

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

Mônica Silva Alves

**Investigação de metodologias
alternativas para extração de ácidos
nucleicos: microextração em gota
única de RNA utilizando um líquido
iônico magnético
como fase extratora**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

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: Dr. Josias de Oliveira Merib
Coorientador: Dr. Paulo Markus Lopes

**Porto Alegre
2023**

Mônica Silva Alves

**Investigação de metodologias
alternativas para extração de ácidos
nucleicos: microextração em gota
única de RNA utilizando um líquido
iônico magnético como fase
extratora**

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: Dr. Josias de Oliveira Merib
Coorientador: Dr. Paulo Markus Lopes

**Porto Alegre
2023**

Catálogo na Publicação

Silva Alves, Mônica

Investigação de metodologias alternativas para extração de ácidos nucleicos: microextração em gota única de RNA utilizando um líquido iônico magnético como fase extratora / Mônica Silva Alves. -- 2023.

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

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2023.

Orientador(a): Josias de Oliveira Merib ;
coorientador(a): Paulo Markus Lopes.

1. Preparo de amostras. 2. RNA. 3. Líquidos Iônicos Magnéticos. I. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), nos laboratórios:

Laboratório de Biologia Molecular;

Central Analítica;

Laboratórios 301 e 317 (prédio 1).

Este trabalho contou com o financiamento das seguintes instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Aline e Marcelo, e aos meu tio-avô - que considero como a um avô - Mário, pelo constante incentivo nos estudos. Agradeço também a minha avó Marilene, que nas madrugadas de estudo me trazia combustível para continuar funcionando – isto é, bombons, chá e cobertor para os ombros.

Obrigada a minha banca de acompanhamento, Rafael Cáceres e Danielle Trentin, pelas considerações no decorrer do trabalho. À sempre solícita Grasiela Agnes, que através de muitas conversas auxiliou no desenvolvimento dos experimentos. Também agradeço à Brenda Fraga e à doutora Márcia Giovenardi, que foram essenciais para o projeto.

Agradeço especialmente ao parceiro de laboratório Luiz Carlos Ferreira Neto, que me apresentou ao projeto, e foi colega e amigo nessa jornada.

Por fim, agradeço imensamente ao professor Josias Merib, que orienta com muita paciência, solicitude e consideração os seus alunos, e é um exímio cientista de curiosidade aguçada.

Obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Ácidos nucleicos	13
1.1.1 Dogma central da biologia molecular	16
1.1.2 Ácido ribonucleico	16
1.1.3 Análise de RNA	18
1.1.4 Extração convencional de RNA	20
1.1.5 Desafios da extração de RNA	21
1.2 Líquidos Iônicos	23
1.2.1 Líquidos Iônicos Magnéticos	24
1.3 Técnicas de extração com MILs	24
1.3.1 Microextração	24
1.3.2 MILs na extração de ácidos nucleicos	25
1.4 Justificativa	26
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Instrumentação	31
3.2 Reagentes e padrões	31
3.2.1 Síntese dos MILs	31
3.2.2 Transcriptase reversa e qPCR	31
3.3 Amostras para estudo	32
3.3.1 Amostras puras de RNA	32
3.3.2 Extração prévia das amostras de RNA	32
3.3.3 Preparo das amostras para extração	33
3.4 Procedimento experimental	33
3.4.1 Síntese do MIL	33
3.4.2 Caracterização do MIL	34
3.4.3 Procedimento de microextração	35
3.4.4 Síntese de cDNA	36
3.4.5 Amplificação em qPCR	37
4. RESULTADOS	37
4.1 Síntese e aspecto visual do MIL	37
4.2 Caracterização do MIL	38
4.3 Leitura dos resultados da microextração	39

5. DISCUSSÃO	44
5.1 Ensaio da PCR em tempo real	44
5.2 Amplificação das amostras	45
5.3 Curva de <i>melting</i>	46
5.4 Metodologia inédita na extração de RNA com MILs	46
5.5 Evolução da metodologia de extração de RNA com MILs	47
6. CONCLUSÕES	48
7. PERSPECTIVAS	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
9. ANEXOS	56
9.1 Artigo	56
10. CURRÍCULO LATTES	57

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
ctDNA	DNA tumoral circulante
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês, <i>diode array detector</i>)
<i>DDE</i>	<i>Dispersive Droplet Extraction</i>
<i>DLLME</i>	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<i>dsDNA</i>	DNA de fita dupla (do inglês, <i>double-stranded DNA</i>)
<i>DTO</i>	<i>Disubstituted ion-tagged</i>
<i>ESI</i>	<i>Electrospray Ionization</i>
<i>ETAAS</i>	<i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
gDNA	DNA genômico
hfacac	Hexafluoroacetilacetona
<i>ILs</i>	Líquidos iônicos
<i>IMSA</i>	<i>Isothermal multiple-self-matching-initiate amplification</i>
<i>ITO</i>	<i>Ion-tagged oligonucleotide</i>
<i>LAMP</i>	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
<i>MILs</i>	Líquidos iônicos magnéticos
mRNA	RNA mensageiro
m/z	Relação massa/carga
<i>PCR</i>	Reação em cadeia da polimerase
pDNA	<i>Plasmid DNA</i>
<i>PGMILS</i>	<i>Phenylpropyl guanidium magnetic ionic liquids</i>
<i>qPCR</i>	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
<i>QTOF</i>	<i>Quadrupole-time-of-flight</i>
<i>RPA</i>	<i>Recombinase polymerase amplification</i>
rRNA	RNA ribossômico
<i>RT-qPCR</i>	<i>Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction</i>
<i>SDE</i>	<i>Single drop extraction</i>
<i>SDME</i>	<i>Single drop microextraction</i>

ssDNA

UFCSPA

DNA de fita simples (do inglês, *single stranded DNA*)

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto

Alegre

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes estruturais dos ácidos nucleicos.....	14
Figura 2. Estrutura química dos ácidos nucleicos.....	15
Figura 3. Dogma Central da Biologia Molecular e tradução de proteínas.....	17
Figura 4. Etapa 1: síntese da porção aniônica $[\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3^-]$	34
Figura 5. Etapa 2: união da porção $[\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3^-]$ com a porção catiônica $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]$ e a obtenção do MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3^-]$	34
Figura 6. Esquema geral da microextração.	36
Figura 7. Características do $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3^-]$	38
Figura 8. Espectros de massa porções catiônica e aniônica do $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3^-]$	39
Figura 9. Esquema da nomenclatura das amostras durante o procedimento....	40
Figura 10. Amplificação em qPCR do primeiro teste de extração.....	41
Figura 11. Amplificação em qPCR obtida no teste de uma possível interferência do MIL.....	42
Figura 12. Amplificação do teste comprobatório em 30 minutos de extração.....	42
Figura 13. Amplificação do teste comprobatório em 15 minutos de extração.....	43
Figura 14. Curva de <i>melting</i>	44
Figura 15. Sistema de microextração desenvolvido para múltiplas amostras simultaneamente.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes tipos de RNA.....	18
Tabela 2. Principais kits de extração de RNA, suas vantagens e limitações.....	22
Tabela 3. Estudos publicados até o momento referentes à extração de ácidos nucleicos utilizando MILs.....	27

RESUMO

As técnicas de análise molecular para a determinação de ácidos nucleicos vêm se destacando cada vez mais nos protocolos de pesquisa e diagnóstico. O sucesso dessas técnicas se deve ao seu alto nível de sensibilidade e especificidade que as tornam reprodutíveis e confiáveis. Ainda assim, para obter um diagnóstico de qualidade é necessário realizar cuidadosamente o preparo das amostras, incluindo a etapa da extração do analito. A extração de RNA é particularmente delicada por se tratar de uma biomolécula muito instável. A utilização de Líquidos Iônicos Magnéticos (MILs) em técnicas de preparo de amostras está sendo investigada como possível alternativa para a extração dessas biomoléculas, correspondendo a procedimentos de baixo custo, com menor toxicidade que alguns protocolos tradicionais, e que requerem significativamente menos etapas para realização. Este estudo teve por objetivo investigar a capacidade de extração do MIL $[P_{66614}]^+[Ni(hfacac)_3]$, sintetizado pelo grupo de pesquisa, na captura de RNA total. Para tanto, foram utilizadas amostras aquosas contendo RNA já isolado obtido através do hipotálamo de camundongos machos e posteriormente diluído a fim de obter a concentração desejada para os experimentos. Além disso, foi utilizada uma plataforma de extração para ampliar a frequência analítica. As medições analíticas foram realizadas através da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR). Os resultados indicam que o MIL foi capaz de extrair o RNA de soluções com concentrações tão baixas quanto 3 ng/ μ L, apresentando reprodutibilidade em 6 ng/ μ L. Resultados preliminares indicaram que o MIL não inibiu a amplificação na PCR e que tempos longos de extração podem acarretar *back-extraction*. Este foi o primeiro estudo a utilizar microextração em gota única (SDME) com MIL na extração de RNA. Futuros estudos ainda são necessários para avaliar a capacidade de extração desse MIL na presença de interferentes e em matrizes complexas.

ABSTRACT

Molecular analysis techniques for the determination of nucleic acids have been increasingly highlighted in research and diagnostic protocols. The success of these techniques is due to their high sensitivity and specificity, which make them reproducible and reliable. Even so, to obtain a high-quality diagnosis, it is necessary to carefully perform the sample preparation, including the extraction of nucleic acid. RNA extraction is particularly complex because of the instability of this biomolecule. The use of Magnetic Ionic Liquids (MILs) in sample preparation techniques is being investigated as a possible alternative for the extraction of these biomolecules, corresponding to less expensive procedures, with lower toxicity than some traditional protocols, and that requires significantly fewer steps to be performed. This study aimed at investigating the extraction capacity of the $[P_{66614}^+][Ni(hfacac)_3^-]$ MIL, synthesized by our research group, for the capture of total RNA. In this case, aqueous samples containing mouse RNA previously isolated and diluted were used to obtain the concentration desired for the experiments. The analytical frequency was also enhanced by a customized platform for the extractions. The analysis was performed using reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results indicated that the MIL was able to extract RNA from aqueous solutions at concentrations as low as 3 ng/ μ L with reproducible results in 6 ng/ μ L concentrations. Preliminary results indicate that MIL does not inhibit PCR amplification and that long extraction times can result in back-extraction. This was the first study that proposed single drop microextraction (SDME) with MIL for the RNA extraction. Future studies are still needed to evaluate the extraction capacity of this MIL in the presence of interferents and in complex matrices.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ácidos nucleicos

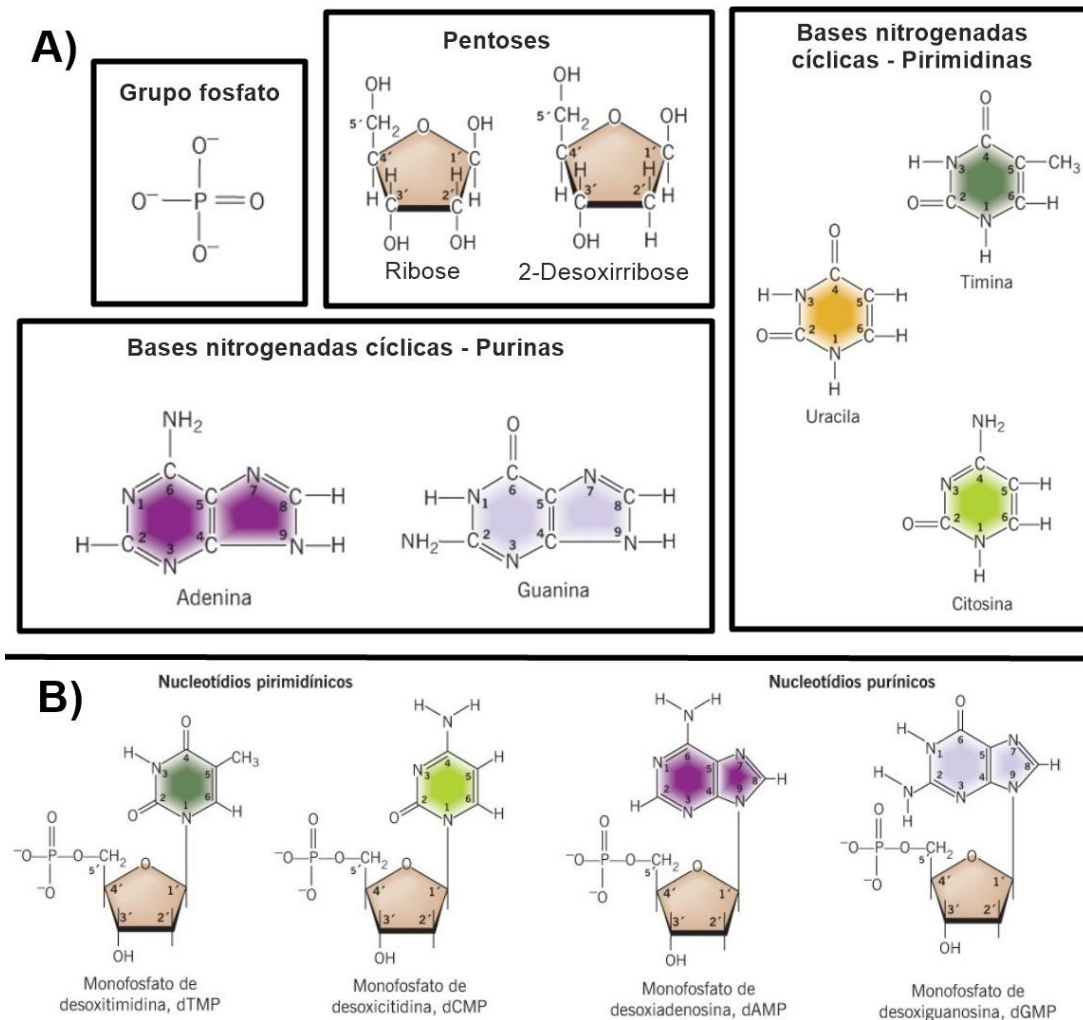
Desde a descoberta de uma substância ácida chamada, na época, “nucleína” pelo bioquímico Johann Friedrich Miescher em 1869, até o desenvolvimento do projeto Genoma Humano em 2007 e as subseqüentes pesquisas na área, muito se tem desvendado sobre as moléculas que carregam o material genético [1,2]. Essas moléculas são chamadas de ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), que emprestam o nome dos açúcares presentes na sua composição, as pentoses desoxirribose e ribose (Figura 1 A), respectivamente. Além da pentose, essas biomoléculas são constituídas por um grupo fosfato e um composto nitrogenado cíclico, o qual é chamado de base nitrogenada [2]. A combinação desses elementos forma os chamados nucleotídeos, que se ligam uns aos outros formando longas cadeias poliméricas (Figura 1 B).

Existem cinco bases nitrogenadas: a timina, a uracila, a guanina, a citosina e a adenina, sendo que a timina está presente apenas no DNA e a uracila apenas no RNA (Figura 1 A). Assim, há ao todo quatro tipos de nucleotídeos para cada um dos ácidos nucleicos (Figura 1 B).

O oxigênio do grupo fosfato de um nucleotídeo se liga ao carbono da pentose do outro nucleotídeo nas chamadas ligações fosfodiéster, formando uma cadeia de nucleotídeos comumente referida como esqueleto de açúcar-fosfato. Fixadas a este esqueleto estão as bases nitrogenadas, cuja seqüência linear difere para cada gene - o que é realmente impactante quando consideramos que o ser humano, por exemplo, possui cerca de 40.000 genes identificados [1]. Ainda, no caso do DNA, existem ligações de hidrogênio que conectam determinados pares de base (A-T e C-G) formando a estrutura de dupla hélice ou de fita dupla. O mesmo não ocorre no RNA, que geralmente se apresenta como fita simples (Figura 2).

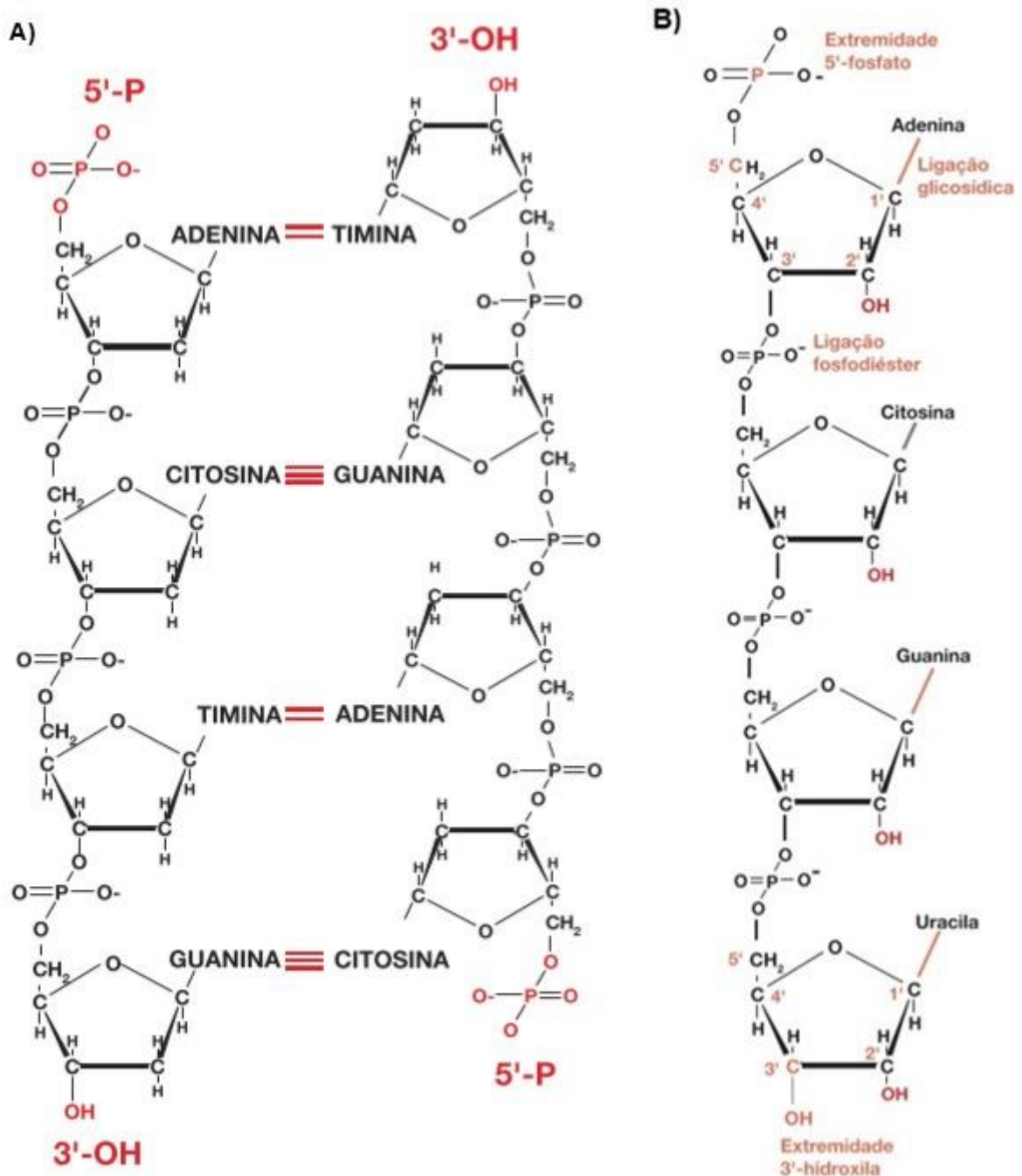
Enquanto o DNA possui a informação para a produção das proteínas, o RNA mensageiro (mRNA) carrega a transcrição que dará origem a elas. O DNA tem caráter permanente, sendo capaz de resistir por longos períodos, mantendo-se estável, servindo como o mais fiel documento histórico quando pensamos na descoberta de seres vivos anteriores a nós - como vemos em pesquisas paleontológicas - ou como um indicador de futuro - quando analisamos o genoma humano ou realizamos um prognóstico. O RNA, por outro lado, é mais suscetível a hidrólise devido ao grupo hidroxila presente no carbono 2.

Figura 1. Componentes estruturais dos ácidos nucleicos (Adaptado de Snustad *et al.* [1]).



A) Componentes estruturais individualmente. A Ribose e a Uracila são exclusivas do RNA, enquanto a Desoxirribose e a Timina, do DNA. Os demais componentes são comuns a ambas as estruturas.
B) Composição dos nucleotídeos presentes no DNA.

Figura 2. Estrutura química dos ácidos nucleicos (Adaptado de Zaha *et al.* [2]).



A) Representação das ligações entre os nucleotídeos de DNA, mostrando sua estrutura na dupla hélice. B) Representação das ligações entre os nucleotídeos de RNA, mostrando sua estrutura em fita simples.

1.1.1 Dogma central da biologia molecular

Antes de adentrarmos as técnicas de análise molecular, é importante lembrar rapidamente o dogma central da biologia molecular. Este dogma consiste na maneira como ocorre a leitura do DNA e sua conseqüente transcrição em proteínas pelo trabalho dos RNAs [2].

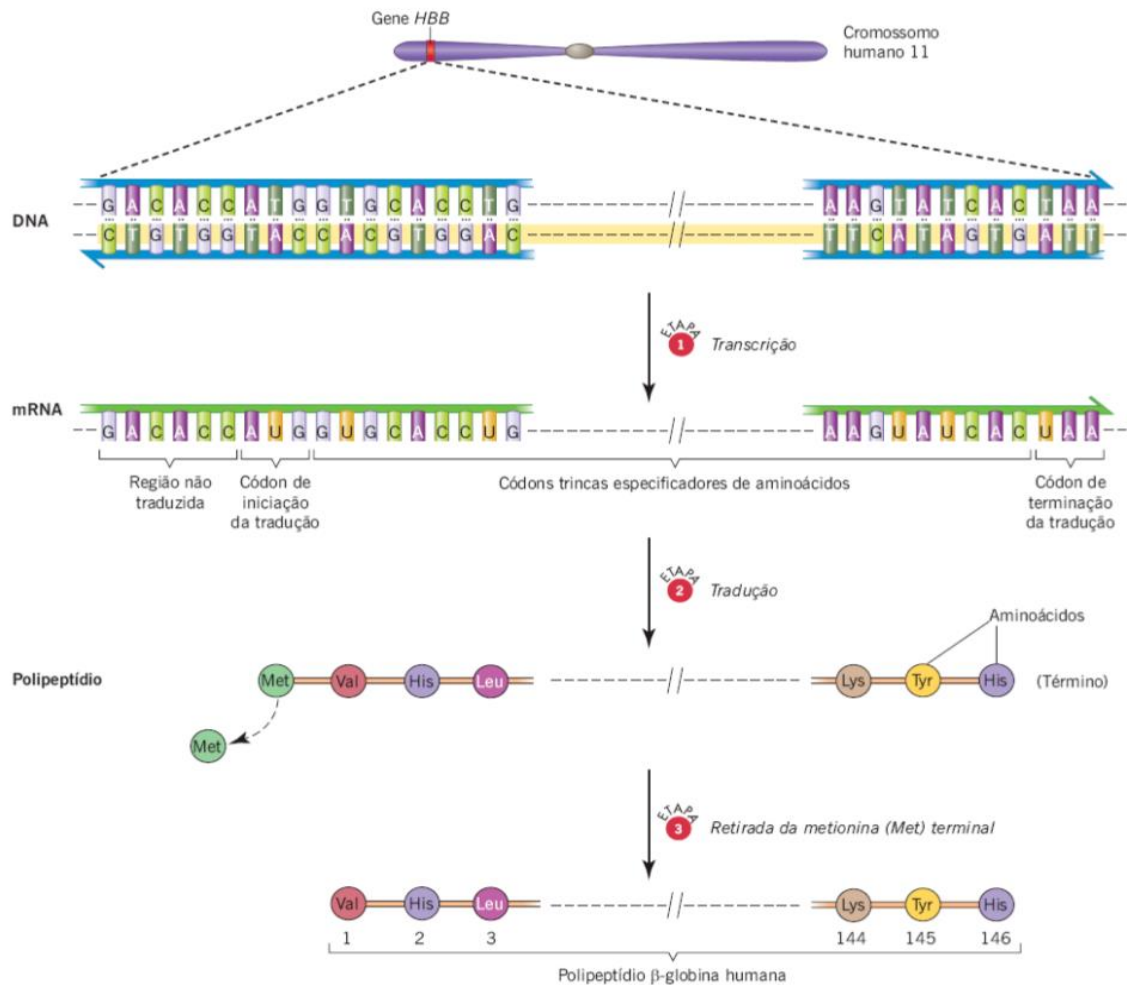
Primeiramente, a estrutura duplex de DNA é dividida de modo que possa ocorrer a leitura da seqüência das bases nitrogenadas. Essa seqüência é copiada em uma molécula de RNA, que será montada ao longo da fita de DNA. A transcrição não é uma cópia exata, e sim complementar, ocorrendo o pareamento das bases nitrogenadas entre DNA/RNA (A/U, T/A, C/G e G/C). Ao término da transcrição, o RNA transcrito se separa da fita de DNA e é transportado para o citoplasma, recebendo o nome de mRNA [1,2].

O mRNA está transportando toda informação necessária para a síntese proteica. Na segunda etapa, chamada de “tradução”, cada três bases nitrogenadas (ou “códon”) expressa um aminoácido que será incorporado a uma cadeia polipeptídica que, ao final do processo, resultará em uma proteína [1-3]. Ainda, pode ocorrer que alguns genes não codifiquem polipeptídios, mas sim moléculas de RNA específicas [1]. Na Figura 3 está representado como exemplo um esquema da síntese da proteína β -globina.

1.1.2 Ácido ribonucleico

Ainda que a molécula de RNA tenha sido descoberta em conjunto com a de DNA, o estudo de suas classes, funções e estruturas permanece um campo amplo a ser explorado [2]. Conforme mencionado anteriormente, diferente do DNA, o RNA possui a ribose como açúcar constituinte, e ao invés da base nitrogenada timina, uracila. Uma diferença também comumente mencionada é a disposição da cadeia: enquanto o DNA apresenta fita dupla, o RNA apresenta geralmente fita simples.

Figura 3. Dogma central da biologia molecular e tradução de proteínas (Snustad *et al.* [1]).



Representação da síntese da proteína β-globina. Primeiramente, ocorre a transcrição do DNA em mRNA, formando trincas codificadoras de aminoácido que serão traduzidas para incorporar os aminoácidos especificados nas sequências, formando as proteínas ao final.

Alguns microrganismos têm como material genético exclusivamente o RNA. É o caso de muitos vírus de importância clínica, que são comumente diagnosticados através de técnicas de biologia molecular [4-7]. Na área clínica e de pesquisa, o RNA também nos fornece dados sobre a expressão gênica que nos permitem elucidar a relação fenotípica e genotípica [8, 9].

O RNA mais comumente lembrado é o mensageiro (mRNA), gerado na etapa de transcrição. No entanto, existe uma gama de subtipos de RNA com características, funções e aplicações próprias, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Diferentes subtipos de RNA.

Abreviaturas	Nome	Tamanho em nucleotídeos	Função
miRNA	MicroRNA	22	Seleciona mRNA complementar para degradação
piRNA	RNA de interação <i>piwi</i>	27	Regula transpósons
rRNA	RNA ribossômico	120, 160 1.868 e 5.025	RNA encontrado em subunidades ribossômicas
snoRNA	Pequeno RNA nucleolar	70	Envolvido no processamento de pré-RNA
snRNA	Pequeno RNA nuclear	100 a 300	Envolvido na recomposição de transcritos gênicos
tRNA	RNA de transferência	70 a 90	Adaptador entre aminoácidos e códons de mRNA durante a síntese polipeptídica

Fonte: adaptado de Snustad *et al.* [1].

1.1.3 Análise de RNA

Devido à imensa quantidade de informação que podemos obter através dos ácidos nucleicos, as análises moleculares vêm ganhando cada vez mais espaço na rotina laboratorial. Através de diversas aplicações em análises clínicas, ambientais, bromatológicas ou forenses, a identificação de ácidos nucleicos fornece informações cruciais para o diagnóstico e para a manutenção da saúde pública [4, 8, 10].

Recentemente, devido à pandemia do coronavírus, presenciamos a importância do diagnóstico rápido de patógenos. No caso do SARS-COV-2, a detecção se deu principalmente através da RT-qPCR [4, 7], que consiste em duas etapas relacionadas. Na primeira etapa, ocorre a transcrição reversa, onde o fluxo do dogma central está invertido: ao invés de sintetizar RNA a partir de um molde de DNA, a enzima transcriptase reversa utiliza o RNA para fabricar um DNA complementar (cDNA). Na segunda etapa, o cDNA obtido é amplificado através da PCR.

Na PCR, fragmentos alvo de DNA são amplificados exponencialmente, de modo a permitir sua análise. Para que isso ocorra, as amostras são submetidas um programa de ciclos em diversas etapas de temperaturas: 1) a 96 °C, ocorre a desnaturação, que é capaz de separar as fitas de DNA, desnaturando, portanto, a dupla hélice; 2) 55-65 °C, ocorre o anelamento dos *primers*, isto é, fragmentos que realizam pareamento com o DNA molde e são iniciadores da extensão da fita que será realizada na etapa 3) a 72 °C, a extensão é a etapa na qual a DNA polimerase adicionará nucleotídeos às sequências dos *primers*, resultando em novas fitas de DNA. Normalmente a DNA polimerase utilizada é a Taq polimerase, que é capaz de resistir a altas temperaturas.

Existem kits comerciais que permitem realizar a transcrição reversa e a PCR no mesmo ensaio. De maneira geral, por questões de custo-benefício, os laboratórios de pesquisa costumam utilizar um kit para cada etapa.

O produto final da RT-PCR, isto é, o fragmento de DNA alvo, pode ser analisado através de técnicas convencionais, como a eletroforese, ou através da PCR em tempo real. Nesse último caso, a leitura ocorre simultaneamente à amplificação, no que chamamos de qPCR ou PCR em tempo real.

Ainda que a PCR seja a técnica mais conhecida, existem alternativas na análise de RNA, como a rt-LAMP [11], EXPAR [12] e sequenciamento de RNA para identificação do transcriptoma [13]. Além disso, é possível utilizar métodos de espectrofotometria [14] e fluorometria [15] que permitem a quantificação do material genético extraído.

Cada método de análise é escolhido de acordo com as possibilidades do laboratório e dos objetivos do analista. No entanto, qualquer que seja o método, deve ser certificado que a etapa preparatória da amostra - que inclui a extração dos ácidos nucleicos - seja executada corretamente, de modo que o resultado final seja claro e conciso.

1.1.4 Extração convencional de RNA

Há inúmeras variáveis a serem consideradas na escolha de uma metodologia de extração que ofereça RNA de qualidade e em quantidade suficiente para a análise a ser executada. Dentre elas, podemos incluir o tipo de RNA alvo, o tipo de matriz, a metodologia de análise a ser utilizada e o objetivo final desta.

De modo geral, o procedimento de extração de ácidos nucleicos consiste em uma etapa inicial de lise das células da amostra e, salvo casos especiais, é procedida pela etapa de purificação. A lise celular pode ocorrer de forma mecânica, enzimática ou química [16]. O rompimento da célula libera as organelas, proteínas e os ácidos nucleicos, sendo necessário purificar a amostra para isolar o ácido nucleico alvo dos demais componentes.

As metodologias de extração mais populares para extração de RNA são extrações líquido-líquido (LLE), destacando-se a técnica do reagente comercial TRIzol® - uma mistura de tiocianato de guanidina e fenol. Esta técnica consiste na lise celular utilizando TRIzol®, que dissolve as proteínas, o DNA e o RNA, procedida por emulsões com clorofórmio [17, 18]. Apesar do excelente custo-benefício e da versatilidade, esta técnica utiliza um volume relativamente grande de solventes, não sendo amigável ao meio-ambiente. Além disso, apresenta risco ao operador por ser uma combinação de um composto tóxico (fenol) com um composto cáustico (tiocianato de guanidina) [19].

Uma outra metodologia que vem sendo utilizada são as *beads* magnéticas, a qual consiste basicamente em uma extração em fase sólida (SPE) [20]. As *beads* magnéticas são esferas positivamente carregadas que conseguem atrair os ácidos nucleicos (cargas negativas) e separá-los facilmente da solução aquosa na qual se encontram. Na sequência, as *beads* (enriquecidas com os ácidos nucleicos) são atraídas por um ímã e conduzidas a processos de dessorção para análise das biomoléculas. Apesar da praticidade das *beads*, costumam ser dispendiosas para laboratórios de menor porte por requerer um equipamento dedicado, e apresentam a inconveniência de formarem agregados que podem interferir na eficiência da extração [21-23].

Outra variante da SPE comumente utilizada é a extração em coluna de sílica. Apesar de ser uma metodologia clássica de extração, tem como limitações a possibilidade de, ocasionalmente, capturar pouco RNA, apresentar dificuldades na dessorção e se tratar de uma técnica laboriosa para o analista.

1.1.5 Desafios da extração de RNA

Conforme apresentado na Tabela 2, a etapa de extração geralmente consiste na utilização de kits que podem ser tóxicos ao meio ambiente e aos profissionais que a realizam, além de serem laboriosas e dispendiosas [22].

Além das dificuldades apresentadas, também devemos levar em consideração o desafio de trabalhar com RNA enquanto analito. Primeiramente, o RNA não se apresenta em grandes concentrações nas amostras. Depois, a sua estrutura pode ser rapidamente degradada logo após a coleta do material biológico devido a presença de endonucleases, particularmente da RNase. Estes dois fatores somados representam já a necessidade de um método de extração que seja capaz de extrair o analito mesmo que este seja naturalmente obtido em baixas concentrações.

Também devemos levar em consideração o trabalho - isto é, o número de etapas - realizado pelo profissional que emprega as técnicas e o tempo que elas requerem. Uma técnica que demanda diversas etapas de centrifugação e ocupa cerca de um turno de trabalho não é ideal para um laboratório de rotina, que requer a entrega de diagnósticos tão rápidos quanto possíveis para os pacientes que os aguardam. Para grandes laboratórios, opções mais dispendiosas são uma possibilidade, mas para laboratórios pequenos ou universidades, as técnicas mais laboriosas acabam vencendo frente ao custo-benefício. Entretanto, mesmo no caso de uma pesquisa acadêmica podemos afirmar que um pesquisador poderia ter o tempo otimizado utilizando técnicas que são mais rápidas, realizando mais experimentos ou mais rapidamente contribuindo com resultados experimentais para a sociedade. Obviamente, também não podemos desconsiderar o prejuízo à saúde e ao meio-ambiente que diversas técnicas podem ocasionar.

Tabela 2. Principais kits de extração de RNA, suas vantagens e limitações.

Técnica	Amostras	Vantagens	Limitações
TRizol	Bactérias, leveduras, sangue, células, plantas, tecidos, amostras virais, leveduras.	Eficiência, versatilidade.	Toxicidade dos reagentes, grandes volumes de solventes, laborioso, resquícios dos reagentes podem inibir a amplificação.
Beads magnéticas	Células e tecidos de mamíferos, plantas.	Menor risco de contaminação, versátil.	Dispendioso, requer equipamento específico.
Colunas de extração	Sangue, células, tecidos, bactérias, amostras virais, leveduras.	Eficiência, custo relativamente menor.	Quantidade de RNA limitada, laborioso.

Podemos observar que tanto o custo quanto a composição das fases extratoras ocasionam grande parte das dificuldades na extração de RNA. Por isso, estudos buscando alternativas são cada vez mais necessários [12, 14, 24, 25]. Dentre as fases extratoras que vêm ganhando destaque, temos os Líquidos Iônicos (ILs) e suas variações [26-28].

1.2 Líquidos Iônicos

IL é uma denominação comum para uma variedade de substâncias salinas compostas por um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C - muitas vezes fundidos à temperatura ambiente, os chamados *Room Temperature Ionic Liquids (RTILs)* [29]. De modo geral, apresentam as seguintes características [30, 31]:

- i. alta estabilidade química e eletroquímica;
- ii. alta estabilidade térmica: baixa temperatura de fusão e elevada temperatura de ebulição. Não são inflamáveis;
- iii. pressão de vapor desprezível;
- iv. alta condutividade iônica;
- v. propriedades de solvatação customizáveis [32, 33].

Os ILs foram descobertos há cerca de um século [29] e, desde então, têm sido explorados nas mais diversas áreas. Os estudos mais recentes de sua aplicação vão desde a composição de estruturas, como baterias de lítio-íon [34] e supercapacitores [35], até aplicações na área de química analítica, com exemplos na separação por cromatografia [31]. Como grande parte dos ILs possuem propriedades hidrofóbicas, estes compostos também vêm sendo estudados em diversos protocolos de extração de moléculas e biomoléculas [29].

A gama de aplicações variada se deve às modificações, ou ainda, à escolha do cátion e do ânion que compõe o IL e acarretará alterações, em maior ou menor grau, nas propriedades previamente mencionadas. A escolha do cátion e do ânion pode, ainda, acarretar alterações na viscosidade do IL, tornando-o mais propício

para uma técnica de separação, por exemplo. Desse modo, cabe ao pesquisador selecionar o IL mais indicado para sua aplicação.

As diferentes estruturas químicas ocasionadas pela alteração dos componentes dos ILs geram algumas subclassificações, tais como ILs sem a presença de um próton livre (*aprotic ionic liquids*) ou com um próton livre no cátion (*protic ionic liquids*) [34]. Além disso, as alterações na estrutura levam não só a modificação de propriedades existentes, como também ao surgimento de novas. É o caso dos líquidos iônicos magnéticos (MILs) [36].

1.2.1 Líquidos Iônicos Magnéticos

Os MILs são uma subclasse dos ILs produzidos pela inserção de um componente paramagnético (geralmente metais de transição ou lantanídeos) na estrutura do cátion ou do ânion do IL [36]. Como resultado, apresentam forte resposta a campos magnéticos externos, característica largamente explorada nas extrações líquido-líquido com MILs [37-39]. Também apresentam baixa volatilidade, dispensando cuidados extras com a perda da fase extratora [38]. Além disso, a praticidade de recuperar o solvente (MIL) com facilidade utilizando um ímã abre espaço para automação de sistemas extratores, conforme já demonstrado em estudos anteriores [39,40].

Desde os primeiros MILs descritos em 2004 [41], muito se tem estudado sobre eles. Os primeiros MILs descritos possuíam ferro na sua estrutura, o que por vezes ocasionava alteração nas análises que necessitavam de temperaturas elevadas, como a PCR, devido a hidrólise do ferro [32]. Mais recentemente, cerca de 20 novos MILs foram sintetizados, o que prova a variabilidade que estes componentes possuem [42].

1.3 Técnicas de extração com MILs

1.3.1 Microextração

A miniaturização de técnicas de extração vai ao encontro dos esforços recorrentes no caminho da química analítica verde (*green analytical chemistry*), ou ainda, do recente conceito da química analítica branca (*white analytical chemistry*) [43]. Recentemente, técnicas de microextração envolvendo líquidos iônicos (IL) vêm sendo estudadas como alternativa às extrações convencionais. Nesse caso,

podem ser obtidas extrações eficientes, eficazes e pouco tóxicas, garantindo uma metodologia mais segura e economicamente viável sem perda na qualidade do analito.

Conforme mencionado previamente, os ILs e os MILs podem ter seus componentes selecionados de acordo com a necessidade analítica. Desse modo, é possível escolher a estrutura de acordo com o analito a ser extraído. Assim, temos três características que destacam os MILs como fase extratora em sistemas aquosos: 1) hidrofobicidade 2) seletividade do MIL e 3) propriedade magnética.

1.3.2 MILs na extração de ácidos nucleicos

Muitas pesquisas têm mostrado a viabilidade da extração de ácidos nucleicos com ILs e MILs, este último principalmente tendo como alvo o DNA [26, 27, 32]. Em relação às microextrações utilizando MILs como solventes extratores, quando comparados a outras técnicas, como as *beads* magnéticas, os MILs apresentam resultados promissores na quantificação e amplificação do DNA [28]. Recentemente foi publicada a primeira pesquisa utilizando MILs para extração de RNA. O estudo abre possibilidades para métodos de extração eficientes e mais viáveis economicamente do que os métodos disponíveis atualmente [44]. A maior aplicabilidade que se pode pensar para a extração de RNA no momento certamente remete a análise de RNA viral. Os métodos mais utilizados para extração de RNA são baseados em extrações envolvendo fenol e clorofórmio e SPE que, como mostrado anteriormente, apresentam desvantagens como toxicidade e quantidade limitada de RNA extraído.

Um dos maiores desafios na análise de RNA é a sua instabilidade, uma vez que é uma molécula suscetível a ação de endo e exonucleases. Protegê-la desses e outros fatores desde o momento da coleta do material até a etapa de análise é essencial para o bom desenvolvimento da técnica. Com a lise celular, o RNA pode entrar em contato com endonucleases. Para evitar esses problemas, é comum o congelamento da amostra ou utilização de soluções inibidoras de endonucleases, conservando assim o RNA por mais tempo. Os MILs vêm mostrando não apenas sua capacidade de extração, mas também de preservação de DNA [33] e RNA [24] da ação de endonucleases, permitindo armazenamentos seguros da amostra por 24h mesmo a temperatura ambiente. A Tabela 3 apresenta um resumo dos estudos

publicados na extração de ácidos nucleicos até o momento. Nela está evidente que a extração de RNA utilizando MILs foi explorada apenas recentemente e se volta para a extração de RNA de micro-organismos através da microextração dispersiva.

1.4 Justificativa

Este estudo se propôs a sintetizar e caracterizar o MIL $[P_{6,6,6,14}^+][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$, bem como avaliar sua capacidade e eficiência na microextração de RNA total de camundongo para posterior análise em RT-qPCR. Além disso, este estudo inova o campo ao aplicar a microextração em gota única (SDME) e aumentar a frequência analítica aplicando uma plataforma de extração. Como a SDME emprega poucos microlitros de solvente extrator (MILs), os impactos causados pelos reagentes no meio ambiente, bem como os custos por análise, são significativamente reduzidos, facilitando inclusive os experimentos realizados dentro da Instituição e proporcionando futuras colaborações com grupos que tenham linhas de pesquisa direcionadas aos estudos de biomoléculas como RNA e DNA.

Tabela 3. Estudos publicados até o momento referentes à extração de ácidos nucleicos utilizando MILs (Adaptado de Alves *et al.* [37]).

Analito	Matriz / Amostra	MILs	Quantidade	Técnica de Extração	Tempo de extração (min)	Instrumentação	Ref. / Ano
ssDNA dsDNA	Solução aquosa e células bacterianas	$[N_{8,8,8,B^+}][FeCl_3Br^-]$ $[(C_{16}BnIM)_2C_{12}^{2+}][NTf_2^-]$ $FeCl_3Br^-$ $[P_{6,6,6,14^+}][FeCl_4^-]$	20 μ L	DDE SDE	<1 (DDE) 120 (SDE)	HPLC-UV/Vis Eletroforese	[32] 2015
<i>Salmonella</i> -specific DNA	Leite fortificado	$[P_{6,6,6,14^+}][Co(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Ni(hfacac)_3^-]$	15 μ L	DDE	0,5	RPA	[45] 2019
dsDNA	Solução aquosa	$[Co(BIM)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$ $[Co(BIM)_4^{2+}]_2[Cl^-]$ $[Ni(BIM)_4^{2+}]_2[Cl^-]$ $[Ni(BzIM)_4^{2+}]_2[Cl^-]$ $[Ni(BIM)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$ $[Ni(BzIM)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$ $[P_{66614^+}][Ni(II)(hfacac)_3^-]$ $[Mn(OIM)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$ $[Mn(BIM)_4^{2+}]_2[Cl^-]$ $[Mn(BIM)_4^{2+}]_2[NTf_2^-]$	-	<i>In situ</i> DLLME	3	HPLC-DAD Espectroscopia por fluorescência	[46] 2019
ssDNA dsDNA	Plasma fortificado	$[P_{6,6,6,14^+}][Mn(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Mn(CF_3Phacac)_3^-]$	1 μ L	ITO/DTO-MIL	10	HPLC-UV qPCR	[47] 2019
ctDNA	Plasma diluído	$[N_{8,8,8,Bz^+}][Ni(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Ni(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Ni(Phfacac)_3^-]$	6 e 8 μ L	DLLME	2-3	Multiplex-qPCR	[48] 2020

Analito	Matriz / Amostra	MILs	Quantidade	Técnica de Extração	Tempo de extração (min)	Instrumentação	Ref. / Ano
ctDNA	Plasma diluído	$[N_{8,8,8,Bz^+}][Mn(hfacac)_3^-]$ $[N_{8,8,8,Bz^+}][Mn(hfacac)_2(P_hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Mn(hfacac)_3^-]$	4 – 8 μ L	ITO-MIL	1-3	qPCR	[49] 2019
ctDNA	Sangue, plasma diluído	$[N_{8,8,8,Bz^+}][Mn(hfacac)_2(P_hfacac)_3^-]$ $[N_{8,8,8,Bz^+}][Mn(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Mn(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Mn(P_hthfacac)_3^-]$	1 μ L	ITO-MIL	1-3	qPCR	[50] 2020
ctDNA	Plasma diluído, urina artificial, escarro artificial	$[P_{6,6,6,14^+}][Mn(hfacac)_3^-]$ $[N_{8,8,8,Bz^+}][Mn(hfacac)_3^-]$	-	ITO-MIL	-	HPLC qPCR	[44] 2017
ITS-sequence specific DNA	Lisado celular de plantas	$[P_{6,6,6,14^+}][Mn(hfacac)_3^-]$	-	ITO-MIL	10-15	qPCR	[51] 2019
dsDNA	Sangue total	$[N_{8,8,8,Bz^+}][Ni(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Ni(P_hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Gd(hfacac)_4^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Dy(hfacac)_4^-]$	2-9 μ L	DDE	0,25 - 2	qPCR	[52] 2020
dsDNA	Solução de células lisadas	$[P_{6,6,6,14^+}][Ni(II)(hfacac)_3^-]$ $[P_{6,6,6,14^+}][Co(II)(hfacac)_3^-]$	2 μ L	SDE	5	LAMP IMSA	[53] 2019

Analito	Matriz / Amostra	MILs	Quantidade	Técnica de Extração	Tempo de extração (min)	Instrumentação	Ref. / Ano
RNA	Solução aquosa	[P _{6,6,6,14} ⁺][Co(hfacac) ₃ ⁻] [P _{6,6,6,14} ⁺][Co(P _h tfacac) ₃ ⁻] [P _{6,6,6,14} ⁺][Ni(hfacac) ₃ ⁻] [P _{6,6,6,14} ⁺][Mn(hfacac) ₃ ⁻] [P _{6,6,6,14} ⁺][Ni(P _h tfacac) ₃ ⁻]	5 µL	SDE	60	RT-qPCR Eletroforese	[24] 2020
microRNA	Plasma diluído, urina e saliva artificiais	[P _{6,6,6,14} ⁺][Ni(II)(hfacac) ₃ ⁻] [P _{6,6,6,14} ⁺][Co(II)(hfacac) ₃ ⁻] [P _{6,6,6,14} ⁺][Mn(hfacac) ₃ ⁻]	6 µL	DLLME	1	EXPAR	[12] 2022
RNA	Células de levedura	[TMDPG] ²⁺ [NiCl ₂ (PF ₆) ₂] ²⁻	0,001 g	Extração auxiliada por vórtex	2	Espectrofotometria	[14] 2022

ctDNA: circulating tumor DNA; DAD: diode array detector; DDE: Dispersive Droplet Extraction; DLLME: Dispersive liquid-liquid microextraction; dsDNA: Double stranded DNA; DTO: disubstituted ion-tagged; ETAAS: electrothermal atomic absorption spectrometry; gDNA: DNA genômico; IMSA: isothermal multiple-self-matching-initiated amplification; ITO: ion-tagged oligonucleotide; LAMP: loop-mediated isothermal amplification; RT-qPCR: Reverse transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction; SDE: Single drop extraction; SDME: Single drop microextraction; ssDNA: Single stranded DNA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia alternativa para a microextração de RNA com a aplicação de líquido iônico magnético.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o MIL $[P_{6,6,6,14}^+][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$;
- Avaliar a estabilidade da configuração utilizando SDME e MIL para a extração de RNA;
- Examinar a possibilidade do MIL interferir na reação de PCR;
- Avaliar a capacidade de extração de RNA utilizando o MIL sintetizado como solvente de extração;
- Avaliar a influência do tempo na extração de RNA utilizando SDME e MIL.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Para a síntese do MIL $[P_{6,6,6,14^+}][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$ foi utilizado um agitador magnético (Fisatom 752 A) e um rota evaporador. A caracterização do MIL foi realizada através de um espectrômetro de massas micrOTOF-Q™ III (Bruker Corporation, Alemanha) e os dados foram processados utilizando o software *Data Analysis* e *HyStar™*.

Para o procedimento de extração, foi utilizado um *Orbital Shaker* - AG-200 (Comecta). A produção de cDNA ocorreu em um termociclador (*2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems™*). Os resultados da extração foram analisados por PCR em tempo real (*Step One Plus, Applied Biosystems™*). Nas etapas onde foram necessárias quantificação do material genético, foi utilizado o espectrofotômetro BioSpec-nano® (Shimadzu, Japão).

3.2 Reagentes e padrões

3.2.1 Síntese dos MILs

Para a síntese do MIL $[P_{6,6,6,14^+}][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$ utilizou-se cloreto de trihexiltetradecil fosfônio (95%), hidróxido de amônio (30%) e 1,1,1,5,5,5-hexafluoracetilacetona (99%) da empresa *Sigma Aldrich* (Missouri, EUA), cloreto de níquel hexahidratado (99%) da Êxodo Científica (Sumaré, Brasil) e metanol e etanol (99,9%) grau LC/MS da empresa *Merck* (Darmstadt, Alemanha).

3.2.2 Transcriptase reversa e qPCR

Para a produção do cDNA foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit*, da *Applied Biosystems™*. A qPCR foi realizada utilizando *PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix*, da *Applied Biosystems™*. Um par de *primers* para o gene *Actb* (beta-actina) desenhado para camundongos foi escolhido, sendo *Primer Forward* TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG e *Primer Reverse* TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT. A água ultrapura foi obtida no purificador Milli-Q® do Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

3.3 Amostras para estudo

3.3.1 Amostras puras de RNA

As amostras de RNA foram cedidas pela professora Márcia Giovenardi. Foram utilizadas amostras de RNA, previamente extraídas, obtidas a partir do hipotálamo de camundongos machos e conservadas em água. Uma dessas amostras, já testada previamente para os *primers* deste estudo, serviu como controle positivo para as análises de qPCR. Ao todo, foram cedidas 36 amostras de RNA.

3.3.2 Extração prévia das amostras de RNA

Para a obtenção do RNA que foi avaliado nas extrações envolvendo SDME, primeiramente foi realizada a extração com TRIzol® (Invitrogen, Brasil), de acordo com instruções do fabricante e descrito previamente [18]. As etapas seguiram conforme descrito:

1) Fase de separação: cada amostra de hipocampo de camundongo foi homogeneizada em 600 µL de TRIzol® por cerca de 20 s. As amostras já homogeneizadas foram então deixadas por 3 min a temperatura ambiente. Em seguida, 120 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIzol foi adicionado às amostras. O conteúdo foi agitado por 15 s e novamente deixado à temperatura ambiente por 3 min. Seguiu-se então para centrifugação por 15 min a 12.000 xg, 4 °C.

2) Fase de precipitação: a fase aquosa foi transferida para outro tubo com 300 µL de isopropanol, seguida de vórtex por 15 s. Depois, foi colocada na centrífuga por 10 min a 12.000 xg, 4 °C. Após a centrifugação, ocorreu a formação de pellet de RNA e o sobrenadante foi removido.

3) Fase de lavagem de RNA: para a lavagem, foram adicionados 600 µL de etanol, agitados cuidadosamente a fim de liberar qualquer *pellet* preso à parede do tubo. Em seguida, ocorreu centrifugação por 5 min a 7.500 xg, 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o *pellet* secou em banho maria por 5-10 min a 50 °C. Foi realizada ressuspensão com 20 µL de água+DEPC, seguida de incubação em banho maria novamente por 5 min a 50 °C.

Ao término da extração com TRIzol, foi realizada a espectrofotometria para verificar a qualidade e a concentração do material extraído.

3.3.3 Preparo das amostras para extração

As amostras de RNA extraídas com TRIzol apresentaram volume total de 20 μL e concentrações entre 146 e 919 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Essas amostras foram diluídas a fim de obter as concentrações finais de 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ e 6 $\text{ng}/\mu\text{L}$ em 1 mL de água ultrapura. Desta forma, as diluições são as amostras aquosas utilizadas para a avaliação do sistema de microextração proposto neste estudo.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Síntese do MIL

A síntese e a caracterização do MIL $[\text{P}_{6,6,6,14^+}][\text{Ni(II)(hfacac)}_3^-]$ foi realizada de acordo com procedimentos previamente estabelecidos [39, 54]. Inicialmente, foram adicionados 10 mmol de hexafluoroacetilacetona a uma mistura contendo 30 mL de etanol e 10 mmol de hidróxido de amônio, em um frasco previamente selado com septo de borracha. Após sedimentação do vapor branco gerado nesta primeira etapa da reação, foram adicionados 3,3 mmol de cloreto de níquel(II) hexahidratado. O frasco da reação foi novamente selado e seguiu para agitação por 12 h à temperatura ambiente. O solvente foi então removido sob pressão reduzida e o produto foi redissolvido em 20 mL de éter dietílico. Após lavagens com 5 mL de água, o éter foi removido sob pressão reduzida e o sal produzido foi submetido à secagem *overnight* a 50 °C. Esta primeira etapa da reação está mostrada no esquema da Figura 4.

Em seguida, foi então adicionado 1 mmol de cloreto de trihexil(tetradecil)fosfônio para cada 1 mmol do produto obtido, seguido de dissolução em metanol e agitação *overnight* à temperatura ambiente. Por fim, após evaporação do solvente e etapas de lavagem com água, o produto foi colocado na estufa novamente *overnight* a 50 °C. Ao término desse período, o MIL $[\text{P}_{6,6,6,14^+}][\text{Ni(II)(hfacac)}_3^-]$ foi obtido e armazenado em frascos para posterior utilização nas microextrações. Esta segunda etapa do procedimento sintético está mostrada no esquema da Figura 5.

Figura 4. Etapa 1: síntese da porção aniônica $[\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3]^-$. (Adaptado de Pierson *et al.* [54]).

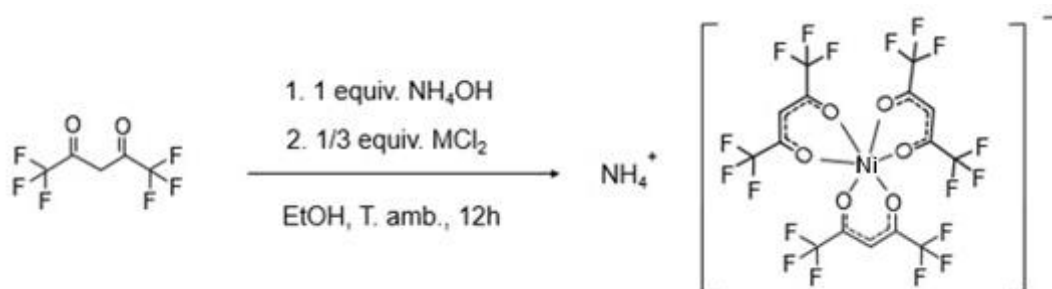
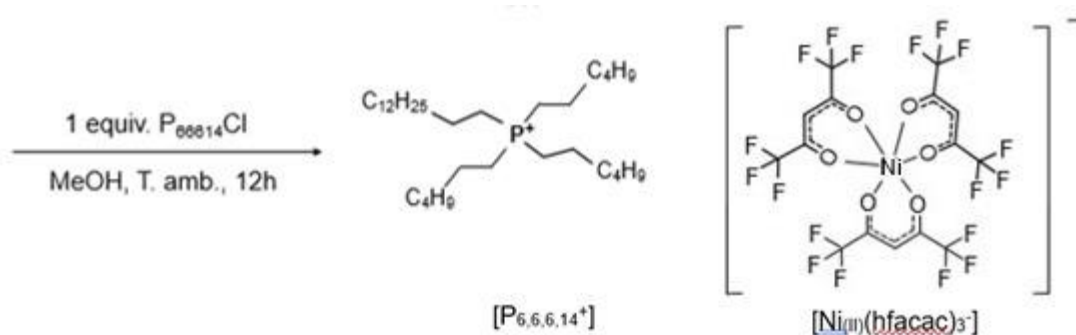


Figura 5. Etapa 2: união da porção $[\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3]^-$ com a porção catiônica $[\text{P}_{6,6,6,14}]^+$ e a obtenção do MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}]^+[\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3]^-$. (Adaptado de Pierson *et al.* [54]).



3.4.2 Caracterização do MIL

Para caracterização, foi utilizado um espectrômetro de massas micrOTOF-Q™ III (Bruker Corporation, Alemanha). O processamento dos dados foi realizado nos softwares Data Analysis e HyStar™. O processo foi realizado com a injeção direta do MIL (concentração de 1,0 ng/mL) diluído em acetonitrila grau LC/MS da marca Merck (Darmstadt, Alemanha). A caracterização da porção catiônica ($[\text{P}_{6,6,6,14}]^+$) foi realizada no modo de ionização positivo, utilizando os seguintes parâmetros: energia do capilar em 5500 V; temperatura de secagem de 250° C; fluxo de gás de nebulização de 3.0 bar; fluxo de gás de secagem de 9,0 L/min; tempo de transferência iônica de 35 μs ; energia de fragmentação 0 eV; e intervalo de massa monitorado de m/z 50 – 500, adquirido com uma frequência de aquisição de 1 Hz.

Para caracterização da porção aniônica ($[\text{Ni}_{(\text{II})}(\text{hfacac})_3]^-$), no modo de ionização negativo, utilizou-se os seguintes parâmetros: energia do capilar de 4500 V; temperatura de secagem de 200° C; fluxo de gás de nebulização de 3.0 bar;

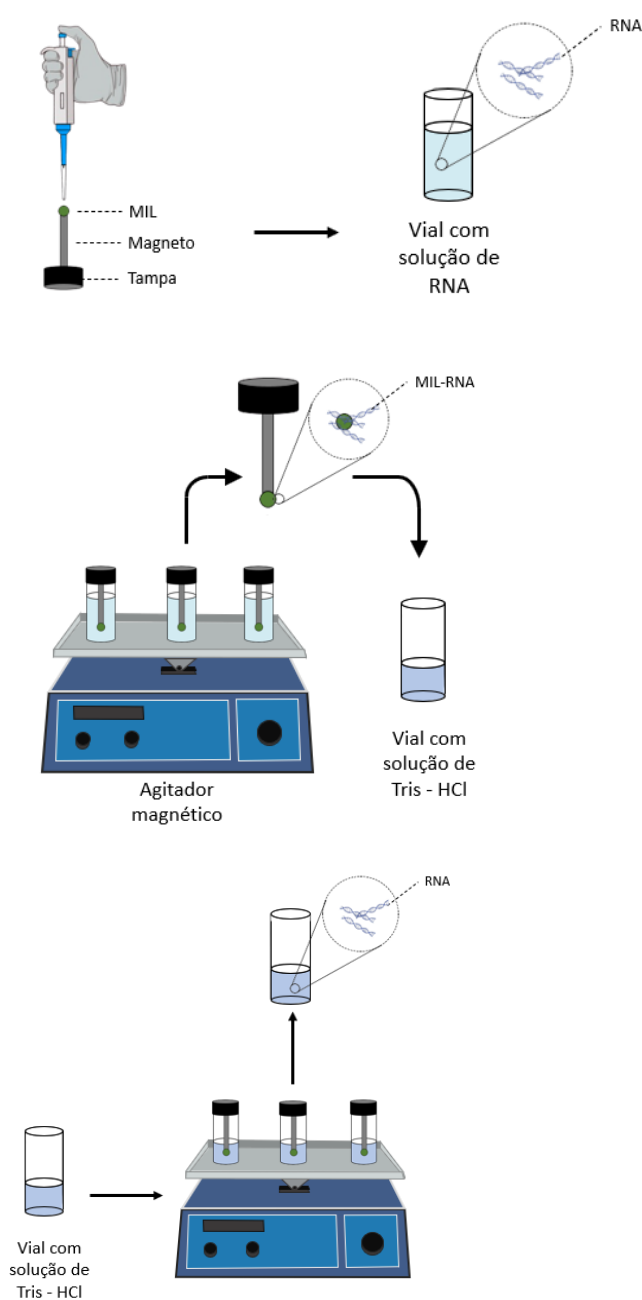
fluxo de gás de secagem de 8,0 L/min; tempo de transferência iônica de 120 μ s; energia de fragmentação 0 eV; e intervalo de massa monitorado de m/z 50 – 800, adquirido com uma frequência de aquisição de 1 Hz.

3.4.3 Procedimento de microextração

A microextração de RNA foi realizada através de uma SDME. A SDME-MIL utilizada neste caso, consiste em duas etapas: a de extração e a de dessorção. Na primeira etapa, por intermédio de um magneto, uma gota de aproximadamente 6 μ L do MIL $[P_{6,6,6,14^+}][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$ foi colocada fixada na extremidade do imã e posta em contato com 1 mL da solução aquosa de RNA. Devido à forte atração do MIL, este se manteve estável durante ambas as etapas (extração e dessorção).

No primeiro teste, foi realizado um mix de três amostras na concentração de 169,33 ng/ μ L, totalizando 60 μ L de volume. Em um tubo Falcon realizou-se a diluição com água ultrapurificada para totalizar o volume de 3.000 μ L na concentração de 3,39 ng/ μ L de RNA. Por fim, este volume foi dividido em três frascos, realizando, portanto, uma triplicata de 1.000 μ L na concentração de 3 ng/ μ L. O MIL interagiu com a solução da amostra de água fortificada com RNA por 30 min a 200 rpm em um agitador orbital. Em seguida, na segunda etapa, o magneto contendo o MIL enriquecido com o RNA foi inserido em uma solução de 200 μ L de Tris-HCL para dessorção, iniciando nova agitação por 10 min a 80 rpm. Os demais testes seguiram mesmo modelo, nas concentrações finais de: 4,13 ng/ μ L, 5,78 ng/ μ L e 6 ng/ μ L. O esquema geral de microextração está representado na Figura 6.

Figura 6. Esquema geral da microextração. (Adaptado de Ferreira Neto *et al.*, 2022 [55]).



A) PREPARAÇÃO:

- Inicialmente foi pipetado 6,5 μ L de MIL na ponta de um magneto alocado em uma tampa de frasco.
- Posteriormente, a tampa foi colocada em um frasco contendo uma solução fortificada com RNA.

B) ETAPA DE EXTRAÇÃO:

- Para a etapa de extração, os frascos foram colocados em um agitador magnético simultaneamente.
- Nesta etapa as condições trabalhadas foram:

- Tempo de extração: 15 ou 30 min;
- Volume de solução: 1 mL;
- Velocidade de agitação: 200 rpm.

C) ETAPA DE DESSORÇÃO:

- Ao término da etapa de extração foi retirada a tampa com o magneto do frasco com a solução inicial e colocado em um outro frasco contendo Tris-HCl.
- Esta representa a etapa de dessorção, onde as condições trabalhadas foram:

- Tempo de extração: 10 min;
- Volume de solução: 200 μ L;
- Velocidade de agitação: 80 rpm.

- Por fim, a solução de dessorção seguiu para a etapa de síntese de cDNA.

3.4.4 Síntese de cDNA

Após a extração, 10 μ L da solução de dessorção foram adicionados ao mix de reagentes para transcrição reversa, preparado de acordo com instruções do fabricante. A reação ocorreu em um termociclador convencional. A fim de avaliar a

eficiência da produção do cDNA e qualidade da amostra, uma alíquota da solução mãe foi armazenada para ser utilizada como controle positivo.

3.4.5 Amplificação em qPCR

Para amplificação em qPCR, o esquema de temperaturas foi programado de acordo com a ficha de informações do reagente (PowerUP SYBR Green Master Mix) para ensaio de expressão: 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 s e 60 °C por 30 s.

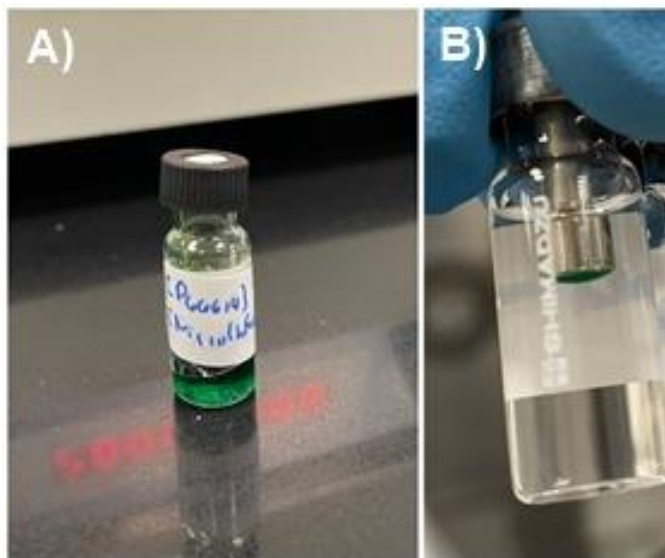
O mix de reagentes foi composto por 7,5 µL do Master Mix e 0,5 µL de cada *primer*. No caso das amostras controle, foram adicionados 5,5 µL de água ultrapura a fim de completar o volume total de 15 µL. Nesse caso, utilizou-se apenas 1 µL de cDNA. Já no caso do cDNA proveniente das amostras descritas em 3.3.3, que estava em menor concentração devido a diluição, utilizou-se 6,5 µL de cDNA.

4. RESULTADOS

4.1 Síntese e aspecto visual do MIL

Em um primeiro momento, verificou-se que o MIL $[P_{6,6,6,14}^+][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$ apresentava as características visuais descritas na literatura [39, 54]: coloração verde intensa, elevada viscosidade, hidrofobicidade e capacidade de interagir com um campo magnético aplicado externamente (Figura 7). Esse conjunto de características indicou que a síntese ocorreu de acordo com o esperado, seguindo-se para a fase de confirmação através da caracterização.

Figura 7. Características visuais do $[P_{6,6,6,14^+}][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$.



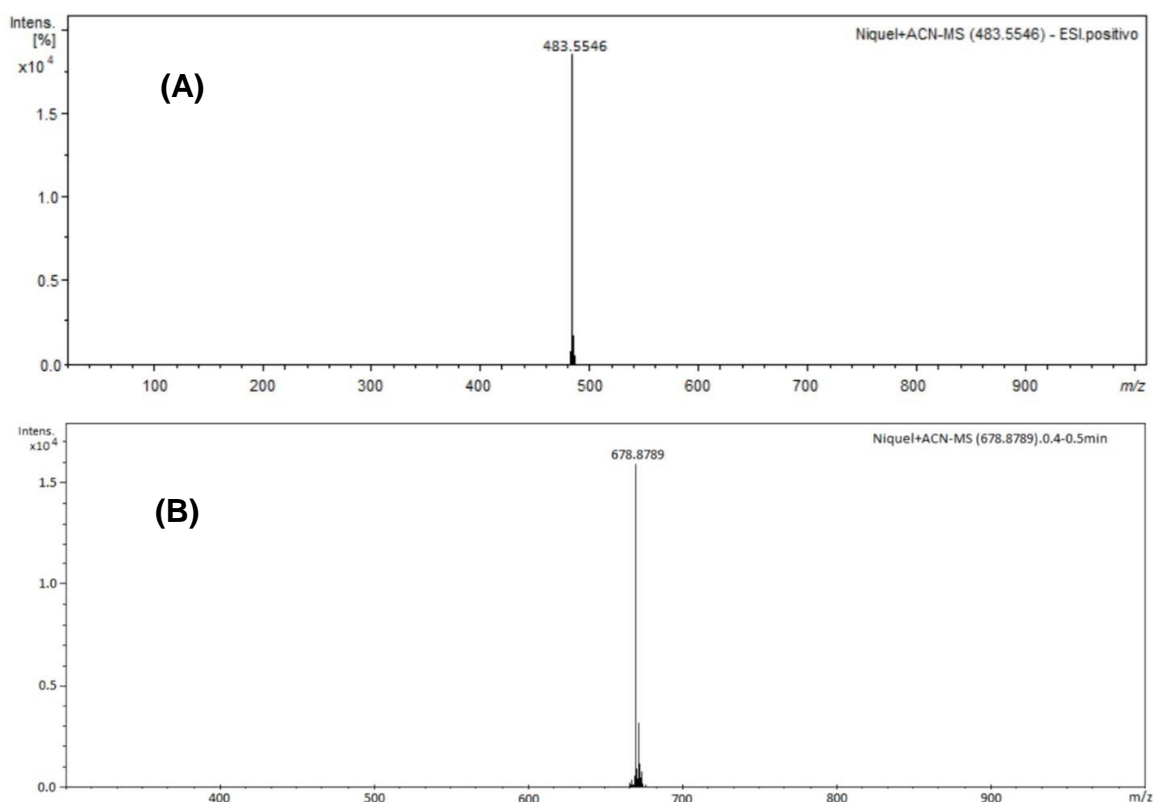
A) coloração verde e aspecto viscoso; B) visualização da hidrofobicidade e da resposta magnética.

4.2 Caracterização do MIL

Conforme descrito em 3.4.2, a caracterização ocorreu com a obtenção dos espectros de massas das porções catiônica e aniônica do MIL e, com o espectrômetro de massas operando em modo positivo e negativo, respectivamente.

O $[P_{6,6,6,14^+}]$, de fórmula estrutural $C_{32}H_{68}P^+$, apresenta massa exata de 483.85 g/mol e m/z observado de 483.5546 (Figura 8A). Já o $[Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$, de fórmula estrutural $C_{15}H_3NiF_{18}O_6$, apresenta massa exata de 679.84 g/mol e m/z observado de 678.7889 (Figura 8B).

Figura 8. Espectros de massa das porções catiônica e aniônica do $[P_{6,6,6,14}]^{+}([Ni_{(II)}(hfacac)_3]^{-})$.



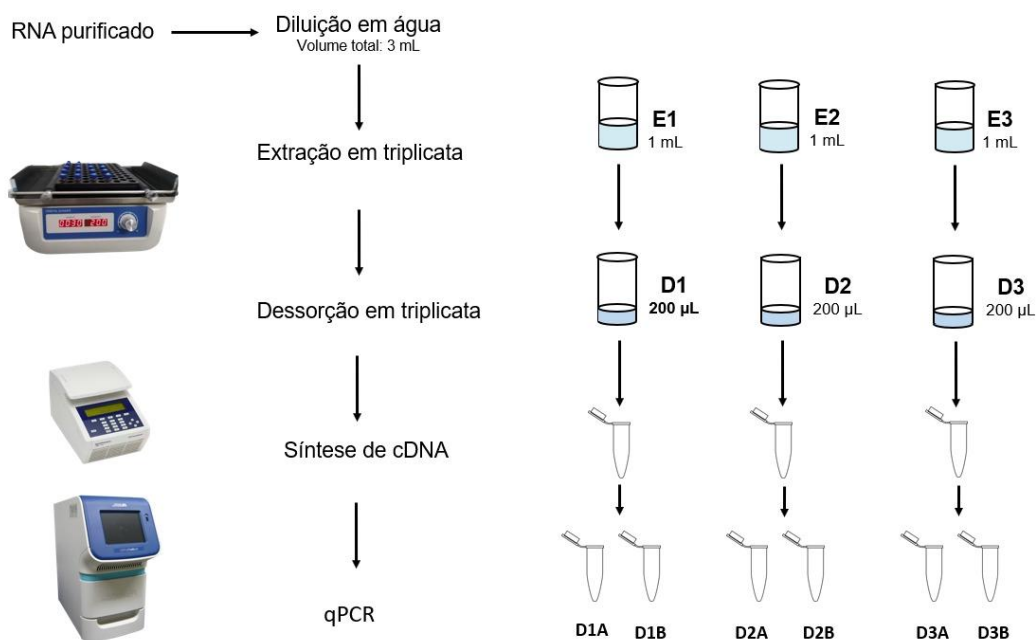
A) Porção catiônica ($[P_{6,6,6,14}]^{+}$) do MIL, ESI⁺, 1,0 ng/mL. B) Porção aniônica ($[Ni_{(II)}(hfacac)_3]^{-}$) do MIL, ESI⁻, 1,0 ng/mL.

4.3 Leitura dos resultados da microextração

Na PCR, foi realizada uma leitura em duplicata de cada amostra extraída por SDME, conforme ilustrado no esquema mostrado na Figura 9.

Conforme visualizado na Figura 10, não houve reprodutibilidade nos resultados. A amostra D1 não apresentou amplificação, enquanto a amostra D2 amplificou nas duplicatas da PCR, apresentando Ct (*threshold cycle*) de 37,01 e 36,05 para D2A e D2B, respectivamente. Já a amostra D3 amplificou apenas para uma das duplicatas da PCR, que apresentou Ct de 35,49.

Figura 9. Esquema da nomenclatura das amostras durante o procedimento.



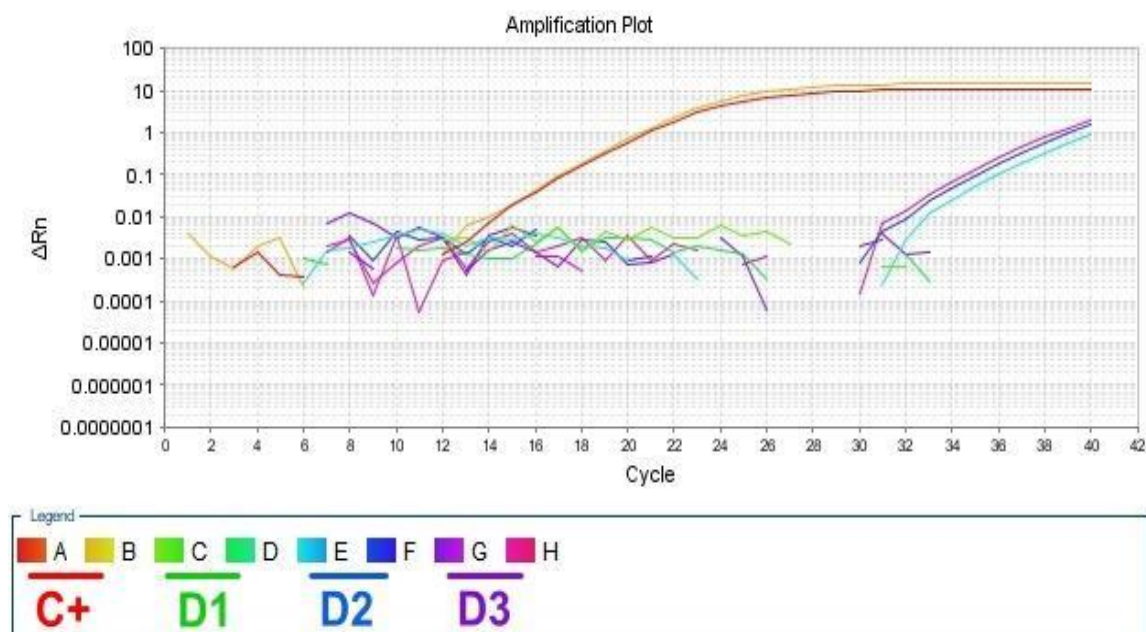
E1, E2, E3: Extração 1, Extração 2, Extração 3 (triplicatas da mesma amostra diluída). D1, D2, D3: Dessorção da E1, Dessorção da E2, Dessorção da E3. D1A, D1B: duplicatas da D1; D2A, D2B: duplicatas da D2; D3A, D3B: duplicatas da D3.

A fim de confirmar os resultados e buscando uma maior reprodutibilidade, as condições de extração foram reproduzidas em um novo teste, desta vez em quadruplicata. Neste caso, apenas os controles positivos amplificaram e as extrações não apresentaram resultados positivos quanto à amplificação.

A fim de investigar se o MIL poderia estar causando inibição na PCR, foi feita uma simulação da etapa da dessorção. Duas amostras de RNA diluídas em Tris-HCl na concentração de 6 ng/µL foram colocadas sob agitação a 80 rpm por 10 min. Durante a agitação, uma amostra estava em contato constante com o MIL suspenso pelo magneto, tal qual ocorre na dessorção normal. A outra estava em contato apenas com o magneto sem a presença do MIL. As duas amostras foram amplificadas, sendo que a amostra que estava em contato com o MIL mostrou valor de Ct de 25,39 enquanto a outra apresentou Ct de 29,71 (Figura 11). O valor de Ct indica o ciclo no qual a fluorescência produzida pela amostra é detectada. Assim, um baixo valor de Ct indica que a amostra foi detectada nos primeiros ciclos de

amplificação e, portanto, apresenta uma maior concentração e/ou qualidade do analito.

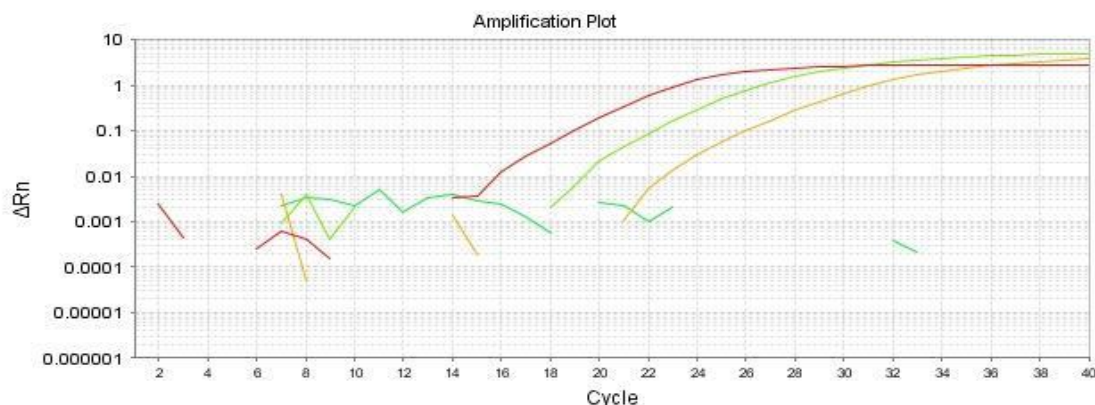
Figura 10. Amplificação em qPCR do primeiro teste de extração.



C+ = controle positivo.

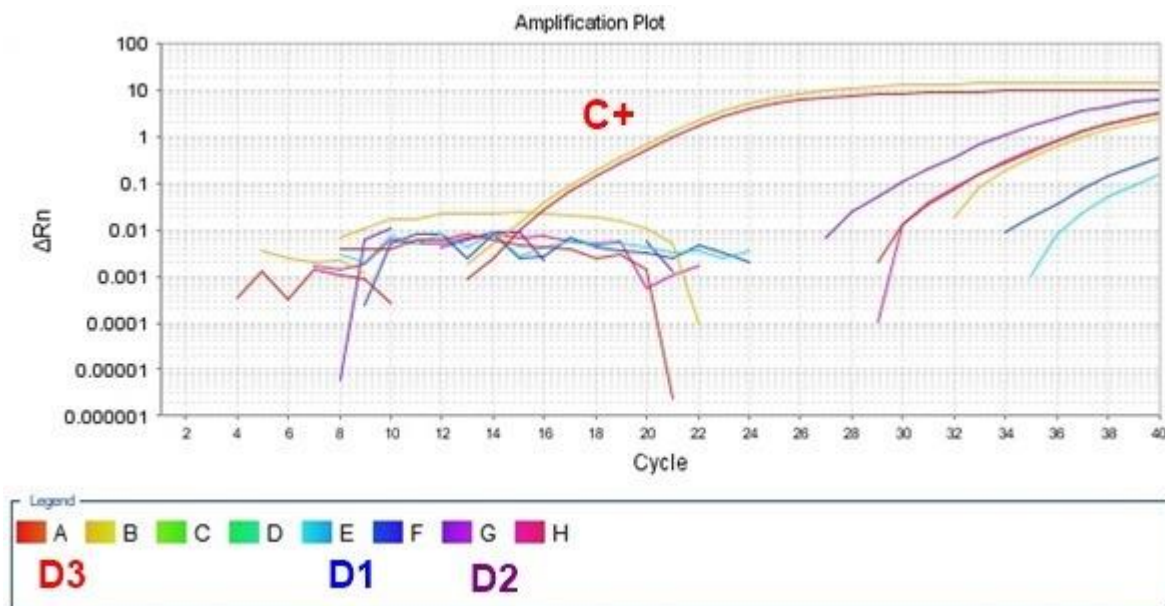
No teste comprobatório, a concentração da solução estoque foi aumentada para 6 ng/μL. Para testar se o tempo de extração poderia estar influenciando no primeiro resultado, foram realizados dois conjuntos de experimentos simultaneamente. Um deles consistiu na reprodução das condições do teste inicial, isto é, uma extração de 30 min a 200 rpm e dessorção de 10 min a 80 rpm, em triplicata (resultado mostrado na Figura 12). No segundo conjunto de experimentos, também em triplicata, o tempo de extração foi reduzido para 15 min. No segundo conjunto de experimentos foi possível observar uma menor variação nos valores de Ct, de 24,8 a 28,04, enquanto o primeiro conjunto variou de 28,01 a 36,9 (Figura 13).

Figura 11. Amplificação em qPCR obtida no teste de uma possível interferência do MIL



Amplificação das amostras simuladas na dessorção. Em vermelho, o controle positivo. Em verde, a amostra que entrou em contato com o MIL e em amarelo a que não entrou em contato com o MIL.

Figura 12. Amplificação do teste comprobatório de 30 minutos de extração.



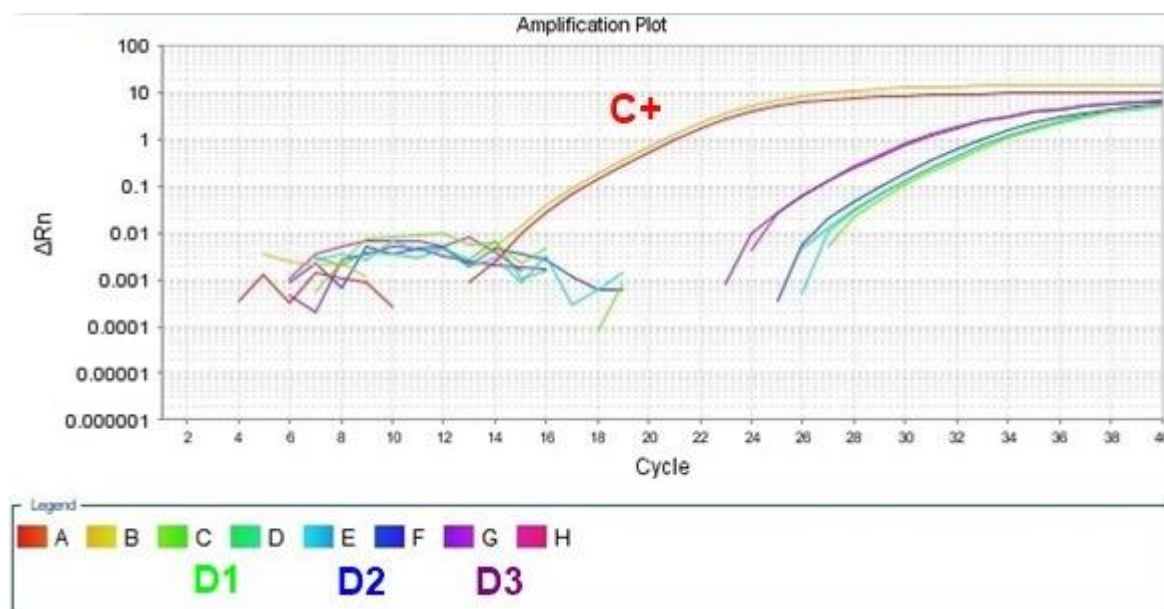
Ct: D1A, 36,9; D1B 35,3; D2A, 28,01; D2B, 30,52; D3A, 30,57; D3B, 32,15.

Tendo como base os resultados da Figura 12, pode-se evidenciar que todas as amostras mostraram amplificação, indicando extração bem-sucedida de RNA por meio da configuração proposta neste estudo.

Em ambos os experimentos onde ocorreu a amplificação das amostras, a curva de *melting* apresentou o mesmo pico (Figura 14). A curva de *melting* é um indício da especificidade da amplificação, uma vez que corresponde a temperatura

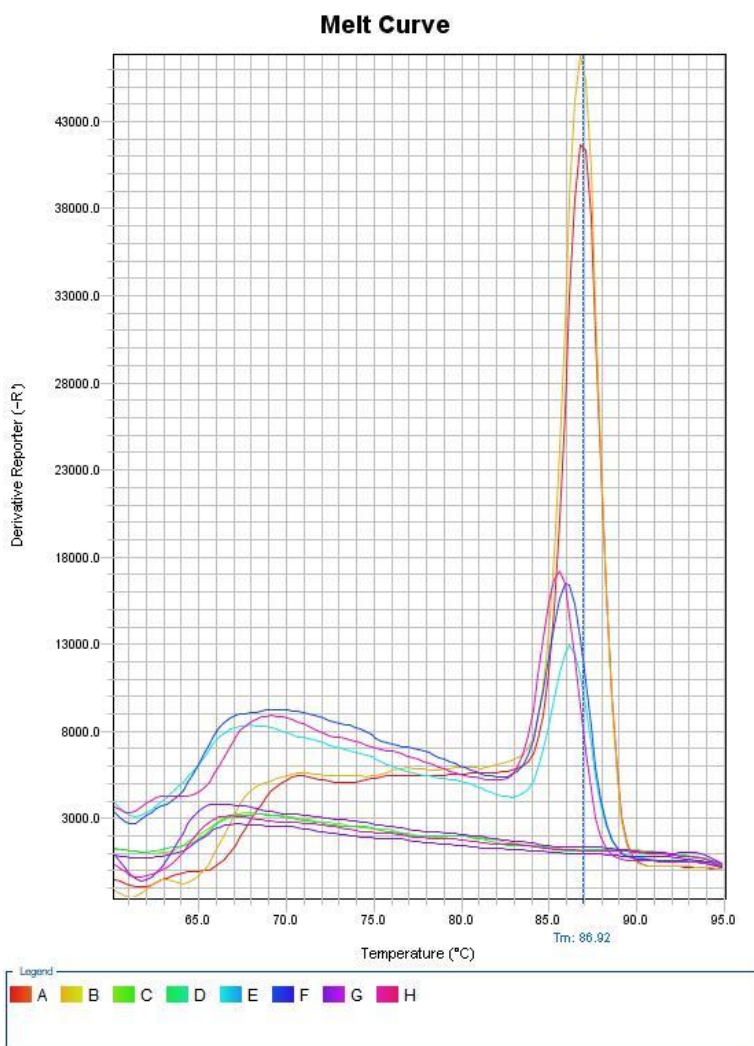
de anelamento dos *primers*. Quando o mesmo pico se apresenta, significa que a mesma região alvo foi amplificada pelas amostras. Do contrário, a observação de vários picos diferentes pode indicar uma contaminação.

Figura 13. Amplificação do teste comprobatório de 15 minutos de extração.



Extração de 15 min. Ct: D1A, 328,03; D1B 27,62; D2A, 27,74; D2B, 27,21; D3A, 24,8; D3B, 24,89.

Figura 14. Curva de *melting* apresentada na amplificação.



5. DISCUSSÃO

5.1 Ensaio da PCR em tempo real

Para amplificação, foi utilizado um par de *primers* do gene *Actb*, codificador da beta-actina. Por ser um gene constitutivo, o *Actb* apresenta baixa variação na expressão em diferentes tecidos, e é comumente utilizado na literatura como padrão.

A amplificação na PCR em tempo real foi realizada com algumas alterações no protocolo. Enquanto amostras diretamente obtidas da extração com TRIzol utilizaram um volume de apenas 1 μL de cDNA, foram utilizados 6,5 μL para amostras provenientes da extração com MIL. Isso porque a PCR em tempo real exige uma quantidade mínima do analito para que ocorra a reação. Uma vez que a extração com MIL foi realizada em uma amostra com escassez de RNA e, até

então, não era possível saber a porcentagem da eficiência de extração, o volume foi aumentado consideravelmente a fim disponibilizar uma quantidade maior de analito na reação.

5.2 Amplificação das amostras

Os resultados obtidos indicam que o método foi eficiente na extração de RNA total em solução aquosa mesmo em concentrações consideravelmente baixas. A dificuldade encontrada nos experimentos iniciais, no entanto, merece atenção.

No primeiro teste, a não amplificação de algumas amostras e a amplificação de outras, ainda que se tratasse de uma triplicata, pode ser justificada pelo fato de que a metodologia não foi completamente otimizada, portanto a quantidade de analito que realmente é extraída ainda é desconhecida e poderia ser insuficiente para leitura na PCR – principalmente se considerarmos que a solução inicial continha uma concentração muito baixa. Para confirmar, foi realizado um segundo teste sob as mesmas condições e concentração. Dessa vez, nenhuma amostra, além dos controles positivos, amplificou.

Algumas vezes o MIL pode desprender do magneto em volumes diminutos, mas, devido a coloração nítida do composto, esse comportamento pode também ser observado. Este acontecimento foi verificado em algumas amostras no decorrer dos experimentos. Por isso, outra hipótese que poderia explicar a não amplificação foi de que o MIL que estava se desprendendo na solução pudesse estar interferindo na leitura da qPCR ao interagir com os componentes da mistura, inibindo assim a amplificação. O teste relatado anteriormente na Figura 11 demonstrou que a interferência do MIL na amplificação não estava ocorrendo. Ainda assim, como há relatos na literatura de que os MILs podem ser hidrolisados após um longo período desde sua síntese, optou-se por sintetizar o $[P_{6,6,6,14}^+][Ni_{(II)}(hfacac)_3^-]$ novamente.

No teste comprobatório relatado anteriormente na Figura 12 (A e B), utilizando o MIL recém-sintetizado, a concentração de RNA foi aumentada - ainda que se mantivesse significativamente abaixo das concentrações relatadas na literatura [12, 14, 24]. Simultaneamente, foi testada a influência do tempo de extração no resultado final. Os resultados apontaram uma outra possível resposta para a não amplificação do primeiro teste: o tempo de extração pode ser relativamente alto e o RNA inicialmente extraído pode estar retornando para a

amostra durante a agitação (*back-extraction*). Entretanto, novos testes envolvendo tempo de extração devem ser realizados para o completo entendimento desse comportamento. Porém, tendo em vista os resultados satisfatórios obtidos com o tempo de 15 min, esta condição pareceu ser favorável para a extração desta biomolécula. Como mencionado anteriormente, o RNA é uma biomolécula extremamente instável e a sua extração/determinação consiste em um desafio analítico bastante significativo.

Além disso, pode ser observada uma alta estabilidade da gota de MIL suspensa no magneto o que consiste em uma grande vantagem comparada à SDME utilizando solventes convencionais (por exemplo, octanol) a qual emprega uma microsseringa para exposição do solvente à amostra. Nesta última, uma configuração instável é obtida, sendo que a gota de solvente pode ser facilmente perdida durante o procedimento de extração.

5.3 Curva de *melting*

A temperatura de *melting* é a temperatura na qual metade das moléculas de DNA estará dissociada na PCR. Moléculas maiores e/ou com maior proporção das bases nitrogenadas guanina e citosina, que estão ligadas por ligação tripla, requerem mais energia para dissociar, isto é, uma temperatura mais elevada.

Assim, cada fragmento terá uma temperatura diferente e apresentará um pico diferente na curva de *melting*. Os resultados demonstrados na curva de *melting* indicam que não houve contaminação da amostra, uma vez que o pico apresentado foi o mesmo, significando que em todas as amplificações o gene que estava sendo amplificado era, de fato, o gene alvo *Actb*.

5.4 Metodologia inédita na extração de RNA com MILs

No primeiro estudo publicado envolvendo a extração de RNA com MILs, os autores não exploraram a capacidade magnética do solvente extrator [24]. Em outro estudo recentemente publicado, o enfoque foi na determinação de uma sequência de tamanho menor de RNA, os microRNAs, que possuem aplicação limitada [14]. O artigo mais recente demonstra a capacidade de extração de RNA total de um *phenylpropyl guanidium magnetic ionic liquids* (PGMIL), demonstrando, também, um grande avanço nesse campo. Neste trabalho, através de uma DLLME, o analito

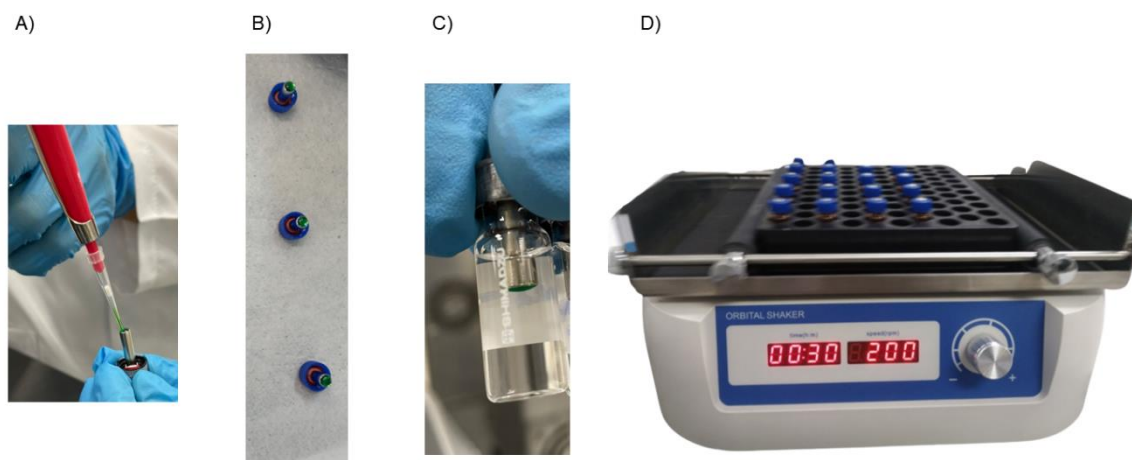
é isolado com sucesso da amostra e analisado por espectrofotometria [12]. No estudo mencionado, no entanto, a extração ocorreu em uma solução contendo 50 ng/ μ L de RNA, sendo, portanto, 10x mais concentrada que a amostra utilizada neste trabalho.

Até então, em todos os estudos mencionados, a extração ocorreu mediante o processamento de uma amostra por vez e através da DLLME. A DLLME apresenta como vantagem a velocidade da técnica, que pode ocorrer em poucos min, mas na prática pode ser um difícil de recuperar o solvente na solução quando este adere à parede do frasco. Já na SDME há uma estabilidade maior da gota de solvente, que quando se desprende é apenas em quantidades desprezíveis, mas costuma requerer um tempo maior de extração [36]. A metodologia proposta neste trabalho foi capaz de extrair múltiplas amostras simultaneamente devido a adaptação do sistema de extração (Figura 15).

5.5 Evolução da metodologia de extração de RNA com MILs

Um ponto muito importante a destacar neste trabalho é que, devido à pouca quantidade de trabalhos na literatura envolvendo a extração de RNA com MILs e também à complexidade da extração desta biomolécula, o grupo de pesquisa optou por explorar a técnica de extração primeiramente em DNA, avaliando desde a extração de amplicons (pequenos fragmentos da sequência de DNA alvo gerados na PCR convencional) até a extração de DNA genômico e aplicação em amostras complexas sendo obtidos resultados satisfatórios. No que diz respeito ao RNA, ainda, este projeto não previa a compra de solventes para extração própria ou de RNA comercial, e sim a parceria com professores da universidade para fortalecer a colaboração entre grupos que necessitem deste tipo de protocolo. O grupo precisou ter cuidado na escolha das amostras que seriam diluídas para a extração, pois a diluição ainda requer um volume relativamente grande de amostra (1 mL), esgotando rapidamente as amostras cedidas pelos professores colaboradores. Assim, as dificuldades inerentes ao RNA e a escassez de amostra nos fizeram prosseguir com muita cautela em relação aos experimentos. Além disso, o tempo disponível para concretizar o trabalho impossibilitou testes adicionais previstos originalmente, como a extração de RNA em solução contendo interferentes e mesmo em amostras mais complexas.

Figura 15. Sistema de microextração desenvolvido para múltiplas amostras simultaneamente.



A) Pipetagem do MIL no magneto; B) Disposição dos magnetos antes do contato com a amostra; C) MIL em contato com a amostra; D) Disposição dos frascos contendo MIL no *shaker* (plataforma de extração).

Entretanto, mesmo com estas limitações, resultados promissores foram obtidos principalmente no que se refere à capacidade de extração pelo MIL avaliado e à estabilidade do sistema proposto. As respostas satisfatórias obtidas nas análises por RT-qPCR para a extração/captura de RNA de amostras controle (aquosas) permitem a elaboração de procedimentos experimentais para otimizar totalmente a configuração proposta, bem como realizar testes desta metodologia em amostras complexas.

6. CONCLUSÕES

Quando este projeto foi idealizado, apenas um artigo envolvendo microextração de RNA com MILs havia sido publicado. No artigo em questão, as propriedades magnéticas dos MILs não foram exploradas, sendo um dos motivos pelo qual decidiu-se explorar essa extração com cautela e testando primeiramente em uma biomolécula mais estável, o DNA. No momento da finalização desta dissertação, outros dois artigos já estão disponíveis: um envolvendo a extração de miRNA e outro utilizando uma subclasse de MILs, os PGMILs. Entretanto, são abordagens bastantes distintas da proposta neste estudo.

Particularmente, este trabalho é o primeiro estudo envolvendo extração de RNA total de um mamífero. Com ele, foi possível comprovar não só a capacidade da microextração utilizando o MIL à base de níquel, mas também que essa capacidade de extração existe mesmo em concentrações muito baixas. Ainda, é o primeiro estudo nesse campo que utiliza a SDME e em múltiplas amostras simultaneamente, o que é uma vantagem grande para laboratórios que necessitam processar diversas amostras diariamente.

Mesmo que alguns dos objetivos iniciais, como a tentativa de automação do sistema e extração do analito em amostra contendo interferentes, não tenham sido alcançados devido ao tempo, a extração de RNA total em solução aquosa com aplicação do campo magnético utilizando um MIL é em si uma novidade na área. Este fato, abre novos horizontes para diversos estudos com o intuito de compreender melhor o processo de extração de RNA com MILs. Além disso, comprovando-se a eficiência de extração de RNA em amostras complexas, o valor associado a esta configuração é muito inferior ao necessário para adquirir os kits comerciais para a extração de RNA.

Ao longo do tempo, pode-se observar a evolução de conhecimento a respeito deste solvente aplicado a extração de RNA. Primeiramente, a descrição de um método que auxiliava na sua preservação [24]; depois, a aplicação bem-sucedida da DLLME para a extração de sequências pequenas de RNA [14], até a aplicação da DLLME em RNA total de levedura [12]. Com este trabalho, alcançou-se mais dois objetivos que é a possibilidade de extrair RNA total de mamíferos em concentrações reduzidas e a possibilidade de extrações múltiplas, o que até então não havia sido explorado. Assim, este estudo abre possibilidades no campo de extração com MILs e biomoléculas ao comprovar a eficiência de extração mesmo em um analito tão instável como o RNA sem, a princípio, interferir na sua leitura.

7. PERSPECTIVAS

Frente aos resultados obtidos, os experimentos envolvendo a extração de RNA com compostos magnéticos seguirão em execução pelo grupo. No futuro, esperamos dar maior robustez aos resultados, respondendo a outras perguntas que ficaram em aberto - conforme discutido no item anterior, como avaliar em meio

contendo interferentes - bem como inovando ainda mais ao aplicar tecnologias de automação para aumentar a frequência analítica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Snustad DP, Simmons MJ. Fundamentos de genética. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 903 p.

[2] Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP. Biologia Molecular Básica. 5. ed. Porto Alegre: Artmed; 2014. 407 p.

[3] Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. 1227 p.

[4] Falzone L, Gattuso G, Tsatsakis A, Spandidos DA, Libra M. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). *Int J Mol Med* 2021; 47(6):100.

[5] Pisano MB, Giadans CG, Flichman DM, Ré VE, Preciado MV, Valva P. Viral hepatitis update: Progress and perspectives. *World J Gastroenterol* 2021; 27(26):4018-4044.

[6] Paul R, Ostermann E, Wei Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosens Bioelectron* 2020; 169:112592.

[7] Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmaeilzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med* 2021; 23(2):e3303.

[8] McDermaid A, Monier B, Zhao J, Liu B, Ma Q. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Brief Bioinform* 2019; 20(6):2044-2054.

[9] Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet* 2020; 21(10):630-644.

[10] Clark KD, Yamsek MM, Nacham O, Anderson JL. Magnetic ionic liquids as PCR-compatible solvents for DNA extraction from biological samples. *ChemComm* 2015; 51(94):16771–16773.

- [11] Selvam K, Najib MA, Khalid MF, Mohamad S, Palaz F, Ozsoz M, Aziah I. RT-LAMP CRISPR-Cas12/13-Based SARS-CoV-2 Detection Methods. *Diagnostics (Basel)* 2021; 11(9):1646.
- [12] Emaus MN, Anderson JL. Magnetic ionic liquids as microRNA extraction solvents and additives for the exponential amplification reaction. *Anal Chim Acta* 2021; 1181:338900.
- [13] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10(1):57-63.
- [14] Ma Y, Chen Y, Peng F, Ding X. Phenylpropyl Guanidinium Magnetic Ionic Liquid for Green and Selective Extraction of RNA. *Langmuir* 2022; 38(42):12833-12840.
- [15] Gu H, Raman AT, Wang X, Gaiti F, Chaligne R, Mohammad AW, Arczewska A, Smith ZD, Landau DA, Aryee MJ, Meissner A, Gnirke A. Smart-RRBS for single-cell methylome and transcriptome analysis. *Nat Protoc* 2021; 16(8):4004-4030.
- [16] Carvalho CV, Ricci G, Affonso, R. *Guia de Práticas em Biologia Molecular*. Yendis, 2^a Ed., 2015.
- [17] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156–159.
- [18] Oliveira TQ, Moura AC, Feistauer V, Damiani R, Braga MF, Almeida S, Guedes RP, Giovenardi M. Caloric restriction in mice improves short-term recognition memory and modifies the neuroinflammatory response in the hippocampus of male adult offspring. *Behav Brain Res* 2022; 425:113838.
- [19] Retterer C, Kenny T, Zamani R, Altamura LA, Kearney B, Jaissle J, Coyne S, Olschner S, Harbourt D. Strategies for Validation of Inactivation of Viruses with Trizol® LS and Formalin Solutions. *Appl Biosaf* 2020; 25(2):74-82.
- [20] Klein S, Müller TG, Khalid D, Sonntag-Buck V, Heuser A, Glass B, Meurer M, Morales I, Schillak A, Freistaedter A, Ambiel I, Winter SL, Zimmermann L, Naumoska T, Bubeck F, Daniel Kirrmaier D, Ullrich S, Miranda IB, Anders S, Grimm D, Schnitzler P, Knop M, Kräusslich H, Thi VLD, Börner K, Chlanda P. SARS-

CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses* 2020; 12(8):863.

[21] Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396(6):1977–1990.

[22] Oliveira CF, Paim TGS, Reiter KC, Rieger A, D’Azevedo PA. Evaluation of Four Different DNA Extraction Methods in Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2014; 56(1):29-33.

[23] Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int* 2017; 2017:9306564.

[24] Zhu C, Varona M, Anderson JL. Magnetic Ionic Liquids as Solvents for RNA Extraction and Preservation. *ACS Omega* 2020 5(19):11151–11159.

[25] Feixia Peng, Xuelian Wang, Wenting Tao, Yao Chen, Yani Ma, Xueqin Ding. Development of Magnetic Deep Eutectic Solvent-Based Liquid–Liquid Extraction for the Selective Extraction and Separation of RNA. *Langmuir* 2022; 38(36):10934–10942.

[26] Fister S, Fuchs S, Mester P, Kilpeläinen I, Wägner M, Rossmannith P. The use of ionic liquids for cracking viruses for isolation of nucleic acids. *Sep Purif Technol* 2015; 155:38–44.

[27] Fuchs-Telka S, Fister S, Mester P, Wagner M, Rossmannith P. Hydrophobic ionic liquids for quantitative bacterial cell lysis with subsequent DNA quantification. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(6):1503–1511.

[28] Quental MV, Pedro AQ, Pereira P, Sharma M, Queiroz JA, Coutinho JAP, et al. Integrated Extraction-Preservation Strategies for RNA Using Biobased Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chem Eng* 2019; 7(10):9439–9448.

[29] Hallett JP, Welton T. Room-temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis. 2. *Chem Rev* 2011; 111(5):3508–3576.

[30] De Los Ríos AP, Fernández FJH. *Ionic Liquids in Separation Technology*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier; 2014. 360 p.

[31] Barbara Kirchner, Eva Perlt. *Ionic Liquids II*. 1. ed. Springer Cham; 2018. 189 p.

[32] Clark KD, Nacham O, Yu H, Li T, Yamsek MM, Ronning DR, et al. Extraction of DNA by magnetic ionic liquids: Tunable solvents for rapid and selective DNA analysis. *Anal Chem* 2015; 87(3):1552–1559.

[33] Clark KD, Sorensen M, Nacham O, Anderson JL. Preservation of DNA in nuclease-rich samples using magnetic ionic liquids. *RSC Adv* 2016; 6(46):39846–39851.

[34] Balducci A. Ionic Liquids in Lithium-Ion Batteries. *Top Curr Chem (Z)* 2017; 375(20).

[35] Salanne M. Ionic Liquids for Supercapacitor Applications. *Top Curr Chem (Z)* 2017; 375(63).

[36] Yoshida Y, Saito G. Design of Functional Ionic Liquids Using Magneto-And Luminescent-Active Anions. *Phys Chem Chem Phys* 2010; 12(8):1675-1684.

[37] Alves MS, Ferreira Neto LC, Scheid C, Merib J. An overview of magnetic ionic liquids: From synthetic strategies to applications in microextraction techniques. *JSS* 2021; 45:258-281.

[38] Clark KD, Nacham O, Purslow JA, Pierson SA, Anderson JL. Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review. *Anal Chim Acta* 2016; 934:9–21.

[39] Mafra G, Vieira AA, Merib J, Anderson JL, Carasek E. Single drop microextraction in a 96-well plate format: A step toward automated and high-throughput analysis. *Anal Chim Acta* 2019; 1063:159–166.

[40] Will C, Huelsmann RD, Mafra G, Merib J, Anderson JL, Carasek E. High-throughput approach for the in situ generation of magnetic ionic liquids in parallel-dispersive droplet extraction of organic micropollutants in aqueous environmental samples. *Talanta* 2021; 223:121759.

[41] Satoshi H, Hiro-o H. Discovery of a Magnetic Ionic Liquid [bmim]FeCl₄. *Chem Lett* 2004; 33(12).

[42] Abbasi NM, Zeger VR, Biswas A, Anderson JL. Synthesis and characterization of magnetic ionic liquids containing multiple paramagnetic lanthanide and transition metal centers and functionalized diglycolamide ligands. *J Mol Liq* 2022; 361:119530.

[43] Nowak PM, Wietecha-Postuszny R, Pawliszyn J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *TrAC*. 2021; 138:116223.

[44] Emaus MN, Anderson JL. Selective extraction of low-abundance BRAF V600E mutation from plasma, urine, and sputum using ion-tagged oligonucleotides and magnetic ionic liquids. *Anal Bioanal Chem* 2021;414(1)277:286.

[45] Hice SA, Clark KD, Anderson JL, Brehm-Stecher BF. Capture, Concentration, and Detection of Salmonella in Foods Using Magnetic Ionic Liquids and Recombinase Polymerase Amplification. *Anal Chem* 2019; 91(1):1113–1120.

[46] Bowers AN, Trujillo-Rodriguez MJ, Farooq MQ, Anderson JL. Extraction of DNA with magnetic ionic liquids using in situ dispersive liquid–liquid microextraction. *Anal Bioanal Chem* 2019;411: 7375–7385.

[47] Clark KD, Zhu C, Anderson JL. Maximizing ion-tagged oligonucleotide loading on magnetic ionic liquid supports for the sequence-specific extraction of nucleic acids. *Anal Chem* 2019; 91:5945–52.

[48] Emaus MN, Anderson JL. Allelic discrimination between circulating tumor DNA fragments enabled by a multiplex-qPCR assay containing DNA-enriched magnetic ionic liquids. *Anal Chim Acta* 2020; 1124:184-193.

[49] Emaus MN, Varona M, Anderson JL. 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* 2019; 1068:1-10.

[50] Emaus MN, Zhu C, Anderson JL. Selective hybridization and capture of KRAS DNA from plasma and blood using ion-tagged oligonucleotide probes coupled to magnetic ionic liquids. *Anal Chim Acta* 2020;1094:1–10.

[51] Marengo A, Cagliero C, Sgorbini B, Anderson JL, Emaus MN, Bicchi C, et al. Development of an innovative and sustainable one-step method for rapid plant DNA isolation for targeted PCR using magnetic ionic liquids. *Plant Methods* 2019; 15:23.

[52] Emaus MN, Anderson JL. Simultaneous cell lysis and DNA extraction from whole blood using magnetic ionic liquids. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412:8039–49.

[53] Ding X, Clark KD, Varona M, Emaus MN, Anderson JL. Magnetic ionic liquid-enhanced isothermal nucleic acid amplification and its application to rapid visual DNA analysis. *Anal Chim Acta* 2019; 1045:132-140.

[54] Pierson SA, Nacham O, Clark KD, Nan H, Mudryk Y, Anderson JL. Synthesis and characterization of low viscosity hexafluoroacetylacetonate-based hydrophobic magnetic ionic liquids. *New J Chem* 2017; 41(13):5498–5505.

[55] Ferreira Neto LC. Investigação de metodologias alternativas para a extração de ácidos nucleicos. Porto Alegre. Tese [Mestrado em Biociências] – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2022.

9. ANEXOS

9.1 Artigo


Received: 28 July 2021 | Revised: 24 October 2021 | Accepted: 27 October 2021

DOI: 10.1002/jssc.202100599

JOURNAL OF
SEPARATION SCIENCE

REVIEW ARTICLE

An overview of magnetic ionic liquids: From synthetic strategies to applications in microextraction techniques

Mônica Silva Alves^{1,2} | Luiz Carlos Ferreira Neto^{1,2} | Camila Scheid^{1,2} |
Josias Merib^{1,2} 

¹ Departamento de Farmacociências,
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre,
Brazil

² Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto
Alegre, Brazil

Correspondence

Josias Merib, Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, 245,
Sarmiento Leite St., Porto Alegre RS, 90050-
170.
Email: josias@ufcspa.edu.br

Remarkable progress has been achieved in the application of magnetic ionic liquids in microextraction-based procedures. These materials exhibit unique physicochemical properties of ionic liquids featuring additional responses to magnetic fields by incorporating a paramagnetic component within the chemical structure. This intriguing property can open new horizons in analytical extractions because the solvent manipulation is facilitated. Moreover, the tunable chemical structures of magnetic ionic liquids also allow for task-specific extractions that can significantly increase the method selectivity. This review aimed at providing an up-to-date overview of articles involving synthesis, physicochemical properties, and applications of magnetic ionic liquids highlighting recent developments and configurations. Moreover, a section containing critical evaluation and future trends in magnetic ionic liquid-based extractions is included.

KEYWORDS

Green Analytical Chemistry, magnetic ionic liquids, microextraction, sample preparation

Article Related Abbreviations: μ_{eff} , effective magnetic moment; CIP, carbonyl iron powder; ctDNA, circulating tumor DNA; DAD, diode array detector; DDE, dispersive droplet extraction; DFT, density functional theory; DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction; ds DNA, double-stranded DNA; DSC, differential scanning calorimetry; DTO, disubstituted ion-tagged; ETAAS, electrothermal atomic absorption spectrometry; FT-IR, Fourier transform infrared spectroscopy; GAC, Green Analytical Chemistry; HNMR, proton nuclear magnetic resonance; HS, headspace; HS-SDME, headspace-single drop microextraction; IL, ionic liquid; IMSA, isothermal multiple-self-matching-initiated amplification; INAA, isothermal nucleic acid amplification; ITO, ion-tagged oligonucleotide; LAMP, loop-mediated isothermal amplification; LLE, liquid-liquid extraction; LPME, liquid phase microextraction; MD, molecular dynamics; MIL, magnetic ionic liquid; MIR, mid infrared; mRNA, messenger RNA; MRTIL, magnetic room temperature ionic liquid; MSPD, matrix solid-phase dispersion; Pa-DDE, Parallel-Dispersive Droplet Extraction; Pa-SDME, parallel-single-drop microextraction; pDNA, plasmid DNA; qPCR, real-time quantitative polymerase chain; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; QTOF,

1 | INTRODUCTION

Significant efforts have been recently devoted to the development of environmentally friendly analytical methodologies in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry (GAC). In particular, the sample preparation step is of great concern for the analytical process since it can increase sensitivity and reduce or eliminate possible interfering components from the sample matrix. In most cases, extraction techniques are typically employed to isolate the analytes prior to instrumental analysis [1–4].

quadrupole time-of-flight; R^2 , coefficient of determination; RPA, recombinase polymerase amplification; SBDLLME, stir bar dispersive liquid-liquid microextraction; SDE, single droplet extraction; SQUID, superconducting quantum interference device; ssDNA, single-stranded DNA; T_d , decomposition temperature; T_g , glass transition temperature; TGA, thermogravimetric analysis; T_m , melting temperature; UV/Vis, ultraviolet/visible; VSM, vibrating sample magnetometer; WAC, White Analytical Chemistry; WBC, white blood cell; χ_g , magnetic susceptibility

10. CURRÍCULO LATTES



Mônica Silva Alves

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6715298996260028>

ID Lattes: **6715298996260028**

Última atualização do currículo em 04/11/2022

Biomédica formada pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) com habilitações em Análises Clínicas, Biologia Molecular e Genética. Realizou estágio curricular na Policlínica Militar de Porto Alegre e no GENEX - Instituto de Exames Genéticos. Durante a graduação, realizou iniciação científica em um projeto que integrava nutrigenética e memória da população idosa. Atualmente é mestranda do PPG-Biociências da UFCSPA e investiga metodologias alternativas para microextração de ácidos nucleicos, especialmente RNA, integrando química analítica e biologia molecular. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Mônica Silva Alves
Nome em citações bibliográficas	ALVES, M. S.; SILVA ALVES, MÔNICA; ALVES, MÔNICA SILVA
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/6715298996260028
Orcid ID	https://orcid.org/0000-0002-3275-8460

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2020	Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Técnicas alternativas para extração de RNA. Orientador: Josias de Oliveira Merib.
2014 - 2019	Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Influência dos polimorfismos rs5174, rs2297660 e rs3737983 no gene LRP8 (ApoE2) nos níveis de selênio e no desempenho de memória em adultos maduros e idosos. Orientador: Marilu Fiegenbaum.

Formação Complementar

2020 - 2020	Extensão universitária em Libras: compreensão básica. (Carga horária: 90h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2020 - 2020	Extensão universitária em Política Nacional de Saúde Integral LGBT. (Carga horária: 30h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2020 - 2020	Bacterial Genomes: Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens. (Carga horária: 15h). Wellcome Genome Campus, WGC, Inglaterra.
2020 - 2020	COVID-19: Contact Tracing. Johns Hopkins University, JHU, Estados Unidos.
2020 - 2020	How to write a Review paper. (Carga horária: 2h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2019 - 2019	Extensão universitária em Genética, Comportamento e Cognição. (Carga horária: 18h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2014 - 2014	Extensão universitária em Cinepsiquiatria: Ciclo da Vida. (Carga horária: 9h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2014 - 2014	Extensão universitária em Módulo de Primeiros Socorros. (Carga horária: 8h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Atuação Profissional

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

Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Monitoria Voluntária, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 10
Outras informações	Monitora voluntária na disciplina de Microbiologia Clínica.
Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20
Outras informações	Aspectos nutrigenéticos da memória: influência do micronutriente selênio e de polimorfismos em selenoproteínas.
Vínculo institucional 2016 - 2016	Vínculo: Voluntária, Enquadramento Funcional: Voluntária de Extensão, Carga horária: 10
Outras informações	Assistência, Ensino e Pesquisa em Genética Clínica.
Vínculo institucional 2015 - 2016	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20
Outras informações	Nutrigenética e Escores de Memória: Interação entre o consumo de Zinco e Selênio e a variabilidade nos genes APOE, SEP15 e SLC30A3.
Atividades 10/2019 - 10/2019	Outras atividades técnico-científicas , Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atividade realizada
09/2017 - 09/2017	Monitora no Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. Outras atividades técnico-científicas , Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atividade realizada
05/2017 - 05/2017	Auxiliar na III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.. Extensão universitária , Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atividade de extensão realizada
09/2016 - 09/2016	Monitora no evento UFCSPA Acolhe. Outras atividades técnico-científicas , Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atividade realizada
09/2015 - 09/2015	Monitora na II Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,. Outras atividades técnico-científicas , Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atividade realizada
04/2014 - 04/2014	Monitora na I Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,. Extensão universitária , Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atividade de extensão realizada Feira de Saúde.

GENEX - Instituto de Exames Genéticos, GENEX, Brasil.

Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Biomédica em Genética Humana, Carga horária: 22
Outras informações	Estágio curricular a fim de obter habilitação em Genética Humana.

Policlínica Militar de Porto Alegre, PMPA, Brasil.

Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Biomédica em Análises Clínicas, Carga horária: 30
Outras informações	Estágio curricular a fim de obter habilitação em Análises Clínicas.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Humana e Médica.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
Francês	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. **ALVES, M. S.**; NETO, L. C. F.; SCHEID, CAMILA; MERIB, JOSTAS. An overview of magnetic ionic liquids: From synthetic strategies to applications in microextraction techniques. *Journal of Separation Science* **JCR**, v. 45, p. 258, 2022.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 2
2. ★ DA ROCHA, TATIANE JACOBSEN; **SILVA ALVES, MÔNICA**; GUISSO, CAROLINA CAMPELO; DE ANDRADE, FABIANA MICHELSEN; CAMOZZATO, ANALUIZA; DE OLIVEIRA, ALCYR ALVES; FIEGENBAUM, MARILU. Association of GPX1 and GPX4 polymorphisms with episodic memory and Alzheimer's disease. *NEUROSCIENCE LETTERS* **JCR**, v. 666, p. 32-37, 2018.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 11

Apresentações de Trabalho

1. NETO, L. C. F.; SCHEID, CAMILA; PRICHULA, J.; LOPES, P. M.; **ALVES, M. S.**; TRENTIN, D.; MERIB, J. O.. Investigação de Metodologias Alternativas para a Extração de Ácidos Nucleicos. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. **ALVES, M. S.**; NETO, L. C. F.; SCHEID, CAMILA; MERIB, J. O.. Extração de RNA com Líquidos Iônicos Magnéticos. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. **ALVES, M. S.**; NETO, L. C. F.; MERIB, J. O.. Avaliação de metodologias alternativas para a extração de RNA. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).
4. **ALVES, M. S.**; ROCHA, T. J.; FIEGENBAUM, M.. Influência dos polimorfismos rs5174, rs2297660 e rs3737983 do gene LRP8 (ApoER2) nos níveis de selênio e no desempenho de memória em adultos maduros e idosos. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. **ALVES, M. S.**; ROCHA, T. J.; FIEGENBAUM, M.; ZEN, P. R. G.. Programa de Extensão, Assistência, Ensino e Pesquisa em Genética Clínica. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
6. **ALVES, M. S.**; ROCHA, T. J.; Bischoff, F.; OLIVEIRA, A. A.; FIEGENBAUM, M.. A Influência de Polimorfismos em GPX1 e GPX4 sobre Escores de Memória e Níveis de Selênio em Adultos Maduros e Idosos.. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Fake news em saúde: como responsabilizar quem as divulga?. 2021. (Outra).
2. II Brazilian South Symposium on Neuroscience. 2021. (Simpósio).
3. II Ciclo de Palestras em Hemoterapia da Liga do Sangue na modalidade EAD. 2021. (Outra).
4. Atuação do Biomédico no diagnóstico laboratorial sorológico e molecular da COVID-19. 2020. (Outra).
5. Best of Asco - Annual Meeting. 2020. (Encontro).
6. EGENE 2020. 2020. (Encontro).
7. III QUIMTOX. 2020. (Outra).
8. I Jornada GEMOCA Online. 2020. (Outra).
9. Imunologia, desenvolvimento da vacina contra o coronavírus e a importância da educação. 2020. (Outra).
10. I Simpósio de Conhecimento Científico no Âmbito da Saúde. 2020. (Simpósio).
11. IV Encontro Carioca de Biomedicina. 2020. (Encontro).
12. Libras e Saúde. 2020. (Outra).
13. O papel do laboratório de análises clínicas no suporte ao diagnóstico nos dias atuais. 2020. (Outra).
14. Simpósio Acadêmico sobre COVID-19. 2020. (Simpósio).
15. Testes para detecção do Covid-19 por RT-qPCR. 2020. (Outra).
16. V Biosciences Meeting - Crossing Borders. Avaliação de metodologias alternativas para a extração de RNA. 2020. (Encontro).
17. Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. Influência dos polimorfismos rs5174, rs2297660 e rs3737983 do gene LRP8 (ApoER2) nos níveis de selênio e no desempenho de memória em adultos maduros e idosos. 2019. (Congresso).
18. Dia do Biomédico e Ciclo de palestras em Análises Clínicas. 2019. (Outra).

19. Linguagem e Cognição no Envelhecimento. 2019. (Outra).
20. I Jornada de Genética Médica da PUCRS: doenças genéticas tratáveis. 2018. (Outra).
21. III Mostra de Trabalhos de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFCSPA. Programa de Extensão, Assistência, Ensino e Pesquisa em Genética Clínica. 2017. (Outra).
22. IV Jornada do Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2017. (Outra).
23. Jornada Acadêmica Biomedicina UFCSPA 2017. 2017. (Outra).
24. World Congress on Brain, Behavior and Emotions 2017. 2017. (Congresso).
25. XVI Simpósio Gaúcho sobre Transtorno Obsessivo-Compulsivo/IV Encontro da Rede Gaúcha de Pesquisa em Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo. 2017. (Simpósio).
26. II Mostra de Trabalhos de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFCSPA. A Influência de Polimorfismos em GPX1 e GPX4 sobre Escores de Memória em Adultos Maduros e Idosos. 2016. (Outra).
27. I Mostra de Trabalhos de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFCSPA. 2015. (Outra).
28. VI Reunião Anual do IBNeC ? 1 st Brazilian Meeting of the Human Behavior and Evolution Society. Memória e depressão no envelhecimento: relação com níveis séricos de zinco. 2015. (Encontro).
29. XIII Simpósio Gaúcho sobre Transtorno Obsessivo-Compulsivo/I Encontro da Rede Gaúcha de Pesquisa em Transtornos do Espectro Obsessivo-Compulsivo?, 2015. (Simpósio).