *primers*, com a redução da temperatura (45 ~ 60 °C) e, iii) a extensão dos *primers* na direção 5' - 3' pela ação da enzima DNA polimerase, com um novo aumento de temperatura (68 ~ 72 °C), promovendo a síntese de nova fita de DNA e, assim, a cada ciclo são geradas milhares de novas cópias de DNA. Por fim, o produto de amplificação final de DNA é analisado pelo uso da eletroforese em gel de agarose [2,4].

De modo geral, a eletroforese é uma técnica de análise que apresenta baixo custo de análise e um protocolo de fácil aplicação. A eletroforese em gel pode ser utilizada para fins qualitativos, pela determinação de tamanhos de fragmentos de DNA e, assim, a separação de moléculas ocorre por migração ao longo do gel em função de uma diferença de potencial. Desta forma, a identificação e confirmação da amplificação realizada pela reação de PCR pode ser observada [2,4].

A partir da PCR (convencional) ocorreu um grande avanço com o desenvolvimento da PCR em tempo real quantitativa (qPCR), que possibilita o monitoramento em tempo real dos produtos da PCR (e não somente no seu final, como na PCR convencional), além da possibilidade de quantificar cópias do fragmento de DNA pesquisado. Este monitoramento ocorre em função da utilização de sondas fluorescentes (intercalantes ou hidrólise) que se ligam ao fragmento em cada ciclo de amplificação, emitindo fluorescência que é registrada pelo equipamento em tempo real [4]. Outra variação bastante importante refere-se ao processo de PCR envolvendo a transcrição reversa (RT-PCR) que permite a utilização de RNA como *template*, sendo realizada a transcrição desse RNA para uma fita de DNA complementar (cDNA) utilizando-se a enzima transcriptase reversa [2,4].

1.3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA

A eficiência das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos está diretamente relacionada ao preparo da amostra. A etapa de preparo apresenta grande importância em um procedimento analítico, especialmente quando se trata de amostras biológicas complexas, uma vez que elas podem conter interferentes e, assim, prejudicar os resultados [5]. O preparo de amostra possibilita também a pré-concentração dos analitos, o que é essencial quando se trabalha com compostos em níveis traço, permitindo a quantificação no equipamento [6].

Em destaque, a etapa de extração é fundamental e define a quantidade e qualidade da sequência alvo de DNA obtida e que será analisada [4]. Dessa forma, a etapa de extração de DNA constitui-se em importante desafio analítico. Nesse sentido, diversos métodos de extração têm sido propostos objetivando otimizar a eficiência na extração de ácidos nucleicos bem como a máxima remoção de interferentes presentes na matriz biológica que possam inibir as reações de amplificação.

Especificamente, referente à extração de DNA, podem ser citadas metodologias que envolvem extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos [7] e tampões, extrações utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e, também protocolos que envolvem o uso de partículas magnéticas (*magnetic beads*). Estas metodologias estão disponíveis comercialmente por inúmeros fabricantes e utilizados na rotina clínica e de pesquisa.

Porém, para determinadas aplicações em amostras complexas, previamente à etapa de captura do analito é necessária a lise celular para a liberação do ácido nucleico contido nas células. De modo geral, os métodos podem ser classificados em mecânicos e não mecânicos. O primeiro compreende pelo processo de lise mecânica de parede ou membrana celular por meio de cisalhamento (por ação física) e, o segundo método ainda pode ser dividido, pela natureza do processo, em enzimáticos (com o uso de enzimas como lisozimas, proteases, entre outras) ou químicos, para gerar lise das células. Dentre os métodos químicos pode-se destacar algumas das

técnicas comumente utilizadas atualmente, baseadas no uso de solventes orgânicos e de surfactantes [4, 5, 8, 9].

Em relação aos protocolos envolvendo extrações com solventes orgânicos, tipicamente é utilizada uma mistura de fenol e clorofórmio na etapa de extração/purificação do DNA. Além disso, esses protocolos têm sido amplamente adaptados com a utilização de detergentes para remoção de polissacarídeos e proteínas. Contudo, a utilização destes solventes orgânicos é considerada tóxica e prejudiciais aos analistas e, também, o protocolo se torna laborioso por apresentar diversas etapas de centrifugação [5, 8, 9].

Um aprimoramento nas técnicas de preparo de amostra para extração de DNA ocorreu com a utilização da SPE. Nesse caso, partículas sólidas geralmente formadas por sílica, são capazes de reter as biomoléculas de DNA na presença de um meio com alta concentração salina. Desta forma, as partículas sólidas contendo o DNA extraído são lavadas para a remoção de outros componentes tais como sais, proteínas e componentes celulares. Posteriormente, o DNA é eluído com um tampão de baixa concentração salina e avaliado quanto ao rendimento e pureza. Apesar do grande avanço na etapa de extração principalmente envolvendo menor consumo de reagentes e tempo de análise, os kits utilizados apresentam custos elevados. Além disso, esses kits podem ser ainda mais caros caso envolvam partículas magnéticas como fases extratoras (*magnetic beads*); sendo que nesse último caso, um instrumento específico para a separação das partículas por meio de um campo magnético deve ser utilizado [3, 8-10].

1.4 TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO

Atualmente, tem-se uma alta demanda pelo desenvolvimento de técnicas baratas, rápidas, com baixo consumo de insumos e, paralelamente, eficiente ao objetivo proposto. Contudo, os métodos de extração de DNA comercialmente disponíveis podem ser laboriosos, ter elevado custo por amostra e apresentarem limitações de desempenho para algumas aplicações [9-11]. Além disso, o emprego de elevadas quantidades de solventes tóxicos geralmente necessários na extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid*

extraction) torna este tipo de metodologia prejudicial ao analista e ao meio ambiente.

Para contornar tais problemas destacam-se técnicas emergentes consideradas eficientes, de baixo custo e fácil execução, e aqui ressaltam-se as técnicas miniaturizadas ou de microextração. As técnicas de microextração estão fundamentadas na distribuição dos analitos entre a matriz da amostra e solventes ou sorventes (materiais sólidos) que funcionam como fases extratoras [5, 9, 11].

Dentre as técnicas miniaturizadas, destaca-se a microextração em fase líquida (LPME, do inglês, *liquid-phase microextraction*). A LPME pode ser representada pela distribuição ou migração de um analito presente na amostra (fase doadora), geralmente aquosa, para um solvente (fase receptora) imiscível em água. Na Figura 1, está representado um esquema contendo as principais técnicas de microextração propostas [5]. Evidentemente, há um número muito grande de outras técnicas miniaturizadas que foram desenvolvidas a partir destas.

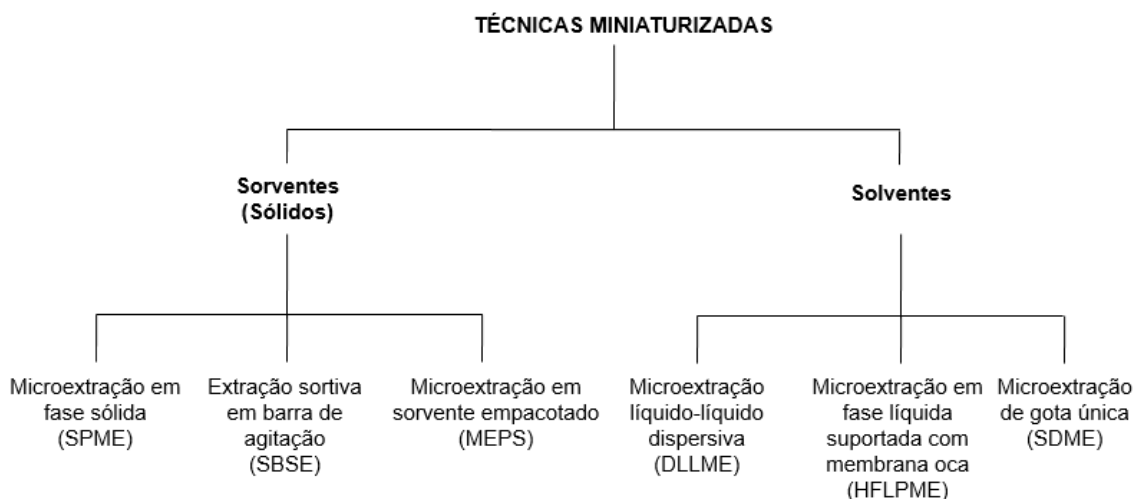


Figura 1. Fluxograma ressaltando a divisão das técnicas de microextração [5].

Como mostrado na Figura 1, a LPME engloba um conjunto de técnicas miniaturizadas e pode ser dividida de acordo o tipo do procedimento experimental adotado. Por exemplo, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) consiste em uma mistura ternária de solventes, sendo eles, um solvente de extração (imiscível na amostra aquosa), um solvente dispersor (miscível tanto no solvente de extração quanto na amostra aquosa) e a amostra aquosa. O processo de

extração é decorrente das diferentes solubilidades dos componentes analisados em duas fases líquidas (aquosa e orgânica) e está fundamentado no fenômeno da partição. Em condições ideais se almeja que o analito se porte preferencialmente solúvel na fase orgânica, possibilitando o isolamento do analito pela partição, e os analitos podem ser extraídos em poucos minutos com altos fatores de enriquecimento. Após a extração, a solução é geralmente submetida a uma etapa de centrifugação e a fase de extração é retirada antes da análise instrumental [5, 12].

A SDME difere da técnica anterior por utilizar apenas uma gota do solvente extrator (imiscível com a solução aquosa) que é exposta diretamente na amostra aquosa (imersão direta) ou no espaço gasoso acima da amostra (*headspace*). Em sua configuração original, a gota de solvente extrator era exposta com o uso de uma microsseringa tipicamente empregada em cromatografia gasosa. Porém, devido à agitação da amostra, este tipo de configuração apresenta grandes problemas de estabilidade da gota de solvente principalmente no modo de imersão direta. Desta forma, algumas adaptações foram propostas e, recentemente, a utilização de líquidos iônicos magnéticos (MILs, do inglês, *Magnetic Ionic liquids*) abriu interessantes possibilidades nesta técnica.

Em geral, pode-se destacar algumas vantagens apresentadas pelas técnicas de microextração, incluindo o baixo consumo de solventes e o fato de serem ambientalmente sustentáveis; além disso, podem ser citados o tempo de execução reduzido quando comparadas às técnicas convencionais de extração; versatilidade e aplicabilidade para extração de diversos compostos com alta capacidade para concentração dos analitos [5, 10, 13, 14].

Outro fator muito importante a ser considerado em técnicas de microextração é a estabilidade das fases extratoras contribuindo para uma satisfatória eficiência de extração. Fases extratoras compostas, por exemplo, por líquidos iônicos (ILs, do inglês, *Ionic liquids*) têm apresentado inúmeras vantagens sobre solventes orgânicos convencionais [3]. As aplicações têm crescido muito nos últimos anos e contribuíram para o rápido desenvolvimento dessa área, assim como, no estudo de novos solventes de extração, dentre eles, os ILs e dos MILs.

1.5 LÍQUIDOS IÔNICOS MAGNÉTICOS

Os ILs são conhecidos como sais orgânicos que possuem pontos de fusão menores ou iguais a 100 °C, e na maioria dos casos, são formados por um cátion orgânico e um ânion orgânico/inorgânico. Entre as propriedades únicas dos ILs podem ser incluídas a alta estabilidade térmica, pressão de vapor desprezível, além de viscosidades variadas, condutividade e miscibilidade em diferentes solventes. Outra propriedade muito importante é a possibilidade de modificação da estrutura do líquido iônico conforme estrutura química do(s) analito(s); desta forma, interações químicas mais efetivas entre a fase extratora (ILs) e o(s) analito(s) podem proporcionar extrações mais seletivas e eficientes [8, 10, 13].

Com o intuito de incorporar novas opções para métodos de extração aos já disponíveis, uma nova classe de solventes conhecidos como MILs tem sido apontada como promissora. Estratégias sintéticas pioneiras resultaram em MILs com o componente paramagnético no ânion. Em 2004, Hayashi *et al.* relataram pela primeira vez o comportamento paramagnético de tetracloroferrato de 1-butil-3-metilimidazólio (III), ([BMIM⁺][FeCl₄⁻]), mostrando a possibilidade de um IL convencional, agora com um metal incorporado em sua estrutura, responder quando submetido a um campo magnético de um ímã [15].

Atualmente, essa classe de compostos destaca-se pela versatilidade estrutural que pode ser obtida através de diferentes estratégias de síntese, viabilizando o desenvolvimento de novas técnicas miniaturizadas para extração de diferentes compostos, incluindo ácidos nucleicos [9, 11, 16-17]. Esses solventes com propriedades iônicas e magnéticas baseiam sua funcionalidade na incorporação de um componente paramagnético no ânion [18-43] (Figura 2) ou no cátion [20, 44-46] da estrutura do IL, geralmente, um íon de metal de transição ou de um lantanídeo. Outras possibilidades descritas na literatura podem ser observadas pela variação do tamanho das porções catiônicas, como descritos por Nacham *et al.* [47], que desenvolveram estratégias sintéticas para produzir MILs monocatômicos, dicatômicos e tricatômicos (Figura 3) .

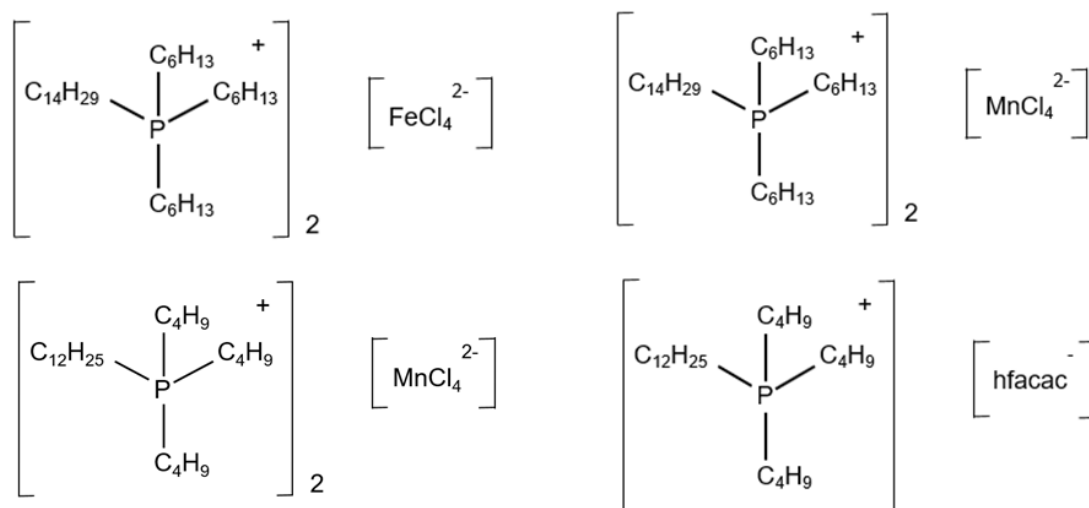


Figura 2. Estruturas químicas de líquidos iônicos magnéticos com o componente paramagnético no ânion.

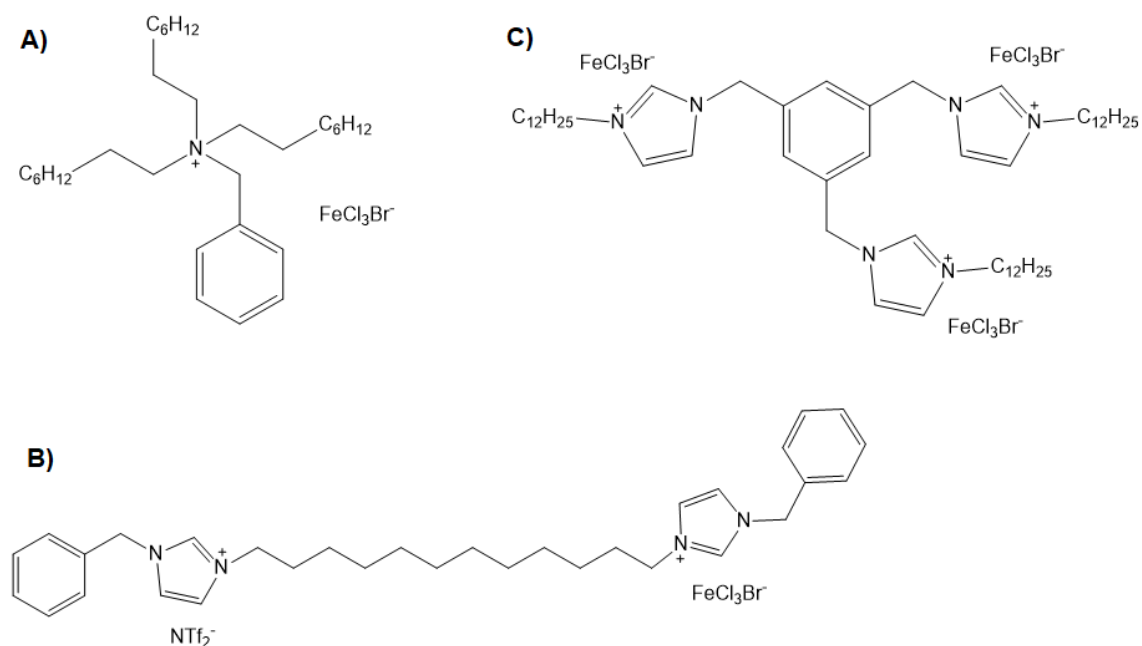


Figura 3. Estruturas químicas de MILs (a) monocatiônicas, (b) dicatiônicas e (c) tricatiônicas sintetizadas por Nacham *et al.* [47].

1.6 LÍQUIDOS IÔNICOS MAGNÉTICOS COMO FASE EXTRATORA

Os MILs são uma subclasse de ILs e exibem propriedades semelhantes aos ILs convencionais e, adicionalmente apresentam forte interação quando submetidos a um campo magnético externo [8]. Dentre algumas propriedades

compartilhadas, pode-se destacar viscosidade, densidade, estabilidade térmica, características hidrofóbicas e propriedades magnéticas.

A viscosidade e a densidade dos solventes de extração são propriedades importantes, principalmente quando são utilizadas técnicas de microextração. MILs de baixa viscosidade são preferidos para algumas técnicas de extração que envolvem pipetagem da fase líquida de extração; por outro lado, MILs mais viscosos podem ser projetados e preferidos para fases estacionárias de cromatografia gasosa. Geralmente, MILs contendo cátions compostos por longas cadeias de alquila podem resultar em compostos mais viscosos [48].

A estabilidade térmica é uma grande preocupação em diversas áreas, particularmente relacionada a fases extratoras em abordagens de preparação de amostras [49-50]. A estabilidade térmica satisfatória é obrigatória para obter resultados precisos e reprodutíveis. Portanto, uma avaliação cuidadosa das propriedades térmicas dos MILs geralmente é necessária para algumas aplicações específicas, uma vez que elas dependem das características estruturais de cada composto. De modo geral, os MILs apresentam boa estabilidade térmica à temperatura ambiente, fator que facilita a sua utilização sem o risco de alteração no seu estado físico. Outro ponto importante dos MILs é o caráter hidrofóbico que a sua estrutura pode lhe oferecer. Essa característica é de grande importância e permitiu sua aplicação em vários sistemas aquosos onde o MIL pode ser aplicado como um bom solvente de extração.

Como mencionado anteriormente, a utilização de MILs permitiu a proposta de uma configuração experimental mais estável para a técnica de SDME. Nesta configuração, a resposta magnética do solvente permite uma aderência eficiente em um magneto (ímã) o que proporciona uma grande estabilidade no momento da extração. A técnica se destaca pela simplicidade de operação, por não necessitar de etapas de centrifugação, e o uso de apenas alguns microlitros de solvente orgânico. Um esquema de extração utilizando SDME com um MIL sendo utilizado como solvente é mostrado na Figura 4.

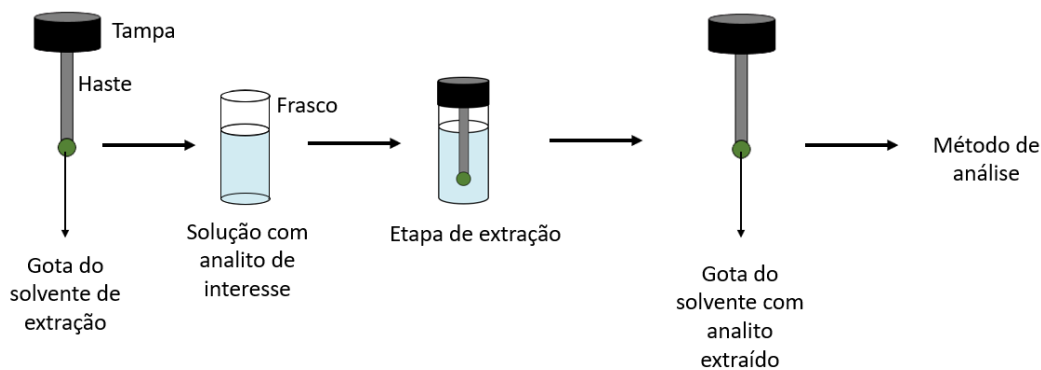


Figura 4. Esquema de um procedimento de extração utilizando SDME e MILs como fases extratoras.

A propriedade magnética é a diferença notável entre ILs e MILs e é representada pela forte resposta dos MILs quando submetidos a campos magnéticos. Essa característica tem sido amplamente explorada em técnicas de microextração para a determinação de um grande número de compostos de baixo peso molecular [45, 51-52] e biomoléculas como DNA [11, 53, 54].

1.7 APLICAÇÃO DE MILs NA EXTRAÇÃO DE DNA

MILs estão ganhando atenção como solventes alternativos para extrações de ácidos nucleicos. O desenvolvimento de protocolos analíticos usando esses compostos está evoluindo rapidamente, uma vez que demonstram inúmeras vantagens, incluindo abordagens rápidas, de baixo custo e ambientalmente corretas. O primeiro estudo descrevendo MILs hidrofóbicas como solventes para extração de DNA utilizando gotículas dispersivas (DDE) e SDME foi proposto por Clark *et al.* em 2015 [3]. Após este estudo, o desenvolvimento de metodologias de extração baseadas em MILs para análise de ácidos nucleicos teve uma evolução bastante significativa, particularmente relacionado a técnicas de microextração (Quadro 1).

Um avanço significativo em relação à extração e amplificação de ácidos nucleicos baseados em MIL foi relatado por Emaus *et al.* em 2018 [11]. Nesse caso, os autores projetaram um tampão capaz de ser acoplado a técnicas bioanalíticas, como qPCR, sem ter impacto significativo na reação de

amplificação. Neste estudo, DLLME e microextração de gota única assistida por surfactante (SA-SDME) foram examinados. O MIL $[P_{6,6,6,14^+}][Ni(hfacac)_3^-]$ apresentou os melhores resultados permitindo uma incorporação direta no tampão de reação para análise de qPCR e apresentou um tempo de extração de apenas 2 min.

Em 2019, Bowers *et al.* exploraram o uso de DLLME e *in situ*-DLLME para a extração e determinação indireta de DNA de fita dupla (dsDNA) [53]. Neste estudo, *in situ* DLLME foi realizado com MILs hidrofílicas adicionadas a uma solução aquosa contendo DNA e 300 μ L de dimetilformamida como solvente dispersivo. Após um período de 10 s sob vórtex, $[Li^+][NTf_2^-]$ foi adicionado para promover uma reação de metátese, e então agitado por mais 3 min para formar a MIL hidrofóbica. Em relação ao procedimento DLLME convencional, uma MIL hidrofóbica baseada em $[NTf_2^-]$ foi misturada com 300 μ L de dimetilformamida como solvente dispersivo e a mistura foi adicionada à amostra. O MIL-DLLME *in situ* exibiu eficiência de extração de 1,1 a 1,5 vezes maior em comparação com o MIL-DLLME tradicional.

MILs também foram investigados para a extração de DNA tumoral circulante (ctDNA) para superar algumas limitações específicas dos métodos convencionais de extração [55-58]. Recentemente, os MILs $[N_{8,8,8,Bz^+}][Ni(hfacac)_3^-]$, $[P_{6,6,6,14^+}][Ni(hfacac)_3^-]$, e $[P_{6,6,6,14^+}][Ni(Phtfacac)_3^-]$ foram avaliados como solventes de extração em DLLME [55]. Nesse caso, um tampão de qPCR foi personalizado para amplificar simultaneamente os genes *KRAS*, G12S *KRAS* e *BRAF*. O procedimento de extração envolveu um volume otimizado de MIL que foi disperso na solução da amostra; após isso, gotículas de MIL enriquecidas com DNA foram recuperadas com um ímã. Finalmente, o MIL foi lavada e 0,3 μ L foi submetido à qPCR para análise. Os MILs demonstraram uma pré-concentração superior de ctDNA em comparação com os kits comerciais, permitindo fatores de enriquecimento mais altos e empregados com sucesso em amostras de plasma aquoso e humano.

Outra abordagem de DLLME investigada para isolar ctDNA foi baseada em sondas oligonucleotídicas marcadas com íons (ITO-MIL) e oligonucleotídeos marcados com íons dissubstituídos (DTO-MIL) [59,56-58, 60]. As sondas ITOs e DTOs podem hibridizar sequências de DNA específicas para captura subsequente pelo MIL hidrofóbico. A formação de ITO pode ser

realizada através de reações com tiol-eno quando marcadores de íons à base de imidazólio são anexados a oligonucleotídeos, assim, extrações seletivas com alta eficiência podem ser alcançadas [59, 61]. Emaus *et al.*, 2022, desenvolveram uma abordagem ITO-MIL usando os MILs $[P_{6,6,6,14^+}][Mn(hfacac)_3^-]$, $[N_{8,8,8,Bz^+}][Mn(hfacac)_3^-]$ e $[N_{8,8,8,Bz^+}][Mn(hfacac)_2(Phtfacac)^-]$ para a extração de DNA de plasma diluído [58]. Resumidamente, uma mistura do modelo de *KRAS* alvo foi primeiramente ligada ao ITO por aquecimento a 90°C por 2 min, seguido de resfriamento a 30 °C por 8 min. Certo volume de MIL foi disperso na mistura previamente preparada. Em seguida, as gotículas de MIL foram coletadas por uma haste magnética e lavadas com água deionizada antes da análise por qPCR. Usando esta abordagem, fatores de enriquecimento mais elevados e seletividade de extração superior aos obtidos por um procedimento baseado em esferas magnéticas foram alcançados. A técnica ITO-MIL também foi proposta com sucesso para a extração da mutação *BRAF* V600E em diferentes matrizes [57].

Recentemente, uma série de MILs foi avaliada como fases de extração para a lise e extração de DNA de glóbulos brancos (GB) [62]. Resumidamente, o MIL foi adicionado em 50 µL de amostra de sangue, agitado em vórtex por 1 min e coletado com uma haste magnética. Após a lavagem, 0,3 µL de MIL enriquecido com DNA foi conduzido para qPCR para amplificação e detecção. MILs mostraram a capacidade efetuar a lise e extrair DNA de sangue total e sangue diluído. O método reduziu significativamente o tempo de análise em comparação com os kits comerciais de colunas sem inibir a amplificação por PCR. No entanto, os kits comerciais exibiram desempenho superior na extração de DNA de amostras de sangue.

MILs	Matriz / Amostra	Analito	Método Extração	Tempo de extração	Volumes	Instrumentação	Ref. / Ano
$[(C_{16}BnIM)_2C_{12}^{2+}][NTf_2^-]$, $FeCl_3Br^-$ $[(C_8)_3BnN^+][FeCl_3Br^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][FeCl_4^-]$	Solução aquosa com lisado celular bacteriano	<i>ss-DNA</i> , <i>ds-DNA</i> , <i>pDNA</i>	DDE e SDME	3 min e 90 min.	20 μ L MIL 2 mL de solução	HPLC-DAD	[3] 2015
$[P_{6,6,6,14}^+][FeCl_4^-]$ $[(C_8)_3BnN^+][FeCl_3Br^-]$	Solução aquosa com lisado celular bacteriano	<i>pDNA</i>	DDE	1 min.	1 μ L de MIL	PCR e Eletroforese	[63] 2015
$[P_{6,6,6,14}^+][Co(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Ni(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Mn(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Dy(hfacac)_4^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Nd(hfacac)_4^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Gd(hfacac)_4^-]$	Suspensão de células de bactérias.	<i>pDNA</i>	DLLME	Vórtex 30 seg. Etapa de lavagem Vórtex 120 seg.	15 μ L de MIL 2 mL de amostra	PCR, Eletroforese e qPCR	[16] 2017
$[P_{6,6,6,14}^+][Ni(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Co(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Mn(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14}^+][Dy(hfacac)_4^-]$	Solução aquosa enriquecida com DNA.	<i>ssDNA</i> , <i>dsDNA</i> (<i>KRAS</i>)	SDME e DLLME	20 min e 2 min.	6 μ L de MIL 2 mL de amostra	PCR, Eletroforese e qPCR	[11] 2018
$[P_{6,6,6,14}^+][Co(hfacac)_3^-]$, $[P_{6,6,6,14}^+][Ni(hfacac)_3^-]$	Solução aquosa com lisado celular bacteriano	<i>ss-DNA</i>	ITO-MIL	1 min (extração) 30 min (dessorção)	1 μ L de MIL 50 μ L de solução	qPCR	[64]
A = $[X(BIm)_4^{2+}]_2[Cl^-]$ X = (Ni, Mn, Co) B = $[Ni(BnIm)_4^{2+}]_2[Cl^-]$ C = $[X(BIm)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$ X = (Ni, Mn, Co) d = $[Ni(BnIm)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$ $[Mn(OIm)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$ f = $[P_{66614}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$	Solução aquosa enriquecida com DNA.	<i>dsDNA</i>	<i>in situ</i> DLLME	3 min.	21 μ L de MIL 2 mL de solução	HPLC-DAD	[53] 2019
$[P_{6,6,6,14}^+][Mn(hfacac)_3^-]$	Solução enriquecida com DNA de plantas	Extração de DNA genômico de plantas.	[AOIM+]-ITO-MIL	20 min e 10 min.	169 pmol de MIL 50 μ L de solução	qPCR	[61] 2019
$[P_{66614}^+][Co(hfacac)_3^-]$ $[P_{66614}^+][Ni(hfacac)_3^-]$ $[P_{66614}^+][Mn(hfacac)_3^-]$ $[P_{66614}^+][Dy(hfacac)_3^-]$ $[P_{66614}^+][Gd(hfacac)_3^-]$ $[P_{66614}^+][Nd(hfacac)_3^-]$	Leite artificialmente enriquecido: com DNA de bactérias.	<i>DNA</i>	DLLME	Vórtex 60 seg. Etapa de lavagem Vórtex 120 seg.	15 μ L de MIL 1 mL de solução	PCR, Eletroforese e NALFIA	[65] 2019

MILs	Matriz / Amostra	Analito	Método Extração	Tempo de extração	Volumes	Instrumentação	Ref. / Ano
[P _{6,6,6,14} ⁺] [Co(hfacac) ₃ ⁻] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Ni(hfacac) ₃] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Mn(hfacac) ₃]	Solução enriquecida com DNA de plantas	Extração de DNA genômico de plantas.	DLLME	60 seg.	6 µL de MIL 500 µL de amostra	PCR, Eletroforese e qPCR	[66] 2019
[P _{6,6,6,14} ⁺] [Mn(hfacac) ₃ ⁻] [N _{8,8,8,Bz} ⁺] [Mn(hfacac) ₃] [N _{8,8,8,Bz} ⁺] [Mn(hfacac) ₂ (Phtfacac) ⁻]	Plasma	<i>cfDNA</i>	ITO-MIL-DLLME	3 min.	8 µL de MIL 1 mL de amostra	qPCR	[58] 2019
[P ₆₆₆₁₄ ⁺] [Mn(hfacac) ₃ ⁻], [P ₆₆₆₁₄ ⁺] [Mn(PhCF ₃ acac) ₃ ⁻]	Lisado de células de bactérias, enriquecido com DNA alvo	DNA	ITO-MIL	10 min extração 10 min dessorção	1 µL MIL 50 µL amostra	qPCR	[59] 2019
[N _{8,8,8,Bz} ⁺] [Ni(hfacac) ₃] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Ni(hfacac) ₃] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Ni(Phtfacac) ₃]	Plasma	DNA	MIL-DLLME	3 min.	8 µL de MIL	multiplex-qPCR	[55] 2020
[P _{6,6,6,14} ⁺] [Mn(hfacac) ₃] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Mn(Phtfacac) ₃] [N _{8,8,8,Bz} ⁺] [Mn(hfacac) ₃] [N _{8,8,8,Bz} ⁺] [Mn(hfacac) ₂ (Phtfacac) ⁻]	Soro fisiológico, plasma diluído e sangue diluído.	DNA	ITO / DTO-MIL	10 min.	8 µL de MIL	qPCR	[56] 2020
[P _{6,6,6,14} ⁺] [Ni(hfacac) ₃] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Co(hfacac) ₃] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Dy(hfacac) ₄] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Gd(hfacac) ₄] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Ni(Phtfacac) ₃] [P _{6,6,6,14} ⁺] [Ni(tfacac) ₃] [N _{8,8,8,Bz} ⁺] [Ni(hfacac) ₃] [OMIM ⁺] [Ni(hfacac) ₃] [C ₁₄ MIM ⁺] [Ni(hfacac) ₃]	Sangue diluído	DNA	MIL-DLLME	1 min.	2 µL de MIL 50 µL de amostra	qPCR	[67] 2020
[P _{6,6,6,14} ⁺] [Mn(hfacac) ₃] [N _{8,8,8,Bz} ⁺] [Mn(hfacac) ₃]	Sangue e urina artificial	DNA (<i>BRAF</i> , <i>V600E</i>)	ITO-MIL	10 min.	8 µL de MIL	qPCR	[57] 2021

Quadro 1. Aplicação de MILs na extração de DNA.

1.7 JUSTIFICATIVA

Devido às características dos MILs, frente a sua múltipla capacidade de solvatação e, paralelamente, em preservar a integridade do DNA na presença de nucleases, recentemente alguns estudos têm descrito a extração de DNA, associados com técnicas de microextração, como a DLLME e SDME, e a presença de MILs como solventes de extração.

Entretanto, os estudos na literatura realizam extrações únicas, o que transforma o método para mais lento e de difícil aplicação em larga escala. Adicionalmente, alguns estudos apresentam extrações a partir de amostras de solução aquosa sem interferentes, de amostras biológicas diluídas ou simuladas.

Desta forma, neste estudo foi proposto a utilização da técnica de extração SDME com a utilização de três diferentes MILs para a extração de DNA de amostras aquosas. Essa técnica utiliza auxílio de magnetos (um imã) em forma de haste, de forma que gera uma maior estabilidade da gota do solvente de extração evitando, assim, que ocorra perda de solvente no processo de extração. A técnica foi proposta para extrair DNA de amostras complexas frescas, como saliva, sangue total e urina.

Outro ponto de destaque desta metodologia proposta é o desenvolvimento de uma plataforma de extração que possibilita a realização de extrações múltiplas sob as mesmas condições. Desta forma, amostras podem ser extraídas simultaneamente, tendo em vista que essa estratégia aumenta significativamente a frequência analítica do procedimento de extração.

Por fim, cabe salientar que a metodologia proposta utiliza volume reduzido de MILs por extração, fato importante que aponta essa técnica como favorável aos princípios de química verde, quando comparado aos métodos tradicionais que necessitam de elevados volumes de solventes. E, devido à forte resposta dos MILs frente a um campo magnético (magneto), esses solventes permanecem fixos no magneto e são imersos nas amostras para a realização das extrações. Após a extração do DNA, os magnetos são recolhidos e imersos em um tampão devidamente avaliado para posterior análise por PCR/eletroforese.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver uma metodologia alternativa para a extração de DNA baseada em microextração com a aplicação de líquidos iônicos magnéticos.

2.1 ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar MILs;
- Testar a metodologia de extração;
- Aplicar a metodologia em amostras complexas.

3. METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DOS MILs

3.1.1 Reagentes

Na etapa de síntese dos MILs foram utilizados metanol e etanol (99,9%) grau LC/MS da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), cloreto de cobalto(II) hexahidratado (99,9%), cloreto de trihexil(tetradecil)fosfônio (97,7%), 1,1,1,5,5,5-hexafluoroacetilacetona (99%) e hidróxido de amônio (30%) da marca Sigma Aldrich (Missouri, EUA). Cloreto de níquel(II) hexahidratado (99%) e cloreto de manganês(II) tetrahidratado (99,9%) da empresa Êxodo Científica (Brasil).

3.1.2 Procedimento sintético

O procedimento de síntese foi realizado no Laboratório Central Analítica e no 301 de Química, ambos no prédio 1 da UFCSPA. Foram sintetizados três MILs hidrofóbicos de baixa viscosidade, seguindo a proposta de Pierson e colaboradores [18]. A estratégia de síntese (figura 5) ocorreu,

inicialmente, pela síntese dos ânions à base de hexafluoroacetilacetato (hfacac) contendo metais de transição incluindo Co(II), Ni(II) ou de Mn(II) e, em uma segunda etapa, o emparelhamento do cátion trihexil(tetradecil)fosfônio ($[P_{6,6,6,14}^+]$) com o ânion correspondente, formando assim o MIL.

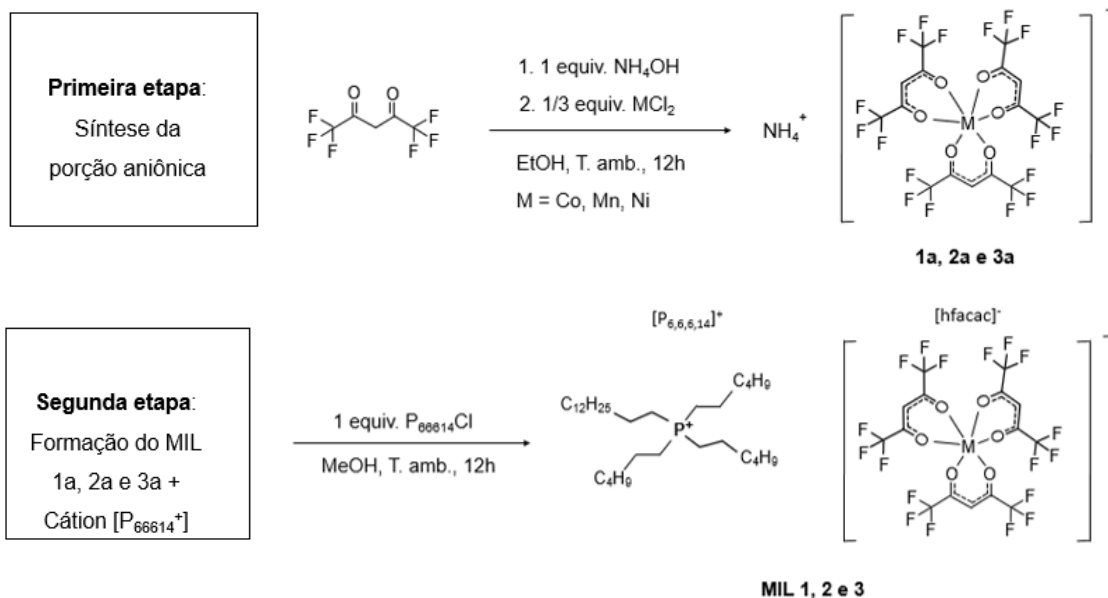


Figura 5. Rota de síntese dos MILs à base de Cobalto, Manganês e Níquel.

O procedimento sintético envolveu a mistura de 10 mmol de hidróxido de amônio, 10 mmol de hfacac com 3,3 mmol do metal correspondente (cloreto de cobalto(II) hexahidratado, cloreto de níquel(II) ou cloreto de manganês(II) tetrahidratado), em etanol, à temperatura ambiente, por 12 h.

Em seguida, o sal de hfacac de metal de amônio foi adicionado a 1 mmol do sal de cloreto de fosfônio purificado e dissolvido em metanol (à temperatura ambiente, por 12 h). Finalmente, após algumas etapas de lavagem com éter dietílico e evaporação do solvente, os MILs de ($[P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-]$), ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$) e ($[P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-]$) foram obtidos.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MILs

Após a síntese dos MILs a caracterização foi realizada por um espectrômetro de massas micrOTOF-Q™ III (Bruker Corporation, Alemanha) e os dados foram processados utilizando o software Data Analysis e HyStar™. Foi realizada injeção direta dos MILs (concentração de 1,0 ng/mL) diluído em

acetonitrila grau LC/MS da marca Merck (Darmstadt, Alemanha). As análises foram realizadas com ionização por ESI e os parâmetros como modo de ionização, temperatura, fluxo de gases, energia de colisão e energia do capilar já haviam sido previamente estabelecidos para os compostos estudados.

Sendo assim, o espectrômetro de massas foi operado com os seguintes parâmetros otimizados: no modo de ionização positivo; a energia do capilar, 5500 V; temperatura de secagem, 250° C; fluxo de gás de nebulização, 3.0 bar; fluxo de gás de secagem, 9,0 L/min; tempo de transferência iônica, 35 μ s; energia de fragmentação 0 eV; e intervalo de massa monitorado, m/z 50 – 500, adquirido com uma frequência de aquisição de 1 Hz.

E no modo de ionização negativo; a energia do capilar, 4500 V; temperatura de secagem, 200° C; fluxo de gás de nebulização, 3.0 bar; fluxo de gás de secagem, 8,0 L/min; tempo de transferência iônica, 120 μ s; energia de fragmentação 0 eV; e intervalo de massa monitorado, m/z 50 – 800, adquirido com uma frequência de aquisição de 1 Hz.

3.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

3.3.1 Adaptação do sistema de extração

Neste projeto, a técnica de extração envolvendo SDME foi utilizada. Entretanto, uma pequena adaptação foi realizada nos septos dos frascos para permitir uma configuração estável. Desta forma, foram utilizados frascos (volume de 2,0 mL) com tampa de polipropileno e septos de silicone nos quais pequenos magnetos foram inseridos. Na Figura 6, ilustra-se a adaptação realizada neste estudo, com a utilização do magneto através do septo da tampa de um frasco.

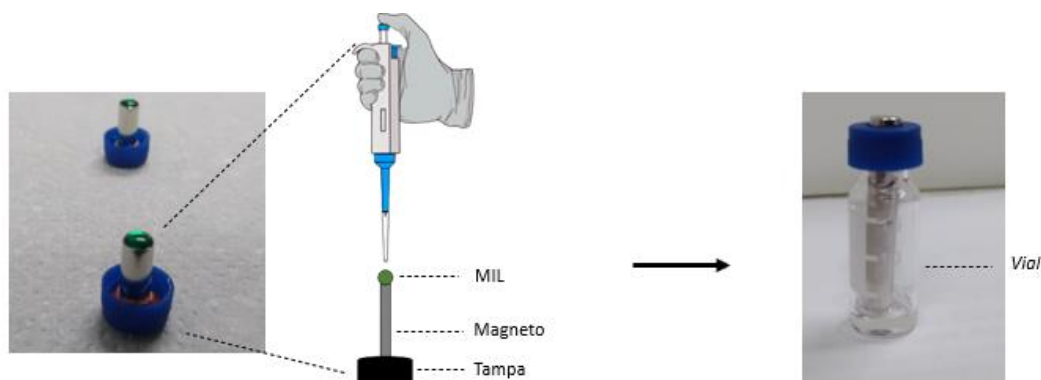


Figura 6. Esquema utilizado para a adaptação para o uso de magnetos.

3.3.2 Plataforma de Extração

Através da adaptação realizada na tampa dos frascos, também foi desenvolvida uma plataforma de extração para comportar múltiplas extrações de forma simultânea, sob agitação constante. Assim, foi utilizado um agitador Orbital Shaker – AG-200 (Comecta) com os frascos acomodados em uma bandeja (Figura 7).



Figura 7. Plataforma de extração desenvolvida para este estudo.

3.3.3 Técnica de Extração SDME-MIL

A microextração em gota única foi a técnica de extração escolhida utilizando os MILs como solvente de extração no processo. A SDME geralmente compreende duas etapas: a de extração e de dessorção. Na figura 8, é apresentado um esquema exemplificando as diferentes etapas do método, assim como, a ordem dos processos executados.

Primeiramente, um pequeno volume de MIL foi colocado na extremidade dos magnetos já adaptados aos frascos. Após isso os magnetos contendo a fase extratora foram mergulhados na solução contendo o DNA para a etapa de extração/captura. Nesta etapa, o sistema foi colocado sob agitação constante e uma série de amostras pode ser analisada simultaneamente. Após um determinado tempo, o sistema de agitação foi desligado e os magnetos contendo os MILs enriquecidos com o DNA capturado foram colocados em um tampão (Tris-HCl, pH 8) para a etapa de dessorção do DNA. Por fim, este tampão foi conduzido para a PCR convencional e, os produtos da amplificação foram avaliados por eletroforese em gel.

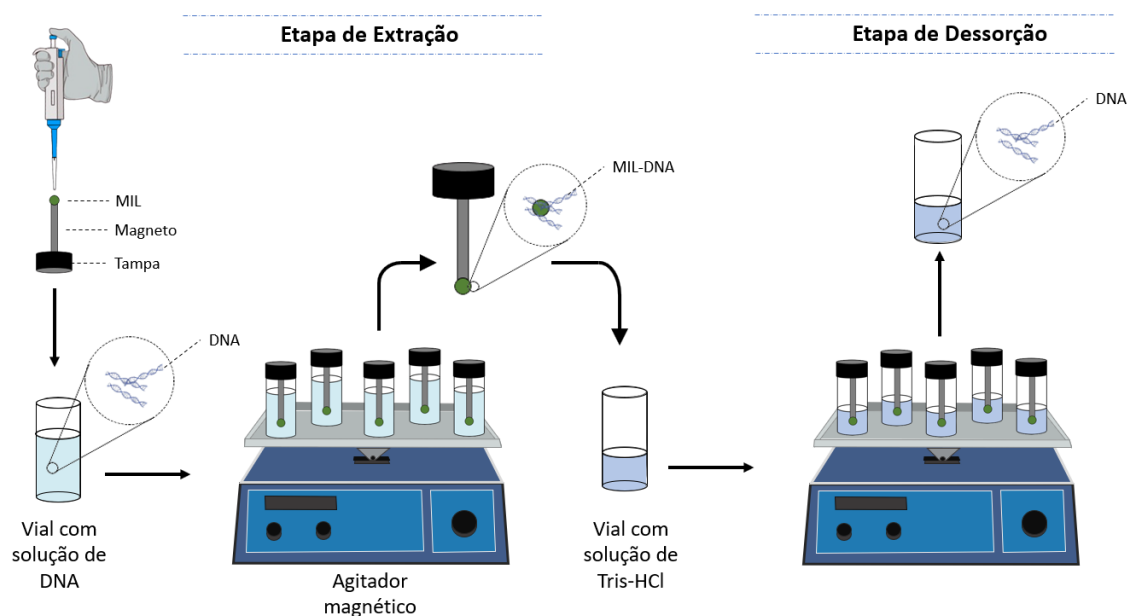


Figura 8. Esquema da técnica de SDME utilizando MILs como extrator.

Ao longo deste estudo, algumas alterações foram realizadas nas condições de extração/dessorção, para uma melhor resposta da metodologia, de acordo com os experimentos realizados (Tabela 1).

Tabela 1. Alterações nas condições de extração ao longo do trabalho.

Etapa	Condições	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
Extração	Solução	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8	MiliQ -	MiliQ -	MiliQ -	MiliQ -	MiliQ -	MiliQ -
	Volume MIL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
	Tempo	6 µL	10 µL	6,5 µL	6,5 µL	6,5 µL	6,5 µL	6,5 µL	6,5 µL
	Agitação	30 min	50 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
		200 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm
Dessorção	Solução	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8	Tris HCl pH 8
	Tempo	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
	Agitação	1 min	20 min	20 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
		n	70 rpm	70 rpm	70 rpm	70 rpm	70 rpm	70 rpm	70 rpm

As condições de extração/dessorção consideradas ideais foram:

a) na etapa de extração: tempo de extração de 30 minutos, sob agitação de 200 rpm, volume de MIL de 6,5 µL (como solvente de extração) e 1,5 mL de amostra (inicialmente água ultrapurificada e, posteriormente urina, sangue ou saliva).

b) na etapa de dessorção: após realizar a etapa de extração se retirou a tampa do frasco com magneto e se transferiu para o frasco com a solução de

dessorção. Essa etapa foi realizada com o tempo de 10 minutos, com agitação de 70 rpm e, com solução de Tris-HCl de pH 8,0 e volume de 200 μ L.

3.4 AMOSTRAS E PREPARO

3.4.1 Soluções

Nos primeiros experimentos foi utilizada como amostra água ultrapurificada em sistema Milli-Q® (com resistividade de 18,2 M Ω cm a 25 °C), marca Millipore (Massachusetts, USA), fortificada com DNA nas concentrações entre 50,0 ng/mL e 15,0 μ g/mL. O DNA utilizado para fortificar as amostras foi obtido através de extração de sangue total por extração convencional (3.4.2).

Posteriormente, foi utilizado a extração de amostras complexas de saliva, sangue total e urina e/ou fortificadas (na concentração de 1 μ g/mL). As coletas foram realizadas em voluntários efetivamente participantes como autores deste estudo de acordo com o protocolo aprovado pelo CEP da UFCSPA (5.235.870).

3.4.2 Obtenção do DNA utilizado para os testes do sistema proposto

Para obtenção de DNA de sangue total fresco, foi utilizada a técnica de Lahiri e Nurberger, 1991, comumente utilizada no laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, traduzido e adaptado pela prof^a Vanessa S. Mattevi.

Inicialmente foram coletados 5 mL de sangue total em um tubo *vacutainer* contendo EDTA (EDTA 15%) e transferido para um tubo Falcon de 15 mL, com a adição de 5 mL de solução TKM1 (10mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2mM EDTA). Também foram adicionados 200 μ L de Nonidet P-40 e misturado por inversão várias vezes. Posteriormente foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Na sequência, foi retirado o sobrenadante e, o *pellet* lavado com 5 mL de TKM1 e centrifugado novamente (processo repetido por 3 vezes). O *pellet* foi ressuspenso em 800 μ L de solução TKM2 (10mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂ ; 2mM EDTA; 0,4M NaCl) e transferido para um *eppendorf* de 1,5 mL.

Foram adicionados 50 μL de SDS 10% e incubado por 20 minutos a 55 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foram adicionados 300 μL de NaCl 6 M e o tubo centrifugado em microcentrífuga (12.000 rpm) por 15 minutos.

O sobrenadante foi coletado e adicionado 2 volumes de etanol 100% à temperatura ambiente. Após, se inverte o tubo várias vezes até o DNA precipitar. Por fim, o DNA precipitado é removido com uma pipeta de Pasteur com gancho na ponta, e ressuspenso em 500 μL de TE.

3.5 ANÁLISES ENVOLVENDO QUBIT

Devido à rapidez e facilidade nas análises, primeiramente optou-se por avaliar a eficiência das extrações de DNA utilizando o fluorômetro Qubit. O aparelho QubitTM Fluorometer (Invitrogen), com o kit de ensaio Quant-iTTM dsDNA HS, foram utilizados para quantificação do DNA extraído de método convencional e nos primeiros ensaios de extração SDME-MIL de amostras de água fortificadas com DNA.

Os ensaios foram realizados de acordo com as especificações do manual do kit do equipamento. Inicialmente, uma solução de trabalho (ST) foi preparada contendo a sonda de DNA e o *buffer* fluorométrico em uma proporção de 10:200 (190 μL do *buffer* de fluorometria e 1 μL da sonda).

A solução de calibração foi preparada diariamente com dois pontos de leitura, com solução de calibração 1 e 2 (50 ng/mL e 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente), com 190 μL de ST e 10 μL do respectivo calibrante, totalizando 200 μL . Para a análise das extrações, foi utilizado 1 μL de amostra com 199 μL de ST, totalizando 200 μL . Todas as leituras foram realizadas em tubos transparentes de 0,5 mL de parede fina, específicos para leitura em QubitTM.

3.6 PCR CONVENCIONAL

3.6.1 Instrumentação

Foi utilizado um termociclador PCR 2720 (Applied Biosystems) para amplificação do *BRAF*. O Mesmo se encontra no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA localizado do Prédio 3 da Instituição.

3.6.2 Reagentes e padrões

Para realização da PCR, foi utilizado o kit Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). A escolha dos *primers forward* (CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGA) e *reverse* (C AGG GCC AAA AAT TTA ATC AGT GGA) para o gene *BRAF* se deu em virtude da pronta disponibilidade e por se tratar de um ensaio já testado no laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

3.6.3 Procedimento experimental

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA. Para amplificação do gene *BRAF* foi preparado um mix de 25 µL para cada amostra testada, contendo: 2,5 µL do *buffer* (1x), 1 µL MgCl₂ (2 mM), 0,2 µL dNTPs (200 µM), 1,25 µL de cada *primer* (0,5 µM), 0,2 µL da enzima *Taq* (1 U) e 17,6 µL de água ultrapura tipo I. Foi adicionado 1 µL da amostra ao mix. O termociclador foi programado da seguinte forma: temperatura inicial de 94°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 58°C por 30 s e polimerização a 72°C por 1 min.

3.6.4 Eletroforese

Para leitura dos resultados foi realizada uma eletroforese em TBE 1X. A cuba permaneceu ligada por 30 minutos a 80 V.

4. RESULTADOS

4.1 SÍNTESE DOS MILs

Os primeiros resultados obtidos correspondem, em ordem cronológica, à etapa de síntese. Três MILs foram obtidos: ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$), ($[P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-]$) e ($[P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-]$), observados na figura 9.



Figura 9: Primeiros MILs sintetizados neste estudo. Da esquerda para a direita ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$), ($[P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-]$) e ($[P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-]$).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MILs

Na etapa de caracterização foram obtidos os espectros de massa de cada porção correspondente dos MILs sintetizados, as porções aniônica e catiônica. A massa exata da porção aniônica $[Ni(II)(hfacac)_3^-]$ é de 679,84 g/mol (figura 10), fórmula estrutural $C_{15}H_3NiF_{18}O_6$, com ionização realizada em ESI⁻, sendo observado o m/z 678,7889 ($[M-H]^+$). A massa exata da porção catiônica $[P_{66614}^+]$ é de 483,85 g/mol (figura 11), com a fórmula estrutural $C_{32}H_{68}P^+$, com ionização realizada em ESI⁺, sendo observado o m/z 483,5546.

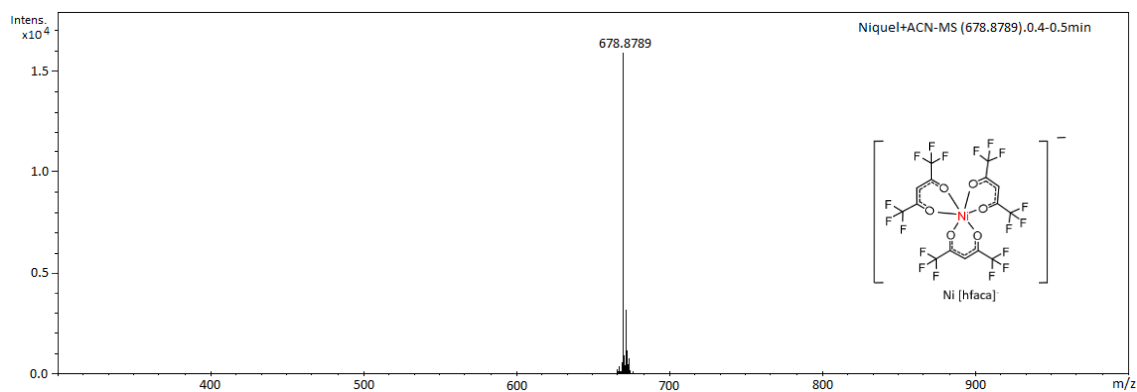


Figura 10. Espectro de massa da porção aniônica $[\text{Ni(II)(hfaca)}_3^-]$, 1,0 ng/mL.

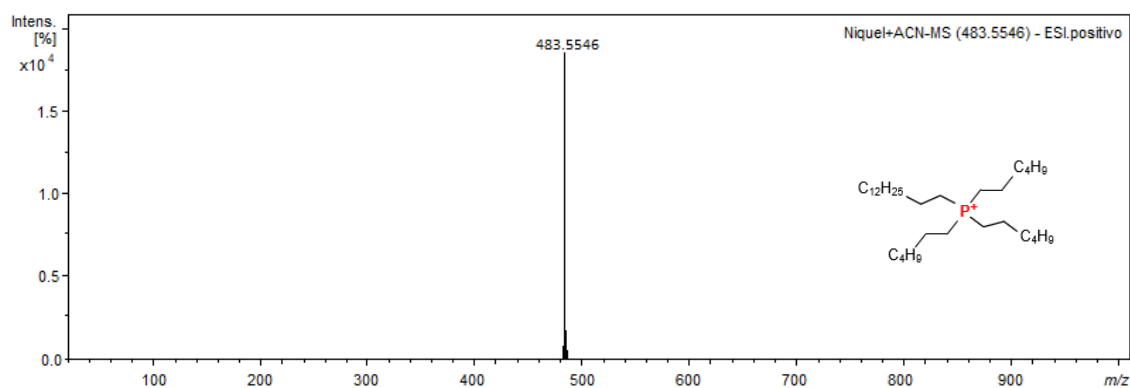


Figura 11. Espectro de massa da porção catiônica $[\text{P}_{66614}^+]$, 1,0 ng/mL.

A massa exata da porção aniônica $[\text{Mn(II)(hfaca)}_3^-]$ é de 676,08 g/mol (figura 12), fórmula estrutural $\text{C}_{15}\text{H}_3\text{MnF}_{18}\text{O}_6$, com ionização realizada em ESI^- , sendo observado o m/z 675,8548 ($[\text{M}-\text{H}]^+$). A massa exata da porção catiônica $[\text{P}_{66614}^+]$ é de 483,85 g/mol (figura 13), com a fórmula estrutural $\text{C}_{32}\text{H}_{68}\text{P}^+$, com ionização realizada em ESI^+ , sendo observado o m/z 483,5393.

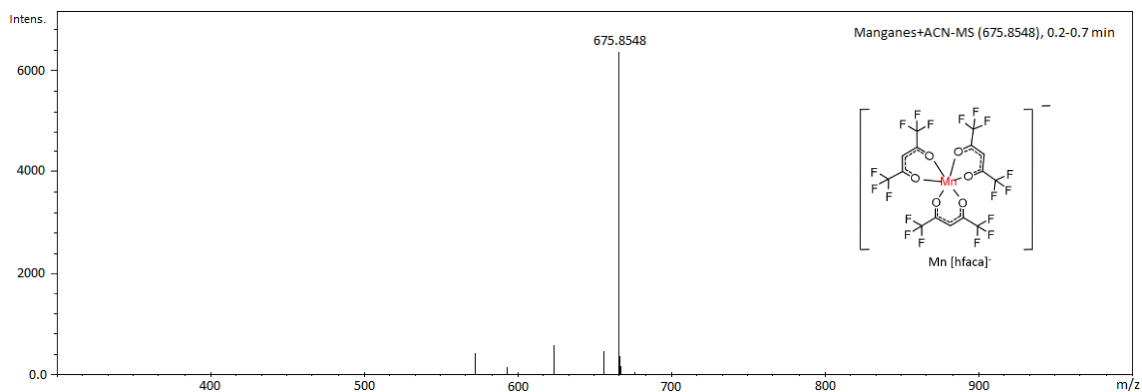


Figura 12. Espectro de massa da porção aniônica $[\text{Mn(II)(hfaca)}_3^-]$, 1,0 ng/mL.

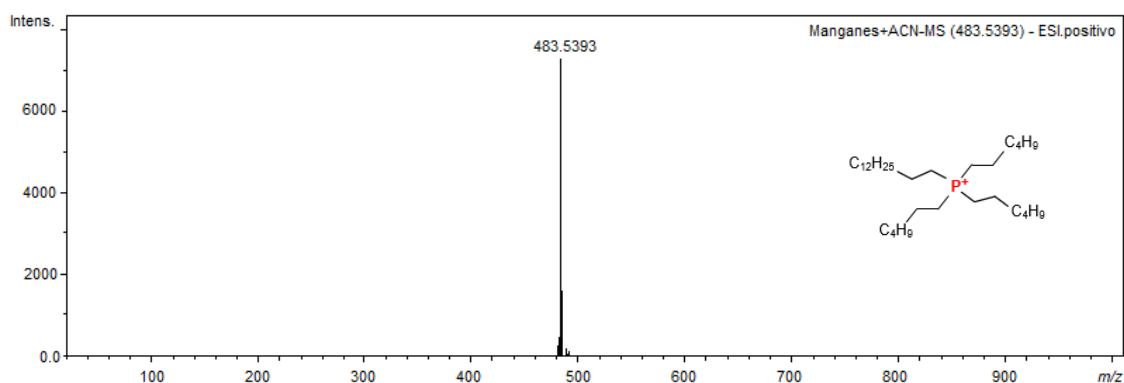


Figura 13. Espectro de massa da porção catiônica $[\text{P}_{66614}^+]$, 1,0 ng/mL.

Por fim, a massa exata da porção aniônica $[\text{Co(II)(hfaca)}_3^-]$ é de 680,08 g/mol (figura 14), fórmula estrutural $\text{C}_{15}\text{H}_3\text{CoF}_{18}\text{O}_6$, com ionização realizada em ESI^- , sendo observado o m/z 679.8604 ($[\text{M-H}]^+$). A massa exata da porção catiônica $[\text{P}_{66614}^+]$ é de 483,85 g/mol (figura 15), com a fórmula estrutural $\text{C}_{32}\text{H}_{68}\text{P}^+$, com ionização realizada em ESI^+ , sendo observado o m/z 483,5546.

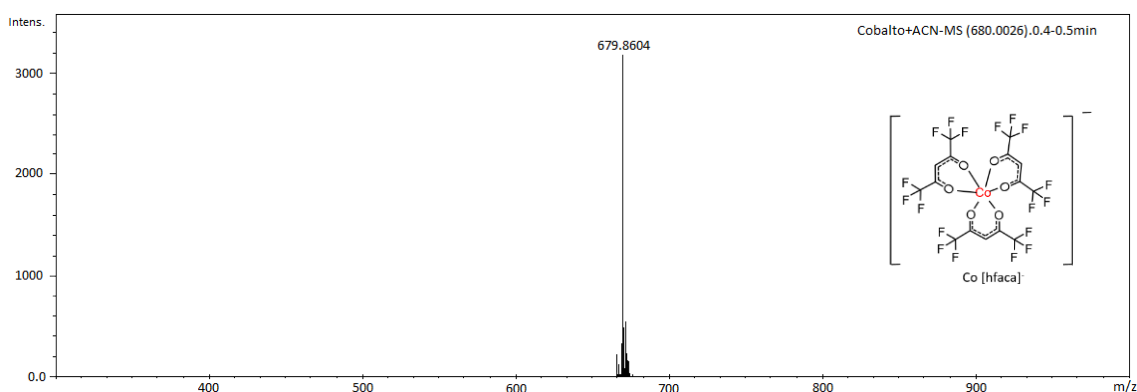


Figura 14. Espectro de massa da porção aniônica $[\text{Co(II)(hfaca)}_3^-]$, 1,0 ng/mL

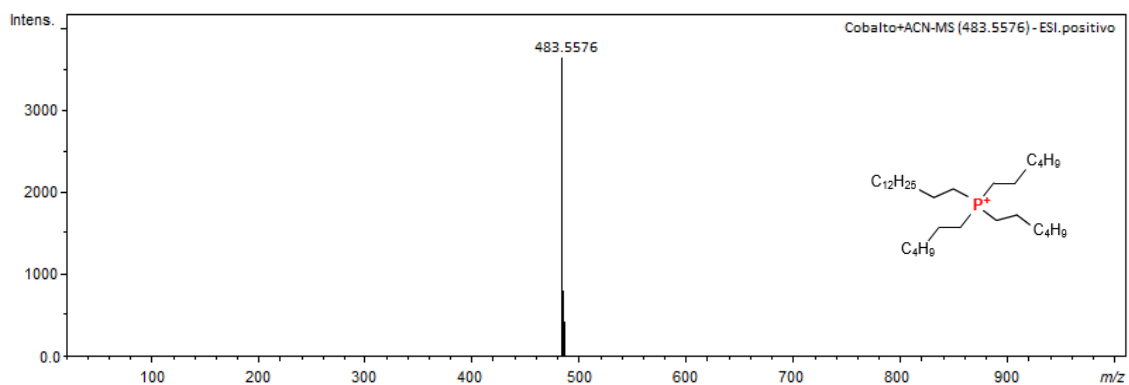


Figura 15. Espectro de massa da porção catiônica $[P_{66614}^+]$, 1,0 ng/mL.

Adicionalmente, algumas características foram observadas, como a cor correspondente a cada MIL (figura 16), seguindo a ordem, o MIL à base de níquel apresentou cor verde, o MIL contendo manganês apresentou cor marrom claro e, o MIL contendo cobalto mostrou-se laranja escuro. Na figura 16a se observa a presença da resposta magnética do MIL ($[P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-]$) aderido a um magneto após ser retirado de uma solução aquosa e, na figura 16b, os MILs ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$) e ($[P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-]$), também aderidos a um magneto, mas em solução aquosa e, neste caso, mostrando o seu caráter hidrofóbico.



Figura 16. (a) MIL à base de cobalto aderido em um magneto e, (b) MILs à base de níquel e manganês imersos em solução aquosa.

4.3 EXTRAÇÕES UTILIZANDO QUBIT

Na tabela 2, estão dispostos os primeiros resultados dos experimentos de extração em solução aquosa fortificada com DNA. Pode ser observado que foram obtidos resultados positivos apenas no experimento de número 2, para a duplicata utilizando o MIL contendo cobalto (50 ng/mL) e, no experimento de número 3, utilizando o MIL com manganês (50 e 100 ng/mL).

Tabela 2. Primeiros dados de extração com análise por Qubit.

MIL	Concentração (fortificado)	Experimento 1 Rendimento	Experimento 2 Rendimento	Experimento 3 Rendimento	Experimento 4 Rendimento
Cobalto	50 ng/mL	-	14,30%	-	-
Cobalto	50 ng/mL	-	26,60%	-	-
Cobalto	100 ng/mL	-	-	-	-
Cobalto	100 ng/mL	-	-	-	-
Manganês	50 ng/mL	-	-	13,90%	-
Manganês	50 ng/mL	-	-	16,30%	-
Manganês	100 ng/mL	-	-	8,70%	-
Manganês	100 ng/mL	-	-	-	-
Níquel	50 ng/mL	-	-	-	-
Níquel	50 ng/mL	-	-	-	-
Níquel	100 ng/mL	-	-	-	-
Níquel	100 ng/mL	-	-	-	-

Tendo em vista estes resultados, foram avaliadas concentrações maiores de DNA para verificar a viabilidade nas extrações. Na tabela 3, resultados de experimentos utilizando solução aquosa (água ultrapura) com maior concentração de DNA (500 ng/mL e 1,0 µg/mL). Neste caso, não foram obtidas respostas positivas para a extração/captura de DNA.

Tabela 3. Resultados de análise por Qubit com amostras mais concentradas.

MIL	Concentração (fortificado)	Experimento 5 Rendimento	Experimento 6 Rendimento
Cobalto	500 ng/mL	-	-
Cobalto	500 ng/mL	-	-
Cobalto	1 µg/mL	*	-
Cobalto	1 µg/mL	*	-
Manganês	500 ng/mL	-	-
Manganês	500 ng/mL	-	-
Manganês	1 µg/mL	*	-
Manganês	1 µg/mL	*	-
Níquel	500 ng/mL	-	-
Níquel	500 ng/mL	-	-
Níquel	1 µg/mL	*	-
Níquel	1 µg/mL	*	-

Após alguns ajustes na metodologia, foram novamente testadas extrações. Na tabela 4, resultado de extrações utilizando água ultrapura fortificada com 50 ng/mL de DNA como solução de extração.

Tabela 4. Resultados de análise por Qubit com método ajustado.

MIL	Concentração (fortificado)	Experimento 7 Rendimento	Experimento 8 Rendimento
Cobalto	50 ng/mL	37,30%	-
Cobalto	50 ng/mL	78,70%	8,00%
Manganês	50 ng/mL	20,00%	-
Manganês	50 ng/mL	-	-
Níquel	50 ng/mL	14,70%	-
Níquel	50 ng/mL	155,20%	20,00%

4.4 EXTRAÇÕES DE SOLUÇÃO FORTIFICADA - PCR

Após algumas dificuldades encontradas nas análises envolvendo Qubit, foram avaliadas extrações com análise por PCR. Na figura 17, o primeiro resultado qualitativo por PCR convencional sendo avaliado por eletroforese em gel de agarose para a amplificação do Gene *BRAF*, onde se utilizou o MIL ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$), e como amostra utilizou-se água ultrapura fortificada com DNA (230 pares de bases), em triplicata nas concentrações de 50 ng/mL (A) e 1,0 µg/mL (B).

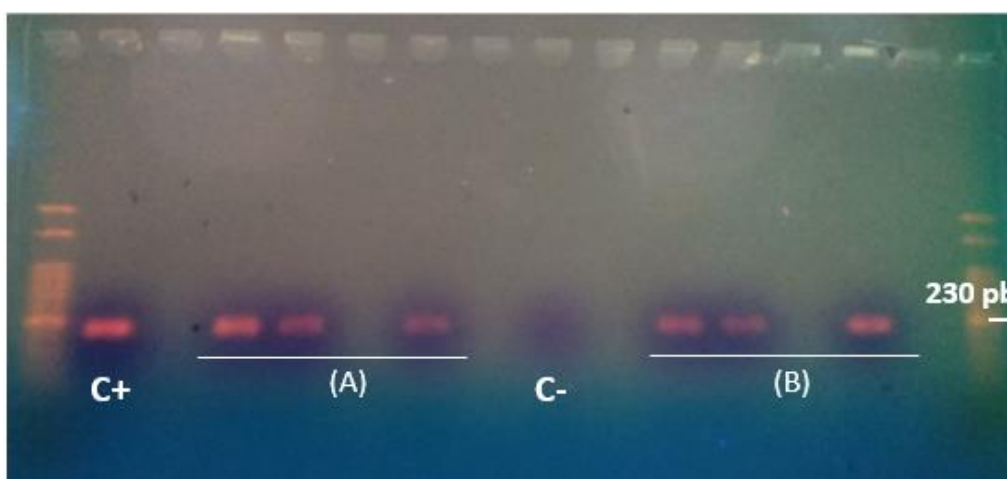


Figura 17. Resultados das extrações utilizando análise por PCR/Eletroforese. (C+ e C- correspondem aos controles positivos e negativos, e extração com MIL a base de Ni com amostras na concentração de (A) 50 ng/mL e (B) 1,0 µg/mL).

Posteriormente, utilizando-se também água ultrapurificada fortificada com DNA (230 pares de bases), foram feitas novas extrações em diferentes concentrações e MILs distintos (Figura 18). Novamente, resultado satisfatório para o MIL ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$) na concentração de 50 ng/mL (B). Além disso, resultado positivo também foi obtido para o MIL ($[P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-]$) para a duplicata da concentração de 100 ng/mL (A) e, para o MIL de ($[P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-]$) nas duplicatas das concentrações de 50 (C) e 250 ng/mL (D).

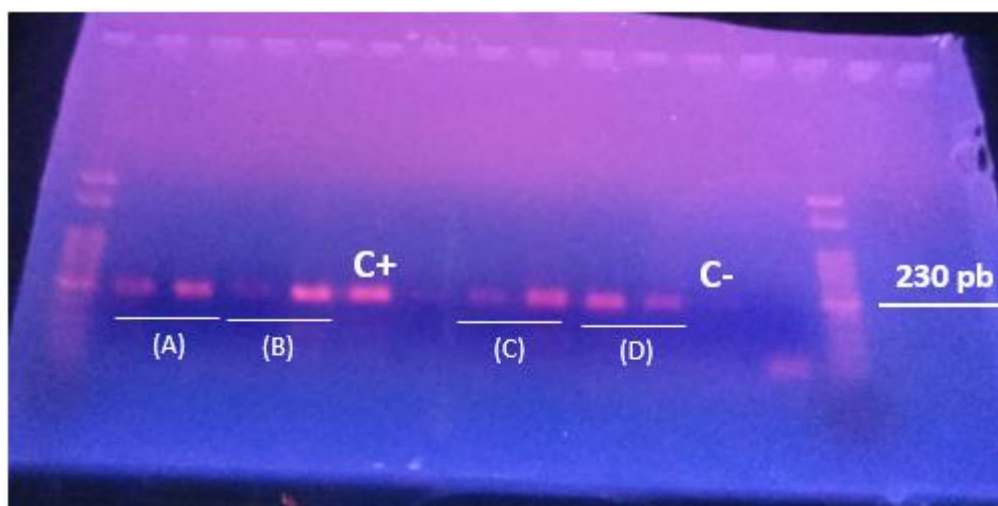


Figura 18. Resultados positivos nas extrações avaliadas em diferentes concentrações. (C+ e C- correspondem aos controles positivo e negativo, (A) extração com MIL à base de cobalto com amostras na concentração de 100 ng/mL, (B) extração com MIL à base de níquel com amostras na concentração de 50 ng/mL e, extração com MIL a base de manganês com amostras na concentração (C) de 50 e (D) e 250 ng/mL).

4.5 APLICAÇÃO EM MATRIZES COMPLEXAS

Na sequência, após os resultados positivos obtidos com a utilização de uma solução de extração composta por água ultrapura, foi realizado o teste da metodologia de extração SDME-MIL em amostras biológicas (Figura 19). Neste experimento foi utilizado o MIL ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$) como solvente de extração. Neste caso, as seguintes amostras foram avaliadas em triplicata: a) saliva, b) saliva fortificada com 1 μ g/mL de DNA, c) urina, d) urina fortificada com 1 μ g/mL de DNA, e) sangue total fresco e, f) sangue total fortificado com 1 μ g/mL de DNA.

A amostra de saliva fortificada apresentou resultado positivo para a triplicata e, a amostra de saliva (sem fortificação) mostrou resultado satisfatório para duas extrações. As amostras de urina, inclusive a fortificada, não apresentaram resultado satisfatório nesta avaliação. Além disso, a amostra de sangue fortificado apresentou duas extrações com resultados positivos, da mesma forma que o sangue fresco.

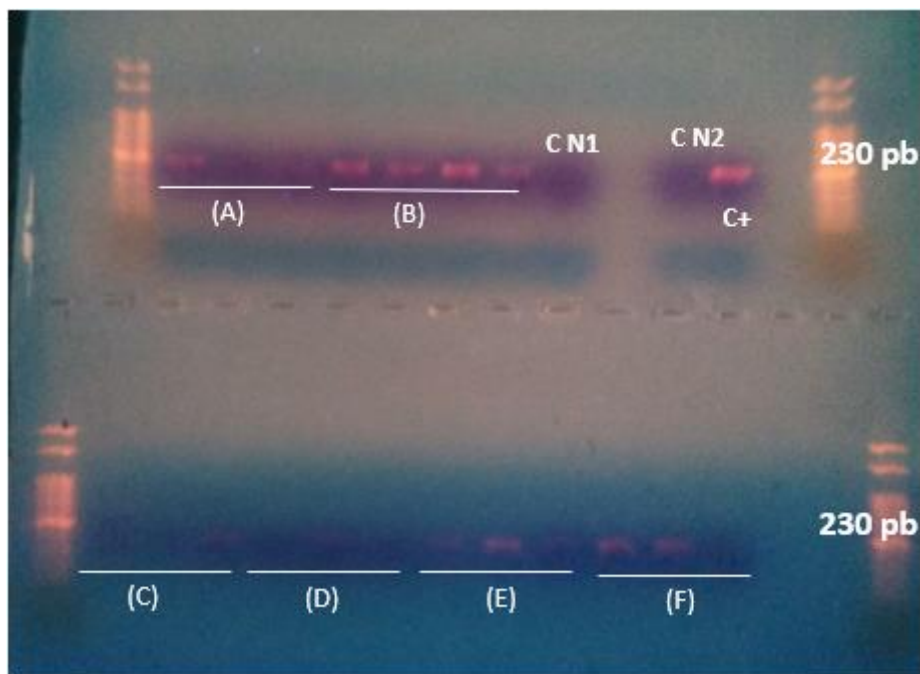


Figura 19. Resultados observados em amostras biológicas (CN1: controle negativo da SDME-MIL, CN2: controle negativo da PCR, C+: controle positivo e, amostras em triplicata de (A) saliva, (B) saliva fortificada com 1 $\mu\text{g/mL}$ de DNA, (C) urina, (D) urina fortificada com 1 $\mu\text{g/mL}$ de DNA, (E) sangue total fresco e, (F) sangue total fortificado com 1 $\mu\text{g/mL}$ de DNA.

5. DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MILS

Neste estudo, foram sintetizados MILs com estrutura à base do cátion $P_{6,6,6,14}^+$, emparelhados com o ânion $hfacac^-$ e com a incorporação dos componentes paramagnéticos níquel, manganês e cobalto, conforme descritos por Pierson e colaboradores em 2017. As estruturas foram confirmadas através de características observadas e confrontadas na literatura [18], como cor, aspecto e propriedade magnética. Além disso, resultados experimentais utilizando-se a espectrometria de massas permitiram a elucidação estrutural inequívoca da estrutura química dos MILs estudados.

Este é um equipamento híbrido com analisadores de massa sequenciais, composto por um sistema quadrupolo-tempo-de-vôo (*quadrupole-time-of-flight*, QTOF), configuração que favorece o ganho de seletividade do método e que é utilizado em espectrometria de massa alta resolução (*high resolution mass spectrometry*, HRMS), assim, possibilitando encontrar a massa exata de um composto em análise [12]. Desta forma, pode-se estabelecer que a síntese e caracterização dos MILs foram realizadas com sucesso.

5.2 TÉCNICA SDME-MIL NA EXTRAÇÃO DE DNA

Neste trabalho foi proposto a utilização dos MILs ($[P_{6,6,6,14}^+][Mn(II)(hfacac)_3^-]$), ($[P_{6,6,6,14}^+][Ni(II)(hfacac)_3^-]$) e ($[P_{6,6,6,14}^+][Co(II)(hfacac)_3^-]$) como solvente de extração na técnica SDME, para extrair DNA de solução aquosa fortificada e de amostras biológicas, consideradas de grande complexidade, tais como, saliva, sangue e urina.

A SDME-MIL, em comparação aos métodos tradicionais que utilizam solventes orgânicos (fenol/clorofórmio, por exemplo), como solvente de extração, apresenta grandes vantagens especialmente por necessitar de baixos volumes de solvente de extração. Além disso, não necessita de várias etapas de processamento da amostra e não requer o uso de centrifugação. Neste estudo, a metodologia empregada utilizou 6,5 μ L de solvente por extração realizada, mostrando-se ambientalmente amigável e, além disso,

necessitou de poucas etapas em sua aplicação, proporcionando uma metodologia rápida e prática. Outro fator importante, está relacionado ao baixo custo da técnica tendo como comparação metodologias que empregam SPE por exemplo.

Recentemente, alguns estudos vêm mostrando a capacidade de diferentes MILs de realizarem extrações de ácidos nucleicos em diferentes amostras e diferentes técnicas de extração. Os primeiros estudos datam 2015 e apresentaram a associação dos MILs com as técnicas DDE e SDE, e a sua capacidade de extração de DNA bacteriano de solução fortificada [3, 63], e com as técnicas DLLME e ITO-MIL [16, 59, 64]. Também são encontrados estudos na literatura que mostraram o uso de MILs na extração de DNA genômico de plantas com as técnicas ITO-MIL [61] e DLLME [66] e, de DNA bacteriano em amostras de leite fortificadas [65].

Posteriormente, Emaus *et al.* 2018 [11] utilizaram o modelo DLLME-MIL e SDME para extrair dsDNA de solução aquosa (sem interferentes) e enriquecida com DNA (gene *KRAS*). O método aplicou os MILs utilizados neste estudo $[P_{6,6,6,14}^+][Ni(hfacac)_3^-]$, $[P_{6,6,6,14}^+][Co(hfacac)_3^-]$, $[P_{6,6,6,14}^+][Mn(hfacac)_3^-]$, e o MIL de $[P_{6,6,6,14}^+][Dy(hfacac)_3^-]$. Neste estudo, foram utilizados os tempos de extração de 20 minutos (SDME) e 2 de minutos (DLLME) e volume de MIL de 6 μ L. Na proposta descrita nesta dissertação, o tempo de extração utilizado foi de 30 minutos o qual permitiu extrações satisfatórias. Tendo em vista que o estudo é basicamente qualitativo até o momento, salienta-se que podem ser utilizadas ferramentas quimiométricas para otimizar a extração em futuras investigações envolvendo PCR em tempo real.

De modo geral os métodos que utilizam MILs associados com a técnica de DLLME apresentam tempo menor para a etapa de extração, com a variação entre 30 segundos e 3 minutos [11, 16, 55, 58, 65], assim como, em alguns casos, a necessidade de uma etapa de lavagem [16, 65].

5.3 – NOVA ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO

Este estudo consiste na primeira proposta a associar o uso dos MILs como solventes para a microextração de DNA através de uma plataforma que permite múltiplas extrações. Outras metodologias usando MILs para extração

de DNA que foram recentemente publicadas se baseiam em extrações únicas, o que deixa o processo mais lento tendo em vista que o analista necessita realizar as extrações de uma amostra a cada vez [55-58, 67]. Este fato é de extrema importância, particularmente para laboratórios que necessitem realizar análises em larga escala.

A estratégia de análise apresenta a perspectiva de potencializar a aplicação do método para a análise simultânea de diversas amostras. Observou-se que até 48 frascos podem ser acomodados na plataforma proposta de modo que possam ser submetidos simultaneamente às extrações/dessorções. Além disso, essa configuração pode ser aprimorada de forma muito simples por meio da confecção de um modelo semiautomatizado que permita análises simultâneas. Um ponto que merece destaque é a possibilidade concreta do desenvolvimento de um sistema impresso em 3D que funcione como base para os magnetos.

Como pode ser observado, este projeto foi um primeiro passo para a obtenção de novas configurações que permitam a extração de DNA com alta frequência analítica. Neste sentido, enfatiza-se a ampla gama de aplicabilidades que surgem em inúmeras áreas. Em particular, podem ser consolidadas estratégias ambientalmente corretas e de menor custo para a extração/captura de ácidos nucleicos em diferentes matrizes.

5.4 – DIFICULDADES ENCONTRADAS EM ANÁLISES POR QUBIT

O estudo inicial com Qubit foi muito importante no início do trabalho pela rapidez na análise que o equipamento oferece, possibilitando a geração de grande volume de dados em pouco tempo. Contudo, as inconsistências dos dados e o calendário apertado (em função da pandemia) fez com que o percurso do trabalho seguisse com as análises confirmatórias e qualitativas por PCR/Eletroforese, para uma posterior continuidade e otimização com qPCR. Tais inconsistências foram observadas com a não reprodução dos dados frente a inúmeros testes. Assim, diversos pontos foram explorados com o intuito de tentar melhorar as respostas observadas.

As principais incertezas foram investigadas e relacionadas aos tempos de extração, volume de solvente extrator e concentração de DNA nas amostras estudadas. Em relação aos tempos de extração e de dessorção, observou-se que acima de 50 minutos e abaixo de 10 minutos, respectivamente, apresentavam ausência de resultado. Outra condição também observada foi o volume de MIL, onde se constatou que o volume de 6,5 μL seria ótimo para usar neste modelo de extração, pois volumes maiores não foram bem estabilizados na extremidade do magneto, o que fez que quantidades de MIL fossem perdidas em agitação e ficassem aderidas no frasco. Outra questão foi vista sobre as concentrações de amostras analisadas, diversas concentrações (de 50 ng/mL até 15 $\mu\text{g/mL}$) foram testadas, mas em nenhum momento se conseguiu reproduzir os poucos resultados positivos. Desta forma, tendo em vista essa falta de reprodutibilidade nas extrações, optou-se pelas análises envolvendo PCR convencional.

5.5 – ANÁLISES ENVOLVENDO PCR CONVENCIONAL

Os primeiros resultados obtidos com análise de PCR convencional foram promissores e foram reproduzidos pelos três MILs sintetizados neste trabalho. Primeiramente, os resultados foram obtidos para a extração de DNA em água ultrapurificada, sem interferentes, e em diferentes concentrações de fortificação. Este resultado qualitativo corrobora os dados observados na literatura [11, 53] da capacidade dos MILs de extraírem DNA de solução aquosa.

Após os resultados positivos observados em amostras sem a presença de interferentes, o método SDME-MIL foi testado em amostras biológicas complexas. Tal resultado foi muito importante, pois diferentemente de estudos publicados recentemente na literatura que realizaram extrações em amostras sem interferentes, ou em amostras biológicas artificiais ou diluídas, este método foi capaz de extrair DNA de amostras extremamente complexas como saliva e sangue total sem necessidade de preparo prévio destas amostras.

Curiosamente, as amostras de urina não apresentaram respostas satisfatórias para o fragmento de DNA analisado. Este fato pode ocorrer devido

à presença de alguns componentes nesta matriz que podem inibir a amplificação da PCR ou dificultar a interação do DNA com o MIL. De acordo com a literatura, a interação das MILs com o DNA é baseada principalmente em mecanismos eletrostáticos, portanto a presença de alto teor de sal pode ter influência nesse tipo de matriz.

Em geral, a estratégia experimental apresentou resultados interessantes em termos de sustentabilidade, estabilidade e eficiência de extração também utilizando matrizes biológicas complexas sem nenhum pré-tratamento. Mais importante, essa configuração abre novos horizontes para inúmeras aplicações, uma vez que a frequência analítica da metodologia é substancialmente maior em comparação com estudos relatados anteriormente envolvendo MILs e análise de ácidos nucleicos [55-57, 67]. Este trabalho está sendo escrito na forma de *Short Communication* para ser avaliado na revista *Journal of Chromatography A* (F.I. 4,601) conforme Apêndice I deste documento.

Adicionalmente, entende-se como caminho natural a sequência dos estudos na verificação da viabilidade de uma metodologia de análise quantitativa como por exemplo qPCR que, inicialmente, foi listada como um dos objetivos desta investigação, mas que não foi alcançada em função do afastamento das atividades de laboratório com o início da pandemia da Covid-19. Contudo, tais testes serão realizados em breve.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho MILs formados pelo cátion $P_{6,6,6,14}^+$ e pelo ânion $hfacac^-$ contendo em sua estrutura os metais Ni, Mn e Co, foram sintetizados, caracterizados e aplicados como fase extratora na técnica de SDME-MIL para a captura de DNA. O método mostrou-se capaz de extrair DNA de amostras consideradas complexas, tais como saliva e sangue total, mostrando que o método de extração teve resultados satisfatórios mesmo sem a realização de uma otimização completa da técnica.

Adicionalmente, o método desenvolvido foi aplicado com sucesso em uma nova estratégia experimental. Neste caso, uma forma de extração projetada ao longo deste trabalho envolveu a possibilidade de múltiplas extrações simultaneamente, fato que até o momento é considerado inédito para a pesquisa relacionada à utilização de MILs em técnicas de extração de biomoléculas como DNA e RNA.

Além disso, também cabe salientar que a metodologia proposta apresenta aspectos interessantes quando comparada com métodos convencionais de extração de DNA, pois não necessita de várias etapas e procedimentos, não há necessidade de etapas de centrifugação e requer o emprego de somente alguns microlitros de solventes como fase extratora, assim, mostrando concordância com os princípios da química verde.

Diante do exposto, este trabalho apresenta como perspectivas a sua continuidade em direção a técnicas de análise por meio da quantificação do DNA extraído, como qPCR. Este passo é de grande importância para possibilitar a otimização e validação desta metodologia para as diferentes amostras biológicas testadas. Além disso, existe em paralelo, a possibilidade de investigar a proposta de um sistema impresso em 3D que permita a alocação dos magnetos e facilite a análise simultânea de uma série de amostras.

7. REFERÊNCIAS

[1] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

[2] ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

[3] CLARK, K. D.; NACHAM, O.; YU, H.; LI, T.; YAMSEK, M. M.; RONNING, D. R.; ANDERSON, J. L. Extraction of DNA by Magnetic Ionic Liquids: Tunable Solvents for Rapid and Selective DNA Analysis. *Anal. Chem.*, v. 87, p. 1552–1559, 2015.

[4] CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia de Práticas em Biologia Molecular**. 2. ed. Campinas: Yendis, 2015.

[5] MOREAU, R. L. M.; DE SIQUEIRA, M. E. P. B. **Ciências Farmacêuticas: Toxicologia analítica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

[6] MERIB, J. O.; SPUDEIT, D. A.; CORAZZA, G.; CARASEK, E.; JARED, A. L. Magnetic ionic liquids as versatile extraction phases for the rapid determination of estrogens in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 19, p. 1-11, 2018.

[7] PATEL, R.; KVACH, J. T.; MOUNTS, P. Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. *J. Gen. Microbiol.*, v. 132, p. 541–551, 1986.

[8] CLARK, K. D.; NACHAM, O.; PURSLOW, J. A.; PIERSON, S. A.; ANDERSON, J. L. Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta.*, v. 934, p. 9-21, 2016.

[9] EMAUS, M. N.; VARONA, M.; EITZMANN, D. R.; HSIEH, S-H.; ZEGER, V. R.; ANDERSON, J. L. Nucleic Acid Extraction: Fundamentals of Sample Preparation Methodologies, Current Advancements, and Future Endeavors. *Trends. Analyt. Chem.*, v. 130, p. 115985, 2020.

[10] VARONA, M.; EOR, P.; FERREIRA NETO, L. C.; MERIB, J.; ANDERSON, J. L. Metal-Containing and Magnetic Ionic Liquids in Analytical Extractions and Gas Separations. *Trends. Analyt. Chem.*, v. 140, p. 116275, 2021.

[11] EMAUS, M. N.; CLARK, K. D.; HINNERS, P.; ANDERSON, J. L. Preconcentration of DNA using magnetic ionic liquids that are compatible with real-time PCR for rapid nucleic acid quantification. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 410, p. 4135-4144, 2018.

[12] SKOOG, D. A.; WEST, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. **Fundamentos de Química Analítica**. 9. ed. [S.l.]: Cengage, 2014.

[13] ALVES, M. S.; FERREIRA NETO, L. C.; SCHEID, C.; MERIB, J. An overview of magnetic ionic liquids: from synthetic strategies to applications in microextraction techniques. *J. Sep. Sci.*, v. 45, p. 258-281, 2021.

[14] KOKOSA, J. M.; PRZYJAZNY, A.; JEANNOT, M. A. **Solvent Microextraction: Theory and Practice**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.

[15] HAYASHI, S.; SAHA, S.; HAMAGUCHI, H. A new class of magnetic fluids: bmim[FeCl₄] and nbmim[FeCl₄] ionic liquids IEEE. *Transac. Magn.*, v. 42, p. 12-14, 2006.

[16] CLARK, K. D.; PURSLOW, J. A.; PIERSON, S. A.; NACHAM, O.; ANDERSON, J. L. Rapid preconcentration of viable bacteria using magnetic ionic liquids for PCR amplification and culture-based diagnostics. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 409, p. 4983-4991, 2017.

[17] FUCHS-TELKA, S.; FISTER, S.; MESTER, P.; WAGNER, M.; ROSSMANITH, P. Hydrophobic ionic liquids for quantitative bacterial cell lysis with subsequent DNA quantification. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 409, p. 1503-1511, 2017.

[18] PIERSON, S. A.; NACHAM, O.; CLARK, K. D.; NAN, H.; MUDRYK, Y.; ANDERSON, J. L. Synthesis and characterization of low viscosity hexafluoroacetylacetonate-based hydrophobic magnetic ionic liquids. *New J. Chem.*, v. 41, p. 5498-5505, 2017.

[19] DAI, X.; QIANG, X.; LI, J.; YAO, T.; WANG, Z.; SONG, H. Design and functionalization of magnetic ionic liquids surfactants (MILSs) containing alkyltrimethylammonium fragment. *J. Mol. Liq.*, v. 277, p. 170-174, 2019.

[20] NACHAM, O.; CLARK, K. D.; ANDERSON, J. L. Synthesis and characterization of the physicochemical and magnetic properties for perfluoroalkyl ester and Fe(III) carboxylate-based hydrophobic magnetic ionic liquids. *RSC Adv.*, v. 6, p. 11109-11117, 2016.

[21] LEE, S. H.; HA, S. H.; HA, S. S.; JIN, H. B.; YOU, C. Y.; KOO, Y. M. Magnetic behavior of mixture of magnetic ionic liquid [bmim] FeCl₄ and water. *J. Appl. Phys.*, v. 101, p. 102-109, 2007.

[22] PEPPEL, T.; KOCKERLING, M. Investigations on a series of ionic liquids containing the [Co^{II}Br₃quin]⁻ anion (quin = quinoline). *Cryst. Growth Des.*, v. 11, p. 5461-5468, 2011.

[23] BACKER, T.; BREUNIG, O.; VALLDOR, M.; MERZ, K.; VASYLYEVA, V.; MUDRING, A. V. In-situ crystal growth and properties of the magnetic ionic liquid [C₂mim][FeCl₄]. *Cryst. Growth Des.*, v. 11, p. 2564-2571, 2011.

[24] JIN, Z. M.; MA, H.; LI, D.; MA, G. H.; WANG, M.; ZHAO, C. J. Femtosecond inverse faraday effect in magnetic ionic liquid [bmim]FeCl₄. *J. Appl. Phys.*, v. 109, p. 073109, 2011.

[25] HERBER, R. H.; NOWIK, I.; KOSTNER, M. E.; KAHLENBERG, V.; KREUTZ, C.; LAUS, G.; SCHOTTENBERGER, H. Mossbauer spectroscopy and X-ray diffraction study of Fe-57-labeled tetrachloroferrate(III)-based magnetic ionic liquids. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12, p. 6397-406, 2011.

[26] ZHURAVLEV, O. E.; VEROLAINEN, N. V.; VORONCHIKHINA, L. I. Thermal stability of 1,3-disubstituted imidazolium tetrachloroferrates, magnetic ionic liquids. *Russ. J. Appl.*, v. 84, p. 1158-1164, 2011.

[27] FRADE, R. F. M.; SIMEONOV, S.; ROSATELLA, A. A.; SIOPA, F.; AFONSO, C. A. M. Toxicological evaluation of magnetic ionic liquids in human cell lines. *Chemosphere.*, v. 92, p. 100-105, 2013.

[28] CRUZ, M. M.; BORGES, R. P.; GODINHO, M.; MARQUES, C. S.; LANGA, E.; RIBEIRO, A. P. C.; LOURENÇO, M. J. V.; SANTOS, F. J. V.; NIETO DE CASTRO, C. A.; MACATRÃO, M.; TARIQ, M.; ESPERANÇA, J.; LOPES, J. N. C.; AFONSO, C. A. M.; REBELO, L. P. N. Thermophysical and magnetic studies of two paramagnetic liquid salts: [C₄mim] [FeCl₄] and [P₆₆₆₁₄] [FeCl₄]. *Fluid Phase Equilib.*, v. 350, p. 43-50, 2013.

[29] TANG, Y. M.; HU, X. L.; GUAN, P.; LIN, X. P.; LI, X. Q. Physicochemical characterization of paramagnetic ionic liquids 1-vinyl-3-alkylimidazolium tetrahalogenidoferrate(III) [VRIM] [FeCl_mBr_{4-m}]. *J. Phys. Org. Chem.*, v. 27, p. 498-503, 2014.

[30] ROSATELLA, A. A.; SIOPA, F.; FRADE, R. F. M.; AFONSO, C. A. M. New low viscous cholinium-based magnetic ionic liquids. *New J. Chem.*, v. 40, p. 3124-3129, 2016.

[31] MCCOURT, E.; WOJNAROWSKA, Z.; JACQUEMIN, J.; NOCKEMANN, P.; MANYAR, H. G.; HAWELEK, L.; PALUCH, M. Temperature- and Pressure-Induced Structural Changes of Cobalt(II) in a Phosphonium-Based Ionic Liquid. *J. Phys. Chem. C.*, v. 120, p. 10156–10161, 2016.

[32] LI, J.-G.; HU, Y.-F.; PENG, X.-M.; ZHANG, X.-M. Study on physicochemical properties of FeCl₃/[C₄mim][Cl] ionic liquids. *J. Chem. Thermodyn.*, v. 97, p. 277-281, 2016.

[33] TIAN, T.; HU, X.; GUAN, P.; TANG, Y. Investigation of Surface and Solubility Properties of N-Vinylimidazolium Tetrahalogenidoferrate(III) Magnetic Ionic Liquids Using Density Functional Theory. *J. Chem. Eng. Data.*, v. 61, p. 721–730, 2016.

[34] SINTRA, T. E.; NASIRPOUR, M.; SIOPA, F.; ROSATELLA, A. A.; GONÇALVES, F.; COUTINHO, J. A. P.; AFONSO, C. A. M.; VENTURA, S. P. M. Ecotoxicological evaluation of magnetic ionic liquids. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 143, p. 315-321, 2017.

[35] LI, X. H.; ZHOU, Q.; LU, X. M.; ZHANG, S. J. Densities and viscosities of binary mixtures of magnetic ionic liquids 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrachloroferrate with ethyl acetate at temperatures (293.15 to 323.15) K. *J. Mol. Liq.*, v. 243, p. 285-292, 2017.

[36] HE, X.; QIANG, W.; WU, J.; SHAO, Q.; CAO, P.; CHENG, L.; ZHANG, X.; DENG, Y. Manipulation of magnetic ionic liquid droplets and their application in energy harvesting. *J. Phys. D.*, v. 50, p. 465002, 2017.

[37] DAI, X. Z.; LI, J. H.; MA, Y. Z.; LAN, X. Q.; SONG, H. Synthesis, properties of pentaalkylguanidinium-based magnetic room temperature ionic liquids (MRTILs) and the mutual solubility of (MRTILs + cyclohexane) and (MRTILs + η -octane) binary systems. *J. Mol. Liq.*, v. 254, p. 226-230, 2018.

[38] FAROOQ, M. Q.; CHAND, D.; ODUGBESI, G. A.; VARONA, M.; MUDRYK, Y.; ANDERSON, J. L. Investigating the effect of ligand and cation on the properties of metal fluorinated acetylacetonate based magnetic ionic liquids. *New J. Chem.*, v. 43, p. 11334-11341, 2019.

[39] BURBA, C. M.; CHANG, H. C. The nature of cation-anion interactions in magnetic ionic liquids as revealed using high-pressure fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Appl. Spectrosc.**, v. 73, p. 511-519, 2019.

[40] HAYASHI, S.; HAMAGUCHI, H. O. Discovery of a magnetic ionic liquid [bmim] FeCl₄. **Chem. Lett.**, v. 33, p. 1590-1591, 2004.

[41] WANG, J.; YAO, H.; NIE, Y.; ZHANG, X.; LI, J. Synthesis and characterization of the iron-containing magnetic ionic liquids. **J. Mol. Liq.**, v. 169, p. 152-155, 2012.

[42] NACHAM, O.; CLARK, K. D.; YU, H.; ANDERSON J. L. Synthetic strategies for tailoring the physicochemical and magnetic properties of hydrophobic magnetic ionic liquids. **Chem. Mater.**, 2015, v. 27, p. 923–931.

[43] PEPPEL, T.; GEPPERT-RYBCZYŃSKA, M.; NEISE, C.; KRAGL, U.; KÖCKERLING, M. Low-melting manganese(II)-based ionic liquids: Syntheses, structures, properties and influence of trace impurities. **Materials**, v. 12, n. 22, p. 3764, 2019.

[44] LAN, X.; MOCHIDA, T.; FUNASAKO, Y.; TAKAHASHI, K.; SAKURAI T.; OHTA, H. Thermochromic magnetic ionic liquids from cationic nickel(II) complexes exhibiting intramolecular coordination equilibrium. **Chem. Eur. J.**, v. 23, p. 823-831, 2017.

[45] TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J.; ANDERSON, J. L. *In situ* generation of hydrophobic magnetic ionic liquids in stir bar dispersive liquid-liquid microextraction coupled with headspace gas chromatography. **Talanta**, v. 196, 420-428, 2019.

[46] TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J.; ANDERSON, J. L. *In situ* formation of hydrophobic magnetic ionic liquids for dispersive liquid-liquid microextraction. **J. Chromatogr. A.**, v. 1588, p 8-16, 2019.

[47] NACHAM, O.; CLARK, K. D.; ANDERSON, J. L. Synthetic Strategies for Tailoring the Physicochemical and Magnetic Properties of Hydrophobic Magnetic Ionic Liquids. **Chem. Mater.**, v. 27, p. 923-931, 2015.

[48] SAJID, M. Magnetic ionic liquids in analytical sample preparation: A literature review. **TrAC Trends Anal. Chem.**, v. 113, p. 210-223, 2019.

[49] FERNÁNDEZ, E.; VIDAL, L.; CANALS, A. Hydrophilic magnetic ionic liquid for magnetic headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes

prior to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 410, p. 4679-4687, 2017.

[50] TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J.; PINO, V.; ANDERSON, J. L. Magnetic ionic liquids as extraction solvents in vacuum headspace single-drop microextraction. **Talanta**, v. 172, p. 86-94, 2017.

[51] YAO, T.; DU, K. Simultaneous determination of sulfonamides in milk: In-situ magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. **Food Chem.**, v. 331, p. 127342, 2020.

[52] CAO, D.; XU, X; XUE, S; FENG, X; ZHANG L. An in situ derivatization combined with magnetic ionic liquid-based fast dispersive liquid-liquid microextraction for determination of biogenic amines in food samples. **Talanta**, v. 199, p. 212-219, 2019.

[53] BOWERS, A. N.; TRUJILLO-RODRIGUEZ, M. J.; FAROOQ, M. Q.; ANDERSON, J. L. Extraction of DNA with magnetic ionic liquids using *in situ* dispersive liquid-liquid microextraction. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 411, p. 7375-7385, 2019.

[54] YU, H.; MERIB, J.; ANDERSON, J. L. Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents. **J. Chromatogr. A**, v. 1463, p. 11-19, 2016.

[55] EMAUS, M. N.; ANDERSON, J. L. Allelic discrimination between circulating tumor DNA fragments enabled by a multiplex-qPCR assay containing DNA-enriched magnetic ionic liquids. **Anal. Chim. Acta**, v. 1124, p. 184-193, 2020.

[56] EMAUS, M. N.; ZHU, C.; ANDERSON, J. L. Selective hybridization and capture of KRAS DNA from plasma and blood using ion-tagged oligonucleotide probes coupled to magnetic ionic liquids. **Anal. Chim. Acta**, v. 1094, p. 1-10, 2020.

[57] EMAUS, M. N.; ANDERSON, J. L. Selective extraction of low-abundance BRAF V600E mutation from plasma, urine, and sputum using ion-tagged oligonucleotides and magnetic ionic liquids. **Anal. Bioan. Chem.**, v. 414, n. 1, p. 277-288, 2022.

[58] EMAUS, M. N.; VARONA, M.; ANDERSON, J. L. Sequence-specific preconcentration of a mutation prone KRAS fragment from plasma using ion-

tagged oligonucleotides coupled to qPCR compatible magnetic ionic liquid solvents. ***Anal. Chim. Acta***, v. 1068, p. 1-10, 2019.

[59] CLARK, K. D.; ZHU, C.; ANDERSON, J. L. Maximizing ion-tagged oligonucleotide loading on magnetic ionic liquid supports for the sequence-specific extraction of nucleic acids. ***Anal. Chem.***, v. 91, p. 5945-5952, 2019.

[60] CLARK, K. D.; VARONA, M.; ANDERSON, J. L. Ion-tagged Oligonucleotides Coupled with a Magnetic Liquid Support for the Sequence-specific Capture of DNA. ***Angew. Chem. Int. Ed.***, v. 26, p. 7630-7633, 2017.

[61] MARENGO, A.; EMAUS, M. N.; BERTEA, C. M.; BICCHI, C.; RUBIOLO, P.; CAGLIERO, C.; ANDERSON, J. L. Arabidopsis thaliana ITS sequence-specific DNA extraction by ion-tagged oligonucleotides coupled with a magnetic ionic liquid. ***Anal. Bioanal. Chem.***, v. 411, p. 6583-6590, 2019.

[62] EMAUS, M. N.; ANDERSON, J. L.; Simultaneous cell lysis and DNA extraction from whole blood using magnetic ionic liquids. ***Anal. Bioanal. Chem.***, v. 412, p. 8039-8049, 2020.

[63] CLARK, K. D.; YAMSEK, M. M.; NACHAM, O.; ANDERSON J. L. Magnetic ionic liquids as PCR-compatible solvents for DNA extraction from biological samples. ***Chem. Commun. (Camb.)***, v. 51, p. 16771-16773, 2015.

[64] PENG, X.; CLARK, K.; DING, X.; ZHU, C.; VARONA, M.; EMAUS, N.; AN, J.; ANDERSON, J. L. Coupling oligonucleotides possessing a polycytosine tag with magnetic ionic liquids for sequence-specific DNA analysis. ***Chem. Commun. (Camb.)***, v. 54, p. 10284-10287, 2018.

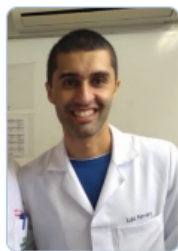
[65] HICE, S. A.; CLARK, K. D.; ANDERSON, J. L.; BREHM-STECHER, B. F. Capture, concentration, and detection of salmonella in foods using magnetic ionic liquids and recombinase polymerase amplification. ***Anal. Chem.***, v. 91, p. 1113-1120, 2019.

[66] MARENGO, A.; CAGLIERO, C.; SGORBINI, B.; ANDERSON, J. L.; EMAUS, M. N.; BICCHI, C.; BERTEA, C. M.; RUBIOLO, P. Development of an innovative and sustainable one-step method for rapid plant DNA isolation for targeted PCR using magnetic ionic liquids. ***Plant Methods***, v. 15, p. 23, 2019.

[67] EMAUS, M. N.; ANDERSON, J. L. Simultaneous cell lysis and DNA extraction from whole blood using magnetic ionic liquids. ***Anal. Bioanal. Chem.***, v. 412, p. 8039-8049, 2020.

[68] ZHU, C.; VARONA, M.; ANDERSON, J.L. Magnetic Ionic Liquids as Solvents for RNA Extraction and Preservation. **ACS Omega**, v. 5, n. 19, p. 11151-11159, 2020.

8. CURRÍCULO LATTES



Luiz Carlos Ferreira Neto

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2433305920809138>

ID Lattes: **2433305920809138**

Última atualização do currículo em 11/08/2022

Biomédico com habilitação em Análises Clínicas e Toxicologia (2019) formado pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), com atuação na área de Toxicologia Analítica, em particular no desenvolvimento e validação de métodos por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas. Bacharel em Educação Física (2013) e Especialista em Ciência do Movimento Humano (2016) pela Faculdade Sogipa de Educação Física, com atuação na área de Preparação Física no Atletismo. Possui qualificação internacional concedida pela Sociedade Internacional para Avanço da Cineantropometria (ISAK), sendo antropometrista nível I (2012). **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Luiz Carlos Ferreira Neto
Nome em citações bibliográficas	FERREIRA NETO, L. C.; FERREIRA NETO, LUIZ CARLOS; NETO, LUIZ CARLOS FERREIRA
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/2433305920809138

Endereço

Endereço Profissional	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmento Leite Centro Histórico 90050170 - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (051) 33039000
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2020	Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Brasil. Título: Investigação de técnicas alternativas para a extração de ácidos nucleicos.
2014 - 2016	Orientador: Josias de Oliveira Merib. Especialização em Ciências do Movimento Humano. (Carga Horária: 550h). Faculdade Sogipa de Educação Física, FSEF, Brasil. Título: Respostas de cortisol e testosterona em jogadores de futebol: uma revisão de literatura..
2014 - 2019	Orientador: Rodrigo Sudatti Delevatti. Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Brasil. Título: Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de cortisol e testosterona em amostras de fluido oral por Espectrometria de Massas de Alta Resolução.
2009 - 2013	Orientador: Tiago Franco de Oliveira. Graduação em Educação Física - Bacharelado. Faculdade Sogipa de Educação Física, FSEF, Brasil. Título: Estados de Humor de Mesatenistas Pré e Pós Competição Oficial.
2008 interrompida	Orientador: Dr. Márcio Geller Marques. Graduação interrompida em 2009 em Licenciatura em Educação Física. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil. Ano de interrupção: 2009

Formação Complementar

2020 - 2020

	Curso de Fisiologia Geral na Prática. (Carga horária: 80h). Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.
2020 - 2020	Curso de Saúde Pública do Brasil. (Carga horária: 80h). Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.
2020 - 2020	Curso de Diagnóstico de Vírus. (Carga horária: 80h). Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.
2020 - 2020	Curso de NR-06. (Carga horária: 80h). Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.
2020 - 2020	Curso de Interpretação de Exames Laboratoriais.. (Carga horária: 80h). Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.
2018 - 2018	Curso EAD de Acidentes Tóxicos por Animais Peçonhentos 3ª Edição. (Carga horária: 60h). Fundação Empresa Escola de Engenharia da UFRGS, FEENG, Brasil.
2015 - 2015	VII Curso de Aplicações Clínicas da Bioquímica: Bioquímica do Esporte. (Carga horária: 9h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2011 - 2011	Curso de Aperfeiçoamento em Suplementação de Proteínas. (Carga horária: 8h). Evidência Saúde -ES, ES, Brasil.
2011 - 2011	Curso de Árbitro de Atletismo Nível I FAERGS.. (Carga horária: 32h). Confederação Brasileira de Atletismo., CBAT, Brasil.
2011 - 2011	Curso de Exercício e Emagrecimento Baseado em Evidência. (Carga horária: 8h). Evidência Saúde -ES, ES, Brasil.
2011 - 2011	Curso Clínica Internacional de Saltos no Atletismo. (Carga horária: 32h). Sociedade de Ginástica Porto Alegre - 1867, SOGIPA, Brasil.
2011 - 2011	Curso de Antropometria Nível 1. (Carga horária: 32h). International Society for the Advancement of Kinanthropometry, ISAK, Nova Zelândia.

Atuação Profissional

Faculdade Sogipa de Educação Física, FSEF, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Monitoria Voluntária, Carga horária: 30
Monitor voluntário da disciplina de Fisiologia do Exercício para o curso de Bacharelado em Educação Física, sob supervisão do Prof.ª Alexandre Machado Lehnen.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Monitoria Voluntária, Carga horária: 30
Monitor voluntário da disciplina de Biologia e Bioquímica Celular para o curso de Bacharelado em Educação Física, sob supervisão do Prof.ª Jocelito Bijoldo Martins.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional

2019 - 2019

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20
Aluno de Iniciação Científica do projeto intitulado "Desenvolvimento e validação de método multiresíduo mini QuEChERS para análise de agrotóxicos com biomarcadores de exposição em plasma de ratos?", sob orientação do professor Tiago Franco de Oliveira.

Vínculo institucional

2019 - 2019

Outras informações

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estágio Curricular Obrigatório, Carga horária: 30
Estágio curricular obrigatório na área de Toxicologia desenvolvido na Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Vínculo institucional

2018 - 2018

Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Monitoria Voluntária, Carga horária: 10
Monitor voluntário da disciplina de Hematologia para o curso de Biomedicina Diurno, sob supervisão da Prof.ª Sandrine Comparsi Wagner.

Vínculo institucional

2017 - 2018

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20
Aluno bolsista de iniciação científica no projeto "Reação de Biginelli: investigação metodológica e síntese de novas dihidropirimidinonas bioativas" sob orientação da Prof. Maria Narciso Godoi Bijoli.

Vínculo institucional

2016 - 2017

Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica Voluntária, Carga horária: 20
Aluno de iniciação científica no projeto "Piperina e seus análogos: síntese através da alquenação de indóis e avaliação de suas atividades biológicas" sob orientação do Prof. Maria Narciso Godoi Bijoli.

Vínculo institucional

2015 - 2015

Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Monitoria Voluntária, Carga horária: 10

Monitor voluntário da disciplina de Pré Química para o curso de Biomedicina Diurno, sob supervisão da Prof.^a Ana Cristina Borba da Cunha.

Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre, HPS, Brasil.

**Vínculo institucional
2019 - 2019**

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estágio Curricular Obrigatório, Carga horária: 30

Outras informações

Estágio curricular obrigatório na área de Análises Clínicas (Patologia Clínica) desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas do HPS Porto Alegre.

SOCIEDADE DE GINÁSTICA PORTO ALEGRE, SOGIPA, Brasil.

**Vínculo institucional
2011 - 2013**

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estágio não obrigatório, Carga horária: 30

Outras informações

Auxiliar em atividades operacionais (Administrativas e Gerenciais) na Secretaria de Esportes da SOGIPA, como no atendimento aos departamentos esportivos, organização e controle das turmas de escolas e equipes esportivas, organização de eventos esportivos e, na substituição de instrutores de forma emergencial (Modalidades: Atletismo, Natação, Futebol, Musculação, Voleibol, Musculação, Judô, entre outras). Auxiliar na elaboração e no acompanhamento de projetos esportivos junto ao Ministério do Esporte e à Fundergs.

**Vínculo institucional
2009 - 2012**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Preparação Física, Carga horária: 20

Outras informações

Auxiliar de preparação física no PerCorrer Assessoria Esportiva Ltda

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

- ★ ALVES, MÔNICA SILVA ; **NETO, LUIZ CARLOS FERREIRA** ; SCHEID, CAMILA ; MERIB, JOSIAS . An overview of magnetic ionic liquids: From synthetic strategies to applications in microextraction techniques. JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE **JCR**, v. 45, p. 258-281, 2022.
- ★ VARONA, MARCELINO ; EOR, PHILIP ; **FERREIRA NETO, LUIZ CARLOS** ; MERIB, JOSIAS ; ANDERSON, JARED L. . Metal-containing and magnetic ionic liquids in analytical extractions and gas separations. TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY **JCR**, v. 140, p. 116275, 2021.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 4
- FERREIRA NETO, L. C.**; HENTGES, D. ; REICHERT, T. ; DELEVATTI, R. S. . Respostas de cortisol e testosterona em jogadores de futebol: uma revisão de literatura.. KINESIS (SANTA MARIA), v. 36, p. 141-153, 2018.
- FERREIRA NETO, L. C.**; LEHNEN, A. M. ; MARQUES, M. G. . Estado de humor de mesatenistas pré e pós-competição oficial.. Lecturas Educación Física y Deportes (Buenos Aires), v. 19, p. 1, 2014.

Apresentações de Trabalho

- FERREIRA NETO, L. C.**; SILVA, L. R. ; BIRK, L. ; MERIB, J. O. ; ELLER, S. C. W. S. ; OLIVEIRA, T. F. . Desenvolvimento e Validação de Métodos para Análise de Agrotóxicos como Biomarcadores de Exposição em Plasma. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- FERREIRA NETO, L. C.**; GODOI, M. N. . Reação de Biginelli: Investigação Metodológica e Síntese de Novas Dihidropirimidinonas.. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- FERREIRA NETO, L. C.**. Liderança e coesão em uma equipe de atletismo. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. II QUIMTOX. 2019. (Outra).
2. IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Reação de Biginelli: investigação metodológica e síntese de novas dihidropirimidinonas bioativas. 2018. (Exposição).
3. V Seminário Internacional de Ciências do Esporte e Atividade Física. Liderança e Coesão de Grupo em Corredores. 2009. (Seminário).
4. XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS. Liderança e Coesão em uma Equipe de Atletismo. 2009. (Outra).

APÊNDICE I**Development of a multiwell-based strategy for the extraction of DNA
using magnetic ionic liquids**

Luiz Carlos Ferreira Neto^{1,3}, Mônica Silva Alves^{1,3}, Janira Prichula¹, Grasiela Agnes¹,
Tiago Franco de Oliveira^{2,3}, Danielle Trentin^{1,3} e Josias Merib^{1,2,3*}

¹Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

²Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

Corresponding Author

E-mail address: josias@ufcspa.edu.br (J. Merib)

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

245, Sarmiento Leite St.

Abstract

This study describes a novel and straightforward experimental strategy for the extraction of DNA using magnetic ionic liquids (MILs) coupled to polymerase chain reaction (PCR). Particularly, a multiwell-based platform was firstly examined to allow for simultaneous extractions in order to increase the analysis throughput of the experimental workflow. This configuration was comprised of a series of magnetic pins attached to the sample vial caps in which the magnetic extraction phases were suspended for a single drop microextraction (SDME) approach. Using this configuration, multiple extractions were able to be successfully performed involving the analysis of BRAF gene in aqueous samples. Moreover, the potential of this experimental strategy was exploited in raw samples of saliva, blood and urine without any pretreatment as proof-of-concept.

Keywords: sample preparation; microextraction; magnetic ionic liquids; DNA; high-throughput analysis.