

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARIANA AZEVEDO ROSA**

**NANOTUBOS DE CARBONO MAGNÉTICOS FUNCIONALIZADOS: AVALIAÇÃO  
DA PROTEÍNA CORONA EM SORO HUMANO, ESTUDOS DE  
CITOCOMPATIBILIDADE E PERMEAÇÃO EM MODELO BIOMIMÉTICO**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**MARIANA AZEVEDO ROSA**

**NANOTUBOS DE CARBONO MAGNÉTICOS FUNCIONALIZADOS: AVALIAÇÃO  
DA PROTEÍNA CORONA EM SORO HUMANO, ESTUDOS DE  
CITOCOMPATIBILIDADE E PERMEAÇÃO EM MODELO BIOMIMÉTICO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mariane Gonçalves Santos

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Rosa, Mariana Azevedo.

Nanotubos de carbono magnéticos funcionalizados: Avaliação da proteína corona em soro humano, estudos de citocompatibilidade e permeação em modelo biomimético / Mariana Azevedo Rosa. - Alfenas, MG, 2024.

206 f. : il. -

Orientador(a): Eduardo Costa de Figueiredo.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Nanotubos de carbono funcionalizados. 2. Adsorção. 3. Citocompatibilidade. 4. Permeação. 5. Proteína corona. I. Figueiredo, Eduardo Costa de, orient. II. Título.

MARIANA AZEVEDO ROSA

**NANOTUBOS DE CARBONO MAGNÉTICOS FUNCIONALIZADOS: AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA CORONA EM SORO HUMANO, ESTUDOS DE CITOTOCOMPATIBILIDADE DE E PERMEAÇÃO EM MODELO BIOMIMÉTICO**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica

Aprovada em: 10 de julho de 2024.

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (Unifal)

Prof. Dr. Jemmyson Romario de Jesus  
Instituição: Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (Unifal)

Profa. Dra. Luciana Azevedo  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (Unifal)

Prof. Dr. Christian Fernandes  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Costa de Figueiredo, Professor do Magistério Superior**, em 10/07/2024, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1286725** e o código CRC **263C1A76**.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elaine e Joel; minhas irmãs, Tatiana e Geovana; minha avó, Maria; e minha afilhada, Raphaela. Obrigada por sempre estarem comigo e por me apoiarem em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, por toda a ajuda e ensinamentos durante todos esses anos. Obrigada por acreditar em mim desde a iniciação científica e por ter sempre se mantido positivo e confiante. À minha coorientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariane Gonçalves Santos, por toda ajuda e contribuições.

Aos alunos, professores e técnicas do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF). Sou grata de fazer parte desse laboratório e por ter nele encontrado amigos. Muito obrigada a todos pela convivência e por estarem sempre disponíveis para assuntos sérios e nem tão sérios também. Essa tese tem muito de vocês.

Aos meus amigos, dos mais antigos aos que, felizmente, foram se juntando a essa jornada. Sou muito feliz em tê-los e minha vida. Obrigada pela companhia e apoio. Isso tudo não teria sido possível sem vocês.

À Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realizar essa tese de doutorado. Agradeço também aos laboratórios da Unifal, principalmente: Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos, Núcleo de Controle de Qualidade, Laboratório Interdisciplinar de Química, Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica, Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos, Laboratório de Central Analítica II, e Laboratório de Neuroimunologia da Dor por abrirem suas portas e permitirem a realização de experimentos importantes para essa tese.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Salette Reis, por me receber em seu grupo de pesquisa durante o Doutorado Sanduíche. Obrigada por todo o acolhimento e ensinamentos. Sou extremamente grata a todos do MB<sup>2</sup> por me receberem tão bem e por toda a ajuda, não só nesse trabalho, mas também na minha estadia em Portugal. Agradeço à Andreia Granja, que além de tudo, me ensinou e me auxiliou em todos os experimentos de citocompatibilidade. Agradeço também a Universidade do Porto e a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto por viabilizarem a minha ida.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por me receber em seu laboratório (GEPAM-Unicamp) para as análises utilizando o ICP-MS e a todos do laboratório pela acolhida e ajuda. Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Gorup pela realização da técnica de microscopia eletrônica de

varredura. Ao Laboratório de Materiais de Baixas Temperaturas (Unicamp) pela possibilidade de realização dos experimentos de susceptibilidade magnética. Ao Prof. Dr Leo Iwa, do Instituto Butantan, pelo início da parceria e pela possibilidade de realização dos estudos futuros de proteômica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação de um nanotubo de carbono de parede única (SWCNT) e um nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) .....	28
Figura 2	- Representação esquemática do procedimento de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida .....	37
Figura 3	- Estrutura cristalográfica da albumina sérica humana .....	44
Figura 4	- Modelos de isotermas de adsorção segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada .....	53
Figura 5	- Esquema de um poço <i>transwell</i> (A) e placa <i>transwell</i> de 12 poços com as células em meio de cultivo .....	59
Figura 6	- Esquema do sistema de síntese para a obtenção de nanotubos de carbono magnéticos (A) e esquema da vista superior do agitador horizontal, utilizado em diversas etapas das sínteses dos materiais (B) .....	63
Figura 7	- Funcionalizantes para a síntese dos M-CNTs-HL .....	65
Figura 8	- Distribuição das amostras utilizadas para os ensaios de viabilidade celular e de liberação de lactato desidrogenase .....	83
Figura 9	- Distribuição das amostras para o ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo .....	86
Figura 10	- Esquema da distribuição das amostras para o ensaio de apoptose .....	88
Figura 11	- Esquema para permitir o contato da placa contendo as monocamadas de Caco-2 com os ímãs .....	90
Figura 12	- Processo de entrecruzamento da BSA com glutaraldeído (em A) e redução dos grupos imina formados a grupamentos amina (em B) .....	95
Figura 13	- Espectros de infravermelho obtidos para os materiais sintetizados e para os reagentes de síntese .....	97
Figura 14	- Perda de massa em função do aumento da temperatura .....	100
Figura 15	- Curvas de DSC para os diferentes materiais .....	101
Figura 16	- Potencial zeta para os nanotubos de carbono comerciais (CNT) e para os materiais sintetizados (M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL) .....	102

Figura 17 - Distribuição dos M-CNTs-BSA por tamanho e curva de correlação .....	106
Figura 18 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura. a) Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ; b) CNT comercial; c) M-CNT; d) M-CNT-BSA; e) CNT oxidado; f) M-CNT-oxidado; g) M-CNT-TEOS; h) M-CNT-TEOS-MPS; i) M-CNT-HL; j-l) EDS de C K $\alpha$ e Fe K $\alpha$ para amostras de M-CNT-BSA .....	108
Figura 19 - Espectros de EDS mostrando a presença de Fe, O e C nas amostras M-CNT, M-CNT-BSA, M-CNT-TEOS, M-CNT-TEOS-MPS e M-CNT-HL .....	109
Figura 20 - Histograma de distribuição dos diâmetros dos nanotubos de carbono. a) CNT comercial; b) M-CNT; c) M-CNT-BSA; d) CNT oxidado; e) M-CNT-oxidado; f) M-CNT-TEOS; g) M-CNT-TEOS-MPS; h) M-CNT-HL .....	110
Figura 21 - Difratoograma de raio-X dos materiais sintetizados e de suas etapas intermediárias .....	111
Figura 22 - Espectro de Raman para CNTs comerciais, CNTs oxidados (CNToxi), M-CNTs, M-CNTs-BSA, e M-CNTs-HL .....	112
Figura 23 - <i>Loops</i> de histerese para M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL (a). <i>Zoom</i> na região próxima do momento igual a zero e fotografias dos nanotubos sendo atraídos por ímas (b) .....	114
Figura 24 - Curva de calibração utilizada para os testes de cinética de adsorção .....	118
Figura 25 - Curvas de cinética (A) e de difusão intrapartícula (B) para M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL .....	119
Figura 26 - Curvas de calibração utilizadas para as isotermas de adsorção .....	123
Figura 27 - Curvas de isoterma de adsorção da albumina sérica humana .....	123
Figura 28 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da dessorção de proteínas das M-CNT de acordo com as variáveis estudadas .....	133
Figura 29 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da dessorção de proteínas das M-CNT-BSA de acordo com as variáveis estudadas .....	137

Figura 30 - Curvas de intensidade relativa de fluorescência de BSA em função da concentração dos nanotubos de carbono .....	153
Figura 31 - Redução do corante não fluorescente resazurina, ao produto fluorescente resorufina .....	157
Figura 32 - Mecanismo do ensaio de liberação de LDH .....	159
Figura 33 - Reação de Fenton para a geração de ROS a partir de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	163
Figura 34 - Formação de produto fluorescente a partir da sonda DCFH-DA .....	164

## LISTA DE FOTOGRAFIAS

- Fotografia 1 - Respostas dos materiais magnéticos a um ímã. De cima para baixo: M-CNT, M-CNT-BSA, M-CNT-HL .....94
- Fotografia 2 - Géis de eletroforese referentes das proteínas dessorvidas dos nanotubos. Eluição realizada com a condição otimizada para os M-CNT (A), M-CNT- BSA (B), e M-CNT-HL (C) .....145
- Fotografia 3 - Gel de eletroforese obtido para amostras de soro diluído 1:10 (soro: água) extraídos por 2 h e dessorvidos com condições de eluição otimizadas ..... 148
- Fotografia 4 - Gel de SDS-PAGE com as amostras do sobrenadante de extração ...150
- Fotografia 5 - Imagens de microscopia confocal (canal de transmitância) mostrando a presença de aglomerados dos nanotubos de carbono magnéticos sintetizados com as células Caco-2 .....162
- Fotografia 6 - Exemplos de imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células tratadas como controles e células expostas aos nanotubos sintetizados .....165
- Fotografia 7 - Imagens de citometria de fluxo para o ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio .....167
- Fotografia 8 - Imagens de citometria de fluxo para as células tratadas com meio DMEM (controle negativo de apoptose) e para as células tratadas com os nanotubos de carbono sintetizados ..... 170
- Fotografia 9 - Exemplos de representação tridimensional das monocamadas de Caco-2 expostas aos diferentes tratamentos (controle e suspensão dos nanotubos magnéticos sintetizados, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) após o ensaio de permeação ..... 176

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Concentração de proteínas dessorvidas ( $\bar{X}$ , n=3) de cada material após os estudos utilizando soro humano diluído em água ultrapura. As barras de erro indicam o desvio padrão relativo .....127
- Gráfico 2 - Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. 2 h indica o tempo de extração e, nesse caso, cada material só foi eluído com a sua condição otimizada ..... 147
- Gráfico 3 - Concentração de proteínas totais após o procedimento de extração ( $\bar{X}$ , n=3  $\pm$  DP) .....150
- Gráfico 4 - Resultados para o ensaio de hemólise .....155
- Gráfico 5 - Resultados de viabilidade para as linhagens celulares L929 (A) e Caco-2 (B) ..... 158
- Gráfico 6 - Resultados de citotoxicidade para as linhagens celulares L929 (A) e Caco-2 (B) .....160
- Gráfico 7 - Comparação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) para as células controle e as células tratadas com os nanotubos de carbono sintetizados ..... 168
- Gráfico 8 - Relação entre células viáveis e células em diferentes estágios de morte (apoptose inicial, apoptose tardia e necrose) ..... 171
- Gráfico 9 - Valores da resistência elétrica transepitelial (TEER) obtidos ao longo do ensaio de permeação para células não expostas (A) e expostas (B) a ímãs ..... 172
- Gráfico 10 - Permeação de *Lucifer Yellow* no modelo de barreira intestinal ..... 175
- Gráfico 11 - Massa de nanotubos permeada pelas monocamadas de Caco-2 (expostas e não expostas ao campo magnético externo) .....177

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ponto isoelétrico (pI) e potencial zeta (pH 7) para os diferentes materiais e suas etapas intermediárias .....	103
Tabela 2 - Valores de área superficial, de volume e de tamanho dos poros para nanopartículas magnéticas (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ), CNTs comerciais e nanotubos sintetizados .....	104
Tabela 3 - Absorbância de soluções proteicas tratadas com reagente de Bradford após diferentes tempos de reação .....	115
Tabela 4 - Resultados de absorbância para o teste de interferência do branco .....	116
Tabela 5 - Ajustes de modelos para cinéticas de adsorção de albumina sérica humana .....	121
Tabela 6 - Ajustes de modelos para isotermas de adsorção de albumina sérica humana .....	125
Tabela 7 - Planejamento experimental para o estudo de dessorção de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs .....	129
Tabela 8 - Análise de variância do modelo geral de dessorção de proteínas dos M-CNTs .....	130
Tabela 9 - Análise de variância do modelo ótimo de dessorção de proteínas dos M-CNTs .....	131
Tabela 10 - Estimativas dos coeficientes do modelo de dessorção de proteínas dos M-CNTs, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.....	132
Tabela 11 - Planejamento experimental para o estudo de dessorção de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs-BSA .....	133
Tabela 12 - Análise de variância do modelo geral de dessorção de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs-BSA .....	133
Tabela 13 - Estimativas dos coeficientes do modelo de dessorção de proteínas dos M-CNTs-BSA, desvio padrão, estatística t e valor-p associados .....	136
Tabela 14 - Planejamento experimental para o estudo de dessorção de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs-HL .....	139

Tabela 15 - Análise de variância do modelo geral de dessorção de proteínas dos M-CNTs-HL .....	140
Tabela 16 Análise de variância do modelo ótimo de dessorção de proteínas dos M-CNTs-HL .....	141
Tabela 17 - Valor de pH, volume de eluição, concentração de NaCl e tempo de agitação otimizados para cada um dos nanotubos estudados .....	142
Tabela 18 - Intensidade de fluorescência obtida para uma solução de BSA após a agitação com diferentes concentrações de nanotubos de carbono .....	151
Tabela 19 - Valores das constantes de Stern–Volmer e das constantes de <i>quenching</i> para os diferentes materiais .....	154
Tabela 20 - Intensidade relativa da sonda marcadora de espécies reativas de oxigênio (ROS) para as amostras avaliadas .....	166

## LISTA DE SIGLAS

7-AAD	7- aminnoactinomycin D (7-amino-actinomicina D)
ABS	Absorbância
$a_K$	Constante do modelo de Khan
$a_R$	Expoente do modelo de Redlich- Peterson
$a_T$	Constante do modelo de Toth
ATL	Attenuated total reflectance (refletância total atenuada)
BBD	Delineamento de Box-Behnken
BET	Método de Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Método de Barrett-Joyner-Halenda
$b_K$	Expoente do modelo de Khan
BSA	Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
CNT	Carbon nanotube (nanotubo de carbono)
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CO <sub>3</sub>	Radical ânion carbonato
DCCR	Delineamento de composto central rotacional
DCF	2,7 dichlorofluorescein (2,7 diclorofluoresceína)
DCF-DA	2,7 dichlorohydrofluorescein (2,7 diclorohidrofluoresceína)
DCFH-DA	2,7 dichlorohydrofluorescein diacetate (2,7 diacetato de diclorohidrofluoresceína)
DDA	Data-dependent acquisition (aquisição de dados de forma dependente)
DDS	Drug delivery system (sistema de entrega de fármacos)
DIA	Data-independent acquisition (aquisição de dados de forma independente)
DLS	Dinamic light scattering (espalhamento de luz dinâmico)
DMEM	Dulbelcco's Modified Eagle Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbelcco)
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
DPR%	Desvio padrão relativo

DSC	Differential scanning calorimetry (calorimetria exploratória diferencial)
E%	Erro relativo
EDS	Energy-dispersive detector (espectroscopia por energia dispersiva)
ESI	Electrospray ionization (ionização por electrospray)
F	Intensidade de fluorescência
F <sub>0</sub>	Intensidade de fluorescência sem a presença do agente de <i>quenching</i>
Fe(II)Hb	Ferro-hemoglobina (II)
Fe(III)Hb	Ferro-hemoglobina (III)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FSC	Detector para dispersão direta
GDMA	Glycerol dimethacrylate (glicerol dimetacrilato)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (Solução de sais balanceados de Hank)
HEA	Hydroxyethyl-acrylate (hidroxietil-acrilato)
HL	Hydrophilic layer (camada hidrofílica)
HOCl	Ácido hipocloroso
HOO•	Radical hidroxila
HSA	Human serum albumin (albumina sérica humana)
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry (espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
K	Constante no modelo de Elovich
K <sub>1</sub>	Constante de velocidade de pseudo-primeira ordem
K <sub>2</sub>	Constante de velocidade de pseudo-segunda ordem
k <sub>AV</sub>	Constante cinética de Avrami
KBr	Brometo de potássio
K <sub>F</sub>	Constante do modelo de Freundlich
K <sub>L</sub>	Constante de afinidade de Langmuir
k <sub>q</sub>	Constante de <i>quenching</i>
K <sub>S</sub>	Constante do modelo de Sips

$K_{rp}$	Constante do modelo de Redlich-Peterson
$K_{SV}$	Constante de Stern–Volmer
$K_T$	Constante do modelo de Toth
L929	Células de fibroblastos de rato
LDH	Lactate dehydrogenase (lactato desidrogenase)
LY	Lucifer Yellow (Amarelo de Lúifer)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization (ionização e dessorção a laser assistida por matriz)
M-CNT	Nanotubo de carbono magnético
M-CNT-BSA	Nanotubo de carbono magnético revestido com albumina sérica bovina
M-CNT-HL	Nanotubo de carbono magnético funcionalizado com monômeros hidrofílicos
MWCNT	Multiwalled carbon nanotube (nanotubo de carbono de paredes múltiplas)
MPS	3-metacriloxipropiltrimetoxisilano
MS	Mass spectrometry (espectrometria de massas)
MTT	Metiltetrazólio
$n$	Taxa inicial de adsorção do modelo de Elovich
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (nicotinamida adenina dinucleotídeo + hidrogênio)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)
$n_{AV}$	Expoente de Ordem fracionaria (Avrami)
$n_F$	Expoente do modelo de Freundlich
NP	Nanopartícula
$n_S$	Expoente do modelo de Sips
$O_2^\bullet$	Radical superóxido
$O_3$	Ozônio
$OH^\bullet$	Radical alcoxila
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida)

PBS	Phosphate saline buffer (tampão fosfato salina)
PDI	Polydispersity index (índice de polidispersão)
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto isoelétrico
q <sub>e</sub>	Capacidade de adsorção
q <sub>s</sub>	Capacidade de saturação teórica
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RAM	Restricted access material (material de acesso restrito)
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
SDS	Sodium dodecyl-sulfate (dodecil sulfato de sódio)
SSC	Detector para dispersão lateral
SWCNT	Singlewalled carbon nanotube (nanotubo de carbono de parede única)
T	Expoente do modelo de Toth
TEER	Transepithelial electrical resistance (resistência elétrica transepitelial)
TEOS	Ortossilicato de tetraetila
TG	Themogravimetric analysis (análise termogravimétrica)
TOF	Time of flight (tempo de voo)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
1.1	OBJETIVOS .....	26
1.1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>26</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>28</b>
2.1	NANOTUBOS DE CARBONO .....	28
2.2	NANOMATERIAIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS .....	30
2.3	ESTUDOS DE PROTEÔMICA .....	33
2.3.1	<b>Eletroforese em gel unidimensional para análise de proteínas</b> .....	<b>3</b>
2.3.2	<b>Espectrometria de massas para análises de proteínas</b> .....	<b>38</b>
2.4	PROTEÍNA CORONA .....	40
2.4.1	<b>Composição do sangue e albumina</b> .....	<b>43</b>
2.5	PROCESSOS DE ADSORÇÃO .....	45
2.6	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	54
2.6.1	<b>Linhagens celulares</b> .....	<b>55</b>
2.6.2	<b>Ensaio de viabilidade</b> .....	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
3.1	REAGENTES .....	61
3.2	SÍNTESE DOS MATERIAIS .....	62
3.2.1	<b>Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos</b> .....	<b>62</b>
3.2.2	<b>Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos revestidos com albumina sérica bovina</b> .....	<b>63</b>
3.2.3	<b>Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos funcionalizados com monômeros hidrofílicos</b> .....	<b>64</b>
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS SINTETIZADOS .....	65
3.3.1	<b>Espectroscopia no infravermelho</b> .....	<b>65</b>
3.3.2	<b>Análises termogravimétricas</b> .....	<b>66</b>
3.3.3	<b>Análise de calorimetria exploratória diferencial</b> .....	<b>66</b>
3.3.4	<b>Potencial zeta</b> .....	<b>66</b>

3.3.5	<b>Análises de área superficial e porosimetria</b> .....	67
3.3.6	<b>Espalhamento dinâmico de luz</b> .....	67
3.3.7	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	67
3.3.8	<b>Difração de raio-X</b> .....	68
3.3.9	<b>Espectroscopia de Raman</b> .....	68
3.3.10	<b>Susceptibilidade magnética</b> .....	68
3.4	<b>MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA</b> .....	69
3.4.1	<b>Preparo do reagente de Bradford</b> .....	69
3.4.2	<b>Avaliação do tempo de reação entre o reagente de Bradford e a albumina</b> .....	69
3.4.3	<b>Interferência do branco</b> .....	70
3.5	<b>TESTE DE EXCLUSÃO DE ALBUMINA</b> .....	70
3.6	<b>ESTUDOS DE ADSORÇÃO</b> .....	71
3.6.1	<b>Cinéticas de adsorção</b> .....	71
3.6.2	<b>Isotermas de adsorção</b> .....	72
3.7	<b>OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS</b> .....	73
3.7.1	<b>Coleta das amostras e obtenção de um <i>pool</i> de soro</b> .....	73
3.7.2	<b>Avaliação da diluição das amostras de soro</b> .....	74
3.8	<b>OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS SORVIDAS</b> .....	75
3.8.1	<b>Delineamento experimental multivariado para a otimização das condições de eluição</b> .....	75
3.9	<b>ESTUDOS DE ELETROFORESE EM GEL</b> .....	76
3.9.1	<b>Protocolos gerais para a execução dos experimentos de eletroforese em gel</b> .....	77
3.9.2	<b>Análises do perfil de proteínas desorvidas dos nanotubos sintetizados</b> .....	79
3.9.3	<b>Análises do perfil de proteínas remanescentes nas amostras de soro diluído</b> .....	80
3.10	<b>ANÁLISES DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA</b> .....	80
3.11	<b>ENSAIOS <i>IN VITRO</i></b> .....	81

<b>3.11.1</b>	<b>Hemólise</b> .....	<b>81</b>
<b>3.11.2</b>	<b>Cultivo das linhagens celulares</b> .....	<b>81</b>
<b>3.11.3</b>	<b>Ensaio de viabilidade e de citotoxicidade</b> .....	<b>82</b>
3.11.3.1	Ensaio de viabilidade: Resazurina .....	83
3.11.3.2	Ensaio de citotoxicidade: Liberação de lactato desidrogenase .....	84
<b>3.11.4</b>	<b>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio</b> .....	<b>84</b>
3.11.4.1	Microscopia confocal de varredura a laser .....	85
3.11.4.2	Citometria de fluxo .....	86
<b>3.11.5</b>	<b>Avaliação da apoptose</b> .....	<b>87</b>
<b>3.11.6</b>	<b>Avaliação da permeação em modelo biomimético de barreira intestinal</b> .....	<b>88</b>
3.11.6.1	Cultivo do modelo biomimético .....	89
3.11.6.2	Ensaio de permeação no modelo biomimético .....	89
3.11.6.3	Permeação de <i>Lucifer Yellow</i> .....	90
3.11.6.4	Análise das monocamadas por microscopia confocal .....	91
<b>3.11.7</b>	<b>Quantificação dos nanotubos permeados por ICP-MS</b> .....	<b>91</b>
3.12	ANÁLISES DE IMAGENS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	92
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>93</b>
4.1	SÍNTESE DOS MATERIAIS .....	93
<b>4.1.1</b>	<b>Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos</b> .....	<b>93</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos revestidos com albumina sérica bovina</b> .....	<b>94</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos funcionalizados com monômeros hidrofílicos</b> .....	<b>95</b>
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS SINTETIZADOS .....	95
<b>4.2.1</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho</b> .....	<b>96</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Análises termogravimétricas</b> .....	<b>99</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Análise de calorimetria exploratória diferencial</b> .....	<b>101</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Potencial zeta</b> .....	<b>102</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Análises de área superficial e porosimetria</b> .....	<b>104</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Espalhamento dinâmico de luz</b> .....	<b>105</b>

4.2.7	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	107
4.2.8	<b>Difração de raio-X</b> .....	111
4.2.9	<b>Espectroscopia de Raman</b> .....	112
4.2.10	<b>Susceptibilidade magnética</b> .....	113
4.3	<b>MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA</b> .....	114
4.3.1	<b>Avaliação do tempo de reação entre o reagente de Bradford e a albumina</b> .....	114
4.3.2	<b>Interferência do branco</b> .....	115
4.4	<b>TESTE DE EXCLUSÃO DE ALBUMINA</b> .....	116
4.5	<b>ESTUDOS DE ADSORÇÃO</b> .....	117
4.5.1	<b>Cinéticas de adsorção</b> .....	117
4.5.2	<b>Isotermas de adsorção</b> .....	122
4.6	<b>AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO</b> .....	126
4.7	<b>OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS SORVIDAS</b> .....	128
4.7.1	<b>Otimização das condições de dessorção para M-CNT</b> .....	129
4.7.2	<b>Otimização das condições de dessorção para M-CNT-BSA</b> .....	134
4.7.3	<b>Otimização das condições de dessorção para M-CNT-HL</b> .....	138
4.7.4	<b>Resumo da otimização das condições de dessorção para os materiais estudados</b> .....	142
4.8	<b>ESTUDOS DE ELETROFORESE EM GEL</b> .....	143
4.8.1	<b>Análises do perfil de proteínas dessorvidas dos nanotubos sintetizados</b> .....	143
4.8.2	<b>Análises do perfil de proteínas remanescentes nas amostras de soro diluído</b> .....	149
4.9	<b>ANÁLISES DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA</b> .....	151
4.10	<b>ENSAIOS <i>IN VITRO</i></b> .....	154
4.10.1	<b>Hemólise</b> .....	154
4.10.2	<b>Ensaio de viabilidade e de citotoxicidade</b> .....	155
4.10.2.1	<b>Ensaio de viabilidade: Resazurina</b> .....	156
4.10.2.2	<b>Ensaio de citotoxicidade: Liberação de lactato desidrogenase</b> .....	159

<b>4.10.3</b>	<b>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio</b> .....	<b>162</b>
4.10.3.1	Microscopia confocal de varredura a laser .....	163
4.10.3.2	Citometria de fluxo .....	166
<b>4.10.4</b>	<b>Avaliação da apoptose</b> .....	<b>169</b>
<b>4.10.5</b>	<b>Avaliação da permeação em modelo biomimético de barreira intestinal</b> .....	<b>171</b>
4.10.5.1	Cultivo do modelo biomimético .....	171
4.10.5.2	Ensaio de permeação no modelo biomimético .....	172
4.10.5.3	Permeação de <i>Lucifer Yellow</i> .....	174
4.10.5.4	Análise das monocamadas por microscopia confocal .....	175
<b>4.10.6</b>	<b>Quantificação dos nanotubos permeados por ICP-MS</b> .....	<b>176</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>179</b>
<b>6</b>	<b>PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO</b> .....	<b>182</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>183</b>

## RESUMO

Os nanotubos de carbono (CNTs) têm se destacado em aplicações nanomédicas devido às suas características favoráveis e possibilidades de funcionalizações. Quando esses nanomateriais entram em contato com a corrente sanguínea assumem uma nova identidade devido à formação da proteína corona. Além disso, ensaios para assegurar a citocompatibilidade dos sistemas devem ser realizados. Nessa tese foram sintetizados três materiais: CNTs magnéticos (M-CNTs), M-CNTs recobertos por albumina sérica bovina (M-CNTs-BSA) e M-CNTs funcionalizados com os monômeros hidrofílicos hidroxietil-acrilato e glicerol dimetacrilato (M-CNTs-HL). Esses materiais foram amplamente caracterizados e o perfil de adsorção de albumina foi avaliado, obtendo-se valores entre 13,2 e 19,9 mg g<sup>-1</sup>, com isotermas de Freundlich e Sips explicando o comportamento adsorptivo. Ensaios mostraram que os nanotubos exerceram um efeito de supressão na fluorescência de uma solução de albumina, indicando que essa proteína pode mudar seu estado conformacional após a interação com a superfície dos materiais. Diferentes concentrações de nanotubos foram aplicadas para os estudos de citotoxicidade, metabolismo celular, estresse oxidativo e apoptose utilizando Caco-2 como modelo celular. Citocompatibilidade para concentrações de até 100 µg mL<sup>-1</sup> foram obtidas para todos os materiais. Ensaios de permeação em modelo biomimético foram conduzidos sob ação de ímãs por até 8 h e as nanopartículas magnéticas presentes nos nanotubos foram utilizadas para estimar a concentração de materiais que atravessaram as Caco-2. Valores entre 0,50 e 7,19 e entre 0,27 e 9,30 ng foram obtidos para as células expostas e não expostas aos ímãs, respectivamente. Ensaios de eletroforese em gel foram realizados para comparar o perfil de proteínas eluídas dos materiais, após a exposição deles a amostras de soro humano diluído. Mudanças na concentração de proteínas totais foram verificadas, além de alterações discretas no perfil observado no gel de eletroforese. A otimização de condições distintas para a eluição de proteínas de cada nanotubo foi uma outra evidência de que os materiais interagem de forma diferente com as proteínas. Estudos mais conclusivos, utilizando um espectrômetro de massas, ainda estão sendo realizados. Juntos os resultados obtidos indicam que os materiais sintetizados são promissores para as áreas biomédicas e biotecnológicas. Ademais, ainda não há na literatura a comparação desses dois tipos de funcionalização para nanotubos.

**Palavras-chave:** Nanotubos de carbono funcionalizados, adsorção, citocompatibilidade, permeação, proteína corona.

## ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNTs) have stood out in nanomedical applications due to their favorable characteristics and the possibility of functionalization. When these nanomaterials come into contact with the blood, they assume a new identity due to the formation of protein corona. Furthermore, assays to ensure the cytocompatibility of the systems must be carried out. In this thesis, three materials were synthesized: magnetic CNTs (M-CNTs), M-CNTs covered with bovine serum albumin (M-CNTs-BSA), and M-CNTs functionalized with hydrophilic monomers hydroxyethyl-acrylate and glycerol dimethacrylate (M-CNTs-HL). These materials were extensively characterized, and the albumin adsorption profile was evaluated, obtaining values ranging from 13.2 to 19.9 mg g<sup>-1</sup>, with Freundlich and Sips isotherms explaining the adsorptive behavior. Fluorescence assays showed that the nanotubes had a quenching effect of the albumin in solution, indicating that these proteins can change their conformational state after interacting with the surface of the materials. Cytotoxicity, cellular metabolism, oxidative stress, and apoptosis using Caco-2 as a cellular model were evaluated using different concentrations of carbon nanotubes. Cytocompatibility for concentrations of up to 100 µg mL<sup>-1</sup> was obtained for all materials. Permeation tests in a biomimetic model were conducted under the action of magnets for up to 8 h, and the magnetic nanoparticles presented in the nanotubes were used to estimate the concentration of materials that crossed the Caco-2 monolayers. Values ranging from 0.50 to 7.19 and from 0.27 to 9.30 ng were obtained for cells exposed and not exposed to magnets, respectively. Gel electrophoresis tests were carried out to compare the profile of the protein corona eluted from the materials after exposure to diluted human serum samples. Changes in the concentration of total proteins were verified, in addition to discrete changes in the protein profile observed in the electrophoresis gel. Another evidence that materials interact differently with proteins was optimizing different elution conditions for each nanotube. More conclusive studies using a mass spectrometer are still being performed. Together the obtained results indicate that the synthesized materials are promising for biomedical and biotechnological applications. There is still no comparison in the literature of these two types of functionalization for nanotubes.

**Key-words:** Functionalized carbon nanotubes, adsorption, cytocompatibility, permeation, protein corona.

## 1 INTRODUÇÃO

A química de nanomateriais é um campo amplamente pesquisado e responsável pelo surgimento de componentes que são utilizados em preparo de amostras complexas (de Faria *et al.*, 2017b), em fabricação de sensores, e em procedimentos nanomédicos (Alshehri *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2012). Neste contexto, os nanotubos de carbono (CNTs) têm despertado grande interesse por apresentarem uma série de características favoráveis, como elevada área superficial, estabilidade física, resistência química e possibilidade de funcionalização com diversos grupos; além de ligação com fármacos e peptídeos (Alshehri *et al.*, 2016). Várias são as possibilidades de uso dos CNTs na nanomedicina: i) bioimageamento de células e tecidos (Zerda *et al.*, 2010); ii) desenvolvimento de imunossensores (Sharma *et al.*, 2015); iii) engenharia de tecidos, melhorando as características mecânicas e elétricas dos suportes (Shrestha *et al.*, 2017); e iv) sistemas de *drug delivery* (DDS), para a entrega específica e controlada de pequenas quantidades de fármacos ou genes (Karimzadeh; Safaei; Jen, 2021).

A magnetização soma vantagens às características dos materiais, pois esses passam a ser facilmente removidos do meio com o auxílio de um ímã, evitando processos como a centrifugação e a filtração (Kandasamy *et al.*, 2018), minimizando fontes de erros, perdas e contaminações. Além disso, os ímãs podem auxiliar em processos médicos como a distribuição de antibióticos em biofilmes bacterianos (Quan *et al.*, 2019) e o transporte de nanomateriais pelo organismo (Bueno *et al.*, 2018).

A toxicidade que os CNTs podem oferecer quando aplicados como dispositivos nanomédicos está ligada com seu grau de pureza, tamanho e funcionalização (Oliveira *et al.*, 2015). Os ensaios de citocompatibilidade são os primeiros a serem realizados e envolvem diversos testes utilizando linhagens celulares para se entender como os materiais interagem com componentes biológicos. Esses ensaios podem compreender viabilidade celular, citotoxicidade, hemólise e potencial oxidante (Cacchioli *et al.*, 2014; Granja *et al.*, 2019).

Para avaliar as potencialidades de um novo sistema de transporte, a sua interação com células do intestino é um interessante campo a ser explorado, devido a possibilidades de administração oral. Assim, linhagens de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) são utilizadas nos ensaios, inclusive para a construção de modelos biomiméticos para a avaliação do potencial de permeação dos materiais em análise (Granja *et al.*, 2019). Já foi relatado que os CNTs podem interagir com barreiras biológicas devido ao seu formato semelhante a nanoagulhas (Serpell; Kostarelos; Davis, 2016) ou por processos de endocitose (Gonzalez-Carter *et al.*, 2019).

Um outro fator importante é que a identidade dos nanomateriais é modificada assim que eles entram na corrente sanguínea (Hadjidemetriou; Kostarelos, 2017), uma vez que ocorrem interações múltiplas e espontâneas com as proteínas. A interação com essas macromoléculas forma o que ficou conhecido como proteína corona, que tem sua constituição determinada principalmente pela composição da superfície dos materiais (Sacchetti *et al.*, 2013).

A formação da proteína corona pode ser correlacionada com a diminuição da toxicidade das nanoplateformas (Oliveira *et al.*, 2015). Além disso, a sorção de proteínas na superfície pode ajudar no reconhecimento específico das células, diminuindo a quantidade de fármacos utilizada nos tratamentos (Oliveira *et al.*, 2015). Contudo, características desfavoráveis que limitam a ação dos sistemas desenvolvidos também são atribuídas à proteína corona, como o aumento do tamanho dos nanomateriais (macrófagos reconhecem mais facilmente compostos maiores), mudanças na interação com células, alterando a forma de transporte e de reconhecimento, e a indução de resposta inflamatória, devido a exposição de diferentes epítomos (Cox *et al.*, 2018, Maiolo *et al.*, 2015).

Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou que CNTs de paredes múltiplas revestidos com albumina sérica bovina (BSA) (Barbosa *et al.*, 2015) ou funcionalizados com monômeros hidrofílicos (de Faria *et al.*, 2022), apresentaram a capacidade de excluir quase 100% das proteínas abundantes provenientes de amostras biológicas, não permitindo que as macromoléculas se acumulassem sobre a superfície dos materiais. Neste contexto, uma investigação mais aprofundada desses materiais, incluindo a citocompatibilidade e a formação da proteína corona, pode ser de grande interesse para a comunidade científica dedicada ao desenvolvimento de nanoplateformas de liberação de fármacos. Para tal, três materiais foram desenvolvidos nessa tese: i) CNTs magnéticos (M-CNTs), ii) CNTs magnéticos revestidos com albumina sérica bovina (M-CNTs-BSA), e iii) CNTs magnéticos funcionalizados com os monômeros hidrofílicos hidroxietil-acrilato e glicerol dimetacrilato (M-CNTs-HL). A principal hipótese é que a presença de grupos de revestimento (BSA ou monômeros hidrofílicos) poderá diminuir a formação da proteína corona quando esses materiais forem expostos a amostras de soro, evitando as limitações que essa camada pode causar aos sistemas nanomédicos. Adicionalmente, a presença dos mesmos grupos de funcionalização poderá alterar a citotoxicidade dos CNTs. Dessa forma, essa tese visa explorar as diferentes funcionalizações de nanotubos magnéticos frente a

citocompatibilidade e sorção de proteínas para que esses materiais possam futuramente serem empregados em diferentes procedimentos nanomédicos.

## 1.1 OBJETIVOS

A seguir serão expostos o objetivo geral e os objetivos específicos dessa tese.

### 1.1.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanotubos de carbono magnéticos (M-CNTs) não modificados e modificados com BSA (M-CNTs-BSA) e monômeros hidrofílicos, glicerol dimetacrilato e hidroxietil-acrilato, (M-CNTs-HL), analisando a capacidade de sorção de proteínas, formação de proteína corona, citotoxicidade, e capacidade de permeação em barreiras biológicas de cada um deles.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são listados a seguir:

- a) sintetizar nanotubos de carbono magnéticos (M-CNTs);
- b) funcionalizar os M-CNTs com BSA ou com monômeros hidrofílicos para a obtenção dos M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL, respectivamente;
- c) caracterizar os três materiais por técnicas diversas: espectroscopia no infravermelho, análises termogravimétricas, calorimetria exploratória diferencial, espalhamento dinâmico de luz, porosimetria, potencial zeta, espectroscopia de Raman, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X e susceptibilidade magnética;
- d) avaliar os parâmetros de adsorção de padrão de HSA (preparada em solução tampão) nos três materiais sintetizados através de estudos de cinéticas e isotermas de adsorção;
- e) incubar, *in vitro*, M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL em amostras de soro humano para a adsorção de proteínas;
- f) otimizar os parâmetros de dessorção dessas proteínas;

- g) caracterizar, por ensaios de fluorescência, o perfil de adsorção de albumina nos materiais sintetizados;
- h) comparar, através da eletroforese em gel, o perfil da proteína corona formada em cada material;
- i) cultivar duas linhagens celulares: fibroblastos L929 e Caco-2;
- j) avaliar a citocompatibilidade dos M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL, utilizando diferentes ensaios *in vitro*: viabilidade celular, citotoxicidade, hemólise, geração de espécies reativas de oxigênio, e apoptose;
- k) verificar quais concentrações dos materiais são biocompatíveis;
- l) avaliar a permeação dos materiais sintetizados em modelo biomimético de barreira intestinal.

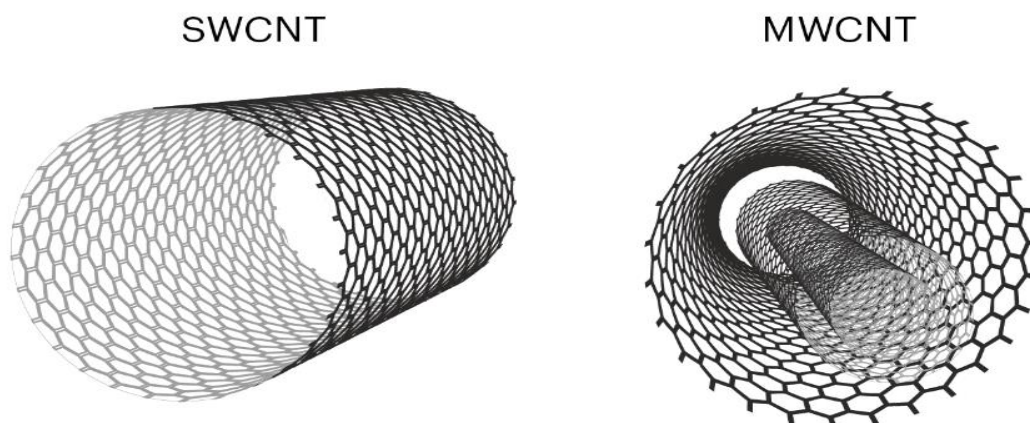
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos tópicos seguintes serão apresentados temas relevantes para o desenvolvimento dessa tese.

### 2.1 NANOTUBOS DE CARBONO

Os CNTs são materiais ocios formados por uma ou múltiplas folhas de grafite organizadas sobre um mesmo eixo (Zarbin, 2007) (Figura 1). Esses materiais apresentam uma série de características favoráveis para aplicações nanotecnológicas: grande área superficial; elevado volume interno; estabilidade; resistência mecânica, química e térmica; propriedades condutoras; e capacidade de ligação com moléculas orgânicas (Prajapati *et al.*, 2019). Os CNTs são naturalmente hidrofóbicos, mas permitem uma série de funcionalizações, como será demonstrado nos tópicos a seguir. Assim, despertam o interesse de áreas como engenharia, medicina e química para aplicações diversas. Vale ressaltar que os CNTs podem apresentar tamanho, morfologia, estrutura e pureza variados de acordo com as técnicas de preparo, purificação e funcionalização (Murjani *et al.*, 2022).

Figura 1 - Representação de um nanotubo de carbono de parede única (SWCNT) e um nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)



Fonte: adaptado de: Filchakova (2021).

Atuais usos dos CNTs funcionalizados podem ser relacionados à fabricação de sensores (Gulati *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022) e ao seu emprego como

materiais de acesso restrito (RAM) para o preparo de amostras complexas (Castilho *et al.*, 2023; Cruz *et al.*, 2022; de Faria *et al.*, 2022). Na obtenção de sensores, os CNTs podem ser funcionalizados com polímeros, enzimas, proteínas ou ácido desoxirribonucleico (DNA) e apresentam algumas vantagens frente a outros sensores, como por exemplo a combinação de propriedades físico-químicas com o reconhecimento biológico, alta sensibilidade e estabilidade (Alshehri *et al.*, 2016). Assari e colaboradores (2020), por exemplo, desenvolveram um imunossensor a partir de CNTs funcionalizados com grupamentos -COOH, polianilina e nanopartículas de ouro para a detecção de biomarcadores específicos do câncer de próstata (Assari *et al.*, 2020). Outras aplicações tecnológicas (sistema de entrega de fármacos, engenharia de tecidos e bioimageamento) também já foram relatadas na literatura e serão abordadas na sequência. Obter uma dispersão adequada dos CNTs pode ser um desafio para as aplicações biomédicas, pois eles são materiais hidrofóbicos e com a tendência de aglomeração (Takahashi *et al.*, 2023). Dessa forma, pesquisadores buscam alternativas que envolvem funcionalizações (Muzi *et al.*, 2016; Prajapati *et al.*, 2019; Singh; Mia; Saxena, 2020; Zhang, Ting *et al.*, 2019), uso de força mecânica para a dispersão (Jos *et al.*, 2009; Singh; Mia; Saxena, 2020; Zhang, Ting *et al.*, 2019), e uso de aditivos no preparo das suspensões (Chen *et al.*, 2008; Kafa *et al.*, 2015; Pichardo *et al.*, 2012; Zhang, Ting *et al.*, 2019).

Em relação ao preparo de amostras, Figueiredo e colaboradores desenvolveram CNTs recobertos com BSA (Barbosa *et al.*, 2015), CNTs magnéticos recobertos com BSA (Balduino *et al.*, 2019) e CNTs recobertos com monômeros hidrofílicos (De Faria *et al.*, 2022). Esses materiais foram utilizados para o tratamento de amostras complexas (como plasma humano e leite industrializado), apresentando duas características fundamentais para os RAMs: i) interação com os analitos, os retirando da amostra e ii) exclusão de proteínas presentes na matriz. Em todos os trabalhos foram relatadas recuperações adequadas dos analitos e exclusão superior a 96% das proteínas interferentes.

A modificação de materiais com proteínas proporciona a presença de um grupamento externo volumoso para os RAMs, impedindo a aproximação de compostos de alto peso molecular ao interior do material. Além disso, em pHs diferente do ponto isoelétrico das proteínas, elas se encontram majoritariamente carregadas e o mecanismo de repulsão eletrostático se faz presente (Mendes *et al.*, 2020). Já o uso de grupamentos hidrofílicos leva

à formação de uma camada externa que previne a sorção de macro interferentes e a ação de moléculas de água sobre os sítios de ligação do material extrator (De Faria *et al.*, 2022).

Um dos desafios para a efetiva aplicação dos nanomateriais, inclusive dos CNTs, na medicina é manter suas propriedades inerentes favoráveis e, ao mesmo tempo, torná-los biocompatíveis e não imuno-responsivos. Estudos têm demonstrado que a funcionalização de CNTs com proteínas do sangue (fibrinogênio, globulina, transferrina e albumina) diminui a citotoxicidade do material (Oliveira *et al.*, 2015). Essas proteínas são adsorvidas na superfície hidrofóbica dos CNTs, evitando a agregação dos mesmos, auxiliando no reconhecimento específico de células e na permeação de barreiras biológicas (Oliveira *et al.*, 2015).

## 2.2 NANOMATERIAIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Os nanomateriais apresentam vantagens para aplicações médicas como: elevada razão área/volume e capacidade de funcionalização com grupamentos diversos que podem proporcionar luminescência, biocompatibilidade, potencial de tratamentos térmicos, e/ou capacidade de reconhecimento por receptores celulares (Maiti *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2023). Nessa revisão será dado enfoque para usos e funcionalizações dos CNTs, uma vez que esse é o material alvo dos estudos.

A albumina desperta interesse como uma proteína para funcionalização pois não apresenta toxicidade, pode ser metabolizada *in vivo* e já é utilizada como excipiente de várias formulações farmacêuticas (An; Zhang, 2017). A albumina apresenta um tempo adequado de circulação na corrente sanguínea, sendo uma vantagem para a distribuição sustentada de fármacos (An; Zhang, 2017). As nanopartículas (NPs) metálicas magnéticas têm comum aplicação em estudos antimicrobianos e vêm demonstrando resultados positivos para a inibição de diferentes microrganismos *in vitro* (Bueno *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2023; Orhan *et al.*, 2019). A magnetização confere características favoráveis aos nanomateriais, pois com o auxílio de um ímã é possível separá-los da matriz ou promover seu deslocamento no meio em que ele está inserido (Bueno *et al.*, 2018). Bueno e coautores (2018) desenvolveram um material utilizando NPs magnéticas, xantana, BSA e amoxicilina e demonstraram que a difusão do antibiótico no meio de cultivo foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* e de *S. aureus*. Os autores relataram também que a presença da proteína sustentou a liberação do

fármaco para o meio (Bueno *et al.*, 2018). Já Orhan e coautores (2019) utilizaram NPs magnéticas recobertas com polímeros para a adsorção de lisozima e propuseram o uso do material como agente microbida para culturas de *M. lysodeikticus* (Orhan *et al.*, 2019). Por fim, Anbouhi e colaboradores (2018) sintetizaram NPs de ferro recobertas com albumina e mostraram que elas atuavam como agente antimicrobiano para *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, foi verificado que material induziu a morte de células tumorais em uma relação dose-dependente (Sedaghat Anbouhi *et al.*, 2018). Estudos com CNTs também já foram relatados, Foo e coautores (2018) funcionalizaram CNTs com extrato de *H. bumi* (uma planta tradicionalmente utilizada na medicina indiana) e testaram a atividade do material contra *Bacillus sp.*, *E. coli* e *A. niger*. Comparados ao extrato somente, os CNTs funcionalizados promoveram um maior halo de inibição quando incubados com os microrganismos; aumentando assim a atividade antimicrobiana (Foo *et al.*, 2018).

As estratégias baseadas em *drug delivery systems* (DDS) são importantes uma vez que contornam limitações encontradas nos tratamentos com fármacos livres. Os DDSs alteram as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, melhoram a solubilidade e a estabilidade, controlam a liberação dos fármacos, e podem proporcionar a capacidade de atravessar barreiras biológicas (An; Zhang, 2017; Goyal *et al.*, 2016). Os nanocarreadores também podem proporcionar liberação em local específico, reduzindo os efeitos sistêmicos adversos (Belali; Wathoni; Muchtaridi, 2019; Chaves *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2020). Os DDSs são largamente estudados para uso em terapias de câncer objetivando-se diminuir a interação de células saudáveis com fármacos altamente citotóxicos. Por existir certa heterogeneidade entre as superfícies de células tumorais e de células saudáveis, os nanomateriais funcionalizados podem interagir de forma distinta com elas (Kalimuthu *et al.*, 2018).

Shao e colaboradores (2015) funcionalizaram CNTs com NPs de albumina sérica humana para a entrega de paclitaxel em células de câncer de mama. O material sintetizado foi internalizado e apresentou inibição de crescimento das células tumorais (Shao *et al.*, 2015). Taghavi e colaboradores (2016) também obtiveram a inibição específica utilizando uma nanoplataforma para a entrega simultânea de shRNA e de doxorrubicina. O material sintetizado era composto por um suporte de polietilamina modificada com polietilenoglicol (PEG) e CNTs carboxilados (Taghavi *et al.*, 2017). Kalimuthu e colaboradores (2018) desenvolveram NPs de ouro recobertas por polímeros e funcionalizadas com peptídeos

ligados a fármacos. O sistema conseguiu interagir de maneira seletiva com as células alvo e aumentar o tempo de circulação do fármaco, passando de aproximadamente 0,4 para até 22 h (Kalimuthu *et al.*, 2018).

Ainda em relação aos estudos de tumores, as propriedades físicas dos CNTs funcionalizados com corantes, NPs fluorescentes ou pontos quânticos (Alshehri *et al.*, 2016) os tornam atrativos para a técnica de bioimagem. Zerda e colaboradores (2010) desenvolveram um material contraste utilizando corante imobilizado em CNTs e conjugados com peptídeos específicos reconhecidos por células tumorais. Como resultado obteve-se o aumento do contraste fotoacústico do tecido tumoral em ratos portadores de tumor (Zerda *et al.*, 2010), possibilitando a geração de imagem do mesmo. Vale ressaltar que nanocarreadores de ouro também foram eficientemente empregados como agentes de contraste para rastrear *in vivo* células mesenquimais de tumores de ratos (Zhang *et al.*, 2013).

Os CNTs também têm sido empregados na engenharia de tecidos (Alshehri *et al.*, 2016; Nalesso *et al.*, 2023; Shrestha *et al.*, 2017). Eles são utilizados para melhorar as propriedades mecânicas e elétricas dos suportes, rastrear células e entregar componentes químicos e biológicos para o meio (Alshehri *et al.*, 2016). Shrestha e colaboradores (2017) desenvolveram um material híbrido utilizando fibras de poliuretano, CNTs funcionalizados e NPs de óxido de zinco e o aplicaram como suporte para tecidos ósseos. Os autores perceberam que a incorporação dos CNTs aumentou a resistência mecânica, a estabilidade, a condutividade, e a biocompatibilidade das fibras. O material desenvolvido também aumentou eficientemente o metabolismo ósseo, oferecendo estímulos constantes para proliferação e diferenciação de osteoblastos (Shrestha *et al.*, 2017). Zhang e colaboradores (2014) também demonstraram a capacidade de NPs de ouro serem internalizadas por osteoblastos, aumentando a proliferação, a atividade de proteínas e o acúmulo de cálcio, sem comprometer a morfologia do tecido (Zhang *et al.*, 2014).

De forma geral, para que possam exercer as diversas funções apresentadas, os nanomateriais precisam ser administrados por alguma via. Ao entrar em contato com a corrente sanguínea esses materiais assumem uma nova identidade de superfície devido às interações que ocorrem com as proteínas. As macromoléculas adsorvidas formam o que é conhecido como proteína corona, uma camada superficial dinâmica que influencia na interação entre os nanomateriais e o sistema biológico (Hajipour *et al.*, 2023).

### 2.3 ESTUDOS DE PROTEÔMICA

O termo proteoma refere-se ao conjunto de proteínas produzidas ou modificadas por um organismo (animais, vegetais, bactérias, entre outros) ou por um sistema vivo (órgãos e culturas de células, por exemplo) (Dupree *et al.*, 2020). Na década de 1990 iniciaram-se os estudos de proteômicas em laboratórios especializados devido a importância das proteínas para a manutenção da vida, do interesse em se conhecer quais delas estão presentes em cada espécie, e da necessidade de se entender os processos, as vias de sinalização e os mecanismos fisiológicos nos quais as proteínas estão presentes (Dupree *et al.*, 2020). Dentre os avanços que possibilitam os estudos de proteômicas recentes, aqueles desenvolvidos em quatro áreas principais podem ser destacados: (1) eletroforese em gel em duas dimensões (2DE), (2) espectrometria de massas, (3) sequenciamento e catálogo de proteínas e peptídeos em diferentes bancos de dados; e (4) desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para permitir e simplificar a identificação de proteínas (Chen *et al.*, 2020; Dupree *et al.*, 2020; Sperling, 2001; Zhang, Fangfei *et al.*, 2020).

De forma geral, a proteômica moderna é de interesse tanto para a ciência básica, quanto para a aplicada e consiste em uma ampla gama de metodologias para a identificação e quantificação de proteínas presentes em uma célula, tecido ou organismo (Amin *et al.*, 2021; Nice, 2021). Além disso, estudos envolvendo a identificação de proteínas que são acumuladas em nanomateriais após o contato deles com matrizes biológicas também são de relevante importância (Carril *et al.*, 2017; Cox *et al.*, 2018; Kim, 2020). A avaliação da expressão de proteínas em diferentes matrizes é útil para o conhecimento de mecanismos fisiológicos/patológicos, seleção de candidatos a vacinas e a biomarcadores, entendimento de vias de sinalização proteicas, estudos de proteoformas e de interações entre proteínas, e previsão de como os nanomateriais irão se relacionar com sistemas biológicos em casos, por exemplo, de *drug delivery* ou de suportes para a regeneração de tecidos (Findeisen; Neumaier, 2009; Hovestadt *et al.*, 2020; Li, Hanmei *et al.*, 2021; Moraru *et al.*, 2020; Palmieri; Spirito; Papi, 2020; Ponzini *et al.*, 2022; Rehman *et al.*, 2021). Os ensaios de proteômica podem ser conduzidos de duas formas principais: *bottom up* ou *top down*. A proteômica por *bottom up* consiste na análise dos peptídeos produzidos por um processo de digestão enzimática controlada (Dupree *et al.*, 2020), já o de *top down* analisa as proteínas em seus estados nativos (Brown *et al.*, 2020).

Um estudo típico de *bottom up* consiste na realização de diversos processos para a identificação/quantificação das proteínas presentes em uma amostra complexa: (i) isolamento da mistura proteica da amostra; (ii) quantificação das proteínas totais por métodos como o de Bradford; (iii) fracionamento das proteínas (exemplos: eletroforese ou cromatografia), (iv) digestão enzimática das proteínas, (v) análises por espectrometria de massas dos peptídeos resultantes, e (vi) identificação das proteínas utilizando banco de dados (Dupree *et al.*, 2020). A digestão enzimática pode ser feita *in gel*, a partir da excisão de digestão de uma banda específica obtida após o fracionamento das proteínas por eletroforese ou *in solution*, a partir da adição de tripsina na solução proteica (Kruszewska; Zajda; Matczuk, 2021). Normalmente proteases são empregadas para realizar a digestão enzimática, permitindo a clivagem de peptídeos em terminais conhecidos. Esse procedimento, aliado às informações da razão massa/carga do peptídeo, possibilita a comparação dos resultados experimentais com bancos de dados, permitindo inferências sobre as proteínas presentes na amostra (Dupree *et al.*, 2020). A tripsina é a protease mais comumente utilizada devido à sua eficiência, alta atividade catalítica e especificidade para a clivagem. A tripsina gera peptídeos básicos de arginina ou lisina no terminal-C, que são adequados para análises em espectrometria de massa (Kiser *et al.*, 2009).

Pode-se dizer que manipular peptídeos, ao invés de proteínas inteiras, seja uma vantagem dos estudos por *bottom up*, pois os peptídeos são mais fáceis de se separar por cromatografia de fase reversa, ionizam bem e geram fragmentos de uma maneira mais previsível (Cristobal *et al.*, 2017; Rogers; Bomgarden, 2016), permitindo a elaboração de métodos precisos e robustos. Além disso, existem métodos bem estabelecidos para o preparo de amostras, instrumentos adequados para análises de MS, e uma variedade de banco de dados (Addona *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2023; Verheggen *et al.*, 2020). Por esses motivos, essa abordagem é amplamente utilizada e fornece uma significativa lista de proteínas identificadas de amostras complexas, incluindo proteomas totais (Wilhelm *et al.*, 2014). Como desvantagens, podem ser citadas as limitações do uso de proteases. Por exemplo, quando a tripsina é usada cerca de 56% de todos os peptídeos gerados são demasiadamente pequenos para serem identificados por MS (Dupree *et al.*, 2020). Além disso, o uso extensivo de tripsina leva a métodos otimizados para a clivagem específica dessa protease (Tsiatsiani; Heck, 2015). Conseqüentemente, a proteômica *bottom-up* atual pode fornecer uma visão limitada e tendenciosa do proteoma completo (Tsiatsiani; Heck, 2015), e a

informação gerada pode não ser suficiente para a identificação de proteoformas (Dupree *et al.*, 2020).

Em análises de *top down*, as proteínas são isoladas da amostra geralmente utilizando tampões com altas concentrações de sais, inibidores de proteases e fosfatases e surfactantes (para a solubilização das proteínas) (Brown *et al.*, 2020). Na sequência, as proteínas podem passar por processos de pré-fracionamento (eletroforese em gel e técnicas cromatográficas, por exemplo), passam por etapas para tornar a amostra compatível com o MS, e são analisadas (Brown *et al.*, 2020). A principal vantagem da análise por *top down* é a possibilidade para resolver proteoformas e identificar os níveis de expressão de várias delas (Chen, Bifan *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). Já como desvantagens, existem dificuldades de solubilização de proteínas inteiras (Melby *et al.*, 2021) e a maior parte dos sais e surfactantes utilizados normalmente não são compatíveis com as análises de MS, precisando ser retirados em etapas prévias (ultrafiltração ou precipitação de proteínas, por exemplo) (Loo; Dales; Andrews, 1994). Vale ressaltar que se sais ou surfactantes forem utilizados no método *bottom up* eles também precisam ser retirados antes das análises por MS.

O principal interesse em se analisar proteínas adsorvidas em nanomateriais é verificar a camada corona formada, e inferir sobre a capacidade desses materiais em adsorver diferentes proteínas de acordo com suas características de superfície (Kruszewska; Zajda; Matczuk, 2021). Após o contato dos nanomateriais com a amostra biológica, as proteínas da corona são eluídas e separadas dos materiais e o método mais comum para análises é o *bottom up* (Kruszewska; Zajda; Matczuk, 2021). Além disso, a digestão enzimática pode ser realizada *in-gel* (pela excisão de bandas de eletroforese) ou *in-solution* (Kruszewska; Zajda; Matczuk, 2021).

É importante ressaltar que algumas dificuldades nos estudos de proteômicas ainda são enfrentadas devido aos diferentes níveis de abundância das proteínas (Lee *et al.*, 2019). Por isso técnicas como fracionamento, depleção de proteínas abundantes ou equalização podem ser inseridas nas etapas de preparo de amostras para obter melhores resultados e permitir a identificação de proteínas de baixa abundância.

As técnicas de fracionamento têm como principal objetivo o isolamento de uma proteína (ou um grupo de proteínas) a partir de suas características físico-químicas (da Costa *et al.*, 2017). Técnicas como eletroforese em gel (uni e bidimensional), cromatografias de

exclusão de tamanho, de troca catiônica, de interações hidrofóbicas ou de interações hidrofílicas são comumente aplicadas para a obtenção de frações menos complexas das amostras (Lee *et al.*, 2019). As metodologias de depleção têm como objetivo a retirada de proteínas de alta abundância (como albumina e imunoglobulinas) das amostras antes das análises por MS (Lee *et al.*, 2019). As estratégias envolvem uso de ligantes, imunodepleção, precipitação e uso de nanomateriais (Lee *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). Além disso, diferentes *kits* estão disponíveis comercialmente. A estratégia de equalização pode ser realizada usando uma biblioteca combinatória de ligantes peptídicos para “igualar” as concentrações das proteínas presentes nas amostras (Righetti *et al.*, 2006). Nos tópicos a seguir será brevemente abordada a técnica de eletroforese em gel unidimensional para a separação e identificação de proteínas, e o uso de espectrometria de massas.

### **2.3.1 Eletroforese em gel unidimensional para análise de proteínas**

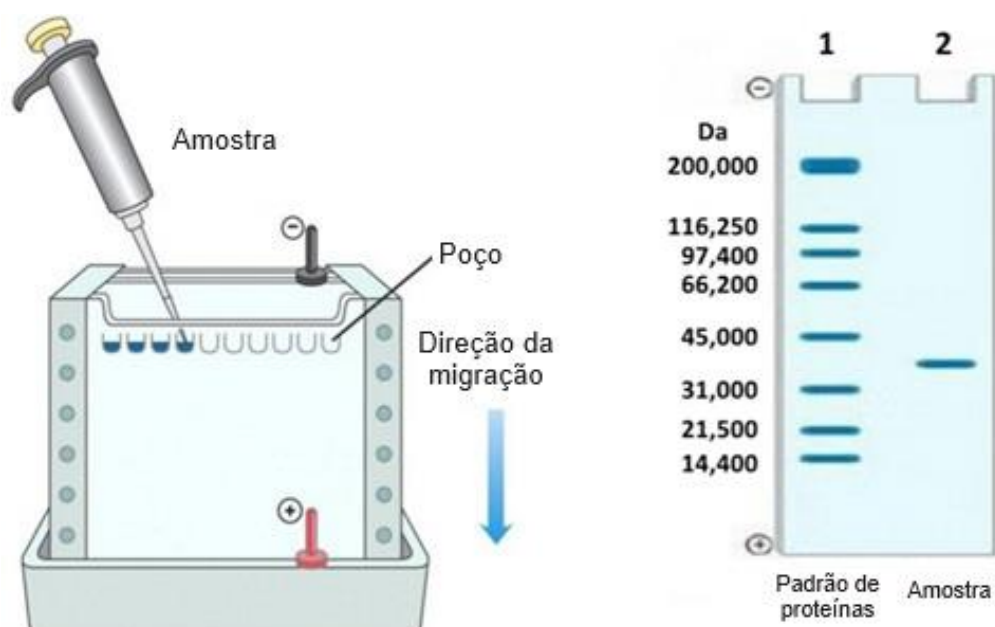
A eletroforese em gel é uma técnica amplamente utilizada nas áreas de bioquímica, biologia molecular, química analítica e proteômica para separar, identificar e quantificar macromoléculas, tais como as proteínas (García-Descalzo *et al.*, 2012). O movimento dessas proteínas através do gel é influenciado por características como tamanho, formato e ponto isoelétrico. Quando estão em solução com pH diferente de seus pontos isoelétricos, as proteínas apresentam cargas que possibilitam seu deslocamento na presença de um campo elétrico externo (García-Descalzo *et al.*, 2012). Vale ressaltar também que a magnitude da carga por unidade de massa influencia diretamente na velocidade de migração da proteína (García-Descalzo *et al.*, 2012).

Os géis mais comumente aplicados na técnica de eletroforese são os de poliacrilamida (PAGE), formados a partir da polimerização da acrilamida na presença de um agente de entrecruzamento, um iniciador, e um catalizador. Bis-acrilamida, persulfato de amônio e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina são normalmente utilizados (García-Descalzo *et al.*, 2012). A concentração empregada, assim como a razão acrilamida/bis-acrilamida exerce uma influência significativa no tamanho dos poros e na rigidez do gel polimerizado, impactando diretamente a faixa de tamanhos de proteínas que podem ser separadas (García-Descalzo *et al.*, 2012). Quanto menor a quantidade de acrilamida utilizada, maior o tamanho dos poros formados, tornando-o mais adequado para a resolução de proteínas maiores e essa

relação é igualmente válida no sentido oposto (Gallagher, 1995). Adicionalmente, é possível a preparação de “géis de gradiente” utilizando diferentes proporções acrilamida/bi-acrilamida. Isso permite uma ampliação na faixa de proteínas que podem ser analisadas em uma corrida eletroforética (García-Descalzo *et al.*, 2012).

O uso de dodecil sulfato de sódio (SDS) na preparação do PAGE também é comum, dando origem a denominação SDS-PAGE. O SDS é utilizado para desnaturar a estrutura terciária das proteínas (a partir da clivagem de ligações dissulfeto) e permitir a formação de complexos SDS-proteína com densidade de cargas negativas similares (García-Descalzo *et al.*, 2012). Dessa forma, as proteínas migram essencialmente pelos seus pesos moleculares (Soni *et al.*, 2022) e a interferência do pH é eliminada. Isso permite que as proteínas se movimentem do cátodo para o ânodo da cuba eletroforética (Figura 2), mesmo em valores de pH próximos de seus pontos isoelétricos (García-Descalzo *et al.*, 2012). Vale ressaltar que proteínas menores apresentam maior mobilidade e são vistas na parte inferior do gel de SDS-PAGE. Além disso, os valores de mobilidade diminuem linearmente com o logaritmo dos pesos moleculares da proteína (Zhu; Lu; Liu, 2012).

Figura 2 - Representação esquemática do procedimento de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida



Fonte: Traduzido de Creative Proteomics Pronalyse (2024).

De forma geral, a execução da SDS-PAGE baseia-se em quatro etapas principais: (i) preparação do gel, (ii) tratamento da amostra (essa etapa é realizada utilizando-se um tampão de ruptura contendo SDS e temperatura de 90°C), (iii) corrida eletroforética, e (iv) uso de corantes para a identificação das proteínas (azul de *Coomassie Brilliant Blue* e nitrato de prata são comumente utilizados) (Zhu; Lu; Liu, 2012). Para o auxílio na identificação das proteínas separadas, um padrão comercial contendo proteínas de pesos moleculares definidos normalmente é aplicado no gel junto com as amostras a serem analisadas.

A eletroforese em gel apresenta vantagens importantes como separação rápida, uso de pequenos volumes de amostras e reagentes, e versatilidade (Kaur *et al.*, 2021; Kim; Cho, 2019; Lopez-Canovas *et al.*, 2019). No entanto, algumas limitações como baixa sensibilidade e baixa resolução para amostras com muitos interferentes também precisam ser mencionadas (Hassis *et al.*, 2015).

Assim como o mencionado, porções do gel podem ser recortadas e digeridas com uma protease para a identificação das proteínas ali presentes por MS (Kruszewska; Zajda; Matczuk, 2021).

### **2.3.2 Espectrometria de massas para análises de proteínas**

A espectrometria de massas é uma técnica utilizada em diferentes áreas, principalmente por suas características de alta sensibilidade e alta especificidade (Li, Chang *et al.*, 2021). De forma geral, um espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador e um detector (May *et al.*, 2011).

Em estudos de proteômica normalmente são utilizadas a ionização por *eletrospray* (ESI) ou a ionização a laser assistida por matriz (MALDI), em modo positivo (com a transferência de prótons para as proteínas/peptídeos) (May *et al.*, 2011). Na ESI, a solução que contém as proteínas/peptídeos é inserida no MS por injeção direta ou por sistemas de separação (exemplos: cromatografia líquida e eletroforese capilar) acoplados a ele (Banerjee; Mazumdar, 2012). Para a ionização, a amostra (carreada por um solvente) passa por um capilar ao qual é aplicado uma tensão e três eventos principais acontecem: (i) formação de uma gota carregada na ponta do capilar, (ii) dessolvatação da gota e desintegrações sucessivas para a formação de gotas menores, e (iii) formação de íons em uma fase gasosa (Banerjee; Mazumdar, 2012). Já na ionização por MALDI, as moléculas da

amostra são inicialmente imobilizadas em uma placa de metal por processos de cocristalização mediados por compostos orgânicos ácidos (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, por exemplo) (Zaluzec; Gage; Watson, 1995). Durante os processos de dessorção e ionização o laser incide sobre a placa, resultando na absorção de energia pela matriz. Esse fenômeno provoca uma transferência parcial de cargas da matriz para as proteínas/peptídeos, levando a ionização destes em uma fase gasosa (May *et al.*, 2011). Vale mencionar que a ionização por MALDI requer várias centenas de disparos do laser (de pulso único) para que seja atingido uma sensibilidade adequada (Husi; Albalat, 2014).

Os analisadores são utilizados para separar os íons com base em sua razão massa/carga (Li, Chang *et al.*, 2021), sendo que a sensibilidade e capacidade de resolução do método estão intrinsecamente ligadas à eficiência do analisador em realizar essa separação. Cada tipo de analisador apresenta características distintas como velocidade de análise, resolução, sensibilidade, transmissão de íons e faixa de massa (Li, Chang *et al.*, 2021). Entre os mais comumente empregados para os estudos de proteômica destacam-se o quadrupolo, o tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*), e o orbitrap (May *et al.*, 2011). Esses analisadores podem ser acoplados para realizar análises sequenciais de duas (MS/MS) ou mais etapas (MS<sub>n</sub>, onde *n* é o número de analisadores). O acoplamento desses módulos proporciona vantagens ao método, como maior sensibilidade e capacidade de resolução (Rozanova *et al.*, 2021). Normalmente, em sistemas acoplados, o primeiro analisador é utilizado para isolar o íon precursor, o qual é posteriormente fragmentado em uma câmara de colisão, gerando íons produtos que serão selecionados pelo segundo analisador (Aebersold; Mann, 2003).

Por fim, os detectores registram o número de íons em cada valor de massa/carga. Multiplicados de elétrons, copos de Faraday, e fotomultiplicadora são detectores frequentemente empregados, e a escolha entre eles se dá levando em consideração alguns fatores como: faixa dinâmica, ruído e compatibilidade com o analisador (Koppenaal *et al.*, 2005).

Além do exposto, os ensaios de proteômicas podem ser realizados com a aquisição de dados de forma dependente (DDA, do inglês *data-dependent acquisition*) ou independente (DIA, do inglês *data-independent acquisition*). No modo DDA, todos os íons precursores são escaneados no MS1, mas apenas um número limitado de íons é selecionado para a fragmentação no MS2, gerando uma série de espectros. Já no DIA, todos os íons

precursores obtidos no MS1 são fragmentados. Dessa forma, o DIA pode apresentar uma melhor exatidão para a quantificação dos peptídeos, mas requer equipamentos de alta resolução (Fu *et al.*, 2023). Por fim, em ambos os casos, os dados obtidos nos espectros são comparados com bancos de dados para a identificação dos peptídeos e das proteínas (Thiede *et al.*, 2005).

Vale ressaltar, que o preparo de amostras é uma etapa crucial para proporcionar obtenção de espectros de boa qualidade e com resolução adequada (Husi; Albalat, 2014). Como mencionado anteriormente, várias etapas precisam ser realizadas de acordo com cada tipo de análise, No entanto, a remoção de detergentes e sais previamente à injeção da amostra é de extrema importância (Hajduk; Matysiak; Kokot, 2016). Além disso, etapas de fracionamento da amostra, depleção de proteínas de alta abundância e equalização também devem ser realizadas, se necessário (Lee *et al.*, 2019).

Por fim, é importante ressaltar que mesmo sendo a tecnologia central para os estudos de proteômica, a utilização de equipamentos, *softwares* e banco de dados, e pessoal qualificado aumentam os custos dos ensaios, limitando o seu uso mais amplo (Aslam *et al.*, 2017). Na literatura existem diversos trabalhos sobre o uso de MS em estudos de proteômica (Aebersold; Mann, 2003; Boys *et al.*, 2023; Findeisen; Neumaier, 2009; Fu *et al.*, 2023; Haga; Minegishi; Ueda, 2023; Kitata; Yang; Chen, 2023; Messner *et al.*, 2023; Smith; Martins-de-Souza, 2021; Tsuchida; Umemura; Nakayama, 2020).

## 2.4 PROTEÍNA CORONA

A proteína corona representa a(s) camada(s) de biomoléculas sorvidas na superfície de materiais (Marchesan *et al.*, 2015). A injeção *in vivo* de nanomateriais pode levar à aglomeração, degradação parcial e/ou formação da corona (Carril *et al.*, 2017). É importante ressaltar que essa camada é dinâmica (Marchesan *et al.*, 2015) e que as proteínas sorvidas dependem das características do material: composição da superfície e método de preparo (Ge *et al.*, 2011), e das características do meio: temperatura, pH e condições da amostra biológica (Corbo *et al.*, 2016). A proteína corona pode alterar o transporte dos nanomateriais pelo organismo, as interações com as células, o perfil de degradação (Ge *et al.*, 2011; Marchesan *et al.*, 2015), e a performance terapêutica (Cox *et al.*, 2018), trazendo prejuízos para a plataforma nanomédica desenvolvida. Albumina sérica humana (HSA),

imunoglobulinas, fibrinogênio e apolipoproteínas são frequentemente relatadas na corona (Corbo *et al.*, 2016).

Capriotti e colaboradores (2012) estudaram as diferenças da formação da proteína corona em três materiais: lipossomas catiônicos, complexos lipídicos catiônicos conjugados com DNA e complexos policatiônicos conjugados com DNA. As proteínas ligadas aos materiais, após a incubação com sangue, foram eluídas e digeridas com tripsina para análises por MS. Diferenças qualitativas e quantitativas significativas foram encontradas entre as camadas corona. Os complexos lipídicos catiônicos com DNA apresentaram a maior diversidade, enquanto os lipossomas apresentaram a menor (Capriotti *et al.*, 2013). Já Sakulku e colaboradores (2015) estudaram a sorção de proteínas em NPs magnéticas recobertas com polivinil (superfícies neutras ou negativas) ou com dextrina (superfície positiva). Os materiais foram incubados em soro fetal bovino e os resultados demonstraram que a composição da camada corona era distinta entre os materiais. Foi observado também que apenas a superfície negativa apresentava forte ligação com as proteínas após a eluição da camada corona (Sakulku *et al.*, 2015).

Em relação às contribuições do meio, Cox e coautores (2018) estudaram a camada corona de NPs de ouro antes e após sua passagem por um modelo celular de barreira hematoencefálica. Como resultados foi observado que das 20 proteínas mais abundantes inicialmente, apenas nove permaneceram entre as principais após a passagem pela barreira, demonstrando mudanças significativas na formação da corona (Cox *et al.*, 2018).

Uma controvérsia que ainda se tem é se a proteína corona se altera de forma qualitativa ou apenas quantitativa ao longo do período de incubação com matrizes proteicas (Corbo *et al.*, 2016). Miklicanin *et al.* (2017) associaram a formação de *soft e hard* corona com a entropia das proteínas. Dessa forma, se a entropia do estado nativo é maior do que a do estado “alternativo” (relacionado a mudanças conformacionais) a transição entre eles é reversível. No entanto, se a entropia atinge um valor máximo que leva a desnaturação, a transição passa a ser irreversível (*hard* corona) (Omanovic-Miklicanin; Manfield; Wilkins, 2017) e mudanças dessas proteínas com o tempo geralmente não são significativas. Além disso, as interações proteína-nanopartículas que resultam em perturbações estruturais podem levar a perda da habilidade de uma proteína interagir com outras (Omanovic-Miklicanin; Manfield; Wilkins, 2017), resultando em alterações da corona com o tempo. Por fim, o meio

em que as proteínas estão dispersas também pode afetar as interações intermoleculares e o equilíbrio entre estado nativo e estado desnaturado (Fonseca *et al.*, 2006).

Tenzer e colaboradores (2013) incubaram NPs de sílica e de poliestireno com plasma humano. Os autores verificaram uma rápida (<0,5 min) formação da camada corona, com mais de 100 proteínas distintas instantaneamente sorvidas na superfície do material. As análises demonstraram que a composição inicial da camada não foi alterada mesmo após prolongada exposição (Tenzer *et al.*, 2013). Por outro lado, Ge e colaboradores (2011) ao estudar as interações entre CNTs e diferentes proteínas do sangue: fibrinogênio bovino,  $\gamma$ -imunoglobulina, transferrina e BSA, observaram que as duas últimas atingiram rapidamente o equilíbrio com os CNTs, contudo eram substituídas pelas duas primeiras ao se prolongar o tempo de incubação. Os autores relataram ainda que a adsorção pode estar relacionada com a hidrofobicidade, o volume, e o número total de resíduos hidrofóbicos das proteínas, mostrando que as interações  $\pi$ - $\pi$  entre os CNTs e os resíduos de aminoácidos aromáticos desempenham um papel fundamental na capacidade de adsorção (Ge *et al.*, 2011).

Em oposição aos resultados de Ge (2011), alguns autores dizem que a formação da proteína corona independe de características hidrofóbicas e do ponto isoelétrico (pI) das proteínas. Sacchaetti e colaboradores (2013) investigaram a formação da camada corona na superfície de CNTs modificados com PEG e relataram que ela era composta por proteínas de coagulação, imunoglobulinas, apolipoproteínas e proteínas do sistema complemento. Os autores afirmaram que a interação com o material foi independente do pI, peso molecular e relativa abundância plasmática. Duas formas distintas de imobilização do PEG nos CNTs foram utilizadas, e a diferença na superfície externa foi a principal responsável pela variação das proteínas adsorvidas, mostrando que o revestimento apresenta maior contribuição do que os CNTs em si, para a composição da corona (Sacchetti *et al.*, 2013).

Além dos estudos *in vitro*, outras possibilidades podem ser exploradas. Sakulku e colaboradores (2014) estudaram a formação da proteína corona *ex vivo* após a injeção intravenosa de NPs metálicas recobertas com polivinil (com diferentes cargas superficiais) em ratos. O número de proteínas e a composição da corona foram significativamente distintas de acordo com as cargas expostas. Como um exemplo, a apolipoproteína A-II, crucial para o transporte de NPs através da barreira hematoencefálica, foi um componente significativo nas superfícies negativas e neutras, mas não foi encontrada nas positivas (Sakulku *et al.*, 2014). Hadjidemetriou e colaboradores (2019) estudaram *in vivo* a

formação da proteína corona sobre lipossomas funcionalizados com PEG. O material foi injetado em ratos saudáveis e em ratos portadores de tumor. Como resultados, foi verificado que a camada corona aumentou o tamanho dos lipossomas e que *fingerprints* variaram de acordo com a presença ou a ausência de tumores (Hadjidemetriou *et al.*, 2019).

Como demonstrado nos exemplos acima, as funcionalizações propostas não impediram a formação da proteína corona, mas poucos estudos comparando materiais funcionalizados e não funcionalizados são relatados. Como um exemplo, Shannahan e coautores (2013) avaliaram a corona em CNTs de paredes únicas e de paredes múltiplas funcionalizados ou não com grupamentos -COOH. Após a incubação com soro fetal bovino, os CNTs não funcionalizados apresentaram cerca de 100 proteínas diferentes; enquanto os funcionalizados de paredes únicas tinham 181 e os de paredes múltiplas, 133 proteínas. A maior diversidade proteica nos funcionalizados foi atribuída às interações dos grupamentos -COOH com os grupos -NH<sub>3</sub> presentes nas proteínas do meio (Shannahan *et al.*, 2013).

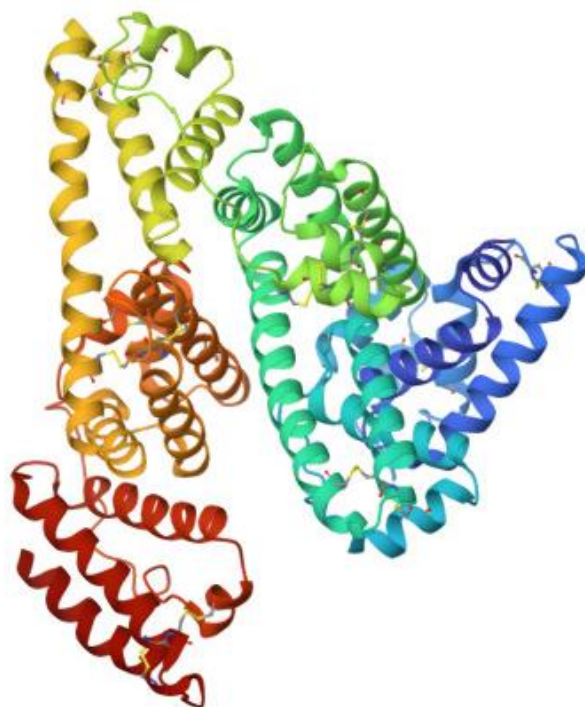
Relata-se que a adsorção de proteínas sobre a superfície de materiais reduz a toxicidade dos mesmos (GE *et al.*, 2011). No entanto, a proteína corona pode representar uma série de limitações *in vivo*, pois induz a formação de aglomerados com diferentes composições e estruturas. O tamanho dos nanomateriais é aumentado (sistemas maiores são mais facilmente reconhecidos, diminuindo seu tempo de circulação) e vias celulares e imunológicas podem ser ativadas pela exposição de epítomos (Maiolo *et al.*, 2015) devido a rearranjos estruturais que as proteínas podem sofrer (Omanovic-Miklicanin; Manfield; Wilkins, 2017). Boulos *et al.* (2013) e Mandal *et al.* (2013) demonstraram que a albumina sofre mudanças conformacionais ao ser adsorvida por NPs de ouro e de carbono, respectivamente. Essa constatação veio através da diminuição da fluorescência da albumina após o contato com os nanomateriais, indicando mudanças principalmente próximas aos resíduos de triptofano (Boulos *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2013). Além disso, a rápida formação da corona pode levar a situações como hemólise, ativação dos trombócitos, destruição de células endoteliais e internalização indesejada dos nanomateriais (Tenzer *et al.*, 2013).

#### **2.4.1 Composição do sangue e albumina**

O sangue é um fluido biológico de extrema importância que está envolvido no transporte de várias substâncias (endógenas e exógenas) entre órgãos e tecidos (Zhao *et al.*, 2016). Esse fluido é rico em proteínas que desempenham diferentes papéis no organismo. Cerca de 90% da massa proteica do sangue é composta apenas por seis proteínas: HSA, imunoglobulina G, imunoglobulina A, transferrina, haptoglobina e  $\alpha$ -1-antitripsina (Javanmard *et al.*, 2014) e, dentre elas, a HSA é a mais abundante (cerca de 60%), atingindo concentrações de 35-50 g por litro de sangue (Anderson; Anderson, 2002).

A HSA é produzida no fígado e liberada para a corrente sanguínea. Suas funções biológicas incluem a manutenção da pressão osmótica e o transporte de vários compostos, como ácidos graxos, bilirrubinas e drogas (Whicher, 1994). A HSA possui uma massa molecular de 66 kDa e apresenta três domínios homólogos (I, II, III) com dois subdomínios cada (A, B) (Bhattacharya; Curry; Franks, 2000). É uma proteína com uma única cadeia polipeptídica, contendo um grupo tiol (Whicher, 1994). A Figura 3 demonstra a estrutura natural da HSA.

Figura 3 – Estrutura cristalográfica da albumina sérica humana.



Fonte: PBD, Sugio *et al.* (1998).

## 2.5 PROCESSOS DE ADSORÇÃO

A adsorção pode ser descrita como um processo de transferência de massa, causado por interações entre um material (o adsorvente) e um analito (o adsorvato) (Nascimento *et al.*, 2014). O processo de adsorção pode ser dividido em dois mecanismos distintos: adsorção física, ocorre por interações de Van der Waals e apresenta uma baixa energia de ativação, ou adsorção química, ocorre por ligações químicas e requer uma maior energia de ativação (Malherbe, 2018). A adsorção física apresenta baixa especificidade e possibilidade de formação de multicamadas; já na adsorção química, maior especificidade e formação de apenas uma camada são esperadas (Malherbe, 2018).

Independentemente do tipo de adsorção, os processos podem ser influenciados por diversos fatores (Febrianto *et al.*, 2009; Malherbe, 2018; Nascimento *et al.*, 2014) como descritos a seguir:

- a) Propriedades do adsorvente: a área superficial e a homogeneidade da superfície estão associadas à disponibilidade de sítios para a adsorção. Já, a porosidade, o diâmetro e a distribuição do tamanho dos poros, estão relacionados à mobilidade do adsorvato no adsorvente. A carga superficial e a massa de adsorvente também são características que influenciam no processo de adsorção.
- b) Condições do meio: fatores como a polaridade do solvente, viscosidade do meio, velocidade de agitação, e presença de impurezas ou qualquer outra substância competitiva, também influenciam nos processos de adsorção.
- c) pH e potencial isoelétrico: determinam o grau de ionização dos grupamentos superficiais (tanto do adsorvente, quanto do adsorvato), o que pode ocasionar atração ou repulsão entre as espécies. O pI é o valor de pH em que a carga líquida da superfície é nula, em  $\text{pH} < \text{pI}$  a superfície tende a adquirir uma carga positiva e em  $\text{pH} > \text{pI}$ , uma carga negativa.
- d) Temperatura: um aumento na temperatura tende a favorecer a adsorção, pois a diminuição da viscosidade do solvente facilita a difusão do adsorvato.

Quando colocadas em contato, as moléculas do adsorvato fluem de modo gradiente do meio em que estão até a superfície do adsorvente, até que um equilíbrio seja atingido

(Nascimento *et al.*, 2014). Nesse estágio, a capacidade de adsorção do adsorvente ( $q_e$ ) pode ser determinada e estudos de cinéticas e isotermas são fundamentais para a avaliação desses parâmetros.

A cinética do processo está diretamente ligada com a taxa na qual o adsorvato presente em uma fase fluida é adsorvida ao material sólido durante o tempo de contato (Sahoo; Prelot, 2020). Durante esse processo, ocorre a transferência de massa do adsorvato para a superfície e/ou interior do adsorvente, podendo seguir diferentes etapas e mecanismos, dependendo das características dos componentes envolvidos (Ho; Ng; McKay, 2000; Nascimento *et al.*, 2020). No entanto, geralmente três etapas são observadas em materiais porosos: (i) a transferência das moléculas do adsorvato da fase fluida para a superfície externa do adsorvente (influenciada pela concentração do adsorvato e a agitação do sistema); (ii) a difusão interna nos poros do material; e (iii) a difusão do adsorvato nos sítios ativos do adsorvente (Wang; Guo, 2020).

Para avaliar o perfil de adsorção modelos matemáticos são aplicados nos dados obtidos, sendo os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, ordem fracionária, Elovich e difusão intrapartícula os mais comumente utilizados. Esses modelos são brevemente descritos a seguir:

#### Modelo de pseudo-primeira ordem

Esse modelo foi proposto por Lagergren em 1898 (Abou-Gamra; Ahmed, 2015) e é considerado o mais simples e antigo para avaliar o processo de adsorção líquido-sólido (Tan; Hameed, 2017). O modelo de pseudo-primeira ordem é descrito pela equação abaixo, em que  $q_e$  e  $q_t$  são, respectivamente, as quantidades de adsorvato adsorvidas por grama de adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no equilíbrio e no tempo  $t$  (s), e  $k_1$  é a constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem ( $\text{s}^{-1}$ ).

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (1)$$

De forma geral, o ajuste de pseudo-primeira ordem indica uma relação diretamente proporcional entre a variação da taxa de adsorção com o tempo e a diferença na concentração de saturação, com a adsorção do analito. Além disso, a estimativa da constante  $k_1$  geralmente é influenciada por condições experimentais (pH e temperatura, por exemplo) (Tan; Hameed,

2017) e tende a uma diminuição no seu valor com o aumento da concentração inicial de adsorvato (Febrianto *et al.*, 2009).

Por fim, esse é um modelo que, em muitos casos, não se adequa bem a toda faixa de adsorção, tendo melhores ajustes em tempos superiores a 20 min após o início do processo de adsorção (Sahoo; Prelot, 2020). A provável razão para isso é que pode haver um atraso no tempo devido a uma resistência externa (ou camada limite) controlada pelo início da adsorção (Vijayaraghavan; Palanivelu; Velan, 2006).

#### Modelo de pseudo-segunda ordem

A cinética de pseudo-segunda ordem vem sendo aplicada na adsorção de íons metálicos, óleos e substâncias orgânicas a partir de soluções aquosas em adsorventes sólidos (Qiu *et al.*, 2009). O modelo é descrito pela equação a seguir, em que  $k_2$  é constante da taxa de adsorção de pseudo-segunda ordem ( $\text{g mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

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

O modelo de pseudo-segunda ordem é dependente da quantidade de analito adsorvido na superfície do adsorvente e a quantidade adsorvida no estado de equilíbrio (Plazinski; Rudzinski; Plazinska, 2009). Nessa condição, a taxa de adsorção é dependente da capacidade adsortiva e não da concentração de adsorvato. Além disso, a etapa limitante do modelo pseudo-segunda ordem é a sorção química (Sahoo; Prelot, 2020). Vale ressaltar que o modelo de pseudo-segunda ordem geralmente representa bem toda a faixa de adsorção e que, a estimativa da constante  $k_2$  também diminui com o aumento da concentração inicial de adsorvato (Febrianto *et al.*, 2009).

#### Modelo de ordem fracionária

O modelo de ordem fracionária de Avrami foi proposto por Lopes *et al.* em 2003 (Lopes *et al.*, 2003) e é representado pela equação a seguir, na qual  $k_A$  é a constante de Avrami ( $\text{s}^{-1}$ ), e  $n_A$  é o expoente relacionado ao mecanismo de adsorção.

$$q_t = q_e \{1 - \exp[-(K_A t)]\}^{n_A} \quad (3)$$

Esse modelo leva em consideração possíveis mudanças nos mecanismos de adsorção em função da concentração inicial do adsorvato e/ou do tempo de contato adsorvente/adsorvato (Nascimento *et al.*, 2020). Também é particularmente útil quando a adsorção é demasiadamente lenta. Além disso,  $n_A$  pode ser um número inteiro ou uma fração (Tan; Hameed, 2017) que também podem ser relacionados a ordem da cinética de adsorção. Contudo, determinações experimentais devem ser realizadas para a validação da ordem da cinética de Avrami (Lopes *et al.*, 2003).

#### Modelo de Elovich

O modelo de Elovich vem sendo comumente utilizado para descrever sistemas que envolvem a quimissorção (Sahoo; Prelot, 2020). Esse modelo é descrito pela equação a seguir, na qual  $\alpha$  é a taxa de adsorção inicial ( $\text{mg g}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) e  $\beta$  está relacionado com a extensão da cobertura da superfície e a energia de ativação envolvida na quimissorção ( $\text{g mg}^{-1}$ ).

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(1 + \alpha\beta t) \quad (4)$$

Vale ressaltar que o modelo de Elovich abrange uma ampla faixa de taxas de adsorção lenta e é mais aplicado para adsorventes que apresentam superfícies heterogêneas (Lima; Adebayo; Machado, 2015).

#### Modelo de difusão intrapartícula

O modelo de difusão intrapartícula foi inicialmente proposto por Weber e Morris em 1963 (Weber; Morris, 1963) e é descrito pela equação a seguir, em que  $k_{di}$  é a taxa de difusão intrapartícula ( $\text{mg g}^{-1}\text{s}^{-0.5}$ ) e  $C$  é uma constante de adsorção inicial ( $\text{mg g}^{-1}$ ), que está relacionada com a espessura da camada limite.

$$q_t = k_{di}\sqrt{t} + C \quad (5)$$

Weber e Morris perceberam que, em muitos casos,  $qt$  variava em função da  $\sqrt{t}$  e não em função do tempo ( $t$ ) de contato, como predito nos modelos anteriores (Weber; Morris, 1963). Dessa forma, um gráfico  $qt$  versus  $\sqrt{t}$  pode ser plotado para obter-se regiões de linearidade, cada uma delas representando um mecanismo distinto de transferência de massa (Wu; Tseng; Juang, 2009). Geralmente três regiões são observadas nesse modelo: (i)

adsorção de superfície (ou instantânea); (ii) adsorção gradual, na qual ocorre a difusão intrapartícula (fatores como concentração, temperatura, e tamanho do material adsorvente influenciam na velocidade dessa etapa); e (iii) equilíbrio, representado pelo movimento lento do soluto dos poros maiores para os menores (Wu; Tseng; Juang, 2009). Entretanto, vale ressaltar que esse modelo não considera o impacto das dimensões dos poros durante o processo de adsorção (Sen Gupta; Bhattacharyya, 2011), o que é visto por alguns autores como uma falha na literatura.

As isotermas de adsorção também são importantes para a compreensão dos mecanismos de adsorção. De forma geral, as isotermas são modelos que correlacionam uma quantidade de adsorvato (em relação a uma massa de material adsorvente) com a concentração desse adsorvato no estado de equilíbrio, a uma temperatura constante (Behnamfard; Salarirad, 2009). Os parâmetros obtidos nos modelos fornecem informações a respeito das propriedades de superfície do adsorvente e de mecanismos de interação e adsorção (Lima; Adebayo; Machado, 2015). Assim como para a cinética, alguns modelos podem ser aplicados nas isotermas, entre os mais comuns estão: Langmuir, Freundlich, Sips, Redlich-Petersen, Toth e Khan.

#### Modelo de Langmuir

Esse modelo, proposto em 1916 por Langmuir (Langmuir, 1916), é um dos mais utilizados devido a sua simplicidade e possibilidade de aplicação em diversos processos de adsorção (Foo; Hameed, 2010). A isoterma de Langmuir é descrita pela equação não linear abaixo, na qual  $q_e$  é a quantidade de analito adsorvido no equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_e$  é a concentração de analito,  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e  $b$  é a constante de equilíbrio de adsorção de Langmuir ( $\text{L mg}^{-1}$ ).

$$q_e = \frac{q_m b c_e}{1 + b c_e} \quad (6)$$

Essa isoterma representa processos em que a adsorção ocorre em uma monocamada e o adsorvente possui um número definido de sítios energeticamente homogêneos e equivalentes. Além disso, nesse modelo não há ocorrência de interações laterais ou impedimento estérico (Nascimento *et al.*, 2020; Vijayaraghavan; Palanivelu; Velan, 2006).

### Modelo de Freundlich

Essa isoterma, proposta em 1906, também é extensamente utilizada para descrever processos de adsorção (Freundlich, 1906), sendo representado pela equação não linear abaixo.  $k_F$  é a constante de equilíbrio [ $\text{mg g}^{-1}(\text{mg L}^{-1})^{-1/n}$ ] e  $n_F$  é o expoente (adimensional) de Freundlich.

$$q_e = k_F C_e^{1/n_F} \quad (7)$$

O modelo de Freundlich assume uma adsorção em multicamadas na superfície de um material com sítios energeticamente heterogêneos. Dessa forma, os sítios de maior energia são inicialmente ocupados, seguidos pelos de menor energia (Foo; Hameed, 2010).

Ademais, é possível avaliar o valor de  $1/n_F$  e relacioná-lo com a distribuição relativa de energia e heterogeneidade dos sítios de adsorção. A adsorção é considerada irreversível quando  $1/n_F = 1$ , desfavorável quando  $1/n_F > 1$ , e favorável quando  $0 < 1/n_F < 1$ . Quanto mais próximo de zero, maior é a intensidade de adsorção e heterogeneidade da superfície (Foo; Hameed, 2010).

### Modelo de Sips

Essa isoterma, proposta em 1948, pode ser descrita pela combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich (Sips, 1948) e é representada pela equação não linear abaixo.  $K_S$  é a constante de equilíbrio ( $\text{mg L}^{-1})^{-1/n}$  e  $n_s$  é o expoente do modelo (adimensional).

$$q_e = \frac{q_m K_S C_e^{1/n_s}}{1 + K_S C_e^{1/n_s}} \quad (8)$$

A isoterma de Sips também descreve uma adsorção em superfícies heterogêneas; assemelhando-se a isoterma de Freundlich em baixas concentrações de adsorvato, e a de Langmuir em altas concentrações (Al-Ghouti; Da'ana, 2020). O modelo de Sips leva à produção de uma expressão que tem um limite finito em alta concentração e contorna limitações dos modelos descritos anteriormente (Foo; Hameed, 2010). Além disso, seus parâmetros são regidos principalmente por condições experimentais: concentração de adsorvato, pH e temperatura (Foo; Hameed, 2010).

Por fim, vale ressaltar que esse modelo só é válido quando  $0 < 1/n_s \leq 1$ , mas poucos trabalhos levam em conta essa consideração (Lima; Adebayo; Machado, 2015).

#### Modelo de Redlich-Peterson

Esse modelo, proposto em 1959, também é um híbrido entre os de Langmuir e Freundlich (Redlich; Peterson, 1959), sendo representado pela equação não linear apresentada abaixo.  $K_{rp}$  ( $L g^{-1}$ ) e  $a_{rp}$  ( $mg^{-1}$ ) são as constantes do modelo e  $g_{rp}$  é o expoente do modelo (adimensional).

$$q_e = \frac{k_{rp}c_e}{1+a_{rp}c_e^{g_{rp}}} \quad (9)$$

A isoterma de Redlich-Peterson pode ser aplicada em uma ampla faixa de concentração e representar a adsorção em sistemas homogêneos ou heterogêneos (Foo; Hameed, 2010). O valor do expoente  $g_{rp}$  deve estar entre zero e um, quando  $g_{rp} = 0$ , a equação se torna linear em uma baixa cobertura de superfície; já quando  $g_{rp} = 1$ , a isoterma se reduz ao modelo de Langmuir (Lima; Adebayo; Machado, 2015).

#### Modelo de Toth

O modelo de Toth, 1981, pode ser descrito como uma modificação da equação de Langmuir para reduzir o erro entre os valores experimentais e os preditos e para representar sistemas heterogêneos (Al-Ghouti; Da'ana, 2020; Tóth, 1981). A equação não linear de Toth é apresentada abaixo. Onde  $k_T$  ( $L mg^{-1}$ ) e  $n_t$  (adimensional) são, respectivamente, a constante de equilíbrio e o expoente do modelo.

$$q_e = \frac{q_m K_T C_e}{[1+(K_T C_e)^{n_t}]^{\frac{1}{n_t}}} \quad (10)$$

A isoterma de Toth também pode representar uma ampla faixa de concentrações do adsorvato e prediz uma adsorção em monocamadas (Al-Ghouti; Da'ana, 2020). Os sítios de ligação são heterogêneos e aqueles de maior energia são inicialmente ocupados (Ayawei; Ebelegi; Wankasi, 2017; Foo; Hameed, 2010).

Por fim, o parâmetro  $n_t$  está relacionado a heterogeneidade do sistema, e quanto mais distante o valor for de 1, maior é essa característica. Já um  $n_t = 1$  reduz o modelo de Toth ao modelo de Langmuir (Al-Ghouti; Da'ana, 2020).

### Modelo de Khan

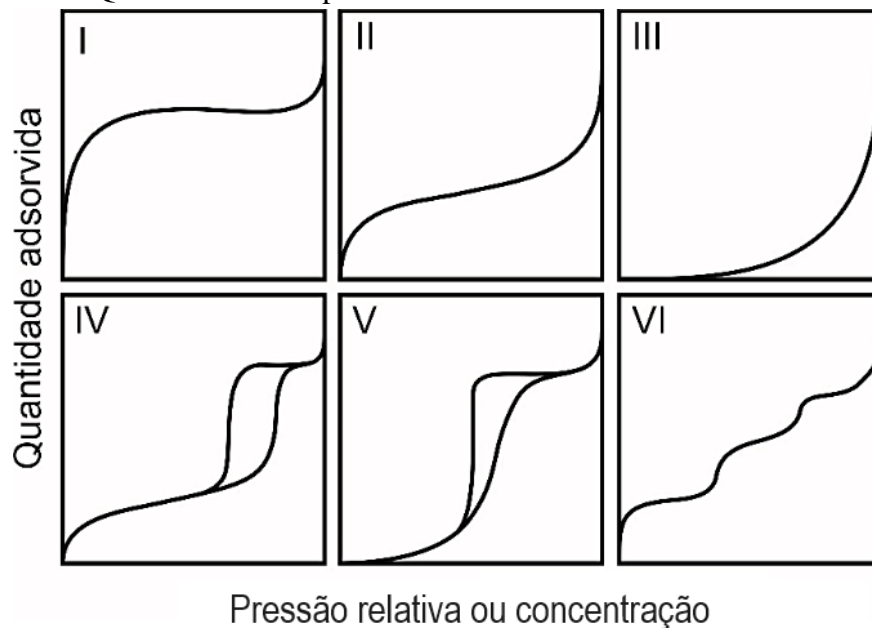
A isoterma de Khan, 1996, sugere uma adsorção generalizada em soluções puras (Khan; Al-Waheab; Al-Haddad, 1996) e é representada pela equação a seguir.  $q_s$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a capacidade de saturação teórica e  $b_k$  (adimensional) e  $a_k$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) são, respectivamente, o expoente e a constante do modelo.

$$q_e = \frac{q_s b_k C_e}{(1 + b_k C_e)^{a_k}} \quad (11)$$

O modelo de Khan também pode ser aplicado a sistemas com uma ampla faixa de concentrações e se refere a superfícies com sítios heterogêneos. No entanto, os sítios com menores energias são aqueles que apresentam energia máxima de adsorção (Foo; Hameed, 2010).

As isotermas também podem ser classificadas em seis tipos (I-IV) de acordo com o perfil de interação entre o adsorvente/adsorvato (Sing, 1985), como mostrado na Figura 4 abaixo. Essa classificação é aceita pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e, embora inicialmente desenvolvida para descrever a adsorção de gases em sorventes sólidos (Sing, 1985), diferentes autores também relatam o uso desses modelos para avaliar a adsorção de moléculas/metais presentes em solução (Bali; Tlili, 2019; Castilho *et al.*, 2023; Sereshti *et al.*, 2020).

Figura 4 - Modelos de isotermas de adsorção segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada



Fonte: Adaptada de Sing *et al.* (1985).

Brevemente, as isotermas do tipo I apresentam a adsorção em monocamada, existindo o aumento da quantidade de adsorvato adsorvido em função do aumento da pressão relativa ou da concentração até a formação de um platô. Normalmente representam materiais com baixa área de superfície e microporosos ( $< 2$  nm) (Marsh; Reinoso, 2006; Thommes *et al.*, 2015). As isotermas do tipo II são características de materiais macroporosos ( $> 50$  nm) ou não porosos. Além disso, a adsorção ocorre em multicamadas e ocorre o aumento da adsorção com o aumento da pressão (ou concentração) até um estágio de equilíbrio e, após ocorre uma nova etapa de aumento (Marsh; Reinoso, 2006; Thommes *et al.*, 2015). As isotermas de tipo III representam interações adsorvente/adsorvato mais fracas ou desfavoráveis. Geralmente representam materiais macroporosos ou não porosos com adsorção em mais de uma camada (Marsh; Reinoso, 2006). As de tipo IV representam materiais mesoporosos (2-50 nm) e a formação de dois platôs é resultado da formação de duas camadas sucessivas de adsorção (Marsh; Reinoso, 2006). As isotermas do tipo V, assim como as do tipo III, referem-se a materiais macroporosos ou mesoporos nos quais as interações adsorvato/adsorvente são fracas (Marsh; Reinoso, 2006). Por fim, as do tipo VI são características de materiais não porosos com superfície uniforme. O processo de

adsorção ocorre em multicamadas, com a altura de cada “degrau” indicando a capacidade de adsorção da camada (Thommes *et al.*, 2015).

## 2.6 ENSAIOS *IN VITRO*

O desenvolvimento de nanomateriais para aplicações biomédicas gera preocupações em relação a sua segurança para a saúde. Efeitos toxicológicos podem ser causados devido ao tamanho, reatividade e disponibilidade sistêmica desses materiais, pois suas características podem modificar as interações com células e/ou proteínas (Segeritz; Vallier, 2017). As propriedades físico-químicas dos nanomateriais representa desafios para pesquisadores, que necessitam propor estudos para garantir a identidade e reprodutibilidade dos efeitos adversos desses materiais com o organismo (Segeritz; Vallier, 2017). Um primeiro passo a ser realizado são os estudos *in vitro*, utilizando a cultura celular.

A cultura celular refere-se a métodos laboratoriais que permitem o crescimento de células em condições fisiológicas (Santamaria; Sayes, 2010). Os experimentos e aplicações são os mais diversos e diferentes tipos de células podem ser utilizadas. Na área clínica é comum o uso dos ensaios *in vitro* para criar modelos de sistemas, replicar mecanismos de doenças, e investigar a toxicidade de novos compostos. Como exemplos, Fernando *et al.* (2022) descreveram um protocolo para o cultivo de retina neural e regiões corticais do cérebro, a partir de cultivos confluentes de células-tronco. Esses organoides desenvolvidos apresentaram funções de trabalho e a análise proteômica indicou a maturidade desses sistemas, demonstrando o desenvolvimento de estruturas semelhantes a nervos (Fernando *et al.*, 2022). Chemmarappally e colaboradores (2020) desenvolveram uma nanofibra suporte para auxiliar na descoberta de agentes neuroprotetores para a doença de Parkinson. As linhagens celulares de neuroblastoma humano, que apresenta a possibilidade de se diferenciar em neurônios maduros, e de glioblastoma humano, capazes de se diferenciar em astrócitos, têm sido utilizadas para investigar características das células cerebrais, inclusive em distúrbios (Chemmarappally *et al.*, 2020). Por fim, Granja *et al.* (2019) exploraram os efeitos da funcionalização de NPs lipídicas com ácido fólico e os seus efeitos de citotoxicidade e transporte pela barreira intestinal biomimética constituída de células Caco-2. Os autores demonstraram que as NPs foram capazes de aumentar a biodisponibilidade oral

da epigallocatequina-3-galato, um polifenol associado a benefícios para a saúde humana (prevenção e tratamento de inflamações, infecções e câncer) (Granja *et al.*, 2019).

Células primárias ou células imortalizadas podem ser utilizadas nos ensaios. As células primárias são diretamente retiradas do tecido de origem e, por isso, são mais próximas de um organismo vivo. As células primárias são um excelente modelo para estudos metabolômicos, de envelhecimento e de sinalização. No entanto, são células com maior variabilidade (adquiridas de acordo com o doador e também entre as passagens) e apresentam um tempo de vida limitado (parando de se dividir após um certo número de passagens) (Egger *et al.*, 2013). As células primárias podem ser manipuladas para uma subcultura secundária através de um processo chamado de transformação, que pode ocorrer espontaneamente ou ser induzido quimicamente (Lundberg *et al.*, 2002). Quando a cultura primária sofre uma transformação, elas passam a se dividir indefinidamente e se tornam uma linhagem imortalizada. As linhagens contínuas são mais robustas, apresentam um crescimento mais rápido, e há maior homogeneidade, quando comparado com as células primárias. Um ponto negativo das linhagens celulares é que elas são geneticamente modificadas, o que pode levar a alterações fisiológicas (Carter; Shieh, 2010).

### **2.6.1 Linhagens celulares**

As condições de cultivo dependerão de cada linhagem celular e do ensaio que será realizado. Nessa revisão serão abordadas as duas linhagens utilizadas no projeto: fibroblastos de ratos L929 e Caco-2.

Os fibroblastos são células que secretam proteínas fibrosas, que juntas formam a matriz extracelular base do tecido conjuntivo, que tem como principal função a sustentação de órgãos. Os fibroblastos também têm importante papel na reparação tecidual (Pan; Jiang; Chen, 2006). A linhagem L929 foi uma das primeiras a ser estabelecida em cultura imortalizada e é comumente utilizada como referência para estudos iniciais de biocompatibilidade de nanomateriais e fármacos (Serrano, 2004).

As Caco-2 são células que expressam várias propriedades morfológicas e funcionais que permitem seu uso como modelo de barreira epitelial intestinal. Essas células formam junções intercelulares que possibilitam a formação de uma monocamada, e apresentam propriedades típicas de enterócitos absorptivos (Lea, 2015). Assim, o uso de monocamadas

de Caco-2 permite fazer previsões da interação de NPs e/ou fármacos com o intestino (Granja *et al.*, 2019), sendo possível obter informação sobre a absorção e o transporte dessas substâncias. No entanto, essa linhagem pode conter células com diferenças sutis em suas propriedades, dependendo da matriz primária (por exemplo culturas da *American Type Culture Collection* ou da *European Collection of Cell Cultures*) (Lea, 2015).

As células cultivadas podem ser classificadas em dois tipos: aderentes (se ligam ao fundo do frasco de cultivo) ou não aderentes (permanecem em suspensão). As células aderentes são oriundas de tecidos duros que dependem de mecanismo de ancoragem para iniciar a proliferação. Para essas células, os frascos de cultura devem possuir uma carga negativa, pois essas irão estimular a produção de proteínas de adesão. Por sua vez, as células não aderentes são derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para sobreviver (exemplo: células hematopoiéticas) (Alves; Guimarães, 2010). Tanto as L929, quanto as Caco-2 são exemplos de células aderentes. Para se realizar a passagem dessas células são utilizadas enzimas proteolíticas, sendo a tripsina uma das mais comum. A tripsina hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil, formando terminais de clivagem, ésteres e amida. Essa reação desnatura a matriz e faz com que as células fiquem individualizadas e se desprendam do frasco de cultivo (Alves; Guimarães, 2010).

Vale ainda mencionar, que o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) é um dos meios de cultivo com maior espectro de aplicações para células aderentes de diferentes fenótipos (ATCC, 2002) sendo indicado inclusive para o cultivo de L929 e de Caco-2. O DMEM é uma modificação do meio original de Eagle, inserindo-se glicose e aumentando os aminoácidos e vitaminas (ATCC, 2002). O meio pode ser suplementado com soro fetal bovino, para aumentar a quantidade de proteínas e com penicilina/estreptomicina, antibióticos que ajudam a diminuir as chances de contaminação. Quando o meio é suplementado recebe o nome de DMEM completo ou DMEM suplementado.

### **2.6.2 Ensaios de viabilidade**

A citotoxicidade é a capacidade de um fármaco ou de um material de interagir com linhagens celulares e provocar alterações metabólicas, podendo ou não levar à morte dessas células (Silva *et al.*, 2019). Os ensaios de viabilidade *in vitro* são os primeiros a serem realizados para avaliar a biocompatibilidade de materiais e consistem em seu contato com

células mamíferas (Silva *et al.*, 2019). Algumas metodologias são mais comumente aplicadas: liberação da enzima lacto desidrogenase (LDH), incorporação do vermelho neutro, teste do metiltetrazólio (MTT), teste da resazurina, potencial oxidante, difusão em ágar, e avaliação da morfologia por microscopias (Fotakis; Timbrell, 2006; Silva *et al.*, 2019).

A LDH é uma enzima que catalisa a interconversão de piruvato e lactato (Fotakis; Timbrell, 2006). A sua liberação para o meio de cultivo é um indicador de dano irreversível na membrana e, portanto, um sinal de morte celular (Fotakis; Timbrell, 2006). Por ser um corante solúvel em meios aquosos, o vermelho neutro é capaz de atravessar a membrana celular, ficando retido nos lisossomas de células vivas e não danificadas (Fotakis; Timbrell, 2006; Rogero *et al.*, 2003). O MTT é um sal triazólio também solúvel em água, que se converte num corante roxo por meio do metabolismo celular. O produto resultante é impermeável à membrana, sendo impedido de deixar o interior das células saudáveis (Fotakis; Timbrell, 2006). Em relação à resazurina, células metabolicamente ativas são capazes de reduzir esse corante não fluorescente em um produto altamente fluorescente que pode ser quantificado e correlacionado com a viabilidade das células (Kuet; Karaosmanoğlu; Sivas, 2017). A avaliação de espécies reativas de oxigênio (ROS) é importante para verificar danos oxidativos, que também pode levar a processos de morte celular. Portanto, um aumento na produção de ROS indica citotoxicidade (Zhang, 2018). Por fim, a difusão em ágar avalia a formação de halo ao redor do material incubado juntamente com as células. O halo é formado quando há lise celular e a citotoxicidade está relacionada com o seu diâmetro (Rogero *et al.*, 2003). As alterações celulares também podem ser avaliadas de forma qualitativa. Essas análises são realizadas por microscopias, comparando a morfologia das células em estudo com o controle (células expostas apenas ao meio de cultivo) (Silva *et al.*, 2019).

A presença de impurezas nos CNTs está envolvida no mecanismo de inibição celular (Haniu *et al.*, 2011), quanto maior a presença de metais, maior a toxicidade. Já o tamanho dos CNTs determina sua internalização em células (Raffa *et al.*, 2008), os de maior comprimento podem ficar retidos no organismo (Murphy *et al.*, 2011) resultando em fibrose e genotoxicidade (Alshehri *et al.*, 2016). Por fim, os grupos que modificam a superfície costumam aumentar a biocompatibilidade dos materiais, pois podem aumentar a solubilidade em meio aquoso, melhorar a dispersibilidade e reduzir a agregação dos CNTs (Alshehri *et*

*al.*, 2016). Além disso, os ligantes podem levar a interações específicas com células e barreiras biológicas, diminuindo a quantidade de material necessária para os tratamentos (Alshehri *et al.*, 2016).

Como um exemplo, Zhou e colaboradores (2017) avaliaram diversos parâmetros de toxicidade (viabilidade celular, estresse oxidativo, apoptose e danos ao DNA) de CNTs não funcionalizados e funcionalizados com dois diferentes grupos: -OH e -COOH. A avaliação de viabilidade celular foi realizada utilizando o sal tetrazólio WST-1 e os autores perceberam que os CNTs funcionalizados apresentavam maiores valores de IC<sub>50</sub>, indicando menor citotoxicidade que material cru. Por outro lado, foi observado (pelo ensaio de LDH) que os materiais funcionalizados causavam ruptura de membranas celulares após 24 h de incubação, além de apresentarem maiores taxas de apoptose e danos ao DNA (Zhou *et al.*, 2017).

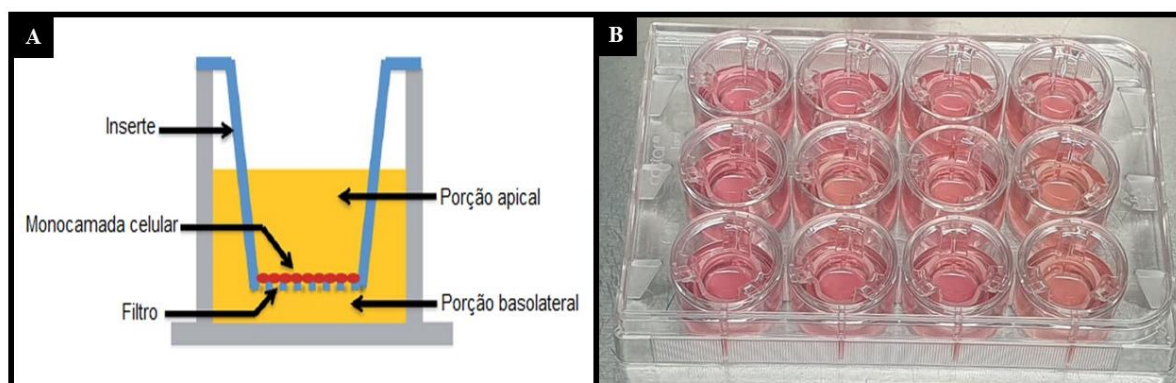
Funcionalizações com proteínas forneceram bons resultados em relação a biocompatibilidade dos CNTs obtidos (Ge *et al.*, 2011; HOLT; DAHL; ISLAM, 2012; MUZI *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019a). Montes-Fonseca e colaboradores (2015) relataram que CNTs revestidos com lectina reduziram a toxicidade e taxa de apoptose de macrófagos quando comparados com CNTs crus e com CNTs funcionalizados com isotiocianato fluorescente (Montes-Fonseca *et al.*, 2015). Ge e coautores (2011) também concluíram que CNTs funcionalizados com proteínas eram menos tóxicos para linhagens celulares de leucemia e de cordão umbilical (Ge *et al.*, 2011). Como um último exemplo, Holt e colaboradores (2012) estudaram a internalização de CNTs recobertos por BSA. Foi observado que os materiais eram incorporados às células em segundos e expelidos após várias horas ou dias, mostrando que os mesmos podem ser utilizados inclusive para terapias de células saudáveis (Holt; Dahl; Islam, 2012).

### **2.6.3 Permeação em modelos biomiméticos de barreira intestinal**

Para promover sua ação, os fármacos livres ou os DDSs precisam transpor várias membranas celulares que são semipermeáveis. Estudos *in vitro* de permeação utilizando modelos biomiméticos da barreira intestinal podem ser conduzidos com as Caco-2 cultivadas em monocamadas, e são importantes para sistemas com potencial para a administração oral (Granja *et al.*, 2019).

Para construir o modelo biomimético, as células são cultivadas em uma placa *transwell* contendo um inserte com uma membrana de policarbonato (Figura 5) e as células são mantidas, em meio de cultivo, até que a monocamada seja formada. Durante os ensaios, a solução contendo os fármacos e/ou os materiais é colocada na porção apical da placa, enquanto a parte basolateral (que contém certo volume de tampão) recebe o que foi permeado.

Figura 5 - Esquema de um poço *transwell* (A) e placa *transwell* de 12 poços com as células em meio de cultivo (B)



Fonte: Adaptado de Ye; Dawson; Lynch (2015) (A). Autora (2024) (B).

Serpell-Kostarelos e Devis (2016) demonstraram, a partir de estudos teóricos e experimentais (*in vitro*), que CNTs funcionalizados podem interagir com barreiras biológicas e transportar fármacos até o citoplasma celular devido a algumas de suas características: seu formato semelhante a uma agulha, suas dimensões, e a superfície anfifílica (contendo uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica) (Serpell; Kostarelos; Davis, 2016). Além disso, Kafa *et al.* (2015) observou em seus experimentos que os CNTs podem atingir o citoplasma celular por meio do processo ativo de endocitose (Kafa *et al.*, 2015), sem impactar na integridade da barreira hematoencefálica (Gonzalez-Carter *et al.*, 2019). No entanto, enquanto o primeiro grupo de pesquisa mostrou que a permeação era independente das cargas de superfície dos CNTs, o segundo relatou que CNTs catiônicos e não iônicos apresentavam maior taxa de permeação, mas que os CNTs aniônicos eram menos citotóxicos.

A absorção de CNTs por células intestinais também vem sendo investigada. Prajapati e colaboradores (2019) avaliaram o potencial de CNTs funcionalizados e conjugados com

gencitabina para o tratamento de câncer de cólon. Os autores relataram que o sistema reduziu consideravelmente a massa tumoral quanto comparado ao fármaco livre e apresentou alta taxa de sobrevivência dos animais. Além disso, estudos histológicos mostraram que os materiais estavam presentes principalmente no cólon (Prajapati *et al.*, 2019). Já Chen e colaboradores perceberam que houve uma mudança da microbiota intestinal predominante após a administração oral de CNTs. Por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão foi verificado que os CNTs se depositavam principalmente no cólon após as administrações. Os autores ainda relataram que CNTs de paredes única apresentaram maiores complicações para o intestino em relação aos de paredes múltiplas e ao grafeno (Chen, Hanqing *et al.*, 2018).

Tendo em vista todo o cenário relacionado as vantagens e utilização dos CNTs em processos biomédicos, essa tese de doutorado visou a exploração das funcionalizações dos nanotubos de carbono magnéticos para futuras aplicações nanomédicas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nos tópicos a seguir serão descritas as metodologias para os diferentes ensaios, assim como os reagentes e equipamentos utilizados.

Os experimentos foram majoritariamente realizados no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). Contudo, para a caracterização dos materiais diversos outros laboratórios da universidade contribuíram, permitindo o uso de seus equipamentos (Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos, Núcleo de Controle de Qualidade, Laboratório Interdisciplinar de Química, Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica, Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos, Laboratório de Central Analítica II, e Laboratório de Neuroimunologia da Dor).

Todos os ensaios de citocompatibilidade com as linhagens celulares foram realizados no Laboratório MB<sup>2</sup> da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), durante um período de realização de Doutorado Sanduíche. Os ensaios de quantificação do permeado celular foram realizados no laboratório GEPAM do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas e os ensaios de susceptibilidade magnética foram realizados no Laboratório de Materiais de Baixas Temperaturas do Instituto de Física da Universidade Estadual de Campinas. Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura foram realizados no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas. (CAAE: 34440820.2.0000.5142), permitindo a coleta e o uso de amostras de sangue total de voluntários que concordaram em participar do projeto.

#### 3.1 REAGENTES

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (pureza  $\geq 95,0\%$ , diâmetro 50-90 nm), cloreto de ferro II, sulfato de ferro III, ortossilicato de tetraetila, 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano, glicerol-dimetacrilato, hidroxietil-acrilato, HSA (pureza  $\geq 95,6\%$ ), BSA (pureza  $\geq 96,0\%$ ), borohidreto de sódio, e metanol foram adquiridos da Sigma Aldrich<sup>®</sup> (Missouri, USA). Ácido fosfórico, fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico, e cloreto de sódio foram obtidos da Synth<sup>®</sup> (Diadema, Brasil). Hidróxido de

amônio, etanol e álcool isopropílico foram obtidos da Exodus Scientifica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). Glutaraldeído 50% em água foi obtido de Dinâmica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). Ácido nítrico foi obtido da Sciavicco<sup>®</sup> (Sabará, Brasil)

Triton X-100, *trypan blue* (pó) foram obtidos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St Louis, USA). *Kit* para LDH foi obtido da Takara Bio Inc<sup>®</sup>. (Shiga, Japan). *Kit* para apoptose e 2,7 diacetato de diclorofluoresceína foram obtidos da Molecular Probes<sup>®</sup> (Eugene, USA). Tampão *Hanks' Balanced Salt Solution* [-] CaCl<sub>2</sub>, [-] MgCl<sub>2</sub> (HBSS), meio DMEM, tripsina-EDTA (1X), tampão fosfato salina, resazurina, paraformaldeído, iodeto de propídeo, *Lucifer Yellow*, penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino foram obtidos da Gibco<sup>®</sup> by Life Technologies<sup>™</sup> (Paisley, UK). *Cell mask* e *Hoechst* foram adquiridos da ThermoFisher<sup>®</sup> (Agawam, USA). Peróxido de hidrogênio 30% foi obtido da Acros Organics<sup>®</sup> (Geel, Bélgica).

Água ultra-pura (18,2 MΩ cm) foi obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

A linhagem celular Caco-2 foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC, Wesel, Germany) e os fibroblastos L929 foram obtidos da *Cell Lines Service* (CLS, Eppelheim, Germany).

## 3.2 SÍNTESE DOS MATERIAIS

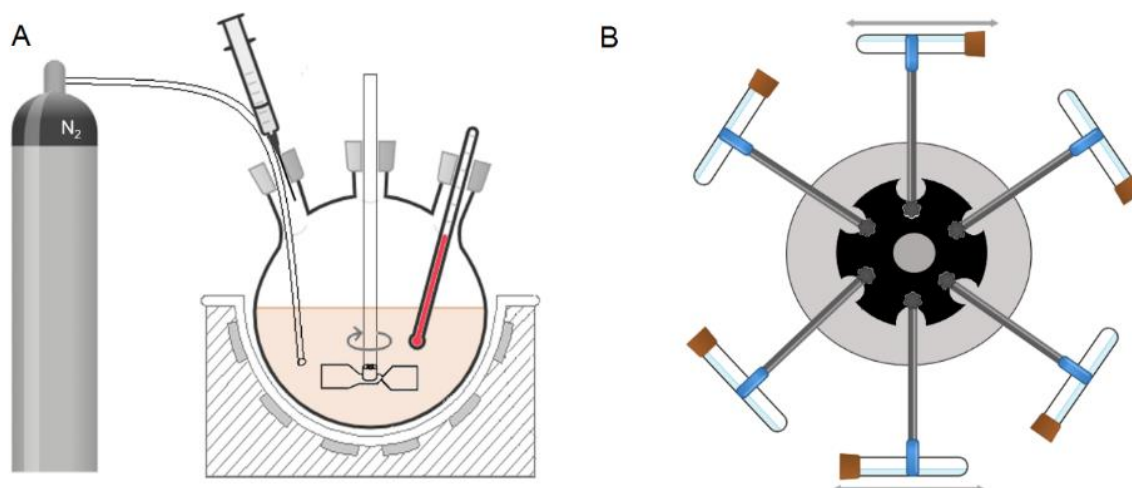
Diferentes modificações nos CNTs de paredes múltiplas comerciais foram realizadas para se obter M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL. Esses materiais foram utilizados individualmente em todos os ensaios para que comparações entre eles fossem realizadas.

### 3.2.1 Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos

Os M-CNTs foram sintetizados de forma semelhante ao descrito por Mendes *et al.* (2020). Em um balão de três bocas foram adicionados 0,428 g de cloreto de ferro III, 0,627 g de cloreto de ferro II e 50 mL de água ultrapura. Os sais foram agitados por 5 min. Logo após, 200 mg de CNTs comerciais foram adicionados ao balão e a reação ocorreu por mais 10 min. Por fim, 2,5 mL de hidróxido de amônio foram lentamente gotejados no sistema, que permaneceu em agitação por mais 30 min. Toda a síntese foi realizada sob atmosfera de

nitrogênio e temperatura de 50 °C. Ao final, os M-CNTs foram lavados com água ultrapura até pH 7 e secos em estufa por 24 h (Mendes *et al.*, 2020). A Figura 6A apresenta um esquema dos aparatos para a execução dessa etapa da síntese.

Figura 6 - Esquema do sistema de síntese para a obtenção de nanotubos de carbono magnéticos (A) e esquema da vista superior do agitador horizontal, utilizado em diversas etapas das sínteses dos materiais (B)



Fonte: Autora (2024).

### 3.2.2 Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos revestidos com albumina sérica bovina

Após a síntese dos M-CNTs, realizou-se o revestimento com a albumina sérica bovina (BSA) de acordo com o descrito por Mendes *et al.* (2020). Em um tubo de vidro foram adicionados 500 mg de M-CNTs e 20 mL de uma solução de BSA 1% (m:v) preparada em tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6. O tubo foi deixado em banho ultrassom por 10 min (para a dispersão dos materiais) e em repouso por mais 10 min. Na sequência, o material foi separado com o auxílio de um ímã e o sobrenadante (solução de BSA) foi descartado (Mendes *et al.*, 2020).

Posteriormente, 5 mL de uma solução de glutaraldeído 25% (v:v) foram adicionados ao tubo, que foi agitado em agitador horizontal por 5 h em velocidade mínima (Figura 6B). Ao fim desse período, o sobrenadante foi descartado, 10 mL de uma solução de borohidreto de sódio 1% (m:v) foram adicionados ao material e o tubo foi novamente agitado por 15 min

em velocidade mínima. Por fim, o material foi lavado com água ultrapura para a retirada de resquícios de síntese (até que não se observasse mais espuma, típica de soluções proteicas) e seco em estufa (60°C) por 24 h. O material final foi chamado de M-CNT-BSA.

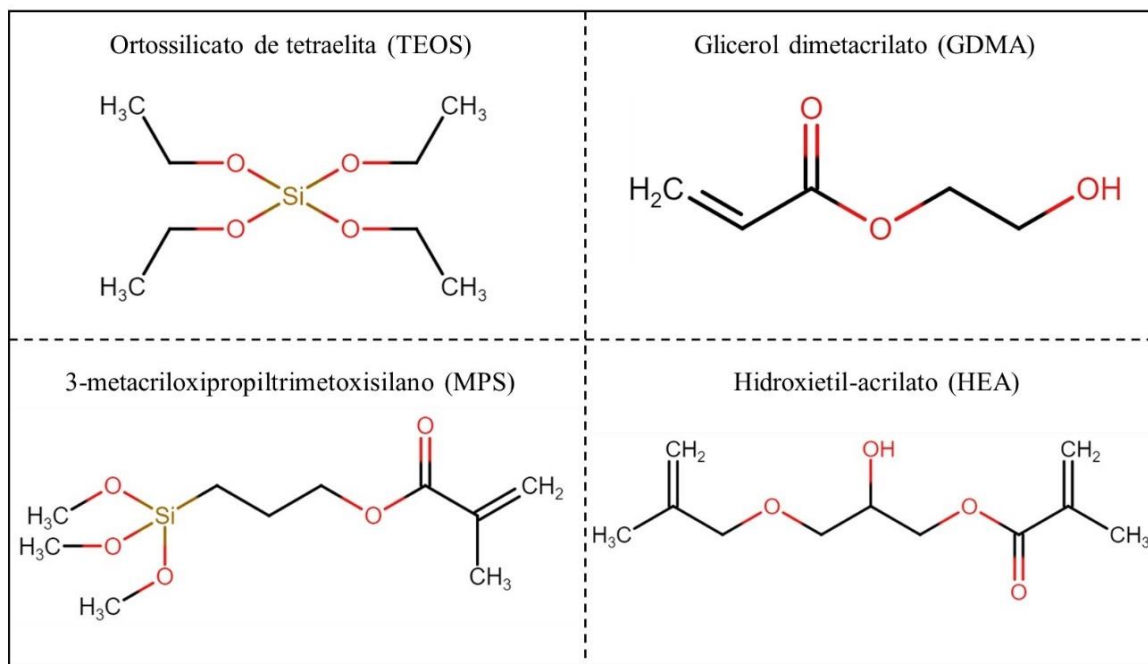
### 3.2.3 Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos funcionalizados com monômeros hidrofílicos

A síntese dos M-CNTs-HL foi realizada de acordo com De Faria *et al.* (2022). Os CNTs comerciais foram inicialmente oxidados, depois magnetizados e, por fim, funcionalizados. Para a oxidação, 1 g de CNTs e 60 mL de ácido nítrico 65% foram colocados em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador. A reação ocorreu a 120 °C por 90 min. Na sequência, os CNTs oxidados foram lavados com água ultrapura até pH 7 e secos em estufa. A magnetização ocorreu conforme descrito anteriormente e a funcionalização foi realizada em três etapas conforme o descrito a seguir (De Faria *et al.*, 2022). A Figura 7 apresenta as estruturas químicas dos reagentes empregados na funcionalização.

- a) Funcionalização com ortossilicato de tetraetila (TEOS): em um tubo de vidro, foram adicionados 300 mg de CNTs oxidados e 30 mL de uma mistura de isopropanol: água ultrapura (5:1 v:v). A mistura foi deixada por 30 min em banho ultrassom. A seguir, foram adicionados 10 mL de hidróxido de amônio e 4 mL de TEOS. A reação ocorreu sob agitação em agitador horizontal (Figura 6B) por 12 h, em velocidade máxima. Após, o material foi lavado com água ultrapura (até a retirada do sobrenadante esbranquiçado proveniente dos resquícios de TEOS) e seco em estufa.
- b) Funcionalização com 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano (MPS): em um tubo de vidro, foram adicionados 300 mg do material obtido na etapa anterior e 50 mL de metanol. A mistura foi colocada em banho ultrassom para que 4,5 mL de MPS fossem nela gotejados. A reação ocorreu sob agitação em agitador horizontal (Figura 6B) por 48 h. Após, o material foi lavado com metanol e seco em estufa.
- c) Funcionalização com monômeros: em um tubo de vidro, foram adicionados 200 mg do material obtido na etapa I, 30 mL de metanol, 0,225 mL de glicerol-

dimetacrilato (GDMA) e 2,1 mL de hidroxietil-acrilato (HEA). A reação ocorreu sob agitação em agitador horizontal (Figura 6B) por 24 h. Após, o material foi lavado com metanol, seco em estufa e os M-CNTs-HL foram obtidos.

Figura 7 - Funcionalizantes para a síntese dos M-CNTs-HL



Fonte: Autora (2024).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS SINTETIZADOS

Nos tópicos a seguir serão descritos os ensaios realizados para a caracterização dos M-CNTs, M-CNTs-HL e M-CNTs-BSA. Técnicas de espectroscopia no infravermelho, análises termogravimétricas, calorimetria exploratória diferencial, potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de varredura, difração de raio-X, porosimetria, espectroscopia de Raman, e susceptibilidade magnética, foram realizadas.

#### 3.3.1 Espectroscopia no infravermelho

Cada uma das etapas de síntese dos materiais foi caracterizada pela técnica de espectroscopia de infravermelho, utilizando um aparelho IR System Shimadzu® e pastilhas de brometo de potássio (KBr). Para confecção das pastilhas uma massa de aproximadamente

1 mg do material foi adicionada a 50 mg de KBr. Os pós foram macerados, utilizando cadinho e pistilo, até que uma mistura visualmente homogênea fosse obtida. No caso dos reagentes líquido, 1 gota do reagente foi misturada com cerca de 50 mg de KBr.

Para as análises, a varredura foi realizada na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com 34 *scans* e utilizando uma pastilha branco para zerar o equipamento.

### 3.3.2 Análises termogravimétricas

A estabilidade térmica dos materiais finais, e de suas etapas intermediárias, foi investigada utilizando análises termogravimétricas (TG). Cerca de 5,0 mg de cada amostra foram colocados em um suporte de alumina e inseridos no equipamento T.A. Instruments – Q600. O aquecimento foi realizado de 30 a 900°C com uma razão de 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio com um fluxo de 100  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 3.3.3 Análise de calorimetria exploratória diferencial

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas de forma complementar às análises de TG para os materiais sintetizados (M-CNT, M-CNT-BSA, e M-CNT-HL) e para a albumina comercial. Cerca de 3,0 mg de cada amostra foram colocados em suporte de alumina fechado e levados para o equipamento DSC Q20 V24.11 Build 124 (TA Instruments®). O fluxo de ar sintético foi mantido a 100  $\text{mL min}^{-1}$  e a diferença de energia do material foi continuamente mensurada em função do aumento da temperatura (10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). As análises foram realizadas até 200  $^{\circ}\text{C}$  devido à decomposição da BSA (aproximadamente 250  $^{\circ}\text{C}$ ) e precauções com a integridade do equipamento.

### 3.3.4 Potencial zeta

Nove suspensões (15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos CNTs sintetizados foram preparadas em água ultrapura com ajustes de pH. 10 mL de cada suspensão foram preparados e as amostras tiveram seus pHs ajustados para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10 (com solução de hidróxido de sódio ou ácido de clorídrico). Além dos materiais finais, as etapas intermediárias de síntese também foram avaliadas.

As suspensões ficaram em repouso por 3 h para que houvesse uma estabilização das cargas de superfície dos materiais de acordo com o pH do meio. Após esse tempo, cada uma das amostras foi levada para o analisador de DLS (Zetasizer Nano NS), sendo agitadas previamente à sua inserção na cubeta de análise (cerca de 900  $\mu\text{L}$ ). As medidas foram realizadas a 25°C e em triplicata.

### **3.3.5 Análises de área superficial e porosimetria**

Os ensaios foram realizados para nanotubos de carbono comercial (CNT) e para M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL, com o intuito de verificar se as funcionalizações alteravam a área superficial e a porosidade dos materiais. As condições aplicadas foram: gás nitrogênio como sorvente, tempo de equilíbrio de 5 s, e aproximadamente 200 mg de cada material. As análises foram realizadas em um equipamento Gemini VII versão 3.03 (modelo 2390 t). O método BET (Brunauer-Emmett-Teller) foi utilizado para calcular a área superficial, enquanto o método BJH (Barrett-Joyner-Halenda) foi empregado para a obtenção do volume dos poros.

### **3.3.6 Espalhamento dinâmico de luz**

Os ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizados em um analisador de DLS (Zetasizer Nano NS), operando com um ângulo de detecção de 173°C e a 25°C.

Inicialmente uma suspensão de M-CNT-BSA (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi preparada em água ultrapura e levada ao analisador. O ensaio de DLS foi realizado apenas com o M-CNT-BSA, pois esse material serviu como um primeiro teste para verificar a aplicabilidade dessa metodologia aos CNTs.

Frente aos resultados obtidos, algumas outras estratégias foram avaliadas: (i) deixar a suspensão em repouso por 30 min, para que as partículas maiores decantassem e (ii) preparar a suspensão em Triton X-100 (0,1%), ao invés de água ultrapura. Em ambos os casos, a concentração da suspensão foi mantida.

### **3.3.7 Microscopia eletrônica de varredura**

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para verificar o tamanho e a morfologia dos materiais sintetizados (tanto dos materiais finais: M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL; quanto de suas etapas intermediárias). Um microscópio Zeiss Supra 35VP Field Effect Electron Gun (FEG-SEM) foi empregado, operando a 10 keV. Anteriormente às análises, pequenos fragmentos das amostras foram colocados em um substrato de silicone e secas a 40 °C por 12 h. Análises usando o detector de raio-X acoplado (MEV-EDS) foram realizadas a partir do mapeamento 2D a 25 keV. As imagens foram geradas a partir da energia de emissão de C K $\alpha$ , O K $\alpha$ , e Fe L $\alpha$ 1.

### **3.3.8 Difração de raio-X**

As análises de difração de raio-X foram realizadas em um difratômetro Rigaku (ULTIMA IV), operando em  $2\theta$ , em uma faixa de 10 a 80 graus. As medidas foram obtidas a partir de irradiação  $\alpha$  com CuK e comprimento de onda de 0,15406 nm. A corrente utilizada foi de 30 mA e a fonte de raio-X operou a 40 kV. Todas as etapas de síntese foram avaliadas por essa técnica.

### **3.3.9 Espectroscopia de Raman**

As medidas de Raman foram realizadas em um sistema modular compreendendo um microscópio (Olympus B-X41) e um monocromador (Horiba iHR550) na geometria de detecção de fótons retroespalhados. Um laser em estado sólido de 532 nm (da B&W Tek) foi utilizado como fonte de excitação.

As análises foram realizadas, em triplicata, para CNTs comerciais, CNTs oxidados, M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL em duas regiões de deslocamento de Raman distintas: de 300 a 900 cm<sup>-1</sup> e de 1180 a 1800 cm<sup>-1</sup>.

### **3.3.10 Susceptibilidade magnética**

As propriedades magnéticas de M-CNT, M-CNT-BSA, e M-CNT-HL foram avaliadas usando um SQUID-VSM (Quantum Design MPMS<sup>®</sup>3, San Diego, USA),

operando a 300 K e utilizando um campo magnético de até 20000 Oe. As análises ocorreram de forma linear e de acordo com a sequência abaixo:

1. VSM vs Field 1 (20000 Oe → 10000 Oe)
2. VSM vs Field 2 (10000 Oe → 0 Oe → -10000 Oe)
3. VSM vs Field 1 (-10000 Oe → -20000 Oe)
4. VSM vs Field 1 (-20000 Oe → -10000 Oe)
5. VSM vs Field 2 (-10000 Oe → 0 Oe → 10000 Oe)
6. VSM vs Field 1 (10000 Oe → 20000 Oe).

### 3.4 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA

Para a quantificação da albumina nos diferentes ensaios, empregou-se o método espectrofotométrico de Bradford (Bradford, 1976).

#### 3.4.1 Preparo do reagente de Bradford

O reagente foi preparado de acordo com Bradford (1976). 50 mg do corante *Coomassie blue* foram diluídos em 25 mL de etanol 95%. Na sequência, 50 mL de ácido fórmico 85% foram adicionados e o volume foi completado com água ultrapura até 500 mL. O reagente foi armazenado em um frasco âmbar envolto com papel alumínio e colocado em banho ultrassom por 2 h. Por fim, o reagente foi filtrado em papel filtro e armazenado em geladeira (4-6°C) até o momento do uso (Bradford, 1976).

#### 3.4.2 Avaliação do tempo de reação entre o reagente de Bradford e a albumina

Os ensaios foram realizados individualmente para dois padrões de HSA (50 e 70 µg mL<sup>-1</sup>) preparados em tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,2. Um branco também foi preparado utilizando apenas o tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,2 e o reagente de Bradford.

Uma alíquota de 200 µL do padrão foi adicionada a 2,8 mL de reagente de Bradford. Essa mistura ficou em repouso e foi lida em espectrofotômetro (595 nm) após 5, 6, 10, 11,

15, 16, 20, 21, 25, 26, 30, e 31 min. As leituras foram realizadas utilizando cubetas de vidro e a absorbância do branco foi utilizada como zero do espectrofotômetro.

### 3.4.3 Interferência do branco

Os testes de interferência do branco foram realizados em triplicata e em três etapas diferentes, conforme descrito a seguir. Tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,2) foi utilizado para o preparo das soluções.

- a) 5 mg do material e 1 mL de tampão foram colocados em um tubo de ensaio e agitados (agitador de tubos, 750 rpm) por 10 min. O material foi separado com um ímã e 0,2 mL do sobrenadante foram tratados com 2,8 mL de Bradford. Após 10 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro (595 nm).
- b) 5 mg do material e 1 mL de um padrão de 100 mg L<sup>-1</sup> de HSA (preparado em tampão) foram colocados em um tubo de ensaio e agitados por 10 min. O material foi separado com um ímã e o sobrenadante tratado com 2,8 mL de Bradford. Após 10 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro (595 nm).
- c) 5 mg do material e 1 mL de tampão foram colocados em um tubo de ensaio e agitados por 10 min. O material foi separado com um ímã. Em um novo tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL do sobrenadante, 0,1 mL de um padrão de 200 mg L<sup>-1</sup> de HSA (preparado em tampão) e 2,8 mL de Bradford. Após 10 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro (595 nm).

A solução “a” consistiu no branco (material + tampão). Já as soluções “b” e “c” representaram, respectivamente, a fortificação com 100 mg L<sup>-1</sup> de HSA antes e após o processo de extração da proteína pelos materiais sintetizados.

### 3.5 TESTE DE EXCLUSÃO DE ALBUMINA

Os testes de exclusão de proteínas (utilizando BSA como modelo) foram realizados em triplicata e a partir de adaptações da metodologia proposta por de Oliveira *et al.* (2019a).

Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mg do material e 1 mL de uma solução de BSA ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) preparada em tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,2). Os tubos foram agitados a 750 rpm por 10 min. Após a agitação, os materiais foram separados com o auxílio de um ímã e uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo. Nesse, foram adicionados 2,8 mL do reagente de Bradford e as amostras foram lidas (595 nm) após 10 min. Vale ressaltar que o espectrofotômetro foi zerado com tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,2) mais o reagente de Bradford (após 10 min de reação).

Um padrão de BSA ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), que não passou pelo processo de extração, foi tratado com o reagente de Bradford e lido em espectrofotômetro, assim como descrito acima. A absorbância desse padrão foi adotada com 100% de BSA. Dessa forma, foi possível calcular a porcentagem de proteínas que permaneceram no sobrenadante após a agitação com os materiais sintetizados.

### 3.6 ESTUDOS DE ADSORÇÃO

Para uma avaliação inicial da capacidade adsorptiva dos materiais, ensaios de cinéticas e isotermas de adsorção foram realizados utilizando a HSA como modelo de proteína.

#### 3.6.1 Cinéticas de adsorção

Inicialmente uma curva de calibração foi construída usando padrões de HSA preparados em tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,2). Duzentos microlitros de cada padrão (20 a  $300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram tratados com 2,8 mL de reagente de Bradford. Após 10 min as amostras foram lidas em espectrofotômetro (595 nm). Um branco também foi preparado e utilizado para zerar o equipamento. As análises foram feitas em triplicata. Na sequência, foram realizados os ensaios de adsorção conforme descrito abaixo:

- a) Em tubos de ensaio foram colocados 5 mg do material e 1 mL de padrão de HSA ( $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) preparado em tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,2).
- b) As suspensões foram agitadas (750 rpm) por diferentes tempos (0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 45,0; 60,0 e 120,0 min). Três réplicas foram feitas para cada um dos tempos.

- c) Ao fim da agitação, o material foi imediatamente separado usando um ímã e o sobrenadante foi vertido em um novo tubo de ensaio.
- d) O novo tubo com o sobrenadante permaneceu em repouso sobre o ímã por 15 min.
- e) Duzentos microlitros de cada sobrenadante foram tratados com 2,8 mL de Bradford, esperou-se 10 min para a reação e fez-se a leitura no espectrofotômetro (595 nm).
- f) Brancos também foram realizados, utilizando apenas o tampão ao invés do padrão de HSA. Esses passaram pelos mesmos procedimentos de extração.

Os valores de absorbância foram tratados utilizando a equação da curva de calibração, e a concentração de proteína não adsorvida pelo material foi determinada. Com esses dados foi possível calcular a capacidade de adsorção ( $q_e$ ) dos materiais, que é dada pela equação 12 a seguir.

$$q_e = \frac{(C_o - C_e) * V}{m} \quad (12)$$

Onde,  $q_e$  é a capacidade de adsorção;  $C_o$ , a concentração inicial do adsorvato ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $C_e$ , a concentração do adsorvato no equilíbrio ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $V$ , o volume (L); e  $m$ , a massa do adsorvente (g).

A partir dos dados de  $q_e$ , construiu-se a curva de cinética ( $q_e$  em função do tempo), que foi ajustada com quatro modelos matemáticos não lineares: pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, ordem fracionária, e quimissorção (Elovich), e com o modelo linear de difusão intrapartícula. Esses ajustes foram feitos no *software* Origin®.

### 3.6.2 Isotermas de adsorção

Assim como para os testes de cinética, primeiramente duas curvas de calibração foram construídas usando padrões de HSA preparados em tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,2). A faixa de trabalho compreendeu concentrações de 10 a  $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , para a primeira curva e de 250 a  $700 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , para a segunda. O tratamento com o reagente de Bradford e as leituras ocorreram como descrito anteriormente (3.6.1) e os procedimentos para a

realização dos ensaios de isoterma estão descritos abaixo. Vale ressaltar que os experimentos foram conduzidos em temperaturas próximas de 25 °C.

- a) Em um tubo de ensaio foram colocados 5 mg do material e 1 mL de solução de HSA (em diferentes concentrações: 50, 70, 100, 200, 300, 400, 500, 600, e 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) preparadas em tampão fosfato 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,2). Três réplicas foram feitas para cada uma das concentrações.
- b) As suspensões foram agitadas a 750 rpm em tempos que garantissem o equilíbrio entre a HSA e os materiais sintetizados: 60 min, para M-CNT; 30 min, para M-CNT-BSA; e 45 min, para M-CNT-HL.
- c) Ao fim do tempo de agitação, os materiais foram imediatamente separados com o ímã, e os sobrenadantes foram vertidos em novos tubos de ensaio.
- d) O tubo com o sobrenadante permaneceu em repouso sobre o ímã por 15 min.
- e) Duzentos microlitros de cada sobrenadante foram tratados com 2,8 mL de Bradford, esperou-se 10 min e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (595 nm).
- f) Brancos também foram realizados, utilizando apenas o tampão ao invés do padrão de HSA. Esses passaram pelos mesmos procedimentos de extração.

O cálculo de  $q_e$  foi realizado da mesma forma que o descrito na seção anterior. Curvas de isoterma de adsorção ( $q_e$  em função da concentração) foram construídas e ajustadas com seis modelos matemáticos não lineares: Langmuir, Freundlich, Redlich-Peterson, Sips, Toth e Kan. Esses ajustes também foram realizados no *software* Origin®.

### 3.7 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Nos tópicos a seguir serão descritos os procedimentos para a coleta das amostras biológicas e os experimentos de diluição do soro humano para a escolha das condições de trabalho.

#### 3.7.1 Coleta das amostras e obtenção de um *pool* de soro

As amostras de sangue total foram doadas por voluntários que concordaram em participar do presente projeto. O procedimento foi realizado utilizando materiais estéreis e tubos com gel separador. Após a coleta, os tubos contendo sangue foram centrifugados (3000 rpm, 5 min) para a separação do soro, sendo este imediatamente utilizado. Para a realização dos experimentos um *pool* de soro (n=6) foi utilizado.

### **3.7.2 Avaliação da diluição das amostras de soro**

A diluição das amostras de soro (em água ultrapura) foi realizada para prosseguir com os experimentos de otimização dos parâmetros de dessorção e de eletroforese em gel.

As diluições avaliadas foram: 1:0; 1:0,2; 1:1; 1:5; 1:10; 1:15; 1:20; 1:30; 1:50; e 1:80 (v:v, soro: água ultrapura). Essas amostras passaram por um procedimento de extração de proteínas, usando M-CNT, M-CNT-BSA ou M-CNT-HL e por uma etapa de dessorção. Ao final, a concentração de proteínas totais dessorvidas em cada uma das diluições foi comparada. O protocolo a seguir foi empregado e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Primeira etapa: adsorção das proteínas

- a) 5 mg dos nanomateriais (M-CNT, M-CNT-BSA ou M-CNT-HL) foram colocados em tubos de ensaio e cada um deles recebeu 1 mL amostras de soro nas diluições descritas anteriormente. Três réplicas foram realizadas para cada condição.
- b) Para a adsorção das proteínas, os tubos foram agitados (750 rpm) por 45, 15 e 20 min, para M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL, respectivamente.

#### Etapas de separação e de lavagem

- a) Após o tempo de agitação, os tubos foram deixados em repouso sobre ímãs de neodímio por 20 min.
- b) Na sequência, o sobrenadante contendo as proteínas não adsorvidas foi descartado.
- c) Os materiais (que permaneceram no tudo de ensaio) foram lavados com 1 mL de água ultrapura para que resquícios de soro fossem removidos.

- d) Os tubos ficaram por mais 1 min sobre os ímãs e a água foi descartada.

#### Etapa de eluição

- a) Aos materiais com as proteínas sorvidas, foram colocadas 1 mL da fase de eluição composta de tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,2 + NaCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>.
- b) Os tubos foram agitados por 30 min para a dessorção das proteínas.
- c) Após esse tempo, os materiais foram rapidamente separados com o auxílio do ímã de neodímio e vertidos em um novo tubo de ensaio identificado.
- d) Os tubos que receberam os eluatos permaneceram sobre os ímãs por 15 min.

#### Quantificação das proteínas

- a) As proteínas totais dessorvidas foram quantificadas pelo método de Bradford. Para isso, 0,2 mL da fase de eluição foi tratada com 2,8 mL do reagente de Bradford.
- b) A reação ocorreu por 10 min e foi lida em espectrofotômetro (595 nm).
- c) As proteínas foram quantificadas a partir de uma curva de calibração previamente construída (15-250 mg L<sup>-1</sup>), utilizando padrões de HSA preparados em tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,2 + NaCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.8 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS SORVIDAS

Otimizações multivariadas foram realizadas para escolher a melhor condição de eluição das proteínas sorvidas em cada um dos materiais. Quatro variáveis foram estudadas: pH, força iônica, volume da fase de eluição, e tempo de agitação. Ao final dos experimentos, as proteínas totais eluídas de cada amostra foram quantificadas com o reagente de Bradford, conforme o descrito anteriormente.

#### **3.8.1 Delineamento experimental multivariado para a otimização das condições de Eluição**

Para a otimização da dessorção das proteínas sorvidas pelos M-CNTs e M-CNTs-HL foi utilizado o delineamento de Box-Behnken (BBD) com quatro repetições no ponto central, estudando as variáveis: pH (6,0 - 9,0), força iônica (0,0 - 0,2 mol L<sup>-1</sup> de NaCl), tempo de dessorção (30 – 50 min), e volume da solução de dessorção (0,5 - 1,9 mL). Já para os M-CNTs-BSA foi utilizado um delineamento de composto central rotacional (DCCR) com quatro repetições no ponto central, analisando-se as variáveis pH (6,1 - 10,1), força iônica (0,005 - 0,259 mol L<sup>-1</sup> de NaCl), e volume da solução de dessorção (0,50 - 1,84 mL).

Inicialmente, foi promovida a adsorção das proteínas nos materiais. Para isso, 5,0 mg dos materiais foram adicionados em tubos de ensaio juntamente com 1,0 mL de soro humano diluído em água ultrapura (1:30 v:v, para M-CNT e M-CNT-BSA, e 1:0,2 v:v; para M-CNT-HL). Os tubos foram agitados a 750 rpm, por 45 (M-CNT), 15 (M-CNT-BSA) ou 20 min (M-CNT-HL). Após essa primeira etapa, realizaram-se os procedimentos de separação dos nanotubos e de lavagem dos materiais com água ultrapura conforme descrito no tópico 3.7.2.

Após a sorção das proteínas, deu-se prosseguimento para os estudos de dessorção. Assim, foram realizados os 28 experimentos do BBD ou os 18, do DCCR. Na sequência, os nanotubos foram separados com o auxílio de um ímã e a quantificação de proteínas totais foi realizada utilizando o método de Bradford, a partir das curvas de calibração (15-300 mg L<sup>-1</sup>) obtidas para cada combinação de pH e de força iônica.

Com a melhor condição de eluição escolhida, foram feitos ensaios de validação da condição otimizada. Nesses ensaios, foram realizados os procedimentos de adsorção/dessorção de proteínas utilizando o procedimento apontado como melhor pelo delineamento. Os resultados da validação (n=4) foram comparados com os obtidos durante os estudos de otimização, e DPR de até 20% foram aceitos como adequados.

Vale ressaltar que para a obtenção dos modelos de otimização, das superfícies de resposta e das curvas de contorno foi utilizado o pacote rsm (Lenth, 2009) do Sistema Computacional R (R CORE TEAM, 2023). Já para a avaliação das pressuposições básicas dos modelos de otimização, os resíduos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro e Wilk), independência (teste de Box e Pierce) e homocedasticidade da variância (teste de Breusch e Pagan). Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando-se o nível de significância de 5%.

### 3.9 ESTUDOS DE ELETROFORESE EM GEL

Nos tópicos a seguir serão descritos os protocolos e métodos empregados para os ensaios de eletroforese em gel de SDS-PAGE. Desde o preparo das soluções até a aplicação das amostras finais.

Esses experimentos foram realizados para comparar o perfil das proteínas recuperadas utilizando as diferentes condições otimizadas para a dessorção. A SDS-PAGE também foi utilizada para verificar as proteínas remanescentes em amostras de soro diluído após o processo de extração com os nanotubos.

### 3.9.1 Protocolos gerais para a execução dos experimentos de eletroforese em gel

A seguir são descritos os procedimentos para o preparo das soluções necessárias previamente à execução do procedimento de eletroforese em gel:

- a) Eletrólito de corrida: solubilizar 3,0 g de tris base, 14,8 g de glicina e 1,0 g de SDS e completar o volume com água ultrapura para 1 L.
- b) Solução corante: solubilizar 1,25 g de *Coomassie Blue R 250* em 227 mL de metanol. Acrescentar 46 mL de ácido acético e completar o volume para 500 mL com água ultrapura.
- c) Solução descorante: misturar 430 mL de metanol com 70 mL de ácido acético e completar para 1 L com água ultrapura.
- d) Tampão de ruptura das amostras: misturar 3,5 mL de água ultrapura, 1,0 mL de tampão 0,5 mol L<sup>-1</sup> de tris-HCl pH 6,8; 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL de uma solução de SDS 10%; 0,4 mL de 2-mercaptoetanol e 0,4 mL de azul de bromofenol 1% (m/v).

Ainda previamente à execução da corrida eletroforética, foi necessário o preparo das amostras de proteínas. Para isso, 75 µL de cada amostra foram colocadas em um tubo eppendorf juntamente com 25 µL do tampão de ruptura. O tubo foi mantido em água fervente por 3 min. As amostras foram usadas imediatamente após a ruptura ou armazenadas em geladeira (4° C) por até 2 dias. O protocolo para a execução da eletroforese por SDS-PAGE é apresentado a seguir:

- a) Preparo do gel de separação (concentração 12%): em um béquer foram adicionados, na seguinte ordem, 4,0 mL de uma solução de acrilamida/bisacrilamida (30/2,67 %); 3,35 mL de água ultrapura; 2,5 mL de tampão tris-HCl ( $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,8), 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de SDS 10 %, 100  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônio 10 % e 15  $\mu\text{L}$  de TEMED.
- b) A solução resultante foi rapidamente colocada (com o auxílio de uma micropipeta de 5 mL) nas placas de vidro próprias para o ensaio de eletroforese. Logo em seguida, adicionou-se n-butanol para a homogeneização da superfície. O sistema foi mantido em repouso por 23 min.
- c) Após esse tempo, o n-butanol foi lavado com água destilada em abundância e a região entre as placas de vidro foi cuidadosamente seca com papel filtro.
- d) Preparo do gel de concentração (concentração 4%): em um béquer foram acrescentados, na sequência, 0,67 mL de uma solução de acrilamida/bisacrilamida (30/2,67 %); 3,050 mL de água ultrapura, 1,25 mL de tampão tris-HCl ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,8); 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de SDS 10 %; 50  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônio 10 % e 10  $\mu\text{L}$  de TEMED.
- e) A solução foi rapidamente colocada (com o auxílio de uma micropipeta de 5 mL) sobre o gel de separação polimerizado e o pente de poços foi colocado na solução. Esperou-se outros 23 min para a nova polimerização.
- f) Ao final, o pente foi retirado, o gel lavado com água destilada em abundância, e os poços foram secos com papel filtro.
- g) 25  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionados em cada um dos respectivos poços; assim como 20  $\mu\text{L}$  dos marcadores de corrida e peso molecular foram adicionados no primeiro poço da esquerda.
- h) O sistema de eletroforese foi montado. O eletrólito de corrida foi adicionado e realizou-se a corrida a uma voltagem de 100 V até que as amostras atingissem o gel de separação (aproximadamente 15 min) e, após, a voltagem foi aumentada para 130 V até o final da análise (mais 50 min, aproximadamente).
- i) Ao final, o gel foi cuidadosamente separado das placas de vidro e transferido para um recipiente contendo a solução corante. O gel permaneceu nesse recipiente sob leve agitação manual por 10 min.

- j) Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e deixado em solução descorante por aproximadamente 17 h.
- k) Terminado todo o processo, o gel foi fotografado em um analisador de imagens *Chemidoc* (Bio-Rad, USA) e as imagens obtidas foram analisadas no *software Image Lab* (Versão 6.1.0, edição padrão, 2020, Laboratórios Bio-Rad).

### 3.9.2 Análises do perfil de proteínas dessorvidas dos nanotubos sintetizados

Para esse ensaio novamente os processos de sorção/dessorção das proteínas foi realizado. Inicialmente as amostras de soro humano foram diluídas nas proporções de 1:30, para M-CNT e M-CNT-BSA e 1:0,2 (v:v soro: água ultrapura), para M-CNT-HL.

As amostras diluídas (1 mL) foram agitadas com 5 mg dos nanotubos por tempo suficiente para que se atingisse o equilíbrio entre as proteínas e os materiais (45, 15 ou 20 min, para M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL, respectivamente). Após, os materiais foram separados com o auxílio de um ímã, lavados com 1 mL de água ultrapura e eluidos por 50 min (para M-CNT e M-CNT-BSA) ou 40 min (para M-CNT-HL) utilizando a condição de eluição ótima para cada material (Agitação por 50 min com 1,4 mL de tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9,0 + 0,2 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Agitação por 50 min com 1,24 mL de tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 10,0 + 0,13 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Agitação por 40 min com 1,2 mL de tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,8 + 0,11 mol L<sup>-1</sup> de NaCl). Esses experimentos foram realizados em quadruplicata.

Três estudos complementares do perfil de adsorção foram realizados: (i) Ao invés de se utilizar o tempo de equilíbrio obtido pelo experimento de cinética, uma etapa de extração de proteínas por 2 h foi realizada para cada um dos materiais, mantendo-se as demais condições de extração e dessorção. (ii) As condições de extração foram mantidas como descrito no parágrafo anterior, mas experimentos de dessorção das proteínas de cada material foram realizados com as três condições ótimas estabelecidas (também descritas no parágrafo anterior). (iii) A diluição de 1:10 (v:v soro: água ultrapura) foi utilizada para a extração (2 h) com os três materiais. Cada nanotubo foi eluido apenas com sua condição de eluição otimizada. Todos esses ensaios complementares foram realizados em duplicatas.

Em todos os ensaios, além das fases de eluição recolhidas, um padrão de 200 µg mL<sup>-1</sup> de HSA também foi preparado e aplicado no gel de SDS-PAGE. Ademais, alíquotas de 0,2

mL foram retiradas de cada um dos tubos utilizados nesses experimentos. Essas alíquotas foram tratadas com o reagente de Bradford (2,8 mL) e lidas em espectrofotômetro ( $\lambda = 595$  nm). A determinação de proteínas totais foi realizada utilizando curvas de calibração previamente preparadas.

### 3.9.3 Análises do perfil de proteínas remanescentes nas amostras de soro diluído

O objetivo desses experimentos foi verificar a concentração e o perfil de proteínas que permaneciam nas amostras de soro diluído após a extração com M-CNT, M-CNT-BSA ou M-CNT-HL. Assim, o soro foi diluído 200 vezes em água ultrapura.

As amostras de soro diluído (1 mL) foram agitadas com 5 mg dos nanotubos por 2 h. Na sequência, os materiais foram separados e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para aplicação em gel de SDS-PAGE e para a quantificação de proteínas totais utilizando o reagente de Bradford. Um padrão de HSA de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  também foi preparado e colocado em um dos poços da eletroforese.

### 3.10 ANÁLISES DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

Os ensaios de fluorescência foram realizados para os M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL. Para essas análises, foi utilizada uma solução de BSA (preparada em tampão fosfato,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,2) na concentração de  $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os ensaios foram realizados individualmente para cada nanomaterial, em triplicata e a temperatura ambiente.

A solução de BSA (2 mL) foi agitada (750 rpm) juntamente com concentrações crescentes de cada nanotubo (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0 e  $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ , suspensões preparadas em tampão fosfato,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,2). Após 2 h, leituras de fluorescência foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência (Cary Eclipse, Agilent Technologies®). As condições empregadas durante as análises foram: comprimento de onda de excitação de 264 nm, faixa de emissão 290 – 450 nm e largura de banda de 5 nm.

### 3.11 ENSAIOS *IN VITRO*

Os estudos *in vitro* foram realizados apenas para os três materiais finais (M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL). Os ensaios de viabilidade celular e de citotoxicidade foram feitos em duas linhagens celulares diferentes: L929 e Caco-2; já os demais ensaios (estresse oxidativo, apoptose e permeação em barreira biomimética) foram realizados apenas com as Caco-2.

Todos os procedimentos com as células foram realizados em câmara de fluxo laminar e utilizando materiais estéreis. Além disso, como incubação assume-se as condições de 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> e o meio DMEM refere-se ao meio completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina).

### 3.11.1 Hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado de acordo Silva *et al.* (2022). Inicialmente, amostras de sangue total foram coletadas de três doadores diferentes e utilizadas individualmente. O sangue foi centrifugado a 955 g (4 °C) por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lavadas 3x com solução salina. As hemácias foram diluídas em solução salina a 4% (v/v) e 100 µL foram colocados em cada poço de uma placa de 96 poços.

Essas hemácias foram tratadas com suspensões dos nanotubos (preparadas em solução salina), nas concentrações de 500, 400, 250, 100, 50 e 25 µg mL<sup>-1</sup>, para M-CNTs e M-CNTs-HL, e de 100, 50 e 25 µg mL<sup>-1</sup>, para M-CNTs-BSA, ou com controles de hemólise. Triton X-100 1% (v/v) e solução salina foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente (Silva *et al.*, 2022). 100 µL das suspensões ou das soluções controle foram utilizados.

A placa foi incubada a 37 °C por 1 h. Após, o sobrenadante foi removido e transferido para uma nova placa, para a leitura das absorbâncias em 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a equação 13 abaixo, onde Abs é a absorbância em 540 nm:

$$\%hemólise = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{controle\ negativo})}{(Abs_{controle\ positivo} - Abs_{controle\ negativo})} \times 100 \quad (13)$$

### 3.11.2 Cultivo das linhagens celulares

As células foram cultivadas em frascos de 10 mL e o meio foi trocado sempre que elas atingiam certa confluência (80-90%). Para as passagens das células seguia-se os seguintes passos, adaptados de protocolos estabelecidos pela literatura:

- a) primeiramente todo o meio de cultivo antigo era retirado do frasco;
- b) as células eram lavadas com 4 mL de tampão fosfato salina (PBS);
- c) na sequência, eram adicionados 2 mL de tripsina-EDTA;
- d) as células eram incubadas por 5-10 min para permitir a ação da tripsina;
- e) ao final do tempo, 4 mL de DMEM eram adicionados ao frasco;
- f) todo o conteúdo do frasco era transferido para um tubo Falcon de 50 mL;
- g) o tubo era centrifugado (300 g, 5 min) para se recuperar as células;
- h) o *pellet* obtido era ressuspensos em 1 mL de meio DMEM;
- i) uma alíquota do *pellet* ressuspensos (cerca de 150-200  $\mu\text{L}$ ) era adicionada a outros 10 mL de DMEM previamente colocados no novo frasco de cultivo.

Para se determinar a concentração das células, após ressuspender o *pellet* em 1 mL de meio, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  era retirada e adicionada a 90  $\mu\text{L}$  do corante *Trypan blue*. As células eram então contadas em câmara de Neubauer e diluições necessárias (em meio DMEM) eram realizadas para obter a densidade de células requeridas para cada ensaio.

### 3.11.3 Ensaios de viabilidade e de citotoxicidade

As mesmas placas (de 96 poços) cultivadas foram utilizadas tanto para os ensaios de viabilidade, quanto para os de citotoxicidade. Réplicas de placas ( $n=4$ ), foram feitas de formas independente (ou seja, com diferentes passagens de células). Os ensaios de viabilidade e de citotoxicidade foram realizados a partir de adaptações nos métodos de Granja *et al.* (2021) e de Granja *et al.* (2019), respectivamente (Granja *et al.*, 2019, 2022).

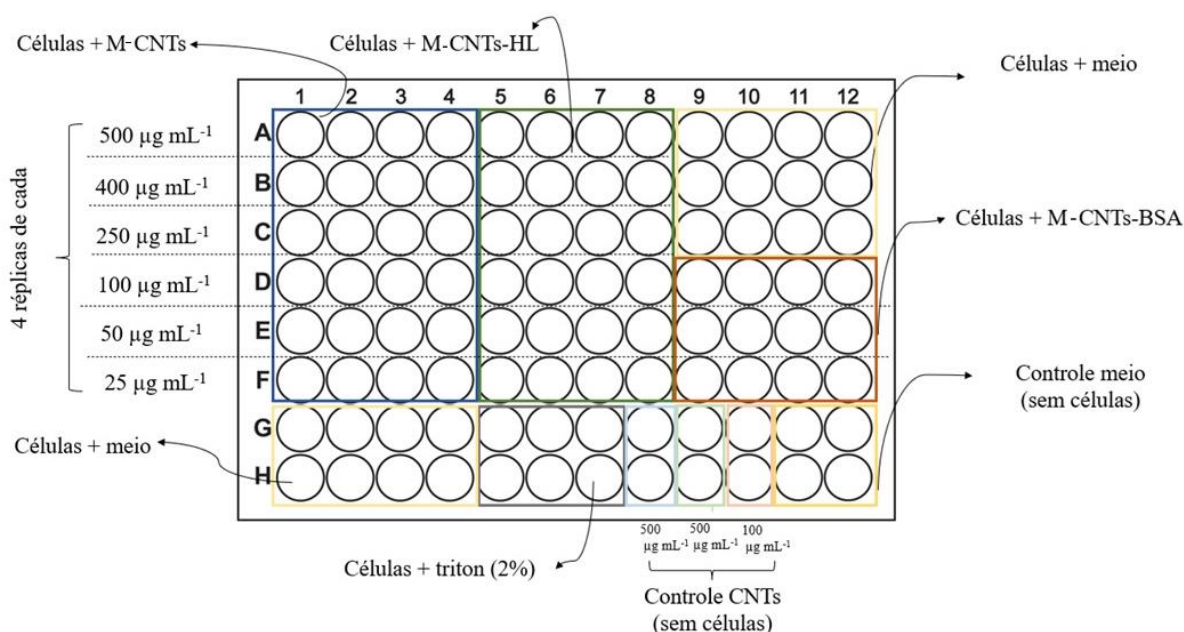
Inicialmente, os materiais sintetizados foram suspensos em meio DMEM, agitados em vórtex e deixados em banho ultrassom por 3 min. Suspensões de 500, 400, 250, 100, 50 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas para os M-CNTs e M-CNTs-HL. Já para os M-CNTs-BSA, suspensões de 100, 50 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram obtidas.

As células foram cultivadas (100  $\mu\text{L}$ /poço) a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço e foram incubadas por 24 h. Na sequência, todo o sobrenadante foi retirado e as

suspensões dos materiais (100  $\mu\text{L}$ ) foram acrescentadas nos poços adequados. As células foram incubadas novamente por mais 24 h.

Além dos materiais, também estavam presentes na placa os controles de viabilidade: positivo (células tratadas apenas com DMEM) e negativo (células tratadas solução de Triton X-100 2%). Poços sem células foram utilizados como controle do meio de cultivo e controle da interação dos nanotubos com os testes realizados. Nesses casos, 100  $\mu\text{L}$  de DMEM ou 100  $\mu\text{L}$  das suspensões dos materiais na maior concentração avaliada foram adicionados nos poços adequados. A Figura 8 exemplifica uma placa utilizada para esses ensaios.

Figura 8 - Distribuição das amostras utilizadas para os ensaios de viabilidade celular e de liberação de lactato desidrogenase



Fonte: Autora (2024).

### 3.11.3.1 Ensaio de viabilidade: Resazurina

Após as 24 h de exposição aos materiais, deu-se sequência aos testes de viabilidade celular e citotoxicidade. A placa foi centrifugada (10 min, 250 g) e 50  $\mu\text{L}$  das suspensões dos nanotubos foram retirados e transferidos para uma nova placa (que foi reservada para o ensaio de LDH), o restante do volume dos sobrenadantes foi desprezado.

Os poços contendo as células foram lavados com PBS, e 150  $\mu\text{L}$  de uma solução de resazurina 0,005  $\text{mg mL}^{-1}$  (para as L929) ou 0,010  $\text{mg mL}^{-1}$  (para as Caco-2), previamente preparadas em meio DMEM, foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada por mais 4 h. Na sequência, 80  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma placa de fundo escuro e a emissão de fluorescência foi medida em um leitor de placas Synergy™ HT Multi-mode (BioTek Instruments Inc., Winooski). Comprimentos de onda de 560 e 590 nm foram utilizados para excitação e emissão, respectivamente. Após as leituras, o percentual de viabilidade (%V) das células expostas aos materiais em cada uma das concentrações foi calculado de acordo com a equação 14 abaixo, onde  $F$  é a fluorescência:

$$\%V = \frac{(F_{material} - F_{meio})}{(F_{controle\ positivo} - F_{meio})} \times 100 \quad (14)$$

### 3.11.3.2 Ensaio de citotoxicidade: Liberação de lactato desidrogenase

Como descrito anteriormente, os sobrenadantes contendo as suspensões dos materiais foram separados e colocados em uma nova placa. Na sequência, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do *kit de LDH* (composto por uma mistura de diaforese/ $\text{NAD}^+$  e cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazolio /lactato de sódio). A placa foi deixada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 min. Após esse tempo, as absorbâncias das amostras foram lidas em dois comprimentos de onda diferentes: 490 e 690 nm (subtraindo-se os valores obtidos em 690 nm ao dos obtidos em 490 nm, para a correção do *background*). O leitor de placas Synergy™ HT Multi-mode foi mais uma vez utilizado. O percentual de citotoxicidade (%C), ou seja, de morte celular, foi calculado admitindo-se o Triton x-100 como 100% de citotoxicidade e usando a equação 15 abaixo, onde  $Abs$  é a diferença entre as absorbâncias obtidas em 690 e 490 nm:

$$\%C = \frac{(Abs_{material} - Abs_{meio})}{(Abs_{tritonX-100} - Abs_{meio})} \times 100 \quad (15)$$

### 3.11.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

Dois ensaios distintos foram realizados para verificar se as Caco-2 expostas aos materiais sintetizados produziam quantidades excessivas ROS, quando comparadas a um controle. Os experimentos foram conduzidos a partir de adaptações nos métodos de Farabegoli *et al.* (2019) e Granja *et al.* (2022) (Farabegoli *et al.*, 2017; Granja *et al.*, 2022).

#### 3.11.4.1 Microscopia confocal de varredura a laser

As Caco-2 foram cultivadas em uma placa de 8 poços (200  $\mu\text{L}$ /poço) a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço e incubadas por 24 h. Após esse tempo, todo o meio foi retirado sendo substituído por 200  $\mu\text{L}$  das suspensões dos materiais (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou por 200  $\mu\text{L}$  de DMEM, para os controles (tanto os positivos quanto os negativos para a geração de ROS). A placa foi incubada por mais 24 h. Na sequência, os sobrenadantes dos controles positivos para a geração de ROS foram retirados e 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1  $\text{mmol L}^{-1}$ , preparada em PBS) foram adicionados nas células. A placa foi deixada temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 h.

Após a incubação, os sobrenadantes de todos os poços foram retirados, as células foram lavadas com PBS e foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$  da sonda 2,7 diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), previamente preparada em dimetilsulfóxido, em todos os poços. Após 30 min de uma nova incubação, a sonda foi retirada e as células foram lavadas com PBS (por 3x). Dos oito poços, dois foram tratados como controles negativos, dois como controles positivos e apenas uma réplica de cada material foi realizada.

Por fim, foram feitas as etapas de coloração das estruturas e fixação das células na seguinte ordem: corante *cell mask* 0,1% (incubação por 10 min), formalina (temperatura ambiente por 30 min), e corante *Hoechst* 8  $\mu\text{mmol L}^{-1}$  (temperatura ambiente por 10 min). Entre todas as etapas o reagente anterior foi retirado e os poços foram lavados com PBS (por 3x). Ao final, 200  $\mu\text{L}$  de PBS foi deixado em cada poço e a placa foi guardada em geladeira (4-6  $^\circ\text{C}$ ) até o momento da análise no microscópio confocal de varredura a laser.

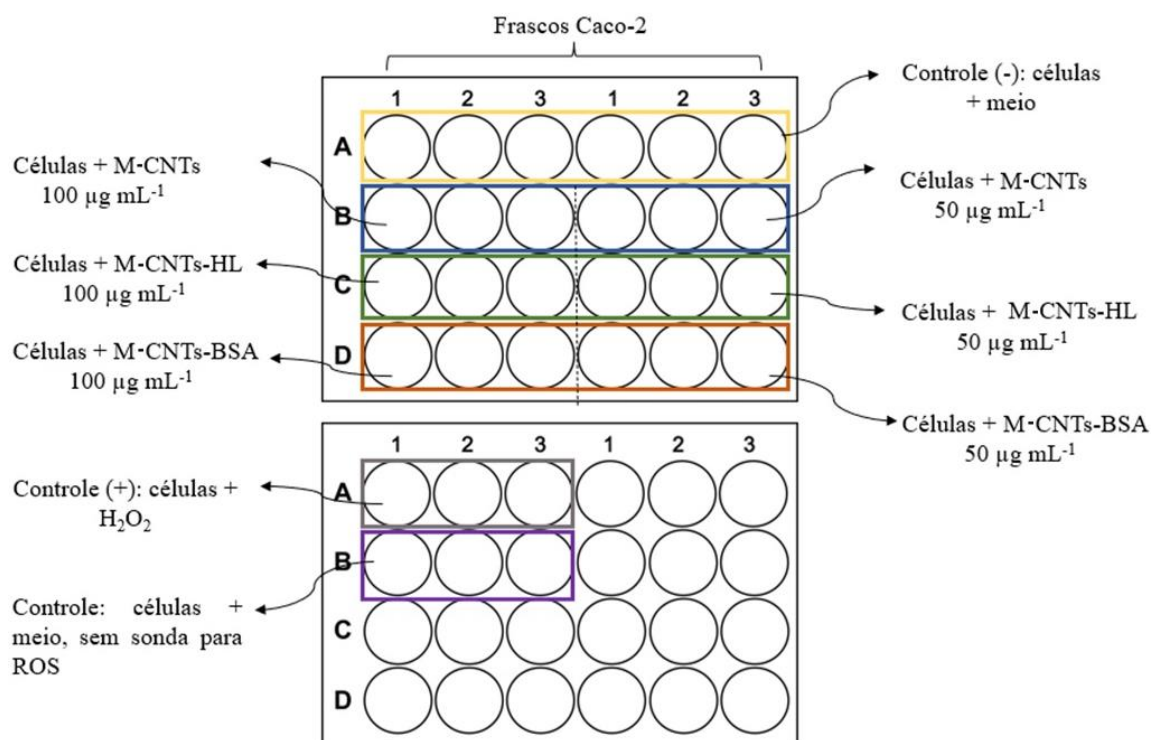
Uma segunda placa de 8 poços, sem células, também recebeu as suspensões dos nanotubos (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), servindo como um controle da interação dos materiais com o plástico da placa. Essa segunda placa não recebeu os tratamentos descritos anteriormente, apenas foram realizadas todas as etapas de lavagem, para que se garantisse que nenhum material ficasse retido, a menos que estivesse interagindo com o plástico.

No microscópio confocal de varredura a laser Leica SP5 CLSM (Leica Microsystems®, Wetzlar, Germany), as estruturas foram monitoradas usando os seguintes filtros: ALEXA 405, ALEXA 610 e *LysoTracker green*, para membranas (*cell mask*), núcleos (*Hoescht*), e ROS (DCFH-DA); respectivamente. O *software* Leica Application Suite - LAS AF v 4.3 foi utilizado.

### 3.11.4.2 Citometria de fluxo

As Caco-2 foram cultivadas em duas placas de 24 poços (300  $\mu\text{L}$ /poço) a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço e células de três frascos independentes foram utilizadas. As placas foram incubadas por 24 h. Após, todo o meio foi retirado sendo substituído por 300  $\mu\text{L}$  das suspensões dos materiais nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ou por meio DMEM (no caso dos controles). As placas foram incubadas por mais 24 h para se promover a interação dos nanomateriais com as células. A Figura 9 a seguir demonstra a distribuição das amostras nas placas.

Figura 9 - Distribuição das amostras para o ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo



Fonte: Autora (2024).

Após o tempo de incubação com os materiais, os sobrenadantes foram retirados dos poços tratados como controles positivos de geração de ROS, sendo substituído por 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1  $\text{mmol L}^{-1}$ , preparada em PBS). A placa foi deixada no escuro e a temperatura ambiente por 1 h. Na sequência, os sobrenadantes de todos os poços foram retirados, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da sonda DCFH-DA (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), assim como descrito anteriormente. Os controles sem sonda utilizados nesse ensaio receberam meio DMEM nessa etapa.

Após 30 min de incubação, os sobrenadantes foram novamente retirados, as células foram lavadas com PBS (por 3x) e 150  $\mu\text{L}$  de tripsina foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas por 5 min para o destacamento das células. A seguir, 150  $\mu\text{L}$  de DMEM foram colocados, para neutralizar a tripsina e todo o volume do poço foi recolhido para um tubo eppendorf.

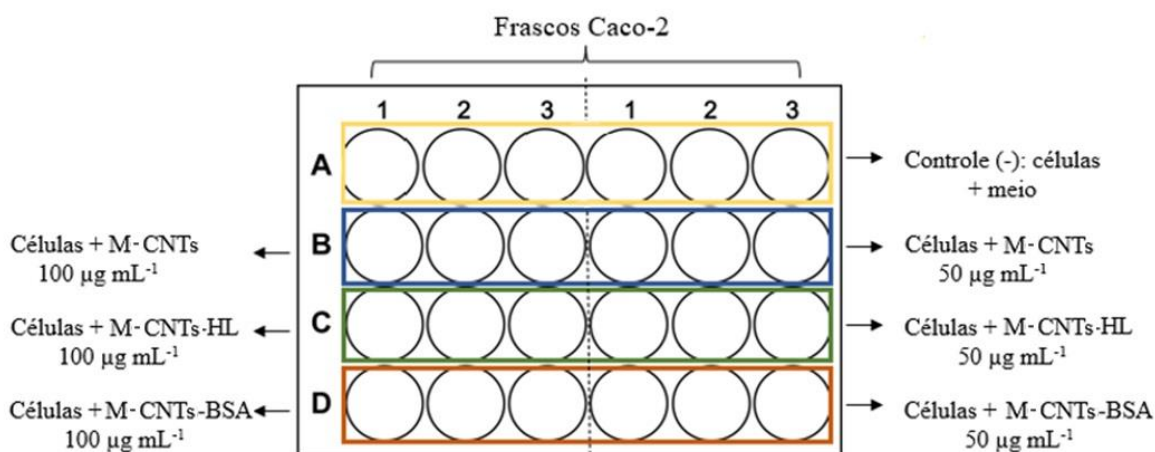
Os tubos foram centrifugados por 5 min (300 g), o sobrenadante foi desprezado e os *pellets*, ressuspensos em 150  $\mu\text{L}$  de PBS. Em cada um dos tubos foram acrescentados 1,5  $\mu\text{L}$  dos corantes *trypan blue* (0,004%) e iodeto de propídeo (0,01  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Os frascos foram agitados em vórtex antes de serem levados para as leituras no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences®, Erembodegem, Belgium).

No *software* do citômetro (BD Accuri), a área de interesse (maior concentração de células viáveis) foi definida através da leitura do controle negativo (células + meio de cultivo + sonda para ROS) e 10 mil eventos foram contadas para cada uma das amostras.

### 3.11.5 Avaliação da apoptose

Os estudos de apoptose também foram realizados conforme Granja *et al.* (2022), utilizando a técnica de citometria de fluxo. Dessa forma, o cultivo das Caco-2, a exposição delas aos materiais, e a tripsinização das células foram realizados da mesma forma que o descrito no tópico acima (3.11.4.2). A Figura 10 exemplifica uma placa de 24 poços utilizada para esse estudo.

Figura 10 - Esquema da distribuição das amostras para o ensaio de apoptose



Fonte: Autora (2024).

Após serem tripsinizadas, as células foram centrifugadas conforme descrito anteriormente. Na sequência, os sobrenadantes foram descartados e 200  $\mu\text{L}$  de PBS frio (retirado da geladeira e mantido em banho de gelo) foram acrescentados aos *pellets* de células. Esses foram centrifugados novamente (300 g) por mais 5 min. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e outros 50  $\mu\text{L}$  de PBS frio foram utilizados para ressuspender as células. Por fim, em cada tubo eppendorf foram adicionados os componentes do *apoptosis detection kit Annexin V*: 50  $\mu\text{L}$  de Annexin V Binding Buffer, 5  $\mu\text{L}$  de Annexin V, e 5  $\mu\text{L}$  de 7-amino-actinomicina (7-AAD).

Antes da leitura, os tubos foram agitados em vórtex e deixados 15 min em repouso no escuro e a temperatura ambiente. No citômetro, a área de interesse (maior concentração de células viáveis) foi definida através da leitura do controle negativo (células + DMEM), com quatro regiões de interesse: células viáveis, células em apoptose precoce, células em apoptose tardia, e células em necrose. Mais uma vez, 10 mil eventos foram contados para cada uma das amostras.

### 3.11.6 Avaliação da permeação em modelo biomimético de barreira intestinal

A capacidade dos materiais em permear a barreira intestinal foi inicialmente avaliada através do modelo biomimético utilizando a linhagem celular Caco-2.

### 3.11.6.1 Cultivo do modelo biomimético

O modelo biomimético de barreira intestinal foi construído de forma semelhante ao trabalho de Granja *et al.* (2019). As células foram cultivadas em placas *transwells* de 12 poços, com membranas de policarbonato (12 mm diâmetro, insertes, 0,4 um tamanho de poro). As Caco-2 foram semeadas a uma densidade de  $1,12 \times 10^5$  células/inserte, com um volume de 0,5 mL por inserte. Além disso, 1,5 mL de meio DMEM foram colocados na porção basolateral dos poços (Figura 5A). As células foram incubadas por 21 dias, trocando-se o meio de cultivo a cada 4 dias. (Granja *et al.*, 2019).

A resistência elétrica transepitelial (TEER) das barreiras foi verificada previamente a cada mudança de meio de cultivo e durante todo o ensaio de permeação. As medidas, em  $\Omega \text{ cm}^2$ , foram realizadas utilizando um voltímetro epitelial (EVOM, World Precision Instruments® - Sarasota, USA).

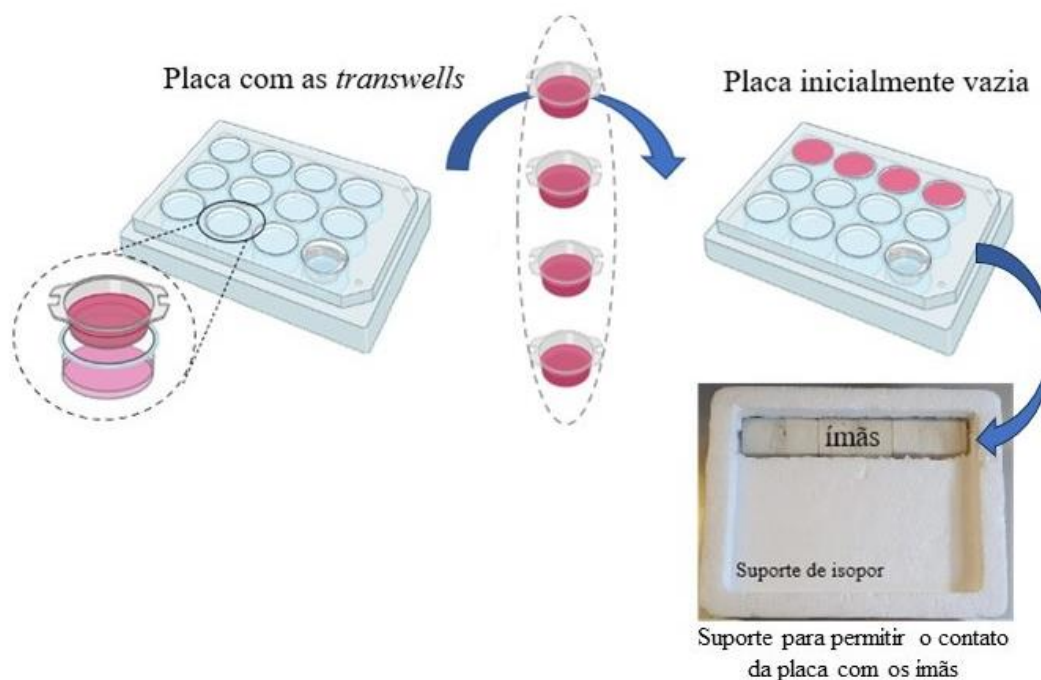
Os ensaios de permeação foram realizados com três placas independentes. Portanto, a formação das monocamadas de Caco-2 iniciou-se em dias diferentes para cada uma das placas.

### 3.11.6.2 Ensaio de permeação no modelo biomimético

Inicialmente, foram preparadas suspensões de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  dos M-CNTs, M-CNTs-BSA, e M-CNTs-HL em tampão HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*). As suspensões foram sonicadas (3 min) e agitadas em vórtex antes de serem colocadas em contato com a monocamada. A placa de 12 poços (Figura 5B) foi dividida em três réplicas para cada um dos materiais e três réplicas para o controle de permeação (apenas tampão HBSS).

Após o cultivo das monocamadas, um inserte de cada material e um inserte do controle foram transferidos para uma nova placa *transwell*, e esta foi colocada em contato constante com três ímãs de neodímio (modelo N52, 40 x 20 x 10 mm, 3700 Gauss), conforme mostrado na Figura 11 abaixo. Dessa forma, tinham-se duas réplicas de cada amostra não expostas aos ímãs e uma réplica, exposta. Vale ressaltar que ambas as placas foram mantidas em estufa ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) durante todo o ensaio, com exceção dos momentos de recolha das alíquotas.

Figura 11 – Esquema para permitir o contato da placa contendo as monocamadas de Caco-2 com os ímãs



Nota: A primeira linha de uma placa de 12 poços foi utilizada para receber 4 insertos com as monocamadas (os três materiais e o controle). A placa se encaixava no suporte de isopor e permitia o contato constante dos ímãs com as amostras.

Fonte: Autora (2024).

Previamente ao início dos ensaios de permeação, todo o meio de cultivo das porções apical e basolateral foi retirado. As suspensões dos materiais (0,5 mL) foram colocadas na parte apical, enquanto 1,5 mL de tampão HBSS foi colocado na porção basolateral. O controle recebeu apenas tampão em ambas as partes.

Nos tempos de 1, 4, 6 e 8 h foram retiradas alíquotas de 300  $\mu$ L da porção basolateral. Esse volume foi repostado pela adição de 300  $\mu$ L de HBSS. Para as *transwells* não expostas aos ímãs, o tempo de 24 h também foi avaliado.

Todas as alíquotas foram individualmente armazenadas em tubos eppendorf (-20°C) até o momento da análise por espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

### 3.11.6.3 Permeação de *Lucifer Yellow*

A avaliação da permeação de *Lucifer Yellow* (LY) foi realizada ao final dos ensaios para as réplicas não expostas aos ímãs, de duas das três placas utilizadas.

Após a lavagem com tampão HBSS (por 3x), a porção basolateral da *transwell* recebeu 1,5 mL do tampão; enquanto a porção apical recebeu 0,5 mL de uma solução de LY (0,1 mg mL<sup>-1</sup>, preparada em tampão HBSS). Após 2 h de incubação, 200 µL da porção basolateral foram recolhidos em uma placa de fundo escuro para a leitura de fluorescência (428 nm excitação e 540 nm emissão) (Pinheiro *et al.*, 2020).

Uma alíquota (200 µL) da solução de LY também teve sua fluorescência mensurada e essa foi considerada como 100%. Por fim, a porcentagem de permeação de LY nas monocamadas expostas aos materiais foi comparada com a do controle.

#### 3.11.6.4 Análise das monocamadas por microscopia confocal

As monocamadas da terceira placa utilizada nos ensaios de permeação (tanto das membranas expostas aos ímãs, quanto das não expostas) foram coradas para a análise no microscópio confocal de varredura a laser.

Ao fim do ensaio de permeação, as membranas foram lavadas com PBS (por 3x), e as células foram coradas e fixadas assim como descrito anteriormente na *seção 4.11.4.1*. Posteriormente, as membranas foram retiradas dos insertes com o auxílio de um bisturi, colocadas em lâminas de vidro e cobertas com lamínulas. *Vectashield* foi usado para auxiliar na adesão das membranas a lâmina, e a lamínula foi vedada utilizando verniz. As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento das análises.

Os canais ALEXA 405 e 610 foram utilizadas para membranas e núcleos, respectivamente. A presença ou não dos materiais sintetizados foi acompanhada por um canal de transmitância.

#### 3.11.7 Quantificação dos nanotubos permeados por ICP-MS

Os íons <sup>57</sup>Fe presentes nas nanopartículas magnéticas foram utilizados para estimar a concentração de nanotubos que atravessaram a barreira de Caco-2. Inicialmente as alíquotas recolhidas da porção basolateral das *transwells* (300 µL) foram tratadas com 100 µL de ácido nítrico. Na sequência, as amostras foram digeridas usando um sonicador *cup-*

*horn* (Qsonica<sup>®</sup>, Newtown, USA) por 8 min (amplitude: 75%; *power*: 210 W; energia: 4.087 J; *pulse-on and pulse-off time*: 1 min) (de Jesus *et al.*, 2019) para a liberação dos íons de Fe. Ao final, os extratos foram diluídos com água ultrapura para um volume total de 5 mL, e analisadas por ICP-MS (iCAP TQ, Thermo Scientific, Bremen, Germany). Os íons <sup>57</sup>Fe foram quantificados a partir de uma curva de calibração previamente preparada (0,1-10 µg L<sup>-1</sup>).

O ICP-MS foi abastecido com Dewer de argônio com pureza de 99,999% (White Martins, São Paulo, Brasil), o sistema de introdução de amostras foi composto por um nebulizador concêntrico (modelo Micromist) e uma câmara de *spray* ciclônica. O equipamento foi operado com um *RF Power (W)* de 1150, profundidade de amostragem de 5 mm, *cool flow* de 14 L min<sup>-1</sup> e fluxo de gás de nebulização de 0,99 L min<sup>-1</sup>. Além disso, a célula de reação e colisão foi pressurizada com hélio e operada via discriminação de energia cinética.

### 3.12 ANÁLISES DE IMAGENS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As imagens obtidas no microscópio confocal foram tratadas no *software* Fiji<sup>®</sup>. Já as análises estatísticas foram feitas no *software* R<sup>®</sup>, todos testes de comparação de médias foram realizados a um nível de confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos tópicos a seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante toda a execução dessa tese.

### 4.1 SÍNTESE DOS MATERIAIS

Como já descrito anteriormente, os CNTs foram escolhidos devido a sua alta capacidade de conjugação com moléculas e fármacos e as diferentes possibilidades de funcionalizações de superfícies. Já a escolha de torná-los magnéticos foi realizada devido à facilidade de manipulação das amostras, além de abrir novas possibilidades para o uso desses materiais na área biomédica.

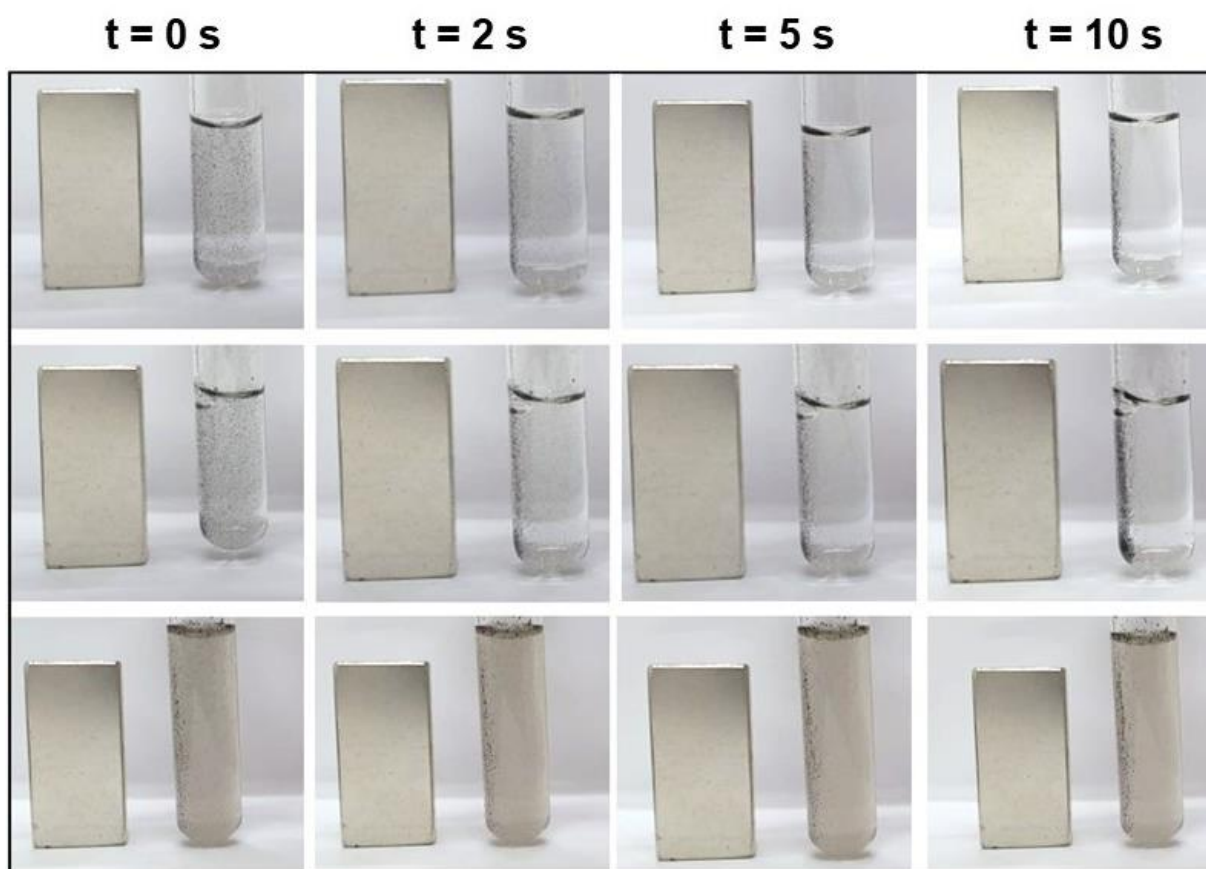
#### 4.1.1 Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos

Para a obtenção das NPs de óxido de ferro, foi realizada uma síntese por coprecipitação, permitindo a formação das NPs a partir de soluções aquosas de sais  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em atmosfera inerte. Esse método traz vantagens como não produzir intermediários tóxicos, ser relativamente simples e rápido, e usar temperaturas abaixo dos 100 °C (Ahn *et al.*, 2012). Ademais, os CNTs comerciais podem ser diretamente colocados no meio reacional, permitindo que os M-CNTs sejam obtidos em uma única etapa.

O método de coprecipitação consiste em dois processos: nucleação, que é responsável pela formação de centros de cristalização; e o crescimento subsequente. A taxa relativa entre eles determina o tamanho e a polidispersão das partículas sintetizadas (Camilo, 2006). Para que populações uniformes sejam conseguidas é necessário o controle das variáveis envolvidas no processo: pH final da solução, tipo de ânion, ordem dos reagentes, temperatura e velocidade de agitação (Camilo, 2006).

Os M-CNTs sintetizados apresentaram coloração escura, de acordo com os CNTs crus e boa resposta ao ímã de neodímio (Fotografia 1).

Fotografia 1 - Respostas dos materiais magnéticos a um ímã. De cima para baixo: M-CNT, M-CNT-BSA, M-CNT-HL



Fonte: Autora (2024).

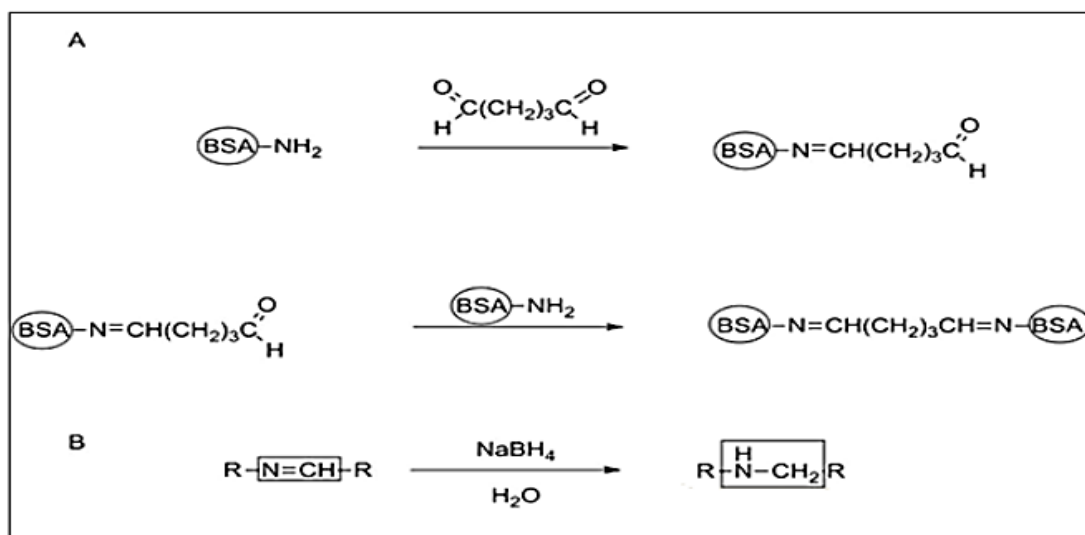
#### 4.1.2 Síntese de nanotubos de carbono magnéticos revestidos com albumina sérica bovina

A funcionalização com albumina ocorre após os M-CNTs estarem limpos e secos. A camada externa de BSA é formada a partir do entrecruzamento dos grupamentos amino terminais das moléculas de BSA com os grupamentos aldeído presente no reagente glutaraldeído (Figura 12A) (De Faria *et al.*, 2017b, 2017a; Menezes; Fêlix, 1998). Essa reação leva à formação de uma cápsula volumosa de proteínas na superfície dos CNTs. No entanto, nenhuma ligação covalente é estabelecida entre o nanotubo e a camada de BSA (Barbosa *et al.*, 2015; De Faria *et al.*, 2017b).

Além disso, a ligação formada entre BSA e glutaraldeído ocorre por meio de grupamentos imina, que são facilmente reativos e propensos a sofrer hidrólise. Dessa forma,

o borohidreto de sódio é utilizado para reduzir os grupos iminas a amins (Figura 12B), proporcionando maior estabilidade para os materiais (Menezes; Fêlix, 1998).

Figura 12 - Processo de entrecruzamento da BSA com glutaraldeído (em A) e redução dos grupos imina formados a grupamentos amina (em B)



Nota: BSA: albumina sérica bovina.

Fonte: Autora (2024).

Visualmente, os M-CNTs-BSA eram muito parecidos com os M-CNTs e uma boa resposta ao ímã de neodímio (Fotografia 1) também foi observada.

#### 4.1.3 Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos funcionalizados com monômeros hidrofílicos

Os M-CNTs-HL foram obtidos após várias etapas de síntese. Inicialmente os CNTs comerciais foram oxidados para expor grupamentos -COOH e -OH e promover uma melhor interação entre os CNTs e os reagentes utilizados nas etapas subsequentes (Al Mgheer; H Abdulrazzak, 2016). Os CNTs oxidados foram usados para a obtenção dos materiais magnéticos, que foram modificados com TEOS, MPS e monômeros hidrofílicos.

A funcionalização com TEOS ocorreu por meio de uma reação de silanização, na qual ligações covalentes são utilizadas para modificar superfícies ricas em grupos hidróxil, que se ligam aos átomos de silicone presente no TEOS (Boccafoschi; Fusaro; Cannas, 2018).

A inserção do MPS, que expõe grupos vinil na superfície dos materiais e a ligação com os monômeros hidrofílicos, que gera uma superfície externa densa em grupamentos -OH (De Faria *et al.*, 2022) foram realizadas sequencialmente.

Os M-CNTs-HL apresentaram uma coloração mais clara que os outros materiais, devido à presença do TEOS e o aspecto de um pó mais fino. Assim como os demais, apresentou boa resposta ao ímã (Fotografia 1).

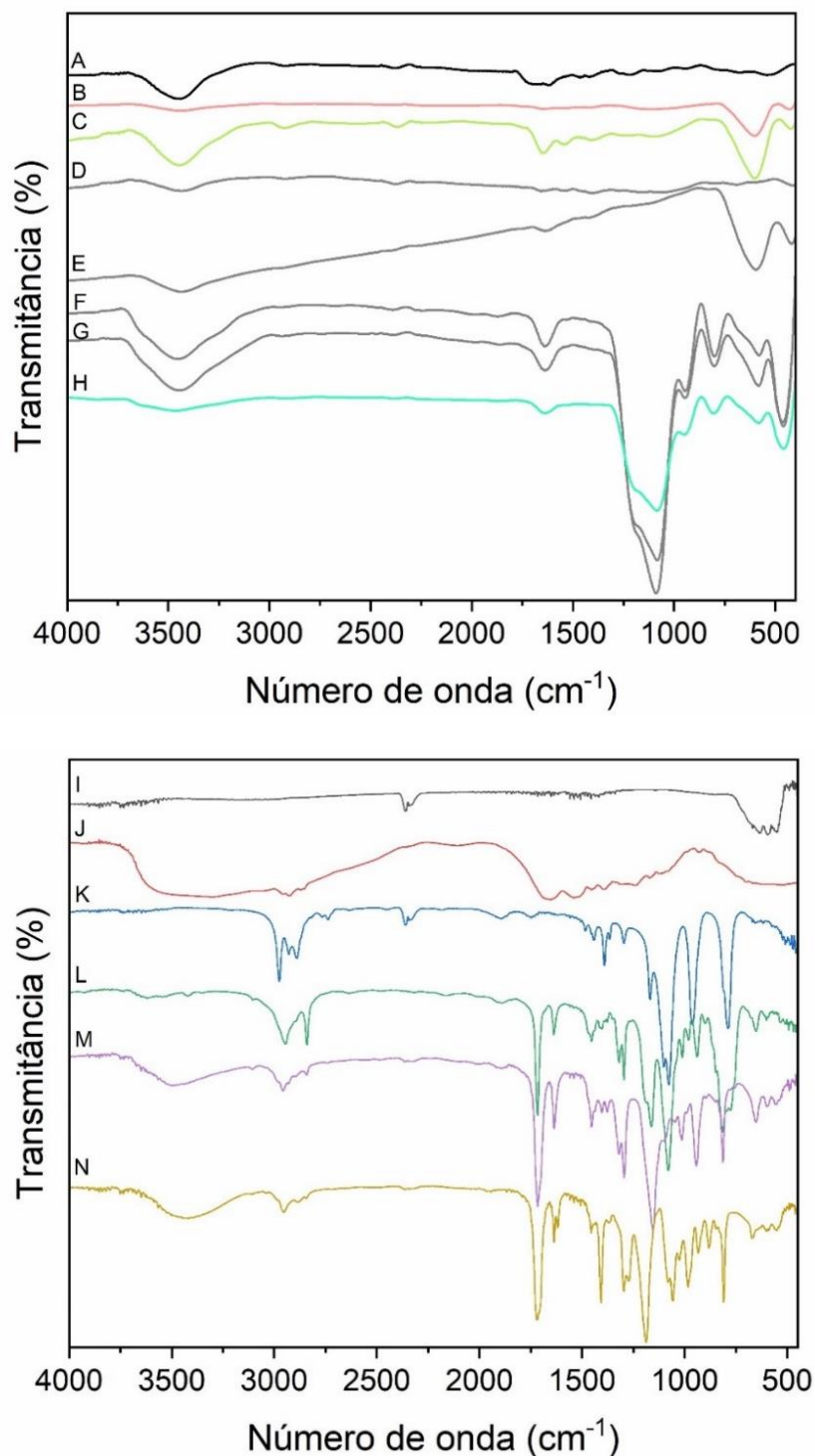
## 4.2 CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS

Nos tópicos a seguir serão apresentados os resultados dos ensaios de caracterização.

### 4.2.1 Espectroscopia no infravermelho

Como pode ser observado na Figura 13, espectros com baixa intensidade de transmitância foram obtidos para os materiais sintetizados. Alguns fatores podem ajudar a explicar esses resultados: os CNTs são materiais escuros que dificultam a passagem de luz, assim, espectros menos intensos e com mais ruídos podem ser obtidos, e a grande simetria dos CNTs gera um espectro mais silencioso devido à fraca diferença de cargas entre os átomos de carbono (Es'haghi; Ebrahimi; Hosseini, 2011). Para a obtenção de melhores resultados, foram realizados diversos testes de proporções entre os materiais e o KBr. Contudo, maiores quantidades de materiais levavam a espectros com mais ruídos, enquanto menores, levavam a espectros com intensidades de bandas ainda mais baixas. Testes sem a pastilha de KBr, utilizando o modo de refletância total atenuada (ATR) também foram realizados, mas não foram obtidos melhores resultados.

Figura 13 - Espectros de infravermelho obtidos para os materiais sintetizados e para os reagentes de síntese



Nota: A: CNTs comercial, B: M-CNT, C: M-CNT-BSA; D-G: etapas intermediárias da síntese do M-CNT-HL, nanotubos de carbono oxidados, nanotubos de carbono oxidados magnéticos, funcionalização com TEOS, funcionalização com MPS, H: M-CNT-HL, I: nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, J: BSA comercial, K: TEOS, L: MPS, M: GDMA, N: HEA.

Fonte: Autora (2024).

Nos espectros dos materiais sintetizados (Figura 13, A-H), bandas próximas de  $2900\text{ cm}^{-1}$  podem estar relacionadas à vibração de estiramento das ligações C-H de nanotubos puros e modificados. Assim como a banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$  podem ser referentes à ligação C=C dos nanotubos de carbono. A banda em  $580\text{ cm}^{-1}$ , presente em todos os materiais magnéticos é relacionada com o ferro das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . No espectro do M-CNT-BSA, bandas sutis em  $1200\text{ cm}^{-1}$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$  podem estar relacionadas com grupos amina proveniente da camada de BSA presente nesses materiais (Balduino *et al.*, 2019; Feliciano *et al.*, 2024). Por fim, materiais com TEOS em sua composição apresentaram bandas devido às interações Si-O-Si ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ), Si-O-H ( $952\text{ cm}^{-1}$ ), e Si-O ( $815$  e  $476\text{ cm}^{-1}$ ). Não foi possível observar alterações nos espectros dos M-CNTs funcionalizados com TEOS, MPS e monômeros hidrofílicos, uma vez que as bandas provenientes da funcionalização com TEOS se sobressaem, pois o TEOS se apresenta em elevada proporção em relação aos CNTs. Franqui *et al.* (2015) e De Faria *et al.* (2022) obtiveram resultados semelhantes em termos de caracterização de materiais funcionalizados com esses grupamentos (De Faria *et al.*, 2022; Franqui *et al.*, 2015).

Por fim, bandas em aproximadamente  $3500\text{ cm}^{-1}$  podem estar relacionadas a vibração O-H de vapores de água absorvidos pelos nanotubos. Contudo, essas bandas também podem estarem sobrepostas aos grupos hidroxila dos monômeros hidrofílicos, no caso do M-CNT-HL, ou do estiramento N-H, no caso do M-CNT-BSA.

Já em relação aos espectros dos reagentes utilizados nas etapas de síntese (Figura 13, I-N), algumas interpretações podem ser realizadas. Primeiro, as nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentam, como mencionado acima, uma banda principal em aproximadamente  $580\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração de estiramento da ligação Fe-O (Smiri *et al.*, 2020). Para a BSA comercial bandas relacionadas à estrutura secundária das proteínas foram observadas em:  $3274\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento N-H),  $2954\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento N-H do íon  $\text{NH}_3^+$ ),  $1634\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento C=O),  $1521\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento C-N e dobramento de N-H),  $1389\text{ cm}^{-1}$  (dobramento de grupos CH<sub>2</sub>), e  $1240\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-N e dobramento N-H) (Bronze-Uhle *et al.*, 2016; Rani, 2016). No material final (M-CNT-BSA), apenas as bandas próximas de  $1500$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  foram identificadas provavelmente devido à BSA formar apenas uma fina camada sobre os nanotubos, que apresentam limitações relacionadas à técnica de infravermelho.

No espectro do reagente TEOS, algumas bandas principais podem ser destacadas: vibrações de estiramento de grupos de éster em  $2978\text{ cm}^{-1}$  e  $2880\text{ cm}^{-1}$ , ligações assimétricas de C-H em  $1440\text{ cm}^{-1}$  e  $1296\text{ cm}^{-1}$  (Hadela *et al.*, 2020). Além das ligações de Si-O-Si em  $1070\text{ cm}^{-1}$ , Si-O-H em  $970\text{ cm}^{-1}$ , e Si-O em  $800\text{ cm}^{-1}$ . Nos nanotubos funcionalizados com TEOS, a ausência da banda próxima de  $2975\text{ cm}^{-1}$  e o deslocamento da banda de  $970$  para  $952\text{ cm}^{-1}$  podem ser indicativos da conversão de grupos de éster em silanóis e da correta funcionalização dos nanotubos.

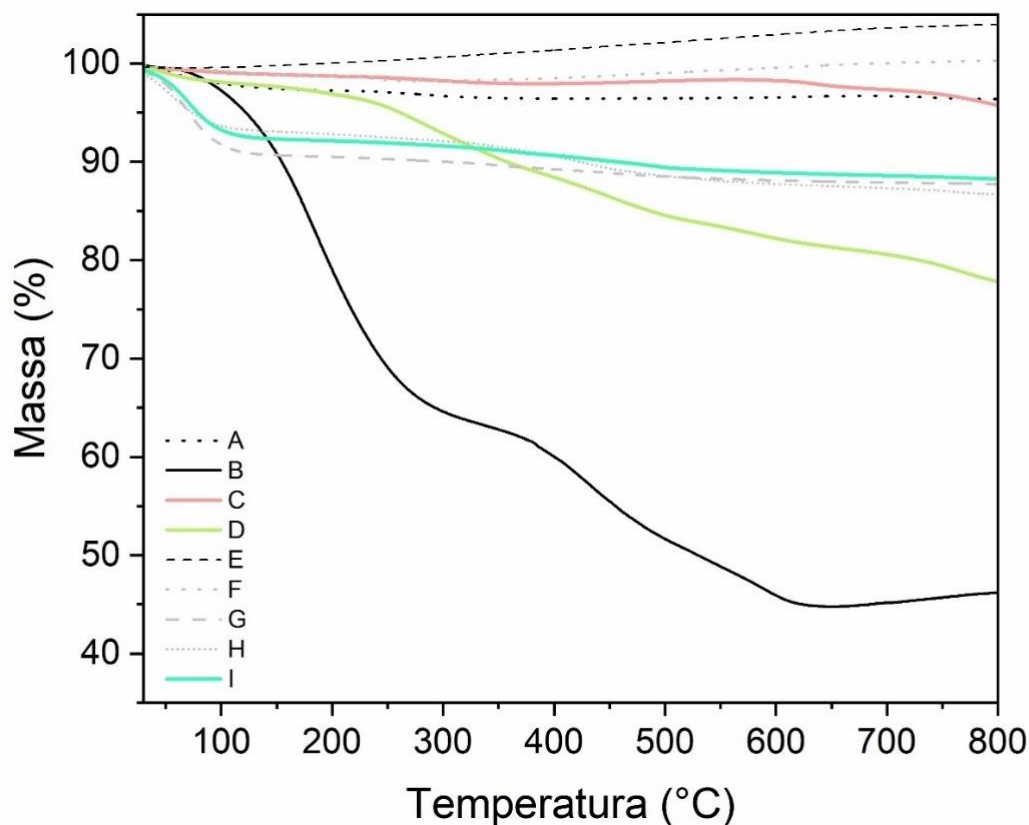
Em relação ao MPS, bandas principais em  $1637\text{ cm}^{-1}$ ,  $1720\text{ cm}^{-1}$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$  podem ser correlacionadas com vibração das ligações de C=C, C=O e C-O, respectivamente (Guo *et al.*, 2006). Ligações Si-O ( $815\text{ cm}^{-1}$ ) e Si-O-Si ( $1153\text{ cm}^{-1}$ ) também puderam ser observadas.

Nos espectros dos monômeros hidrofílicos, GDMA e HEA, bandas principais em aproximadamente  $3450\text{ cm}^{-1}$ ,  $1720\text{ cm}^{-1}$ , e  $1637\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas, respectivamente às ligações O-H, C=O, e C=C. Ademais, para o monômero HEA, a banda observada em  $1410\text{ cm}^{-1}$  pode ser correlacionada com o dobramento  $-\text{CH}_2$  (Cherifi *et al.*, 2020; Mejia; Murillo, 2016).

#### 4.2.2 Análises termogravimétricas

As análises termogravimétricas forneceram resultados referentes a estabilidade térmica dos materiais sintetizados. Os nanotubos foram expostos a uma ampla faixa de temperatura para que se abrangesse valores que são empregados em diferentes técnicas e metodologias. A Figura 14 mostra a perda de massa de cada amostra, em função do aumento de temperatura.

Figura 14 - Perda de massa em função do aumento da temperatura



Nota: A: Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , B: CNT comercial, C: M-CNT, D: M-CNT-BSA, E-H etapas intermediárias do M-CNT-HL (CNTs oxidados, CNT oxidados magnéticos, funcionalização com TEOS, e funcionalização com MPS), I: M-CNT-HL.

Fonte: Autora (2024).

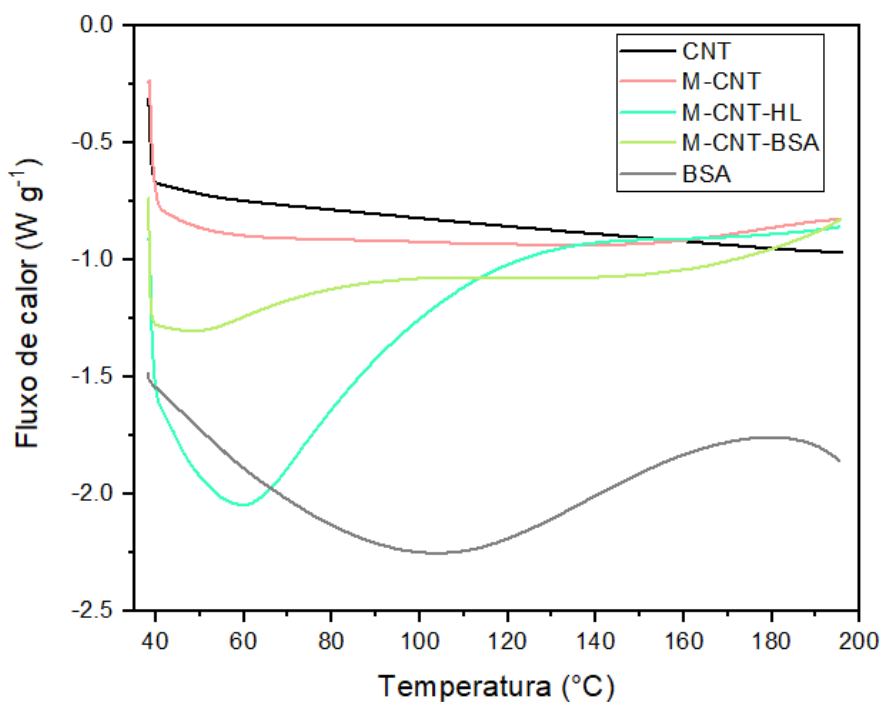
Os CNTs comerciais apresentaram eventos referentes à decomposição de carbono amorfo (até próximo de 350 °C) (Giraldo *et al.*, 2008) e de decomposição dos MWCNT (com máximo em 600 °C) (De Faria *et al.*, 2022; Giraldo *et al.*, 2008). Os CNTs comerciais apresentaram perda de massa de aproximadamente 55%. Já os materiais magnéticos apresentaram perdas de massa menos significativas, provavelmente devido à incorporação das nanopartículas magnéticas, que se mantiveram estáveis em temperaturas de até 900 °C. Os M-CNTs perderam cerca de 5% de sua massa inicial, enquanto os M-CNTs-BSA apresentaram uma perda de 23% em dois eventos diferentes. O primeiro deles (por volta de 200 °C) provavelmente relacionado à desnaturação e degradação da camada de BSA (Rosa *et al.*, 2019). Os M-CNTs-HL perderam aproximadamente 12% da massa inicial, também em dois eventos, com o primeiro iniciando-se em aproximadamente 280°C. Essa perda de

massa está possivelmente relacionada com a quebra das ligações Si-O provenientes da funcionalização com TEOS (Ismail *et al.*, 2011). Vale mencionar que as etapas intermediárias dos M-CNT-HL (M-CNTs-TEOS e M-CNTs-TEOS-MPS) apresentaram um perfil semelhante de perda de massa. Além disso, perdas de massa abaixo dos 100 °C, para todas as amostras, provavelmente são referentes à evaporação de água adsorvida pelos materiais.

#### 4.2.3 Análise de calorimetria exploratória diferencial

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada para complementar os resultados da TG e inferir a natureza de alguns dos eventos térmicos. As análises foram realizadas até 200 °C por precauções com o equipamento frente ao ponto de fusão da BSA (aproximadamente 250 °C). A Figura 15 mostra os resultados obtidos.

Figura 15 - Curvas de DSC para os diferentes materiais.



Fonte: Autora (2024).

Os eventos em aproximadamente 40 °C (M-CNTs-BSA) e 60 °C (M-CNTs-HL) podem ser correlacionados com a evaporação de solventes residuais. M-CNTs e M-CNTs

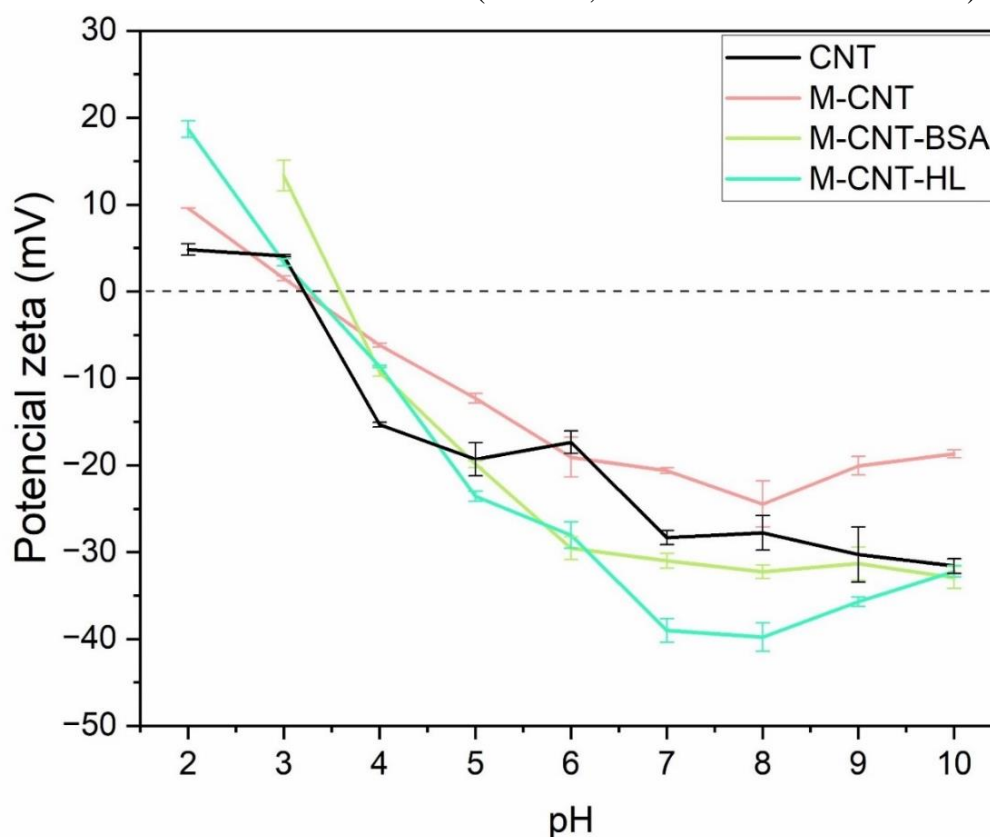
não apresentaram eventos térmicos até a temperatura de 200 °C, assim como o observado nos ensaios de TG.

A BSA comercial apresentou um pico endotérmico largo, iniciando em aproximadamente 70 °C, com ápice entre 100 e 125 °C. Esse evento indica que a albumina foi completamente desnaturada. Resultados similares foram obtidos por outros autores (Jones; Zeller; Sharma, 2013). Já os M-CNTs-BSA, apresentaram um pico iniciando em 100 °C, que possivelmente se refere à transição de fase da BSA. A elevação na temperatura para o início do evento (de 70 para 100 °C) pode indicar que o entrecruzamento aumenta, em certo nível, a resistência térmica da proteína, ou ainda pode ser um indicativo de que a BSA passe para um estado mais desordenado após o entrecruzamento.

#### 4.2.4 Potencial zeta

Os resultados desse ensaio são mostrados na Figura 16 e na Tabela 1.

Figura 16 - Potencial zeta para os nanotubos de carbono comerciais (CNT) e para os materiais sintetizados (M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL)



Fonte: Autora (2024).

De forma geral, os M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL apresentaram uma maior densidade de cargas que os M-CNTs, o que pode levar a uma maior repulsão eletrostática entre os materiais funcionalizados, auxiliando em uma maior estabilidade coloidal. Vale ressaltar que os desvios padrão entre réplicas das leituras foram inferiores a 16%, indicando uma reprodutibilidade adequada para as análises.

Além disso, pelos gráficos obtidos foi possível estimar o ponto isoelétrico (pI) dos materiais: 3,23; 3,20; 3,62; e 3,28 para CNTs comerciais, M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL; respectivamente. Nesses pHs, a carga líquida superficial é igual a zero e os mecanismos de repulsão eletrostática não se fazem tão presentes. Os CNTs revestidos com BSA apresentaram pI mais elevado provavelmente devido à influência das proteínas que o revestem (BSA tem um pI de aproximadamente 4,7 (Medda; Monduzzi; Salis, 2015)). Vale ressaltar que os M-CNTs-HL apresentaram pI próximos àqueles relatados para CNTs-HL: 3,7 (De Faria *et al.*, 2022).

As etapas intermediárias também foram analisadas e os resultados de pI e potencial zeta são resumidos na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Ponto isoelétrico (pI) e potencial zeta (pH 7) para os diferentes materiais e suas etapas intermediárias

<b>Material</b>	<b>pI</b>	<b>Potencial zeta</b>
CNT	3,23	-28,33 ± 0,81
M-CNT	3,20	-20,63 ± 0,32
M-CNT-BSA	3,62	-31,00 ± 0,87
CNT oxidado	< 2,00	-43,33 ± 1,00
M-CNT oxidado	< 2,00	-30,53 ± 3,84
M-CNT-TEOS	< 2,00	-28,50 ± 3,03
M-CNT-TEOS-MPS	3,20	-32,93 ± 1,33
M-CNT-HL	3,28	-39,00 ± 1,35

Fonte: Autora (2024).

Como pode ser observado, a oxidação dos nanotubos levou a uma diminuição do pI, apresentando cargas negativas maiores que as observadas para os CNTs comerciais. Provavelmente isso ocorreu devido à existência de grupos ácidos na superfície dos CNTs

após a oxidação (Chen *et al.*, 2000). O valor de pI voltou a elevar-se apenas com a inserção do MPS nos materiais. Provavelmente, as funcionalizações de superfícies diminuíram a interferência dos grupos ácidos provenientes da oxidação e da funcionalização com TEOS.

#### 4.2.5 Análises de área superficial e porosimetria

Informações sobre área de superfície específica, volume de poro, e tamanho dos poros foram obtidas por meio dos experimentos de área superficial e porosimetria. A Tabela 2 a seguir apresenta os resultados obtidos para nanopartículas magnéticas, CNTs comerciais, M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL.

Tabela 2 - Valores de área superficial, de volume e de tamanho dos poros para nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), CNTs comerciais e nanotubos sintetizados

Material	Área superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Volume de poro ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	Tamanho de poro (nm)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	11,9740	0,002080	2,1111
CNT	27,5342	0,008185	2,4398
M-CNT	38,7387	0,013834	2,2883
M-CNT-BSA	24,0427	0,011499	2,1505
M-CNT-HL	26,0893	0,018291	2,1372

Fonte: Autora (2024).

Como pode ser observado, os M-CNTs apresentaram uma maior área superficial, provavelmente devido à incorporação das nanopartículas magnéticas nos CNTs comerciais. Os materiais com superfícies funcionalizadas apresentaram diminuição de área superficial, tamanho e volume de poros (em comparação com os M-CNTs e CNTs comerciais). Provavelmente as funcionalizações diminuem o acesso do  $\text{N}_2$  aos poros dos nanomateriais. Dessa forma, valores mais baixos são encontrados. O discreto aumento no volume de poros dos M-CNTs-HL, em relação aos M-CNTs e M-CNTs-BSA pode ser atribuído a presença da camada de TEOS (Tadjarodi; Haghverdi; Mohammadi, 2012).

Por fim, todas as amostras analisadas puderam ser classificadas como mesoporosos, com poros entre 2 e 50 nm (Naik; Ghosh, 2009).

#### 4.2.6 Espalhamento dinâmico de luz

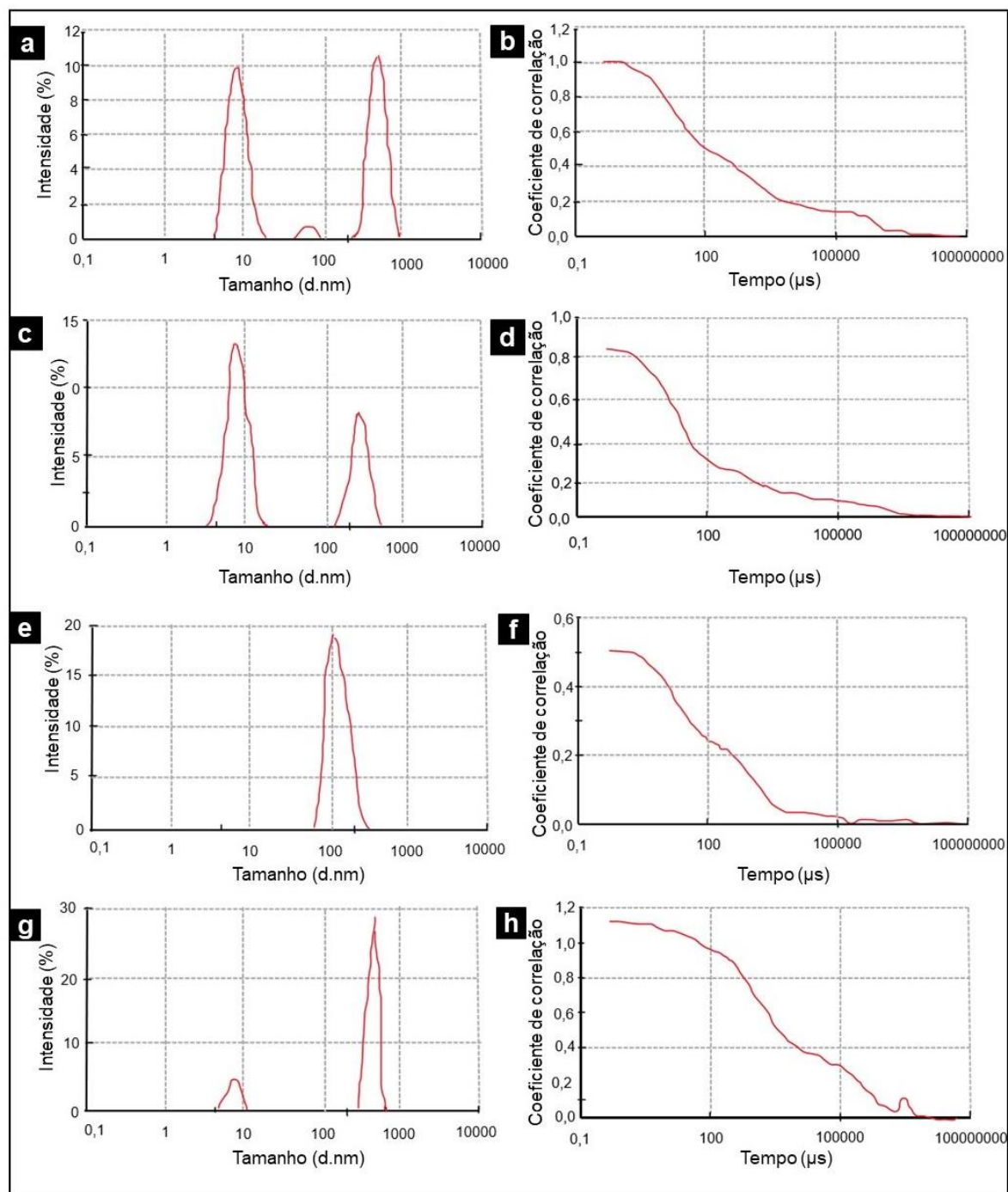
Um estudo inicial de DLS foi realizado utilizando uma suspensão de M-CNT-BSA como modelo. Os resultados obtidos mostraram populações com uma média de  $403,56 \pm 82,43$  nm ( $n=3$ ). Contudo, uma outra população de aproximadamente 8,0 nm foi identificada nas análises. Além disso, índices de polidispersividade (PDI) variando entre 0,428 e 0,790 foram obtidos (Figuras 17a e 17b). O PDI é uma medida que reflete a dispersividade de tamanhos encontrados em uma amostra. Valores mais próximos de 1,00 representam uma amostra com alta polidispersividade, ou seja, com populações de diversos tamanhos coexistindo. Geralmente PDIs abaixo de 0,2 indicam uma população monodispersa.

Diante desse resultado, algumas outras estratégias foram aplicadas na metodologia de análise, com o intuito de se diminuir os valores de PDI obtidos:

- a) a suspensão foi deixada em repouso (30 min), para que as partículas maiores decantassem. Os resultados das leituras mostraram populações de  $8,65 \pm 0,24$  nm e de  $352,03 \pm 49,23$  nm, com  $PDI > 0,368$ . (Figuras 17c e 17d);
- b) uma suspensão foi preparada em Triton X-100 (0,1%) e analisada. Populações de  $206,30 \pm 98,14$  nm e PDIs  $> 0,428$  foram obtidos (Figuras 17e e 17f);
- c) a suspensão descrita em “b” foi deixada em banho ultrassom por 30 min previamente às análises. Resultados de  $11,46 \pm 4,63$  nm e de  $275,50 \pm 87,11$  nm foram obtidos, com  $PDI > 0,501$  (Figuras 17f e 17g).

A curva obtida pelos valores de coeficiente de correlação em função do tempo traz algumas informações sobre a qualidade das análises. A inclinação da curva, valores acima de 1,0 e a presença de ruídos, indicam uma leitura com baixa qualidade, a presença de sedimentos, e fluorescência ou absorbância das amostras. Tentativas de aumentar a concentração do Triton X-100, de diminuir a concentração dos nanotubos e de filtrar a amostra previamente às análises também foram realizadas. No entanto, em todos os casos, PDIs elevados foram obtidos e variações significativas nas populações das réplicas de uma mesma amostra também foram observadas.

Figura 17 - Distribuição dos M-CNTs-BSA por tamanho e curva de correlação



Nota: (a, b) Suspensão de M-CNTs-BSA preparada em água ultrapura; (c,d) Suspensão de M-CNTs-BSA preparada em água ultrapura e deixada em repouso; (e,f) Suspensão de M-CNTs-BSA preparada em solução de Triton-X 100; (g, h) Suspensão de M-CNTs-BSA preparada em solução de Triton-X e deixada no ultrassom. Fonte: Autora (2024).

O ultrassom tem como função dispersar melhor os materiais presentes na solução, dificultando sua aglomeração. Já o Triton X-100 é um surfactante aniônico, com viscosidade

de 270 centipoise a 25 °C. Dessa forma, pode ser utilizado para manter partículas mais estáveis em suspensões. A literatura relata que esse surfactante pode ser utilizado em análises de DLS até concentrações de 0,5% (Malvern Panalytical, 2014).

Um outro ponto refere-se à técnica em si, que é mais adequada para partículas esféricas (Malvern Panalytical, 2014), pois o tratamento dos dados leva em consideração a dispersão da luz incidente nessas partículas. Assim, a análise de nanotubos pode ser dificultada e apresentar maiores valores de PDIs (Malvern Panalytical, 2014). Os materiais cilíndricos podem rotacionar em diferentes sentidos e ângulos e, em cada um desses sentidos espalhará a luz de uma forma diferente, contribuindo para os resultados de polidispersão. Além disso, a fluorescência da BSA também pode ser uma outra complicação presente.

#### 4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

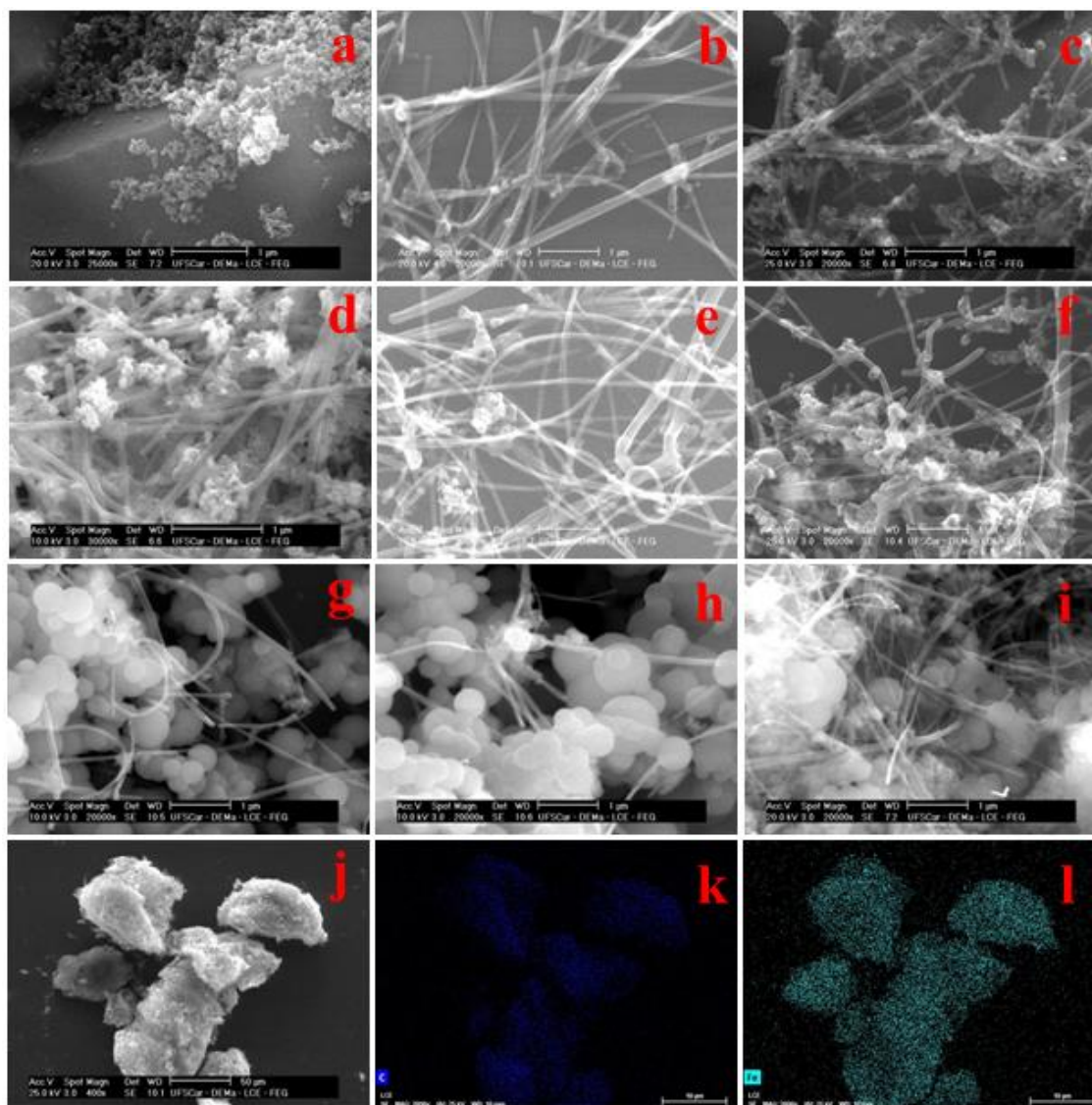
As imagens de MEV são mostradas na Figura 18 abaixo. As análises foram realizadas para os materiais finais (M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL) e para suas etapas intermediárias.

As análises para as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mostraram tamanhos individuais menores que 50 nm (Figura 18a) e uma distribuição homogênea sobre os nanotubos magnéticos sintetizados (Figuras 18c, d, f-i). Esses resultados sugerem que as NPs foram adequadamente dispersas no material, sem acúmulo excessivo em uma determinada área.

A funcionalização dos M-CNT com TEOS (Figura 18g-i) levou à formação de *shells* de  $\text{SiO}_2$ , que podem ser facilmente identificados. Não foi possível observar diferenças significativas entre a funcionalização com TEOS, MPS e monômeros hidrofílicos. Por fim, a camada de BSA (Figura 18d) forma um filme fino sobre os M-CNT, assim não é possível verificar mudanças significativas nas imagens de MEV.

Pelas imagens de EDS (Figuras 18j-l) foi possível identificar a presença de carbono, ferro e oxigênio nas amostras. As imagens 2D foram geradas a partir da energia liberada de Fe  $K\alpha$  (nanopartículas magnéticas) e C  $K\alpha$  (nanotubos de carbono), indicando uma distribuição uniforme desses elementos na área demarcada na micrografia.

Figura 18 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura. a) Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; b) CNT comercial; c) M-CNT; d) M-CNT- BSA; e) CNT oxidado; f) M-CNT-oxidado; g) M-CNT-TEOS; h) M-CNT-TEOS-MPS; i) M-CNT-HL; j-l) EDS de C  $K\alpha$  e Fe  $K\alpha$  para amostras de M-CNT-BSA

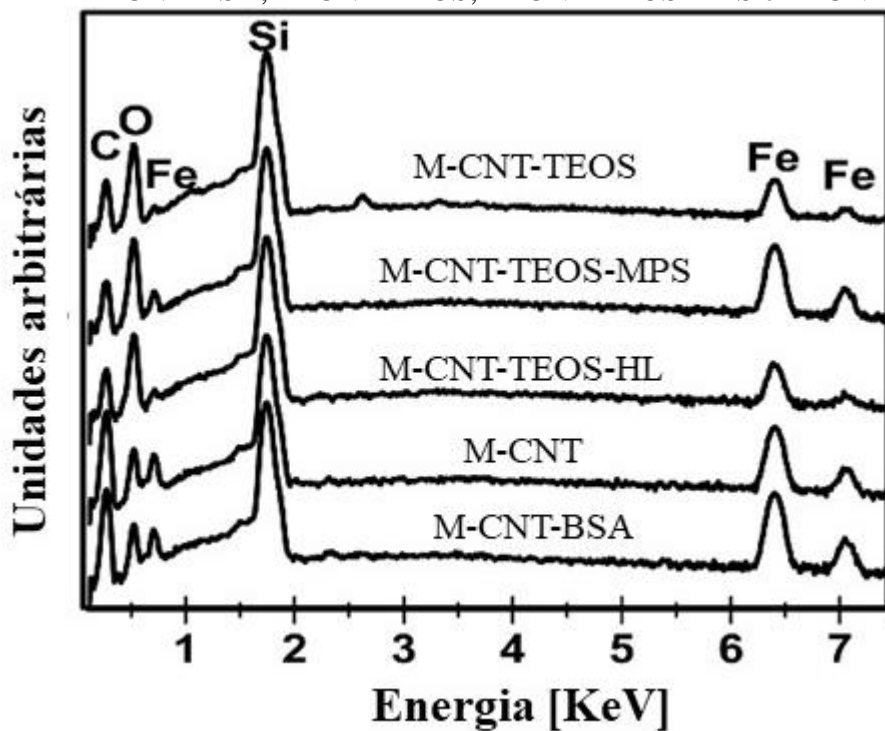


Nota: Escala igual a 1  $\mu\text{m}$  para imagens de *a-i*; igual a 50  $\mu\text{m}$  para a imagem *j*; e igual a 10  $\mu\text{m}$  para as imagens *k-l*.  
Fonte: Autora (2024).

Os espectros de EDS para todas as amostras (Figura 19) mostram que os materiais apresentaram composições similares. Na região entre 0,2 e 1,0 keV, picos correspondendo a emissões de C  $K\alpha$ , O  $K\alpha$ , e Fe  $L\alpha$  foram observados em 0,277; 0,525 e 0,705 keV, respectivamente. Na região entre 6,0 e 7,0 keV, um pico em 6,398 keV corresponde a emissão Fe  $K\alpha$ . Adicionalmente, os espectros de EDS revelam a presença de Si (1,74 keV),

proveniente do substrato de silicone usado para a deposição da amostra e do revestimento com TEOS para os materiais que receberam essa funcionalização (M-CNT-TEOS, M-CNT-TEOS-MPS e M-CNT-HL).

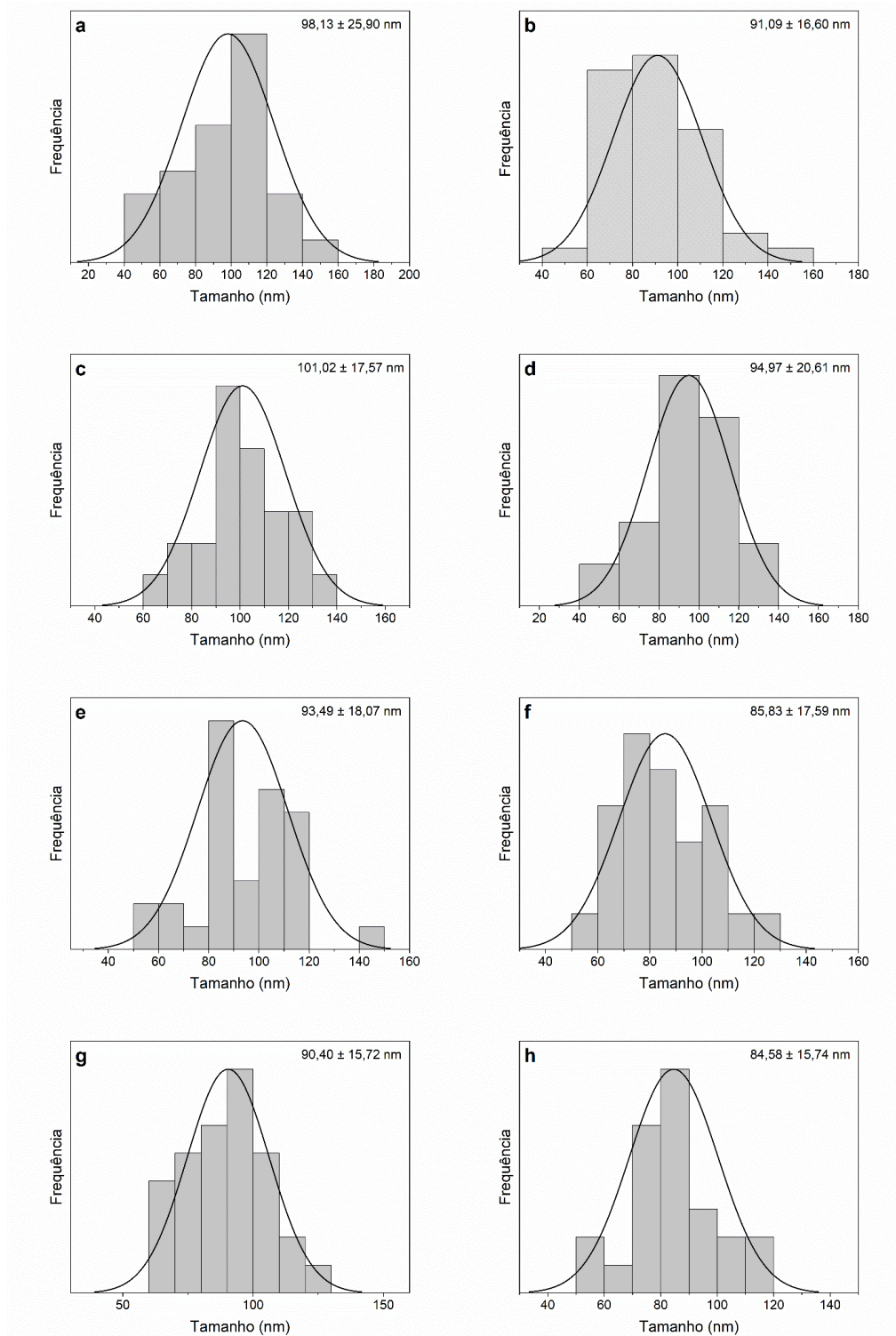
Figura 19 - Espectros de EDS mostrando a presença de Fe, O e C nas amostras M-CNT, M-CNT-BSA, M-CNT-TEOS, M-CNT-TEOS-MPS e M-CNT-TEOS-HL



Fonte: Autora (2024).

Por fim, os histogramas indicam nanotubos de carbono com diâmetros de 101,8 nm (Figura 20). Como pode ser observado, as funcionalizações não alteraram de forma significativa o tamanho dos nanotubos de carbono em si.

Figura 20 - Histograma de distribuição dos diâmetros dos nanotubos de carbono. a) CNT comercial; b) M-CNT; c) M-CNT- BSA; d) CNT oxidado; e) M-CNT-oxidado; f) M-CNT-TEOS; g) M-CNT-TEOS-MPS; h) M-CNT-HL

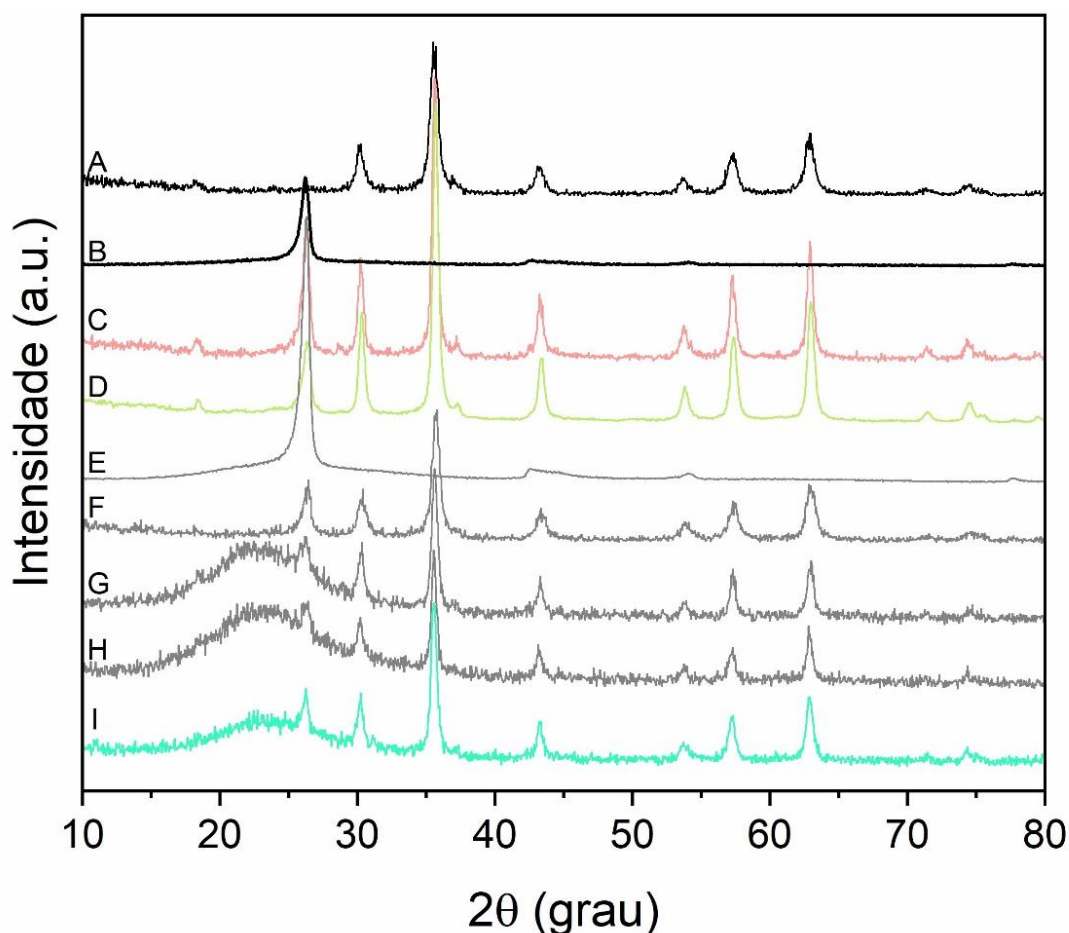


Fonte: Autora (2024).

#### 4.2.8 Difração de raio-X

A difração de raio-X (Figura 21) foi utilizada para verificar a estrutura cristalina dos materiais sintetizados. Como pode ser observado, os picos em  $26^\circ$  podem ser correlacionados com os CNTs de paredes múltiplas (Zhao *et al.*, 2015). Já os picos em  $30^\circ$ ,  $35^\circ$ ,  $43^\circ$ ,  $53^\circ$ ,  $57^\circ$ , e  $62^\circ$  podem ser atribuídos ao  $2\theta$  das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Lago *et al.*, 2020). Nos materiais com revestimento de TEOS é possível observar picos alargados perto de  $20^\circ$ , indicando o aspecto amorfo da sílica (de Oliveira *et al.*, 2019b). A BSA também não apresentou nenhum pico por ser amorfa.

Figura 21 - Difratoograma de raio-X dos materiais sintetizados e de suas etapas intermediárias.



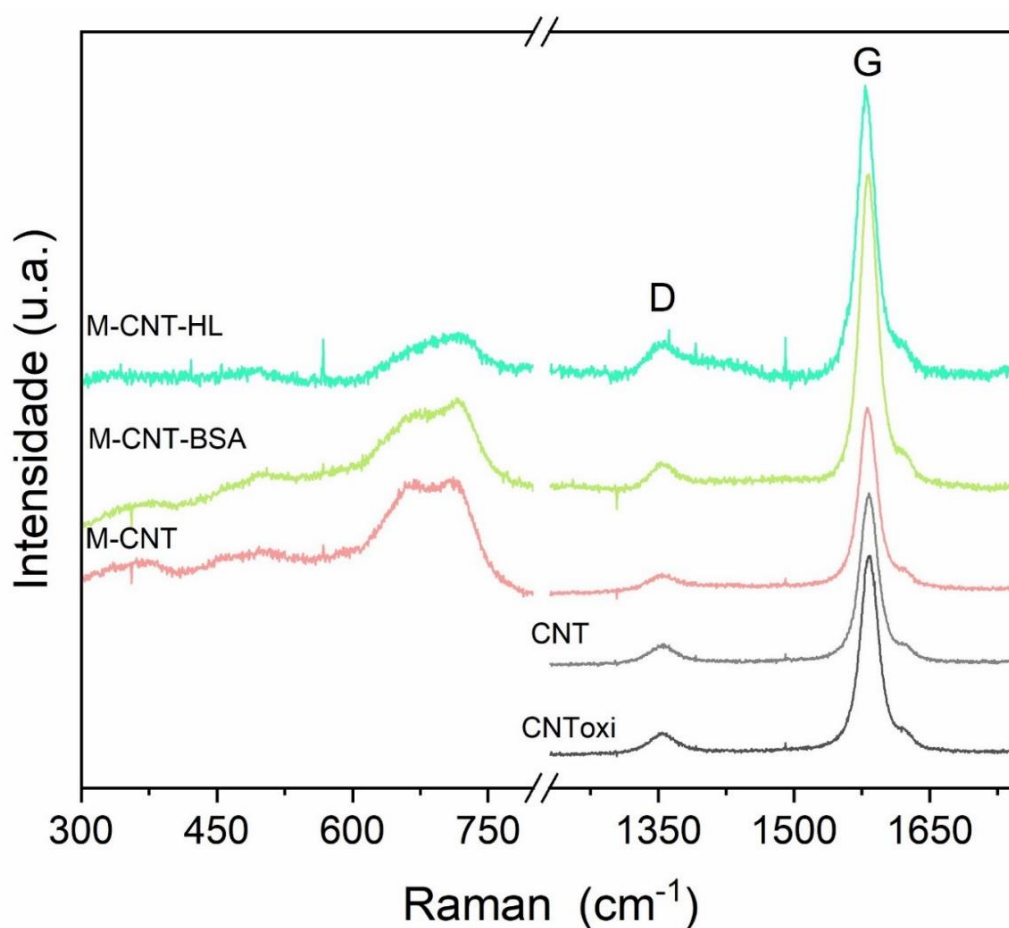
Nota: A) Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; B) CNT comercial; C) M-CNT; D) M-CNT- BSA; E) CNT oxidado; F) M-CNT-oxidado; G) M-CNT-TEOS; H) M-CNT-TEOS-MPS; I) M-CNT-HL.

Fonte: Autora (2024).

#### 4.2.9 Espectroscopia de Raman

Os resultados da espectroscopia de Raman (Figura 22) mostraram que as amostras de CNTs comerciais, CNTs oxidados, M-CNTs, M-CNTs-BSA, e M-CNTs-HL apresentaram bandas características de nanotubos de paredes múltiplas. A banda D (em  $1340\text{ cm}^{-1}$ ) pode ser o resultado da hibridização  $\text{sp}^3$  dos carbonos ou da desorganização da estrutura (Zeng *et al.*, 2015). Já a banda G (em  $1570\text{ cm}^{-1}$ ) pode estar relacionada ao alongamento  $\text{E}_{2g}$  do grafite (Zeng *et al.*, 2015).

Figura 22 – Espectro de Raman para CNTs comerciais, CNTs oxidados (CNToxi), M-CNTs, M-CNTs-BSA, e M-CNTs-HL



Fonte: Autora (2024).

A razão entre as áreas das bandas D e G pode ser utilizada para caracterizar os defeitos introduzidos pela oxidação dos CNTs comerciais (Zeng *et al.*, 2015). A razão D/G

obtida para os nanotubos oxidados (0,125) foi maior que a obtida para os nanotubos comerciais (0,114), indicando a correta oxidação do material. Além disso, para os M-CNTs-HL houve uma diminuição no valor de D/G (0,111) provavelmente devido a uma supressão dos defeitos a partir da funcionalização com TEOS. Resultados seguindo essa tendência também foram encontrados por Zeng *et al.* (2005) na avaliação de nanotubos de carbono funcionalizados com sílica (Zeng *et al.*, 2015). Os materiais M-CNT e M-CNT-BSA apresentaram valores de 0,100 e 0,101; respectivamente.

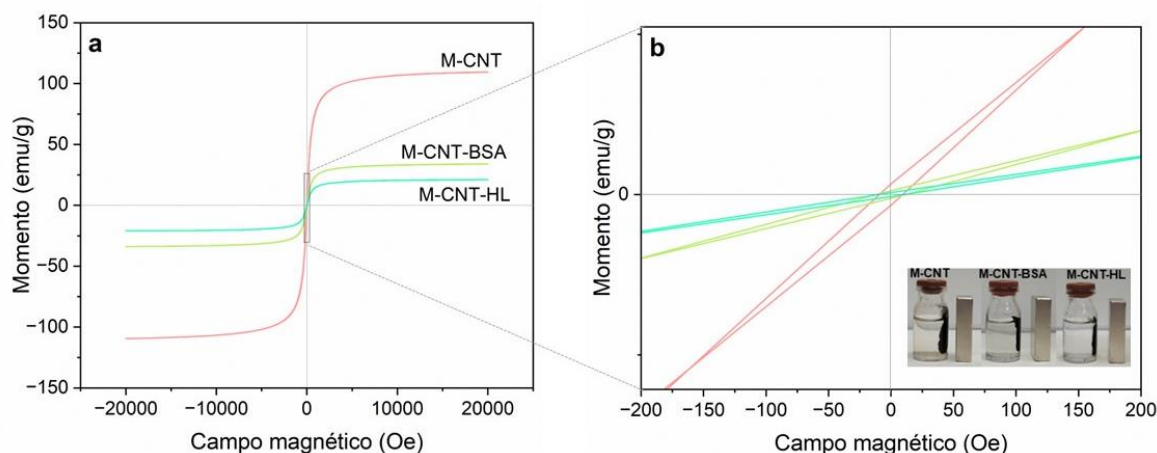
Por fim, como também pode ser observado na Figura 22. Todos os materiais magnéticos apresentaram uma banda em aproximadamente  $730\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída às nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Bergmann CP, 2015).

#### 4.2.10 Susceptibilidade magnética

As histereses de susceptibilidade magnética para M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL são mostradas na Figura 23a a seguir. Os valores de saturação magnética encontrados foram de 109,5; 33,9; e 21,0  $\text{meu g}^{-1}$  para M-CNT, M-CNT-BSA, e M-CNT-HL, respectivamente. O menor valor observado para os materiais funcionalizados pode ser atribuído à presença de grupos não magnéticos e amorfos nos materiais (Lago *et al.*, 2020; Mohammad Aminzadeh; Zeynizadeh, 2023). No entanto, os materiais funcionalizados continuaram demonstrando boa resposta ao ímã de neodímio permitindo sua recuperação de soluções (Figura 23b) e de amostras biológicas.

Na Figura 23b também pode ser observado um *loop* de histerese pouco aberto, indicando que os materiais analisados apresentam um comportamento superparamagnético (Mohammad Aminzadeh; Zeynizadeh, 2023).

Figura 23 – *Loops* de histerese para M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL (a). *Zoom* na região próxima do momento igual a zero e fotografias dos nanotubos sendo atraídos por ímãs (b)



Fonte: Autora (2024).

### 4.3 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA

O método de Bradford foi o utilizado a quantificação de proteínas. Esse método é baseado na interação entre o corante *Coomassie brilliant blue* e as proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Durante a interação, ocorre o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm (Zaia; Zaia; Lichtig, 1998), comprimento de onda na região do visível. Esse método tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversas amostras, incluindo soro (Rigueira *et al.*, 2016), e é tido como simples e reprodutível.

#### 4.3.1 Avaliação do tempo de reação entre o reagente de Bradford e a albumina

Para que a reação entre as proteínas e o reagente de Bradford ocorra completamente, é necessário que se tenha um tempo de contato. A literatura relata que a interação entre esses dois componentes é estável entre 5 e 60 min (Pedrol; Ramos, 2001; Seevaratnam; Patel; Hamadeh, 2009). Assim, um ensaio foi realizado para identificar diferenças na quantificação de uma solução de HSA, quando essa era deixada em contato com o reagente de Bradford por diferentes tempos que antecediam a leitura em espectrofotômetro. Os resultados são mostrados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Absorbância de soluções de HSA tratadas com reagente de Bradford após diferentes tempos de reação

Tempo	Absorbância (595 nm)		
	Branco	50 mg L <sup>-1</sup>	700 mg L <sup>-1</sup>
5	0,402	0,510	1,063
+ 1 min	0,406	0,513	1,058
10	0,409	0,513	1,046
+ 1 min	0,409	0,510	1,050
15	0,409	0,516	1,034
+ 1 min	0,405	0,521	1,037
20	0,407	0,521	1,040
+ 1 min	0,409	0,522	1,047
25	0,407	0,521	1,052
+ 1 min	0,407	0,523	1,048
30	0,408	0,523	1,051
+ 1 min	0,410	0,524	1,046

Nota: Os valores de absorbância do branco foram anotados, mas o espectrofotômetro foi zerado previamente às leituras dos padrões de HSA.

Fonte: Autora (2024).

Pelos resultados, pôde-se observar que as absorbâncias não apresentaram variações significativas. Contudo, o branco apresentou uma menor variação (ao longo do tempo), a partir de 10 min, sendo esse o tempo escolhido para as análises posteriores. Dessa forma, caso haja um erro por parte do analista, os resultados não ficam prejudicados. Pode-se dizer também que tempos de até 30 min são adequados para o uso.

#### 4.3.2 Interferência do branco

Para verificar se o tampão fosfato (utilizado para preparar as soluções proteicas) e/ou os nanotubos influenciavam na absorbância das proteínas, um teste de interferência do branco foi realizado e resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados de absorvância para o teste de interferência do branco

Material	Solução	Absorbâncias (595 nm)	Média	DPR%
M-CNT	a	0,431; 0,424; 0,430	0,428	0,884
	b	0,644; 0,623; 0,618	0,628	2,196
	c	0,640; 0,639; 0,647	0,642	0,679
M-CNT-BSA	a	0,420; 0,418; 0,416	0,418	0,478
	b	0,618; 0,644; 0,623	0,628	2,196
	c	0,613; 0,639; 0,606	0,619	2,807
M-CNT-HL	a	0,424; 0,416; 0,425	0,425	0,896
	b	0,673; 0,686; 0,683	0,681	0,751
	c	0,668; 0,671; 0,675	0,671	0,364

Nota: DPR: Desvio padrão relativo. Os valores das absorvâncias representam as três réplicas analisadas. Soluções “a”: branco (material + tampão); “b”: fortificação com HSA antes do processo de extração; “c”: fortificação com HSA após o processo de extração.

Fonte: Autora (2024).

Um Test-t, bicaudal (5% de significância) para comparação de médias foi aplicado comparando as absorvâncias obtidas em “b” e em “c”, para cada um dos materiais. O valor de T calculado foi menor que o valor de T crítico, em todos os ensaios. Esse resultado evidencia que não houve diferença estatística entre as absorvâncias obtidas para a fortificação com HSA antes e após o processo de extração. Ou seja, que o branco não causa interferência na quantificação das proteínas. Com esses resultados é possível concluir também que as etapas de repouso dos materiais nos ímãs foram suficientes para se retirar os CNTs do sobrenadante, impedindo que eles causassem interferências nas leituras no espectrofotômetro por obstrução do feixe de radiação.

#### 4.4 TESTE DE EXCLUSÃO DE ALBUMINA

Os resultados dos ensaios de exclusão de albumina (n=3) foram  $97,45 \pm 1,88\%$ ,  $73,92 \pm 1,80\%$ , e  $48,72 \pm 4,39\%$ , para M-CNT-BSA, M-CNT-HL e M-CNT, respectivamente.

A funcionalização com monômeros hidrofílicos resulta na formação de uma camada externa densa e hidrofílica, que diminui a adsorção e o acúmulo de macromoléculas na superfície dos materiais por mecanismos de impedimento estérico (De Faria *et al.*, 2017b) e

pelo fato da ligação entre proteínas e superfícies hidrofílicas não ser termodinamicamente favorável (Wang *et al.*, 2004).

A funcionalização com BSA cria uma cápsula volumosa, dificultando a penetração das macromoléculas no interior dos materiais (De Faria *et al.*, 2017b). Além disso, em valores de pH diferentes de seu ponto isoelétrico, tanto a BSA que funcionaliza os M-CNTs-BSA, quanto a BSA presente em solução apresentam uma superfície predominantemente carregada. Assim, mecanismos de repulsão eletrostática também atuam, prevenindo o acúmulo de proteínas (De Faria *et al.*, 2017b).

Uma possibilidade de certa exclusão de proteínas pelos M-CNTs, além do fato deles não terem a capacidade para adsorver toda a proteína disponível no meio, é a presença de carga negativa na superfície das nanopartículas.

Quando usados em aplicações biomédicas, os nanotubos atingem a corrente sanguínea e imediatamente adsorvem proteínas, levando a formação da camada corona, que pode trazer limitações para os sistemas. Assim, a capacidade de não acumular proteínas pode ser benéfica para esses materiais. Considerando-se a quantidade de albumina no sangue humano ( $44 \text{ g L}^{-1}$ ), uma diferença de aproximadamente 25,2% de exclusão reflete em 11,17 g de proteínas a menos adsorvidas em cada litro de sangue.

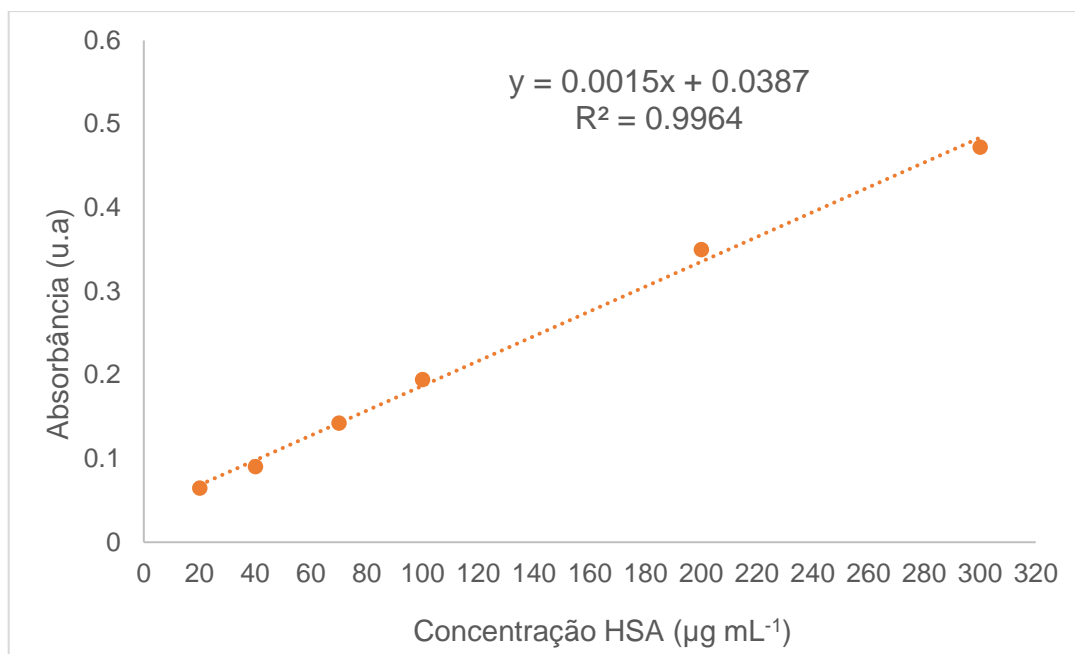
## 4.5 ESTUDOS DE ADSORÇÃO

Nos tópicos a seguir serão descritos os resultados dos estudos de adsorção de HSA utilizando os ensaios de cinéticas e de isotermas.

### 4.5.1 Cinéticas de adsorção

O primeiro passo para a realização dos estudos de cinéticas foi a construção de uma curva de calibração ( $20$  a  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para a quantificação das proteínas (Figura 24). Foram obtidos coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9964, desvio padrão relativo (DPR%)  $\leq 15,8\%$  e erro relativo (E%) entre -13,66 e 3,98%. Indicando, respectivamente, linearidade, precisão e exatidão adequadas para o método (FDA, 2013).

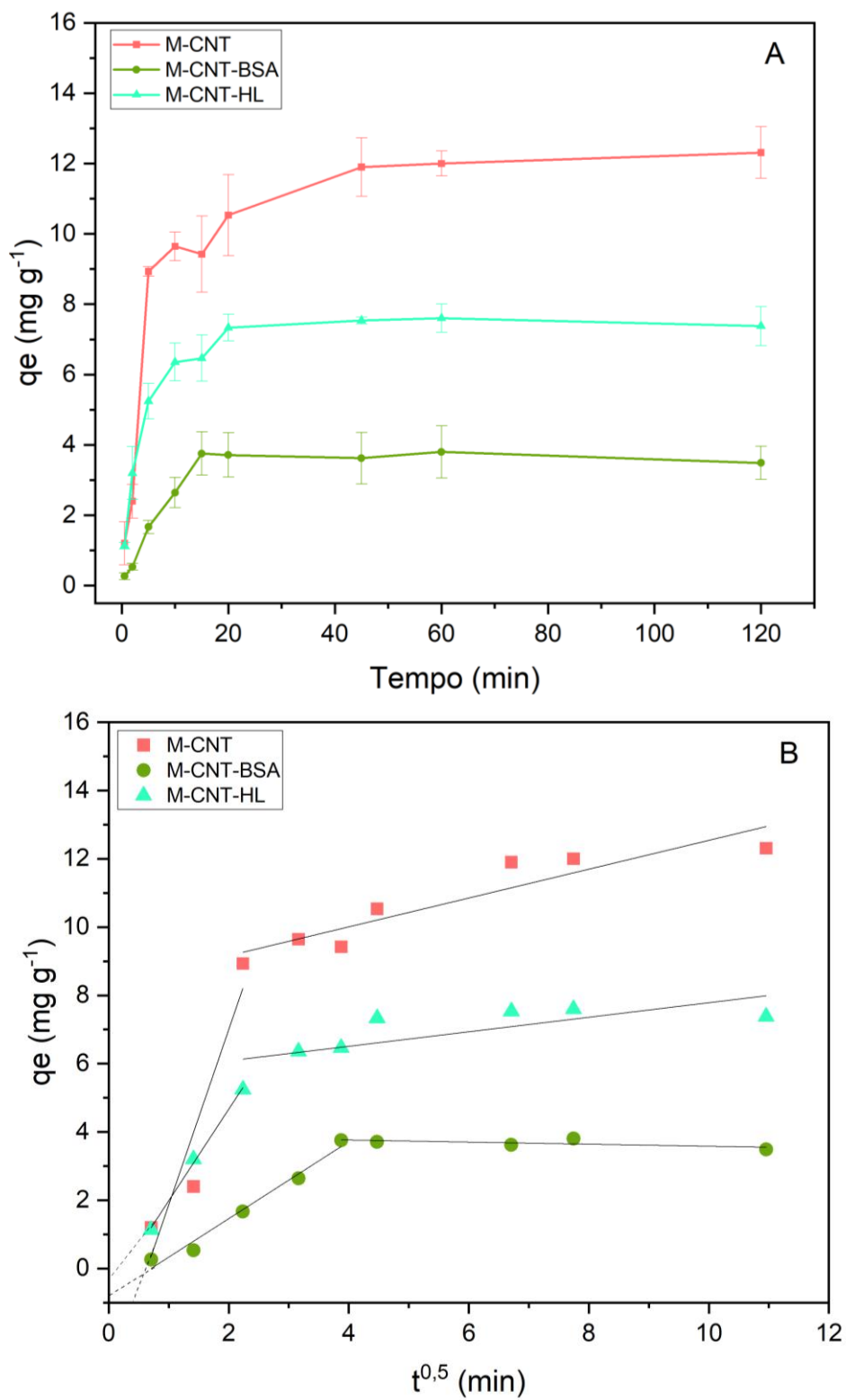
Figura 24 - Curva de calibração utilizada para os testes de cinética de adsorção



Fonte: Autora (2024).

Após a agitação com os materiais, as proteínas remanescentes no sobrenadante foram quantificadas e o que foi calculado para cada um dos tempos analisados. Com esses dados, curvas de cinética puderam ser plotadas (Figura 25A).

Figura 25 - Curvas de cinéticas (A) e de difusão intrapartícula (B) para M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL



Fonte: Autora (2024).

Como é possível observar na Figura 25 A, os tempos de equilíbrio foram de 45, 15 e 20 min, para M-CNTs, M-CNTs-BSA, e M-CNTs-HL, respectivamente. No entanto, se considerarmos o desvio padrão dos resultados (barras de erros), os M-CNTs-HL podem apresentar um início de equilíbrio em aproximadamente 10 min.

Como o esperado, os materiais revestidos com BSA ( $3,8 \text{ mg g}^{-1}$ ) e funcionalizados com os monômeros ( $7,6 \text{ mg g}^{-1}$ ) apresentaram um menor  $q_e$  em relação aos materiais apenas magnéticos ( $12,3 \text{ mg g}^{-1}$ ). Uma maior capacidade extrativa dos M-CNTs-HL em relação aos M-CNTs-BSA, corroboram com os resultados obtidos no teste de exclusão de proteínas. Considerando a massa de HSA ( $0,1 \text{ mg}$ ) que entrou em contato com os nanotubos, a massa dos materiais ( $5 \text{ mg}$ ), e a capacidade extrativa no tempo de equilíbrio, foi possível calcular novamente a porcentagem aproximada de proteínas excluídas: 38; 81; e 62% para M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL, respectivamente. Os dados da cinética mostraram que a HSA continuou sendo adsorvida após o tempo de 10 min (usado nos ensaios de exclusão) até o equilíbrio, o que também é evidenciado nas curvas apresentadas.

O equilíbrio entre HSA e M-CNTs é atingido mais lentamente quando comparado aos outros materiais. A adsorção de proteínas é termodinamicamente favorecida em superfícies hidrofóbicas (Wang *et al.*, 2004), assim como a dos CNTs sem revestimentos. Uma das possibilidades é que ocorra a adsorção em multicamadas, existindo uma flexibilização das pontes dissulfeto das proteínas sorvidas na primeira camada para a interação dessas com as demais proteínas do meio.

Curvas de  $q_e$  em função de  $t^{0,5}$  (Figura 25B) foram plotadas e nelas foram observadas três etapas distintas de adsorção para todos os materiais. A fase 1 (adsorção externa) não está presente (linha pontilhada) e provavelmente ocorre antes dos 0,5 min (primeiro tempo avaliado). A fase 2 iniciou-se em 0,5 min e refere-se à difusão da HSA pela superfície e interior dos materiais; além disso é a etapa mais lenta. Já a 3 fase, refere-se ao equilíbrio e à retenção da HSA nos sítios de adsorção. De forma geral, o coeficiente angular da fase 2 é chamado de constante de difusão intrapartícula (Senthil Kumar; Gayathri, 2009) e valores 5,13; 1,12; e  $2,68 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-0,5}$  foram obtidos para M-CNT; M-CNT-BSA; e M-CNT-HL, respectivamente. Esses resultados sugerem que a etapa limitante da adsorção ocorre em um único estágio atribuído ao processo de adsorção da proteína na superfície dos materiais (Santos *et al.*, 2021).

Por fim, as curvas de  $q_e$  em função do tempo foram ajustadas em quatro modelos não lineares e a Tabela 5 abaixo sumariza os resultados obtidos.

Tabela 5 - Ajustes de modelos para cinéticas de adsorção de albumina sérica humana

Modelo Cinética	Equação	Parâmetro	Valor obtido		
			M-CNT	M-CNT-BSA	M-CNT-HL
Pseudo-primeira ordem	$q = q_e(1 - \exp^{-kt})$	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	11,55259	3,76437	7,27067
		$K_1$ (min <sup>-1</sup> )	0,19068	0,13339	0,25539
		$R^2_{\text{adj}}$	0,92669	0,96147	0,97489
		$F_{\text{error}}$	0,00846	0,02991	0,05036
Pseudo-segunda ordem	$q = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	12,86774	4,18038	7,89677
		$k_2$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0,01904	0,04215	0,04709
		$R^2_{\text{adj}}$	0,93558	0,90334	0,98909
		$F_{\text{error}}$	0,138972	0,05341	0,00458
Ordem fracionária	$q = q_e \{1 - \exp[-(k_{AV} t)^{n_{AV}}]\}$	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	11,77825	3,7	7,47436
		$K_{AV}$ (min <sup>-1</sup> )	0,17525	0,13456	0,23047
		$n_{AV}$	0,87414	1,41971	0,76206
		$R^2_{\text{adj}}$	0,91667	0,97906	0,98912
Elovich	$q = k \ln(nkt)$	$k$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0,44803	1,33054	0,81206
		$n$ (mg g <sup>-1</sup> )	9,25102	2,03135	11,51777
		$R^2_{\text{adj}}$	0,87228	0,80233	0,88206
		$F_{\text{error}}$	$6,89 \times 10^{-8}$	$2,28 \times 10^{-10}$	$2,29 \times 10^{-9}$

Nota:  $q$ : quantidade de analito adsorvido no tempo  $t$ ;  $q_e$ : quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material;  $t$ : tempo de contato;  $k_1$ : constante de velocidade de pseudo-primeira ordem;  $k_2$ : constante de velocidade de pseudo-segunda ordem;  $k_{AV}$ : constante cinética de Avrami;  $n_{AV}$ : reação de ordem fracionária (Avrami) relacionada ao mecanismo de adsorção;  $k$ : constante do modelo de quimissorção (relacionada à extensão da cobertura da superfície de quimissorção);  $n$ : taxa inicial de adsorção do modelo de quimissorção (Elovich). Dados obtidos por meio do *software* OriginPro 2023®.

Fonte: Autora (2024).

Levando em consideração o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que indica o quão bem o modelo se ajustou aos dados experimentais, e o  $F_{\text{error}}$  calculado, que indica a aproximação dos dados obtidos com os esperados; pode-se dizer que os M-CNTs e os M-CNTs-BSA tiveram a adsorção de HSA melhor representada pelo modelo de pseudo-primeira ordem, embora pseudo-segunda ordem e ordem fracionária também tenham apresentado bons ajustes, mas com maiores erros.

Já os M-CNTs-HL tiveram seus resultados melhor ajustados com o modelo de pseudo-segunda ordem. No entanto, dados de cinética obtidos perto do equilíbrio podem

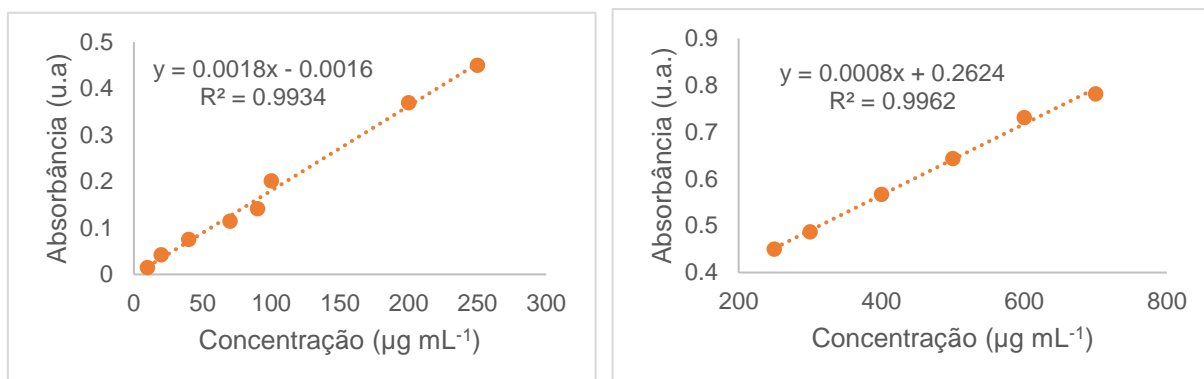
produzir uma tendência de indicar o modelo de pseudo-segunda ordem como o melhor, mesmo essa não sendo a realidade (Wang; Guo, 2020). Assim, o modelo de pseudo-primeira ordem, que também apresentou elevado  $R^2$  e baixo  $F_{\text{error}}$ , pode ser adequado para explicar o comportamento dos M-CNTs-HL, principalmente levando em consideração o parâmetro  $n$  da cinética de ordem fracionária, que tem seu valor mais próximo de 1 (o expoente  $n$  refere-se a um número fracionário relacionado com possíveis alterações do mecanismo de adsorção durante o processo) (Mozaffari Majd *et al.*, 2022).

O modelo de pseudo-primeira ordem indica uma relação diretamente proporcional entre a variação da taxa de adsorção com o tempo e a diferença na concentração de saturação. O modelo de quimissorção (Elovich) apresentou erros baixos para todos os materiais, porém um pior ajuste quando comparado aos outros. Dessa forma, há indícios que mecanismo principal de adsorção seja o físico, mesmo que haja certa possibilidade de ligações químicas entre grupos expostos da camada de BSA ou grupos -OH dos monômeros e grupos expostos da HSA do meio. Como alguns exemplos da literatura, Kopac *et al.* (2018) avaliaram a adsorção de BSA em CNTs de paredes duplas e verificaram um valor positivo para  $\Delta H^\circ$  (9,4 kJ mol<sup>-1</sup>), indicando um processo endotérmico controlado por fisissorção. Lou *et al.* (2016) também encontraram um valor positivo de  $\Delta H^\circ$  (13,53 kJ mol<sup>-1</sup>) para a adsorção de BSA em CNTs-COOH de paredes múltiplas e um valor de  $\Delta S^\circ > 0$ , indicando que a interação de ligação é controlada por mecanismos físicos e favorecida por interações hidrofóbicas (Kopac; Bozgeyik; Flahaut, 2018; Lou *et al.*, 2016).

#### 4.5.2 Isoterma de adsorção

Devido a não linearidade do método de Bradford para faixas muito amplas (Bradford, 1976), optou-se por trabalhar com duas curvas de calibração (10 -250 e 250 - 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o uso de cada uma delas foi dependente da absorbância das amostras analisadas. As curvas apresentaram  $R^2 \geq 0,993$ ,  $\text{DPR}\% \leq 12,37\%$ , e  $\text{E}\%$  entre -12,8 e 19,7%. As curvas de calibração são mostradas na Figura 26 a seguir.

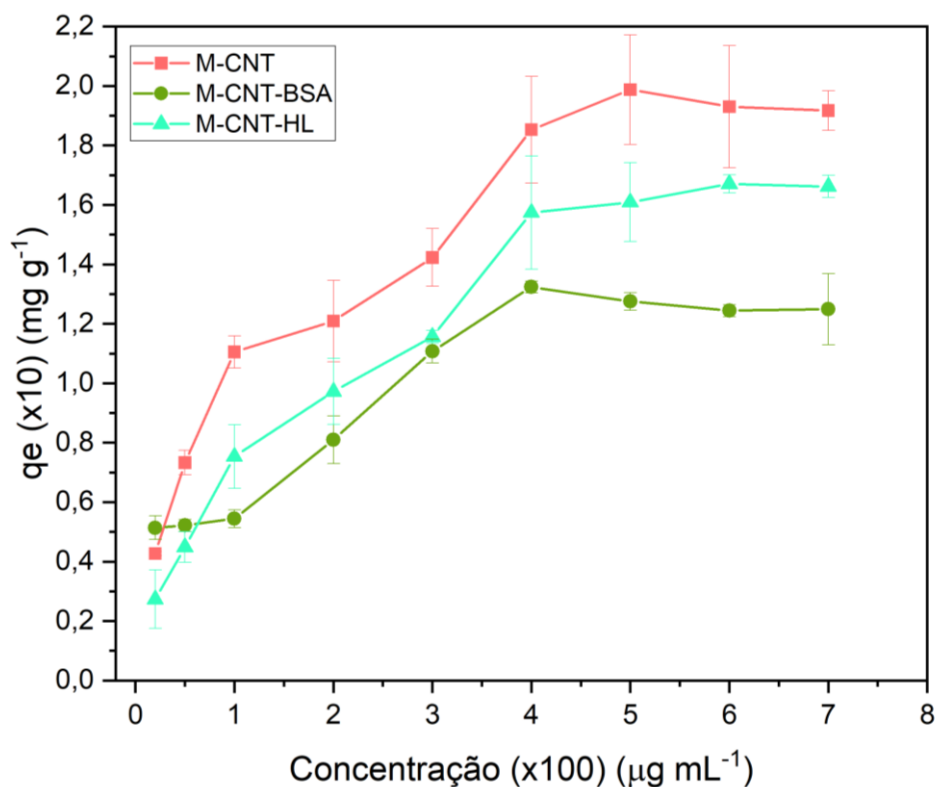
Figura 26 - Curvas de calibração utilizadas para as isotermas de adsorção



Fonte: Autora (2024).

Os tempos de contato entre a HSA e os materiais foram de acordo com os ensaios de cinética e utilizados para garantir que o equilíbrio de adsorção fosse atingido. Assim, 60 min foi utilizado para os M-CNTs, 30 para os M-CNTs-BSA e 45 para os M-CNTs-HL. Após a etapa de agitação, as curvas de isoterma de adsorção ( $q_e$  em função da concentração) foram construídas (Figura 27).

Figura 27 - Curvas de isoterma de adsorção da albumina sérica humana



Fonte: Autora (2024).

De forma geral, o perfil de adsorção de HSA pelos materiais seguiu o que foi obtido nos testes de cinética: M-CNTs com a maior capacidade extrativa e M-CNTs-BSA com a menor. Coeficientes de extração máximos próximos de 19,9; 16,7 e 13,2 mg de HSA por g de material, foram obtidos para M-CNTs, M-CNTs-HL e M-CNTs-BSA, respectivamente. As curvas de cinética foram ajustadas em seis modelos não lineares e os resultados são mostrados na Tabela 6.

O perfil de adsorção dos M-CNTs-HL foi semelhante aos dos M-CNTs, mas com menores  $q_e$ , devido a sua característica de RAM. No início, há uma região de inclinação entre 20 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mostrando que menores variações na concentração de proteínas levam a maiores variações no  $q_e$ . Esse resultado indica que parte das proteínas disponíveis puderam ser mais facilmente adsorvidas nesses materiais, nas concentrações mais baixas. Já para os M-CNTs-BSA, o  $q_e$  praticamente não muda nas primeiras concentrações, indicando maior resistência desse material em adsorver as proteínas presentes no meio. Em 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pode ser observado uma região de inclinação até o equilíbrio para todos os materiais. Assim, pode-se dizer que M-CNTs e M-CNTs-HL seguem um perfil de adsorção do tipo IV; já os M-CNTs-BSA, apresentam o perfil do tipo V. Ambos os tipos são referentes a materiais mesoporosos, assim como observado nos ensaios de BET (Al-Ghouti; Da'ana, 2020).

Tabela 6 - Ajustes de modelos para isotermas de adsorção de albumina sérica humana

Modelo	Equação	Parâmetro	Valor obtido		
			M-CNT	M-CNT-BSA	M-CNT-HL
Langmuir	$q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + b C_e}$	qs (mg g <sup>-1</sup> )	2,03174	1,46282	2,45753
		b (min L <sup>-1</sup> )	2,10699	1,17686	0,3727
		R <sup>2</sup> adj.	0,86863	0,83038	0,9546
		F <sub>error</sub>	0,023067	0,006238	0,00218
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n_F}$	K <sub>F</sub> (mg g <sup>-1</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	1,2084	0,75149	0,68105
		n <sub>F</sub>	3,37786	3,07776	1,91331
		R <sup>2</sup> adj.	0,93388	0,86495	0,9024
		F <sub>error</sub>	0,000265	1,29x10 <sup>-5</sup>	0,00226
Sips	$q_e = \frac{q_s K_s C_e^{1/n_s}}{1 + b C_e^{1/n_s}}$	qs (mg g <sup>-1</sup> )	3,93829	2,55298	1,90928
		K <sub>s</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0,464	0,427	0,510
		n <sub>s</sub>	0,45241	0,51731	1,4462
		R <sup>2</sup> adj.	0,93159	0,85118	0,9533
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_R C_e}{1 + a_R C_e^g}$ onde 0 >g ≥1	K <sub>R</sub> (g L <sup>-1</sup> )	20,47728	37,98318	0,73113
		a <sub>R</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	15,35705	49,3507	0,26896
		g	0,75853	0,68612	1,0
		R <sup>2</sup> adj.	0,92941	0,84255	0,96079
Khan	$q_e = \frac{q_s b_K C_e}{(1 + b_K C_e)^{a_K}}$	F <sub>error</sub>	9,57x10 <sup>-7</sup>	3,34x10 <sup>-6</sup>	0,10195
		qs (mg g <sup>-1</sup> )	0,558960	0,132310	3,16636
		a <sub>K</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	0,75854	0,6857	1,48664
		b <sub>K</sub>	36,62818	276,13682	0,22139
Toth	$q_e = \frac{K_T C_e}{(a_K + C_e)^{1/t}}$	R <sup>2</sup> adj.	0,92941	0,84255	0,95192
		F <sub>error</sub>	1,22x10 <sup>-6</sup>	2,967x10 <sup>-6</sup>	0,00023
		K <sub>T</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	1,33	0,771	6,90
		a <sub>T</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	0,0652	0,0214	9,42
Toth	$q_e = \frac{K_T C_e}{(a_K + C_e)^{1/t}}$	t	1,31814	1,45605	0,67233
		R <sup>2</sup> adj.	0,92941	0,84255	0,95192
		F <sub>error</sub>	9,69x10 <sup>-7</sup>	3,18x10 <sup>-6</sup>	0,09574

Nota:  $q_e$ : quantidade adsorvida no equilíbrio por grama de material;  $q_s$ : capacidade de saturação teórica;  $K_L$ : constante de afinidade de Langmuir;  $C_e$ : concentração do analito no equilíbrio;  $K_F$  e  $n_F$ : constante e expoente do modelo de Freundlich;  $K_s$  e  $n_s$ : constante e expoente do modelo de Sips;  $a_K$  e  $b_K$ : constante e expoente do modelo de Khan;  $K_R$  e  $a_R$ : constante e expoente do modelo Redlich-Peterson;  $K_T$  e  $a_T$ : constantes do modelo de Toth;  $t$ : expoente do modelo de Toth. Dados obtidos por meio do *software* OriginPro 2023<sup>®</sup>.

Fonte: Autora (2024).

Como pode ser visto na tabela acima, tanto M-CNTs quanto M-CNTs-BSA apresentaram  $F_{\text{error}}$  bastante baixos para todos os modelos, mas melhores  $R^2$  foram obtidos com a isoterma de Freundlich. O  $R^2$  em torno de 0,86 obtido para M-CNTs-BSA foi considerado como adequado, por se tratar de sistemas com componentes biológicos (Saghafi

*et al.*, 2022; Urbach Frederik, 2010). O modelo de Freundlich é uma isoterma de dois parâmetros e supõe uma adsorção reversível em superfícies heterogêneas e com a possibilidade de formação de multicamadas (Al-Ghouti; Da'ana, 2020). Para os três materiais, o expoente  $n_F$  foi superior à 1, indicando a heterogeneidade da superfície (Mozaffari Majd *et al.*, 2022) e com a relação  $1/n_F$ , obteve-se valores entre 0 e 1, indicando que o processo de adsorção é favorável (Al-Ghouti; Da'ana, 2020).

Para os M-CNTs-HL, o modelo de Sips apresentou um melhor ajuste, levando em consideração o  $F_{\text{error}}$  e o  $R^2$ . Essa isoterma é uma intermediária entre Langmuir e Freundlich, e o resultado corrobora com o bom ajuste de cinética de ordem fracionária que também foi obtido para os M-CNTs-HL. O fato da isoterma de Sips ter três parâmetros pode ter contribuído para o melhor valor de  $R^2$  (Lima; Adebayo; Machado, 2015); por isso vale a pena avaliar os outros modelos testados. A isoterma de Langmuir (modelo de dois parâmetros) apresentou bons valores para  $R^2$  e  $F_{\text{error}}$ ; esse modelo assume uma superfície homogênea, na qual todos os sítios apresentam uma mesma energia de ativação (Mozaffari Majd *et al.*, 2022). Alguns parâmetros de outros modelos, como o  $g = 1$  da isoterma de Redlich-Peterson e o  $a_K$  próximo de 1 na isoterma de Khan, também aproximam o comportamento dos M-CNTs-HL do modelo de Langmuir. Já o  $0 < t < 1$ , na isoterma de Toth e o  $n_F = 1,9$ ; indicam um comportamento mais próximo da isoterma de Freundlich (Al-Ghouti; Da'ana, 2020; Mozaffari Majd *et al.*, 2022), que também obteve ajustes adequados. Esses resultados corroboram com as características do modelo de Sips, que prevê um comportamento semelhante ao de Langmuir para altas concentrações de analitos e semelhante ao de Freundlich para baixas concentrações (Mozaffari Majd *et al.*, 2022), indicando a heterogeneidade da superfície dos materiais.

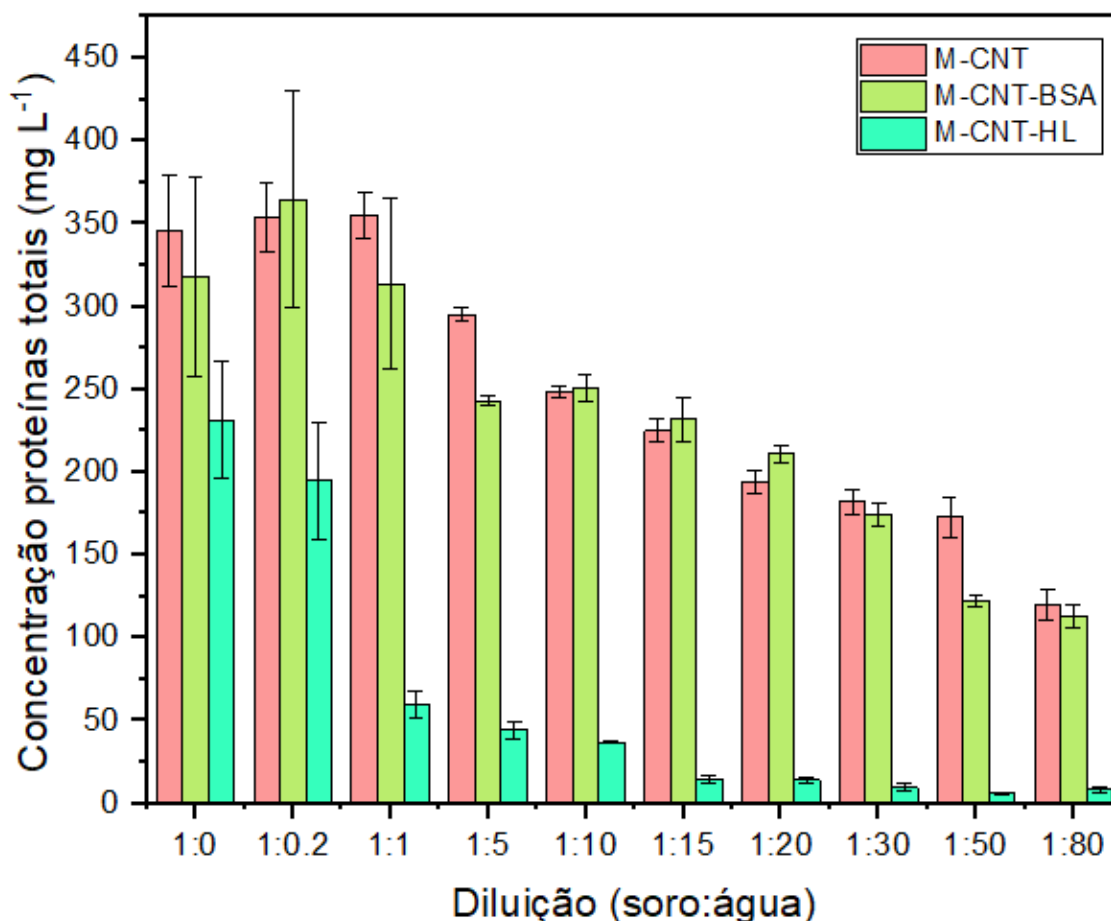
Os resultados de perfil de adsorção e de  $q_e$  máximo obtidos, mostram que os materiais interagem de forma distinta com a principal proteína do sangue humano e, pequenas diferenças em quantidades de proteínas sorvidas podem alterar de forma significativa a formação da camada corona e a interação do material com o ambiente biológico.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO

O soro humano é uma matriz complexa e muito rica em proteínas. Nesse cenário, o estudo da diluição se fez importante para uma melhor observação do comportamento de sorção/dessorção das proteínas pelos diferentes materiais. Ademais, para os estudos de eletroforese, uma alta concentração de proteínas dessorvidas, como poderiam ser obtidas do soro *in natura*, dificultaria a separação e a visualização das bandas no gel de SDS-PAGE.

Para a quantificação das proteínas foi construída uma curva de calibração, empregando padrões de HSA. A curva obteve linearidade ( $R^2 = 0,993$ ), precisão ( $DPR\% \leq 12,37\%$ ) e exatidão adequadas ( $E\%$  entre  $-12,8$  e  $19,7\%$ ). A concentração de proteínas totais obtidas após os processos de sorção/dessorção é mostrada no Gráfico 1 a seguir.

Gráfico 1 – Concentração de proteínas dessorvidas ( $\bar{X}$ ,  $n=3$ ) de cada material após os estudos utilizando soro humano diluído em água ultrapura. As barras de erro indicam o desvio padrão relativo



Fonte: Autora (2024).

A concentração de proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford variou entre 120 e 345 mg L<sup>-1</sup>, para M-CNT, entre 113 e 318 mg L<sup>-1</sup>, para M-CNT-BSA, e entre 38 e 260 mg L<sup>-1</sup>, para M-CNT-HL. O DPR% máximo obtido entre as réplicas foi de 18,8%, indicando adequada reprodutibilidade entre os ensaios. As respostas para as diluições de 1:15, 1:20, 1:30, 1:50, e 1:80 (v:v, soro: água ultrapura) avaliadas para os M-CNT-HL, mesmo apresentado no gráfico, ficaram abaixo do limite de quantificação da curva analítica (15 mg mL<sup>-1</sup>). Essa menor recuperação pode estar relacionada com a presença de ligações entre proteínas e os grupamentos hidrofílicos externos e/ou grupamentos -COOH presentes na superfície dos nanotubos oxidados.

Tendo em vista os resultados obtidos, para os ensaios de otimização das condições de eluição foram escolhidas as diluições de 1:30, para M-CNT e M-CNT-BSA; e 1:0,2 (v:v, soro: água ultrapura) para M-CNT-HL. Essas diluições ofereceram uma resposta em termos de proteínas totais desorvidas próximas para os três materiais (cerca de 200 mg L<sup>-1</sup>), podendo possibilitar melhores comparações.

#### 4.7 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESSORÇÃO DAS PROTEÍNAS SORVIDAS

A desorção é um processo complexo com vários fatores que podem interferir na resposta final. Delineamentos multivariados apresentam vantagens, pois permitem o estudo de mais de um fator simultaneamente, a obtenção de informações a respeito das interações entre os fatores e realização de um menor número de experimentos (Ferreira *et al.*, 2004). Vários delineamentos podem ser utilizados, entre eles estão o DCCR e o BBD. O primeiro pode ser descrito como um delineamento eficiente para estudos com variáveis controladas e baixos erros experimentais (Aslan, 2008); já o segundo estuda as variáveis em três níveis: cúbico baixo, central e cúbico alto e cada experimento cruza o nível extremo de duas ou três variáveis com os valores médios das outras (Beg; Raza, 2021).

Inicialmente o delineamento BBD foi proposto para os três materiais (M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL). Os resultados foram obtidos e os experimentos foram validados com as melhores condições apontadas pelo delineamento. No entanto, para o M-CNT-BSA, as respostas obtidas durante a validação tiveram desvios superiores a 20% em relação às respostas obtidas durante a realização da otimização. Dessa forma, foi proposto a utilização de um novo delineamento: o DCCR. Como o fator tempo de desorção não havia sido

significativo, decidiu-se pela retirada desse fator no planejamento DCCR. Nos tópicos a seguir serão apresentados os resultados da otimização para cada um dos materiais.

#### 4.7.1 Otimização das condições de dessorção para M-CNT

Os dados usados para o planejamento experimental, assim como a recuperação das proteínas totais após a etapa de eluição são mostrados na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Planejamento experimental para o estudo de dessorção de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs

n	pH	Cod	Volume (mL)	cod	Tempo (min)	cod	NaCl (mol L <sup>-1</sup> )	cod	Massa recuperada (µg)
1	6,00	-1	0,50	-1	40,00	0	0,10	0	53,59
2	9,00	1	0,50	-1	40,00	0	0,10	0	160,85
3	6,00	-1	1,90	1	40,00	0	0,10	0	51,87
4	9,00	1	1,90	1	40,00	0	0,10	0	165,24
5	7,50	0	1,20	0	30,00	-1	0,00	-1	39,79
6	7,50	0	1,20	0	50,00	1	0,00	-1	69,82
7	7,50	0	1,20	0	30,00	-1	0,20	1	194,62
8	7,50	0	1,20	0	50,00	1	0,20	1	194,62
9	6,00	-1	1,20	0	40,00	0	0,00	-1	1,89
10	9,00	1	1,20	0	40,00	0	0,00	-1	112,78
11	6,00	-1	1,20	0	40,00	0	0,20	1	128,61
12	9,00	1	1,20	0	40,00	0	0,20	1	234,48
13	7,50	0	0,50	-1	30,00	-1	0,10	0	164,06
14	7,50	0	1,90	1	30,00	-1	0,10	0	174,45
15	7,50	0	0,50	-1	50,00	1	0,10	0	133,15
16	7,50	0	1,90	1	50,00	1	0,10	0	168,30
17	6,00	-1	1,20	0	30,00	-1	0,10	0	80,32
18	9,00	1	1,20	0	30,00	-1	0,10	0	218,05
19	6,00	-1	1,20	0	50,00	1	0,10	0	45,70
20	9,00	1	1,20	0	50,00	1	0,10	0	196,10
21	7,50	0	0,50	-1	40,00	0	0,00	-1	27,05
22	7,50	0	1,90	1	40,00	0	0,00	-1	63,00
23	7,50	0	0,50	-1	40,00	0	0,20	1	156,81
24	7,50	0	1,90	1	40,00	0	0,20	1	211,05
25	7,50	0	1,20	0	40,00	0	0,10	0	169,22
26	7,50	0	1,20	0	40,00	0	0,10	0	154,47
27	7,50	0	1,20	0	40,00	0	0,10	0	158,65
28	7,50	0	1,20	0	40,00	0	0,10	0	181,43

Fonte: Autora (2024).

Com os dados obtidos, o ajuste do modelo geral foi realizado (Tabela 8). Esse modelo leva em consideração os coeficientes de primeiro e segundo grau e todas as interações entre as variáveis.

Tabela 8 - Análise de variância do modelo geral de dessorção de proteínas dos M-CNTs

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	Valor-p
Modelo	14	110353,20	7882,37	18,19	<0,0001***
x <sub>1</sub>	1	43865,22	43865,22	101,23	<0,0001***
x <sub>2</sub>	1	1596,44	1596,44	3,68	0,0771
x <sub>3</sub>	1	337,03	337,03	0,78	0,3938
x <sub>4</sub>	1	54116,3	54116,3	124,89	<0,0001***
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	2879,37	2879,37	6,64	0,0230*
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	1058,05	1058,05	2,44	0,1422
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	371,56	371,56	0,86	0,3713
x <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1	5611,02	5611,02	12,95	0,0032**
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	9,34	9,34	0,02	0,8856
x <sub>1</sub> :x <sub>3</sub>	1	40,15	40,15	0,09	0,7656
x <sub>1</sub> :x <sub>4</sub>	1	6,30	6,30	0,01	0,9058
x <sub>2</sub> :x <sub>3</sub>	1	153,26	153,26	0,35	0,5622
x <sub>2</sub> :x <sub>4</sub>	1	83,72	83,72	0,19	0,6675
x <sub>3</sub> :x <sub>4</sub>	1	225,44	225,44	0,52	0,4835
Resíduos	13	5633,16	433,32		
Falta de ajuste	10	5197,90	519,79	3,58	0,1607
Erro puro	3	435,26	145,09		

Nota: \* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%; \*\*\* Significativo a 0,1%

x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: volume de eluente (mL); x<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); x<sub>4</sub>: concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>); gl.: Graus de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio; F: Estatística F calculada.

Fonte: Autora (2024).

A variável tempo não resultou em diferenças sobre a quantidade de proteínas recuperadas. Além disso, como alguns coeficientes foram não significativos ( $p > 0,05$ ) reajustaram-se vários modelos retirando-se estes termos e recalculando os coeficientes restantes. A análise de variância do modelo final, assim como de suas pressuposições básicas são apresentadas na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9 - Análise de variância do modelo ótimo de dessorção de proteínas dos M-CNTs

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	Valor-p
Modelo	6	109497,96	18249,66	59,07	<0,0001***
x <sub>1</sub>	1	43865,22	43865,22	141,97	<0,0001***
x <sub>2</sub>	1	1596,44	1596,44	5,17	0,0336*
x <sub>4</sub>	1	54116,3	54116,3	175,15	<0,0001***
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	2879,37	2879,37	9,32	0,0060**
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	1058,05	1058,05	3,42	0,0784
x <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1	5982,58	5982,58	19,36	<0,0002***
Resíduos	21	6488,40	308,97		
Falta de ajuste	12	4265,62	355,47	1,44	0,2968
Erro puro	9	2222,78	246,98		

Nota: \* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%; \*\*\* Significativo a 0,1%.

x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: volume de eluente (mL); x<sub>4</sub>: concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>) gl.: Graus de liberdade;

SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio; F: Estatística F calculada.

Fonte: Autora (2024).

Pode-se dizer que o modelo ótimo não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,2968$ ) e nem violações nas pressuposições da análise de regressão ( $p = 0,7994$ ;  $0,3407$  e  $0,8853$ ; para os testes de Shapiro-Wilk, Box-Pierce e Breush-Pegan, respectivamente). Diante disso, obtiveram-se as estimativas dos coeficientes (Tabela 10). O valor obtido a partir do modelo para a estatística F (59,07) foi maior que o F tabelado (2,57), demonstrando sua significância.

O modelo que pode ser representado pela equação 16, é adequado para descrição dos dados e pode ser usado para obtenção dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno para a análise dos efeitos das variáveis dessorção de proteínas a partir dos M-CNT.

Tabela 10 - Estimativas dos coeficientes do modelo de dessorção de proteínas dos M-CNTs, desvio padrão, estatística t e valor-p associados

Parâmetros	Estimativa	DP	t-calc	valor-p
Intercepto	165,92	6,95	23,88	<0,0001***
x <sub>1</sub>	60,46	5,07	11,92	<0,0001***
x <sub>2</sub>	11,53	5,07	2,27	0,0336*
x <sub>4</sub>	67,15	5,07	13,23	<0,0001***
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-28,71	6,95	-4,13	0,0005***
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-18,71	6,95	-2,69	0,0136*
x <sub>4</sub> <sup>2</sup>	-30,57	6,95	-4,4	0,0002***

Nota\* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%; \*\*\* Significativo a 0,1%.

x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: volume de eluente (mL); x<sub>4</sub>: concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>); t-calc.: estatística t calculada.

Fonte: Autora (2024).

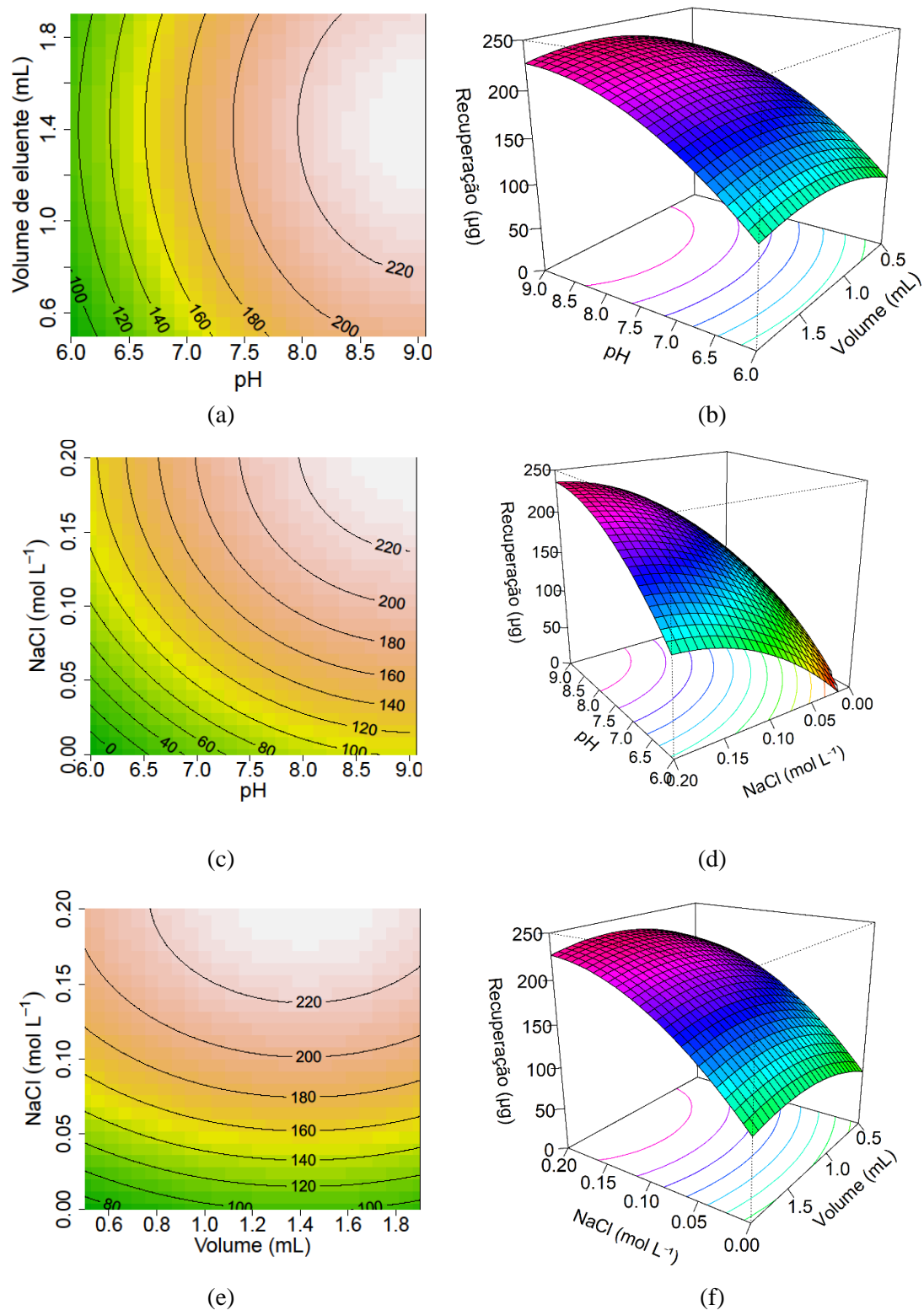
$$M_{rec} = 165,92 + 60,46 x_1 + 11,53 x_2 + 67,15 x_4 - 28,71 x_1^2 - 18,71 x_2^2 - 30,57 x_4^2 \quad (16)$$

Em que  $M_{rec}$  é a massa de proteínas recuperada ( $\mu\text{g}$ ),  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_4$  são respectivamente as variáveis independentes codificadas pH, volume de eluente de dessorção (mL) e concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>).

O modelo apresentou um  $R^2$  de 0,9441, o que indica que ele é capaz de explicar 94,41% da variabilidade dos dados recuperação de proteínas.

Posteriormente foram obtidas as curvas de contorno e as superfícies de resposta para descrever a recuperação de proteínas de acordo com o efeito das variáveis do estudo, sendo os resultados apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da dessorção de proteínas dos M-CNT de acordo com as variáveis estudadas



Fonte: Autora (2024).

Pode-se observar que a recuperação de proteínas foi maior em valores de pH mais alcalinos e em concentrações de NaCl e volume de eluentes intermediários.

Para determinar as melhores condições, inicialmente realizou-se a análise canônica do modelo, a qual permite determinar a natureza do ponto estacionário (mínimo, máximo ou ponto de sela) com base nos autovalores da matriz hessiana do modelo de otimização. Os valores obtidos foram -18,71; -28,71 e -30,57, todos com sinais negativos, indicando um ponto de máximo. Assim, a maior quantidade de proteínas desorvidas poderia ser obtida nas condições de pH 9,08; volume de eluente de 1,42 mL e uma concentração de NaCl de 0,21 mol L<sup>-1</sup>. Como o valor de concentração de NaCl se localizava um pouco fora da região de experimentação, optou-se pela análise *ridge*. Por essa análise foi verificado que a recuperação máxima (235,74 µg) seria obtida com as seguintes condições experimentais: pH 9, volume de eluente de 1,4 mL e uma concentração de NaCl de 0,2 mol L<sup>-1</sup>.

A fim de validar os resultados da otimização da recuperação de proteínas, realizou-se um experimento de desorção (quadruplicata) considerando as condições ótimas obtidas a partir do modelo. A quantidade de proteínas recuperadas nessas condições foi de 213,79 µg, o que demonstra uma exatidão de cerca de 91%, indicando que o modelo é adequado para descrever o efeito das variáveis, na faixa estudada, sobre a recuperação de proteínas adsorvidas nos M-CNT.

#### **4.7.2 Otimização das condições de desorção para M-CNT-BSA**

Os dados do planejamento experimental e as respostas em termos de massa de proteínas recuperadas são apresentados na Tabela 11 abaixo. Os dados obtidos foram utilizados para o ajuste do modelo geral (Tabela 12).

Assim como ocorreu para os M-CNTs, alguns coeficientes foram não significativos e reajustes foram realizados. No entanto, devido a problemas de violações na análise dos resíduos e de falta de ajuste, optou-se por manter todos os coeficientes no modelo.

Tabela 11 - Planejamento experimental para o estudo de dessorção de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs-BSA

n	pH	cod	VOLUME (mL)	cod	NaCl (mol L <sup>-1</sup> )	cod	Massa recuperada (µg)
1	6,10	-1,00	0,50	-1,00	0,05	-1,00	34,47
2	9,10	1,00	0,50	-1,00	0,05	-1,00	70,55
3	6,10	-1,00	1,50	1,00	0,05	-1,00	46,49
4	9,10	1,00	1,50	1,00	0,05	-1,00	86,67
5	6,10	-1,00	0,50	-1,00	0,21	1,00	67,51
6	9,10	1,00	0,50	-1,00	0,21	1,00	76,05
7	6,10	-1,00	1,50	1,00	0,21	1,00	75,00
8	9,10	1,00	1,50	1,00	0,21	1,00	94,89
9	5,08	-1,68	1,00	0,00	0,13	0,00	58,80
10	10,12	1,68	1,00	0,00	0,13	0,00	131,34
11	7,60	0,00	0,16	-1,68	0,13	0,00	12,00
12	7,60	0,00	1,84	1,68	0,13	0,00	102,66
13	7,60	0,00	1,00	0,00	0,00	-1,68	67,00
14	7,60	0,00	1,00	0,00	0,26	1,68	106,46
15	7,60	0,00	1,00	0,00	0,13	0,00	104,48
16	7,60	0,00	1,00	0,00	0,13	0,00	105,71
17	7,60	0,00	1,00	0,00	0,13	0,00	88,09
18	7,60	0,00	1,00	0,00	0,13	0,00	98,35

Fonte: Autora (2024).

Tabela 12 - Análise de variância do modelo geral de dessorção de proteínas dos M-CNTs-BSA

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	Valor-p
Modelo	9	12396,92	1377,44	5,26	0,0143*
x <sub>1</sub>	1	3762,64	3762,64	14,37	0,0053**
x <sub>2</sub>	1	3135,65	3135,65	11,97	0,0086**
x <sub>3</sub>	1	1468,6	1468,60	5,61	0,0454*
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	3,69	3,69	0,01	0,9084
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	3181,19	3181,19	12,15	0,0083**
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	529,07	529,07	2,02	0,1930
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	29,81	29,81	0,11	0,7445
x <sub>1</sub> :x <sub>3</sub>	1	285,86	285,86	1,09	0,3267
x <sub>2</sub> :x <sub>3</sub>	1	0,41	0,41	0,0015	0,9695
Resíduos	8	2094,99	261,87		
Falta de ajuste	5	1900,54	380,11	5,86	0,0881
Erro puro	3	194,45	64,82		

Nota: \* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%; \*\*\* Significativo a 0,1%

x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: volume de eluente (mL); x<sub>3</sub>: concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>); gl.: Graus de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio; F: Estatística F calculada.

Fonte: Autora (2024).

Os resultados apresentados nas tabelas acima mostram que o modelo ótimo não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,881$ ) e nem violações nas pressuposições da análise de regressão (teste de Shapiro-Wilk:  $p = 0,455$ ; Box-Pierce,  $p = 0,5556$ ; Breusch-Pagan,  $p = 0,0768$ ). Diante disso, obtiveram-se as estimativas dos coeficientes do modelo (Tabela 13).

Tabela 13 - Estimativas dos coeficientes do modelo de dessorção de proteínas dos M-CNTs-BSA, desvio padrão, estatística t e valor-p associados

Parâmetros	Estimativa	DP	t-calc	valor-p
Intercepto	99,62	8,08	12,33	<0,0001***
$x_1$	16,60	4,38	3,79	0,0053**
$x_2$	15,15	4,38	3,46	0,0086**
$x_3$	10,37	4,38	2,37	0,0454*
$x_1:x_2$	1,93	5,72	0,34	0,7445
$x_1:x_3$	-5,98	5,72	-1,04	0,3267
$x_2:x_3$	-0,23	5,72	-0,04	0,9695
$x_1^2$	-3,52	4,55	-0,77	0,4615
$x_2^2$	-16,86	4,55	-3,71	0,0060**
$x_3^2$	-6,47	4,55	-1,42	0,1930

Nota: \* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%; \*\*\* Significativo a 0,1%

$x_1$ : pH;  $x_2$ : volume de eluente (mL);  $x_3$ : concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>); t-calc.: estatística t calculada.

Fonte: Autora (2024).

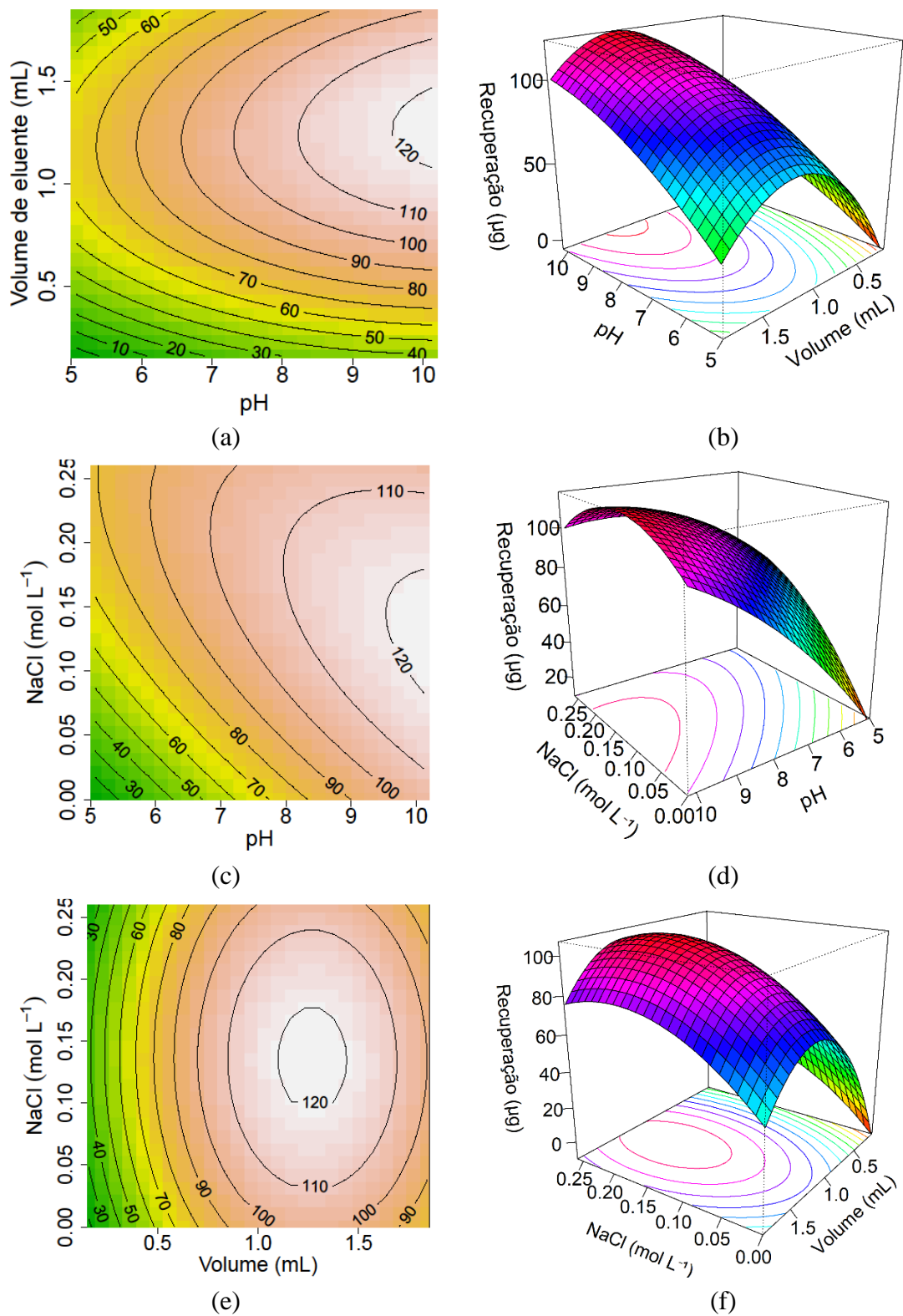
O valor obtido a partir do modelo para a estatística F (5,26) foi maior que o F tabelado (3,39), o que demonstra sua significância. Assim, o modelo pode ser apresentado segundo a equação 17, é adequado para descrição dos dados e pode ser usado para obtenção dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno.

$$M_{rec} = 99,62 + 16,60 x_1 + 15,15 x_2 + 10,37 x_3 + 1,93 x_1:x_2 - 5,98 x_1:x_3 - 0,23 x_2:x_3 - 3,52 x_1^2 - 16,86 x_2^2 - 6,47 x_3^2 \quad (17)$$

Onde,  $M_{rec}$  é a massa de proteínas recuperada ( $\mu\text{g}$ ),  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são respectivamente as variáveis independentes codificadas pH, volume de eluente de dessorção (mL) e concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>).

O modelo apresentou um  $R^2$  de 0,8554, o que indica que ele é capaz de explicar 85,54% da variabilidade dos dados recuperação de proteínas. Posteriormente foram obtidas as curvas de contorno e as superfícies de resposta para descrever a recuperação de proteínas de acordo com o efeito das variáveis do estudo, sendo os resultados apresentados na Figura 29 abaixo.

Figura 29 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da dessorção de proteínas das M-CNT-BSA de acordo com as variáveis estudadas



Fonte: Autora (2024).

A recuperação de proteínas foi maior em valores de pH mais básicos e concentrações de NaCl e volume de eluente de dessorção intermediários. Os autovalores da matriz hessiana do modelo foram -1,61, -8,31 e -16,93, indicando um ponto de máximo. Ainda de acordo com o modelo obtido, a maior quantidade de proteínas dessorvidas poderia ser obtida nas condições de pH 12,2, volume de eluente de 1,31 mL e uma concentração de NaCl de 0,08 mol L<sup>-1</sup>. Como o valor de pH se localiza fora da região de experimentação, também foi necessária a realização da análise *ridge*. Assim, para a recuperação máxima de proteínas (118,04 µg) valores de pH 10, volume de eluente de 1,24 mL e uma concentração de NaCl de 0,13 mol L<sup>-1</sup> foram encontrados. A recuperação de proteínas nas condições de validação foi de 107,23 µg, o que demonstra uma exatidão de cerca de 91%, indicando que o modelo é adequado para descrever o efeito das variáveis, na faixa estudada, sobre a recuperação de proteínas adsorvidas nos M-CNT-BSA.

#### **4.7.3 Otimização das condições de dessorção para M-CNT-HL**

Os dados do planejamento e das respostas para o dessorção das proteínas dos M-CNTs-HL e os dados do ajuste do modelo geral são apresentados nas Tabelas 14 e 15 abaixo.

Tabela 14- Planejamento experimental para o estudo de dessorção de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs-HL

n	pH	cod	Volume (mL)	cod	Tempo (min)	cod	NaCl (mol L <sup>-1</sup> )	cod	Massa Recuperada (µg)
1	6,00	-1	0,50	-1	40,00	0	0,10	0	13,33
2	9,00	1	0,50	-1	40,00	0	0,10	0	10,70
3	6,00	-1	1,90	1	40,00	0	0,10	0	1,47
4	9,00	1	1,90	1	40,00	0	0,10	0	26,54
5	7,50	0	1,20	0	30,00	-1	0,00	-1	7,65
6	7,50	0	1,20	0	50,00	1	0,00	-1	11,80
7	7,50	0	1,20	0	30,00	-1	0,20	1	34,39
8	7,50	0	1,20	0	50,00	1	0,20	1	16,76
9	6,00	-1	1,20	0	40,00	0	0,00	-1	1,86
10	9,00	1	1,20	0	40,00	0	0,00	-1	13,89
11	6,00	-1	1,20	0	40,00	0	0,20	1	16,19
12	9,00	1	1,20	0	40,00	0	0,20	1	12,94
13	7,50	0	0,50	-1	30,00	-1	0,10	0	12,84
14	7,50	0	1,90	1	30,00	-1	0,10	0	18,08
15	7,50	0	0,50	-1	50,00	1	0,10	0	31,51
16	7,50	0	1,90	1	50,00	1	0,10	0	56,35
17	6,00	-1	1,20	0	30,00	-1	0,10	0	15,80
18	9,00	1	1,20	0	30,00	-1	0,10	0	40,84
19	6,00	-1	1,20	0	50,00	1	0,10	0	36,40
20	9,00	1	1,20	0	50,00	1	0,10	0	49,88
21	7,50	0	0,50	-1	40,00	0	0,00	-1	16,85
22	7,50	0	1,90	1	40,00	0	0,00	-1	46,27
23	7,50	0	0,50	-1	40,00	0	0,20	1	36,40
24	7,50	0	1,90	1	40,00	0	0,20	1	27,76
25	7,50	0	1,20	0	40,00	0	0,10	0	40,43
26	7,50	0	1,20	0	40,00	0	0,10	0	40,23
27	7,50	0	1,20	0	40,00	0	0,10	0	56,58

Fonte: Autora (2024).

Tabela 15 - Análise de variância do modelo geral de dessorção de proteínas dos M-CNTs-HL

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	Valor-p
Modelo	14	4252,73	303,77	1,42	0,2758
x <sub>1</sub>	1	405,35	405,35	1,89	0,1943
x <sub>2</sub>	1	250,76	250,76	1,17	0,3008
x <sub>3</sub>	1	445,31	445,31	2,08	0,1752
x <sub>4</sub>	1	177,25	177,25	0,83	0,3812
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	703,59	703,59	3,28	0,0952
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	89,45	89,45	0,42	0,5305
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	3,07	3,07	0,01	0,9067
x <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1	1317,66	1317,66	6,14	0,0290*
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	191,79	191,79	0,89	0,3630
x <sub>1</sub> :x <sub>3</sub>	1	33,37	33,37	0,16	0,7002
x <sub>1</sub> :x <sub>4</sub>	1	58,38	58,38	0,27	0,6113
x <sub>2</sub> :x <sub>3</sub>	1	95,97	95,97	0,45	0,5162
x <sub>2</sub> :x <sub>4</sub>	1	362,15	362,15	1,69	0,2182
x <sub>3</sub> :x <sub>4</sub>	1	118,62	118,62	0,55	0,4714
Resíduos	12	2573,46	214,46		
Falta de ajuste	10	2397,45	239,74	2,72	0,2983
Erro puro	2	176,02	88,01		

Nota: \* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%; \*\*\* Significativo a 0,1%. x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: volume de eluente (mL); x<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); x<sub>4</sub>: concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>); gl.: Graus de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio; F: Estatística F calculada.

Fonte: Autora (2024).

Como sugerido pela tabela acima, nenhuma variável estudada exerceu influência significativa sobre a massa de proteínas recuperadas a partir dos M-CNTs-HL. Além disso, quase todos os coeficientes do modelo foram não significativos ( $p > 0,05$ ). A análise de variância do único modelo significativo, após várias tentativas, é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16 - Análise de variância do modelo ótimo de dessorção de proteínas dos M-CNTs-HL

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	Valor-p
Modelo	5	2713,58	542,72	2,77	0,0449*
x <sub>1</sub>	1	405,35	405,35	2,07	0,1650
x <sub>3</sub>	1	445,31	445,31	2,27	0,1465
x <sub>4</sub>	1	177,25	177,25	0,91	0,3523
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	703,59	703,59	3,59	0,0719
x <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1	982,08	982,08	5,01	0,0361*
Resíduos	21	4112,62	195,84		
Falta de ajuste	13	2948,37	226,8	1,56	0,2689
Erro puro	8	1164,25	145,53		

Nota: \* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%; \*\*\* Significativo a 0,1%.

x<sub>1</sub>: pH; x<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); x<sub>4</sub>: concentração de NaCl (mol L<sup>-1</sup>); gl.: Graus de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio; F: Estatística F calculada.

Fonte: Autora (2024).

Os resultados apresentados na Tabela 16 mostram que mesmo que o modelo tenha apresentado significância ( $p = 0,0449$ ) e ausência de falta de ajuste ( $p = 0,2689$ ), apenas o coeficiente associado à variável  $x_4^2$  foi significativo. O valor obtido a partir do modelo para a estatística F (2,77) foi praticamente igual ao F tabelado (2,68), o que corrobora com o fato de o valor-p estar muito próximo do nível de significância de 5%. Embora conforme os testes de Shapiro-Wilk ( $p = 0,5203$ ), Box-Pierce (0,1509) e Breusch-Pagan ( $p = 0,7594$ ) não tenham ocorrido violações nas pressuposições de regressão, o modelo apresentou um  $R^2$  de 0,3975, o que indica que ele é capaz de explicar apenas 39,75% da variabilidade dos dados recuperação de proteínas.

Como as variáveis não foram significativas, a recuperação de proteínas a partir dos M-CNT-HL praticamente não variou na faixa estudada. Desse modo estabeleceu-se como condições ótimas de dessorção aquelas indicadas pelo modelo: pH 7,8, tempo de 40 min e concentração de NaCl de 0,1 mol L<sup>-1</sup>, por estarem próximas do ponto central do planejamento e conforme resultados de experimentos anteriores. Além disso, como o modelo não apresentou uma capacidade de predição satisfatória, a análise das curvas de contorno e superfícies de resposta não foi realizada.

#### 4.7.4 Resumo da otimização das condições de dessorção para os materiais estudados

A Tabela 17 abaixo resume as condições otimizadas para cada um dos materiais.

Tabela 17 – Valor de pH, volume de eluição, concentração de NaCl e tempo de agitação otimizados para cada um dos nanotubos estudados

Material	pH	Volume do eluente (mL)	[NaCl] (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de agitação (min)
M-CNT	9,0	1,40	0,20	50
M-CNT-BSA	10,0	1,24	0,13	50
M-CNT-HL	7,8	1,20	0,11	40

Fonte: Autora (2024).

As concentrações de NaCl foram escolhidas levando em consideração a concentração desse sal no PBS, que é relatado na literatura como fase de eluição de proteínas para estudos da camada corona (Sakulkhu *et al.*, 2015). Concentrações mais baixas e mais altas também foram avaliadas para o planejamento do delineamento experimental. Já a escolha do pH está relacionado com resultados preliminares obtidos para a eluição de HSA (dados ainda não publicados).

Os resultados mostraram que o uso do NaCl auxiliou a eluição das proteínas sorvidas pelos materiais, principalmente pelo M-CNT. A presença do sal pode levar a um efeito conhecido como *salting in*: ao se adicionar o sal, as cargas provenientes de sua dissociação interagem com as proteínas diminuindo a interação entre elas e levando a uma maior solubilidade no meio aquoso. Possivelmente existem várias interações entre proteínas sorvidas na superfície dos M-CNTs em diferentes camadas, então uma fase com maior força iônica seria melhor para romper algumas dessas interações. Muitas proteínas sorvidas e o fato da ligação favorável a superfícies hidrofóbicas, podem ajudar a explicar a taxa de eluição ser melhorada com concentrações mais altas de NaCl.

A avaliação do pH se faz importante devido ao potencial de ionização das moléculas envolvidas no processo. Na faixa de pH escolhida, a albumina se encontra predominantemente com cargas negativas (pI=4,7). No entanto, trabalhos anteriores demonstraram que a carga superficial negativa líquida da BSA aumenta em função do pH, até valores de pH 10 (Rosa *et al.*, 2019). Os nanomateriais, principalmente M-CNT e M-

CNT-BSA, apresentaram uma melhor dessorção em meios mais alcalinos. Uma vez que há indícios de formação de multicamadas proteicas nesses materiais (principalmente nos M-CNT), uma maior densidade de cargas pode aumentar a repulsão eletrostática e auxiliar no processo de remoção dessas proteínas, especialmente aquelas adsorvidas a outras proteínas. O grau de ionização também se torna particularmente importante para o M-CNT-BSA já que a camada externa de albumina confere um grupamento de proteção em que a adsorção/dessorção é dependente do pH do meio. Por fim, para o M-CNT-HL menos camadas de proteínas adsorvidas são esperadas, dessa forma, o pH 7,8 já pode ter sido suficiente para a obtenção da melhor condição de eluição. Além disso, há evidências de possíveis ligações covalentes entre o M-CNT-HL e HSA (dados obtidos pelos estudos de cinética).

Em relação aos volumes de fase de eluição, valores próximos foram encontrados para os três materiais e eles são referentes a um volume suficiente para promover a dessorção sem, no entanto, causar diluição significativa nas proteínas recuperadas. O tempo de agitação não influenciou de forma significativa a eluição das proteínas.

#### 4.8 ESTUDOS DE ELETROFORESE EM GEL

Na sequência serão apresentados os resultados dos ensaios de eletroforese em gel.

##### 4.8.1 Análises do perfil de proteínas dessorvidas dos nanotubos sintetizados

Inicialmente, para a etapa de extração, as amostras de soro foram diluídas nas proporções 1:30, para M-CNT e M-CNT-BSA e de 1:0,2 soro: água ultrapura v:v, para M-CNT-HL. Essas diluições foram adotadas para que as amostras pudessem ser colocadas no gel de SDS-PAGE com uma concentração similar de proteínas totais recuperadas.

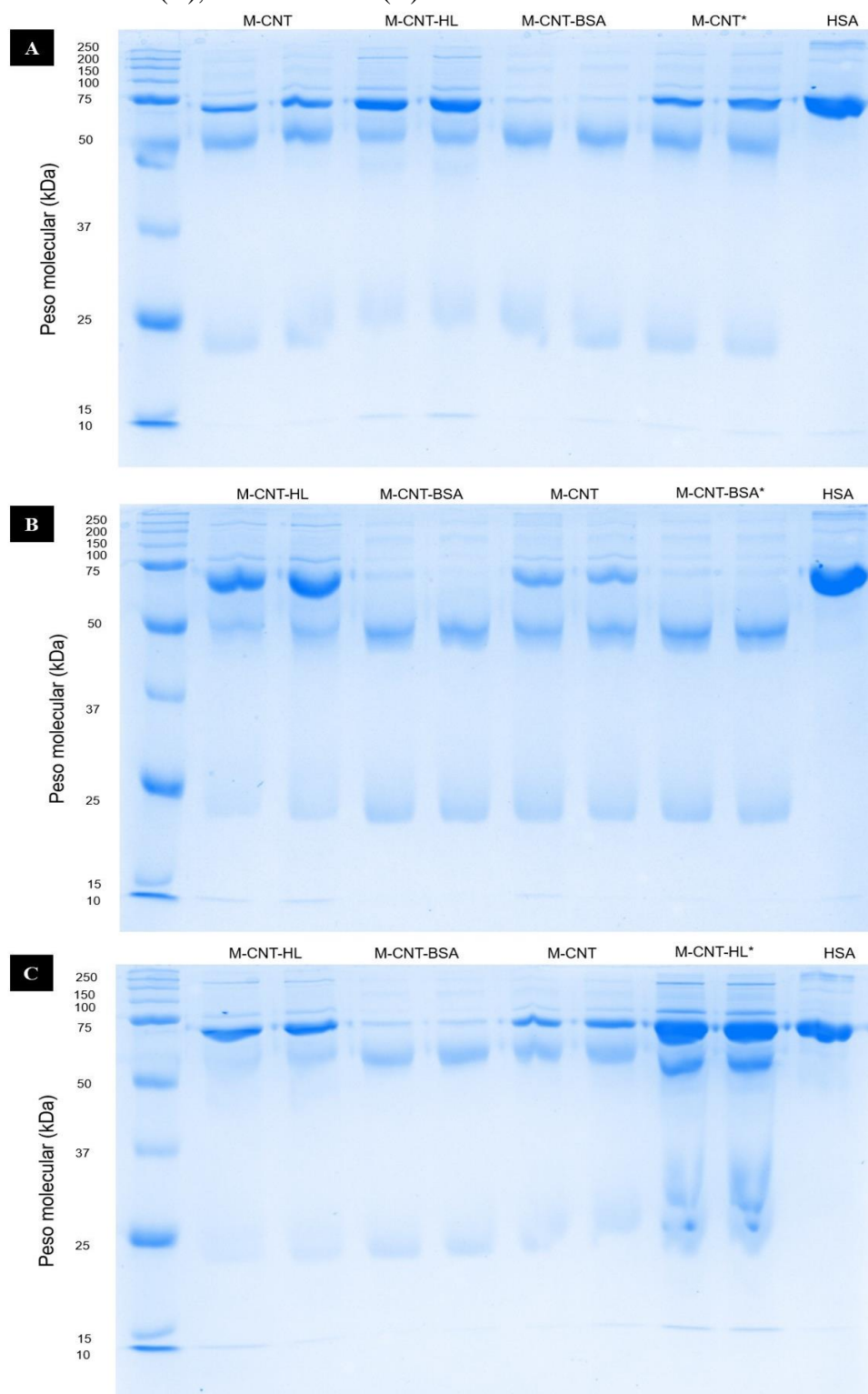
Após o procedimento de extração, as proteínas foram dessorvidas de cada material, tanto com a sua condição de eluição otimizada (Tabela 17) como com a otimizada para os outros dois materiais. Esse procedimento foi realizado para verificar se a composição das fases poderia alterar o perfil geral das proteínas dessorvidas de um mesmo material.

Por sua vez, os ensaios com tempo de extração de 2 h foram realizados para proporcionar a comparação do perfil de proteínas quando tempos diferentes de exposição

eram empregados, pois uma controvérsia que ainda se tem na literatura é se a proteína corona se altera de forma qualitativa e/ou quantitativa ao longo do período de incubação com matrizes proteicas (Corbo *et al.*, 2016). Nesse caso, a eluição de cada material ocorreu apenas com sua condição otimizada.

As fotografias dos géis de SDS-PAGE são mostradas abaixo (Fotografia 2). Como pode ser observado, cada gel apresenta amostras obtidas após a eluição das proteínas sorvidas pelos diferentes materiais e eluidas com uma mesma condição. Foram utilizadas para a etapa de extração os tempos de equilíbrio indicados pelos estudos de cinética de adsorção (45, 15 e 20 min, para M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL, respectivamente), além do tempo de 2 h.

Fotografia 2 - Géis de eletroforese referentes das proteínas desorvidas dos nanotubos. Eluição realizada com a condição otimizada para os M-CNT (A), M-CNT-BSA (B), e M-CNT-HL (C).



Nota: \*Indica agitação por 2 h para a extração de proteínas.  
Fonte: Autora (2024).

Como pode ser observado em todos os géis o primeiro poço da esquerda é ocupado por um marcador padrão comercial que consiste em um *mix* de proteínas com peso molecular (em kDa) definido. Esse padrão é utilizado para verificar a qualidade da análise (separação das proteínas no gel) e para auxiliar a identificação do peso molecular das proteínas encontradas nas amostras. Além disso, também foi colocado um padrão de HSA (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , preparado em tampão fosfato), para auxiliar na identificação dessa proteína nas amostras. A HSA é a proteína sanguínea mais abundante e, assim como o esperado, foi encontrada em todas as amostras, em maior ou menor concentração.

Utilizando com referências o peso molecular e a literatura (Fatahi *et al.*, 2012; Winzen *et al.*, 2015), pode-se indicar que as outras bandas de proteínas vistas nos três géis podem ser referentes a apolipoproteínas (próximas de 46 kDa), transferrina (próximas de 76 kDa), além de cadeias longas e cadeias curtas de imunoglobulinas (próximas de 200 e 25 kDa, respectivamente). Essas proteínas estão dentre as descritas como as mais abundantes do sangue (Javanmard *et al.*, 2014).

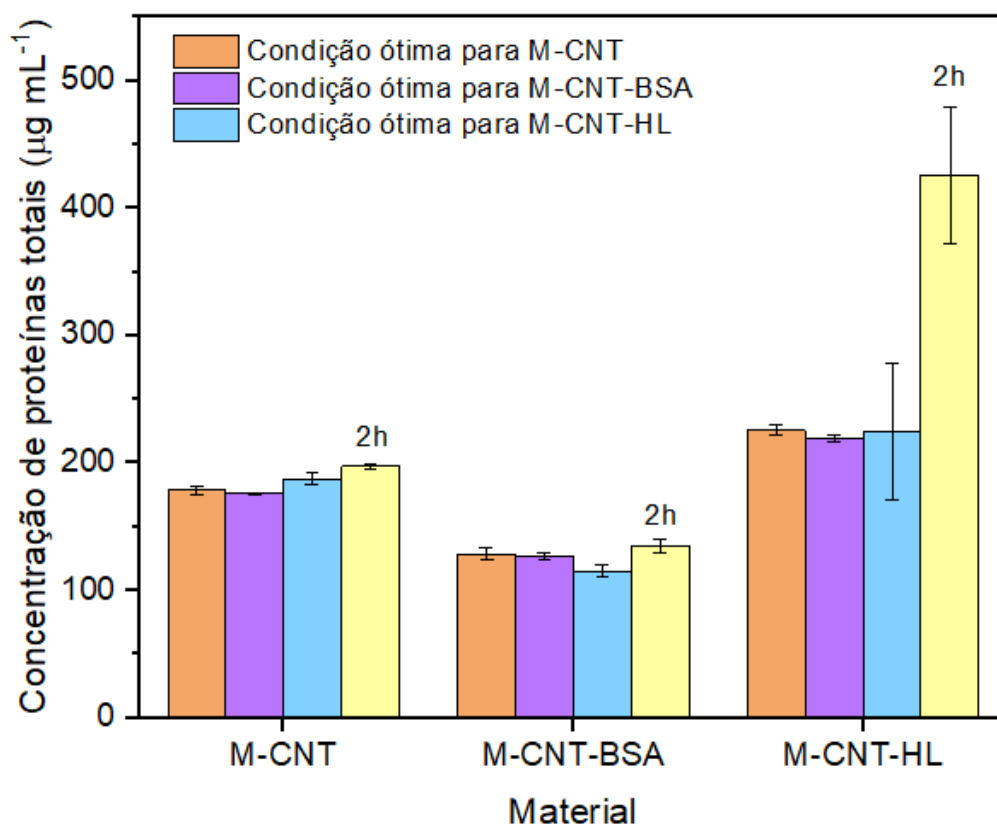
O perfil de proteínas eluidas e observadas por SDS-PAGE foi bastante próximo entre um mesmo material eluido com as três diferentes condições. Indicando, assim, que a composição delas não é diferente o suficiente para favorecer a dessorção de algumas proteínas majoritárias em relação a outras.

Em relação ao tempo de extração, não houve mudanças evidentes do perfil de proteínas para os três materiais, quando comparados o tempo de agitação da cinética com o de 2 h. Em relação à massa de proteínas recuperadas, para M-CNT e M-CNT-BSA não houve mudanças estatísticas significativas; enquanto para M-CNT-HL houve um aumento significativo das massas recuperadas. Esse resultado pode indicar que o tempo da cinética obtido pelo equilíbrio entre HSA presente em solução e M-CNT-HL (ensaios prévios) não representou adequadamente a adsorção de proteínas quando a amostra real foi utilizada, principalmente considerando-se que a diluição do soro para esse material foi bastante menor que para os outros dois (M-CNT e M-CNT-BSA) ou ainda que há alterações quantitativas significativas na proteína corona de acordo com o tempo de agitação para o M-CNT-HL.

Por fim, todas as amostras que foram utilizadas para esses ensaios de eletroforese tiveram sua concentração de proteínas totais quantificada pelo método colorimétrico de Bradford e os resultados são mostrados na Gráfico 2 a seguir. As concentrações de proteínas

eluídas de um mesmo material não apresentaram diferenças estatísticas (Tukey, 95% de confiança) quando eluídas com as três fases diferentes.

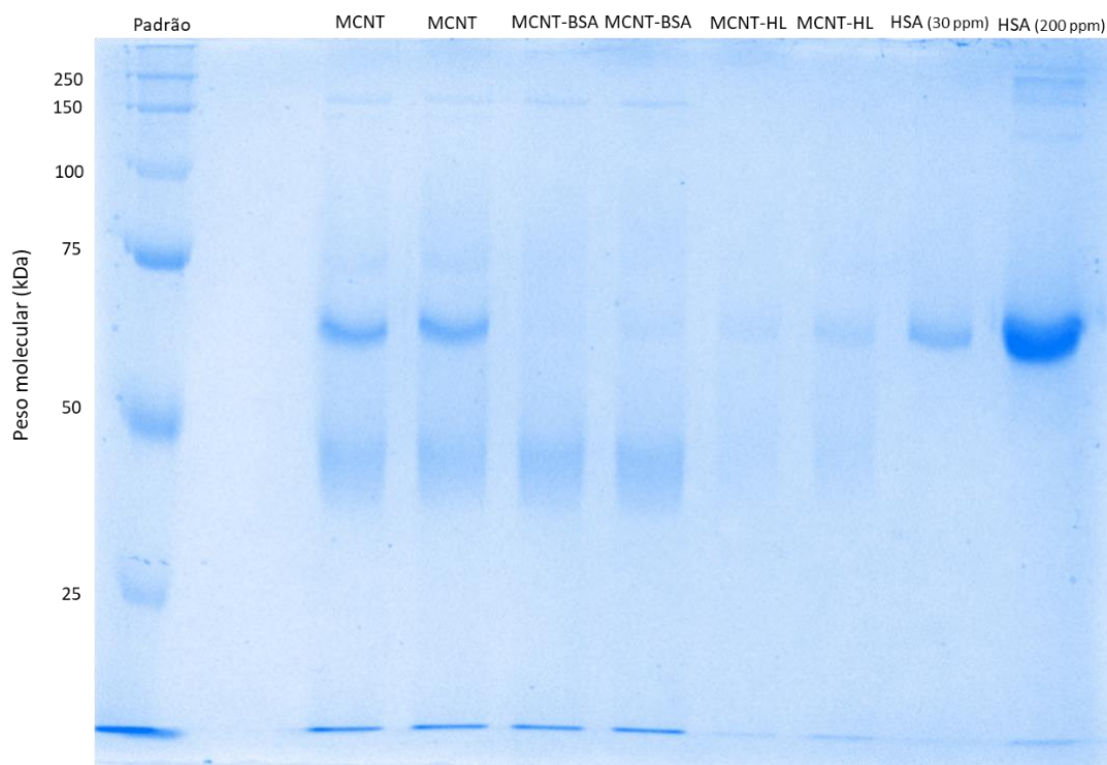
Gráfico 2 - Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. 2 h indica o tempo de extração e, nesse caso, cada material só foi eluído apenas com a sua condição otimizada



Fonte: Autora (2024).

Uma vez que nesses primeiros ensaios foi possível verificar o perfil das proteínas dessorvidas, mas condições experimentais diferentes foram utilizadas para cada um dos materiais, decidiu-se por realizar um novo gel de SDS-PAGE. Contudo, condições padronizadas de análises foram empregadas. Os três nanotubos sintetizados (M-CNT, M-CNT-BSA e M-CNT-HL) foram agitados com amostras de soro diluídas 1:10 (soro: água ultrapura v:v) por 2 h. Na sequência, as proteínas foram eluídas de cada material utilizando sua condição ótima. O gel de eletroforese obtido é mostrado na Fotografia 3 a seguir.

Fotografia 3 - Gel de eletroforese obtido para amostras de soro diluído 1:10 (soro: água) extraídos por 2 h e dessorvidos com condições de eluição otimizadas.



Fonte: Autora (2024).

Mais uma vez foi possível observar a presença do padrão de marcação no primeiro poço da esquerda e padrões de HSA nos últimos dois poços. Nesse caso, optou-se também por um padrão de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pois a concentração de proteínas totais eluídas dos M-CNTs-HL aproximava-se de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; enquanto para os outros materiais variava entre  $150$  e  $225 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nesse gel, as bandas não ficaram muito bem resolvidas, mas é possível inferir sobre a identificação de apolipoproteínas (próximas de  $50 \text{ kDa}$ ), cadeias longas de imunoglobulina (próximas de  $150 \text{ kDa}$ ) e HSA, principalmente para o material M-CNT. Vale ressaltar que há indicações de que a albumina, mesmo sendo proteína mais abundante do sangue, não foi totalmente responsável pela concentração de proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford. A banda de HSA no M-CNT-HL é menos intensa que a banda do padrão de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  e, mesmo com uma identificação de proteínas totais de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ , as bandas de HSA no M-CNT-BSA são pouco intensas.

Com esses ensaios de eletroforese, foi possível perceber mudanças sutis na concentração das proteínas presentes em cada banda observada, mas um perfil semelhante para os três materiais em análise. A SDS-PAGE unidimensional é uma técnica que permite a visualização de proteínas majoritárias. Além disso, diversas proteínas existentes no soro podem apresentar peso molecular muito próximo, ficando retidas de forma semelhante no gel de eletroforese. Finalmente, é possível notar que há diferenças entre as proteínas recuperadas, principalmente se for levado em consideração que a HSA aparece em menor intensidade nos géis para os materiais funcionalizados, mesmo quando a concentração total de proteínas (quantificadas por Bradford) é muito próxima. Dessa forma, há evidências de diferentes proteínas sorvidas em cada um dos materiais. Vale ressaltar que amostras de proteínas recuperadas dos M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL já estão sendo processadas para análises utilizando a espectrometria de massas (no Laboratório de Toxinologia Aplicada – Instituto Butantan).

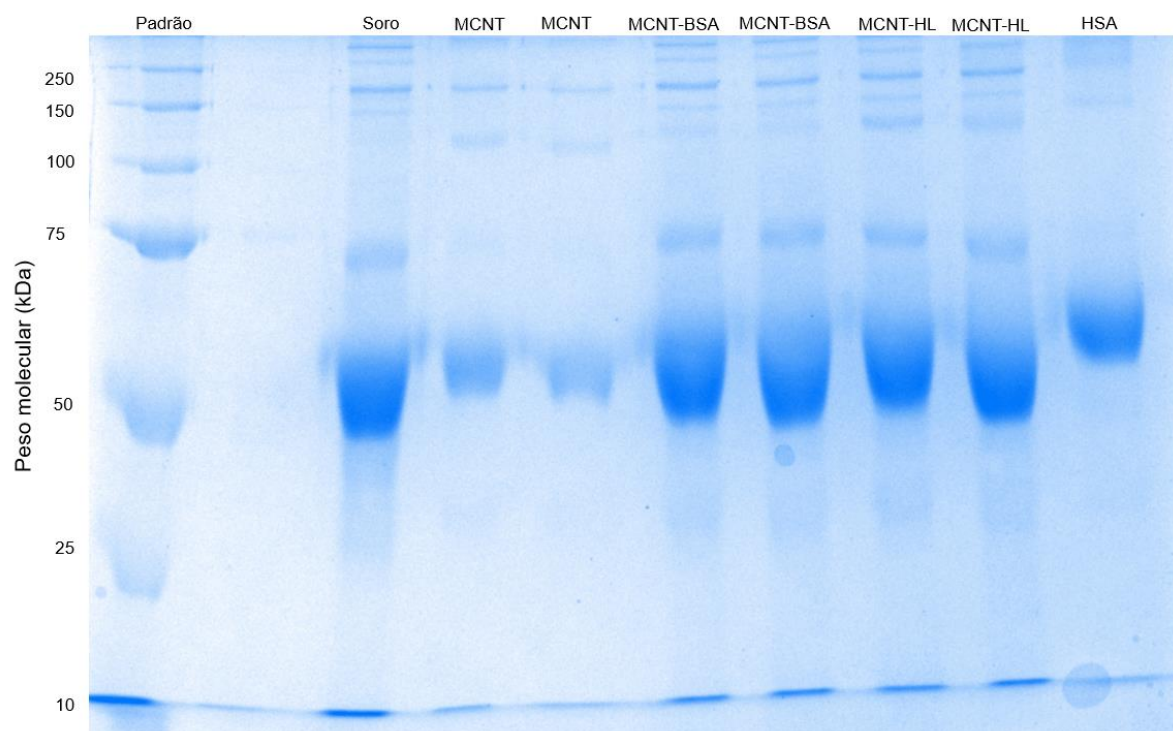
Com um último ensaio, para verificar se a HSA não estava sendo extraída pelos materiais funcionalizados, principalmente pelo M-CNT-BSA; ou se haviam dificuldades de eluição dessas proteínas, um ensaio de eletroforese SDS-PAGE para o sobrenadante de extração (adsorção) também foi realizado e será apresentado no tópico a seguir.

#### **4.8.2 Análises do perfil de proteínas remanescentes nas amostras de soro diluído**

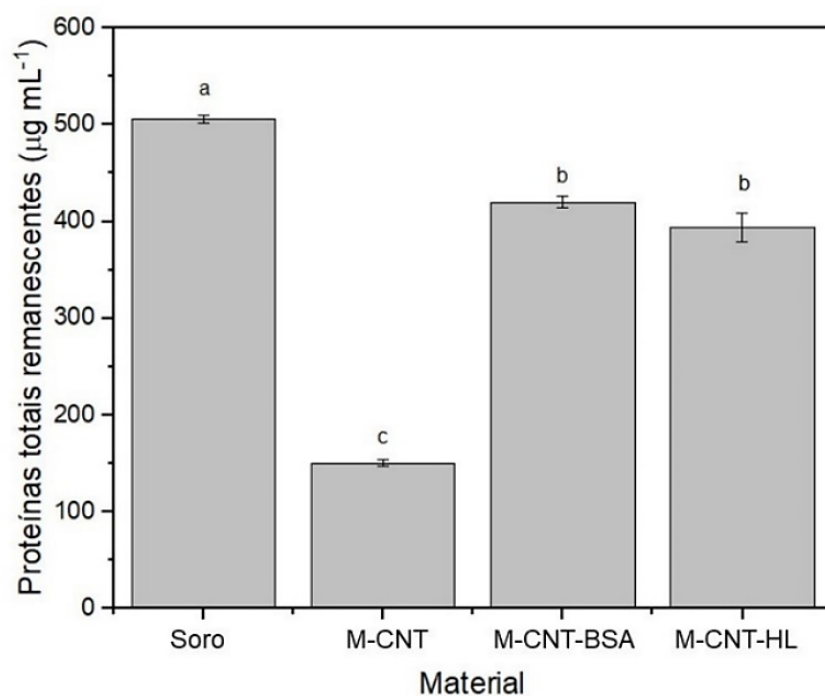
Como mencionado, esse estudo teve como finalidade verificar se a HSA realmente não estava sendo adsorvida pelos nanotubos funcionalizados, e assim permanecendo nas amostras de soro. As amostras de soro coletadas foram diluídas 200 vezes em água ultrapura para que fossem obtidas concentrações proteicas adequadas para os ensaios de eletroforese.

Como pode ser observado na Fotografia 4 abaixo, para os materiais funcionalizados, bandas mais evidentes de HSA, transferrina e apolipoproteínas foram encontradas em relação as amostras provenientes dos M-CNT. Além disso, essa diferença de proteínas totais remanescentes também foi verificada na quantificação utilizando o reagente de Bradford (Gráfico 3). Os resultados indicam que realmente não há a adsorção significativa dessas proteínas majoritárias pelos materiais com modificações de superfícies, e corroboram resultados de ensaios prévios como os de exclusão de proteínas e os de isoterma de adsorção.

Fotografia 4 - Gel de SDS-PAGE com as amostras do sobrenadante de extração



Fonte: Autora (2024).

Gráfico 3 – Concentração de proteínas totais após o procedimento de extração ( $\bar{X}$ ,  $n=3 \pm DP$ )

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam médias estatísticas diferentes (Teste Tukey, 95% de confiança).

Fonte: Autora (2024).

#### 4.9 ANÁLISES DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

Por conter dois resíduos de triptofano (Trp) em sua estrutura, a BSA apresenta propriedades de fluorescência (Li *et al.*, 2013) que podem ser mensuradas e correlacionadas com a concentração de proteínas disponíveis em uma solução. Durante os ensaios de fluorescência, a concentração de BSA foi mantida constante para todas as amostras, enquanto concentrações crescentes dos nanotubos de carbono foram acrescentadas (Tabela 18). Vale mencionar que brancos utilizando apenas a suspensão dos nanotubos também foram lidos, mas não resultaram em bandas de fluorescência. A solução de BSA (6,0 mmol L<sup>-1</sup>) apresentou valores máximos em 350 nm, com intensidade de 836,715.

Tabela 18 - Intensidade de fluorescência obtida para uma solução de BSA após a agitação com diferentes concentrações de nanotubos de carbono

Material	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Intensidade de fluorescência (média ± DP, n=3)
M-CNT	0,1	610,353 ± 45,742
	0,2	429,032 ± 13,522
	0,3	146,973 ± 38,497
	0,5	182,816 ± 21,622
	0,6	89,760 ± 13,155
	0,8	69,583 ± 10,197
M-CNT-BSA	0,1	744,651 ± 19,524
	0,2	675,529 ± 10,722
	0,3	623,536 ± 49,865
	0,5	521,956 ± 14,587
	0,6	471,774 ± 26,572
	0,8	395,609 ± 19,403
	1,2	319,581 ± 15,410
M-CNT-HL	0,1	575,789 ± 14,901
	0,2	404,068 ± 10,559
	0,3	296,306 ± 2,194
	0,5	226,492 ± 18,872
	0,6	170,622 ± 21,726
	0,8	130,910 ± 11,836
	1,0	120,267 ± 14,531

Fonte: Autora (2024).

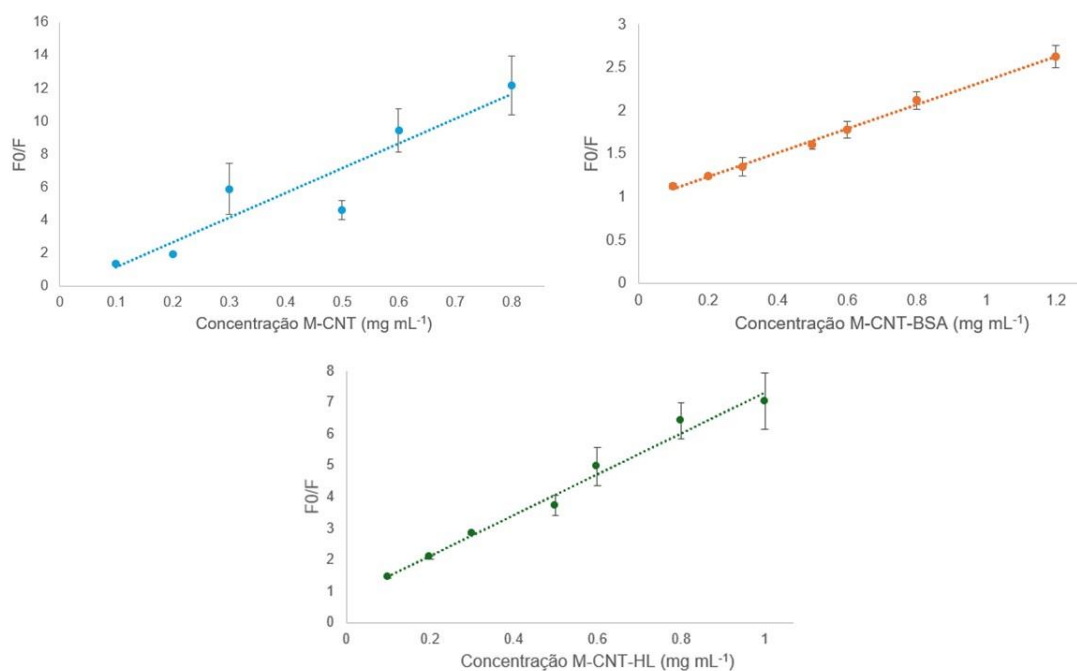
Os M-CNT foram avaliados até  $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$  uma vez que concentrações mais altas não resultaram em bandas de intensidade além do considerado como *background*. Além de haver uma tendência de estabilização da intensidade proporcionada por maiores concentrações.

Como pode ser observado, a intensidade de fluorescência da BSA diminuiu com a adição dos materiais, indicando a ocorrência de interação entre eles com possível mudança conformacional das proteínas após a interação com a superfície dos nanotubos. Li *et al.* (2013), Suvarna *et al.* (2018) e Mandal *et al.* (2013) obtiveram resultados semelhantes ao estudar a interação de BSA com CNTs de paredes simples carboxilados, nanopartículas de quitosana e nanopartículas de carbono, respectivamente (Li *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2013; Suvarna *et al.*, 2018). É importante mencionar também que durante os experimentos não foram observadas mudanças no espectro da BSA mesmo com a adição dos CNTs.

O efeito de supressão da fluorescência (*quenching*) pode ser causado por mecanismos de rearranjo molecular, reação do estado excitado, transferência de energia, formação de um complexo, ou *quenching* por colisão (Hu *et al.*, 2005). Além disso, geralmente os mecanismos podem ser dinâmicos (colisão da molécula no estado excitado com o agente de *quenching*) ou estáticos (formação de um complexo não fluorescente) (Li *et al.*, 2013).

Com os resultados da tabela acima, foi possível plotar curvas de  $F_0/F$  (em que  $F_0$  é a intensidade de fluorescência da solução de BSA sem a presença dos nanotubos e  $F$ , com a presença) em função da concentração dos nanotubos utilizados (Figura 30).

Figura 30 – Curvas de intensidade relativa de fluorescência de BSA em função da concentração dos nanotubos de carbono



Fonte: Autora (2024).

A constante de Stern–Volmer ( $k_{SV}$ ) para cada um dos materiais pode ser obtida a partir das curvas plotadas e é correlacionada com os coeficientes angulares (Li *et al.*, 2013). Dessa forma, valores de 15,018; 1,3953 e 6,5126 mL mg<sup>-1</sup> foram obtidos para M-CNT, M-CNT-BSA, e M-CNT-HL, respectivamente. Esses valores reafirmam a capacidade dos nanomateriais se ligarem à BSA, mas de uma maneira limitada para os nanotubos com funcionalizações de superfícies.

A correlação linear obtida ( $R^2 \geq 0,98$ ) para M-CNT-BSA e M-CNT-HL indica a ocorrência de um único mecanismo de *quenching*, que pode ser dinâmico ou estático (Mandal *et al.*, 2013). Já no caso dos M-CNTs, o perfil obtido pode indicar a coexistência de mecanismos. De acordo com Mandal *et al.* (2013), o tipo de interação pode ser analisado pelo valor da constante de *quenching* ( $k_q$ ), que é calculada segundo a razão entre  $k_{SV}$  (em mol L<sup>-1</sup>) e  $\tau_0$  (tempo de vida médio das biomoléculas:  $5,9 \times 10^{-9}$  s para a BSA). Se o valor for maior que a constante do limite de difusão das biomoléculas ( $2,0 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), provavelmente o mecanismo estático prevalece (Mandal *et al.*, 2013).

No experimento realizado, as constantes foram calculadas em mL mg<sup>-1</sup>. No entanto, pode-se calcular de forma empírica e aproximada a massa molar dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, obtendo-se valores que se aproximam de 1 x 10<sup>9</sup> g mol<sup>-1</sup>. Dessa forma, levando em consideração a massa dos nanotubos usadas nos experimentos e o volume das soluções pôde-se plotar novamente as curvas obtendo-se os seguintes valores para  $k_{vs}$ : 4,0 x 10<sup>15</sup>, 3,0 x 10<sup>14</sup>, e 2,0 x 10<sup>15</sup> M<sup>-1</sup>, para M-CNT, M-CNT-BSA, e M-CNT-HL, respectivamente.

A partir da razão  $k_{vs}/T_0$  foram obtidos valores de  $k_q$  (Tabela 19), todos maiores que a constante de difusão das BSA, indicando que provavelmente ocorre uma interação estática entre essa proteína e os nanomateriais em estudo.

Tabela 19 - Valores das constantes de Stern–Volmer e das constantes de *quenching* para Os diferentes materiais

<b>Material</b>	<b><math>k_{vs}</math> (L mg<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>k_{vs}</math> (M<sup>-1</sup>)*</b>	<b><math>k_q</math> (M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)*</b>
<b>M-CNT</b>	15,0	4,0 x 10 <sup>15</sup>	6,8 x 10 <sup>23</sup>
<b>M-CNT-BSA</b>	1,4	3,0 x 10 <sup>14</sup>	5,1 x 10 <sup>22</sup>
<b>M-CNT-HL</b>	6,5	2,0 x 10 <sup>15</sup>	3,4 x 10 <sup>23</sup>

Nota: \*valores aproximados.

Fonte: Autora (2024).

#### 4.10 ENSAIOS *IN VITRO*

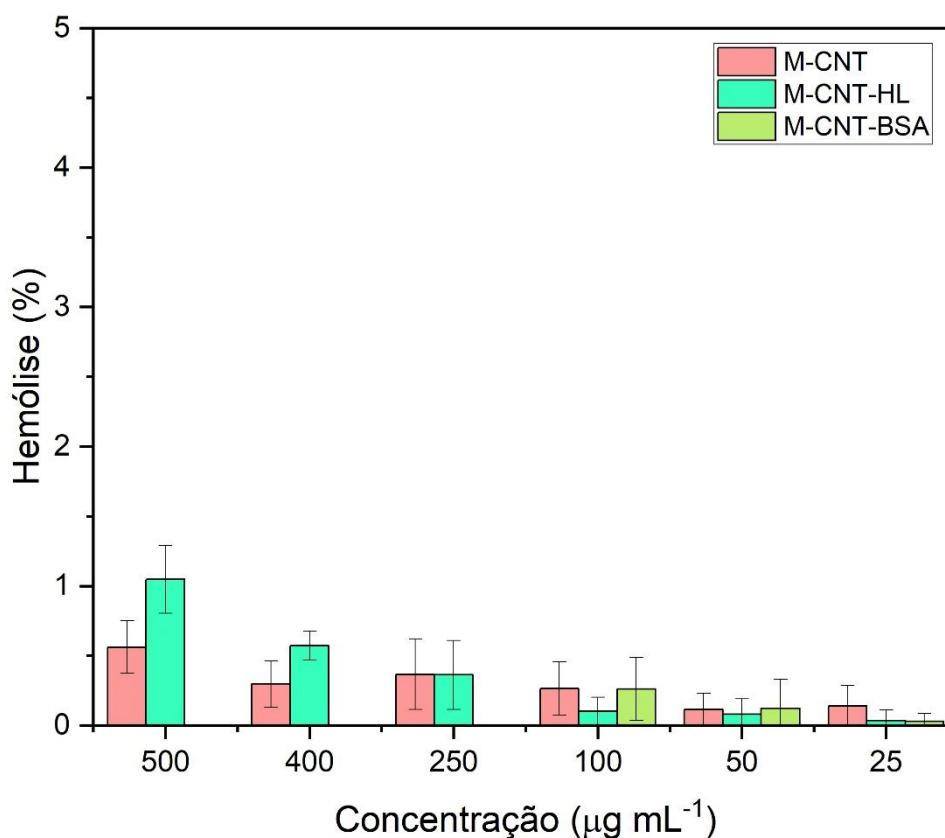
Nos tópicos a seguir serão apresentados os resultados obtidos nos diferentes ensaios *in vitro*.

##### 4.10.1 Hemólise

A hemólise pode ser definida como a ruptura das membranas das hemácias, resultando na liberação de hemoglobina (Sowemimo-Coker, 2002). No caso dos nanotubos avaliados, nenhum sinal de hemólise foi observado (Gráfico 4), uma vez que os níveis hemolíticos foram significativamente menores que os 5% preconizados como referência (Iso; BRITISH STANDARD., 2009). Esses resultados indicam que os materiais, nas

concentrações avaliadas, podem ter aplicações futuras em diversas vias de administração, inclusive a intravenosa.

Gráfico 4 - Resultados para o ensaio de hemólise



Fonte: Autora (2024).

#### 4.10.2 Ensaios de viabilidade e de citotoxicidade

O meio DMEM suplementado foi utilizado para o preparo das suspensões dos nanotubos devido a sua compatibilidade com as células em cultura. Desse modo, outro fator de estresse, além dos nanotubos sintetizados, não foram inferidos às linhagens celulares durante os ensaios de viabilidade e citotoxicidade. Além disso, a suplementação do meio também pode ajudar a mimetizar as condições do ambiente fisiológico, devido à presença de proteínas.

Em relação ao tempo de ultrassom, foram observados desprendimento de ferro e prejuízos à integridade dos M-CNTs em períodos prolongados, embora existam relatos na

literatura sobre uso de ultrassom por 30 minutos (Kam; Dai, 2005). Portanto, optou-se por padronizar o tempo de 3 min para a dispersão dos materiais no meio DMEM. Nesse tempo, não foram identificadas (visualmente) alterações no aspecto dos materiais. Singh *et al.* (2020) utilizaram tempos parecidos para a dispersão de CNTs funcionalizados em PBS (Singh; Mia; Saxena, 2020). Vale ressaltar que a liberação de ferro pôde ser observada principalmente nos M-CNTs e que os grupos de funcionalização (TEOS ou BSA) parecem aumentar a estabilidade das NPs nos materiais.

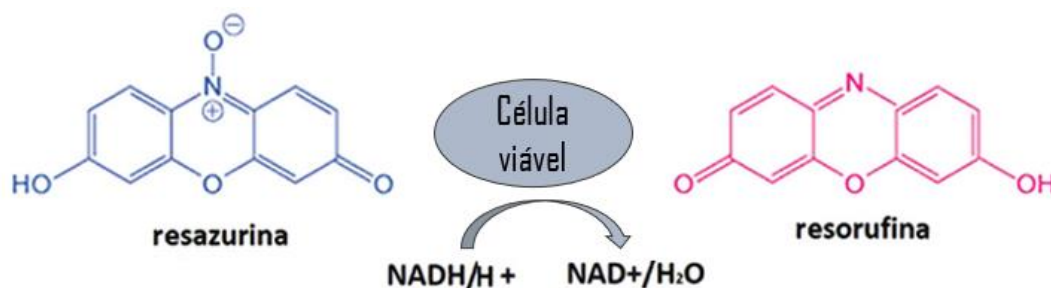
Mesmo com o uso do ultrassom, foi observada sedimentação nos M-CNTs-BSA após algumas horas, possivelmente devido ao aumento da massa das partículas e consequente aumento da densidade. Dessa forma, os ensaios com M-CNTs-BSA foram iniciados com concentrações mais baixas ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Por fim, a literatura relata que os CNTs podem interferir em vários ensaios de citotoxicidade (Belyanskaya *et al.*, 2007; Breznan *et al.*, 2015), sendo recomendado a realização de mais de um ensaio para assegurar confiabilidade dos resultados.

#### 4.10.2.1 Ensaio de viabilidade: Resazurina

O ensaio de resazurina vem sendo comumente utilizado por apresentar algumas vantagens como não toxicidade, simplicidade, sensibilidade e rapidez (Küete; Karaosmanoğlu; Sivas, 2017). Células metabolicamente viáveis são capazes de reduzir o corante resazurina (que não apresenta fluorescência) em resorufina (altamente fluorescente). Essa redução é feita por via mitocondrial e a enzima NADPH desidrogenase é provavelmente a responsável pela reação (Küete; Karaosmanoğlu; Sivas, 2017) (Figura 31). Ao final do ensaio, a fluorescência é proporcional ao número de células viáveis (Breznan *et al.*, 2015).

Figura 31 - Redução do corante não fluorescente resazurina, ao produto fluorescente resorufina



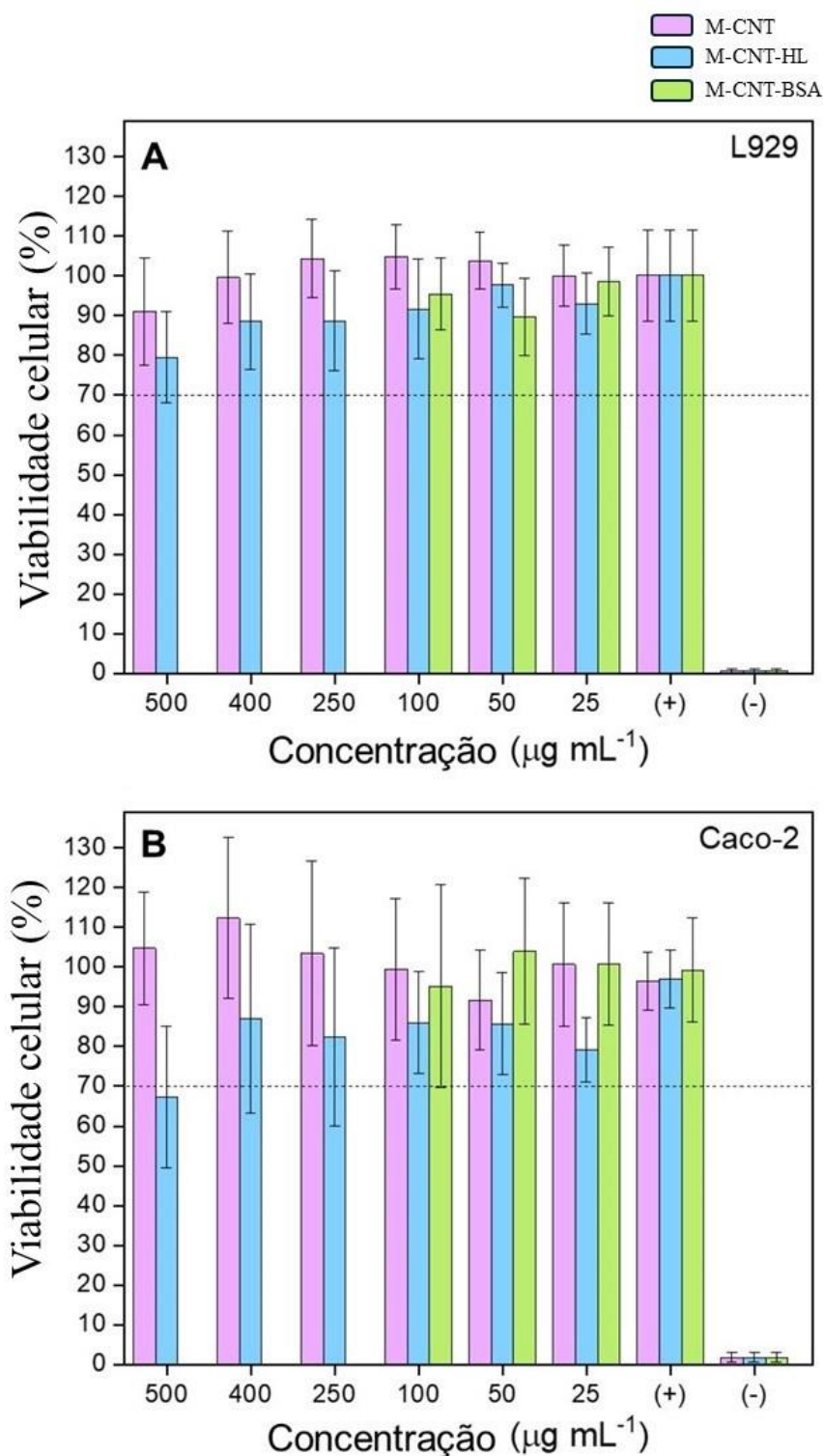
Fonte: Autora (2024).

Os resultados dos testes de viabilidade são apresentados no Gráfico 5 abaixo. A linha pontilhada a 70% marca o limite máximo de toxicidade recomendado de acordo com a ISO10993-5:2009(E).

As células tratadas apenas com meio DMEM foram consideradas como controle positivo e utilizadas como 100% de viabilidade. Como pode ser observado nos gráficos, os nanotubos estudados (M-CNT, M-CNT-BSA, e M-CNT-HL) não apresentaram efeitos citotóxicos para as L929, uma vez que para todas as concentrações avaliadas a viabilidade celular foi superior a 70% (Europe Standards, 2009). Já para as Caco-2, uma linhagem mais sensível, houve evidências de um pequeno efeito citotóxico para a concentração mais alta dos M-CNTs-HL. Hipóteses para tal comportamento envolvem as características do material e sua melhor dispersão aparente no meio.

Desvios padrão mais altos são frequentemente obtidos para materiais biológicos e esse comportamento é visto inclusive no controle positivo de viabilidade. Assim como o esperado, o controle negativo levou a morte de quase todas as células cultivadas.

Gráfico 5 - Resultados de viabilidade para as linhagens celulares L929 (A) e Caco-2 (B)



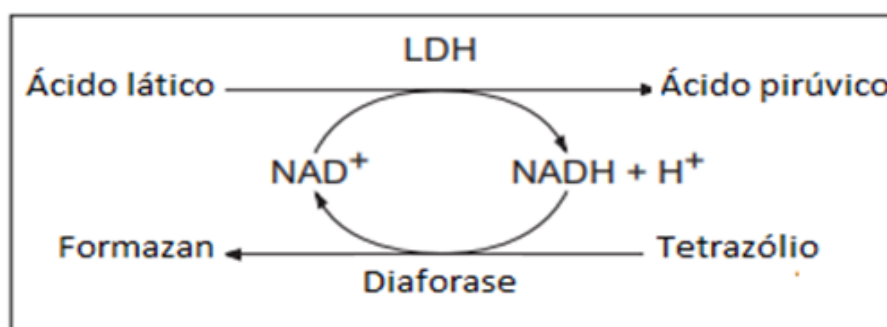
Nota: C+: controle positivo (células tratadas apenas com DMEM); C-: controle negativo (células tratadas com Triton-X 100 (2%)). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: Autora (2024).

#### 4.10.2.2 Ensaio de citotoxicidade: Liberação da lactato desidrogenase

Esse ensaio colorimétrico é geralmente utilizado para avaliar danos em tecidos ou células, pois é considerado simples, rápido e robusto (TAKARA, 2023). O teste é determinado por duas etapas (Figura 32). Na primeira,  $\text{NAD}^+$  é reduzida a  $\text{NADH}/\text{H}^+$ , durante a conversão de lactato a piruvato. Na segunda, ocorre a transferência de  $\text{H}/\text{H}^+$  da  $\text{NADH}/\text{H}^+$  para um sal tetrazólio (amarelo), formando um produto formazan (vermelho) (TAKARA, [s. d.]). Um aumento de danos na membrana resulta em um aumento da liberação de LDH para sobrenadante celular, e, conseqüentemente um aumento no produto formazan.

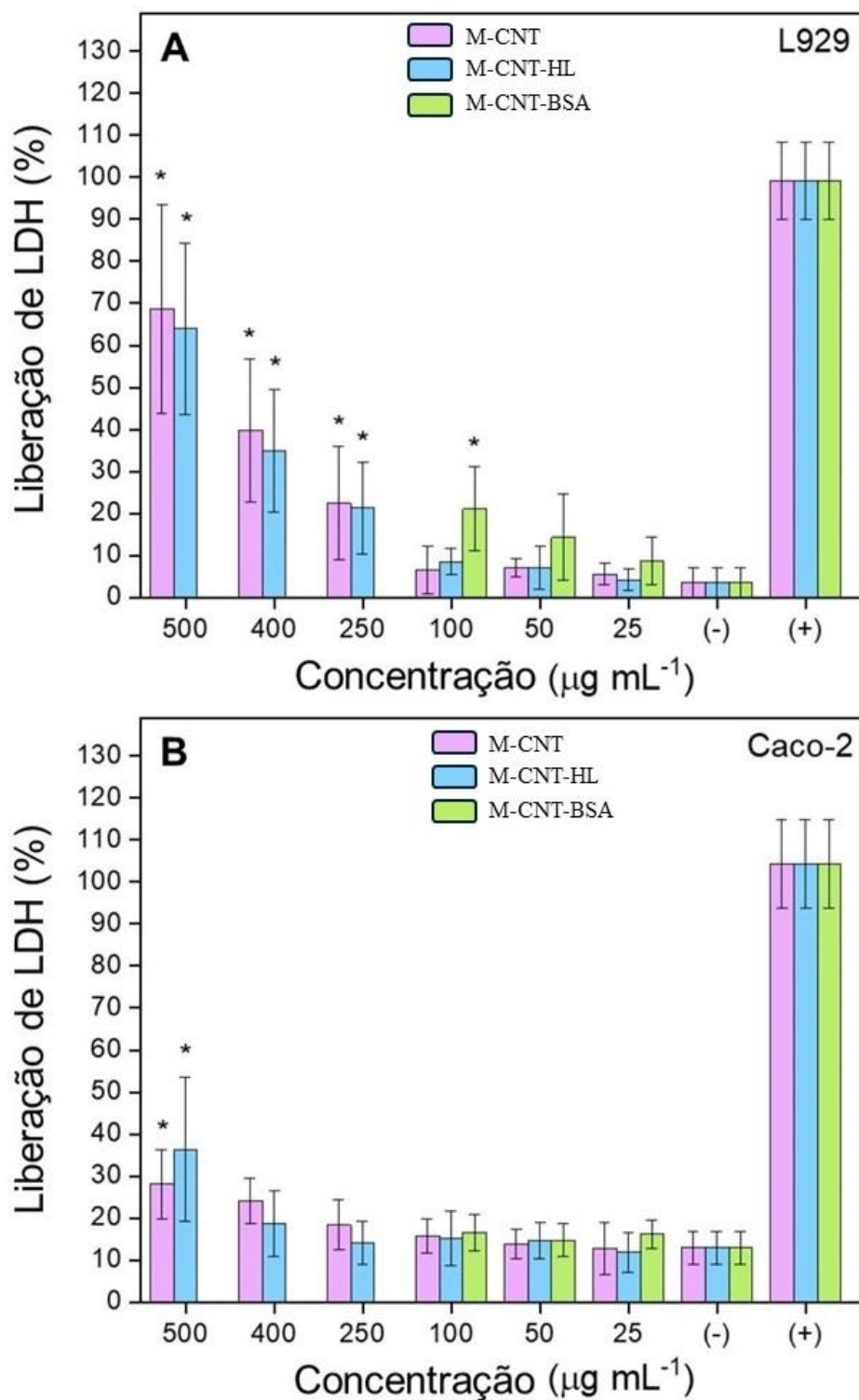
Figura 32 - Mecanismo do ensaio de liberação de LDH



Fonte: adaptado de TAKARA (2023).

Os resultados do ensaio de citotoxicidade estão representados no Gráfico 6 abaixo. As células tratadas com Triton-X 100 foram adotadas como controle positivo de citotoxicidade, sendo consideradas como 100% da liberação de LDH. Já as células tratadas apenas com DMEM foram usadas como controle negativo. Tratamentos que apresentaram liberação de LDH significativamente distintas de seu respectivo controle negativo foram considerados citotóxicos para as linhagens celulares (teste de Scott-Knott, com um nível de 95% de confiança).

Gráfico 6 - Resultados de citotoxicidade para as linhagens celulares L929 (A) e Caco-2 (B)



Nota: C-: controle negativo (células tratadas apenas com DMEM); C+: controle positivo (células tratadas com Triton-X 100 (2%)). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

Fonte: Autora (2024).

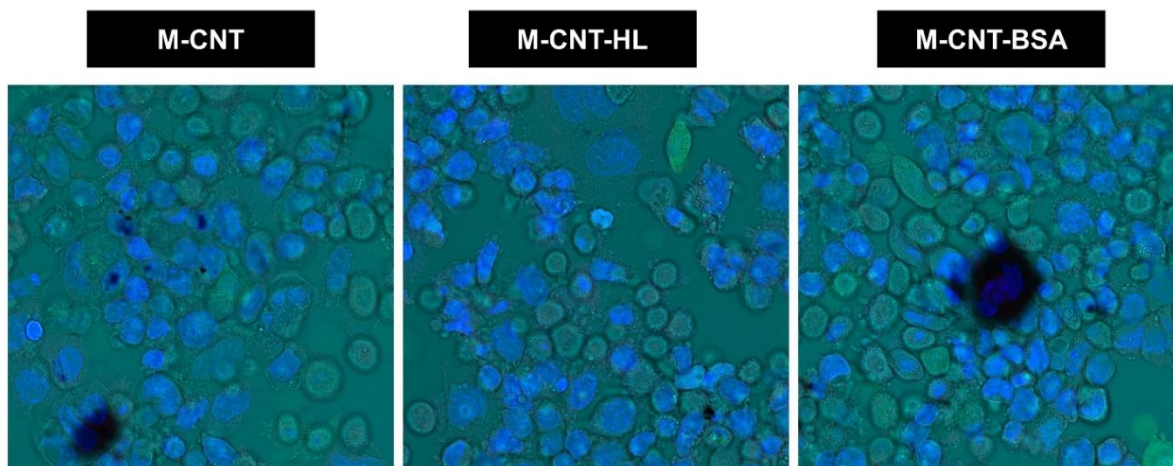
Conforme demonstrado no Gráfico 6A, concentrações  $\geq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram citotóxicas para as células da linhagem L929 quando submetidas a tratamentos com M-CNTs-BSA. Da mesma forma, concentrações  $\geq 250 \mu\text{g mL}^{-1}$  resultaram em toxicidade nos tratamentos com M-CNTs ou M-CNTs-HL. Uma hipótese é que maior potencial citotóxico dos M-CNTs-BSA pode estar relacionado à menor dispersão desses materiais no meio e à presença de agregados, principalmente nas concentrações mais elevadas, resultando em maiores prejuízos às membranas celulares.

Em relação às Caco-2 (Gráfico 6B), apenas concentrações  $\geq 400 \mu\text{g mL}^{-1}$  demonstraram citotoxicidade nos tratamentos com M-CNTs ou M-CNTs-HL, enquanto nenhuma concentração avaliada foi tóxica para os tratamentos com M-CNTs-BSA. Uma hipótese para a maior resistência das Caco-2, refere-se ao fato dessas células se arranjam em monocamadas, com uma grande capacidade de junção intracelulares (Ye *et al.*, 2017). Assim, os nanotubos, principalmente os aglomerados, apresentam maiores dificuldades para causar danos às membranas plasmáticas.

É importante mencionar que os agregados dos materiais puderam ser observados através dos canais de transmitância do microscópio confocal (Leica®). A Fotografia 5 abaixo foi adquirida juntamente com os experimentos de estresse oxidativo e mostra claramente aglomerados dos nanotubos juntos às Caco-2. Esses aglomerados podem causar danos às membranas celulares. No entanto, na concentração avaliada ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) parecem permitir o crescimento das células em suas superfícies, servido como suportes. Na literatura já são reportados estudos do uso de CNTs como suportes para a reconstituição de tecidos (Nikbakht *et al.*, 2019; Zadehnajar *et al.*, 2020) e a funcionalização com as partículas magnéticas, grupos hidrofílicos e/ou albumina não parecem trazer prejuízos, a princípio, para essa propriedade.

Ainda pela análise das imagens, foi possível observar o número de aglomerados presentes nas células tratadas com cada um dos materiais. Em 10 imagens, foi possível contar 121 aglomerados para os M-CNTs; 30, para os M-CNTs-HL; e 121 para os M-CNTs-BSA. Essa é uma análise qualitativa preliminar, mas corrobora com os indícios que o M-CNTs-HL apresenta uma melhor dispersibilidade no meio estudado.

Fotografia 5 – Imagens de microscopia confocal (canal de transmitância) mostrando a presença de aglomerados dos nanotubos de carbono magnéticos sintetizados com as células Caco-2



Fonte: Autora (2024).

Levando em consideração os ensaios de viabilidade e citotoxicidade, as concentrações mais altas dos M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL podem causar lesões nas membranas, mas não levar necessariamente à morte das células, como foi visto no ensaio de resazurina. Os CNTs podem interagir com as células devido a seu formato similar a nanoagulhas, com possibilidades não só de permeação, mas também de lesões às membranas (dependendo do tamanho do material, do estado de agregação e das células com as quais eles interagem). Nas concentrações avaliadas, não houve diferenças significativas de citocompatibilidade entre os três materiais, principalmente nos resultados para Caco-2.

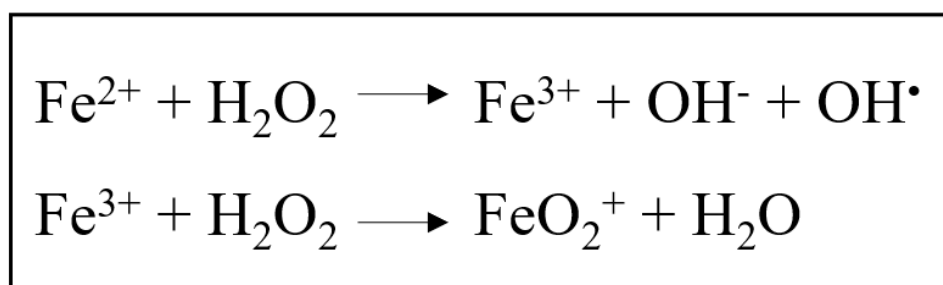
#### 4.10.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

O termo ROS é usado para englobar várias espécies, que podem ser ou não radicalares, entre elas: ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical perhidroxila ( $HOO^{\bullet}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), radical alcóxila ( $RO^{\bullet}$ ), radical peróxila ( $ROO^{\bullet}$ ), radical ânion carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), e ozônio ( $O_3$ ) (Gomes; Fernandes; Lima, 2005). Essas espécies são formadas constantemente durante o metabolismo respiratório e, para lidar com essa situação, os organismos apresentam mecanismos de defesas antioxidantes. Quando em quantidades excessivas, as ROSS

promovem acúmulo de prejuízos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios (Kirtonia; Sethi; Garg, 2020).

Nos experimentos realizados, o peróxido de hidrogênio foi utilizado para induzir a geração de ROS no controle positivo de estresse oxidativo. O peróxido é capaz de reagir com os grupos heme (Fe(II)Hb e Fe(III)Hb) presente nas hemoglobinas, produzindo metemoglobina e radical hidroxil, através da reação Fenton (Figura 33) (Meng *et al.*, 2020).

Figura 33 - Reação de Fenton para a geração de ROS a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



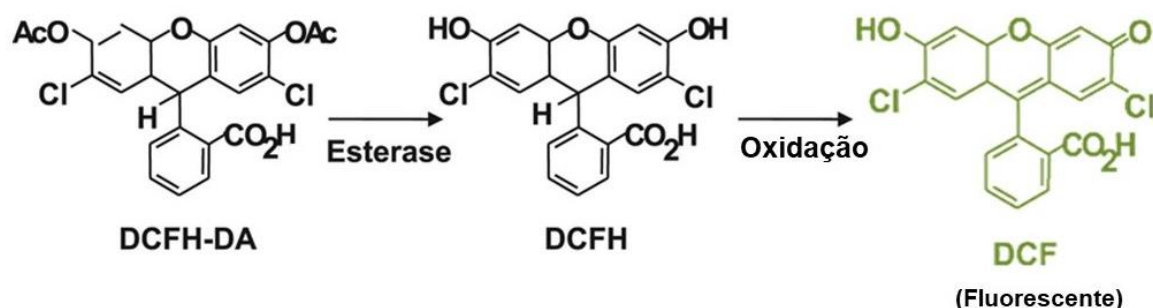
Fonte: Autora (2024).

#### 4.10.3.1 Microscopia confocal de varredura a laser

Os marcadores de fluorescência são necessários para observar as estruturas celulares no microscópio confocal de varredura a laser. O corante *CellMask* é formado por moléculas anfifílicas, contendo uma porção lipofílica para a entrada na membrana celular e um corante hidrofílico negativamente carregado, para a ancoragem da sonda (Molecular probes, 2007). Já *Hoeschet* é um corante permeável que cora o DNA, preferencialmente em regiões contendo adenina-timina, e emite fluorescência em comprimentos de onda 460-490 nm (Thermo Scientific, 2006).

A sonda DCFH-DA é utilizada em estudos com células devido a sua habilidade de se difundir através da membrana. Em ambiente celular, a DCFH-DA é hidrolisada enzimaticamente a DCFH, por esterases nucleares (Gomes; Fernandes; Lima, 2005) e, na sequência, o composto é reduzido a DCF pela ação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 34). Essa etapa de redução também pode ocorrer na presença de Fe<sup>2+</sup>, tendo evidências que, nesse caso, as espécies HO• são responsáveis pela oxidação (Walrand *et al.*, 2003). Dessa forma, a fluorescência do DCF pode ser correlacionada com a geração das espécies H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HO•.

Figura 34 - Formação de produto fluorescente a partir da sonda DCFH-DA.

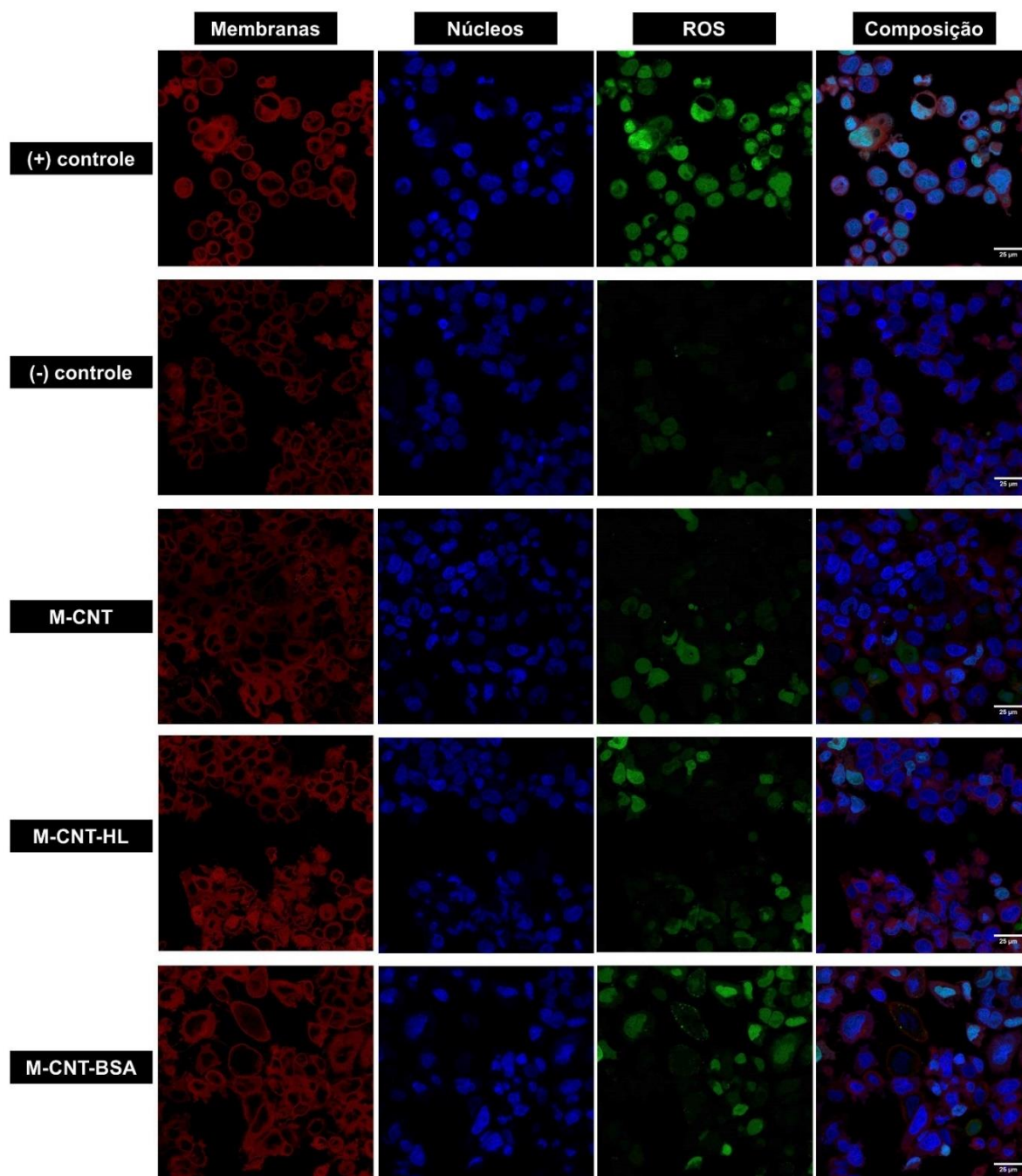


Nota: DCFH-DA: 2,7 diacetato de diclorodihidrofluoresceína, DCFH: 2,7 diclorodihidrofluoresceína, DCF: 2,7 diclorofluoresceína.

Fonte: adaptado de: Gomes; Fernandes; Lima, 2005.

As imagens de microscopia confocal (Fotografia 6) mostram que há uma diferença na intensidade de fluorescência da DCFH-DA entre os diferentes tratamentos (controles e suspensão dos nanotubos). A fluorescência mais intensa é observada no controle positivo para a geração de ROS (células tratadas com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). No entanto, também é possível observar a presença de ROS nas células tratadas com os nanotubos sintetizados e até mesmo no controle negativo, uma vez que as ROS são normalmente formadas na cadeia respiratória das células (ZHAO, RU-ZHOU *et al.*, 2019).

Fotografia 6 - Exemplo de imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células tratadas como controles e células expostas aos materiais



Nota: Controle (+): células tratadas com peróxido de hidrogênio 30%; Controle (-): células tratadas apenas com DMEM completo. As imagens foram tratadas utilizando o *software* Fiji®. Escala 25 µm.

Fonte: Autora (2024).

Ainda utilizando as imagens da microscopia confocal ( $n \geq 8$ , para cada amostra) foram estimadas, utilizando o *software* Fiji®, a intensidade de fluorescência dos núcleos

corados com *Hoechst* e da sonda DCFH-DA. Os dados obtidos (Tabela 20) estão de acordo com os resultados da imagem acima: há uma predominância de ROS nas células utilizadas como controle positivo, e as células tratadas com os nanotubos sintetizados ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram uma concentração de ROS próxima a do controle negativo.

A intensidade da sonda foi dividida pela intensidade dos núcleos para levar em consideração a população de células em cada imagem. Os altos desvios padrão são observados por se tratar de imagens de locais distintos de um mesmo poço de amostra (algumas regiões apresentavam maior intensidade de ROS que outras), além de cada imagem apresentar um número diferente de células.

Tabela 20 - Intensidade relativa da sonda marcadora de espécies reativas de oxigênio (ROS) para as amostras avaliadas

Amostras	Intensidade (média $\pm$ DP, $n \geq 10$ imagens)		
	ROS	Núcleos	ROS/núcleos
Controle (+)	$3,2707 \pm 1,5967$	$19,6301 \pm 5,8586$	$0,1710 \pm 0,0722$
Controle (-)	$1,1372 \pm 0,9219$	$21,1500 \pm 4,4002$	$0,0534 \pm 0,0382$
M-CNT	$1,2254 \pm 0,5088$	$17,0236 \pm 3,9908$	$0,0754 \pm 0,0386$
M-CNT-HL	$1,2945 \pm 0,6404$	$24,9664 \pm 4,0155$	$0,0530 \pm 0,0267$
M-CNT-BSA	$1,7693 \pm 0,8049$	$21,3726 \pm 4,9464$	$0,0851 \pm 0,0370$

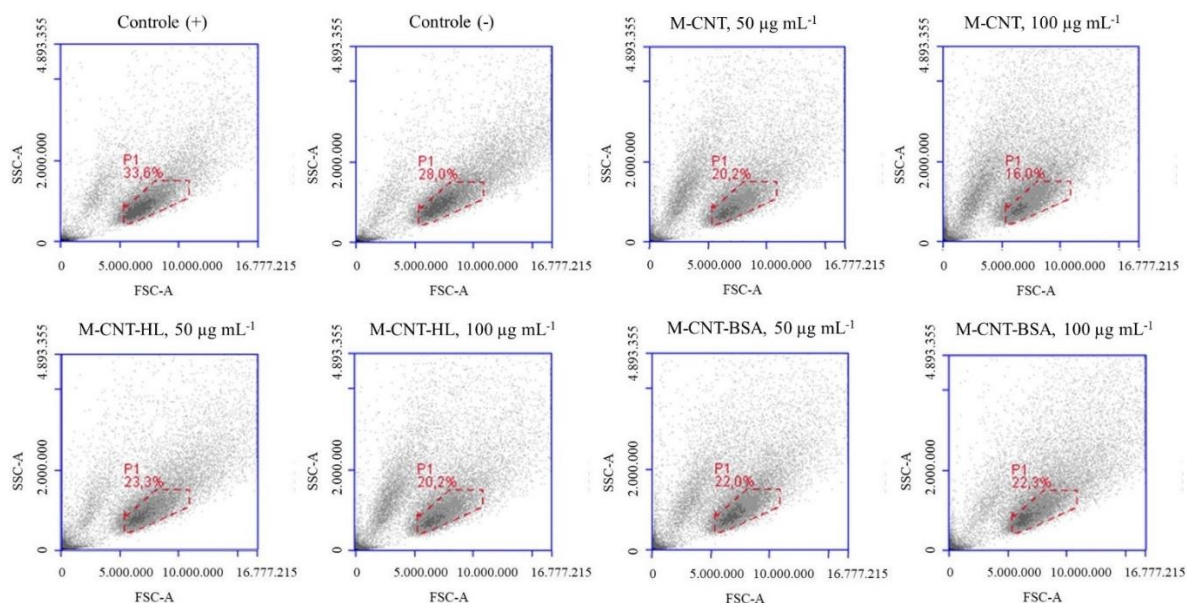
. Fonte: Autora (2024).

#### 4.10.3.2 Citometria de fluxo

O iodeto de propídeo e o *trypan blue* são corantes que não conseguem atravessar uma membrana citoplasmática saudável (Hussain *et al.*, 2019), por isso são usados para excluir células não viáveis em diferentes tipos de ensaios. Na citometria de fluxo, a luz dispersada pelas células é medida por dois detectores ópticos: um de dispersão direta (FSC) e um de dispersão lateral (SSC). A intensidade no detector FSC é proveniente da difração da luz pela célula, sendo proporcional ao seu diâmetro. Já a intensidade no SSC refere-se à luz refratada ou refletida na interface entre o laser e as estruturas intracelulares. Dessa forma, enquanto o FSC discrimina as células pelo tamanho, o SSC fornece informações sobre a complexidade interna (por exemplo, a granulidade) de uma célula (AAT Bioquest, 2020). A Fotografia

7 abaixo demonstra o perfil das células durante a realização do ensaio de citometria de fluxo. No gráfico cada ponto visto refere-se a uma célula independente.

Fotografia 7 - Imagens de citometria de fluxo para o ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio

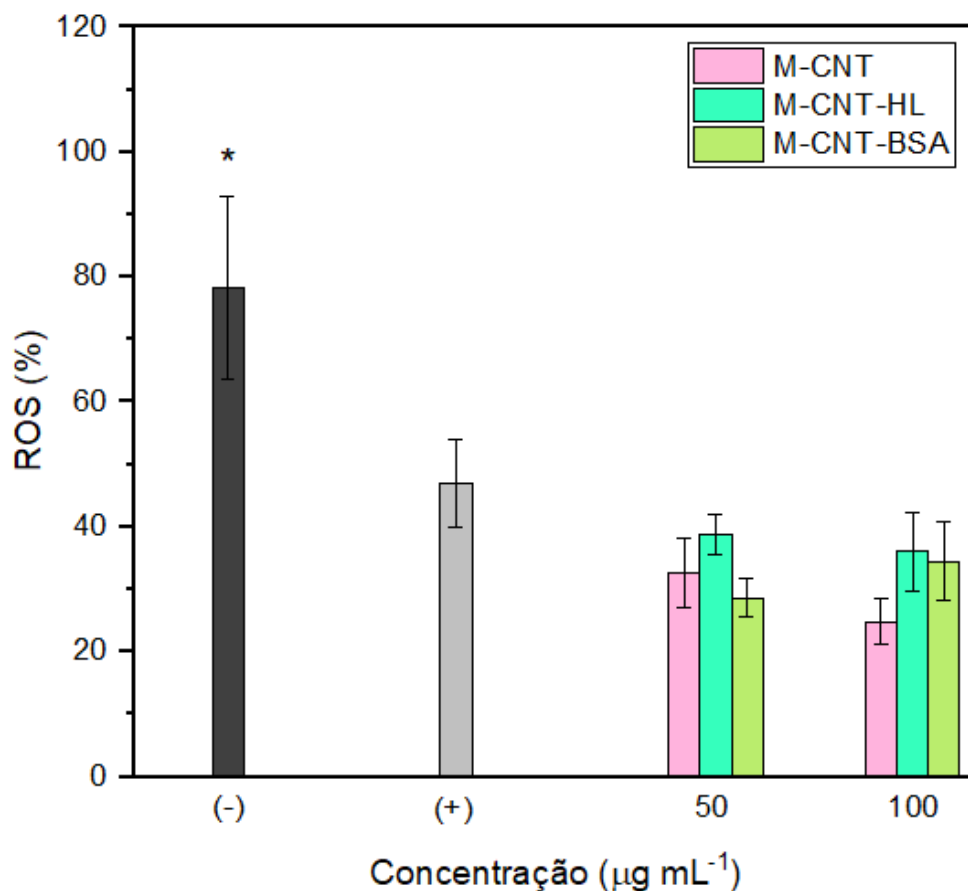


Nota: A área pontilhada indica a região da população de células selecionada para o ensaio e o valor de P1 é a quantidade (em percentual) das células que estão nessa região frente todas as células lidas. As imagens foram adquiridas através do *software* BD Accuri®. Controle (+) células tratadas com água oxigenada e controle (-) células tratadas apenas com meio de cultivo.

Fonte: Autora (2024).

A área escolhida para as análises representa a região com a maior população de células viáveis na amostra do controle negativo para a geração de ROS. Essa região foi mantida para as análises das outras amostras e devia conter, no mínimo, 10 mil eventos. Na parte inferior do gráfico (próximo a origem 0,0) é possível observar as células não viáveis (muito pequenas) e fragmentos celulares. As células com elevada granulosidade (parte direita do gráfico, eixo FSC) também são células que apresentam danos e, portanto, não são adequadas para os ensaios. A partir dos dados de intensidade de fluorescência obtidos foi possível comparar as diferentes amostras, utilizando o controle positivo como 100% de geração de ROS (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Comparação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) para as células controle e as células tratadas com os nanotubos de carbono sintetizados



Nota: C+: controle positivo para a geração de ROS (células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); C-: controle negativo para a geração de ROS (células tratadas com meio DMEM). Os valores em número (50 e 100) referem-se à concentração dos nanotubos, em µg mL<sup>-1</sup>. Os valores são representados em média (n=3) ± desvio padrão. \* denota diferença estatística (p<0,05) em relação aos outros tratamentos.

Fonte: Autora (2024).

Os valores da intensidade de fluorescência das células expostas às concentrações dos materiais sintetizados (50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>) não foram estatisticamente diferentes (teste de Scott-Knott, a um nível de 95% de confiança) do controle negativo (células tratadas apenas com DMEM). Assim, a quantificação da intensidade das ROS pela técnica de citometria de fluxo corrobora com os resultados obtidos na microscopia confocal de varredura a laser, indicando que os materiais, em concentrações abaixo de 100 µg mL<sup>-1</sup>, não levam a um aumento de estresse oxidativo nas Caco-2.

Vale ressaltar que inicialmente concentrações mais altas de M-CNTs e M-CNTs-HL (500 µg mL<sup>-1</sup>) foram avaliadas. No entanto, não foi possível obter 10 mil eventos na região

de interesse, indicando que havia grande morte celular com essas concentrações. Esse resultado já havia sido predito pelos ensaios de citotoxicidade.

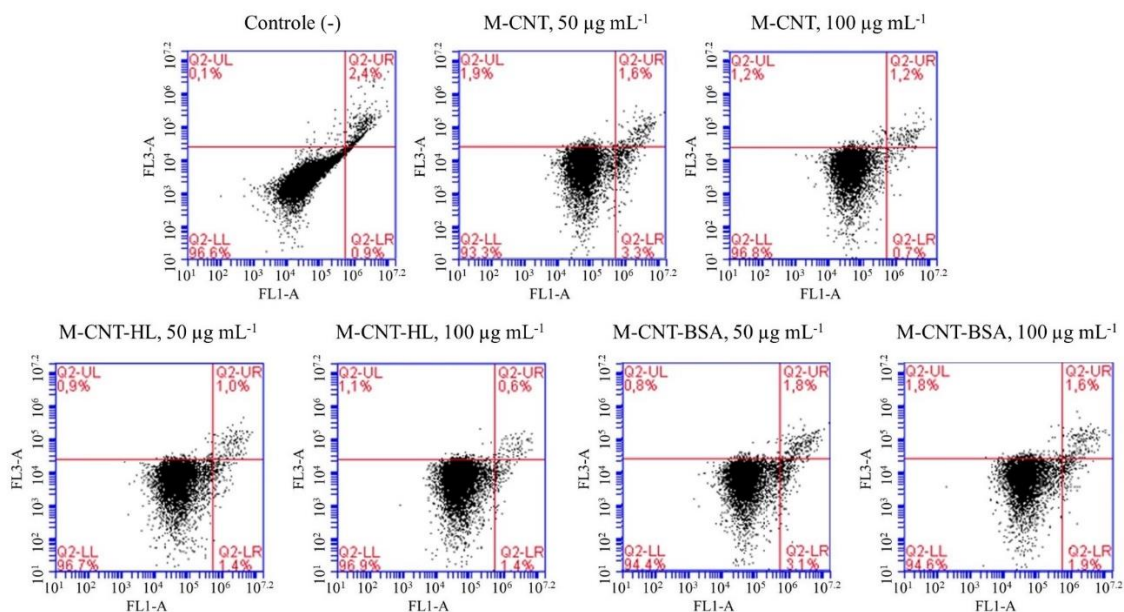
#### 4.10.4 Avaliação da apoptose

A apoptose é um processo de morte altamente regulado por alterações morfológicas na arquitetura celular: encolhimento e descolamento, externalização da fosfatidilserina, condensação nuclear e fragmentação do DNA (D'Arcy, 2019; PAROLIN; REASON, 2001), são alterações comumente descritas. Por outro lado, a necrose é uma morte celular sem controle (D'Arcy, 2019).

Os ensaios de citometria de fluxo para a avaliação de apoptose podem ser realizados utilizando os corantes 7-AAD e fluoresceína isotiocianato (FITC) – conjugada com Annexin V. Células em apoptose recente são positivas para Annexin V e negativas para 7-AAD; enquanto as células em apoptose tardia são positivas para ambos os corantes (BioLegend, 2020). A Annexin V é uma proteína intracelular que se liga a fosfatidilserina, encontrada na porção interior da membrana plasmática em células saudáveis. Durante a apoptose precoce, a assimetria da membrana é perdida e a fosfatidilserina é translocada para a face extracelular da membrana. Dessa forma, o Annexin V pode ser usado para identificar especificamente células apoptóticas (BioLegend, 2020). Já a 7-AAD cora células em estágio tardio de morte pois necessita entrar no núcleo, onde se liga ao DNA (BioLegend, 2020).

O complexo Annexin V-FITC pode ser analisado pelo filtro de fluorescência FL1 e a 7-AAD pelo, FL3 (de acordo com seus comprimentos de onda de excitação e emissão). Como pode ser visto na Fotografia 8 abaixo, a região de células analisadas pode ser dividida em 4 quadrantes: o inferior esquerdo refere-se às células viáveis; o inferior direito, às células em início de apoptose; o superior direito, às células em apoptose tardia e o superior esquerdo, às células em necrose. Os quadrantes foram definidos com base nos resultados obtidos para o controle negativo de apoptose e seu posicionamento está de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura (Dong *et al.*, 2017; Koç *et al.*, 2018).

Fotografia 8 - Imagens de citometria de fluxo para as células tratadas com meio DMEM (controle negativo de apoptose) e para as células tratadas com os nanotubos de carbono sintetizados

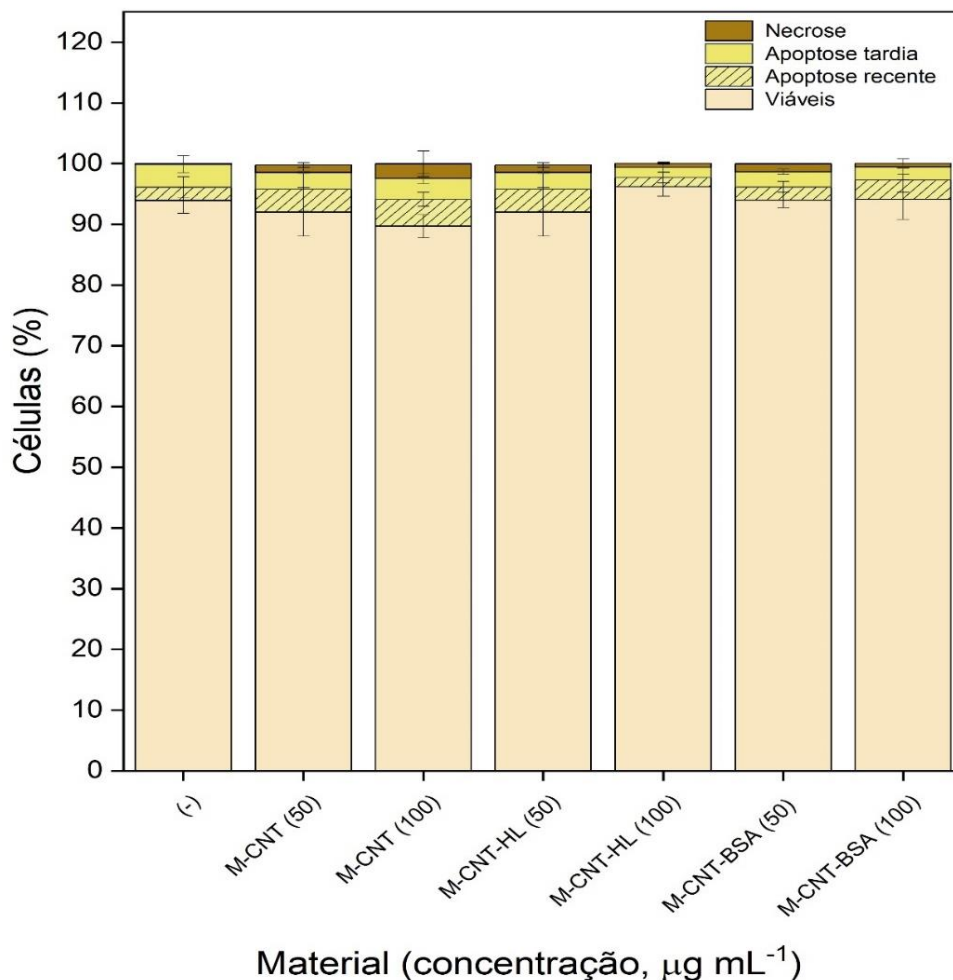


Nota: Os valores que aparecem nos quadrantes são relacionados com a porcentagem de células em cada estágio, em relação à população total de células. As imagens foram adquiridas através do *software* BD Accuri®. Controle (-) células tratadas apenas com meio de cultivo.

Fonte: Autora (2024).

Com esses resultados foi possível plotar um gráfico de barras comparando-se os tratamentos com os nanotubos avaliados e o controle negativo de apoptose (Gráfico 8). Como pode ser observado, não houve diferenças significativas (Teste de Scott-Knott, a um nível de 95% de confiança) no número de células viáveis entre as células tratadas com DMEM e as com os materiais. O número de células em necrose, após o tratamento com os M-CNTs, principalmente, aumentou indicando que o contato das células com os materiais pode levar a um maior número de mortes não programadas. Contudo, de forma geral, os resultados mostram citocompatibilidade dos materiais em concentrações  $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Gráfico 8 – Relação entre células viáveis e células em diferentes estágios de morte (apoptose inicial, apoptose tardia e necrose)



Nota: C-: controle negativo para apoptose (células tratadas com meio DMEM). Os valores em número (50 e 100) referem-se à concentração dos nanotubos, em µg mL<sup>-1</sup>. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados a um nível de 95% de confiança.

Fonte: Autora (2024).

#### 4.10.5 Avaliação da permeação em modelo biomimético de barreira intestinal

Nos tópicos a seguir serão mostrados e discutidos os resultados obtidos durante os ensaios empregando as monocamadas de Caco-2.

##### 4.10.5.1 Cultivo do modelo biomimético

O modelo biomimético de barreira intestinal, utilizando as células Caco-2, foi cultivado de forma análoga ao descrito na literatura (Chaves *et al.*, 2018; Granja *et al.*, 2019). As células cresceram, sem nenhuma ocorrência durante os 21 dias. Uma monocamada com células confluentes e íntegras gera um valor de TEER que pode ser usado como controle de uniformidade (CASTILLO *et al.*, 2006). Valores acima de  $200 \Omega \text{ cm}^2$  são descritos como necessários para uma monocamada adequada de Caco-2 (Denaro *et al.*, 2020; Granja *et al.*, 2019; Mehdizadeh Gohari *et al.*, 2019).

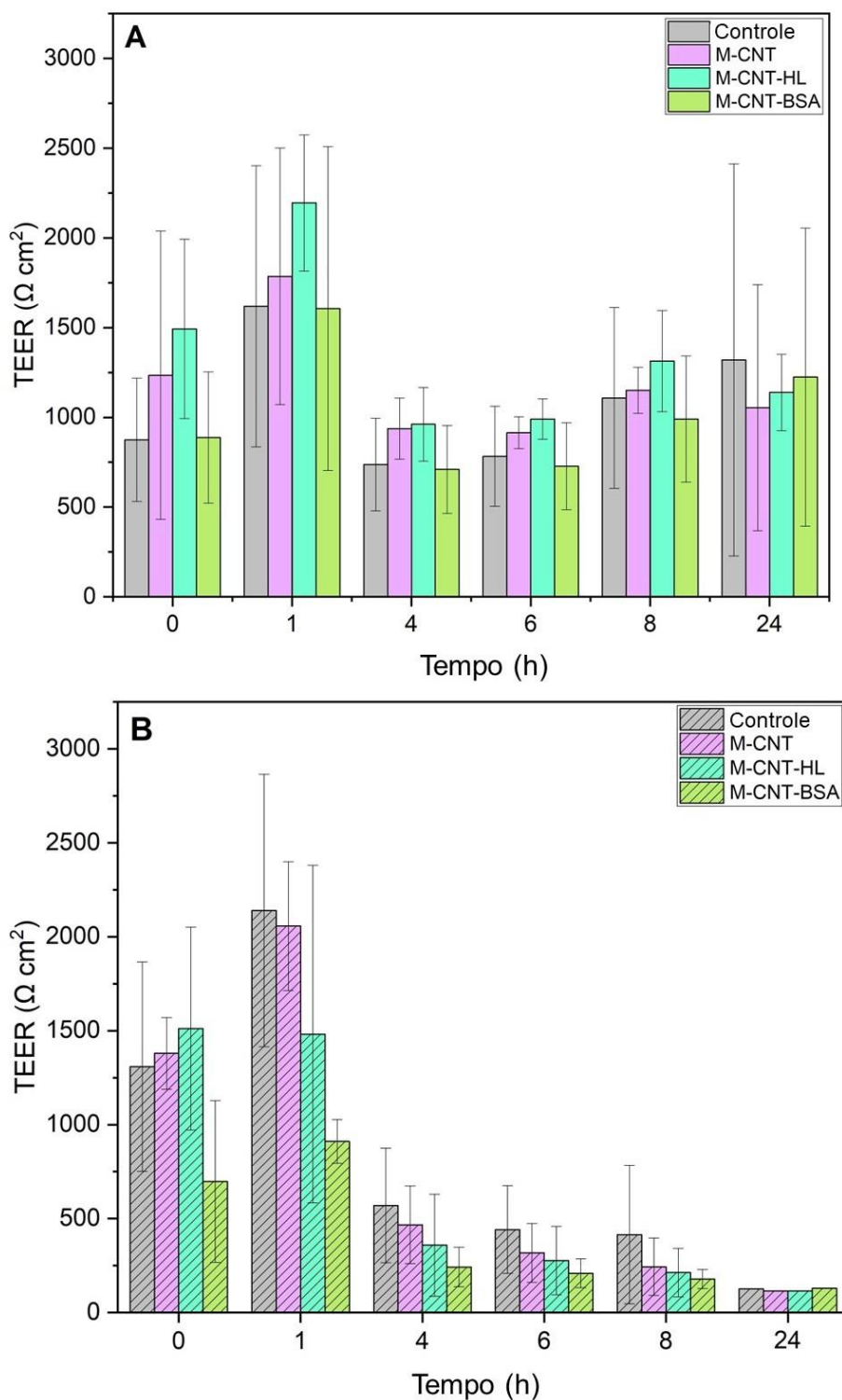
Ao final do oitavo dia de cultivo as TEERs das monocamadas eram superiores a  $200 \Omega \text{ cm}^2$  e, ao final dos 21 dias, TEERs  $\geq 2000 \Omega \text{ cm}^2$  foram obtidas. Assim como no presente trabalho, Netzel *et al.* (2011), Zhang *et al.* (2020) e Darling *et al.* (2020) também obtiveram valores de TEER acima de  $1000 \Omega \text{ cm}^2$  para as suas barreiras de Caco-2 (Darling *et al.*, 2020; Netzel *et al.*, 2011; Zhang, Ruirui *et al.*, 2020).

#### 4.10.5.2 Ensaios de permeação no modelo biomimético

Durante os ensaios de permeação, ímãs foram utilizados para atrair as  $\text{F}_3\text{O}_4$  presentes nos nanotubos sintetizados e, assim, tentar promover uma maior permeação desses materiais nas Caco-2. Thomson e colaboradores (2013) estudaram o uso de ímãs na permeação de NPs magnéticas em modelos de barreiras hematoencefálica; Saiyed *et al.* (2010) verificaram o comportamento de permeação de nanoformulações lipossômicas magnéticas nesse mesmo modelo de barreira, com o uso de um ímã posicionado na parte de baixo da placa de cultivo; por sua vez, Min *et al.* (2010) estudaram a permeação de NPs magnéticas funcionalizadas com heparina em monocamadas de células epiteliais, com e sem a presença de um ímã. Em todos os casos, foi verificado que a presença do ímã aumentou significativamente a permeação dos materiais nas células estudadas (Min *et al.*, 2010; Nair; Saiyed; Gandhi, 2010; Thomsen *et al.*, 2013).

Como demonstrado no Gráfico 9, para as placas não expostas aos ímãs foi verificado que os valores de TEER se mantiveram  $\geq 200 \Omega \text{ cm}^2$  para todos os tempos avaliados (1-24 h). Já em relação à placa exposta, valores  $\leq 130 \Omega \text{ cm}^2$  foram obtidos com o tempo de 24 h de exposição, inclusive para o controle. Esses resultados indicaram que o contato prolongado com os ímãs levou a uma desestabilização das monocamadas de Caco-2. Dessa forma, os ensaios para as placas expostas ao campo magnético externo foram encerrados com 8 h.

Gráfico 9 - Valores da resistência elétrica transepitelial (TEER) obtidos ao longo do ensaio de permeação para células não expostas (A) e expostas (B) a ímãs



Fonte: Autora (2024).

Campos magnéticos podem interagir com sistemas biológicos e aumentar a concentração e/ou o tempo de meia vida dos radicais livres (Ghodbane *et al.*, 2013), pois influenciam no estado de *spin* de pares de elétrons de radicais redox-ativos, fazendo com que esses fiquem desemparelhados (Sharpe *et al.*, 2021). Esse fato pode iniciar danos na membrana (levando à lise) e pode interromper o fluxo de elétrons na cadeia de transporte mitocondrial. Em ambos os casos, há morte celular por apoptose ou necrose (Ghodbane *et al.*, 2013; Sharpe *et al.*, 2021).

Outro resultado que pôde ser observado ao final do ensaio é que os nanotubos remanescentes na porção apical das monocamadas não expostas aos ímãs eram mais facilmente retirados (com o recolhimento do volume da porção apical e nas lavagens com HBSS) do que os remanescentes nas monocamadas expostas ao campo magnético. Esses últimos pareciam intercalados à monocamada, indicando que os ímãs realmente tiveram ação no ensaio realizado, aumentando o contato dos materiais com as células. Os resultados ainda indicam possibilidades de estudos de exposição dos M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL aos ímãs com tempos prolongados de contato (até 8 h).

Uma vez que os CNTs são difíceis de serem quantificados nas concentrações utilizadas no ensaio de permeação ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), o ferro presente nas nanopartículas magnéticas foi utilizado para se estimar a permeação dos materiais nas monocamadas de Caco-2. Esses resultados serão discutidos no tópico 4.10.6.

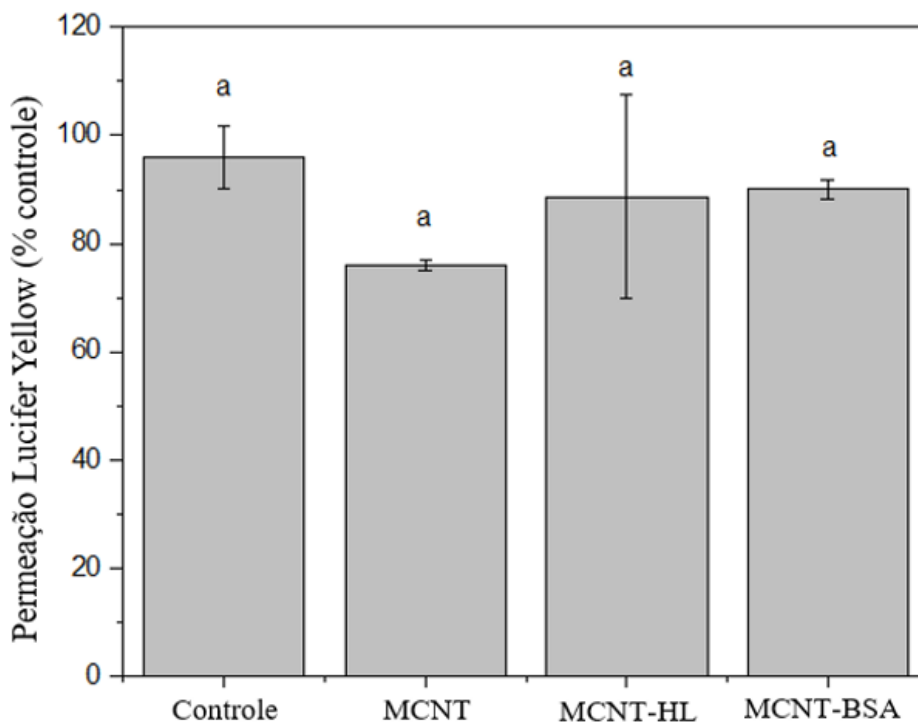
#### 4.10.5.3 Permeação de *Lucifer Yellow*

A LY é uma molécula hidrofílica que pode se mover através de barreiras celulares por difusão passiva paracelular (Sharma; Luhach; Kulkarni, 2019). Ou seja, por transporte entre as junções celulares. Dessa forma, a LY pode agir como um marcador para assegurar integridade de barreiras biomiméticas. O Gráfico 10 abaixo demonstra a permeação de LY nas monocamadas não expostas aos ímãs após 24 h.

Como pode ser observado, não existiu diferenças estatísticas (teste Scott-Knott, a um nível de 95% de confiança) na permeação de LY entre as células controle e as células expostas aos materiais, indicando que não houve prejuízos às monocamadas durante o ensaio de permeação. Caso as junções intercelulares fossem prejudicadas pela presença dos nanotubos avaliados, uma maior permeação de LY seria observada, em relação ao controle.

Esse resultado corrobora com as medições de TEER ao longo do ensaio de permeação, indicando que a barreira estava adequada até a retirada da última alíquota para a realização do experimento.

Gráfico 10 - Permeação de *Lucifer Yellow* no modelo de barreira intestinal.

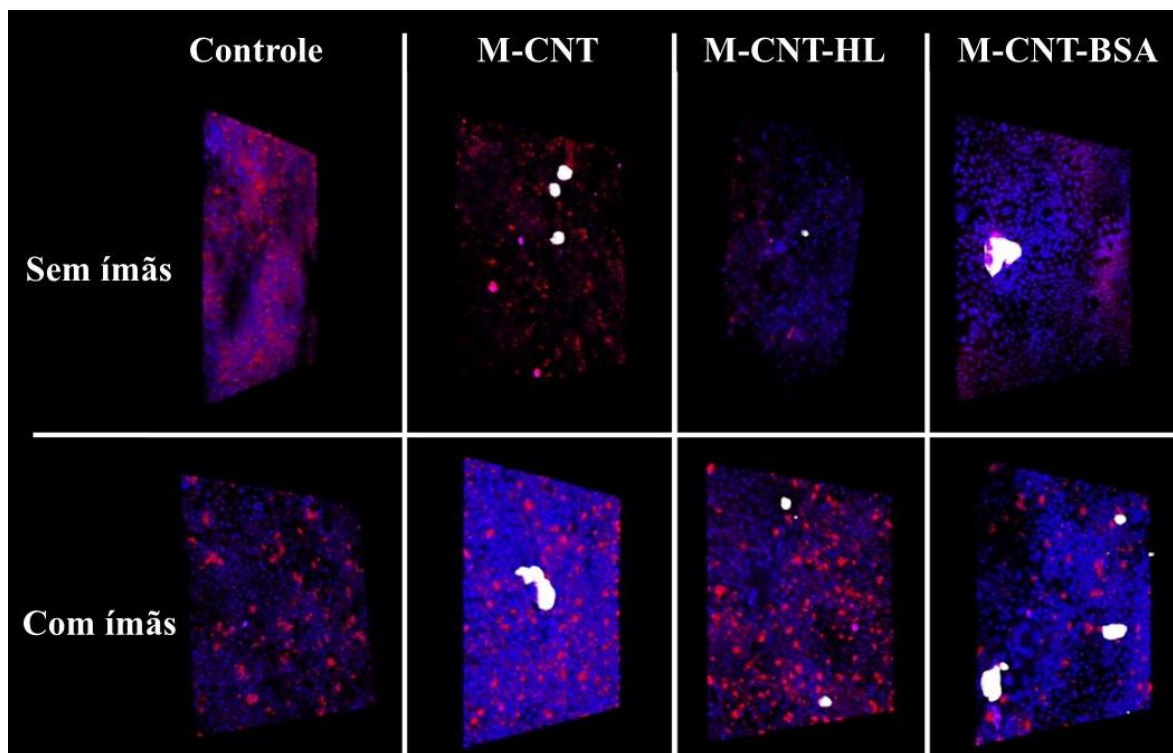


Nota: O controle: células tratadas apenas com tampão HBSS. Os resultados estão expressos em média ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão. Não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos (teste de Scott- Knott,  $p<0,05$ ). Fonte: Autora (2024).

#### 4.10.5.4 Análise das monocamadas por microscopia confocal

As imagens das monocamadas foram obtidas após o término dos ensaios de permeação (8 h para células expostas aos ímãs e 24 h, para as não expostas). A Fotografia 9 traz exemplos representativos de imagens tridimensionais das membranas expostas aos diferentes tratamentos. Os modelos tridimensionais (obtidos por ferramentas do *software* Leica® do próprio microscópio confocal) são formados a partir de múltiplas imagens retiradas de uma única região da monocamada, mas com alturas diferentes. Os M-CNTs, M-CNTs-BSA e M-CNTs-HL puderam ser visualizados a partir de canais de transmitância e foram digitalmente corados de branco com uma máscara, através do *software* Fiji®.

Fotografia 9 - Exemplos de representação tridimensional das monocamadas de Caco-2 expostas aos diferentes tratamentos (controle e suspensão dos nanotubos magnéticos sintetizados,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) após o ensaio de permeação



Nota: Controle: células tratadas apenas com tampão HBSS ao longo do ensaio de permeação.  
 Fonte: Autora (2024).

Através das imagens, foi possível observar a presença de materiais aderidos nas monocamadas, principalmente naquelas expostas aos ímãs, obtendo-se mais indícios que os CNTs analisados não causam danos aparentes ao crescimento celular.

As monocamadas apresentaram uma espessura entre  $30\text{-}40 \mu\text{m}$  e as falhas aparentes podem ser devido ao preparo das membranas (desgastes e sobreposição de células causados pela manipulação), pois as medidas de TEER e o ensaio de permeação com LY não indicam prejuízos às monocamadas de Caco-2, mesmo após o ensaio de permeação.

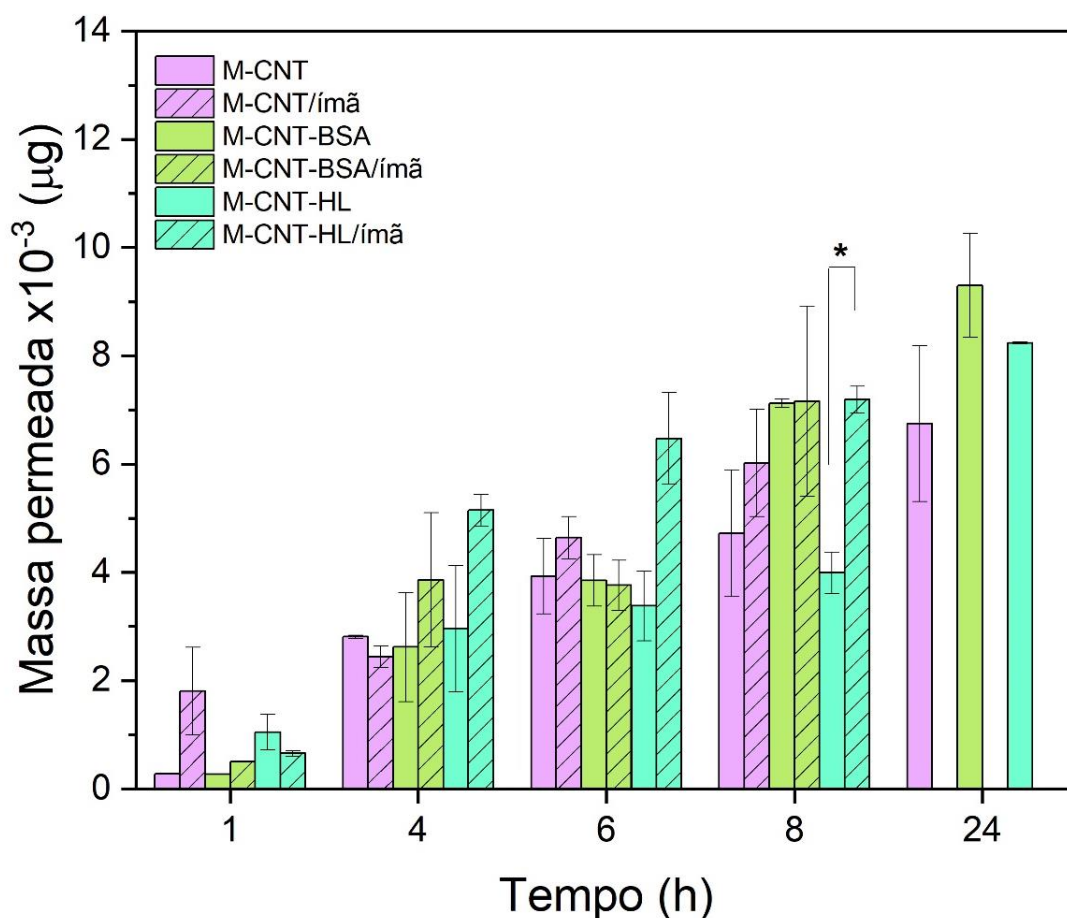
#### 4.10.6 Quantificação dos nanotubos por ICP-MS

A quantificação de nanotubos de carbono após ensaios de permeação não é frequentemente realizada. Normalmente apenas os valores de TEER são reportados (Pacurari

*et al.*, 2012; Rotoli *et al.*, 2008; Singh; Mia; Saxena, 2020; Yang *et al.*, 2020). No entanto, o fato de os materiais sintetizados nesse trabalho serem magnéticos possibilita a quantificação dos íons de ferro presente nas NPs.

Pelos resultados de análises termogravimétricas foi possível propor que cerca de 46% da massa dos nanotubos sintetizados é composta por nanopartículas de ferro. Assim, esse valor foi utilizado para os cálculos das massas de material permeado (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Massa de nanotubos permeada pelas monocamadas de Caco-2 (expostas e não expostas ao campo magnético externo)



Nota: materiais expostos aos ímãs não foram avaliados em 24 h devido a desestabilização da monocamada. Os resultados são mostrados em média  $\pm$  desvio padrão (n=3) e \* indica diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação à exposição aos ímãs.

Fonte: Autora (2024).

Como pode ser observado houve uma tendência de aumento de permeação em relação ao tempo para todas as condições. Após 8 h, apenas os M-CNTs-HL apresentaram diferença estatística de permeação entre as placas expostas e não expostas ao campo

magnético. No entanto, mesmo sem diferenças estatísticas, também houve uma tendência de aumento da permeação quando as placas eram expostas ao campo magnético tanto para M-CNT quanto para M-CNT-BSA.

Devido a hidrofiliçidade, os M-CNTs-HL podem apresentar limitações para a permeação em membranas (mais lipofílicas). Essa hipótese, somada ao fato desses materiais terem apresentado melhor dispersibilidade no tampão utilizado para o preparo das suspensões, podem justificar uma ação mais significativa dos ímãs. Os M-CNTs não apresentaram efeitos estatísticos significativos associados aos ímãs. Provavelmente devido ao formato de agulha e à falta de funcionalização de superfície, esses materiais já alcançaram a sua capacidade máxima de permeação mesmo sem o campo magnético. Por fim, a camada externa de BSA, devido ao seu volume e densidade, pode ter dificultado a permeação dos M-CNT-BSA, e essa situação não foi significativamente melhorada pelo uso dos ímãs. Além disso, a literatura relata que a captura de albumina pelas Caco-2 é um processo saturável (Hashem; Swedrowska; Vllasaliu, 2018) e mediado por receptores (Azevedo *et al.*, 2020; Hashem; Swedrowska; Vllasaliu, 2018), o que pode ter contribuído para uma maior permeação dos M-CNTs-BSA, comparado com os outros materiais, quando as células não estavam expostas aos ímãs.

## 5 CONCLUSÕES

Os materiais propostos foram obtidos e caracterizados com sucesso e aplicados em diferentes ensaios ao longo do desenvolvimento da tese.

Nos testes de adsorção de proteínas foi possível perceber, assim como o esperado, que os nanotubos avaliados se comportavam de forma distinta em relação à adsorção de HSA: que nos valores de 19,9; 16,7 e 13,2 mg g<sup>-1</sup> foram obtidos para M-CNT, M-CNT-HL e M-CNT-BSA, respectivamente. Além disso, os modelos de cinética pseudo-primeira ordem e isoterma de Freundlich explicaram o comportamento de adsorção da HSA pelos M-CNT e M-CNT-BSA; enquanto os modelos de pseudo-segunda ordem e Sips foram os adequados para os M-CNTs-HL.

Outras evidências da interação dos materiais com albumina vieram dos ensaios de fluorescência, nos quais foi verificado que os nanotubos exercem um efeito de *quenching* na fluorescência de albumina presente em solução. Valores aproximados de  $k_q$  (na ordem de 10<sup>23</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, para todos os materiais) foram maiores que os valores descritos na literatura para a difusão de biomoléculas, indicando que o mecanismo de *quenching* ocorre pela formação de um complexo não fluorescente e que a albumina provavelmente se molda ao interagir com a superfície dos nanotubos.

Com os ensaios de otimização multivariada de dessorção de proteínas e de eletroforese em gel foi verificado que os M-CNT, M-CNT-HL e M-CNT-BSA eram capazes de interagir com amostras de soro diluído, extraindo proteínas dessa matriz biológica. Além disso, os materiais puderam ser facilmente recuperados com o uso de um ímã.

As diferentes condições de eluição de proteínas obtidas para cada um dos nanomateriais (principalmente relacionadas com o pH e a força iônica da fase) são evidências de que eles interagem de forma distinta com as proteínas presentes no soro. Ademais, mudanças sutis no perfil e na concentração de proteínas dessorvidas dos nanomateriais e separadas nos géis de eletroforese indicam formação de camadas corona distintas. Foi possível verificar também uma mudança quantitativa de proteínas adsorvidas pelos M-CNTs-HL de acordo com o tempo de agitação. Por fim, nos géis de SDS-PAGE, proteínas majoritárias como albumina, apolipoproteínas, transferrina e imunoglobulinas foram identificadas. Outras proteínas minoritárias serão identificadas após os estudos com o MS.

Os resultados de metabolismo celular e de citotoxicidade mostraram que os materiais sintetizados podem causar danos às membranas das células, mas não necessariamente levam à morte celular. Concentrações de até  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram citocompatíveis para M-CNT, M-CNT-HL e M-CNT-BSA quando esses eram expostos às Caco-2. Os testes de estresse oxidativo e indução a apoptose corroboraram esses resultados.

Nos estudos de permeação, as monocamadas permaneceram viáveis por até 8 h de exposição a um campo magnético externo. Após esse tempo, danos foram percebidos nas células mesmo para o grupo controle. Ainda em relação aos ensaios de permeação, foi demonstrado que a presença das nanopartículas magnéticas permitiu estimar de forma indireta a massa dos nanotubos permeados ao longo do ensaio. Esse ensaio não é comum na literatura, geralmente apenas os valores de TEER são relatados para estudos de permeação utilizando CNTs.

De forma geral, o M-CNT-BSA apresentou uma maior capacidade de excluir macromoléculas (o que pode ser uma vantagem para as aplicações *in vivo*), apresentou uma menor tendência de gerar ROS (quando comparados aos M-CNT-HL) e uma maior tendência de permear a barreira biomimética, principalmente quando os ímãs não foram utilizados. No entanto, esse material demonstrou a pior estabilidade e dispersibilidade em meio DMEM, impedindo os ensaios com as concentrações mais altas propostas ( $500$  e  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Por sua vez, o M-CNT-HL apresentou melhor dispersibilidade e foi o único, dos três materiais, que apresentou melhora significativa na permeação após o uso dos ímãs. Ambos os materiais funcionalizados foram efetivos na prevenção de processos de necrose nas Caco-2 e foram favoráveis à permeação.

Vale mencionar que alguns agregados de nanotubos foram observados durante os diferentes ensaios. Contudo, eles aparentavam não danificar as células, mas sim servir como um suporte para o seu crescimento.

Os experimentos realizados exploraram o papel das funcionalizações de superfície nos nanotubos magnéticos, demonstrando que esses materiais interagem de forma distinta com proteínas e células. A menor capacidade de adsorção de proteínas pelos materiais funcionalizados pode ser vantajosa para aplicações *in vivo*. A interação dos nanomateriais com múltiplas proteínas pode resultar em limitações para o sistema desenvolvido, impedindo-o de desempenhar adequadamente sua função programada. A presença das nanopartículas magnéticas também é um diferencial para os materiais, permitindo sua

manipulação com um ímã e abrindo possibilidades para terapias nanomédicas (como, por exemplo, tratamentos por hipertermia magnética). Assim, devido às diferenças entre os materiais e à citocompatibilidade observada, M-CNT-HL e M-CNT-BSA podem continuar sendo investigados para futuras aplicações nanomédicas.

## 6 PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

Um artigo diretamente relacionado com os resultados dessa tese de doutorado foi publicado na revista *International Journal of Biological Macromolecules*: **Magnetic carbon nanotubes modified with proteins and hydrophilic monomers: cytocompatibility, in-vitro toxicity assays and permeation across biological interfaces**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131962.

Outras contribuições em artigos provenientes de dissertações e teses, revisão de literatura e pedidos de patentes estão listadas a seguir:

1. **Molecularly imprinted nanoparticles as drug carriers to the brain**. doi: 10.1007/s10853-023-09053-7.

2. **Determination of Lead and Cadmium in Non-mineralized Raw Milk Samples Employing Extraction with Magnetic Restricted Access Carbon Nanotubes Followed by FAAS Analysis**. doi:10.1007/s12161-023-02452-1.

3. **Online biological sample preparation with restricted access hybrid carbon nanotubes for determination of anti-smoking drugs**. doi: 10.1016/j.chroma.2022.46293.

4. **Magnetic restricted-access carbon nanotubes for SPME to determine cannabinoids in plasma samples by UHPLC-MS/MS**. doi: 10.1016/j.aca.2022.340160.

5. **Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers for Biological Sample Preparation**. doi: 10.30744/brjac.2179-3425.RV-90-2021.

6. **A sustainable and innovative method to determine parabens in body creams for exposure and risk assessment**. doi: 10.1016/j.yrtph.2024.105667

7. **Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers**. *In*: Antonio Martín-Esteban. (Org.). *Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers*. *Methods in Molecular Biology*. 1ed.: Springer US, 2021, v. 1, p. 53-70.

8. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202302634, título: **"Biocatalisador magnético da lipase de *Geotrichum candidum*"**, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 14/12/2023.

## REFERÊNCIAS

- AAT BIOQUEST. **What is FSC and SSC in flow cytometry?**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-FSC-and-SSC-in-flow-cytometry>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- ABOU-GAMRA, Zeinab M.; AHMED, Mohamed A. TiO<sub>2</sub> nanoparticles for removal of malachite green dye from waste water. **Advances in Chemical Engineering and Science**, [Glendale], v. 05, n. 03, p. 373–388, 2015.
- ADDONA, Terri A *et al.* Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring–based measurements of proteins in plasma. **Nature Biotechnology**, [New York], v. 27, n. 7, p. 633–641, 2009.
- AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, [Washington DC], v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.
- AHN, Taebin *et al.* Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. **The Journal of Physical Chemistry C**, [Washington DC], v. 116, n. 10, p. 6069–6076, 2012.
- AL MGHEER, Tariq; H ABDULRAZZAK, Firas. Oxidation of multi-walled carbon nanotubes in acidic and basic Piranha mixture. **Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology**, [Zurich], v. 2, n. 4, 2016.
- AL-GHOUTI, Mohammad A.; DA'ANA, Dana A. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. **Journal of Hazardous Materials**, [Amsterdam], v. 393, p. 122383, 2020.
- ALSHEHRI, Reem *et al.* Carbon nanotubes in biomedical applications: Factors, mechanisms, and remedies of toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [Washington, DC], v. 59, n. 18, p. 8149–8167, 2016.
- ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo Celular. *In*: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 2.ed. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215–254.
- AMIN, Mohsin *et al.* Polyamine biomarkers as indicators of human disease. **Biomarker**, [Montreal], v. 26, n. 2, p. 77–94, 2021.
- AN, Fei-Fei; ZHANG, Xiao-Hong. Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery. **Theranostics**, [Sydney], v. 7, n. 15, p. 3667–3689, 2017
- ANDERSON, N. Leigh; ANDERSON, Norman G. The human plasma proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, [Frisco], v. 1, n. 11, p. 845–867, 2002.

ASLAM, Bilal *et al.* Proteomics: Technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, [Oxford], v. 55, n. 2, p. 182–196, 2017.

ASLAN, N. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling and optimization of a multi-gravity separator for chromite concentration. **Powder Technology**, [s. l.], v. 185, n. 1, p. 80–86, 2008.

ASSARI, Parnaz *et al.* Fabrication of a sensitive label free electrochemical immunosensor for detection of prostate specific antigen using functionalized multi-walled carbon nanotubes/polyaniline/AuNPs. **Materials Science and Engineering: C**, [Amsterdam], v. 115, p. 111066, 2020.

ATCC. **Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)**. [S. l.]: ATCC, 2002. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/30-2002>. Acesso em: 1 jul. 2024.

AYAWEI, Nimibofa; EBELEGI, Augustus Newton; WANKASI, Donbebe. Modelling and interpretation of adsorption isotherms. **Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 2017, p. 1–11, 2017.

AZEVEDO, Cláudia *et al.* Engineered albumin-functionalized nanoparticles for improved FcRn binding enhance oral delivery of insulin. **Journal of Controlled Release**, [Amsterdam], v. 327, p. 161–173, 2020.

BALDUINO, Jonathan Saulo *et al.* Magnetic restricted access carbon nanotubes for smooth Cu and Zn extraction from Cu, Zn-superoxide dismutase. **SN Applied Sciences**, [Londres], v. 1, n. 10, p. 1246, 2019.

BALI, M; TLILI, H. Removal of heavy metals from wastewater using infiltration-percolation process and adsorption on activated carbon. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [Londres], v. 16, n. 1, p. 249–258, 2019.

BANERJEE, Shibdas; MAZUMDAR, Shyamalava. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, [London], v. 2012, p. 1–40, 2012.

BARBOSA, Adriano F. *et al.* Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, [Amsterdam], v. 131, p. 213–220, 2015.

BEG, Sarwar; RAZA, Kaisar. Full Factorial and Fractional Factorial Design Applications in Pharmaceutical Product Development. *In*: BERG, Sarwar. **Design of experiments for pharmaceutical product development**. Singapore: Springer, 2021. p. 43–53.

BEHNAMFARD, Ali; SALARIRAD, Mohammad Mehdi. Equilibrium and kinetic studies on free cyanide adsorption from aqueous solution by activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, [Amsterdam], v. 170, n. 1, p. 127–133, 2009.

- BELALI, Nagina; WATHONI, Nasrul; MUCHTARIDI, Muchtaridi. Advances in orally targeted drug delivery to colon. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, [Gwalior], v. 10, n. 3, p. 100–106, 2019.
- BELYANSKAYA, Larisa *et al.* The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. **Carbon**, [Londres], v. 45, n. 13, p. 2643–2648, 2007.
- BERGMANN CP, Panta PC. Raman spectroscopy of iron oxide of nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). **Journal of Material Science & Engineering**, [s. l.], v. 05, n. 01, 2015.
- BHATTACHARYA, Ananyo A.; CURRY, Stephen; FRANKS, Nicholas P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. **Journal of Biological Chemistry**, [Nova York], v. 275, n. 49, p. 38731–38738, 2000.
- BIOLEGEND. **FITC annexin V apoptosis detection kit with 7-AAD**. [S. l.]: BIOLEGEND, 2020. Disponível em: <https://www.biolegend.com/en-us/products/fitc-annexin-v-apoptosis-detection-kit-with-7-aad-8264?GroupID=BLG6047>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- BOCCAFOSCHI, F.; FUSARO, L.; CANNAS, M. Immobilization of peptides on cardiovascular stent. In: WALL, Gerard, PODBIELSKA, Halina, WAWRZYNSKA, Magdalena. **Functionalised cardiovascular stents**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 305–318.
- BOULOS, Stefano P. *et al.* Nanoparticle–protein interactions: A thermodynamic and kinetic study of the adsorption of bovine serum albumin to gold nanoparticle surfaces. **Langmuir**, [Washington DC], v. 29, n. 48, p. 14984–14996, 2013.
- BOYS, Emma L. *et al.* Clinical applications of mass spectrometry-based proteomics in cancer: Where are we?. **PROTEOMICS**, [Weinheim], v. 23, n. 7–8, 2023.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dy binding. **Analytical Biochemistry**, [Frisco], v. 72, p. 248–254, 1976.
- BREZNAN, Dalibor *et al.* Non-specific interaction of carbon nanotubes with the resazurin assay reagent: Impact on in vitro assessment of nanoparticle cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, [Londres], v. 29, n. 1, p. 142–147, 2015.
- BRONZE-UHLE, E. S. *et al.* Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid. **Nanotechnology, Science and Applications**, [Auckland], v. 10, p. 11–21, 2016.
- BROWN, Kyle A. *et al.* Top-down proteomics: challenges, innovations, and applications in basic and clinical research. **Expert Review of Proteomics**, [Abingdon], v. 17, n. 10, p. 719–733, 2020.
- BUENO, Pedro V.A. *et al.* Magnetically triggered release of amoxicillin from xanthan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/albumin patches. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Londres], v. 115, p. 792–800, 2018.

CACCHIOLI, A. *et al.* Cytocompatibility and Cellular Internalization Mechanisms of SiC/SiO<sub>2</sub> Nanowires. **Nano Letters**, [Washington DC], v. 14, n. 8, p. 4368–4375, 2014.

CAMILO, Ruth Luqueze. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia**. 2006. 209f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.

CAPRIOTTI, Anna Laura *et al.* Label-free quantitative analysis for studying the interactions between nanoparticles and plasma proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [Berlin], v. 405, n. 2–3, p. 635–645, 2013.

CARRIL, Monica *et al.* In situ detection of the protein corona in complex environments. **Nature Communications**, [Londres], v. 8, n. 1, p. 1542, 2017.

CARTER, Matt; SHIEH, Jennifer C. Cell culture techniques. *In*: CARTER, Matt, SHIEH, JENNIFER C. **Guide to research techniques in neuroscience**. Londres: Academic Press, 2010. p. 281–296.

CASTILHO, Leandro Rossi *et al.* Determination of lead and cadmium in non-mineralized raw milk samples employing extraction with magnetic restricted access carbon nanotubes followed by FAAS analysis. **Food Analytical Methods**, [Nova Iorque], v. 16, n. 6, p. 1017–1029, 2023.

CHAVES, Luíse L. *et al.* Drug delivery systems on leprosy therapy: Moving towards eradication?. **Pharmaceutics**, [Basel], v. 12, n. 12, p. 1–19, 2020.

CHAVES, Luíse L. *et al.* Nanosystems as modulators of intestinal dapsone and clofazimine delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [Paris], v. 103, p. 1392–1396, 2018.

CHEMMARAPPALLY, Joseph M. *et al.* A co-culture nanofibre scaffold model of neural cell degeneration in relevance to Parkinson's disease. **Scientific Reports**, [Londres], v. 10, n. 1, p. 2767, 2020.

CHEN, Hanqing *et al.* Acute oral administration of single-walled carbon nanotubes increases intestinal permeability and inflammatory responses: Association with the changes in gut microbiota in mice. **Advanced Healthcare Materials**, [Weinheim], v. 7, n. 13, p. 1–13, 2018.

CHEN, Chen *et al.* Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, [Basel], v. 21, n. 8, p. 2873, 2020.

CHEN, G. Z. *et al.* Carbon nanotube and polypyrrole composites: Coating and doping. **Advanced Materials**, [Weinheim], v. 12, n. 7, p. 522–526, 2000.

CHEN, Jingyi *et al.* Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery. **Journal of the American Chemical Society**, [Washington, DC], v. 130, n. 49, p. 16778–16785, 2008.

CHEN, Bifan *et al.* Top-down proteomics: Ready for prime time?. **Analytical Chemistry**, [Washington, DC], v. 90, n. 1, p. 110–127, 2018.

CHERIFI, Zakaria *et al.* Preparation of new nanocomposite poly(GDMA)/mesoporous silica and its adsorption behavior towards cationic dye. **Reactive and Functional Polymers**, [Amsterdam], v. 153, p. 104611, 2020.

CORBO, Claudia *et al.* The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. **Nanomedicine**, [Abingdon], v. 11, n. 1, p. 81–100, 2016.

COX, Alysia *et al.* Evolution of nanoparticle protein corona across the blood–brain barrier. **ACS Nano**, [Washington, DC], v. 12, n. 7, p. 7292–7300, 2018.

CREATIVE PROTEOMICS PRONALYSE. **SDS-PAGE Service**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/sds-page-service.html>. Acesso em: 1 jul. 2024.

CRISTOBAL, Alba *et al.* Toward an optimized workflow for middle-down proteomics. **Analytical Chemistry**, [Washington, DC], v. 89, n. 6, p. 3318–3325, 2017.

CRUZ, Jonas Carneiro *et al.* Magnetic restricted-access carbon nanotubes for SPME to determine cannabinoids in plasma samples by UHPLC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 1226, n. May, p. 3–12, 2022.

DA COSTA, João Pinto *et al.* How low can you go? A current perspective on low-abundance proteomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [Amsterdam], v. 93, p. 171–182, 2017.

D'ARCY, Mark S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, [New Jersey], v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

DARLING, Nicole J. *et al.* Bioengineering novel in vitro co-culture models that represent the human intestinal mucosa with improved Caco-2 structure and barrier function. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [Lausanne], v. 8, 2020.

DE FARIA, Henrique Dipe *et al.* Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Food Chemistry**, [Londres], v. 225, p. 98–106, 2017a.

DE FARIA, Henrique Dipe *et al.* New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], 2017b.

- DE FARIA, Henrique Dipe *et al.* Online biological sample preparation with restricted access hybrid carbon nanotubes for determination of anti-smoking drugs. **Journal of Chromatography A**, [Amsterdam], v. 1669, p. 462931, 2022.
- DE JESUS, Jemmyson Romário *et al.* Optimization of a methodology for quantification and removal of zinc gives insights into the effect of this metal on the stability and function of the zinc-binding co-chaperone Ydj1. **Frontiers in Chemistry**, [Lausanne], v. 7, 2019.
- DE OLIVEIRA, Hanna Leijoto *et al.* Microextraction by packed sorbent using a new restricted molecularly imprinted polymer for the determination of estrogens from human urine samples. **Microchemical Journal**, [Frisco], v. 150, n. July, p. 104162, 2019a.
- DE OLIVEIRA, Hanna Leijoto *et al.* Novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymer for selective magnetic solid-phase extraction of estrogens from human urine. **Microchemical Journal**, [Frisco], v. 149, n. May, p. 104043, 2019b.
- DENARO, Marcella *et al.* In vitro intestinal transport and anti-inflammatory properties of ideain across Caco-2 transwell model. **Fitoterapia**, [Amsterdam.], v. 146, p. 104723, 2020.
- DONG, Wei *et al.* Protective effect of NSA on intestinal epithelial cells in a necroptosis model. **Oncotarget**, New York, v. 8, n. 49, p. 86726–86735, 2017.
- DUPREE, Emmalyn J. *et al.* A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field. **Proteomes**, [Basel], v. 8, n. 3, p. 1–26, 2020.
- EGGER, Boris *et al.* In vitro imaging of primary neural cell culture from Drosophila. **Nature Protocols**, [Londres], v. 8, n. 5, p. 958–965, 2013.
- ES'HAGHI, Zarrin; EBRAHIMI, Mahmoud; HOSSEINI, Mohammad-Saeid. Optimization of a novel method for determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in hair and waste water samples by carbon nanotubes reinforced sol–gel based hollow fiber solid phase microextraction and gas chromatography using factorial ex. **Journal of Chromatography A**, [Amsterdam], v. 1218, n. 21, p. 3400–3406, 2011.
- ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Bioanalytical method validation**. Rockville: FDA, 2013. ISSN 2229-4708.
- EUROPE STANDARDS. Biological evaluation of medical devices Tests for in vitro cytotoxicity. **ISO 10993-5:2009**, 2009.
- FARABEGOLI, F. *et al.* Betalains increase vitexin-2-O-xyloside cytotoxicity in CaCo-2 cancer cells. **Food Chemistry**, [Londres], v. 218, p. 356–364, 2017.
- FATAHI, S. *et al.* Comparison of different albumin removal methods for evaluation of human serum proteome. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, [Zāhidān], v. 14, n. 4, 2012.

FEBRIANTO, Jonathan *et al.* Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. **Journal of Hazardous Materials**, [Amsterdam], v. 162, n. 2–3, p. 616–645, 2009.

FELICIANO, Cristiane dos R. *et al.* Synthesis and characterization of restricted access magnetic nanotubes (M-RACNTs) for the extraction of secondary metabolites from *Lasiodiplodia* sp. fermentation broth. **Diamond and Related Materials**, [Amsterdam], v. 142, p. 110763, 2024.

FERNANDO, Milan *et al.* Differentiation of brain and retinal organoids from confluent cultures of pluripotent stem cells connected by nerve-like axonal projections of optic origin. **Stem Cell Reports**, [Amsterdam], 2022.

FERREIRA, Sérgio L.C. *et al.* Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, [Amsterdam], v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004.

FILCHAKOVA, Marina. **What are multi walled carbon nanotubes? MWCNT production, properties, and applications.** [s. l.]: TUBALL™, 2021. Disponível em: <https://tuball.com/articles/multi-walled-carbon-nanotubes>. Acesso em: 1 jul. 2024.

FINDEISEN, Peter; NEUMAIER, Michael. Mass spectrometry based proteomics profiling as diagnostic tool in oncology: current status and future perspective. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 6, 2009.

FONSECA, Lúbia Cristina *et al.* Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 543–548, 2006.

FOO, Mu Ee *et al.* Antimicrobial activity of functionalized single-walled carbon nanotube with herbal extract of *Hempedu bumi*. **Surface and Interface Analysis**, [Chichester], v. 50, n. 3, p. 354–361, 2018.

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, [Nova Iorque], v. 156, n. 1, p. 2–10, 2010.

FOTAKIS, George; TIMBRELL, John A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, [Amsterdam], v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

FRANQUI, Lidiane Silva *et al.* Synthesis and characterization of a magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of nicotine and cotinine from urine samples followed by GC-MS analysis. **Analytical Methods**, [Cambridge], v. 7, n. 21, p. 9237–9244, 2015.

FREUNDLICH, H. Over the adsorption in solution. **The Journal of Physical Chemistry** [Washington DC], v. 57, p. 1100–1107, 1906.

FU, Qin *et al.* Automated proteomic sample preparation: The key component for high throughput and quantitative mass spectrometry analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, [Nova Jersey], v. 42, n. 2, p. 873–886, 2023.

GALLAGHER, Sean R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, [Nova Jersey], v. 00, n. 1, 1995.

GARCÍA-DESCALZO, Laura *et al.* Gel electrophoresis of proteins. *In*: MAGDELDIN, Sameh. **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**. Rijeka: InTech, 2012.

GE, Cuicui *et al.* Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 41, p. 16968–16973, 2011.

GE, Pengfei *et al.* Surface chemistry of gold nanoparticles for bacterial detection and antimicrobial applications. **ACS Materials Letters**, [Washington DC], v. 5, n. 3, p. 638–655, 2023.

GHODBANE, Soumaya *et al.* Bioeffects of static magnetic fields: Oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies. **BioMed Research International**, [Londres], v. 2013, p. 1–12, 2013.

GIRALDO, Luis F. *et al.* Scratch and wear resistance of polyamide 6 reinforced with multiwall carbon nanotubes, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [Valencia, USA], v. 8, p. 3176-3183, 2008.

GOMES, Ana; FERNANDES, Eduarda; LIMA, José L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, [Amsterdam], v. 65, n. 2–3, p. 45–80, 2005.

GONZALEZ-CARTER, Daniel *et al.* Quantification of blood-brain barrier transport and neuronal toxicity of unlabelled multiwalled carbon nanotubes as a function of surface charge. **Nanoscale**, [Cambridge], v. 11, n. 45, p. 22054–22069, 2019.

GOYAL, Ritu *et al.* Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [Amsterdam], v. 240, p. 77–92, 2016.

GRANJA, Andreia *et al.* EGCG intestinal absorption and oral bioavailability enhancement using folic acid-functionalized nanostructured lipid carriers. **Heliyon**, [Londres], v. 5, n. 7, p. e02020, 2019.

GRANJA, Andreia *et al.* Folate receptor-mediated delivery of mitoxantrone-loaded solid lipid nanoparticles to breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [Paris], v. 154, p. 113525, 2022.

GULATI, Shikha *et al.* Improving the air quality with functionalized carbon nanotubes: Sensing and remediation applications in the real world. **Chemosphere**, [Londres], v. 299, p. 134468, 2022.

GUO, Xiaohui *et al.* Bioinspired sandwich-structured pressure sensors based on graphene oxide/hydroxyl functionalized carbon nanotubes/bovine serum albumin nanocomposites for wearable textile electronics. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, [Londres], v. 163, p. 107240, 2022.

- GUO, Zhanhu *et al.* Surface functionalized alumina nanoparticle filled polymeric nanocomposites with enhanced mechanical properties. **Journal of Materials Chemistry**, [Abingdon], v. 16, n. 27, p. 2800, 2006.
- HADJIDEMETRIOU, Marilena *et al.* A novel scavenging tool for cancer biomarker discovery based on the blood-circulating nanoparticle protein corona. **Biomaterials**, [Londres], v. 188, n. October 2018, p. 118–129, 2019.
- HADJIDEMETRIOU, Marilena; KOSTARELOS, Kostas. Evolution of the nanoparticle corona. **Nature Nanotechnology**, [Londres], v. 12, n. 4, p. 288–290, 2017.
- HAGA, Yoshimi; MINEGISHI, Yuriko; UEDA, Koji. Frontiers in mass spectrometry–based clinical proteomics for cancer diagnosis and treatment. **Cancer Science**, [Tóquio], v. 114, n. 5, p. 1783–1791, 2023.
- HAJDUK, Joanna; MATYSIAK, Jan; KOKOT, Zenon J. Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS. **Clinica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 458, p. 84–98, 2016.
- HAIPOUR, Mohammad J. *et al.* An overview of nanoparticle protein corona literature. **Small**, [Weinheim], v.19, n. 36, p. 2301838, 2023.
- HANIU, Hisao *et al.* DJ-1 as a potential biomarker for the development of biocompatible multiwalled carbon nanotubes. **International Journal of Nanomedicine**, [Auckland], v. 6, n. June 2014, p. 2689, 2011.
- HASHEM, Lina; SWEDROWSKA, Magda; VLLASALIU, Driton. Intestinal uptake and transport of albumin nanoparticles: potential for oral delivery. **Nanomedicine**, [Abingdon], v. 13, n. 11, p. 1255–1265, 2018.
- HASSIS, Maria E. *et al.* Evaluating the effects of preanalytical variables on the stability of the human plasma proteome. **Analytical Biochemistry**, [Frisco], v. 478, p. 14–22, 2015.
- HO, Y. S.; NG, J. C.Y.; MCKAY, G. Kinetics of pollutant sorption by biosorbents: Review. **Separation and Purification Methods**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 189–232, 2000.
- HOLT, Brian D; DAHL, Kris Noel; ISLAM, Mohammad F. Cells take up and recover from protein-stabilized single-wall carbon nanotubes with two distinct rates. **ACS Nano**, [Washington DC], v. 6, n. 4, p. 3481–3490, 2012.
- HOVESTADT, Volker *et al.* Medulloblastomics revisited: Biological and clinical insights from thousands of patients. **Nature Reviews Cancer**, [Londres], v. 20, n. 1, p. 42–56, 2020.
- HU, Yan-Jun *et al.* Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method. **Journal of Molecular Structure**, [Amsterdam], v. 750, n. 1–3, p. 174–178, 2005.

- HUSI, Holger; ALBALAT, Amaya. Proteomics. *In*: PASMABHAN, Sandosh (org.). **Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine**. Londres: Academic Press, 2014. p. 147–179.
- HUSSAIN, Husniza *et al.* Determination of cell viability using acridine orange/propidium iodide dual-spectrofluorometry assay. **Cogent Food & Agriculture**, [Abingdon], v. 5, n. 1, p. 1582398, 2019.
- ISMAIL, Fanya *et al.* Strength of interactions between immobilized dye molecules and sol–gel matrices. **The Analyst**, [Rockville], v. 136, n. 4, p. 807–815, 2011.
- ISO, Biological Evaluation of Medical Devices; BRITISH STANDARD. Biological evaluation of medical devices. Part 1. v. 1, p. 10993, 2009.
- JAVANMARD, M. *et al.* Depletion of cells and abundant proteins from biological samples by enhanced dielectrophoresis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [*s. l.*], v. 193, p. 918–924, 2014.
- JONES, Alexander; ZELLER, Mark; SHARMA, Suraj. Thermal, mechanical, and moisture absorption properties of egg white protein bioplastics with natural rubber and glycerol. **Progress in Biomaterials**, [Heidelberg], v. 2, n. 1, p. 12, 2013.
- JOS, Angeles *et al.* Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. **Toxicology in Vitro**, [Londres], v. 23, n. 8, p. 1491–1496, 2009.
- KAFA, Houmam *et al.* The interaction of carbon nanotubes with an invitro blood-brain barrier model and mouse brain in vivo. **Biomaterials**, [Londres], v. 53, p. 437–452, 2015.
- KALIMUTHU, Kalishwaralal *et al.* Gold nanoparticles stabilize peptide-drug-conjugates for sustained targeted drug delivery to cancer cells. **Journal of Nanobiotechnology**, [Londres], v. 16, n. 1, p. 34, 2018.
- KAM, Nadine Wong Shi; DAI, Hongjie. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: Generality and biological functionality. **Journal of the American Chemical Society**, [Washington DC], v. 127, n. 16, p. 6021–6026, 2005.
- KANDASAMY, Ganeshlenin *et al.* Functionalized hydrophilic superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia application in liver cancer treatment. **ACS Omega**, [Washington, DC], v. 3, n. 4, p. 3991–4005, 2018.
- KARIMZADEH, Sina; SAFAEI, Babak; JEN, Tien-Chien. Theoretical investigation of adsorption mechanism of doxorubicin anticancer drug on the pristine and functionalized single-walled carbon nanotube surface as a drug delivery vehicle: A DFT study. **Journal of Molecular Liquids**, [Amsterdam], v. 322, p. 114890, 2021.
- KAUR, Gurjeet *et al.* Extending the depth of human plasma proteome coverage using simple fractionation techniques. **Journal of Proteome Research**, [Washington DC], v. 20, n. 2, p. 1261–1279, 2021.

KHAN, A. R.; AL-WAHEAB, I. R.; AL-HADDAD, A. A generalized equation for adsorption isotherms for multi-component organic pollutants in dilute aqueous solution. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 13–23, 1996.

KIM, Jinku. Systematic approach to characterize the dynamics of protein adsorption on the surface of biomaterials using proteomics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 188, p. 110756, 2020.

KIM, Yong-In; CHO, Je-Yoel. Gel-based proteomics in disease research: Is it still valuable?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1867, n. 1, p. 9–16, 2019.

KIRTONIA, Anuradha; SETHI, Gautam; GARG, Manoj. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 77, n. 22, p. 4459–4483, 2020.

KISER, Jianying Z. *et al.* Streptomyces erythraeus trypsin for proteomics applications. **Journal of Proteome Research**, [Washington DC], v. 8, n. 4, p. 1810–1817, 2009.

KITATA, Reta Birhanu; YANG, Jih-Ci; CHEN, Yu-Ju. Advances in data-independent acquisition mass spectrometry towards comprehensive digital proteome landscape. **Mass Spectrometry Reviews**, [Nova Jersey], v. 42, n. 6, p. 2324–2348, 2023.

KOÇ, Emine *et al.* The detailed comparison of cell death detected by annexin V-PI counterstain using fluorescence microscope, flow cytometry and automated cell counter in mammalian and microalgae cells. **Journal of Fluorescence**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1393–1404, 2018.

KOPAC, Turkan; BOZGEYIK, Kadriye; FLAHAUT, Emmanuel. Adsorption and interactions of the bovine serum albumin-double walled carbon nanotube system. **Journal of Molecular Liquids**, [Amsterdam], v. 252, p. 1–8, 2018.

KOPPENAAL, David W. *et al.* MS Detectors. **Analytical Chemistry**, [Washington, DC], v. 77, n. 21, p. 418 A-427 A, 2005.

KRUSZEWSKA, Joanna; ZAJDA, Joanna; MATCZUK, Magdalena. How to effectively prepare a sample for bottom-up proteomic analysis of nanoparticle protein corona? A critical review. **Talanta**, [Amsterdam], v. 226, p. 122153, 2021.

KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H. Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. *In*: KUETE, Victor. **Medicinal spices and vegetables from Africa**. London: Academic Press, 2017. p. 271–297.

LAGO, Ayla Campos do *et al.* Magnetic restricted-access carbon nanotubes for dispersive solid phase extraction of organophosphates pesticides from bovine milk samples. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 1102, p. 11–23, 2020.

- LANGMUIR, Irving. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. **Journal of the American Chemical Society**, [Washington, DC], v. 38, n. 11, p. 2221–2295, 1916.
- LEA, Tor. Caco-2 cell line. *In*: VERHOECKX, K., et al. **The Impact of Food Bioactives on Health**. Cham: Springer. 2015. p.103-111.
- LEE, Pey Yee *et al.* Plasma/serum proteomics: Depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery. **Bioanalysis**, [Abingdon], v. 11, n. 19, p. 1799–1812, 2019.
- LENTH, Russell V. Response-surface methods in R, using rsm. **Journal of Statistical Software**, [Los Angeles], v. 32, n. 7, 2009.
- LI, Lili *et al.* Interaction of carboxylated single-walled carbon nanotubes with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [Amsterdam], v. 105, p. 45–51, 2013.
- LI, Yilin *et al.* Recent advances in nanoporous materials as sample preparation techniques for peptidome research. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [Amsterdam], v. 120, p. 115658, 2019.
- LI, Hanmei *et al.* The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. **Acta Biomaterialia**, [Londres], v. 129, p. 57–72, 2021.
- LI, Chang *et al.* Towards higher sensitivity of mass spectrometry: A perspective from the mass analyzers. **Frontiers in Chemistry**, [Lausanne], v. 9, 2021.
- LIMA, Éder Cláudio; ADEBAYO, Matthew Ayorinde; MACHADO, Fernando Machado. Kinetic and equilibrium models of adsorption. *In*: BERGMANN, Carlos P.; MACHADO, Fernando (org.). **Carbon Nanomaterials as Adsorbents for Environmental and Biological Applications**. Springer, 2015. p. 33–69.
- LIN, Ziqing *et al.* Comprehensive characterization of swine cardiac troponin T proteoforms by top-down mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [Washington DC], v. 29, n. 6, p. 1284–1294, 2018.
- LIU, Runqiang *et al.* A novel electrochemical sensor based on  $\beta$ -cyclodextrin functionalized carbon nanosheets@carbon nanotubes for sensitive detection of bactericide carbendazim in apple juice. **Food Chemistry**, [Londres], v. 384, p. 132573, 2022.
- LOO, R. R. Ogorzalek; DALES, N.; ANDREWS, P. C. Surfactant effects on protein structure examined by electrospray ionization mass spectrometry. **Protein Science**, [Nova Jersey], v. 3, n. 11, p. 1975–1983, 1994.
- LOPES, Elaine C.N. *et al.* An alternative Avrami equation to evaluate kinetic parameters of the interaction of Hg(II) with thin chitosan membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, [Frisco], v. 263, n. 2, p. 542–547, 2003.

LOPEZ-CANOVAS, Lilia *et al.* Pulsed field gel electrophoresis: Past, present, and future. **Analytical Biochemistry**, [Frisco], v. 573, p. 17–29, 2019.

LOU, Kai *et al.* Comprehensive studies on the nature of interaction between carboxylated multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 243, p. 54–61, 2016.

LUNDBERG, Ante S *et al.* Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. **Oncogene**, [Basingstoke], v. 21, n. 29, p. 4577–4586, 2002.

MAIOLO, Daniele *et al.* Nanomedicine delivery: does protein corona route to the target or off road?. **Nanomedicine**, [Abingdon], v. 10, n. 21, p. 3231–3247, 2015.

MAITI, Debabrata *et al.* Carbon-based nanomaterials for biomedical applications: A recent study. **Frontiers in Pharmacology**, [Lausanne], v. 9, 2019.

MALHERBE, Rolando. **Adsorption and Diffusion in Nanoporous Materials**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 2018. p.318

MALVERN PANALYTICAL. **Tips and tricks for nanoparticles**. [S. l.]: MALVERN PANALYTICAL, 2014. Disponível em: <https://www.materials-talks.com/blog/2014/11/17/tips-tricks-for-nanoparticle-characterization/>. Acesso em: 1 jul. 2024.

MANDAL, Samir *et al.* Interaction of carbon nanoparticles to serum albumin: Elucidation of the extent of perturbation of serum albumin conformations and thermodynamical parameters. **Journal of Hazardous Materials**, [Amsterdam], v. 248–249, n. 1, p. 238–245, 2013.

MARCHESAN, Silvia *et al.* The winding road for carbon nanotubes in nanomedicine. **Materials Today**, [Kidlington], v. 18, n. 1, p. 12–19, 2015.

MARSH, Harry; REINOSO, Francisco Rodríguez. **Activated carbon**. [S. l.]: Elsevier, 2006. p.554.

MAY, Caroline *et al.* Instruments and methods in proteomics. *In*: WALKER, John M. **Methods in Molecular Biology**. Clifton: Springer .2011. p. 3–26.

MEDDA, Luca; MONDUZZI, Maura; SALIS, Andrea. The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific. **Chemical Communications**, [Cambridge], v. 51, n. 30, p. 6663–6666, 2015.

MEHDIZADEH GOHARI *et al.* Effects of claudin-1 on the action of clostridium perfringens Enterotoxin in Caco-2 Cells. **Toxins**, [Basel], v. 11, n. 10, p. 582, 2019.

MEJIA, María; MURILLO, Edwin. Study of the structural, thermal, rheological and film properties of functional copolymers of hydroxyethyl acrylate and methyl methacrylate. **Polímeros**, São Carlos, v. 26, n. 3, p. 254–261, 2016.

MELBY, Jake A. *et al.* Novel strategies to address the challenges in top-down proteomics. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [Washington DC], v. 32, n. 6, p. 1278–1294, 2021.

MENDES, Tássia Venga *et al.* Synthesis and characterization of a new magnetic restricted access molecularly imprinted polymer for biological sample preparation. **Materials Today Communications**, [Londres], v. 24, n. May 2019, p. 101002, 2020.

MENEZES, M. L.; FÈLIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [Boca Raton], v. 21, n. 18, p. 2863–2871, 1998.

MENG, Xiangyu *et al.* Fenton reaction-based nanomedicine in cancer chemodynamic and synergistic therapy. **Applied Materials Today**, [Kidlington], v. 21, p. 100864, 2020.

MESSNER, Christoph B. *et al.* Mass spectrometry-based high-throughput proteomics and its role in biomedical studies and systems biology. **Proteomics**, [Weinheim], v. 23, n. 7–8, 2023.

MIN, Kyoung Ah *et al.* Transcellular transport of heparin-coated magnetic iron oxide nanoparticles (Hep-MION) under the influence of an applied magnetic field. **Pharmaceutics**, [Basel], v. 2, n. 2, p. 119–135, 2010.

MOHAMMAD AMINZADEH, Farkhondeh; ZEYNIZADEH, Behzad. Immobilized nickel boride nanoparticles on magnetic functionalized multi-walled carbon nanotubes: a new nanocomposite for the efficient one-pot synthesis of 1,4-benzodiazepines. **Nanoscale Advances**, [Cambridge], v. 5, n. 17, p. 4499–4520, 2023.

MOLECULAR PROBES. CellMask™ Plasma Membrane Stains. **Image (Rochester, N.Y.)**, [s. l.], p. 1–5, 2007.

MONTES-FONSECA, Silvia Lorena *et al.* Cytotoxicity of protein-carbon nanotubes on J774 macrophages is a functionalization grade-dependent effect. **BioMed Research International**, [Londres], v. 2015, p. 1–8, 2015.

MORARU, Cristina *et al.* Understanding the factors influencing chitosan-based nanoparticles-protein corona interaction and drug delivery applications. **Molecules**, [Basel], v. 25, n. 20, p. 4758, 2020.

MOZAFFARI MAJD, Mahdiah *et al.* Adsorption isotherm models: A comprehensive and systematic review (2010–2020). **Science of The Total Environment**, [Amsterdam], v. 812, p. 151334, 2022.

MURJANI, Bhushan O. *et al.* Carbon nanotubes in biomedical applications: current status, promises, and challenges. **Carbon Letters**, [Londres], v. 32, n. 5, p. 1207–1226, 2022.

MURPHY, Fiona A. *et al.* Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 178, n. 6, p. 2587–2600, 2011.

MUZI, Laura *et al.* Interactions and effects of BSA-functionalized single-walled carbon nanotubes on different cell lines. **Nanotechnology**, [Bristol], v. 27, n. 15, p. 0, 2016.

NAIK, Bhanudas; GHOSH, Narendra. A review on chemical methodologies for preparation of mesoporous silica and alumina based materials. **Recent Patents on Nanotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 213–224, 2009.

NAIR; SAIYED; GANDHI. Magnetic nanoformulation of azidothymidine 5'-triphosphate for targeted delivery across the blood-brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, [Auckland], p. 157, 2010.

NALESSO, Paulo Roberto Lopes *et al.* Early in vivo osteogenic and inflammatory response of 3D printed polycaprolactone/carbon nanotube/hydroxyapatite/tricalcium phosphate composite scaffolds. **Polymers**, [Londres], v. 15, n. 13, p. 2952, 2023.

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do *et al.* **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais**. 2ªed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020.

NETZEL, Michael *et al.* Release and absorption of carotenes from processed carrots (*Daucus carota*) using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model. **Food Research International**, [Londres], v. 44, n. 4, p. 868–874, 2011.

NICE, Edouard C. The separation sciences, the front end to proteomics: An historical perspective. **Biomedical Chromatography**, [Chichester], v. 35, n. 1, 2021.

NIKBAKHT, Mohammad *et al.* Evaluation of the effects of hyaluronic acid on poly (3-hydroxybutyrate)/chitosan/carbon nanotubes electrospun scaffold: structure and mechanical properties. **Polymer-Plastics Technology and Materials**, [Boca Raton], v. 58, n. 18, p. 2031–2040, 2019.

OLIVEIRA, Sabrina F. *et al.* Protein functionalized carbon nanomaterials for biomedical applications. **Carbon**, [Londres], v. 95, p. 767–779, 2015.

OMANOVIC-MIKLICANIN, Enisa; MANFIELD, Iain; WILKINS, Terry. Application of isothermal titration calorimetry in evaluation of protein–nanoparticle interactions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 127, n. 1, p. 605–613, 2017.

ORHAN, Hande *et al.* Bacteria killer enzyme attached magnetic nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, [Amsterdam], v. 94, n. October 2018, p. 558–564, 2019.

PACURARI, M. *et al.* Cell permeability, migration, and reactive oxygen species induced by multiwalled carbon nanotubes in human microvascular endothelial cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, [Abingdon], v. 75, n. 2, p. 112–128, 2012.

PALMIERI, Valentina; SPIRITO, Marco De; PAPI, Massimiliano. Graphene-based scaffolds for tissue engineering and photothermal therapy. **Nanomedicine**, [Abingdon], v. 15, n. 14, p. 1411–1417, 2020.

PAN, H; JIANG, H; CHEN, W. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. **Biomaterials**, [Londres], v. 27, n. 17, p. 3209–3220, 2006.

PARK, Wooram *et al.* Advanced hybrid nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, [Londres], v. 114, p. 100686, 2020.

PAROLIN, Mônica Beatriz; REASON, Iara J. Messias. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 138–144, 2001.

PEDROL, Nuria Bonjoch; RAMOS, Pilar Tamayo. Free proline quantification. *In*: BONJOCH, N. P.; TAMAYO, P. R. **Handbook of Plant Ecophysiology Techniques**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001. P. 365-382.

PICHARDO, Silvia *et al.* Oxidative stress responses to carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. **Toxicology in Vitro**, [Londres], v. 26, n. 5, p. 672–677, 2012.

PINHEIRO, R.G.R *et al.* Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [Amsterdam], v. 148, p. 105314, 2020.

PLAZINSKI, Wojciech; RUDZINSKI, Wladyslaw; PLAZINSKA, Anita. Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [Amsterdam], v. 152, n. 1–2, p. 2–13, 2009.

PONZINI, Erika *et al.* Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery. **Mass Spectrometry Reviews**, [Nova Jersey], v. 41, n. 5, p. 842–860, 2022.

PRAJAPATI, Shiv Kumar *et al.* Hyaluronic acid conjugated multi-walled carbon nanotubes for colon cancer targeting. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Londres], v. 123, p. 691–703, 2019.

QIU, Hui *et al.* Critical review in adsorption kinetic models. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE A**, [Pequim], v. 10, n. 5, p. 716–724, 2009.

QUAN, Kecheng *et al.* Artificial channels in an infectious biofilm created by magnetic nanoparticles enhanced bacterial killing by antibiotics. **Small** [Weinheim], v. 1902313, p. 1–6, 2019.

RAFFA, Vittoria *et al.* Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells?. **Carbon**, [Londres], v. 46, n. 12, p. 1600–1610, 2008.

RANI, Kirti. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectral analysis of BSA nanoparticles (BSA NPs) and egg albumin nanoparticles (EA NPs). **Research Journal of Chemical Sciences**, [Indore], v. 6, n. 2, p. 29–36, 2016.

REDDY, L. Harivardhan *et al.* Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. **Chemical Reviews**, [Washington DC], v. 112, n. 11, p. 5818–5878, 2012.

REDLICH, O.; PETERSON, D L. A useful adsorption isotherm. **The Journal of Physical Chemistry**, [Washington DC], v. 63, n. 6, p. 1024–1024, 1959.

REHMAN, Abdur *et al.* Integrated core proteomics, subtractive proteomics, and immunoinformatics investigation to unveil a potential multi-epitope vaccine against Schistosomiasis. **Vaccines**, [Basel], v. 9, n. 6, p. 658, 2021.

RIGHETTI, Pier Giorgio *et al.* Protein Equalizer™ Technology: The quest for a “democratic proteome”. **Proteomics**, [Weinheim], v. 6, n. 14, p. 3980–3992, 2006.

RIGUEIRA, Leila M B *et al.* Identification of metal-binding to proteins in seed samples using RF-HPLC-UV, GFAAS and MALDI-TOF-MS. **Food Chemistry**, [Londres], v. 211, p. 910–915, 2016.

ROGERO, Sizue Ota *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

ROGERS, John C.; BOMGARDEN, Ryan D. Sample preparation for mass spectrometry-based proteomics; From proteomes to peptides. *In*: MIRZAEI, H., CARRASCO, M. (eds) **Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol 919. New Yorker: Springer, Cham, 2016. p. 43–62.

ROSA, Mariana Azevedo *et al.* Biological sample preparation by using restricted-access nanoparticles prepared from bovine serum albumin: application to liquid chromatographic determination of  $\beta$ -blockers. **Microchimica Acta**, [Wien], v. 186, n. 9, p. 647, 2019.

ROTOLI, Bianca Maria *et al.* Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells. **Toxicology Letters**, [Amsterdam], v. 178, n. 2, p. 95–102, 2008.

ROZANOVA, Svitlana *et al.* Quantitative mass spectrometry-based proteomics: An overview. *In*: MARCUS, K.; EISENACHER, M.; SITEK, B. (org.). **Quantitative Methods in Proteomics. Methods in Molecular Biology**. New York: Humana, 2021. v. 2228, p. 85–116.

SACCHETTI, Cristiano *et al.* Surface polyethylene glycol conformation influences the protein corona of polyethylene glycol-modified single-walled carbon nanotubes: Potential implications on biological performance. **ACS Nano**, [Washington DC], v. 7, n. 3, p. 1974–1989, 2013.

SAGHAFI, Ava *et al.* Preconcentration and determination of four antibiotics in biological samples using nanofluid-assisted magnetic dispersive micro-solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 901–911, 2022.

SAHOO, Tapas Ranjan; PRELOT, Benedicte. Adsorption processes for the removal of contaminants from wastewater. *In*: BONELLI, Barbara *et al.* **Nanomaterials for the detection and removal of wastewater pollutants**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 161–222..

SAKULKHU, Usawadee *et al.* Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats. **Nanoscale**, [Cambridge], v. 6, n. 19, p. 11439–11450, 2014.

SAKULKHU, Usawadee *et al.* Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings. **Scientific Reports**, [Londres], v. 4, n. 1, p. 5020, 2015.

SANTAMARIA, Annette B.; SAYES, Christie M. Toxicological studies with nanoscale materials. *In*: HULL, Matthew; BOWMAN, Diana. **Nanotechnology environmental health and safety**. 3rd. ed. New York: William Andrew, 2019. p. 3–47.

SANTOS, Mariane Gonçalves *et al.* Use of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with bovine serum albumin for the separation of lysozyme from chicken egg white. **Food Chemistry**, [Londres], v. 353, p. 129442, 2021.

SEDAGHAT ANBOUHI, Tabassom *et al.* Albumin binding, anticancer and antibacterial properties of synthesized zero valent iron nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, [Auckland], v. Volume 14, p. 243–256, 2018.

SEEVARATNAM, Rajini; PATEL, Barkha P.; HAMADEH, Mazen J. Comparison of total protein concentration in skeletal muscle as measured by the Bradford and Lowry assays. **Journal of Biochemistry**, [Oxford], v. 145, n. 6, p. 791–797, 2009.

SEGERITZ, Charis-P.; VALLIER, Ludovic. Cell culture. *In*: JALALI, Morteza; SALDANHA, Francesca; JALALI, Mehdi. **Basic science methods for clinical researchers**. London: Academic Press, 2016. p. 151–172.

SEN GUPTA, Susmita; BHATTACHARYYA, Krishna G. Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [Amsterdam], v. 162, n. 1–2, p. 39–58, 2011.

SENTHIL KUMAR, P.; GAYATHRI, R. Adsorption of Pb<sup>2+</sup> ions from aqueous solutions onto bael tree leaf powder: Isotherms, kinetics and thermodynamics study. **Journal of Engineering Science and Technology**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 381–399, 2009.

SERESHTI, Hassan *et al.* Removal of phosphate and nitrate ions aqueous using strontium magnetic graphene oxide nanocomposite: Isotherms, kinetics, and thermodynamics studies.

- Environmental Progress & Sustainable Energy**, [Nova Iorque], v. 39, n. 2, p. e13332, 2020.
- SERPELL, Christopher J.; KOSTARELOS, Kostas; DAVIS, Benjamin G. Can carbon nanotubes deliver on their promise in biology? Harnessing unique properties for unparalleled applications. **ACS Central Science**, [Washington, DC], v. 2, n. 4, p. 190–200, 2016.
- SERRANO, M. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, [Londres], v. 25, n. 25, p. 5603–5611, 2004.
- SHANNAHAN, Jonathan H. *et al.* Comparison of nanotube-protein corona composition in cell culture media. **Small**, [Weinheim], v. 9, n. 12, p. 2171–2181, 2013.
- SHAO, Wei *et al.* A new carbon nanotube-based breast cancer drug delivery system: Preparation and in vitro analysis using paclitaxel. **Cell Biochemistry and Biophysics**, [Nova Iorque], v. 71, n. 3, p. 1405–1414, 2015.
- SHARMA, Abhinav *et al.* Single-walled carbon nanotube based transparent immunosensor for detection of a prostate cancer biomarker osteopontin. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 869, p. 68–73, 2015.
- SHARMA, Bhupesh; LUHACH, Kanishk; KULKARNI, G.T. In vitro and in vivo models of BBB to evaluate brain targeting drug delivery. *In*: GAO, Huile; GAO, Xiaoling, **Brain targeted drug delivery system**. London: Academic Press, 2019. p. 53–101.
- SHARPE, Martyn A. *et al.* Rotating magnetic fields inhibit mitochondrial respiration, promote oxidative stress and produce loss of mitochondrial integrity in cancer cells. **Frontiers in Oncology**, [Lausanne], v. 11, 2021.
- SHRESTHA, Bishnu Kumar *et al.* Bio-inspired hybrid scaffold of zinc oxide-functionalized multi-wall carbon nanotubes reinforced polyurethane nanofibers for bone tissue engineering. **Materials & Design**, [Londres], v. 133, p. 69–81, 2017.
- SILVA, Suely Alves *et al.* Citotoxicidade in vitro de nanopartículas de fosfato tricálcico- $\beta$  sintetizado via reação em estado sólido. **Matéria**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, 2019.
- SILVA, Sandra G. *et al.* Serine-based surfactants as effective antimicrobial agents against multiresistant bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [Amsterdam], v. 1864, n. 9, p. 183969, 2022.
- SING, K S W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). **Pure and Applied Chemistry**, [Berlim], v. 57, n. 4, p. 603–619, 1985.
- SINGH, Anand P; MIA, Md. Babu; SAXENA, Rajiv K. Acid-functionalized single-walled carbon nanotubes alter epithelial tight junctions and enhance paracellular permeability. **Journal of Biosciences**, [Nova Deli], v. 45, n. 1, p. 23, 2020.

SIPS, Robert. On the structure of a catalyst surface. **The Journal of Chemical Physics**, [Nova Iorque], v. 16, n. 5, p. 490–495, 1948.

SMIRI, M. *et al.* Remove of humic acid from water using magnetite nanoparticles. **European Journal of Advanced Chemistry Research**, [Londres], v. 1, n. 4, 2020.

SMITH, Bradley J.; MARTINS-DE-SOUZA, Daniel. Biological applications for LC-MS-based proteomics. *In*: SIMIONATO, Colnaghi 2021. **Separation Techniques Applied to Omics Sciences**. Springer International Publishing, 2021. p. 17–29.

SONI, Neeraj *et al.* Single-file translocation dynamics of SDS-denatured, whole proteins through sub-5 nm solid-state nanopores. **ACS Nano**, [Washington DC], v. 16, n. 7, p. 11405–11414, 2022.

SOUSA, Filipa *et al.* Current insights on antifungal therapy: Novel nanotechnology approaches for drug delivery systems and new drugs from natural sources. **Pharmaceuticals**, [Basel], v. 13, n. 9, p. 1–30, 2020.

SOWEMIMO-COKER, Samuel O. Red blood cell hemolysis during processing. **Transfusion Medicine Reviews**, [Frisco], v. 16, n. 1, p. 46–60, 2002.

SPERLING, Karl. From proteomics to genomics. **Electrophoresis**, [Weinheim], v. 22, n. 14, p. 2835–2837, 2001.

SUGIO, S *et al.* **Protein data bank**: Crystal structure of human serum albumin. [*S. l.*], 1998.

SUVARNA, Meghna *et al.* understanding the stability of nanoparticle-protein interactions: Effect of particle size on adsorption, conformation and thermodynamic properties of serum albumin proteins. **ACS Applied Nano Materials**, [Washington DC], v. 1, n. 10, p. 5524–5535, 2018.

TADJARODI, Azadeh; HAGHVERDI, Marzieh; MOHAMMADI, Vahid. Preparation and characterization of nano-porous silica aerogel from rice husk ash by drying at atmospheric pressure. **Materials Research Bulletin**, [*s. l.*], v. 47, n. 9, p. 2584–2589, 2012.

TAGHAVI, Sahar *et al.* Polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes tagged with AS1411 aptamer for combination gene and drug delivery into human gastric cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, [Basel], v. 516, n. 1–2, p. 301–312, 2017.

TAKAHASHI, Toru *et al.* Effect of dispersibility of carbon nanotubes on the hardness and thermal properties of polyphenylene sulphide/carbon nanotube composites obtained using solution mixing and melt blending methods. **Materials Science and Engineering: B**, [Amsterdam], v. 295, p. 116579, 2023.

TAKARA. **Product overview**: Cell viability and proliferation measurement. [*S. l.*]: TAKARA, 2023. Disponível em: <https://www.takarabio.com/learning-centers/gene-function/cell-biology-assays/technical-notes/cell-viability-and-proliferation-measurement>. Acesso em: 1 jul. 2024.

TAN, K.L.; HAMEED, B.H. Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [Taipei], v. 74, p. 25–48, 2017.

TENZER, Stefan *et al.* Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. **Nature Nanotechnology**, [Londres], v. 8, n. 10, p. 772–781, 2013.

THERMO SCIENTIFIC. Hoechst 33342. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2006, n. 1, p. pdb.caut447, 2006.

THIEDE, Bernd *et al.* Peptide mass fingerprinting. **Methods**, [Washington DC], v. 35, n. 3, p. 237–247, 2005.

THOMMES, Matthias *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, [Berlim], v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.

THOMSEN, L. B. *et al.* Uptake and transport of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through human brain capillary endothelial cells. **ACS Chemical Neuroscience**, [Washington DC], v. 4, n. 10, p. 1352–1360, 2013.

TÓTH, József. A uniform interpretation of gas/solid adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, [Frisco], v. 79, n. 1, p. 85–95, 1981.

TSIATSIANI, Liana; HECK, Albert J. R. Proteomics beyond trypsin. **The FEBS Journal**, [Chichester], v. 282, n. 14, p. 2612–2626, 2015.

TSUCHIDA, Sachio; UMEMURA, Hiroshi; NAKAYAMA, Tomohiro. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. **Molecules**, [Basel], v. 25, n. 20, p. 4775, 2020.

URBACH FREDERIK, Nils and Ahlemann. Structural equation modeling in information systems research using partial least squares. **Journal of Information Technology Theory and Application (JITTA)**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 5–40, 2010.

VERHEGGEN, Kenneth *et al.* Anatomy and evolution of database search engines—a central component of mass spectrometry based proteomic workflows. **Mass Spectrometry Reviews**, [Nova Jersey], v. 39, n. 3, p. 292–306, 2020.

VIJAYARAGHAVAN, K.; PALANIVELU, K.; VELAN, M. Biosorption of copper(II) and cobalt(II) from aqueous solutions by crab shell particles. **Bioresource Technology**, [Londres], v. 97, n. 12, p. 1411–1419, 2006.

WALRAND, Stéphane *et al.* Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. **Clinica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 331, n. 1–2, p. 103–110, 2003.

WANG, You-Xiong *et al.* Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. **Pharmaceutical Research**, [Dordrecht], v. 21, n. 8, p. 1362–1373, 2004.

WANG, Jianlong; GUO, Xuan. Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. **Journal of Hazardous Materials**, [Amsterdam], v. 390, p. 122156, 2020.

WEBER, Walter J. Jr.; MORRIS, J. Carrel. Kinetics of adsorption on carbon from solution. **Journal of the Sanitary Engineering Division**, [*s. l.*], v. 89, p. 31–59, 1963.

WHICHER, J.T. Abnormalities of plasma proteins. *In*: WILLIAMS, David. L. and MARKS, Vincent. **Scientific foundations of biochemistry in clinical practice**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994. p. 464–494.

WILHELM, Mathias *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. **Nature**, [Londres], v. 509, n. 7502, p. 582–587, 2014.

WINZEN, S. *et al.* Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition. **Nanoscale**, [Cambridge], v. 7, n. 7, p. 2992–3001, 2015.

WU, Zhijie *et al.* Comprehensive characterization of the recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase by top-down mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [Washington DC], v. 30, n. 12, p. 2561–2570, 2019.

WU, Feng-Chin; TSENG, Ru-Ling; JUANG, Ruey-Shin. Initial behavior of intraparticle diffusion model used in the description of adsorption kinetics. **Chemical Engineering Journal**, [Nova Iorque], v. 153, n. 1–3, p. 1–8, 2009.

YANG, Di *et al.* Paracellular permeability changes induced by multi-walled carbon nanotubes in brain endothelial cells and associated roles of hemichannels. **Toxicology**, [Amsterdam], v. 440, p. 152491, 2020.

YE, Dong *et al.* Low uptake of silica nanoparticles in Caco-2 intestinal epithelial barriers. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [Frankfurt], v. 8, p. 1396–1406, 2017.

YE, Dong; DAWSON, Kenneth A.; LYNCH, Iseult. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. **The Analyst**, [Rockville], v. 140, n. 1, p. 83–97, 2015.

ZADEHNAJAR, Parisa *et al.* Preparation and characterization of poly  $\epsilon$ -caprolactone-gelatin/multi-walled carbon nanotubes electrospun scaffolds for cartilage tissue engineering applications. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, [Abingdon], v. 69, n. 5, p. 326–337, 2020.

ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thais B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZALUZEC, E.J.; GAGE, D.A.; WATSON, J.T. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: Applications in peptide and protein characterization. **Protein Expression and Purification**, [Frisco], v. 6, n. 2, p. 109–123, 1995.

ZARBIN, Aldo J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.

ZENG, Xiaoliang *et al.* Encapsulating carbon nanotubes with SiO<sub>2</sub>: A strategy for applying them in polymer nanocomposites with high mechanical strength and electrical insulation. **Journal of Materials Chemistry C**, [Abingdon], v. 3, n. 1, p. 187–195, 2015.

ZERDA, Adam De La *et al.* Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice. **Nano Letters**, [Washington DC], v. 10, n. 6, p. 2168–2172, 2010.

ZHANG, Yong. Cell toxicity mechanism and biomarker. **Clinical and Translational Medicine**, [Nova Jersey], v. 7, n. 1, 2018.

ZHANG, Fangfei *et al.* Data-independent acquisition mass spectrometry-based proteomics and software tools: A Glimpse in 2020. **Proteomics**, [Weinheim], v. 20, n. 17–18, 2020.

ZHANG, Ruirui *et al.* Effects of food constituents on absorption and bioaccessibility of dietary synthetic phenolic antioxidant by Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington DC], v. 68, n. 16, p. 4670–4677, 2020.

ZHANG, Dawei *et al.* Gold nanoparticles stimulate differentiation and mineralization of primary osteoblasts through the ERK/MAPK signaling pathway. **Materials Science and Engineering C**, [Amsterdam], v. 42, p. 70–77, 2014.

ZHANG, Yu Shrike *et al.* Labeling human mesenchymal stem cells with gold nanocages for in vitro and in vivo tracking by two-photon microscopy and photoacoustic microscopy. **Theranostics**, [Sydney], v. 3, n. 8, p. 532–543, 2013.

ZHANG, Ting *et al.* MWCNT interactions with protein: Surface-induced changes in protein adsorption and the impact of protein corona on cellular uptake and cytotoxicity. **International Journal of Nanomedicine**, [Auckland], v. 14, p. 993–1009, 2019.

ZHANG, Li *et al.* One-step maltose-functionalization of magnetic nanoparticles based on self-assembled oligopeptides for selective enrichment of glycopeptides. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 1088, p. 63–71, 2019.

ZHANG, Yuhang *et al.* Sustainable nanomaterials for biomedical applications. **Pharmaceutics**, [Basel], v. 15, n. 3, p. 922, 2023.

ZHAO, Tingkai *et al.* Electromagnetic wave absorbing properties of amorphous carbon nanotubes. **Scientific Reports**, [Londres], v. 4, n. 1, p. 5619, 2015.

ZHAO, Yan *et al.* Mining the human plasma proteome with three-dimensional strategies by high-resolution quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 904, p. 65–75, 2016.

ZHAO, Ru-Zhou *et al.* Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, [*s. l.*], 2019.

ZHOU, Lulu *et al.* Multi-walled carbon nanotubes: A cytotoxicity study in relation to functionalization, dose and dispersion. **Toxicology in Vitro**, [Londres], v. 42, p. 292–298, 2017.

ZHU, Zaifang; LU, Joann J.; LIU, Shaorong. Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 709, p. 21–31, 2012.