

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**DIALISON TEIXEIRA DE CARVALHO**

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS PARA DEPLEÇÃO DE  
ALBUMINA DE SORO SANGUÍNEO HUMANO**

**Alfenas/MG**

**2023**

**DIALISON TEIXEIRA DE CARVALHO**

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS PARA DEPLEÇÃO DE  
ALBUMINA DE SORO SANGUÍNEO HUMANO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de doutor 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**

**2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Carvalho, Diailison Teixeira de.

Nanopartículas magnéticas revestidas para depleção de albumina de soro sanguíneo humano / Diailison Teixeira de Carvalho. - Alfenas, MG, 2023. 292 f. : il. -

Orientador(a): Eduardo Costa Figueiredo..

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Depleção de proteínas. 2. Modelagem de adsorção. 3. Otimização de processos. 4. Nanopartículas magnéticas. 5. SDS-PAGE. I. Figueiredo., Eduardo Costa, orient. II. Título.

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS PARA DEPLEÇÃO DE ALBUMINA DE SORO SANGUÍNEO HUMANO

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica

Aprovado em: 24 de fevereiro de 2023

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo - Presidente e Orientador  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley  
Instituição: Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Luiz Alberto Beijo  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Costa de Figueiredo, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 19:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CÉSAR RICARDO TEIXEIRA TARLEY, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 19:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, Presidente**, em 24/02/2023, às 19:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Battaglia Hirata, Vice-Coordenador(a) de Pós-Graduação em Biotecnologia**, em 24/02/2023, às 19:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Alberto Beijo, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 19:27, 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 **0921956** e o código CRC **CA808B7F**.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a DEUS, pela plenitude da vida, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida e por nunca ter permitido que eu desistisse em todos os momentos de fraqueza.

Aos meus pais Luis e Amelia, meu irmão Thallysson e minha namorada Juliana, meus alicerces em todos os momentos, pelo apoio incondicional, pela compreensão nos momentos difíceis, paciência e por nunca medirem esforços pelo meu bem estar.

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade de realizar mais esse trabalho e às instituições parceiras que apoiaram a pesquisa (FAPEMIG e CNPq) e ao Programa de Pós-Graduação em Química.

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

Ao meu orientador professor Eduardo, e minha coorientadora, professora Mariane, pelos quais tenho grande admiração e respeito, agradeço por todo conhecimento compartilhado, exemplo, paciência, profissionalismo, amizade e confiança durante todos estes anos, pelas inúmeras contribuições, sugestões, disponibilidade, apoio, palavras de incentivo e por terem compartilhado sua vasta experiência.

Aos professores José Maurício, César Tarley, Luiz Beijo e Daniela, membros da banca de defesa pela prontidão em aceitar o convite. Aos professores José Maurício, Juliana e Daniela, membros da banca do exame de qualificação pela disponibilidade, valorosas correções e sugestões para melhora deste trabalho.

À toda equipe da Agência de Inovação da Unifal por todo suporte prestado para o pedido de patente do método desenvolvido na tese.

A todos os professores do Instituto de Química pelo conhecimento compartilhado durante as disciplinas do curso. A todos os membros do Instituto de Química pelo profissionalismo. Aos colegas do LATF pelo suporte, pelas inúmeras discussões, amizade, companheirismo e os muitos momentos de descontração.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**A todos vocês meus mais sinceros agradecimentos...**

*“Confie teus negócios ao Senhor e teus planos terão bons êxitos.”*

(BÍBLIA, PROVÉRBIOS, 16:3, 2002)

## RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido um processo de separação de proteínas de soro humano por adsorção utilizando-se nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com diferentes revestimentos. Na primeira etapa do processo obtém-se um sobrenadante de menor complexidade em que a albumina humana (HSA) pode ser depletada em diferentes quantidades. Ao contrário dos kits comerciais disponíveis, os quais descartam as proteínas adsorvidas nessa etapa de depleção, o método proposto permite a recuperação das proteínas codepletadas nas nanopartículas (depletoma) e da própria HSA, de modo que as amostras obtidas podem ser usadas para estudos do depletoma e até mesmo do albuminoma, que é a fração de proteínas que se ligam na HSA. As nanopartículas magnéticas (magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) foram sintetizadas pelo método de coprecipitação e revestidas com tetraetilortossilicato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$ ) e albumina de soro bovino ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$ ) e caracterizadas por difratometria de raio-X, termogravimetria, espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier, potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura, as quais confirmaram as modificações na superfície, revelaram alta estabilidade térmica e uma dependência da carga superficial em relação ao pH. As nanopartículas obtidas foram utilizadas para o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras de depleção de albumina de soro humano (HSA). Os estudos de otimização da adsorção da HSA nas nanopartículas foram feitos utilizando-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) e os resultados mostraram que o pH, a massa de nanopartícula e a concentração de HSA influenciam no processo de adsorção, sendo os pHs ótimos de adsorção de 3,5 e 4,5 para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$  respectivamente. Para ambas as nanopartículas, a cinética de adsorção foi descrita pelo modelo de ordem fracionária de Avrami, sendo o tempo de equilíbrio alcançado em 10 minutos. Com relação aos dados de equilíbrio de adsorção, os modelos que melhor se ajustaram foram as isotermas de Freundlich e Sips para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$  e de Freundlich e Harkins-Jura para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$ . As capacidades máximas de adsorção de HSA pelas nanopartículas foram estimadas pela isoterma de Langmuir em aproximadamente 11,93 e 14,89  $\text{mg g}^{-1}$  respectivamente. As condições de dessorção das proteínas adsorvidas nas superfícies e a reutilização das nanopartículas também foram otimizadas com DCCRs. Para ambas as nanopartículas a dessorção foi influenciada pelo pH (ótimos de

dessorção de 9,2 e 8,3 respectivamente) e volume do eluente de dessorção, mas as porcentagens de recuperações de HSA foram baixas, o que faz com que a reutilização das nanopartículas ainda seja inviável. As eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) mostraram padrões diferenciados das bandas de proteínas do soro quando se realizam depleções consecutivas utilizando-se as nanopartículas. Foi evidente que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  apresentaram maior afinidade pela HSA e eficiência na depleção. Uma característica importante apresentada pelo processo é a sua versatilidade, em que a quantidade de HSA a ser depletada pode ser controlada variando-se a massa de nanopartícula utilizada. Em suma, este estudo mostrou que a depleção, utilizando-se as nanopartículas, principalmente as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , provou ser uma técnica de preparo de amostras para a depleção rápida (em torno de 1 hora), confiável e específica de HSA, mesmo que tenham demonstrado codepleção de outras proteínas, conforme os estudos de SDS-PAGE. No entanto, na eletroforese do depletoma das proteínas dessorvidas das nanopartículas, boa parte destas proteínas codepletadas puderam ser recuperadas, o que reforça a eficiência e viabilidade das nanopartículas.

**Palavras-chave:** Adsorção; BSA; Cinética; Depleção; HSA; Isotermas; Magnetita; Otimização; SDS-PAGE; TEOS.

## ABSTRACT

In the present work, a process for the separation of human serum proteins by adsorption using magnetite magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) with different coatings was developed. In the first step of the process, a less complex supernatant is obtained in which human albumin (HSA) can be depleted in different amounts. Unlike available commercial kits, which discard the proteins adsorbed in this depletion step, the proposed method allows the recovery of proteins codepleted in the nanoparticles (depletome) and of the HSA itself, so that the samples obtained can be used for studies of the depletome and even albuminoma, which is the fraction of proteins that bind to HSA. The magnetite magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) were synthesized by the coprecipitation method and coated with tetraethylorthosilicate ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ ) and bovine serum albumin ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ ) and it were characterized by X-ray diffraction, thermogravimetry, spectroscopy in the infrared region by Fourier transform, zeta potential, scanning electron microscopy, which confirmed surface modifications, it revealed high thermal stability and a pH-dependent surface charge. The nanoparticles obtained were used for the development of a sample preparation method for human serum albumin (HSA) depletion. The optimization studies of the adsorption of HSA on nanoparticles were carried out using the central composite rotational design (RCCD), and the results showed that the pH, the nanoparticle mass and the HSA concentration influence in the adsorption process. The optimal adsorption pHs were 3.5 and 4.5 for  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  respectively. For both nanoparticles, the adsorption kinetics was described by the Avrami fractional order model, with the equilibrium time reached in 10 minutes. Regarding the adsorption equilibrium data, the models that best fit were the Freundlich and Sips isotherms for  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$  and Freundlich and Harkins-Jura for  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ . The maximum adsorption capacities of HSA by nanoparticles were estimated by the Langmuir isotherm at approximately 11.93 and 14.89  $\text{mg g}^{-1}$  respectively. The desorption conditions of the proteins adsorbed on the surface and the reuse of the nanoparticles were also optimized with RCCDs, for both nanoparticles the desorption was influenced by the pH (desorption optimum pH 9.2 and 8.3 respectively) and volume of the desorption eluent, but the percentages of HSA recovery were low, it makes the reuse of nanoparticles still unfeasible. Electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) showed different patterns of serum

protein bands when consecutive depletions were performed. It was evident that Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS showed greater affinity for HSA and efficiency in depletion. An important characteristic presented by the process is its versatility, in which the amount of HSA to be depleted can be controlled by varying the mass of nanoparticle used. In summary, this study showed that depletion using nanoparticles, mainly Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, proved to be a sample preparation technique for rapid (around 1 hour), reliable and specific depletion of HSA, even though they have demonstrated co-depletion of other proteins, according to studies on SDS-PAGE. However, in the electrophoresis of the depleted proteins desorbed from the nanoparticles, most codepleted protein could be recovered, which reinforces the efficiency and viability of the nanoparticles.

**Keywords:** Adsorption; BSA; Depletion; HSA; Isotherms; Kinetics; Magnetite; Optimization; SDS-PAGE; TEOS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Princípio da cromatografia de exclusão molecular.....	38
Figura 2 -	Representação de uma corrida das amostras em gel 1DE, em duplicata.....	43
Figura 3 -	Estrutura nativa da HSA.....	51
Figura 4 -	Representação esquemática do processo de equalização para redução da faixa de concentração de proteínas de uma amostra.....	58
Figura 5 -	Representação esquemática dos princípios da cromatografia de imunoafinidade por (a) imunodepleção (b) imunoenriquecimento.....	63
Figura 6 -	Esquematização das depleções consecutivas. ....	132
Figura 7 -	Nanopartículas obtidas em cada etapa.....	134
Figura 8 -	Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de $Fe_3O_4$ .....	141
Figura 9 -	Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de $Fe_3O_4@TEOS$ .....	142
Figura 10 -	Microscopia eletrônica de varredura de partículas de $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .....	143
Figura 11 -	Representação esquemática das $Fe_3O_4@TEOS$ .....	211
Figura 12 -	Curvas de calibração de HSA obtidas através de SDSPAGE.....	249
Figura 13 -	Perfil eletroforético dos eluatos de depleções consecutivas com $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ após separação via SDS.....	253
Figura 14 -	Perfil eletroforético dos eluatos de depleções consecutivas com $Fe_3O_4@TEOS$ após separação via SDS.....	256
Figura 15 -	Perfil eletroforético dos eluatos de dessorção das proteínas adsorvidas nas $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ após separação via SDS...	259
Figura 16 -	Perfil eletroforético dos eluatos de dessorção das proteínas adsorvidas nas $Fe_3O_4@TEOS$ após separação via SDS.....	262

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Padrões de difração de DRX das MNPs estudadas.....	135
Gráfico 2 - Análise termogravimétrica das nanopartículas: Termogravimetria (TG) Termogravimetria derivada (DTG).....	136
Gráfico 3 - Espectro de Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das nanopartículas.....	138
Gráfico 4 - Potencial zeta e ponto isoelétrico das nanopartículas e da HSA.....	139
Gráfico 5 - Potencial zeta médio das nanopartículas magnéticas.....	140
Gráfico 6 - Eficiência de remoção de HSA (%) predita pelo modelo em função da eficiência experimental para os dados de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	151
Gráfico 7 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA de acordo com as variáveis avaliadas duas a duas e fixando a terceira no valor correspondente ao ponto central do delineamento.....	152
Gráfico 8 - Ponto ótimo da análise ridge representado nas curvas de contorno do modelo da adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA de acordo com as variáveis.....	153
Gráfico 9 - Porcentagem de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA de acordo com o pH.....	154
Gráfico 10 - Curvas de potencial zeta das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA e da HSA.....	155
Gráfico 11 - Eficiência de remoção de HSA (%) predita pelo modelo em função da eficiência experimental para os dados de adsorção de HSA nas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	160
Gráfico 12 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS de acordo com as variáveis avaliadas duas a duas e fixando a terceira no valor correspondente ao ponto central do delineamento.....	161
Gráfico 13 - Curvas de contorno da análise <i>ridge</i> do modelo de otimização da adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS de acordo com as variáveis....	162

Gráfico 14 - Porcentagem de adsorção de HSA nas nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ de acordo com o pH.....	163
Gráfico 15 - Curvas de potencial zeta das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ e da HSA.....	163
Gráfico 16 - Modelos de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ ajustados.....	170
Gráfico 17 - Modelos de difusão intrapartícula de Weber para a cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	172
Gráfico 18 - Modelos de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .	178
Gráfico 19 - Modelos de difusão intrapartícula de Weber para cinética de adsorção de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	180
Gráfico 20 - Modelos de isothermas de dois parâmetros de adsorção de HSA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	193
Gráfico 21 - Modelo de isothermas de três parâmetros de adsorção de HSA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	194
Gráfico 22 - Isotherma de Jossens.....	195
Gráfico 23 - Fator de separação para a adsorção de HSA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	195
Gráfico 24 - Modelos de isothermas de dois parâmetros de adsorção de HSA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	208
Gráfico 25 - Modelo de isothermas de três parâmetros de adsorção de HSA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	209
Gráfico 26 - Fator de separação para a adsorção de HSA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	210
Gráfico 27 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental da dessorção de HSA das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	221
Gráfico 28 - Curvas de contorno e superfície de resposta do efeito do pH e do volume de eluente sobre a recuperação de HSA das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ de acordo com o modelo de dessorção.....	221
Gráfico 29 - Ponto ótimo da análise <i>ridge</i> das curvas de contorno do modelo ótimo para dessorção de HSA das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	222
Gráfico 30 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental de HSA após a reutilização das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	228

Gráfico 31 - Recuperação de HSA após a reutilização das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	229
Gráfico 32 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental da dessorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	236
Gráfico 33 - Curvas de contorno (a) e superfície de resposta (b) para o modelo de otimização da dessorção de HSA das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ de acordo com o modelo ótimo de dessorção.....	237
Gráfico 34 - Curvas de contorno da análise ridge do modelo de otimização da dessorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	238
Gráfico 35 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental após a reutilização das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ ...	244
Gráfico 36 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da reutilização das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ de acordo com as variáveis avaliadas.....	245
Gráfico 37 - Concentração de proteínas antes e depois da depleção com nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	246
Gráfico 38 - Concentração de proteínas antes e depois da depleção com nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	247
Gráfico 39 - Dados obtidos com a eletroforese e curvas de calibração de HSA ajustadas.....	252
Gráfico 40 - Quantidade de HSA adsorvida em cada etapa de depleção com $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	254
Gráfico 41 - Quantidade de HSA adsorvida em cada etapa de depleção com $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	257
Gráfico 42 - Estudo da dessorção da HSA das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ com diferentes soluções de dessorção.....	260
Gráfico 43 - Estudo da dessorção da HSA das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ com diferentes soluções de dessorção.....	263

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais PAAs do plasma/soro adsorvidas pelas colunas de depleção de imunoafinidade comumente disponíveis comercialmente.....	65
Tabela 2 -	Tipos de soluções e respectivas composições de possíveis soluções de eluição para dessorver proteínas capturadas por grânulos de biblioteca combinatória de ligantes peptídicos.....	69
Tabela 3 -	Principais métricas de avaliação da qualidade de ajuste para seleção de modelos.....	109
Tabela 4 -	Métricas de avaliação da qualidade de ajuste utilizadas para seleção dos modelos de cinética e isotermas.....	128
Tabela 5 -	Coeficientes de variação (%) dos calibradores das curvas de HSA conforme o pH.....	144
Tabela 6 -	Informações das curvas de calibração de HSA obtidas em diferentes pHs: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor- $p_m$ ) e coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ).....	145
Tabela 7 -	Análise de resíduos (pressuposições) das curvas de HSA em diferentes pHs.....	146
Tabela 8 -	Planejamento experimental para o estudo da adsorção de HSA nas nanopartículas de $Fe_3O_4@TEOS$ e de $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .....	147
Tabela 9 -	Análise de variância do modelo geral de adsorção de HSA em $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .....	148
Tabela 10 -	Informações da análise de variância do modelo reduzido de adsorção de HSA em $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .....	149
Tabela 11 -	Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos do modelo ajustado para adsorção de HSA em $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .....	149
Tabela 12 -	Estimativas dos coeficientes do modelo ótimo de adsorção reduzido de HSA em $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ , desvio padrão, estatística t e valor-p associados.....	150

Tabela 13 - Análise de variância do modelo geral de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	157
Tabela 14 - Análise de variância do modelo ótimo de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	158
Tabela 15 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ajustado para adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	158
Tabela 16 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo de adsorção reduzido de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.....	159
Tabela 17 - Coeficiente de variação para os calibradores da curva analítica em pH 3,5.....	165
Tabela 18 - Informações da curva de calibração de HSA em pH 3,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-pm) e coeficiente de determinação múltipla (R <sup>2</sup> ).....	166
Tabela 19 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos da curva de HSA em pH 3,5.....	167
Tabela 20 - Expressões, estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	167
Tabela 21 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	168
Tabela 22 - Critérios de seleção dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	168
Tabela 23 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA ajustados.....	169
Tabela 24 - Informações dos modelos de difusão intrapartícula de Weber - Morris no estudo de cinética de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	171
Tabela 25 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições dos modelos de difusão intrapartícula de Weber - Morris no estudo	

	de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .....	172
Tabela 26 -	Coeficientes de variação dos calibradores da curva de HSA em pH 4,5.....	173
Tabela 27 -	Informações da curva de calibração de HSA em pH 4,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor- $p_m$ ) e coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ).....	174
Tabela 28 -	Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições da curva de HSA em pH 4,5.....	174
Tabela 29 -	Equações, estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros dos modelos de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	175
Tabela 30 -	Análise das pressuposições dos modelos de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	175
Tabela 31 -	Critérios de informação dos modelos de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	176
Tabela 32 -	Métricas de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	177
Tabela 33 -	Informações dos modelos de difusão intrapartícula de Weber - Morris para os dados de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	178
Tabela 34 -	Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições dos modelos de Weber-Morris no estudo de cinética de adsorção de HSA em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .....	179
Tabela 35 -	Coeficientes de variação (%) para os calibradores da curva analítica de HSA em pH 3,5.....	181
Tabela 36 -	Informações da curva de calibração de HSA em pH 3,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor- $p_m$ ) e coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ).....	182
Tabela 37 -	Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos da curva de HSA em pH 3,5.....	182

Tabela 38 - Coeficientes de variação (%) para os dados de concentrações de HSA no equilíbrio e quantidades adsorvidas nas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA de acordo com as concentrações iniciais....	183
Tabela 39 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de dois parâmetros para adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	184
Tabela 40 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de três parâmetros para adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	185
Tabela 41 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições das isotermas de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	186
Tabela 42 - Critérios de seleção dos modelos de isotermas de adsorção de HSA nas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA. ....	187
Tabela 43 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos de isotermas de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	189
Tabela 44 - Comparação dos valores de $C_e^{m_{RP}-1}$ com o valor de K <sub>RP</sub> para as Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA. ....	192
Tabela 45 - Coeficientes de variação para os calibradores da curva analítica de HSA em pH 4,5.....	196
Tabela 46 - Informações da curva de calibração de HSA em pH 4,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p <sub>m</sub> ) e coeficiente de determinação múltipla (R <sup>2</sup> ) .....	197
Tabela 47 - Coeficiente de variação (%) para os calibradores da curva de HSA em pH 4,5 com o método de Bradford modificado.....	198
Tabela 48 - Informações da nova curva de calibração de HSA em pH 4,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p <sub>m</sub> ) e coeficiente de determinação múltipla (R <sup>2</sup> ).....	199
Tabela 49 - Coeficientes de variação (%) para os dados de concentrações de HSA no equilíbrio e quantidades adsorvidas nas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS de acordo com as concentrações iniciais.....	200

Tabela 50 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de adsorção de dois parâmetros para adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	201
Tabela 51 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de adsorção de três parâmetros para adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	202
Tabela 52 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos das isotermas de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	203
Tabela 53 - Valores dos critérios de seleção dos modelos de isotermas de adsorção de HSA nas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	204
Tabela 54 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste das isotermas de adsorção de HSA nas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	205
Tabela 55 - Comparação dos valores de $C_e^{m_{RP}-1}$ com o valor de K <sub>RP</sub> para as Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS. ....	207
Tabela 56 - Coeficientes de variação (%) dos calibradores das curvas de HSA nos pHs de 4,5; 6,5 e 8,5.....	215
Tabela 57 - Informações das curvas de calibração de HSA obtidas nos pHs de 4,5; 6,5 e 8,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p <sub>m</sub> ) e coeficiente de determinação múltipla (R <sup>2</sup> ).....	216
Tabela 58 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições das curvas de HSA obtidas nos pHs de 4,5; 6,5 e 8,5.....	217
Tabela 59 - Planejamento experimental e resposta (absorbância) para o estudo da dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	217
Tabela 60 - Análise de variância do modelo geral de otimização da dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	218
Tabela 61 - Análise de variância do modelo recalculado de otimização da dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	219
Tabela 62 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo da dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.....	219

Tabela 63 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ótimo de dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	220
Tabela 64 - Planejamento experimental e resposta (recuperação) para o estudo da reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	224
Tabela 65 - Análise de variância do modelo geral de otimização da reutilização das nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	225
Tabela 66 - Informações da análise de variância do modelo ótimo de recuperação de HSA na reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA....	226
Tabela 67 - Estimativas dos parâmetros, desvio padrão, estatística t e valor-p associados ao modelo ótimo para recuperação de HSA após a reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	226
Tabela 68 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo reduzido para recuperação de HSA após a reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA. ....	226
Tabela 69 - Coeficientes de variação (%) dos calibradores das curvas de HSA nos pHs de 6, 7,5 e 9.....	230
Tabela 70 - Informações das curvas de calibração de HSA obtidas nos pHs de 6, 7,5 e 9: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p <sub>m</sub> ) e coeficiente de determinação múltipla (R <sup>2</sup> ) .....	231
Tabela 71 - Análise das pressuposições das curvas de HSA obtidas nos pHs de 6, 7,5 e 9.....	231
Tabela 72 - Planejamento experimental e recuperação de HSA para o estudo da dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	232
Tabela 73 - Análise de variância do modelo geral de otimização da dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	233
Tabela 74 - Análise de variância do modelo ótimo de dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	234
Tabela 75 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo da dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.....	235
Tabela 76 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ótimo de dessorção de HSA das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	235

Tabela 77 - Planejamento experimental e resposta para o estudo da reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	240
Tabela 78 - Análise de variância do modelo geral de otimização da reutilização das nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	241
Tabela 79 - Informações da análise de variância do modelo ótimo de recuperação de HSA na reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	242
Tabela 80 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo de reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.....	243
Tabela 81 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ajustado para reutilização das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	243
Tabela 82 - Coeficientes de variação (%) para os calibradores da curva analítica de HSA obtida na eletroforese.....	250
Tabela 83 - Informações da curva de calibração de HSA obtida na eletroforese: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p <sub>m</sub> ) e coeficiente de determinação múltipla (R <sup>2</sup> ) .....	251
Tabela 84 - Análise das pressuposições da curva de HSA obtida com a eletroforese.....	251

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	Critério de Informação de Akaike
AICc	Critério de Informação de Akaike corrigido
ARE	Erro médio relativo (do inglês Average relative error)
BIC	Critério de Informação Bayesiano
BSA	Albumina sérica bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DCCR	Delineamento composto central rotacional
Dp-resid	Desvio padrão residual
DRX	Difratometria de Raios-X
EABS	Soma de erros absolutos
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Nanopartículas de magnetita
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS	Nanopartículas de magnetita revestidas com TEOS
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA	Nanopartículas de magnetita revestidas com TEOS e BSA
HSA	Albumina sérica humana
HYBRID	Erro fracionário híbrido
Log-veros	Log-verossimilhança
MNP	Nanopartícula magnética
MPSD	Desvio padrão percentual de Marquardt
MS	Espectrometria de massas
PAAAs	Proteínas de alta abundância
PBAAs	Proteínas de baixa abundância
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub>	Coefficiente de determinação ajustado
SRE	Desvio padrão do erro relativo
SSE	Soma de quadrado dos erros
TEOS	Tetraetilortossilicato
TG	Análise Termogravimétrica
χ <sup>2</sup>	Estatística de Qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
2.1	ESTUDOS PROTEÔMICOS E A BUSCA POR BIOMARCADORES.....	31
<b>2.1.1</b>	<b>Tecnologias utilizadas em proteômica.....</b>	<b>36</b>
2.1.1.1	Cromatografia por exclusão de tamanho.....	37
2.1.1.2	Técnica de eletroforese em gel 1D para separação de proteínas..	39
2.1.1.3	Espectrometria de massas.....	44
2.2	O MAIOR DESAFIO PARA ESTUDOS PROTEÔMICOS DO SORO HUMANO: AS PROTEÍNAS DE ALTA ABUNDÂNCIA.....	49
<b>2.2.1</b>	<b>Principais estratégias de separação de proteínas.....</b>	<b>53</b>
2.2.1.1	Separação por precipitação química.....	54
2.2.1.2	Métodos de enriquecimento e equalização.....	57
2.2.1.3	Métodos de depleção oligoespecífica.....	61
2.2.1.4	O grande desafio na depleção de PAAs: depleção cruzada de PBA.....	68
2.2.1.5	Métodos de depleção com materiais inteligentes.....	70
2.2.1.6	Nanopartículas magnéticas na separação de proteínas humanas em estudos proteômicos.....	75
2.3	O PROCESSO DE ADSORÇÃO.....	83
<b>2.3.1</b>	<b>Obtenção dos dados e modelagem do processo.....</b>	<b>85</b>
<b>2.3.2</b>	<b>A cinética de adsorção.....</b>	<b>86</b>
2.3.2.1	Modelo de pseudo-primeira ordem.....	87
2.3.2.2	Modelo de pseudo-segunda ordem.....	88
2.3.2.3	Modelo de Elovich.....	89
2.3.2.4	Modelo de ordem fracionária de Avrami.....	89
2.3.2.5	Modelo Weber e Morris ou modelo de difusão intrapartícula.....	90
<b>2.3.3</b>	<b>As isotermas de adsorção.....</b>	<b>91</b>
2.3.3.1	Isoterma de Langmuir.....	92
2.3.3.2	Isoterma de Freundlich.....	93
2.3.3.3	Isoterma de Dubinin-Radushkevich.....	94

2.3.3.4	Isoterma de Temkin.....	94
2.3.3.5	Isoterma de Elovich.....	95
2.3.3.6	Isoterma de Harkins-Jura.....	95
2.3.3.7	Isoterma de Halsey.....	96
2.3.3.8	Isoterma de Jovanovic.....	96
2.3.3.9	Isoterma de Sips.....	96
2.3.3.10	Isoterma de Koble-Corrigan.....	97
2.3.3.11	Isoterma de Toth.....	98
2.3.3.12	Isoterma de Redlich-Peterson.....	98
2.3.3.13	Isoterma de Langmuir-Freundlich.....	99
2.3.3.14	Isoterma de Hill.....	99
2.3.3.15	Isoterma de Khan.....	100
2.3.3.16	Isoterma de Radke-Plausnitz.....	100
2.3.3.17	Isoterma de BET.....	101
2.3.3.18	Isoterma de Jossens.....	102
<b>2.3.4</b>	<b>Regressão não linear: Conceitos, ajuste e seleção.....</b>	<b>103</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Aplicações do processo de adsorção.....</b>	<b>110</b>
2.3.5.1	Adsorção de poluentes.....	110
2.3.5.2	Adsorção de proteínas.....	111
2.4	OBJETIVOS.....	116
<b>2.4.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>116</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>116</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>117</b>
3.1	REAGENTES.....	117
3.2	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	117
<b>3.2.1</b>	<b>Síntese de magnetita.....</b>	<b>117</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Revestimento das nanopartículas com TEOS.....</b>	<b>118</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Revestimento das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS com BSA.....</b>	<b>118</b>
3.5	CARACTERIZAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS.....	119
<b>3.5.1</b>	<b>Difratometria de raios-X.....</b>	<b>119</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Análise termogravimétrica.....</b>	<b>119</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....</b>	<b>119</b>

<b>3.5.4</b>	<b>Potencial zeta.....</b>	<b>120</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Microscopias eletrônicas de varredura.....</b>	<b>120</b>
<b>3.6</b>	<b>ESTUDOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO.....</b>	<b>121</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Otimização da adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.....</b>	<b>121</b>
3.6.1.1	Avaliação complementar do efeito do pH na adsorção de HSA	121
<b>3.6.2</b>	<b>Estudos de cinética de adsorção.....</b>	<b>122</b>
3.6.2.1	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	122
3.6.2.2	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	123
<b>3.6.3</b>	<b>Estudos de isotermas de adsorção.....</b>	<b>123</b>
3.6.3.1	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	123
3.6.3.2	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	123
<b>3.6.4</b>	<b>Estudos de otimização da dessorção de HSA e reutilização das nanopartículas magnéticas.....</b>	<b>124</b>
3.6.4.1	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	124
3.6.4.2	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	126
<b>3.6.5</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>126</b>
<b>3.7</b>	<b>ANÁLISES DE AMOSTRAS DE SORO HUMANO.....</b>	<b>129</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Quantificação de proteínas totais.....</b>	<b>129</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Corridas de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS).....</b>	<b>129</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Diluições do soro.....</b>	<b>131</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Curvas de calibração.....</b>	<b>131</b>
<b>3.7.5</b>	<b>Depleções múltiplas.....</b>	<b>132</b>
<b>3.7.6</b>	<b>Dessorção.....</b>	<b>133</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>134</b>
4.1	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	134
4.2	CARACTERIZAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS.....	135
4.2.1	Difratometria de Raios-X (DRX).....	135
4.2.2	Análise termogravimétrica.....	136
4.2.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	137
4.2.4	Potencial zeta.....	139

<b>4.2.5</b>	<b>Microscopias eletrônicas de varredura.....</b>	<b>140</b>
4.3	ESTUDOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO.....	143
<b>4.3.1</b>	<b>Estudos de otimização da adsorção de HSA.....</b>	<b>144</b>
4.3.1.1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	147
4.3.1.2	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	157
<b>4.3.2</b>	<b>Estudos de cinética de adsorção.....</b>	<b>165</b>
4.3.2.1	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	165
4.3.2.2	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	173
<b>4.3.3</b>	<b>Estudos das isotermas de adsorção.....</b>	<b>181</b>
4.3.3.1	Isotermas de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	181
4.3.3.2	Isotermas de adsorção de HSA em Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	196
<b>4.3.4</b>	<b>Estudos de otimização da dessorção de HSA.....</b>	<b>214</b>
4.3.4.1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	214
4.3.4.1.1	<i>Otimização da reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.....</i>	223
4.3.4.2	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	230
4.3.4.2.1	<i>Otimização da reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.....</i>	239
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	246
<b>4.4.1</b>	<b>Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.....</b>	<b>246</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.....</b>	<b>247</b>
4.5	ELETROFORESE.....	248
<b>4.5.1</b>	<b>Curvas de calibração.....</b>	<b>248</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Eletroforese das depleções múltiplas.....</b>	<b>253</b>
4.5.2.1	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	253
4.5.2.2	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	255
<b>4.5.3</b>	<b>Eletroforese das dessorções.....</b>	<b>259</b>
4.5.3.1	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS@BSA.....	259
4.5.3.2	Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TEOS.....	261
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>265</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>267</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A análise do espectro de proteínas do plasma humano é um dos principais fundamentos da bioquímica clínica, por meio do qual é possível identificar várias alterações patológicas que refletem nos níveis de proteínas plasmáticas (KULLOLLI *et al.*, 2013) e também descobrir/quantificar novos biomarcadores clínicos que podem ser úteis no diagnóstico, prognóstico e avaliação da progressão de doenças (PIETROWSKA *et al.*, 2019).

O uso da proteômica para análises eficientes, precisas e completas de amostras clínicas apresenta uma variedade de desafios técnicos, como a presença de proteínas de alta abundância (PAAs), tais como a albumina (60%), globulinas, (35%) e fibrinogênio (4%), as quais podem mascarar a detecção de proteínas de menor abundância (PBAs) como as citocinas (GRANGER *et al.*, 2005; KULLOLLI *et al.*, 2013; STEEL *et al.*, 2003). Soma-se a isso o fato de que estas proteínas de baixa abundância, os potenciais biomarcadores, não apenas estão presentes em concentrações extremamente baixas ( $< 1 \text{ nmol L}^{-1}$ ), como ainda seus sinais de espectrometria de massas sofrem forte interferência de ambas PAAs e contaminantes que são introduzidos na amostra durante os procedimentos de pré-tratamento, tais como sais do tampão e surfactantes (LI; ZHANG; DENG, 2013).

Dessa forma, para obter-se uma maior sensibilidade nas análises do proteoma plasmático, há a necessidade de se purificar o plasma, retirando as proteínas majoritárias e enriquecendo as proteínas de interesse (ANDAC; GALAEV; DENIZLI, 2013) de forma mais simples possível.

Existem, no entanto, limitações consideráveis nas tecnologias proteômicas atualmente disponíveis, pois nenhuma delas permite a análise de todo o proteoma em uma etapa simples devido ao grande número de peptídeos e à ampla faixa dinâmica de concentração do proteoma das amostras clínicas. Como resultado, muitas vezes é observado que uma abordagem de preparo de amostra influencia o resultado experimental final, e portanto, uma análise proteômica ideal tenderia a reduzir também o número de etapas na preparação da amostra (AHMED, 2009).

O alvo principal dessas PAAs tem sido a albumina, e uma abordagem muito utilizada para sua remoção é por meio de cromatografia de pseudoafinidade com ligantes de corante de triazina imobilizados, mais frequentemente em *Cibacron Blue F3-GA* (GIANAZZA *et al.*, 2016). Outras estratégias de preparo de amostras têm sido

utilizadas para depleção das proteínas majoritárias, como por exemplo ultrafiltração e a precipitação química (SAFARIK; SAFARIKOVA, 2004) e kits comerciais (GRANGER *et al.*, 2005; JESUS *et al.*, 2017). Contudo, muitas destas técnicas não têm sido capazes de promover a depleção de proteínas majoritárias sem causar a depleção concomitantemente de proteínas de baixas concentrações (GRANGER *et al.*, 2005; KAWASHIMA *et al.*, 2010). Desse modo, um método ideal de depleção seria aquele que apresentasse alta capacidade de captura seletiva das proteínas majoritárias e baixa para as demais.

As principais estratégias de preparo de amostras para diminuição das proteínas de alta abundância apresentam diversos problemas tais como alto custo, complexidade experimental, elevado tempo de operação, depleção inespecífica de proteínas de baixa abundância, os kits comerciais devem ser utilizados seguindo-se uma metodologia rigorosamente estabelecida de modo que podem perder eficiência se qualquer dessas etapas não forem seguidas corretamente. Um outro inconveniente associado a estes métodos é que o conjunto das proteínas depletadas (depletoma) é descartado, e como diversas proteínas de baixa abundância ligam-se à HSA, há uma grande perda de informações proteômicas da amostra.

Diante dos problemas apresentados, uma boa alternativa é a utilização de nanopartículas magnéticas (MNPs) com recobrimentos específicos capazes de reter seletivamente algumas destas proteínas em detrimento à outras com base na variação de parâmetros como pH e quantidade de MNP utilizada. O uso de nanopartículas magnéticas, especialmente da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), tem atraído a atenção de pesquisadores de diversas áreas devido às suas características tais como elevada área superficial, protocolos de sínteses e revestimentos já consolidados, baixo custo, excelentes propriedades magnéticas, baixa toxicidade e possibilidade de diversos tipos de funcionalizações (LI; ZHANG; DENG, 2013) e aplicações, simplicidade operacional e alta capacidade de adsorção.

Um método de depleção baseado na utilização de MNPs pode ser bastante flexível e envolver diferentes etapas simples de adsorção e de posterior dessorção para recuperação do analito alvo quando apropriado, o que por sua vez pode contornar muitos dos problemas supracitados referentes aos métodos de depleção. Em Jesus *et al.* (2017) os autores desenvolveram um método de preparo de amostras de soro em que a depleção de HSA era feita com MNPs e a amostra final resultante (sobrenadante) permitia a detecção de várias proteínas de baixa

abundância que não foram identificadas na amostra original. No entanto, as nanopartículas com as proteínas adsorvidas (complexo MNPs/proteínas) era descartado, o que pode ocasionar a perda das informações do depletoma.

Em outro estudo envolvendo MNPs, Santos *et al.* (2021) desenvolveram um método de extração de lisozima de clara de ovo de galinha utilizando nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recobertas com tetraetilortossilicato (TEOS) e albumina de soro bovino (BSA). O processo consistiu de uma etapa de adsorção direta e específica da lisozima e uma segunda etapa em que a lisozima foi desorvida (recuperada) das MNPs por meio de uma solução eluente adequada.

A partir dos dois exemplos apresentados e diante dos problemas referentes aos métodos de depleção discutidos, percebe-se que um método de depleção de proteínas de alta abundância adequado deve envolver uma etapa inicial de depleção e outra de recuperação do depletoma. Diante disso, pretende-se com este trabalho desenvolver um processo de separação de proteínas de soro humano por adsorção utilizando-se nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com diferentes revestimentos. O processo consistirá em uma primeira etapa cujo objetivo é a obtenção de um sobrenadante de menor complexidade, no qual a albumina humana (HSA) pode ser depletada em diferentes quantidades. Já na segunda etapa pretende-se recuperar as proteínas adsorvidas nas MNPs na etapa de depleção, para possíveis estudos do depletoma e do albuminoma, sendo este último a fração de proteínas que se ligam à HSA.

A natureza magnética das MNPs, funcionalizada ou não, permite sua manipulação seletiva e separação na presença de outros sólidos suspensos mesmo em amostras complexas como o soro/plasma. Em termos práticos, a MNP é colocada em contato direto com a amostra, promovendo a adsorção das proteínas alvo. Em seguida, um campo magnético é utilizado para remoção do complexo MNPs/proteínas da amostra e, quando aplicável, uma etapa adicional de eluição das proteínas adsorvidas é feita para recuperação das mesmas.

Dessa forma, uma investigação mais aprofundada do processo de adsorção de proteínas em materiais adsorventes como as MNPs, obtendo-se os modelos de cinética e das isotermas de adsorção, torna-se importante por várias razões (WANJERI *et al.*, 2018). Por meio destes estudos é possível prever o comportamento da proteína alvo em superfícies complexas nos processos de extração, compreender as capacidades adsorptivas dos adsorventes, gerar dados quantitativos que podem ser

usados para estudos comparativos e projetar processos adequados que podem ser adaptados para outros tipos de proteínas alvos.

No caso específico da depleção (adsorção) de HSA, as informações na literatura sobre isotermas e cinética de adsorção são bastante limitadas ou mesmo inexistentes para adsorção de HSA em superfícies de nanomateriais como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com diferentes revestimentos. Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado o uso de nanopartículas magnéticas para adsorção de proteínas, como por exemplo HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (JESUS *et al.*, 2017), lisozima em  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  revestida com sílica e albumina bovina (SANTOS *et al.*, 2021), trombina em microesferas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  funcionalizadas com aptâmero (ZHANG *et al.*, 2012), BSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcionalizada com líquido iônico (QIAN *et al.*, 2017), BSA em nanopartículas magnéticas de  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  (LIU *et al.*, 2017a), no entanto não há uma abordagem aprofundada sobre o processo de adsorção de HSA em nanopartículas magnéticas, bem como de uma modelagem estatística aprofundada sobre o processo de adsorção.

Na literatura especializada, foram encontrados poucos trabalhos que relatam especificamente a utilização de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  na depleção de proteínas de alta abundância e nenhum que aborde especificamente o uso de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas com TEOS e/ou com BSA para depleção de HSA. Diante disso, pretende-se com este trabalho sintetizar nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , recobri-las com tetraetilortosilicato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ ) e posteriormente com BSA ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ ), caracterizar estas nanopartículas, demonstrar a aplicação de métodos estatísticos por meio da otimização da adsorção de HSA nas MNPs, estudos aprofundados de cinética e isotermas de adsorção, otimização da dessorção da HSA das MNPs e posteriormente avaliação da viabilidade da reutilização das MNPs. Por último, pretende-se aplicar o método de adsorção desenvolvido na depleção de HSA de amostras de soro reais e avaliar os resultados quanti e qualitativamente por meio da técnica de eletroforese SDS-PAGE antes e depois da adsorção com as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTUDOS PROTEÔMICOS E A BUSCA POR BIOMARCADORES

A proteômica moderna envolve a aplicação de tecnologias para a identificação e quantificação do conteúdo total de proteínas presentes de uma célula, tecido ou organismo. Ela complementa as outras tecnologias “ômicas”, como genômica e transcriptômica, para elucidar a identidade das proteínas de um organismo e conhecer a estrutura e as funções de proteínas específicas (ASLAM *et al.*, 2017).

As tecnologias baseadas em proteômica são utilizadas em vários tipos de pesquisa, como detecção novos biomarcadores para diagnóstico e detecção precoce de doenças como câncer, candidatos para produção de vacinas, compreensão de mecanismos de patogenicidade, alteração de padrões de expressão em resposta a diferentes sinais e interpretação de vias funcionais de proteínas em diferentes doenças. Ela inclui a análise e categorização de assinaturas de proteínas gerais de um genoma (ASLAM *et al.*, 2017). Com o sequenciamento do genoma humano e de numerosos patógenos, houve um grande avanço para a proteômica, de modo que esse cenário cria inúmeras oportunidades, além de muitos desafios, para atender às necessidades de altas sensibilidade e produtividade necessárias nas investigações relacionadas a doenças (HANASH, 2003).

O avanço da abordagem proteômica tem possibilitado a realização de estudos em larga escala da expressão proteica em diferentes tecidos e fluidos corporais, proporcionando novas oportunidades para obtenção de informações relevantes sobre diferentes processos fisiológicos e/ou patológicos que podem ocorrer no organismo humano (BARBOSA *et al.*, 2012). Com relação à saúde humana, o estudo das proteínas que circulam no sangue oferece grandes oportunidades para diagnóstico, estratificação ou prevenção de doenças.

O genoma humano é capaz de codificar milhares de diferentes tipos de proteínas e houve grandes projetos para caracterizações sistemáticas das proteínas circulantes no plasma como o *Plasma Proteome Project* (PPP) iniciado em 2002 que gerou um conjunto de dados de 4395 proteínas plasmáticas caracterizadas em um banco de dados disponível ao público (DEUTSCH *et al.*, 2021). Apesar da enorme variedade das proteínas existentes, a maioria das pesquisas com o objetivo de entender os fundamentos moleculares da vida e/ou de doenças tem se concentrado

em um conjunto limitado de proteínas cada vez mais conhecidas, enquanto as funções biológicas de muitas outras permanecem pouco compreendidas (KUSTATSCHER *et al.*, 2022). Para se ter uma ideia, a esmagadora fração da literatura de ciências da vida (cerca de 94,2%) dedicada a mecanismos biomoleculares se concentram em um grupo de menos de 5000 proteínas humanas particularmente bem estudadas (SINHA *et al.*, 2018).

Com os recentes avanços tecnológicos e algumas situações de urgência como foi a necessidade do entendimento dos efeitos do COVID-19, a análise proteômica de soro e plasma sanguíneos tornou-se ainda mais importante para o estudo da biologia e fisiopatologia humanas (DEUTSCH *et al.*, 2021). Várias investigações proteômicas foram realizadas em diferentes matrizes biológicas obtidas de pacientes com COVID-19, e a maioria dos estudos publicados na literatura foram realizados a partir de amostras de plasma e soro. A principal perspectiva por trás dos estudos de proteômica realizados na COVID-19 foi definir assinaturas específicas nos diferentes estágios de gravidade da doença, para a descoberta de biomarcadores ou potenciais alvos terapêuticos (COSTANZO *et al.*, 2022).

Uma das vertentes mais importantes da proteômica é a investigação clínica (proteômica clínica), a qual tem feito grandes avanços, como a descoberta de biomarcadores únicos até o diagnóstico precoce de doenças para a caracterização abrangente de perfis de expressão de proteínas, capazes de identificar tanto a doença específica quanto sua subtipagem (HOVESTADT *et al.*, 2020; PONZINI *et al.*, 2022). Abordagens proteômicas são ferramentas poderosas para descoberta de biomarcadores (FINDEISEN; NEUMAIER, 2009).

Biomarcadores podem ser definidos como alterações celulares (componentes intra/extracelulares e células inteiras), bioquímicas (metabólitos, íons e toxinas) ou moleculares (ácidos nucleicos, proteínas e lipídios) mensuráveis em meios biológicos como tecidos, células ou fluidos humanos (SRIVASTAVA; KRAMER, 2000; AMIN *et al.*, 2021) sejam em processos biológicos normais, aberrações patogênicas ou mesmo a resposta a uma exposição ou intervenção terapêutica. Os biomarcadores podem ser detectáveis em diversas matrizes tais como sangue ou outros fluidos corporais ou tecidos (TAINSKY, 2009), entretanto, o plasma humano é uma das mais importantes (OMENN *et al.*, 2005).

Muitas das técnicas empregadas em proteômica têm como objetivo principal a identificação desses biomarcadores para prevenção, diagnóstico e terapia de diversas

doenças como o câncer (ALHARBI, 2020; BELCZACKA *et al.*, 2019; HANASH; PITTERI; FACA, 2008; OMENN, 2004; OMENN *et al.*, 2005). A busca de biomarcadores clínicos é de extrema importância, visando não apenas a detecção precoce, mas também para maximizar os benefícios de modalidades de tratamento atualmente disponíveis, bem como para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento de tratamento de doenças (BELCZACKA *et al.*, 2019).

Uma característica comum a muitos biomarcadores é a baixa concentração na qual são encontrados no organismo. Para se ter uma ideia a interleucina 6, um biomarcador indicador de infecções/inflamações está presente na faixa de 0-5 pg/mL, por outro lado, a albumina sérica humana (HSA) está presente no sangue em concentrações normalmente na faixa de 35-50 mg/mL, o que mostra que ambas possuem uma diferença de concentrações que pode chegar a um fator de  $10^{10}$  ordens de grandeza (ANDERSON; ANDERSON, 2002). Os biomarcadores de interesses clínicos geralmente se incluem nesse seleto grupo de baixas concentrações (KAWASHIMA *et al.*, 2010). Neste trabalho, um termo bastante utilizado será “proteínas de baixa abundância” (PBAs) para se referir a potenciais biomarcadores clínicos que estão presentes em concentrações muito baixas.

Na recente pandemia de COVID-19, as tecnologias baseadas em “ômicas” foram amplamente adotadas visando potenciais alvos terapêuticos, bem como a descoberta de assinaturas específicas (biomarcadores) nos diferentes estágios de gravidade da doença (COSTANZO *et al.*, 2022). A busca por biomarcadores foi intensamente explorada pelos pesquisadores. Em Shu *et al.* (2020), foram analisados por espectrometria de massas, os proteomas plasmáticos coletados em momentos diferentes de 5 indivíduos fatais, 7 graves e 10 casos leves de COVID-19 em comparação com 8 controles saudáveis. A análise proteômica de pacientes fatais em comparação com controles saudáveis detectou 195 proteínas com graus de expressões diferenciais que reduziu à medida que a gravidade dos sintomas diminuiu no grupo leve. Isso sugere que as alterações do proteoma estão significativamente correlacionadas com a gravidade da doença. Os marcadores ORM1, ORM2, S100A9, CRP, AZGP1, CFI, SERPINA3/ACT e LCP1/LPL aumentaram significativamente em condições mais graves de COVID-19, enquanto os níveis de FETUB, CETP e PI16 diminuíram significativamente.

Outra área de grande destaque da proteômica é a busca de biomarcadores associados ao câncer, o qual segundo dados do *Our World in Data* de 2018 (RITCHIE;

SPOONER; ROSER, 2018) foi a segunda principal causa de mortalidade por doenças não transmissíveis em todo o mundo, com 10,08 milhões de óbitos, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (18,56 milhões).

Há mais de 20 anos, já se percebia uma tendência de esforços focados em direção às estratégias direcionadas à prevenção do câncer, de modo que uma compreensão da maquinaria molecular do câncer poderia ser usada para detecção e diagnóstico mais precisos. Com esse novo foco, percebeu-se que as estratégias de detecção baseadas em moléculas necessitam da experiência de grupos de pesquisa multidisciplinares, os quais envolveriam biólogos do câncer, epidemiologistas, desenvolvedores de tecnologia, estatísticos, cientistas da computação, químicos e médicos. Diante disso, foi criada pelo Instituto Nacional do Câncer (<http://www.nci.nih.gov>) a Rede de Pesquisa de Detecção Precoce (EDRN - *Early Detection Research Network*). A EDRN é um programa norte-americano colaborativo que mantém infraestrutura abrangente e recursos críticos para a descoberta, desenvolvimento e validação de biomarcadores para risco de câncer e detecção precoce (SRIVASTAVA; KRAMER, 2000).

Uma estrutura formal para orientação do processo de desenvolvimento de biomarcadores para detecção precoce do câncer foi proposta por Pepe *et al.* (2001) e adotada pela EDRN. Essa estrutura compreende cinco fases principais:

- a) Exploração pré-clínica: identificar um ou mais marcadores tumorais promissores que possam ser desenvolvidos em estágios subsequentes;
- b) Validação de ensaio clínico: avaliar capacidade do biomarcador em distinguir indivíduos com ou sem câncer;
- c) Retrospectiva longitudinal: avaliar a capacidade do biomarcador em detectar doença pré-clínica em função do tempo antes do diagnóstico clínico e definir critérios para um teste de triagem positivo em preparação para a fase 4.
- d) Triagem prospectiva: determinar as características operacionais do teste de triagem baseado em biomarcador em uma população relevante, determinando a taxa de detecção e a taxa de encaminhamento falso.
- e) Estudos de controle do câncer: visa estimar as reduções na mortalidade por câncer proporcionadas pelo teste de rastreamento.

Conforme Ou *et al.* (2021), os biomarcadores mais comuns associados ao câncer são proteínas, mutações genéticas, deleções, rearranjos e número extra de cópias de genes. Essas moléculas podem ser secretadas na circulação ou estarem

presentes em células cancerígenas. Um biomarcador ideal deve satisfazer as seguintes propriedades: deve ser binário (ou seja, presente ou ausente) ou quantificável sem avaliações subjetivas, o resultado deve ser gerado por um ensaio que seja adaptável à prática clínica de rotina e tenha uma resposta oportuna rápida, especificidade e sensibilidade, e o mais importante, o biomarcador deve ser detectável usando amostras facilmente acessíveis.

A literatura atual tem relatado vários estudos de busca de biomarcadores em diferentes matrizes visando o diagnóstico de câncer, como por exemplo câncer endometrial (NJOKU *et al.*, 2019), biomarcadores na saliva para diagnóstico de câncer oral (CHU *et al.*, 2019), cabeça e pescoço (AMENÁBAR; DA SILVA; PUNYADEERA, 2020; KANG; KIESS; CHUNG, 2015), câncer de ovário epitelial (HÜTTENHAIN *et al.*, 2019). Ressalta-se que a busca de biomarcadores de interesse clínico não é exclusiva em oncologia. Há trabalhos em diversas áreas clínicas tais como síndrome da apneia do sono (LAL *et al.*, 2019), em nefrologia (KLEIN; SCHANSTRA, 2019), estresse oxidativo em tuberculose (YELDU *et al.*, 2019), análise proteômica de vesículas extracelulares derivadas de plaquetas no armazenamento em banco de sangue (NOGUEIRA *et al.*, 2020), doença de Alzheimer (WESTWOOD *et al.*, 2020), doença vitreoretiniana (CARVALHO *et al.*, 2020), esclerose lateral amiotrófica (OECKL *et al.*, 2020), diabetes (SHAO; GUO; AEBERSOLD, 2015), diagnóstico e acompanhamento de crianças asmáticas (XEPAPADAKI *et al.*, 2023).

Enormes esforços foram feitos nas últimas décadas para descobrir novos biomarcadores de câncer para uso na prática clínica. No entanto, existe uma discrepância marcante entre o esforço direcionado para a descoberta de biomarcadores e o número de marcadores que chegam à prática clínica (FÜZÉRY *et al.*, 2013). Até o momento poucos biomarcadores candidatos foram encaminhados para validação, aprovação regulatória e uso clínico. A descoberta eficaz de biomarcadores e seu possível uso como marcador clínico é desafiadora por muitos fatores, incluindo a complexidade e variabilidade biológica inerente, como por exemplo a variação intra-individual e promiscuidade de alguns marcadores de doenças, estabilidade de plataformas analíticas, eficiência da análise de dados, validação de biomarcadores em geral em uma população, a despesa e o tempo necessários para que um teste atinja aplicações clínicas (THOMAS *et al.*, 2016), robustez do método desenvolvido, sensibilidade e especificidade do enriquecimento dos biomarcadores, reprodutibilidade quantitativa e qualitativa, entre outros (DEUTSCH *et al.*, 2021).

Soma-se a isso a ampla faixa dinâmica de concentrações de proteínas, dificuldade em encontrar proteínas de baixa abundância devido aos efeitos de mascaramento de proteínas de alta abundância, altos níveis de sais e outros compostos interferentes, possibilidade de reação cruzada durante a análise multiplexada e, acima de tudo, variações entre os indivíduos e falta de reprodutibilidade. Além disso, variáveis pré-analíticas, como dispositivos de coleta, procedimentos de coleta e manuseio e condições de armazenamento, também são fatores cruciais para a análise do proteoma sérico (RAY *et al.*, 2011).

A busca de biomarcadores envolve a aplicação de diversas tecnologias proteômicas. Essas técnicas são indicadas para a detecção e investigação de candidatos a biomarcadores, devido à alta sensibilidade e desempenho analítico que podem ser alcançados, e à capacidade de gerar grandes conjuntos de dados por meio da identificação de números grandes e cada vez maiores de proteínas, incluindo peptídeos ou fragmentos de proteínas (FRANTZI *et al.*, 2015). Algumas das tecnologias utilizadas em proteômica são apresentadas a seguir.

### 2.1.1 Tecnologias utilizadas em proteômica

Em Aslam *et al.* (2017) os autores apresentam uma revisão sobre as principais tecnologias em proteômicas e suas aplicações, subdividindo as tecnologias em cinco tópicos principais. O primeiro deles são as técnicas convencionais, utilizadas para purificação de proteínas. Tais técnicas são baseadas em cromatografia, cujos subtipos são a cromatografia de troca iônica (IEC), de exclusão por tamanho (SEC) e de afinidade; podem ser baseadas também no ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) e em *Western blotting*. A técnica de ELISA e *Western blotting* são utilizadas para análise de proteínas seletivas, sendo restritas à análise de poucas proteínas individuais (ASLAM *et al.*, 2017).

O segundo grupo envolve as técnicas avançadas, mais usadas para a separação de amostras de proteínas complexas. São representadas por:

- a) *Microarrays* ou microchips de proteínas, os quais são subdivididos em *microarrays* de proteína analítica, funcional e de fase reversa;
- b) Abordagens baseadas em gel de eletroforese: gel de dodecil sulfato de poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE, do inglês *sodium-dodecyl sulfate*

*polyacrylamide gel electrophoresis*), eletroforese em gel bidimensional (2-DE) e eletroforese em gel diferencial bidimensional (2D-DIGE)

- c) Espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*);
- d) Técnica de degradação de Edman, desenvolvida para determinar a sequência de aminoácidos de uma determinada proteína (ASLAM *et al.*, 2017).

O terceiro grupo das técnicas utilizadas em proteômica são as análises quantitativas, das quais destacam-se as técnicas de marcação de afinidade codificada por isótopos (ICAT), marcação de isótopos estáveis com aminoácidos em cultura de células (SILAC) e marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ). Estas técnicas geralmente são utilizadas juntamente com a espectrometria de massas (ASLAM *et al.*, 2017).

O quarto grupo é representado pelas técnicas de cristalografia de raios-X e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Estas são capazes de fornecer a estrutura tridimensional (3D) de uma proteína que pode ser útil para entender sua função biológica (ASLAM *et al.*, 2017).

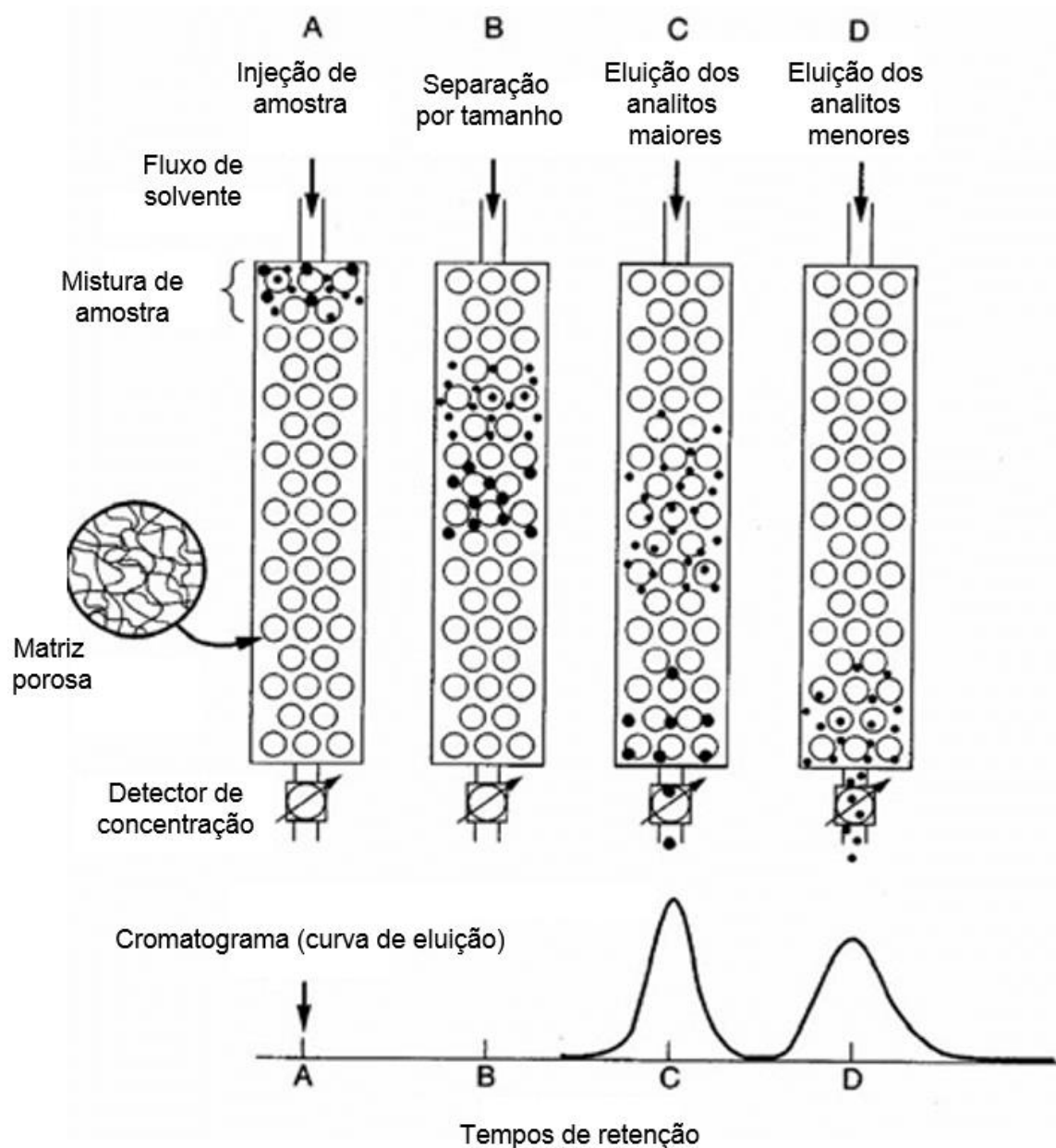
O quinto e último grupo das tecnologias em proteômica compreendem as técnicas de bioinformática. Com o suporte de tecnologias de alto rendimento, um grande volume de dados proteômicos é obtido. Diversas ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para análise destes dados, o que possibilita a previsão de estrutura 3D, domínio de proteína, análise das interações proteína-proteína e análise de dados de MS (ASLAM *et al.*, 2017).

#### 2.1.1.1 Cromatografia por exclusão de tamanho

A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) é um nome genérico para o processo de separação baseado no tamanho das moléculas em solução, quando esta flui através de um leito empacotado poroso. Em geral, a SEC é uma técnica cromatográfica em coluna líquida na qual uma solução de amostra é introduzida em uma coluna preenchida com um revestimento poroso e é transportada através da coluna por solvente. Idealmente, a separação de tamanho é obtida pela permeação diferencial dos poros, uma vez que não há interações significativas entre a fase estacionária e o soluto (KOSTANSKI; KELLER; HAMIELEC, 2004). A Figura 1

apresentada a seguir mostra um esquema simplificado do princípio que rege a cromatografia de exclusão molecular.

Figura 1 - Princípio da cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Striegel *et al.* (2009).

Conforme evidenciado pela Figura 1, ocorre uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas a serem separadas e a fase móvel presente dentro dos poros da fase estacionária e a fase móvel externa aos poros. A fase estacionária geralmente é um polímero ou um gel, caracterizada por poros de tamanhos bem controlados, responsáveis por controlar a entrada e a saída das moléculas que podem permear

parcialmente ou completamente dentro da fase estacionária. As moléculas que não permeiam são excluídas e saem mais rápido, enquanto aquelas que não permeiam completamente também saem junto no volume total da eluição. Somente as moléculas que permeiam parcialmente são separadas (COLLINS, 2011).

A cromatografia de exclusão iônica é uma técnica relativamente antiga que vem atraindo maior atenção. É particularmente útil para separar espécies moleculares hidrofílicas umas das outras e de grandes quantidades de materiais iônicos.

Como subdivisões da SEC, a cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma separação cromatográfica de macromoléculas sintéticas com o uso de géis porosos ou partículas inorgânicas rígidas, enquanto a cromatografia de filtração em gel (GFC) ou simplesmente a filtração em gel é um processo semelhante de separação de macromoléculas biológicas (KOSTANSKI; KELLER; HAMIELEC, 2004).

Uma abordagem mais aprofundada sobre SEC é feita nos trabalhos de Kostanski, Keller e Hamielec (2004), em que os autores fazem uma revisão sobre metodologias de calibração em cromatografia por exclusão de tamanho, discutindo também sobre mais associações com métodos analíticos tais como ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e dispersão de luz (*light scattering*). Collins (2011) faz uma revisão sobre separações em colunas abertas enfatizando a cromatografia por exclusão e por bioafinidade. Em Hong, Koza e Bouvier (2012) os autores apresentam uma revisão sobre o uso da uma cromatografia de exclusão por tamanho para a análise de proteínas bioterapêuticas e os seus agregados.

#### 2.1.1.2 Técnica de eletroforese em gel 1D para separação de proteínas

A eletroforese em gel é um grupo amplamente conhecido de técnicas usadas para separar e identificar macromoléculas como DNA, RNA ou proteínas com base no tamanho, forma ou ponto isoelétrico. A separação de moléculas por eletroforese baseia-se no fato de que moléculas carregadas migram através de uma matriz de gel mediante a aplicação de um campo elétrico. Estas técnicas tornaram-se uma das principais ferramentas em bioquímica, biologia molecular, química analítica e proteômica (GARCÍA-DESCALZO *et al.*, 2012).

Os atuais métodos de eletroforese estão se tornando cada vez mais robustos e confiáveis para análise de proteínas (ZHU; LU; LIU, 2012). Além disso, a eletroforese apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas de separação, tais como

rápidas separações, quantidades bem pequenas de amostra e reagentes, baixo custo, versatilidade e alta eficiência de separação. Pode ser utilizada em análises biológicas, ambientais, farmacêuticas, clínicas e análises de alimentos (CHEN *et al.*, 2012).

A eletroforese em gel de proteínas com matriz de poliacrilamida, comumente chamada de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), é uma das técnicas mais utilizadas na caracterização e/ou separação de misturas complexas de proteínas. Trata-se de um método conveniente, rápido e barato que requer quantidades de proteínas da ordem de microgramas. As proteínas possuem uma carga elétrica líquida se estiverem em uma solução na qual o pH é diferente do seu ponto isoelétrico, o que proporciona a capacidade de se moverem quando submetidas a um campo elétrico, assim a separação ocorre devido ao movimento através de um gel poroso sob a influência de um campo elétrico. A velocidade de migração é proporcional à razão entre as cargas da proteína e sua massa. Quanto maior a carga por unidade de massa, mais rápida a migração (GARCÍA-DESCALZO *et al.*, 2012).

Dada a complexidade estrutural das proteínas, suas taxas de migração não são semelhantes entre si. Se estiverem em seu ponto isoelétrico, não ocorrerá migração pelo gel mesmo com aplicação do campo elétrico. Em casos como esses, as proteínas são desnaturadas pela adição de um detergente como o dodecil sulfato de sódio (SDS) para separá-las exclusivamente de acordo com o peso molecular. Esta metodologia de utilização de SDS foi proposta por Shapiro, Viñuela e Maizel (1967). O SDS é um detergente presente no tampão de amostra SDS-PAGE, cuja função é clivar as ligações dissulfeto das proteínas, desnaturando a estrutura terciária das proteínas, separando a proteína em suas subunidades e fornecendo uma carga líquida negativa o que por sua vez permite que elas migrem pelo gel de acordo com o seu tamanho. Além disso, a desnaturação faz com que eles percam sua estrutura terciária e, assim, a velocidade de migração é proporcional ao tamanho e não à estrutura terciária (GARCÍA-DESCALZO *et al.*, 2012).

O SDS deve reagir completamente com as proteínas da amostra produzindo complexos de proteínas/SDS com densidades de carga semelhantes. Quando esses complexos são eletroforicamente separados, suas mobilidades dependerão de seus tamanhos, sendo que, quanto menor a proteína, maior será sua mobilidade. O tamanho dos poros do gel diminui com o aumento das concentrações de acrilamida, de modo que a combinação do tamanho, da carga e da forma da proteína juntamente com o tamanho do poro do gel determinam sua taxa de migração pelo gel

(GALLAGHER, 2012). Os valores de mobilidade diminuem linearmente com o logaritmo das massas moleculares da proteína, que é o princípio básico de separação do SDS-PAGE (ZHU; LU; LIU, 2012).

Em Gallagher (2012), são descritos vários protocolos alternativos para aplicações da eletroforese. Os géis de poliacrilamida, os mais comuns, são formados pela polimerização da acrilamida pela ação de um agente de reticulação, a bis-acrilamida, na presença de um iniciador e de um catalisador. O íon persulfato, geralmente adicionado como persulfato de amônio (APS), é o iniciador de solidificação do gel e uma fonte de radicais livres, enquanto o N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) catalisa a reação de polimerização estabilizando estes radicais livres. A taxa de polimerização é determinada pela concentração de persulfato (catalisador) e TEMED (iniciador) (GARCÍA-DESCALZO *et al.*, 2012).

A razão entre acrilamida/bisacrilamida, bem como a concentração total de ambos, afeta o tamanho dos poros e a rigidez da matriz de gel final. Estes, por sua vez, afetam o intervalo de tamanhos de proteínas que podem ser resolvidas (separadas). O tamanho dos poros criados no gel é inversamente relacionado à quantidade de acrilamida utilizada. Por exemplo, um gel de 7% de poliacrilamida tem poros maiores do que um gel de 12% de poliacrilamida. Géis com baixa porcentagem de acrilamida são normalmente usados para resolver proteínas grandes, e os com alta porcentagem são usados para resolver proteínas menores. "Géis de gradiente" são especialmente preparados para ter baixa porcentagem de acrilamida na parte superior e alta porcentagem de acrilamida na parte inferior, permitindo que uma gama mais ampla de tamanhos de proteínas seja separada (GARCÍA-DESCALZO *et al.*, 2012).

Com relação ao equipamento, quando um único gel é conectado a uma fonte de alimentação, as cargas negativas fluem do terminal negativo do cátodo (preto) para a câmara tampão superior, através do gel e para a câmara tampão inferior. A câmara tampão inferior é conectada ao terminal do ânodo positivo (vermelho) para completar o circuito. Assim, as proteínas revestidas com SDS, carregadas negativamente devido ao SDS, movem-se do cátodo negativo ligado à câmara tampão superior em direção ao ânodo positivo ligado à câmara inferior (GALLAGHER, 2012).

Os géis suprimem a convecção térmica causada pela aplicação do campo elétrico, e também podem atuar como meio de peneiramento, retardando a passagem de moléculas e também podem servir simplesmente para manter a separação

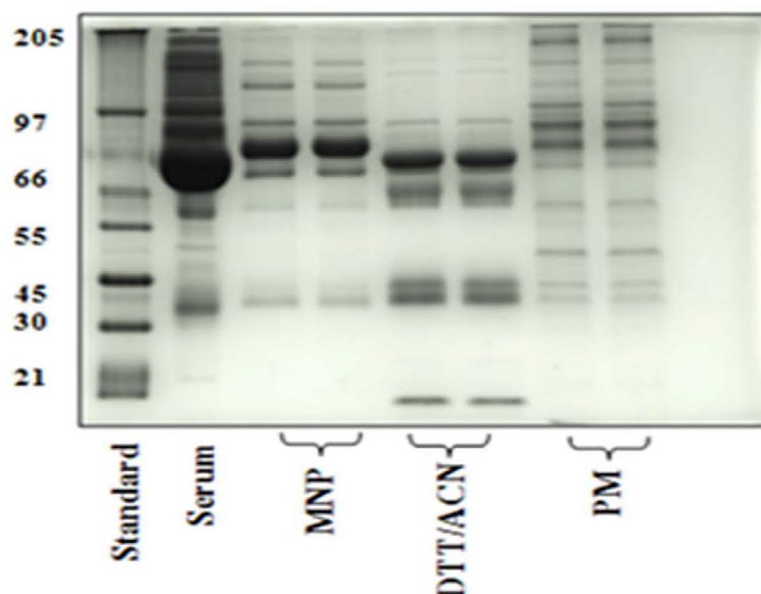
finalizada, de modo que uma coloração pós-eletroforese possa ser aplicada (GARCÍA-DESCALZO *et al.*, 2012).

De acordo com Zhu, Lu e Liu (2012), de modo geral os procedimentos básicos da eletroforese em gel de SDS podem ser resumidos em: (1) preparação um gel e montar os aparatos do equipamento, (2) mistura da amostra contendo a proteína com um tampão contendo o SDS e aquecimento da mistura sob uma temperatura elevada, (3) execução da corrida de eletroforese colocando-se o complexo proteína/SDS no gel dentro do equipamento de gel, e por último (4) a fixação ou coloração das proteínas separadas para identificação e/ou quantificação.

Conforme García-Descalzo *et al.* (2012), as proteínas separadas em um gel de poliacrilamida podem ser detectadas por vários métodos, por meio de corantes ou com coloração com prata. Um dos corantes mais utilizado é o azul de *Coomassie*, o qual permite detectar até 0,2 a 0,6 µg de proteína, sendo quantitativamente linear na faixa de 15 a 20 µg. É frequentemente usado em soluções de metanol/ácido acético e descolorido em soluções de isopropanol/ácido acético. Outra alternativa é a coloração com prata, geralmente nitrato de prata, de fácil aplicação, podendo ser de 50 a 100 vezes mais sensível que a coloração com azul de *Coomassie*. Para a seleção do método de coloração não há um método universal, ela é determinada analisando-se vários fatores como a sensibilidade desejada, faixa linear de concentração das proteínas, facilidade de uso, custo e tipo de equipamento de imagem disponível, etc.

Na Figura 2 a seguir, obtida de Jesus *et al.* (2017), apresenta-se um uma corrida de SDS-PAGE em que os autores utilizaram coloração com nitrato de prata para coloração do gel. O gel mostrado refere-se a um estudo de depleção de HSA em que foram empregados e comparados diferentes métodos de depleção: a utilização de nanopartículas magnéticas (MNP), agentes químicos ditioneitol e acetonitrila (DTT/ACN) e o kit comercial *ProteoMinerR* (PM).

Figura 2 - Representação de uma corrida das amostras em gel 1-DE, em duplicata.



Fonte: Jesus *et al.* (2017).

Standard: padrões de peso molecular (kDa); Serum: soro bruto, MNP: nanopartículas, DTT/ACN (ditiotretol e acetonitrila), PM (*ProteoMiner*).

Embora seja uma técnica bastante eficiente, a eletroforese apresenta algumas limitações, como por exemplo a baixa sensibilidade em pequenas concentrações devido à menor carga de amostra e menor comprimento do caminho óptico. Um sério problema é má qualidade na resolução da eletroforese quando a quantidade de interferentes na amostra é muito alta, gerando uma sobreposição das bandas. Essa é a situação que ocorre em amostras biológicas como o plasma/soro sanguíneo, em que a grande quantidade de proteínas majoritárias como a albumina as e globulinas podem gerar uma sobreposição de bandas com as proteínas minoritárias.

Em Hassis *et al.* (2015), os autores afirmam que o processamento e manipulação de amostras como o plasma podem afetar a abundância dos biomarcadores, afetando assim a confiabilidade da análise. Para contornar este problema, várias técnicas on-line de preparo de amostras têm sido propostas. Chen *et al.* (2012) fazem uma revisão sobre algumas destas técnicas e suas aplicações na eletroforese. Os autores discutem sobre as técnicas de pré-concentração de isotacoforese transitória, empilhamento de amostra aprimorado em campo, empilhamento de micela para o solvente, colapso micelar, junção dinâmica de pH,

varredura, extração em fase sólida, microextração de gota única, microextração em fase líquida, entre outras.

Embora a eletroforese em gel seja geralmente usada para fins analíticos, diversos estudos proteômicos tem utilizado-a como técnica de preparo de amostras para purificar parcialmente as moléculas antes de aplicar outras metodologias de análises, principalmente a espectrometria de massas. Nesse caso, uma vez que as proteínas de interesse são selecionadas por análise diferencial ou outros critérios, as proteínas podem ser excisadas de géis e digeridas com tripsina para preparar sua identificação por espectrometria de massas.

### 2.1.1.3 Espectrometria de massas

A proteômica desempenha um papel vital na pesquisa biomédica na era pós-genômica e, com a revolução tecnológica e os modelos computacionais e estatísticos emergentes, a metodologia proteômica evoluiu rapidamente na última década e contribuiu para a resolução de problemas biomédicos complexos. Segundo os autores, a espectrometria de massa é uma das principais técnicas proteômicas de alto rendimento existentes (CUI; CHENG; ZHANG, 2022). Desde as últimas décadas, as crescentes demandas relacionadas à produtividade e flexibilidade de amostras têm favorecido as tecnologias baseadas em espectrometria de massas (AEBERSOLD; MANN, 2003), de modo que a proteômica baseada em MS tornou-se uma ferramenta confiável e essencial para elucidar processos biológicos em nível de proteína. Ao longo da última década, testemunhou-se uma grande expansão do conhecimento de doenças humanas com a aplicação de tecnologias proteômicas baseadas em MS (LI; WANG; CHEN, 2017).

Conforme Thomas *et al.* (2016), as técnicas baseadas em espectrometria de massas permitem uma janela única para perturbações biológicas por meio de estratégias proteômicas globais ou direcionadas; cuja escala, especificidade e potencial de descoberta são inigualáveis por outros métodos atualmente disponíveis. Os métodos baseados em MS têm desfrutado de ganhos tecnológicos em grande parte devido à popularidade e interesse em muitos gêneros de pesquisa, como desenvolvimento de medicamentos, pesquisa biomédica e toxicologia. Ainda conforme os autores, as estratégias proteômicas baseadas em MS são normalmente divididas em três grupos principais: *top-down* (análise de proteína intacta), *middle-*

*down* (análise de peptídeos grandes) e *bottom-up* (análise de peptídeos proteolíticos), cada um exigindo diferentes métodos de preparação de amostras.

Por definição, um espectrômetro de massa consiste em uma fonte de íons, um analisador de massa que mede a razão massa-carga ( $m/z$ ) dos analitos ionizados e um detector que registra o número de íons em cada valor de  $m/z$ . A fonte de íons é usada para criar íons de proteínas ou peptídeos, geralmente transferindo prótons carregados positivamente ( $H^+$ ) para as moléculas. A ionização é chamada de “soft” porque a estrutura química das proteínas ou peptídeos permanece ilesa. Um ou mais analisadores de massa são usados para separar os íons por sua razão  $m/z$  ou para fragmentar os íons para posterior análise de sequência. Por fim, estes íons são passados para um detector e transmitidos para um sistema de processamento de dados de um software apropriado, resultando no espectro de massas (AEBERSOLD; MANN, 2003; MAY *et al.*, 2011). As ferramentas de software modernas incluem programas de controle para todas as partes da configuração do espectrômetro de massas (MAY *et al.*, 2011).

As duas técnicas mais comumente empregadas para volatilizar e ionizar as proteínas ou peptídeos para análise de MS são a ionização por eletrospray (ESI) e a desorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI). Na ESI ocorre a ionização dos analitos de uma solução e, portanto, é prontamente acoplado a ferramentas de separação à base de líquido como a cromatografia ou sistemas de separação eletroforese). A ESI é considerada um método “suave” ou “brando” de ionização que requer amostras líquidas que são entregues por injeção direta com uma seringa ou “online” acoplada a um sistema cromatográfico. A amostra passa por uma agulha capilar na qual a voltagem é aplicada. Como resultado, gotículas carregadas são geradas na ponta do capilar. Nesse processo o solvente evapora parcialmente, resultando na redução do diâmetro das gotas e aumento da densidade de cargas. A densidade de carga crescente leva às chamadas explosões de coulomb que reduzem ainda mais o diâmetro das gotículas. Desse modo, os analitos são dispersos como um spray fino em que íons são gerados em fase gasosa. Os íons são posteriormente detectados pelo analisador de massa (MAY *et al.*, 2011).

Na ionização por MALDI, as moléculas da amostra são imobilizadas por cocristalização na presença de compostos orgânicos ácidos como ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico ou ácido 2,5-dihidroxibenzóico em uma placa de metal. Quando os cristais da matriz/analitos formados na placa são atingidos pelo laser, há a absorção

dessa energia pela matriz e subsequentemente a dessorção e ionização dos analitos presentes na amostra para a fase gasosa. A ionização ocorre quando os íons da matriz transferem parcialmente sua carga para as moléculas do analito, produzindo principalmente íons peptídicos de carga única. Como o laser opera mais por disparos do que continuamente, o MALDI é usado principalmente em combinação com analisadores de tempo de voo (TOF). Esta combinação é denominada como MALDI-TOF e é uma das técnicas mais utilizadas em proteômica para análise de proteínas e peptídeos (MAY *et al.*, 2011). A ionização MALDI requer várias centenas de disparos de laser para atingir uma relação sinal-ruído aceitável para detecção de íons.

A análise das massas dos íons é a etapa na qual ocorre a separação dos íons de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ). Independente da técnica de ionização utilizada, as massas moleculares dos íons livres são medidas em analisadores de massa após passagem por uma câmara de vácuo (MAY *et al.*, 2011).

Os analisadores de massa mais comuns são os quadrupolos, os analisadores TOF (do inglês *Time of flight*), os *ions trap* de diferentes tipos e os analisadores de alta resolução, como os de Transformada de Fourier de ressonância ciclotron de íons (FT-ICR) e o *Orbitrap*. Os principais parâmetros relacionados são sensibilidade, resolução, precisão de massa e a capacidade de gerar espectros de massa de íons ricos em informações a partir de fragmentos de peptídeos (MAY *et al.*, 2011).

Os analisadores de massa são parte integrante de cada instrumento porque podem armazenar íons e separá-los com base nas relações massa-carga. Os analisadores *ions trap*, o *orbitrap* e ressonância de ciclotron de íons (ICR) separam íons com base em sua frequência de ressonância  $m/z$ . Os quadrupolos (Q) usam a estabilidade  $m/z$  e os analisadores TOF usam o tempo de voo. Cada analisador de massa possui propriedades exclusivas, como faixa de massa, velocidade de análise, resolução, sensibilidade, transmissão de íons e faixa dinâmica. Foram construídos espectrômetros de massa híbridos que combinaram mais de um analisador de massa para corresponder às necessidades específicas das análises, os chamados analisadores em “*Tandem*” (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

O sucesso da análise de proteínas por MS está intimamente ligado e altamente dependente de tecnologias de separação empregadas antes da análise por MS, as quais devem reduzir a complexidade das amostras biológicas. Como as proteínas são identificadas pelas razões massa-carga de seus peptídeos e fragmentos, é necessária uma separação adequada para identificações inequívocas. O preparo de amostras

inicial também é necessário para detectar espécies de baixa abundância que, de outra forma, seriam ofuscadas por um sinal de abundância mais alto, tal desafio será discutido posteriormente em mais detalhes. Assim, tanto a precisão quanto a sensibilidade de uma análise MS dependem da escolha de métodos de separação apropriados, os quais são frequentemente o primeiro passo no projeto de estudos proteômicos. Algumas das principais técnicas para a separação de proteínas são os diferentes tipos de cromatografia e a eletroforese 1D e/ou 2D (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

Na literatura existem vários trabalhos em que é feita uma revisão sobre a espectrometria de massas e sua utilização em estudos proteômicos (AEBERSOLD; MANN, 2003; BARBOSA *et al.*, 2012; BOJA *et al.*, 2014; FINDEISEN; LI; WANG; CHEN, 2017; MAY *et al.*, 2011; NEUMAIER, 2009; SMITH; SOUZA, 2021; THOMAS *et al.*, 2016; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

A utilização da espectrometria de massas na identificação/quantificação de proteínas é um componente-chave na descoberta de biomarcadores, pois os biomarcadores geralmente são selecionados por meio de variações nas concentrações de proteínas ou peptídeos entre os grupos de amostras. As técnicas de quantificação mudam à medida que um marcador progride ao longo do *pipeline* de biomarcadores, desde a quantificação relativa da fase de descoberta até a quantificação absoluta da fase de validação (THOMAS *et al.*, 2016).

A identificação de proteínas por MS pode ser realizada por meio da fragmentação de peptídeos específicos de sequência ou impressão digital de massa de peptídeos (*peptide mass fingerprinting* - PMF), também conhecida como mapeamento de massa de peptídeos. A abordagem padrão para identificar proteínas inclui a separação de proteínas por eletroforese em gel ou cromatografia líquida. Subsequentemente, as proteínas são clivadas com endoproteases de sequência específica, principalmente tripsina. Após a clivagem (digestão), os peptídeos gerados são investigados por determinação de massas moleculares ou geração de fragmentos de peptídeos. A identificação das proteínas é feita pela comparação das massas obtidas experimentalmente com as massas peptídicas teóricas de proteínas armazenadas em bancos de dados por meio de programas de busca de massas (THIEDE *et al.*, 2005).

O PMF é mais eficaz para a identificação de proteínas relativamente puras, podendo apresentar falhas na identificação de misturas complexas de proteínas. A

separação de amostras de proteínas complexas por eletroforese em gel bidimensional de alta resolução (2-DE) é bem adaptada à identificação de proteínas com PMF. Por outro lado, a aplicação de PMF em combinação com eletroforese em gel unidimensional ou cromatografia líquida deve ser ajustada à capacidade de separação (THIEDE *et al.*, 2005).

Apesar da espectrometria de massas ser a técnica analítica central nas tecnologias proteômicas atuais, a utilização de instalações de proteômica, incluindo o software para equipamentos, bancos de dados e a necessidade de pessoal qualificado aumentam substancialmente os custos, limitando o seu uso mais amplo. Além disso, o proteoma é altamente dinâmico devido a complexos sistemas regulatórios que controlam os níveis de expressão de proteínas (ASLAM *et al.*, 2017).

A etapa crucial em MS é o preparo da amostra, a fim de possibilitar a geração de espectros de massa de boa qualidade que são pré-requisitos essenciais para uma análise proteômica bem-sucedida que garantam o maior número possível de peptídeos. Espera-se que os métodos empregados sejam reprodutíveis, sensíveis e seletivos, para garantir a remoção de sais e outras impurezas e o esgotamento de biomoléculas de alta concentração que possam interferir no desempenho analítico (HAJDUK; MATYSIAK; KOKOT, 2016). Em Hajduk, Matysiak e Kokot (2016), os autores fazem uma revisão sobre alguns dos principais desafios na descoberta de biomarcadores com MALDI-TOF MS. Em Melby *et al.* (2021), os autores discutem sobre alguns desses desafios na proteômica, especialmente em relação à solubilidade de proteínas, faixa dinâmica de concentrações, complexidade do proteoma e análise de dados de MS.

A faixa dinâmica de concentrações de proteínas é um problema recorrente em diversas análises proteômicas de amostras complexas. Dentre estas amostras, soro e plasma estão entre as mais importantes fontes de biomarcadores clínicos e também as que oferecem um dos maiores desafios de preparo de amostras, uma vez que a alta concentração de algumas proteínas como a HSA ocasionam um sério problema supressão de sinal analítico em espectrometria de massas e impede a identificação de diversas proteínas de baixa abundância. Nas próximas seções são apresentadas algumas informações sobre esse assunto.

## 2.2 O MAIOR DESAFIO PARA ESTUDOS PROTEÔMICOS DO SORO HUMANO: AS PROTEÍNAS DE ALTA ABUNDÂNCIA

O plasma e soro humanos são amplamente utilizados para a descoberta de biomarcadores baseados em proteômica (LEE *et al.*, 2019). Esses fluidos biológicos prontamente disponíveis refletem o estado do corpo em estados fisiológicos e patológicos, tendo assim diversas aplicações clínicas. Eles estão envolvidos também no transporte de várias substâncias entre órgãos e tecidos e no carregamento de um grande número de proteínas (ZHAO *et al.*, 2016). Cerca de 90% da massa proteica do sangue é representada por albumina sérica, imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA), transferrina, haptoglobina e  $\alpha$ -1-antitripsina (JAVANMARD *et al.*, 2014). De acordo com Surinova *et al.* (2011), mais de 95% do proteoma do soro/plasma humano correspondem a somente 22 proteínas.

A remoção de proteínas de alta abundância é essencial para tornar detectáveis espécies pouco abundantes, incluindo moléculas fisiologicamente importantes, como citocinas, quimiocinas, lipoproteínas e hormônios peptídicos, que representam a fonte mais valiosa de biomarcadores de doenças. Uma das tarefas mais desafiadoras nos estudos de descoberta de biomarcadores consiste em reduzir essa enorme faixa dinâmica de concentração de proteínas. Muitas estratégias de depleção de proteínas tem sido propostas em soro sanguíneo e outros biofluidos para diminuir a concentração das proteínas mais abundantes antes da análise de MS. Especificamente, métodos baseados em ultrafiltração, precipitação e extração diferencial com reagentes químicos apropriados, bibliotecas combinatórias de ligantes peptídicos, nanopartículas magnéticas e kits de depleção comerciais baseados em afinidade e/ou imunoafinidade são utilizados propostos (PISANU *et al.*, 2018).

Entre estas proteínas, a principal é a albumina sérica humana (HSA), a mais abundante do plasma humano, constituindo cerca de 60% do total de proteínas. A albumina sérica humana (HSA) é uma macromolécula monomérica de múltiplos domínios, representando o principal determinante da pressão oncótica plasmática e o principal modulador da distribuição de fluidos entre os compartimentos corporais. A HSA exibe uma extraordinária capacidade de ligação a ligantes, fornecendo um depósito e um transportador para muitos compostos endógenos e exógenos. Ela representa o principal carreador de ácidos graxos, afeta a farmacocinética de muitas drogas, fornece a modificação metabólica de alguns ligantes, torna toxinas potenciais

inofensivas, é responsável pela maior parte da capacidade antioxidante do plasma humano e exibe propriedades (pseudo-) enzimáticas (FANALI *et al.*, 2012). Esta versatilidade, que surge da presença de múltiplos sítios de ligação, que são dependentes de vários fatores ambientais como pH, temperatura e força iônica (VARSHNEY *et al.*, 2010).

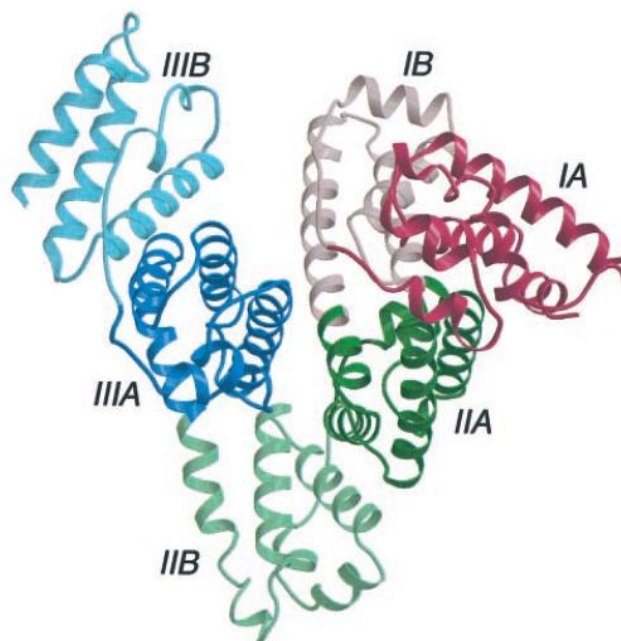
A HSA também pode ser considerada como um biomarcador de muitas doenças, incluindo câncer, artrite reumatóide, isquemia, obesidade pós-menopausa, enxerto agudo grave contra-doença do hospedeiro, e doenças que necessitam de acompanhamento de controle glicêmico. Além disso, a HSA é amplamente utilizada clinicamente para tratar várias doenças, incluindo hipovolemia, choque, queimaduras, perda de sangue cirúrgicas, traumas, hemorragias, circulação extracorpórea, síndrome do desconforto respiratório agudo, hemodiálise, insuficiência hepática aguda, doença hepática crônica, suporte nutricional e hipoalbuminemia. Existem relatos de aplicações biotecnológicas de HSA, incluindo biomateriais implantáveis, adesivos e selantes cirúrgicos, biocromatografia, captura de ligantes e proteínas de fusão (FANALI *et al.*, 2012).

A biossíntese de HSA começa no hepatócito com a produção de pré-pró-albumina que é modificada em pró-albumina no lúmen do retículo endoplasmático. Em seguida, a furina cliva um oligopeptídeo N-terminal de 6 aminoácidos na rede trans-Golgi para obter a proteína plasmática madura, constituída por uma única cadeia de 585 resíduos, com peso molecular de 66,438 kDa (PETERS JR, 1996 apud FANALI *et al.*, 2012).

A HSA é uma proteína plasmática abundante, multifuncional não glicosilada, carregada negativamente, com propriedades de ligação ao ligante e transporte, funções antioxidantes e atividades enzimáticas (PETERS-JR, 1995). A proteína é um monômero de 585 resíduos de aminoácidos com três domínios  $\alpha$ -helicoidais homólogos, denominados domínios I, II e III. Cada domínio contém 10 hélices e é dividido em subdomínios antiparalelos de seis e quatro hélices (A e B) (VARSHNEY *et al.*, 2010). A estrutura da HSA é apresentada na Figura 3:

:

Figura 3 - Estrutura nativa da HSA.



Fonte: Bhattacharya, Curry e Franks (2000).

A estrutura secundária de HSA é dominada por  $\alpha$ -hélices (68%), sem nenhum elemento de folha  $\beta$ . Ela está disposta em uma conformação globular em forma de coração (FIGURA 3) contendo três domínios homólogos, de dois subdomínios cada (A, B), geralmente indicados como I (1 - 195), II (196 - 383) e III (384 - 585) (VARSHNEY *et al.*, 2010). Embora os três domínios da HSA sejam estruturalmente comparáveis, eles diferem em termos de sequências de aminoácidos. Percentualmente, as semelhanças entre os domínios 1 e 2, domínios 1 e 3 e domínios 2 e 3 são de 25%, 18% e 20%, respectivamente (ROTHSCHILD; ORATZ; SCHREIBER, 1988). Essas diferenças entre os domínios resultam em distribuição não homogênea de cargas hidrofóbicas (MAPIOUR; ABDELRASOUL, 2023).

A HSA contém um único resíduo Trp na posição 214. Os resíduos Met, Gly e Ile são baixos, enquanto Cys, Leu, Glu e Lys são abundantes. O grande número de resíduos ionizados confere à HSA uma alta carga total (ou seja, 215 íons por molécula em pH 7,0), o que facilita sua solubilidade. Além disso, os resíduos de aminoácidos ácidos superam os básicos na HSA, resultando em uma carga líquida negativa por moléculas. A HSA contém 35 resíduos Cys formando 17 pontes dissulfeto, com o único resíduo Cys livre localizado na posição 34. As pontes dissulfeto contribuem significativamente para a estabilidade da HSA e evidenciam seu longo tempo de vida biológica (PETERS JR, 1996).

Como consequência do elevado número de resíduos ácidos e básicos, a estrutura HSA sofre transições conformacionais reversíveis em diferentes valores de pH (ASCENZI; FASANO, 2010; CURRY, 2003; DOCKAL; CARTER; RÜKER, 2000;

PETERS JR, 1996; SHAW; PAL, 2008; THAKUR *et al.*, 2014). Em pHs ácidos abaixo de 4,3, acredita-se que a HSA assume a forma (F) a qual é altamente carregada (ASCENZI *et al.*, 2006; FOSTER, 1977; SHAW; PAL, 2008), caracterizada por um aumento na viscosidade, solubilidade muito menor e perda da  $\alpha$ -hélice em relação à forma neutra (N) (ASCENZI; FASANO, 2010). Na faixa de pH de 4,3 a 8,0, e na ausência de efetores alostéricos, a HSA apresenta a forma normal (N) que se caracteriza pela estrutura típica em forma de coração. Para pHs maiores que 8, ocorre a transição para a forma básica (B), na qual acredita-se que a estrutura em forma de coração se transforme em um elipsóide, caracterizada pela perda da  $\alpha$ -hélice e aumento da afinidade por alguns ligantes em relação à forma N (ASCENZI *et al.*, 2006; PETERS JR, 1996). Para alguns autores, em pHs extremos a HSA ainda pode sofrer outras mudanças conformacionais, como a conformação estendida (E) em pHs inferiores a 2,7 (ASCENZI; FASANO, 2010; FANALI *et al.*, 2012) e a forma básica (A) em pHs superiores a 10 (NIKKEL; FOSTER, 1971; SHAW; PAL, 2008).

Como já mencionado, em estudos proteômicos as proteínas altamente abundantes tendem a obscurecer a detecção de potenciais biomarcadores que geralmente estão em concentrações muito mais baixas (AHMED *et al.*, 2003; ANDAÇ *et al.*, 2012; ANDAÇ; DENIZLI, 2014; BHAKTA *et al.*, 2017; BOLLINENI *et al.*, 2015; BÜYÜKTIRYAKI *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2005; FILIP *et al.*, 2015; FONSLow *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2017; GÖKTÜRK *et al.*, 2018; GREENOUGH *et al.*, 2004; HEEMSTRA; JAHNKE; PETERSON, 2016; JESUS *et al.*, 2017; KOUTROUKIDES *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2015b, 2019; NESET *et al.*, 2022; PETRIČ *et al.*, 2007; PISANU *et al.*, 2018; SILVA-COSTA *et al.*, 2019; STEEL *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2017b; YANG *et al.*, 2017, 2013; ZOLOTARJOVA *et al.*, 2005). Assim, a análise de soro/plasma é altamente desafiadora devido à complexidade e à ampla faixa dinâmica de seus proteomas (LEE *et al.*, 2019), o que leva à necessidade de um preparo de amostras adequado.

Em Omenn *et al.* (2005), os autores ressaltam a importância do preparo da amostra, e recomendam o uso de apropriadas técnicas de depleção de proteínas de alta abundância, a fim de melhorar a resolução, sensibilidade e a reprodutibilidade da identificação de biomarcadores. Diversas técnicas de depleção e/ou separação têm sido utilizadas para diminuir a quantidade dessas proteínas de alta abundância (KAWASHIMA *et al.*, 2010).

Entre as estratégias para resolver esse problema da complexidade dos fluidos biológicos, as principais são a depleção ou esgotamento das proteínas de alta abundância, o enriquecimento de proteínas de interesse de baixa abundância e o pré-fractionamento das amostras (LEE *et al.*, 2019). Nas próximas seções serão apresentadas algumas das principais técnicas de separação de proteínas utilizadas no preparo de amostras de estudos proteômicos.

### **2.2.1 Principais estratégias de separação de proteínas**

O objetivo principal da separação de proteínas é diminuir a complexidade da composição das amostras. De acordo com Costa *et al.* (2017), as principais estratégias de separação de proteínas para estudos proteômicos podem ser categorizadas em metodologias de depleção, enriquecimento e equalização e, embora esses termos às vezes sejam usados como sinônimos, eles se referem à diferentes abordagens, embora o objetivo seja análogo. De modo geral, os métodos de depleção visam a remoção de proteínas de alto teor específico, geralmente as proteínas de alta abundância como a albumina humana. As estratégias de enriquecimento, por outro lado, são concebidas para, como o nome sugere, “enriquecer” o grupo ou classe ou proteínas alvo, aumentando suas concentrações em relação às outras para posterior análise e identificação. Por último, as abordagens de equalização podem ser vistas como uma combinação dessas técnicas, resultando assim em um “proteoma mais democrático”, com uma diminuição da faixa dinâmica das concentrações das proteínas, ou seja, uma redução da diferença entre essas concentrações. Embora haja esta distinção, o objetivo das diferentes estratégias de separação de proteínas é o mesmo: a diminuição da concentração das PAAs e aumento da concentração das PBAs.

De acordo com Fang e Zhang (2008), um método ideal utilizado para separações de misturas complexas de proteínas ou enriquecimento de grupos específicos de proteínas de baixa abundância deve possuir as seguintes características:

- a) Alta especificidade e precisão;
- b) Baixa reatividade cruzada com proteínas não-alvo (menos ligação inespecífica);
- c) Alta afinidade e avidéz (poder de ligação multivalente);

- d) Recuperação de proteínas ligadas para análise (bom para fracionamento ou particionamento);
- e) Alta capacidade (para processar grande volume por carga);
- f) Aplicação entre espécies (aplicável para amostras de diferentes espécies);
- g) Uso conveniente (operação simples e fácil);
- h) Possibilidade de automação ou racionalização (on-line com outros dispositivos);
- i) Alta reprodutibilidade (com coeficiente de variação aceitável);
- j) Boa capacidade de reutilização (fidelidade após a regeneração);
- k) Manter a integridade da amostra (manter a representatividade da amostra);
- l) Acessibilidade razoável (custo-benefício).

Essas características ideais acima impõem desafios adicionais no desenvolvimento e validação de tecnologia. Existem várias abordagens para separação ou enriquecimento de proteínas com base em suas características bioquímicas, como peso molecular, massa, densidade, hidrofobicidade, carga superficial, ponto isoelétrico, estrutura terciária, sequência de aminoácidos (epítipo), entre outras. Centrifugação convencional, ultrafiltração e cromatografia líquida, incluindo ligantes corantes (*Cibacron Blue*), foram usados anteriormente para remover albumina e outras proteínas plasmática (COSTA *et al.*, 2017).

Diversos métodos têm sido empregados para depleção de proteínas de alta abundância, como por exemplo a precipitação por reagentes químicos como ditioneitol e acetonitrila, kits comerciais baseados em imunoafinidade (ProteoMiner<sup>R</sup>) (JESUS *et al.*, 2017), cromatografia de interação hidrofóbica (MAHN *et al.*, 2010), precipitação por sulfato de amônio (MAHN; ISMAIL, 2011), colunas de imunocaptura com diferentes formatos, dependendo do número de proteínas a serem removidas, digestão seletiva (FONSLOW *et al.*, 2013) e nanopartículas magnéticas (JESUS *et al.*, 2017).

#### 2.2.1.1 Separação por precipitação química

Uma estratégia comumente utilizada em estudos proteômicos devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo é a depleção por precipitação química. Basicamente, a precipitação ocorre quando uma proteína atinge seu ponto isoelétrico,

em que a o balanço de cargas é zero, o que faz com que as forças de repulsão sejam minimizadas, de modo que há a formação de agregados que tendem a se precipitar. A precipitação química tem sido utilizada principalmente para a depleção da de albumina (JMEIAN; EL RASSI, 2009).

Diferentes abordagens têm sido propostas para depleção por precipitação química, tal método também se fundamenta nas diferentes características de solubilidade das proteínas, uma vez que algumas podem ser solúveis em água, como a albumina, outras são solúveis em soluções salinas (globulinas), outras em álcoois (como as prolaminas), entre outras. Conforme Jmeian e Rassi (2009), vários reagentes podem ser usados para esse fim, como NaCl/etanol, ácido tricloroacético (TCA)/acetona ou uma mistura de n-butanol/sulfato de amônio. Esta abordagem de precipitação baseia-se no fato de que os complexos resultantes, como TCA e albumina, são solúveis em solventes orgânicos, como metanol e acetona, enquanto outros complexos TCA e proteína não são.

Um método de pré-fracionamento realizado por um sistema aquoso bifásico (NATPS) composto de n-butanol,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e água foi desenvolvido por Bai, Yang e Yang (2006). Utilizando albumina de soro humano, zeína e  $\gamma$ -globulina como proteínas modelo, os autores avaliaram a eficácia da separação do NATPS sob a influência do pH, volume de n-butanol e concentração de sal e proteínas. O modelo e as amostras de proteínas reais foram separados pelo NATPS e, em seguida, usadas diretamente para eletroforese em gel sem separar as proteínas alvo dos reagentes formadores de fase. Os estudos revelaram que o NATPS poderia separar proteínas em multigrupos por extração em uma única etapa, não sendo necessário separar as proteínas-alvo dos reagentes formadores de fase.

Alguns autores utilizam solventes orgânicos como acetonitrila, acetona e ácido tricloroacético, na precipitação de proteínas de alta abundância. Entre eles, Kay *et al.* (2008) visando a detecção da proteína de baixa abundância IGF-I para posterior detecção em espectrometria nano-LC/MS/MS, desenvolveram uma estratégia de depleção de proteínas majoritárias que emprega precipitação com acetonitrila. Os resultados obtidos por meio de uma análise em eletroforese SDS-PAGE não mostraram bandas correspondentes a proteínas de massa molecular acima de 75 kDa após a extração, demonstrando eficiência do método para a depleção de proteínas de alto peso molecular. Análise de proteínas totais de os extratos de ACN mostraram que aproximadamente 99,6% de todas as proteínas foram removidas do soro.

A maior desvantagem desta estratégia é a baixa especificidade, em que proteínas não direcionadas podem ser perdidas durante a depleção e isso pode levar à perda de biomarcadores durante o processo. Outras desvantagens são a possibilidade de ocorrência de ressuspensão insuficiente de algumas proteínas, como proteínas hidrofóbicas, e o fato de que a separação de proteínas muito alcalinas ou ácidas também é dificultada. Soma-se a isso, o fato de que o enriquecimento de proteínas intactas é possivelmente menos específico do que o de peptídeos, o que pode ser atribuído à maior complexidade das estruturas proteicas e à integridade dos domínios proteicos formados por enovelamento tridimensional adequado, que podem estar ausentes após a proteína clivagem em peptídeos (FÍLA; HONYS, 2012).

No trabalho de Bollineni *et al.* (2015), foi proposta uma abordagem de precipitação e solubilidade diferencial de proteínas como uma estratégia de fracionamento para remoção abundante de proteínas do plasma. As proteínas totais do plasma foram precipitadas com sulfato de amônio saturado a 90%, seguida de solubilização diferencial em soluções saturadas de sulfato de amônio a 55% e 35%. Usando um gradiente de cromatografia líquida (LC) de quatro horas e um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap XL, um total de 167 e 224 proteínas foram identificadas nas frações de sulfato de amônio de 55% e 35%, enquanto 235 proteínas foram encontradas nas frações de proteína restantes. SDS-PAGE e contagens de espectro total exclusivas de análises de LC-MS/MS mostraram claramente que a maioria das proteínas plasmáticas abundantes foram solubilizadas em soluções de sulfato de amônio a 55% e 35%, indicando que a fração restante da proteína é de potencial interesse para identificação de proteínas plasmáticas de menor abundância.

Em Qu *et al.* (2009), os autores desenvolveram um sistema simples de extração aquosa em duas fases (ATPS) de PEG/fosfato para separação seletiva e enriquecimento de proteínas. Para isso foi estudado o efeito da concentração de fosfato e pH na partição de cinco proteínas modelo (albumina de soro bovino, citocromo C, lisozima, mioglobina e tripsina). O sistema PEG/fosfato foi inicialmente aplicado a amostras de saliva e plasma humanos reais e os resultados primários demonstraram a separação seletiva e o enriquecimento de proteínas em ATPS, fornecendo o potencial para a depleção de proteínas de alta abundância.

Outros exemplos do uso de precipitação química na depleção de proteínas podem ser encontrados em Mahn e Ismail (2011), em que os autores também utilizaram o sulfato de amônio para precipitação de proteínas de alta abundância do

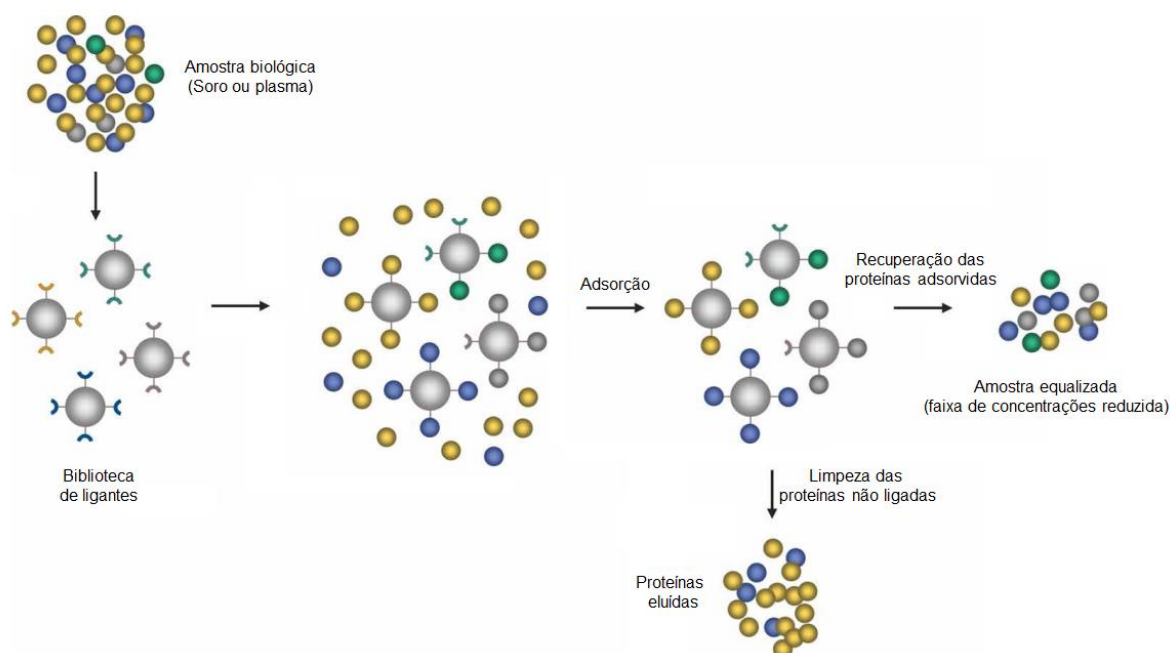
plasma sanguíneo, em Chen *et al.* (2005), os quais propuseram um método modificado a base de ácido tricloroacético/acetona para depleção de albumina (HSA), em Bai *et al.* (2010) em que foi proposto um método de depleção utilizando um sistema bifásico aquoso (ATPS) composto por isopropanol, sulfato de amônio e água, e por último em Jesus *et al.* (2017), com uma solução de ditioneitol e acetonitrilo (DTT/ACN).

#### 2.2.1.2 Métodos enriquecimento e equalização

A estratégia de separação de proteínas por equalização e/ou enriquecimento é baseada na equalização da concentração de proteínas usando uma biblioteca combinatória de ligantes peptídicos. Esses ligantes são acoplados a grânulos porosos esféricos. Quando esses grânulos entram em contato com uma amostra de proteomas complexos (urina, soro humanos ou clara de ovo por exemplo) de composição de proteínas e abundâncias relativas amplamente diferentes, eles são capazes de “igualar” as concentrações das proteínas, reduzindo a concentração dos componentes mais abundantes, ao mesmo tempo em que aumenta a concentração das de baixa abundância (RIGHETTI *et al.*, 2006). O método é mais indicado quando a(s) proteína(s) alvo é conhecida(s) e sabe-se que há um ligante específico para ela na biblioteca de grânulos de enriquecimento.

Uma biblioteca de ligantes deve atender a três critérios: (i) uma diversidade reprodutível suficiente de ligantes deve estar presente para adsorver cada proteína na mistura, (ii) as constantes de dissociação dos ligantes e proteínas devem ser compatíveis com a concentração da proteína, e (iii) os ligantes e seus suportes devem ser compatíveis com a amostra de teste não fracionada e ter uma capacidade de ligação alta o suficiente para capturar proteína suficiente para ser detectada pelos métodos atuais (THULASIRAMAN *et al.*, 2005). A seguir, na Figura 4, é apresentado o princípio da tecnologia de equalização/enriquecimento.

Figura 4 - Representação esquemática do processo de equalização para redução da faixa de concentração de proteínas de uma amostra.



Fonte: Adaptado de Guerrier, Righetti e Boschetti (2008).

O princípio de funcionamento desta técnica é baseado na interação específica entre cada proteína da amostra e seus respectivos sítios de ligação peptídica nos ligantes. Uma amostra complexa de proteínas é misturada com os grânulos de ligantes da biblioteca e, como a biblioteca possui quantidades iguais de cada ligante, teoricamente a quantidade máxima de cada proteína ligada é a mesma. Desse modo, há a diminuição das proteínas presentes em excesso e concentração daquelas de abundância relativamente menor. Os componentes não ligados são lavados e as proteínas capturadas são finalmente dessorvidas e recuperadas (LEE *et al.*, 2019). Todo o processo de preparo da amostra leva cerca de meio dia e produz uma solução de proteína que pode ser usada como tal para investigações de espectrometria de massa por exemplo (GUERRIER; RIGHETTI; BOSCHETTI, 2008).

Essa tecnologia é modulada por um espectro relativamente grande de parâmetros físico-químicos, como o número de diversos peptídeos, que depende do número de aminoácidos utilizados e do comprimento do peptídeo final, tamanho das partículas dos grânulos, condições de adsorção das proteínas tais como quantidade/diluição de amostra, pH e força iônica do tampão, temperatura, concentração das proteínas, presença de competidores, e o método de dessorção e

fatores associados (BOSCHETTI; RIGHETTI, 2013). Tais condições podem ser controladas a fim de otimizar-se a adsorção das proteínas de baixa abundância.

Um kit comercial com destaque na literatura é o *ProteoMiner*<sup>®</sup> (BIO-RAD) e a tecnologia do *ProteoMiner* utiliza uma biblioteca de grânulos de hexapeptídeos com grande diversidade para ligar e enriquecer proteínas de baixa abundância, mas ao mesmo tempo suprime a concentração de proteínas de alta abundância em análises subsequentes (MURPHY; DOWLING, 2023). Quando uma amostra biológica complexa é aplicada sobre as esferas, as proteínas de alta abundância saturam os seus ligantes de alta afinidade e o excesso de proteínas é removido por lavagem, em contraste, as proteínas de baixa abundância são concentradas no(s) seu(s) ligante(s) de afinidade específico(s). Mais detalhes técnicos sobre o kit *ProteoMiner* podem ser encontrados em Murphy e Dowling (2023) e Li (2015) e exemplos de aplicação em Mouton *et al.* (2010), Million *et al.* (2011), Fonslow *et al.*, 2011; Jesus *et al.* (2017), Liang, Tan e Chung (2012).

De acordo com Guerrier, Righetti e Boschetti (2008), os métodos de enriquecimento podem apresentar diversos problemas e os principais são discutidos a seguir. Um destes problemas é a tendência de coagulação do plasma, pois o plasma contém fatores de coagulação que podem ser ativados durante o tratamento. Para contornar essa situação, a adição de agentes anticoagulantes deve ser feita antes da incubação com grânulos de ligantes, exceto heparina, que pode competir com a captura de proteínas (BOSCHETTI; RIGHETTI, 2013).

Outro problema é a viscosidade da solução. Quando é devida à presença de polissacarídeos neutros, recomenda-se um tratamento em suspensão com agitação durante várias horas ou durante a noite, visto que a presença de polissacarídeos ácidos com forte afinidade pelos grânulos pode afetar a capacidade dos grânulos de capturar adequadamente as proteínas. Lipídios também podem causar um aumento de viscosidade e como as amostras biológicas contém uma quantidade significativa de lipídios, estes devem ser removidos antes do tratamento com o kit. Uma alternativa é a limpeza das proteínas por precipitação com vários meios, como sulfato de amônio (BOSCHETTI; RIGHETTI, 2013).

Outro problema é que a solução de proteína contém ácidos nucleicos. A presença de ácidos nucleicos pode impedir a captura adequada de proteínas porque eles competem com as proteínas ou obstruem os poros do grânulo (BOSCHETTI; RIGHETTI, 2013). Diante disso é aconselhada a remoção destes ácidos por meios

clássicos de precipitação ou então, alternativamente, as proteínas podem ser precipitadas, separadas e redissolvidas em PBS antes do tratamento.

Após o tratamento com *ProteoMiner*, as condições ambientais podem provocar a precipitação de proteínas ao longo do tempo (amostra instável) e/ou a aglomeração de grânulos (GUERRIER; RIGHETTI; BOSCHETTI, 2008). Para evitar isso, a amostra deve ser melhor equilibrada com a solução inicial antes do contato com os grânulos (BOSCHETTI; RIGHETTI, 2013).

A redução de espécies de alta abundância pode não ocorrer como esperado, e a quantidade de proteínas pode ser muito pequena em comparação com o volume de grânulos. Isso pode ser devido à presença de agentes competidores. A composição proteica do sobrenadante final pode ser extremamente complexa e de difícil análise. Com o aumento da concentração de proteínas de baixa abundância, a amostra tratada obtida pode ser muito mais complexa do que inicialmente, por isso pode ser necessário fracionar a amostra por qualquer meio bioquímico, como cromatografia, separação de proteínas por grupos de pontos isoelétricos ou ainda por eluição sequencial de esferas da biblioteca de ligantes (BOSCHETTI; RIGHETTI, 2013).

Em situações nas quais as proteínas que não possuem ligantes peptídicos correspondentes ou têm afinidades fracas não são retidas de forma eficiente pelos grânulos, podendo ocorrer a perda destas proteínas (THULASIRAMAN *et al.*, 2005). A perda também pode ocorrer se a eluição das proteínas adsorvidas for incompleta. Apesar do número extremamente grande de ligantes, se nenhum tiver afinidade por uma determinada proteína, esta não será capturada e, portanto, não poderá ser detectada. De acordo com dados experimentais, esse fenômeno parece estar limitado a 5-15% do total de proteínas encontradas, dependendo do extrato biológico. Embora não tenha sido formalmente demonstrado, acredita-se que o fenômeno se deva à ausência de ligantes peptídicos específicos. A afinidade entre um ligante peptídico e uma determinada proteína varia em função de uma série de parâmetros físico-químicos, como o pH do meio (BOSCHETTI; RIGHETTI, 2013).

A reprodutibilidade dos procedimentos pode não ser satisfatória em operações distintas, uma vez que as condições de pH, força iônica e temperatura devem ser as mesmas de uma tentativa para outra. A captura de proteínas hidrofóbicas pode ser aumentada de acordo com um aumento na temperatura e um pH diferente do valor inicial pode alterar a constante de dissociação entre proteínas e seu respectivo peptídeo ligante (GUERRIER; RIGHETTI; BOSCHETTI, 2008).

### 2.2.1.3 Métodos de depleção oligoespecífica

Uma outra técnica de separação de proteínas é a depleção de afinidade oligoespecífica. O termo oligoespecífico abrange métodos de subtração que visam uma proteína bem estabelecida (por exemplo, albumina), mas cuja especificidade nem sempre é notável e depende das condições operacionais.

Dentro desta estratégia de depleção de afinidade oligoespecífica, uma possibilidade é a utilização de corantes imobilizados, tais como o clorotriazina *Cibacron Blue* (CB). Neste caso específico, o corante liga-se à albumina como resultado de múltiplas interações moleculares que podem ser eletrostáticas (pela presença de grupos sulfato), hidrofóbicas mediadas pelos grupos aromáticos e interações de ligações de hidrogênio. O método pode ser facilmente utilizado em diferentes pH e forças iônicas, com resultados variados. A albumina adsorvida pode ser dissociada usando-se altas concentrações de cloreto de sódio, etilenoglicol e ureia concentrada, visando especificamente cada uma dessas interações moleculares (RIGHETTI; BOSCHETTI, 2013). A principal desvantagem deste método são as interações não específicas relativamente altas que geralmente resultam na remoção de muitas proteínas além da albumina (JMEIAN; RASSI, 2009; RIGHETTI; BOSCHETTI, 2013).

Outra possibilidade de depleção oligoespecífica é a utilização de ligantes de proteínas como as proteínas A e G. A proteína A é uma proteína de superfície de 42 kDa encontrada na parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus*, é conhecida há muito tempo por se ligar à imunoglobulina G. A proteína A reage com a parte Fc da numerosos anticorpos, de modo que quando ligada à Sepharose ela pode ser usada como um imunossorvente para isolamento da IgG humana (HJELM; HJELM; SJÖQUIST, 1972). Este método funciona tem as desvantagens da fraca interação com a subclasse IgG3 e da coadsorção de outras proteínas de baixa abundância. Semelhante à proteína A, a Proteína G é uma proteína da parede celular bacteriana de *Streptococci* do grupo G (AKERSTRÖM *et al.*, 1985), que apresenta grande afinidade pela imunoglobulina (IgG), mas exibindo diferentes especificidades de ligação. A proteína G tem melhor capacidade de ligação para uma gama mais ampla de subclasses de IgG. Estas diferentes especificidades levaram ao desenvolvimento da Proteína A/G, uma proteína de fusão recombinante de 50,46 kDa que combina os

domínios de ligação de IgG da Proteína A e da Proteína G, com as propriedades aditivas de ambas as proteínas (ELIASSON *et al.*, 1988).

Em Jmeian e Rassi (2007), os autores desenvolveram microcolunas monolíticas de afinidade com ligantes de afinidade imobilizados, incluindo proteína A, proteína G' (variante da proteína G, que é preparada pela clonagem e expressão do gene da proteína G do *streptococcus* cepa G148 em *Escherichia coli* conforme proposto em Goward *et al.* (1990) e anticorpos policlonais, as quais foram desenvolvidas para a depleção em microescala das oito principais proteínas abundantes do soro humano em sistemas cromatográficos. Segundo os autores, a capacidade de carregamento de amostra de proteína A e proteína G' foi cerca de 7 a 25 vezes maior do que a das colunas de afinidade baseadas em anticorpos. A natureza macroporosa das colunas monolíticas em tandem, altamente permeáveis ao fluxo acionado por pressão, permitiu o projeto de longas colunas de afinidade para cromatografia líquida de microafinidade para a depleção simultânea das oito proteínas em uma única execução. Além disso, as colunas de afinidade puderam ser integradas com colunas monolíticas de tripsina imobilizada para permitir ainda a digestão simultâneas de proteínas para estudos de espectrometria de massas.

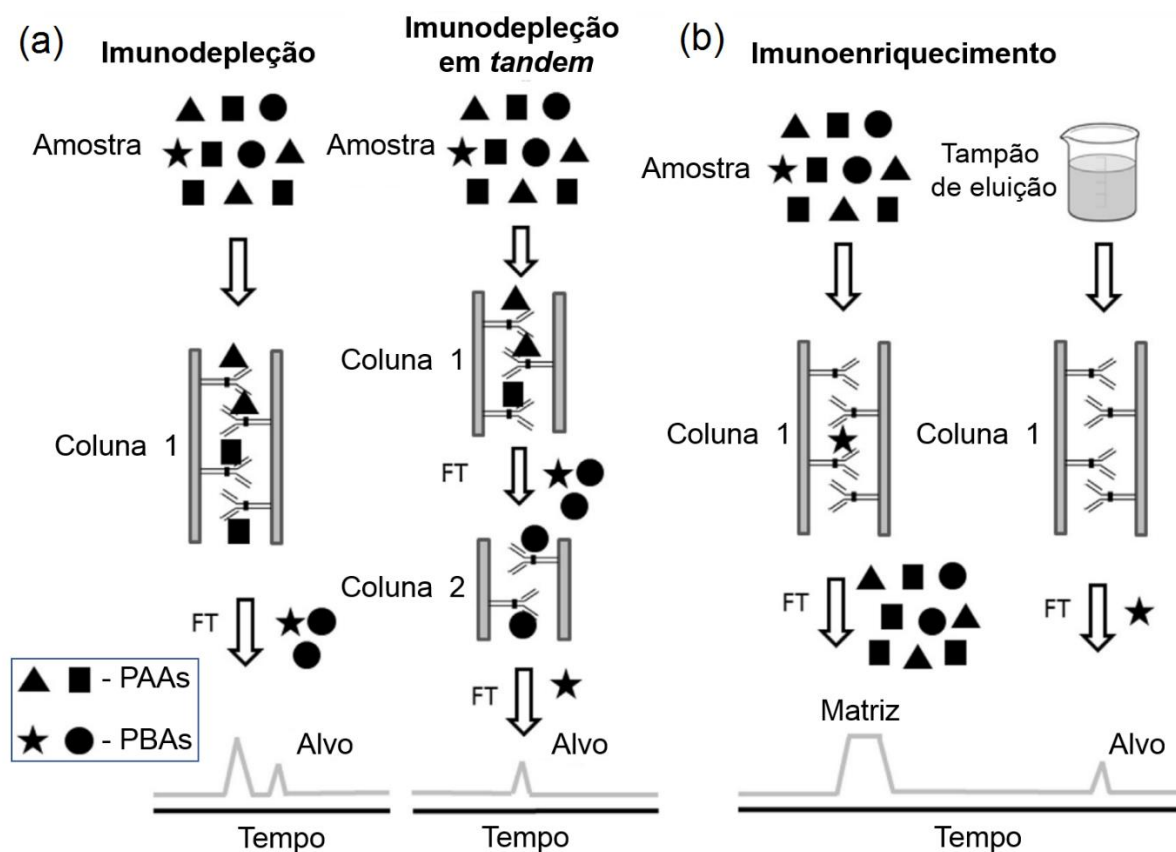
Com o objetivo de melhorar especificidade de algumas das estratégias de depleção já mencionadas, foi desenvolvida a depleção de imunoafinidade, também conhecida como imunodepleção, usando anticorpos específicos, dos quais os anticorpos policlonais IgG e IgY são os dois principais. As diferenças entre os anticorpos IgY e IgG são facilmente aparentes e suas características, pontos fortes e fracos são diretamente traduzidos nos produtos de imunoafinidade deles derivados. É importante escolher o sistema e os dispositivos apropriados para a preparação de amostras proteômicas, em que muitos fatores precisam ser considerados, como as formas, características e especificações do produto, objetivos experimentais, tipo de amostra, tamanho e número, bem como métodos e compatibilidades de processos posteriores. (COSTA *et al.*, 2017). Muitos dos métodos de depleção de imunoafinidade disponíveis comercialmente, incluem colunas LC e *spin columns* (KIM *et al.*, 2010).

A imunodepleção de proteínas de alta abundância (PAAs) é uma estratégia relativamente comum no preparo de amostras para análise de proteoma, na qual múltiplos anticorpos são misturados em uma proporção otimizada e imobilizados em matrizes sólidas para remover múltiplos PAAs simultaneamente (FANG; ZHANG,

2008). Muitos destes métodos são desenvolvidos em cromatografia de afinidade (cromatografia de imunoafinidade) ou em *spin columns*.

De acordo com Wu *et al.* (2016), a cromatografia de imunoafinidade (CIA) representa um tipo específico de cromatografia de afinidade em que a fase estacionária é composta por anticorpos imobilizados ou outros reagentes de afinidade em matriz de suporte sólido. O princípio da CIA baseia-se na interação não covalente seletiva entre anticorpos (ou reagentes de afinidade) e seus alvos de ligação específicos ou antígenos. O objetivo das separações de CIA pode ser enriquecer proteínas de baixa abundância de interesse, removendo as de alta abundância das amostras por meio da depleção de imunoafinidade (imunodepleção) ou direcionando a captura de alvos de interesse de baixa abundância por meio de enriquecimento de imunoafinidade (imunoenriquecimento). Em Wu *et al.* (2016), os autores ilustram os princípios da cromatografia de imunoafinidade por imunodepleção ou imunoenriquecimento, sendo essas representações reproduzidas na Figura 5:

Figura 5 - Representação esquemática dos princípios da cromatografia de imunoafinidade por (a) imunodepleção (b) imunoenriquecimento.



Fonte: Adaptado de Wu *et al.* (2016).

Conforme pode ser visto na Figura 5, as matrizes cromatográficas (colunas) com anticorpos imobilizados podem ser utilizadas tanto para adsorver especificamente as PAAs (imunodepleção) ou então as PBAs, geralmente os biomarcadores alvo (imunoenriquecimento), para análises posteriores. Cada estratégia é descrita a seguir:

- a) A estratégia de imunodepleção é projetada para depletar as PAAs e enriquecer as PBAs. Na imunodepleção, as amostras de plasma ou soro são primeiro carregadas em uma coluna de depleção, e apenas PAAs específicas são capturadas seletivamente pelos anticorpos imobilizados na coluna, enquanto outros PBAs fluem diretamente e são analisadas (WU *et al.*, 2016).
- b) Para maximizar a detecção de PBAs, em alguns casos é necessária a remoção simultânea de várias PAAs. Uma estratégia pode ser a utilização de múltiplos anticorpos misturados e imobilizados na coluna para remover múltiplas PAAs. Além disso, diferentes colunas podem ser utilizadas em conjunto para permitir a depleção de um número maior de PAAs (WU *et al.*, 2016).
- c) Semelhante à estratégia de enriquecimento já discutida anteriormente, o imunoenriquecimento (ou purificação por imunoafinidade) é mais direcionada às proteínas específicas alvo (PBAs). No imunoenriquecimento, apenas os analitos alvo de baixa abundância são reconhecidos e ligados à coluna, enquanto todas as outras proteínas/peptídeos são lavados e os alvos posteriormente eluídos da coluna para análise (WU *et al.*, 2016).

Vários produtos e kits comerciais foram desenvolvidos e aprimorados ao longo dos anos para a separação por imunoafinidade de proteínas de média e alta abundâncias de soro/plasma humanos. Na Tabela 1 a seguir, obtida de Wu *et al.* (2016), são apresentados alguns kits comerciais e as proteínas alvo no processo de depleção:

Tabela 1 - Principais PAAs do plasma/soro adsorvidas pelas colunas de depleção de imunoafinidade comumente disponíveis comercialmente.

Proteínas	Colunas comerciais						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Albumina	√	√	√	√	√	√	√
IgG		√	√	√	√	√	√
Transferrina				√	√	√	√
Fibrinogênio					√	√	√
IgA				√	√	√	√
α-2-Macroglobulina					√	√	√
IgM					√	√	√
α-1-Antitripsina				√	√	√	√
Complemento C3					√	√	√
Haptoglobina				√	√	√	√
Apolipoproteína AI					√	√	√
Apolipoproteína AII					√	√	√
Apolipoproteína B						√	√
α-1-Glicoproteína ácida					√	√	√
Transtirretina					√		
Ceruloplasmina							√
Complemento C4							√
Complemento C1q							√
IgD							√
Pré-albumina							√
Plasminogênio							√
Nº de PAAs esgotadas	1	2	2	6	14	14	20
Fornecedores	1	2	3	4	5	6	7

Fonte: Adaptado de Wu *et al.* (2016).

I: Vivapure; II: Qproteome; III: ProteoPrep; IV: Mars Hu-6; V: Mars Hu-14; VI: Seppro IgY-14; VII: ProteoPrep 20.

Fornecedores: 1: Sartorius; 2: QIAGEN; 3: Sigma-Aldrich; 4: Agilent; 5: Agilent; 6 e 7: Sigma-Aldrich.

A escolha entre as colunas LC ou colunas giratórias, deve ser feita considerando vários fatores. Em primeiro lugar, o investigador precisa determinar quais proteínas precisam ser depletadas, a remoção de IgG e albumina seria suficiente ou é necessário remover outras proteínas abundantes? Em segundo lugar, o qual o volume de plasma/soro precisa ser depletado. Por exemplo, se o plasma for de um camundongo, há um pequeno volume e uma coluna de spin seria suficiente. As colunas LC podem lidar com volumes maiores para amostras como plasma/soro humano. Outro detalhe a se considerar é que as colunas LC requerem um sistema de

Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), enquanto as *spin columns* precisam de uma centrífuga padrão. Em terceiro lugar, o custo também deve ser levado em consideração, pois há uma grande variedade de preços para colunas LC versus *spin columns* (WIEDERIN; CIBOROWSKI, 2016).

A depleção por imunoafinidade é um método já consolidado em estudos de depleção de PAAs. No entanto, devido ao elevado custo dos dispositivos baseados em anticorpos, eles são normalmente projetados para uso repetido. É importante ressaltar que vários estudos compararam a eficácia de vários métodos de depleção de imunoafinidade comercialmente disponíveis e mostraram que esses dispositivos são vulneráveis à ligação não específica de proteínas/peptídeos ao ligante e materiais de coluna e transferência entre experimentos no caso de colunas LC. Diante disso, é de suma importância validar que a(s) proteína(s) capturada(s) pela coluna seja completamente removida antes do processamento de amostras subsequentes, para garantir que não haja transferência e que os sítios de ligação estejam disponíveis para amostras subsequentes. Isso é crítico tanto para estudos interessados em examinar a amostra com depleção de albumina quanto para aqueles interessados na albumina e suas proteínas/peptídeos ligados (GUNDRY *et al.*, 2009).

Diferentes condições de ligação e lavagem de colunas de imunoafinidade também podem fazer diferenças significativas na separação ou particionamento de proteínas. Em alguns casos, a adição de reagentes desnaturantes ou detergentes no tampão de lavagem pode afetar diretamente as interações proteína-proteína e resultar em diferentes separações de proteínas. No entanto, esta questão pode ser abordada empiricamente otimizando e padronizando um determinado processo de separação com base nas necessidades da pesquisa e nos processos posteriores (FANG; ZHANG, 2008).

Com relação aos kits comerciais para depleção e/ou enriquecimento de proteínas, existem diversos kits desenvolvidos para depleção de proteínas, ou mais diretamente para extração de proteínas alvo específicas diretamente mesmo na presença de proteínas de alta abundância. Esses kits, embora tenham uma mesma finalidade, podem empregar diferentes tecnologias para promover a depleção.

Outro kit comercial é o *PureProteome™* da empresa MERCK, ao contrário dos métodos convencionais, que exigem a centrifugação para sedimentar as esferas e, em seguida, a aspiração cuidadosa para evitar a perda da amostra, as esferas magnéticas *PureProteome™* são isoladas utilizando um suporte magnético. Isto

permite a remoção total de tampões para recuperação completa das esferas sem diluição da amostra. Da mesma empresa tem-se também o kit de remoção de albumina *ProteoExtract<sup>R</sup>*, o qual contém colunas revestidas com uma resina específica para albumina, que possibilita uma remoção de mais de 80% da albumina de amostras de fluidos corporais séricos. Outro exemplo é o kit de depleção de albumina Montage de Millipore, da empresa Biocompare, o qual contém colunas de afinidade que ligam especificamente a albumina. Exemplos de aplicação do *ProteoExtract* podem ser vistos em (MILLIONI *et al.*, 2011)

Diversos autores realizaram estudos comparativos sobre a eficiência dos diferentes kits comerciais. Em Björhall, Miliotis e Davidsson (2005) foram comparadas cinco colunas de depleção diferentes, *Aurum* (Bio-Rad), o Kit de remoção de albumina/IgG *ProteoExtract<sup>TM</sup>* (Merck Biosciences), a Coluna de remoção de afinidade múltipla (Agilent Technologies), Cartuchos de Depleção de Afinidade POROS (Applied Biosystems) e o kit de remoção de albumina e IgG (Amersham Biosciences). Os resultados obtidos pelos autores indicaram que todas as cinco colunas de depleção removeram albumina e IgG com alta eficiência, com destaque para a coluna de remoção de afinidade múltipla (Agilent) que removeu um total de seis proteínas abundantes (albumina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina e haptoglobina). Entre os kits de uso único, o kit *ProteoExtract<sup>TM</sup>* apresentou os melhores resultados.

Em Pisanu *et al.* (2018), os autores realizaram uma avaliação comparativa de sete produtos comerciais para enriquecimento proteínas de soro humano. Para isso, foram testados e comparados sete produtos comerciais para depleção e/ou enriquecimento de proteínas de soro por análise proteômica *shotgun*. Os kits são baseados em quatro agentes de captura diferentes: anticorpos (*Qproteome* da empresa Qiagen, *ProteoPrep* da Sigma-Aldrich, *Top 2* e *Top 12 Spin Columns* ambos da Thermo Fisher Scientific), *Cibacron blue* e proteína A (*CibB-A* da Thermo Fisher Scientific), anticorpos e proteína G (*SpinTrap* da GE Healthcare) e bibliotecas combinatórias de ligantes peptídicos (*ProteoMiner* da Bio-Rad). Todos os procedimentos permitiram um aumento do número de proteínas identificadas, de modo que com a utilização do *ProteoMiner* obteve-se um maior número de proteínas, com os kits *SpinTrap* e *ProteoPrep* uma maior eficiência na depleção de albumina, com as *Top 2* e *Top 12 Spin Columns* os níveis gerais de imunoglobulina diminuíram mais do que nos demais procedimentos, enquanto que os resultados menos eficientes foram obtidos com o *CibB-A*.

Outros estudos de comparações de estratégias de depleção de PAAs podem ser encontrados em *Millioni et al.* (2011), *Olver et al.* (2010), *Zolotarjova et al.* (2005), *Smith et al.* (2011), *Bock et al.* (2010), *Bandow* (2010), *Dayon e Kussmann* (2013), *Zhao et al.* (2014), *Liu et al.* (2014), *Yang et al.* (2020), *Cao et al.* (2021), *Kaur et al.* (2021), *Neset et al.* (2022), *Paul e Veenstra* (2022).

Apesar da eficiência e dos bons resultados na separação de proteínas de alta abundância obtidos com a utilização dos kits comerciais, existem diversos desafios associados ao uso dos mesmos, muitas desvantagens das estratégias de depleção e enriquecimento já foram discutidas, mas incluem-se ainda o alto custo dos kits, a necessidade de equipamentos sofisticados como cromatógrafos, dificuldades técnicas de recursos humanos, a complexidade experimental associada a muitos kits, o elevado tempo de execução dos preparos de amostra, etc.

#### 2.2.1.4 O grande desafio na depleção de PAAs: depleção cruzada de PBA

A maioria dos métodos de depleção de PAAs tem um problema intrínseco que é a depleção cruzada de PBAs. Esse efeito é bastante comum com a HSA e está associado às múltiplas interações e ligação da HSA com diversas moléculas do sangue, devido à sua função transportadora (*KIM et al.*, 2010).

Com a depleção da HSA, a fração descartada (lavada) pode conter então proteínas de baixa abundância, sendo essa fração chamada de albuminoma, a qual também se refere às proteínas codepletadas devido às interações com outras proteínas abundantes (*WIEDERIN; CIBOROWSKI*, 2016). Assim, mesmo que uma estratégia tenha uma alta capacidade de adsorção de albumina, o número de possíveis PBAs encontrados após a depleção não necessariamente será maior, resultados disso foram encontrados em *Jesus et al.* (2017). Potenciais biomarcadores que podem ser encontrados associados à albumina e assim removidos durante a depleção, incluem peptídeos BRCA2, proteína C reativa, cistatina C, apolipoproteína CIII, lumican e angiotensinogênio (*GUNDRY et al.*, 2009).

De modo geral, deve-se enfatizar que muitas vezes um método de enriquecimento e/ou depleção não é suficiente para obtenção de um estudo proteômico completo, sendo necessária uma combinação destas técnicas com metodologias de pré-fracionamento. Assim, os métodos menos específicos e usados

com menos frequência também podem desempenhar papéis importantes na elucidação do perfil do proteoma completo (FÍLA; HONYS, 2012).

Os métodos de pré-fracionamento consistem em um processo ou uma série de processos que visam isolar um determinado tipo ou grupo de proteínas com base em suas propriedades físico-químicas, resultando em frações de complexidade reduzida (COSTA *et al.*, 2017). Tais métodos são essenciais para uma análise proteômica aprofundada por técnicas multidimensionais de separação, como por exemplo a eletroforese ou a cromatografia líquida em vários formatos, as quais podem ser seguidas por identificação por espectrometria de massas (JMEIAN; EL RASSI, 2009).

São diversas as formas em que o pré-fracionamento pode ser feito, algumas delas podem ser a eluição sequencial da fração de proteínas adsorvidas em uma fase sólida utilizada no enriquecimento/depleção ou com o uso de diferentes soluções de eluição, ou ainda com uma combinação de eluição sequencial com diferentes soluções. Em Boschetti *et al.* (2007), são discutidas algumas possíveis soluções de eluição, as quais são apresentadas na Tabela 2:

Tabela 2 - Tipos de soluções e respectivas composições de possíveis soluções de eluição para dessorver proteínas capturadas por grânulos de biblioteca combinatória de ligantes peptídicos.

<b>Tipo de solução de dessorção</b>	<b>Composição</b>
Aumento da força iônica	cloreto de sódio 1 mol L <sup>-1</sup>
Alcoólico hidrossolúvel	etileno glicol 60%
Tampões ácidos	glicina 0,2 mol L <sup>-1</sup> - HCl, pH 2,5
Soluções neutras caotrópicas	tiourea 2 mol L <sup>-1</sup> - ureia 9 mol L <sup>-1</sup> - CHAPS 2%
Soluções desnaturantes caotrópicas	guanidina 6 mol L <sup>-1</sup> - HCl, pH 6,0
Misturas hidro-orgânicas	acetonitrila - isopropanol - ácido trifluoroacético - água (16,7 - 33,3 - 0,5 - 49,5%)
Soluções caotrópicas ácidas	Ureia 9 mol L <sup>-1</sup> - ácido cítrico ou ácido acético pH 3,5
Soluções caotrópicas alcalinas	Ureia 9 mol L <sup>-1</sup> - amônia pH 11

Fonte: Adaptado de Boschetti *et al.* (2007).

A estratégia de utilização conjunta da depleção de PAAs com métodos de pré-fracionamento pode ser uma etapa de suma importância em estudos proteômicos por permitir também o estudo do albuminoma, visto a possibilidade de dessorção de diferentes proteínas da fase sólida utilizada na depleção.

### 2.2.1.5 Métodos de depleção com materiais inteligentes

Nos últimos anos, diferentes estratégias de depleção de PAAs têm sido propostas, a maioria envolvendo o esgotamento direto das proteínas e variados métodos analíticos. Variadas matrizes de adsorção vem sendo desenvolvidas, tais como uso de criogéis poliméricos baseados em reconhecimento de bioafinidade (ANDAÇ; DENIZLI, 2014), métodos baseados em cromatografia de afinidade e eletroforese 2D (GREENOUGH *et al.*, 2004), aplicação de criogel à base de poli(hidroxiethylmetacrilato) impresso molecularmente (ANDAC; GALAEV; DENIZLI, 2013), cromatografia de troca aniônica utilizando colunas monolíticas (PETRIČ *et al.*, 2007), polímeros impressos em epítopos como anticorpos artificiais (YANG *et al.*, 2013), resina de imunoafinidade com anticorpos monoclonais (STEEL *et al.*, 2003), uso de esferas de poli(glicidil methacrilato) (ALTINTAS; DENIZLI, 2006), nanofibras de celulose bacteriana (GÖKTÜRK *et al.*, 2018), colunas monolíticas de criogel (UZUN *et al.*, 2013), esferas de poli(glicidil metacrilato) incorporados em criogéis para afinidade pseudo-específica (BERELI *et al.*, 2010), materiais impressos molecularmente por técnicas de impressão hierárquicas (LIU *et al.*, 2015b), compostos molecularmente impresso de criogel (ANDAÇ *et al.*, 2012). Outras abordagens são apresentadas em Filip *et al.* (2015), Ahmed *et al.* (2003), Zolotarjova *et al.* (2005) e Pernemalm *et al.* (2008). A seguir serão apresentadas algumas destas estratégias.

Em Bhakta *et al.* (2017) foi feita a depleção de HSA utilizando-se *nanopockets* (nanobolsas) sintéticos com nanopartículas magnéticas. Esses *nanopockets* de ligação de HSA foram sintetizados nas superfícies de nanopartículas magnéticas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> de 200 nm revestidas com sílica funcionalizada com amina. A polimerização foi realizada utilizando-se 4 monômeros de organo-silano (hidroximetiltriethoxissilano, benziltriethoxissilano, n-propiltriethoxissilano e 3-aminopropiltriethoxissilano). Esses monômeros têm cadeias laterais semelhantes a aminoácidos, fornecendo interações hidrofóbicas, hidrofílicas e de ligação de H que imitam os sítios de reconhecimento dos anticorpos. Os *nanopockets* apresentaram capacidade máxima de adsorção de 21 mg g<sup>-1</sup> e removeu consistentemente ~88% de HSA de soro humano em múltiplas extrações, demonstrando efetividade na depleção de HSA para estudos proteômicos.

Para depleção direta de PAAs, em Liu *et al.* (2019), os autores desenvolveram um método para depleção de imunoglobulina humana (IgG) baseado em

nanopartículas de ouro (GNPs) revestidas com citrato e conjugadas com proteína A recombinante (rProtA-GNP) e proteína G ProtG-GNP. Os resultados das análises de eletroforese SDS-PAGE e cromatografia líquida (HPLC) revelaram que a nanopartícula rProtA-GNP exibiu melhores capacidades de ligação para IgG e uma eficiência de depleção de cerca de 90% pode ser alcançada em uma solução padrão de plasma. Com quantidade otimizada de rProtA-GNP e ProtG-GNP, respectivamente, a IgG pode ser eficientemente extraída de amostras de plasma humano, demonstrando que as nanopartículas de afinidade rProtA-GNP e ProtG-GNP podem ser uma alternativa promissora para captura de imunofinidade para a depleção de IgG.

Em Cortés *et al.* (2012), os autores propuseram um método de separação das proteínas do soro humano combinando depleção química com acetonitrila e subsequente separação das proteínas com nanopartículas de ouro (GNPs). O método parte do princípio de que as GNPs podem separar proteínas contendo aminoácidos cisteína, uma vez que o enxofre contido na cisteína liga-se ao ouro das GNPs. Muitas variáveis influenciam nesse processo, tais como a quantidade de GNPs, pH da amostra, quantidade de proteína e tempo de contato da amostra e as GNPs. No desenvolvimento do método, essas variáveis foram otimizadas utilizando-se uma mistura simples de duas proteínas, a albumina de soro bovino, BSA, e a anidrase carbônica, CA. Estas duas proteínas modelo foram escolhidas porque BSA tem um total de 33 resíduos de cisteína, enquanto CA não nenhum. Os resultados obtidos mostraram que o pH foi o fator mais importante, com faixa ótima de adsorção entre os pHs de 5,8 e 6,4, com um tempo mínimo de incubação de 15 min. Usando as condições experimentais de adsorção obtidas, e com base em técnicas de eletroforese e espectrometria de massas, o soro de pacientes com diferentes tipos de câncer (linfoma, mieloma) e voluntários saudáveis tiveram seu perfil de proteínas traçados pelo método desenvolvido e os dados foram classificados corretamente usando a análise de componentes principais (PCA), o que indica que o método tem grande potencial de diagnóstico auxiliar de doenças.

Uma estratégia de depleção concomitante de algumas PAAs foi proposta em Yang *et al.* (2017). Como um proteoma contém várias proteínas de diferentes concentrações, essa heterogeneidade inerente da amostra foi aplicada exatamente para imprimir e depletar as PAAs, por meio de criogéis macroporosos. Estes materiais consistem em polímeros impressos molecularmente, obtidos adicionando-se soro

humano em soluções de diferentes monômeros funcionais. Os criogéis obtidos foram usados no empacotamento de colunas de cromatografia e as análises cromatográficas demonstraram que a albumina, serotransferrina e a maioria das globulinas foram esgotadas das amostras. Após a depleção, as proteínas de menor abundância foram reveladas por SDS-PAGE, análise de impressão digital de peptídeos e identificadas por MALDI-TOF-MS. Após a remoção das PAAs, as PBAs podem ser facilmente enriquecidas por técnicas convencionais, como a diálise, tornando o protocolo de impressão extensível. Isso permite traçar o perfil completo dos proteomas e a aquisição de proteínas de baixa abundância de forma intacta.

O uso de um criogel para a depleção de HSA de soro humano também foi proposto por Andac, Galaev e Denizli (2013), em que os criogéis impressos com HSA (PHEMAPA-HSA) foram preparados por copolimerização de 2-hidroxietil metacrilato com um comonômero funcional de N-metacrilóil-L-fenilalanina. Experimentos de ligação seletiva na presença de proteínas competitivas como transferrina e mioglobina humanas atestaram a alta especificidade do material. Os PHEMAPA-HSA foram usados em uma coluna para separação por cromatografia líquida de proteína de amostras de soro, em que, juntamente com os estudos de eletroforese SDS-PAGE atestaram a eficiência do material para depleção de HSA.

A capacidade máxima experimental de adsorção de HSA nos PHEMAPA-HSA foi de 390,2 mg g<sup>-1</sup> com soro não diluído. Foi feita a eluição da HSA ligada aos PHEMAPA-HSA com 10% de etilenoglicol em tampão acetato 100 mM (pH 4,0) atingindo uma taxa de dessorção de 96%. Praticamente, nenhuma redução na capacidade de adsorção da coluna foi observada após a reutilização da coluna de criogel PHEMAPA-HSA de até dez vezes. A alta eficiência da eluição das proteínas adsorvidas tem um benefício adicional de permitir o estudo do depletoma e do albuminoma, como já descrito anteriormente.

Um dos problemas mais característicos de muitos polímeros molecularmente impressos (MIPs) usando HSA como modelo são as baixas capacidade de adsorção e seletividade. Visando minimizar tais problemas, Lu *et al.* (2021a) desenvolveram um novo MIP impresso com HSA sintetizado usando N-isopropilacrilamida (NIPAM) como monômero principal, acrilamida (AAm), ácido metacrílico (MAA) e metacrilato de dimetilaminoetil (DMAEMA) como monômeros funcionais e reticulador de peptídeo à base de ácido oligoglutâmico (PC) como um reticulador em pH 5,5. O MIP desenvolvido apresentou alta capacidade de adsorção de HSA (648,05 mg g<sup>-1</sup>) e

possibilidade de reutilização após a dessorção. O método de depleção com os MIPs foi testado em amostras de soro humano diluídas e os resultados de cromatografia e eletroforese demonstraram a eficiência de depleção e seletividade.

O uso de polímeros impressos de reconhecimento, embora promissores, podem enfrentar outras desvantagens como a dificuldade de remoção de algumas das proteínas usadas como moldes, elevado tempo de adsorção das proteínas alvo, complexidade e elevado tempo da síntese e necessidade de trituração do material depois de sintetizado. O processo de trituração pode ocasionar outros problemas, como a geração de partículas de tamanhos irregulares e o baixo aproveitamento da síntese, visto que muitos dos sítios de adsorção do material são parcialmente destruídos durante a trituração, o que diminui a capacidade de retenção seletiva da proteína alvo e pode ainda levar a formação de sítios de ligação não específicos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Outros diferentes tipos de materiais têm sido desenvolvidos para depleção de PAAs. Em Wang *et al.* (2017b) foram sintetizados uma série de materiais de sílica mesoporosa funcionais, compostos de unidades de metacrilato de 2-(dietilamino)etil e ácido metacrílico, projetadas e sintetizadas via polimerização por radical de transferência de átomo. Estes materiais mostraram adsorção de algumas proteínas em soluções aquosas ou tampão com seletividade dependente do pH. Os materiais foram aplicados na remoção seletiva de certas proteínas de amostras biológicas reais de clara de ovo e soro humano. Os resultados de análises cromatográficas e eletroforéticas revelaram que as eficiências máximas de remoção de ovalbumina e lisozima da amostra de clara de ovo foram obtidas de 99% e 92%, respectivamente, enquanto a eficiência máxima de depleção de HSA da amostra de soro humano foi de cerca de 80% nas condições estudadas. Os resultados foram promissores na redução da complexidade de amostras biológicas reais e pode facilitar a identificação de PBAs. No entanto, segundo os autores, embora o método seja validado para estudos direcionados à proteínas específicas de maior abundância, esta abordagem ainda é inadequada para análise proteômica não direcionada e mais pesquisas são necessárias para estender a aplicação do processo proposto, uma vez que estes materiais também podem adsorver outras PBAs, o que é um problema comum em técnicas similares.

No invento (patente) de Heemstra, Jahnke e Peterson (2016) foram desenvolvidos métodos para preparar aptâmeros de ácido nucleico na presença de

um surfactante e a utilização desses métodos para separação de proteínas abundantes, incluindo HSA, de uma amostra biológica, como soro. De modo semelhante, Iyer e Muriithi (2018) desenvolveram sorventes para isolar pelo menos uma proteína alvo de uma amostra líquida, sendo que os sorventes são constituídos de um material de suporte sólido tendo reagentes de afinidade ligados a eles, como aptâmeros ou afímeros, os quais têm uma alta afinidade para pelo menos uma proteína alvo. Um aptâmero é um ácido nucleico (por exemplo, DNA, RNA, etc.) que se liga seletivamente a uma molécula alvo de ácido não nucleico. Em algumas modalidades, os aptâmeros empregados podem variar de 15 a 80 bases de nucleotídeos de comprimento. Já um afímero é uma molécula de proteína estável que exibe alças peptídicas e que se liga seletivamente a uma molécula alvo específica, comumente compreendem uma estrutura central fixa com 2 alças variáveis, que fornecem uma superfície de ligação de alta afinidade para uma proteína alvo específica. Em certas modalidades, os afímeros podem ser proteínas de baixo peso molecular (por exemplo, 12-14 kDa), derivadas da família de cistatinas inibidoras de cisteína protease. Esses sorventes desenvolvidos são adequados para cromatografia de afinidade ou técnicas relacionadas baseadas em processos de adsorção seletiva.

Apesar de promissor, o uso de aptâmeros apresenta algumas desvantagens como o custo elevado, dificuldade para produção em larga escala, necessidade de condições muito bem estabelecidas e muito específicas para imobilização dos aptâmeros nas superfícies sólidas. Soma-se a isso o fato de que o DNA após a conjugação na superfície pode mudar sua conformação e assim alterar sua afinidade de ligação às proteínas alvo, o que pode diminuir drasticamente a remoção de PAAs e ainda promover a depleção cruzada de biomarcadores.

Ainda no campo das patentes, Chao *et al.* (2006) divulgaram a invenção de um método de depleção de PAAs utilizando nanopartículas magnéticas de ouro com um ligante de afinidade da PAA alvo fixado nas nanopartículas. Esse ligante de afinidade das PAAs compreende um anticorpo ou o polipeptídeo de albumina A/G e seu derivado e seu derivado. A interação de afinidade entre a albumina por exemplo e seu ligante de afinidade e o superparamagnetismo das nanopartículas magnéticas de ouro podem ser usados para separar a HSA do soro sanguíneo.

Apesar da eficiência na depleção de PAAs com a utilização de muitas das estratégias discutidas, existem diversos desafios e desvantagens associados, como por exemplo o alto custo de kits comerciais, a necessidade de equipamentos

sofisticados como cromatógrafos, dificuldades técnicas, complexidade experimental associada, o elevado tempo de execução dos preparos de amostra, interações não específicas de alguns sorventes e principalmente a depleção concomitante de alguns biomarcadores que interagem fortemente com a HSA devido à sua função transportadora. Dessa forma, um protocolo mais adequado para estudo proteômico que envolva a depleção de PAAs deve considerar um estudo das proteínas não só obtidas após a depleção, mas também daquelas que podem estar coadsorvidas na fase sólida usada para adsorção da PAA alvo como também daquelas associadas à HSA depletada (albuminoma).

Diante do exposto, uma alternativa viável para separação de proteínas e a depleção de PAAs é a utilização de nanopartículas magnéticas (MNPs) com recobrimentos específicos capazes de reter seletivamente algumas destas proteínas em detrimento à outras com base na variação de parâmetros como pH. O uso de nanopartículas magnéticas, especialmente da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), tem atraído a atenção de pesquisadores de diversas áreas devido às suas características tais como elevada área superficial, protocolos de síntese bem estabelecidos, baixo custo, excelentes propriedades magnéticas, baixa toxicidade e possibilidade de diversas funcionalizações (LI; ZHANG; DENG, 2013).

A natureza magnética das MNPs, funcionalizada ou não, permite sua manipulação seletiva e separação na presença de outros sólidos suspensos mesmo em amostras complexas como o plasma. Em termos práticos, a MNP é colocada em contato direto com a amostra, promovendo a adsorção das proteínas alvo. Em seguida, um campo magnético é utilizado para remoção do complexo MNPs/proteínas da amostra e quando aplicável, uma etapa adicional de eluição das proteínas adsorvidas é feita a fim de recuperar-se tais proteínas (depletoma). A seguir serão apresentadas informações sobre as MNPs e seu uso em estudos proteômicos.

#### 2.2.1.6 Nanopartículas magnéticas na separação de proteínas humanas em estudos proteômicos

Diferentes tipos de nanopartículas têm sido apontadas na medicina, desde meados da década de 1970, como ferramentas poderosas para obter uma redução na complexidade de amostras humanas, tendo sido utilizadas para separação de proteínas-alvo, bem como para pré-concentração de proteínas de soro e plasma humanos

(CORTÉS *et al.*, 2012). Nas ciências de separação, o uso de MNPs em técnicas de preparo de amostras tem sido bastante explorado, uma vez que proporciona uma série de vantagens como simplicidade do processo, facilidade de separação das amostras permitindo a remoção de compostos alvo de amostras brutas (FRANZREB *et al.*, 2006) sem a necessidade de etapas prévias de pré-tratamento, como centrifugação ou filtração (SAHU *et al.*, 2011).

As nanopartículas são partículas na faixa nanométrica ( $1 \times 10^{-9}\text{m}$ ). Devido às suas pequenas dimensões e características de superfície, elas exibem propriedades eletrônicas, ópticas e magnéticas com diversas aplicações (WAHAJUDDIN; ARORA, 2012). Como uma classe de adsorventes típicos, os óxidos metálicos foram desenvolvidos por um longo tempo e continuaram a atrair ampla atenção, uma vez que possuem propriedades físico-químicas únicas, incluindo sítios ativos de superfície abundantes, alta estabilidade química e forma e tamanho ajustáveis (WANG *et al.*, 2020).

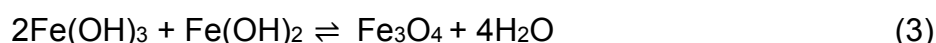
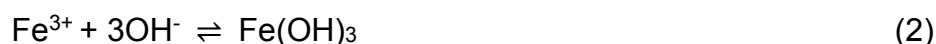
De acordo com Wierucka e Biziuk (2014) e Wu, Jiang e Roy (2016), os os óxidos de ferro mais comuns usados como MNPs são a hematita ( $\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ), a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). O átomo de ferro tem um forte momento magnético devido a quatro elétrons desemparelhados em seu terceiro orbital (TEJA; KOH, 2009). Dentre os óxidos supracitados, o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é mais comumente utilizado como suporte para MNPs, sendo facilmente obtidos em condições de bancada em laboratório a partir de sais de ferro. Uma revisão detalhada sobre as propriedades físicas da magnetita é apresentada em (BATLLE *et al.*, 2022).

No que diz respeito à obtenção de MNPs, o primeiro ponto crítico consiste em definir as condições experimentais que possibilitem um conjunto monodisperso de partículas magnéticas de tamanho adequado. O segundo ponto é selecionar um processo reprodutível que possa ser industrializado sem nenhum procedimento de purificação complexo, como ultracentrifugação, cromatografia de exclusão de tamanho, filtração magnética ou gradiente de campo de fluxo (LAURENT *et al.*, 2008).

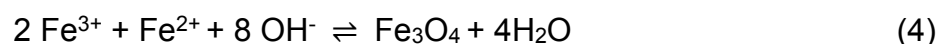
Diferentes protocolos têm sido empregados e incluem síntese clássica por coprecipitação, método de poli-ol, métodos eletroquímicos, métodos sonoquímicos (GUPTA; GUPTA, 2005), reações em ambientes restritos, reações hidrotérmicas e de alta temperatura, reações sol-gel, síntese de injeção de fluxo e síntese por eletrospray. A síntese de nanopartículas superparamagnéticas é um processo complexo devido à sua natureza coloidal (LAURENT *et al.*, 2008) e a reprodutibilidade pode ser uma

barreira importante nas aplicações práticas (WU; JIANG; ROY, 2016). Esses métodos têm sido usados para preparar partículas com composição homogênea e distribuição de tamanho estreita (LAURENT *et al.*, 2008).

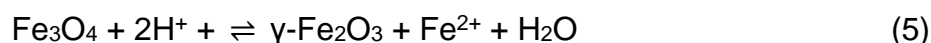
De acordo com Laurent *et al.*, (2008) e Liu *et al.* (2020), a técnica de coprecipitação é provavelmente a via química mais simples e eficiente para a obtenção de partículas magnéticas, e também a mais utilizada. Os óxidos de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) são geralmente preparados por uma mistura estequiométrica de sais ferrosos e férricos em meio aquoso. As reações químicas de formação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  podem ser escritas como:



Ou de forma simplificada:



De acordo com a termodinâmica da reação (4), a precipitação completa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  deve ser esperada em pH variando entre 8 e 14, com uma relação estequiométrica de 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ) em um ambiente não oxidante de oxigênio. No entanto, a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) não é muito estável e é sensível à oxidação. A magnetita é transformada em maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) na presença de oxigênio, de acordo com a reação (5):



As reações de coprecipitação envolvem a ocorrência simultânea de processos de nucleação, crescimento e engrossamento e/ou aglomeração. Quando a concentração das espécies atinge a supersaturação crítica, inicia-se a precipitação e numerosos cristalitos pequenos se formam inicialmente (nucleação), mas eles tendem a se agregar rapidamente para formar partículas maiores e termodinamicamente mais

estáveis (crescimento). Os processos de nucleação e crescimento governam o tamanho das partículas e a morfologia dos produtos das reações de precipitação (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004; LAURENT *et al.*, 2008). Uma discussão aprofundada especificamente sobre os processos de nucleação e crescimento das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é apresentada por Baumgartner *et al.* (2013).

De modo geral, conforme Cushing, Kolesnichenko e O'connor (2004) as reações de coprecipitação tendem a exibir as seguintes características:

- a) Os produtos resultantes são geralmente espécies pouco solúveis formadas sob condições de alta supersaturação;
- b) Tais condições ditam que a nucleação será uma etapa chave do processo de precipitação e que um grande número de pequenas partículas será formado;
- c) Processos secundários, como amadurecimento e agregação, afetarão drasticamente o tamanho, a morfologia e as propriedades dos produtos.
- d) As condições de supersaturação necessárias para induzir a precipitação são geralmente o resultado de uma reação química. Como tal, quaisquer condições de reação que influenciem o processo de mistura, como taxa de adição de reagente e taxa de agitação, devem ser consideradas relevantes para o tamanho do produto, morfologia e distribuição de tamanho de partícula.

O principal problema na aplicação de MNPs de óxidos de ferro é a alta tendência à adesão e agregação, resultando em perda de magnetismo (CHEN; WANG; TONG, 2011; MALLAKPOUR; MADANI, 2015). Conforme enfatizado por Mallakpour e Madani (2015), uma alternativa é a modificação da superfície do núcleo magnético por meio de um revestimento adequado com substâncias inorgânicas (tais como sílica, alumina, óxido de manganês (IV) ou grafeno) ou com substâncias orgânicas (quitosana, divinilbenzeno, poliamidoaminas ou tensoativos). De acordo com Laurent *et al.* (2008), esses revestimentos não apenas fornecem estabilidade às nanopartículas em solução, mas também ajudam na ligação de vários ligantes biológicos à superfície da nanopartícula.

A estratégia de modificações da superfície das MNPs é o fundamento básico das suas aplicações em preparo de amostras. Tais modificações podem ser feitas por revestimento ou pela introdução de grupamentos químicos quimicamente ou

fisicamente (CARNEIRO; WARD, 2018). As modificações físicas são geralmente realizadas com surfactantes ou macromoléculas adsorvidas na superfície da MNP. Os grupos polares dos surfactantes podem ser adsorvidos na superfície das devido às interações eletrostáticas. Uma desvantagem das modificações físicas é que elas são térmica e solvoluticamente instáveis devido à natureza relativamente fraca das forças de van der Waals, ligações de hidrogênio (MALLAKPOUR; MADANI, 2015) e interações eletrostáticas que as ancoram. As modificações químicas envolvem a ligação covalente do agente de revestimento (diferentes compostos orgânicos ou inorgânicos ou polímeros de baixa massa molecular), essas abordagens por ligação covalente são preferidas para maximizar uma compatibilidade interfacial estável entre a superfície da MNP e o agente de revestimento (MALLAKPOUR; MADANI, 2015).

A sílica tem sido bastante explorada como material de revestimento para nanopartículas magnéticas. Normalmente, um revestimento inerte de sílica na superfície das nanopartículas de magnetita evita sua agregação em um meio líquido, melhora sua estabilidade química e fornece melhor proteção contra toxicidade. Este revestimento estabiliza as nanopartículas de magnetita de duas maneiras diferentes, a primeira é protegendo a interação do dipolo magnético com o invólucro de sílica. Já a segunda, as nanopartículas de sílica são carregadas negativamente e, portanto, o revestimento de sílica aumenta a repulsão coulombiana das MNPs (LAURENT *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, as superfícies das MNPs ficam repletas de grupamentos de silanol, os quais podem ser modificadas com vários agentes de acoplamento para anexar bioligantes específicos de forma covalente às superfícies das nanopartículas magnéticas (SUN *et al.*, 2005). Exemplos de revestimentos de sílica nas MNPs para estabilização antes de outro(s) revestimento(s) e para as mais diversas aplicações das MNPs podem ser encontrados na literatura An *et al.* (2018), Dehghan *et al.* (2015), Shahabadi *et al.* (2016), Shahabadi, Hadidi e Shiri (2020) e Zhao *et al.* (2014b).

Um outro agente de revestimento bastante utilizado, principalmente em *drug delivery*, é a BSA, devido às suas propriedades como biocompatibilidade, invisibilidade ao sistema imunológico, alta estabilidade coloidal em fluidos biológicos e longos tempos de circulação sanguínea (AIRES *et al.*, 2015). Os materiais de acesso restrito (RAMs) são novos sorventes utilizados na preparação de amostras biológicas, devido à sua capacidade de reter moléculas pequenas e excluir macromoléculas. Esses materiais podem ser obtidos modificando-se as superfícies externas de sorventes convencionais como nanotubos de carbono, polímeros, nanopartículas

inorgânicas e materiais à base de sílica, com grupos hidrofílicos que evitam a adsorção de macromoléculas da amostra (FARIA *et al.*, 2017). Uma modificação comumente usada é o revestimento com albumina de soro bovino (BSA). Gomes *et al.* (2016) comprovaram que os nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) encapsulados com BSA podem adsorver ou excluir proteínas em função do pH da amostra, devido à modificação da carga superficial. Para pHs menores ou maiores o ponto isoelétrico das proteínas, a superfície dos RACNTs e as proteínas da amostra são carregadas positivamente ou negativamente, e uma repulsão eletrostática evita a adsorção entre ambos. Por outro lado, para pH próximo ao ponto isoelétrico, ambas as proteínas da amostra e da superfície do material não são carregadas, sendo possível a interação entre ambas.

Com relação às aplicações, a separação magnética pode ser usada como um método rápido, simples e eficiente para a extração de espécies-alvo tais como proteínas específicas, anticorpos, peptídeos, ácidos nucleicos, enzimas e até mesmo células e vírus, selecionadas mesmo na presença de outros sólidos suspensos em meios complexos como caldo de fermentação, células rompidas, sangue e tecidos (SAHU *et al.*, 2011).

Para informações mais detalhadas sobre possíveis aplicações de MNPs para extração seletiva de espécies de interesse, sugere-se a leitura de Smith *et al.* (2011), em que os autores utilizam MNPs conjugadas com anticorpos marcados fluorescentemente (IgG Alexa647-chick) para pré-concentração de alvos e imunoenaios. Em Cao *et al.* (2012), os autores mostram aplicações de MNPs relacionadas à imobilização de enzimas, purificação de proteínas e análise de alimentos. Li *et al.* (2013) fazem uma revisão sobre a síntese e aplicações de materiais magnéticos funcionalizados no preparo de amostras. Em um trabalho semelhante, He *et al.* (2014) apresentam uma revisão sobre o emprego de técnicas de separação magnética no preparo de amostras em análises biológicas. Vasconcelos e Fernandes (2017), fizeram uma revisão sobre a utilização de MNPs para determinação de drogas em matrizes biológicas. Kupcik *et al.* (2017) apresentam uma nova interface para purificação de proteínas utilizando nanotubos de carbono magnetizados por nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

A escolha do revestimento das nanopartículas é fundamental para o isolamento de analitos e depende principalmente da natureza da amostra analisada. A polaridade dos analitos, sua solubilidade e a composição de matrizes complexas (presença de

várias substâncias interferentes) são importantes. Essas propriedades podem afetar a força de interação do analito com o sorvente, impactando diretamente no desempenho da análise (WIERUCKA; BIZIUK, 2014).

Com relação às proteínas de alta abundância do sangue, alguns trabalhos na literatura reportam a aplicação de nanomateriais a base de MNPs revestidos para adsorção de HSA de soro, alguns exemplos são nanopockets revestidos com monômeros de organo-silanos (BHAKTA *et al.*, 2017), nanopartículas magnéticas obtidas de magnetita revestida com 3-aminopropiltriétoxysilano e com reação subsequente com glutaraldeído (CAN; OZMEN; ERSOZ, 2009; MALTAS *et al.*, 2011) e nanopartículas magnéticas puras para depleção direta de HSA (JESUS *et al.*, 2017).

Em Sun *et al.* (2011a), foram descritas as aplicações de MNPs multifuncionais para o enriquecimento de PBAs para separação por eletroforese SDS-PAGE. As MNPs foram funcionalizadas pela hemoglobina, sendo obtidas com base em interações eletrostáticas e ligações covalentes entre a hemoglobina (Hb) e as MNPs, formando as Hb-MNPs. Foi demonstrado que algumas proteínas no soro humano foram adsorvidas seletivamente com Hb-MNPs e puderam ser usadas para o enriquecimento seletivo de PBAs. Três e sete proteínas foram identificados por MS após as eletroforeses 1-D e 2-D PAGE, respectivamente. Dentre essas, há o componente amilóide P sérico humano (SAP). A alta concentração de SAP pode ser considerada um sinal para a neurodegeneração da doença de Alzheimer, assim o método baseado em Hb-MNPs pode ser aplicado para investigar o nível sérico de SAP para o diagnóstico da doença de Alzheimer, e os resultados foram satisfatórios.

No trabalho de Jiang *et al.* (2017), os autores utilizaram as MNPs de magnetita na obtenção de um nanocompósito de óxido de grafeno magnético funcionalizado com nanopartículas de prata (GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PEI/Ag). O material resultante foi utilizado como adsorvente para enriquecimento seletivo de glicopeptídeos e apresentaram alta capacidade de enriquecimento e mostraram especificidade superior para glicopeptídeos mesmo quando os não glicopeptídeos eram 100 vezes mais concentrados. Outras vantagens do nanocompósito foram rápida adsorção (1 min), baixo limite de detecção (25 fmol), repetibilidade (6 vezes) e alta recuperação (77,8%). Usando esses nanocompósitos, 91 glicoproteínas diferentes e 136 glicopeptídeos foram identificados entre 20 µg de proteínas tríplicas do soro humano.

Na busca de biomarcadores a partir da urina como amostra, Bastos *et al.* (2017) desenvolveram um método baseado no uso de nanopartículas magnéticas

funcionalizadas com EDTA (NPs@EDTA), para fracionar amostras de urina antes da análise por cromatografia líquida e espectrometria de massa e compararam as proteínas identificadas com aquelas obtidas de amostras de urina ultrafiltradas/não fracionadas (UF). O método de preparo de amostras com as NPs@EDTA permitiu que maiores volumes de urina fossem processados, resultando em um maior número de identificações de proteínas (~2 vezes) a um custo menor quando comparado às amostras de UF. Proteínas de maior abundância (como albumina e uromodulina) foram, pelo menos parcialmente, empobrecidas com NPs@EDTA enquanto as de PBAs foram enriquecidas. Os resultados das análises por SDS-PAGE e espectrometria de massas mostraram que houve a identificação de 109 proteínas na urina, revelando um alto potencial como plataforma para o fracionamento da urina antes da análise proteômica.

Em Jesus *et al.* (2017) os autores realizaram a depleção de PAAs utilizando nanopartículas magnéticas e compararam a efetividade do processo de depleção com outros dois métodos, a depleção por reagentes químicos (aplicação sequencial de ditioneitol e acetonitrila, DTT/ACN) com o kit de imunoafinidade *ProteoMiner*. A depleção de PAAs foi efetiva nos três métodos, com destaque para o kit *ProteoMiner*, em que a depleção foi mais expressiva. Por outro lado, a comparação direta entre os métodos revelou 72 proteínas identificadas ao usar a depleção com nanopartículas (43 delas exclusiva deste método), 20 proteínas usando DTT/ACN (7 exclusivas) e 30 com o kit *ProteoMiner* (7 exclusivas). Aqui percebeu-se que, como já comentado, a depleção de PAAs pode depletar outras proteínas, principalmente as PBAs (possíveis biomarcadores), pelo chamado efeito esponja da HSA. Ficou evidente que a depleção de PAAs com nanopartículas magnéticas pode ser uma alternativa simples, rápida, barata e robusta para a depleção baseada em imunoafinidade, fornecendo uma estratégia potencial na busca de biomarcadores de doenças.

A maioria dos métodos de depleção e/ou enriquecimento de proteínas humanas ocorre por adsorção das proteínas alvo na superfície dos materiais adsorventes, tais como as nanopartículas magnéticas com diferentes revestimentos ou os polímeros molecularmente impressos. O estudo da adsorção das proteínas no material adsorvente é de suma importância para compreender os fenômenos associados à essa interação e assim direcionar o processo, por meio do controle de variáveis como pH e quantidade de material, e dessa maneira obter adsorventes com maiores seletividade e capacidade de adsorção, robustez e baixo custo. Devido à importância

do processo de adsorção, nas próximas seções serão apresentados importantes conceitos relacionados ao assunto e a modelagem dos processos de cinética e equilíbrio (isotermas) de adsorção.

### 2.3 O PROCESSO DE ADSORÇÃO

O processo de adsorção é uma operação unitária fundamental com diversas aplicações tanto na academia quanto na indústria. A adsorção é um fenômeno de transferência de massa, o qual estuda a habilidade de certos materiais em concentrar físico-quimicamente na sua superfície determinadas substâncias existentes em fluidos, possibilitando desse modo, a separação dos componentes desses fluidos (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Outra definição, proposta por Malherbe (2018), relata que a adsorção gás-sólido e líquido-sólido consiste respectivamente em um aumento da concentração de moléculas de um gás sobre a superfície de um sólido, ou um aumento da concentração de uma substância dissolvida na interface entre um sólido e uma fase líquida. Em ambos os casos, o fenômeno de adsorção é causado por interações superficiais entre o adsorbato, substância que é adsorvida, e o adsorvente.

O processo de adsorção é considerado um dos processos de separação e purificação mais utilizados, no qual a adsorção ocorre pela formação de ligações físicas ou químicas entre um adsorvente e adsorbato em um meio fluido (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020). Conforme Myers (1999), de acordo com a intensidade das forças de ligação envolvidas, o processo de adsorção pode ser dividido em dois mecanismos distintos: adsorção física ou fisissorção e adsorção química ou quimissorção. A fisissorção ocorre por meio de forças eletrostáticas de Van der Waals, sendo relativamente fracas, a entalpia (calor) de adsorção associada é inferior a  $20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , há uma baixa energia de ativação. A adsorção pode ocorrer em toda a superfície do adsorvente dada a baixa especificidade e pode formar até multicamadas. O processo é exotérmico e reversível. Já a quimissorção ocorre mediante ligações químicas, sendo estas ligações mais fortes, com energia de adsorção superior a  $20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , uma alta energia de ativação é necessária e geralmente ocorre em temperaturas mais elevadas. É caracterizada também por uma alta especificidade entre os sítios ativos do adsorvente e o adsorbato, de modo que só ocorre adsorção em monocamada. O processo é endotérmico e irreversível (MYERS, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Diversos fatores podem influenciar o processo de adsorção, tais como propriedades físico-químicas do adsorvente e do adsorbato, pH, temperatura e condições do meio reacional. Com base em Myers (1999), Febrianto *et al.* (2009), Malherbe (2018) e Nascimento *et al.* (2014). Um desses fatores são as propriedades do adsorvente, as quais incluem a área superficial, massa de adsorvente, granulometria e homogeneidade da superfície. Estas estão associadas à disponibilidade de sítios para adsorção, porosidade, diâmetro e distribuição do tamanho dos poros, relacionadas à motilidade do adsorbato intrapartícula, e a presença de diferentes grupos funcionais que podem influenciar as interações eletrostáticas com o adsorbato. A heterogeneidade da superfície adsorvente afeta significativamente o equilíbrio e a cinética da adsorção. Os adsorventes heterogêneos contêm mais de um tipo de sítio de adsorção que pode se ligar ao adsorbato, e cada tipo de sítio tem um calor de adsorção diferente (FOO; HAMEED, 2010).

Outro fator importante, a temperatura, pode influenciar na adsorção por diferentes maneiras, em um primeiro instante, um aumento na temperatura pode favorecer a adsorção, visto que pode ocorrer uma diminuição da viscosidade do solvente e favorecer a difusão do adsorbato até o adsorvente. Outra consequência desse aumento é a ocorrência de uma desobstrução dos poros do adsorvente facilitando a difusão intrapartícula do adsorbato. Por outro lado, sob temperaturas mais elevadas, a consequente maior energia das moléculas de adsorbato pode ser maior que a energia de adsorção, prejudicando o processo, o que ocorre geralmente na adsorção física. Em contraste, na quimissorção essa ligação torna-se mais forte.

O efeito da temperatura sobre o processo de adsorção deve ser avaliado considerando-se a entropia/energia de Gibbs. A princípio, um aumento de temperatura promove maior adsorção para processos endotérmicos em que a variação de entalpia é positiva, por outro lado o sistema é não espontâneo porque a entropia diminui (variação negativa).

O pH e o potencial de carga zero influenciam no processo de adsorção na medida em que determina o grau de ionização de grupamentos superficiais do adsorvente e/ou adsorbato, o que por sua vez pode ocasionar atração ou repulsão entre as espécies. O potencial de carga zero ( $pH_{PZC}$ ), também chamado ponto isoelétrico, é valor do pH necessário para que a carga líquida do adsorvente seja nula, trata-se de um índice conveniente da tendência de uma superfície de adquirir carga

positiva ou negativa. A superfície adquire carga positiva quando  $\text{pH} < \text{pH}_{\text{PZC}}$  e negativa quando  $\text{pH} > \text{pH}_{\text{PZC}}$ .

Podem ser citadas aqui as condições do meio em geral, compreendendo-se alguns elementos tais como polaridade do solvente, que pode ocasionar uma menor afinidade pelo adsorvente, velocidade de agitação, em que a energia cinética pode ser maior que a energia de adsorção prejudicando o processo, presença de impurezas na superfície do adsorvente ou quaisquer outras espécies competitivas, o que por sua vez impede o contato direto adsorvente/adsorbato impedindo a adsorção, outro fator é viscosidade do solvente, que pode influenciar na motilidade do adsorbato até o adsorvente (cinética de adsorção).

Com maior notoriedade, a adsorção em fase líquida pode ser utilizada para remover compostos recalcitrantes de efluentes (corantes, metais pesados, fenóis, produtos farmacêuticos e outros), para recuperar metais valiosos de lixiviados (ouro, prata, cobalto e outros) e para purificar produtos durante o processamento industrial (combustíveis, sucos, licores, vinhos e outros) (PICCIN *et al.*, 2017), para imobilização de enzimas e adsorção de proteínas em geral.

No que tange ao estudo experimental da adsorção, o processo é geralmente subdividido em duas partes principais. A primeira é a cinética de adsorção, a qual estuda a velocidade/tempo até que o equilíbrio de adsorção seja atingido. A avaliação da cinética possibilita a obtenção de parâmetros importantes para a caracterização de sistemas de adsorção, como por exemplo o coeficiente de difusividade do adsorbato no adsorvente e a constante de equilíbrio cinético, os quais são obtidos com modelos específicos. A segunda são as isotermas de adsorção, que são modelos matemáticos que buscam descrever a relação entre a quantidade de adsorbato presente em determinada massa de adsorvente no equilíbrio e a concentração de adsorbato na fase líquida no equilíbrio, obtidos em temperatura constante. Dada a importância dessas etapas, elas serão discutidas separadamente nas próximas seções.

### **2.3.1 Obtenção dos dados e modelagem do processo**

O estudo do equilíbrio de adsorção é uma etapa fundamental para obtenção de informações relevantes sobre um processo de separação por adsorção. É obtido quando uma determinada quantidade de um material adsorvente é colocado em contato com uma solução contendo um adsorbato, a adsorção ocorre até que o

equilíbrio seja estabelecido em temperatura e pH constantes. Quando colocados em contato, as moléculas do adsorbato fluem de modo gradiente do meio fluido para a superfície do adsorvente até que a concentração de adsorbato na fase fluida permaneça constante ( $c_e$ ). Quando o equilíbrio é atingido, a quantidade de adsorbato adsorvido ( $q_e$ ) pode ser determinada (FEBRIANTO *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2014). O cálculo da quantidade ( $q_e$ ) é feito com base na equação (6):

$$q_e = \frac{(c_0 - c_e) \times V}{m} \quad (6)$$

em que  $c_0$  e  $c_e$  são as concentrações de adsorbato iniciais e de equilíbrio respectivamente,  $V$  é o volume de solução e  $m$  é a massa de material adsorvente. Nos estudos de cinética de adsorção,  $q_e$  pode ser substituído por  $qt$ , de modo que  $qt$  corresponde à quantidade de adsorbato adsorvido em um tempo específico  $t$ , em que o equilíbrio pode ou não ter sido atingido.

Obtidos os dados de quantidade de soluto adsorvida e concentrações de equilíbrio, pode-se então partir para a modelagem do processo de adsorção por meio do ajuste dos modelos de cinética e/ou de isotermas de adsorção.

### 2.3.2 A cinética de adsorção

A cinética do processo de adsorção está associada com a taxa de adsorção do adsorbato presente na fase fluida em relação ao tempo, tal processo envolve a transferência de massa do adsorbato para superfície e/ou interior do adsorvente por diversas etapas/mecanismos. Para o projeto/estudo de sistemas de adsorção adequados, é de suma importância que os perfis de adsorção em relação ao tempo sejam conhecidos, e uma das formas de se analisar os dados referentes a estes estudos é por meio dos diferentes modelos de cinética.

De acordo com Ho, Ng e Mckay (2000) e Nascimento *et al.* (2014), de modo geral, a cinética de adsorção pode ocorrer por diferentes etapas. A primeira delas corresponde à transferência de massa externa, na qual as moléculas do adsorbato são transferidas da fase fluida para superfície externa do material adsorvente por intermédio da camada de fluido que envolve o adsorvente. Essa etapa é afetada pela principalmente pela concentração de adsorbato e pela agitação do sistema. O segundo processo é a difusão no poro, o qual consiste na transferência do adsorbato

do fluido para o interior dos poros do adsorvente. O terceiro e último processo corresponde à difusão na superfície do poro, em que o adsorbato é adsorvido ao longo da superfície do mesmo.

Diversos fatores podem influenciar a cinética do processo de adsorção, dentre eles estão a temperatura do sistema, o pH e a força iônica do meio, a concentração inicial de adsorbato, a velocidade e o tempo de contato e agitação, as características intrínsecas do material adsorvente, tais como tamanho, granulometria, distribuição do tamanho dos poros, quando se tratar de um material poroso, e também as condições hidrodinâmicas do sistema (HO, 2006).

O estudo da cinética de adsorção é importante porque fornece informações valiosas sobre as vias de reação, o mecanismo de adsorção (LIMA; ADEBAYO; MACHADO, 2015), e uma previsão da taxa de adsorção (YOUSEF; EL-ESWED; AL-MUHTASEB, 2011).

Quando se trata de adsorção, aspectos termodinâmicos e cinéticos devem ser avaliados para conhecer mais detalhes sobre seu desempenho e mecanismos. O desempenho cinético de um determinado adsorvente também é de grande importância para a aplicação piloto. A partir da análise cinética, pode-se estabelecer a taxa de adsorção do soluto, que determina o tempo de residência necessário para a conclusão da adsorção (QIU *et al.*, 2009).

A forma mais utilizada para avaliação da cinética de adsorção é por meio do ajuste dos modelos característicos. Existem diversos modelos para essa finalidade, dos quais os de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem são os mais conhecidos. Outros bastante frequentes são os modelos de Elovich, de Avrami e o modelo de difusão intrapartícula de Weber-Morris (TRAN *et al.*, 2017). Cada um destes modelos será apresentado a seguir.

#### 2.3.2.1 Modelo de pseudo-primeira ordem

De acordo com Tan e Hameed (2017) e Qiu *et al.* (2009) o modelo de pseudo-primeira ordem, o mais simples e antigo para avaliar a cinética do processo de adsorção, foi proposto por Lagergren (1898) para descrever o processo cinético de adsorção líquido-sólida de ácido oxálico e ácido malônico em carvão. De acordo com os autores, o modelo é descrito pela expressão:

$$qt = qe(1 - e^{-k_1 t}) \quad (7)$$

Em que  $qe$  e  $qt$  são respectivamente as quantidades de adsorbato adsorvidas por grama de adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no equilíbrio e no tempo  $t$  (segundos),  $k_1$  é a constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem ( $\text{s}^{-1}$ ). Espera-se que estimativa da constante  $k_1$  seja influenciada por condições experimentais, como pH e temperatura (TAN; HAMEED, 2017) e que este valor diminua com o aumento da concentração inicial de adsorbato (FEBRIANTO *et al.*, 2009).

De acordo com Vijayaraghavan, Palanivelu e Velan (2006), em muitos casos descritos na literatura, o modelo de pseudo-primeira ordem não se ajusta bem aos dados cinéticos para toda a faixa de tempo de contato estudada e geralmente subestima os valores de  $qe$ , o que sugere a insuficiência do modelo para ajustar os dados cinéticos para as concentrações iniciais examinadas. A razão para essas diferenças nos valores de  $qe$  é que pode haver um atraso no tempo, possivelmente devido a uma camada limite ou resistência externa controlado no início do processo de adsorção. O modelo geralmente se ajusta bem a dados de tempos de equilíbrio maiores.

### 2.3.2.2 Modelo de pseudo-segunda ordem

O modelo de cinética de pseudo-segunda ordem (FEBRIANTO *et al.*, 2009; HO; MCKAY, 1999; QIU *et al.*, 2009) é descrito pela expressão:

$$qt = \frac{qe^2 k_2 t}{1 + qe k_2 t} \quad (8)$$

Em que  $qe$  e  $qt$  são respectivamente as quantidades de adsorbato adsorvidas por grama de adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no equilíbrio e no tempo  $t$  (segundos),  $k_2$  é constante da taxa de adsorção de pseudo-segunda ordem ( $\text{g mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Assim como  $k_1$ , a estimativa da constante  $k_2$  diminui com o aumento da concentração inicial de adsorbato (FEBRIANTO *et al.*, 2009).

Em sistemas de biossorção de metais por exemplo, diferentemente do modelo de pseudo-primeira ordem, os valores de  $qe$  obtidos com o de pseudo-segunda são

mais condizentes com os dados experimentais, o que demonstra que este modelo é considerado mais apropriado para representar os dados cinéticos (FEBRIANTO *et al.*, 2009). Esta equação tem sido aplicada com sucesso na adsorção de íons metálicos, corantes, herbicidas, óleos e substâncias orgânicas a partir de soluções aquosas (QIU *et al.*, 2009).

### 2.3.2.3 Modelo de Elovich

O modelo de Elovich foi proposto por Roginsky e Zeldovich (1934) para descrever a adsorção de CO no MnO<sub>2</sub> (QIU *et al.*, 2009; TAN; HAMEED, 2017; TRAN *et al.*, 2017). Este modelo é mais adequado a sistemas de cinética que envolvem mecanismos de quimissorção, cobrindo uma ampla faixa de taxas de adsorção lenta, e sendo mais aplicado quando a superfície do adsorvente é heterogênea (LIMA; ADEBAYO; MACHADO, 2015). A equação do modelo é dada por:

$$qt = \frac{1}{\beta} \ln(1 + \alpha\beta t) \quad (9)$$

Em que  $qt$  é a quantidade de adsorbato adsorvidas por grama de adsorvente (mg g<sup>-1</sup>) no tempo  $t$  (segundos),  $\alpha$  é a taxa de adsorção inicial (mg g<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) e  $\beta$  está relacionado com a extensão da cobertura da superfície e a energia de ativação envolvida na quimissorção (g mg<sup>-1</sup>).

### 2.3.2.4 Modelo de ordem fracionária de Avrami

No modelo de ordem fracionária de Avrami proposto por Lopes *et al.* (2003), no qual a equação cinética de Avrami determina alguns parâmetros cinéticos, como possíveis alterações das taxas de adsorção em função da concentração inicial e do tempo de adsorção, bem como a determinação de ordens cinéticas fracionárias. O modelo de adsorção Avrami proposto é considerado uma boa alternativa para encontrar parâmetros cinéticos de adsorção relativamente incomuns em situações nas quais a taxa de adsorção é muito lenta e apresenta mais de um mecanismo de adsorção. O modelo de Avrami é descrito pela equação:

$$qt = qe - qe \times e^{-k_A t^{n_A}} \quad (10)$$

Em que  $qe$  e  $qt$  são respectivamente as quantidades de adsorbato adsorvidas por grama de adsorvente ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no equilíbrio e no tempo  $t$  (segundos),  $k_A$  é a constante de Avrami ( $\text{s}^{-1}$ ),  $n_A$  é constante relacionada ao mecanismo de adsorção. Este modelo é de primeira ordem em relação à força motriz ( $qe - qt$ ) mas pode ser de ordem fracionária em relação a  $t$ , uma vez que  $n_A$  pode ser um inteiro ou fração (LOPES *et al.*, 2003; TAN; HAMEED, 2017). Os valores fracionários de  $n_A$  do modelo Avrami também podem ser relacionados às ordens cinéticas de adsorção. No entanto, deve-se ressaltar que outras determinações experimentais devem ser feitas para validar definitivamente o uso da equação de Avrami para calcular as ordens cinéticas de adsorção (LOPES *et al.*, 2003).

### 2.3.2.5 Modelo Weber e Morris ou modelo de difusão intrapartícula

O modelo de modelo de difusão intrapartícula, proposto por Weber e Morris (1963), prevê qual o fator determinante da cinética de adsorção. Os autores descobriram que em muitos casos de adsorção, a quantidade de adsorbato  $qt$  varia quase proporcionalmente com  $\sqrt{t}$  e não com o tempo de contato  $t$ . O modelo é descrito por:

$$qt = k_{di} \sqrt{t} + C \quad (11)$$

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 ( $\text{mg g}^{-1}$ ), relacionada com a espessura da camada limite e também à resistência à difusão no filme. O gráfico  $qt$  versus  $\sqrt{t}$  pode apresentar multilinearidade e cada região representa um mecanismo distinto de transferência de massa.

De acordo com Wu, Tseng e Juang (2009), no modelo de Weber-Morris plota-se a quantidade  $qt$  contra  $\sqrt{t}$  para obter uma linha reta que é forçada a passar pela origem. A multilinearidade no gráfico  $qt$  versus  $\sqrt{t}$  é considerada (duas ou três etapas estão envolvidas em todo o processo de adsorção). A adsorção da superfície externa ou adsorção instantânea ocorre na primeira etapa; a segunda etapa é a etapa de adsorção gradual, onde a difusão intrapartícula é controlada; e a terceira etapa é a

etapa de equilíbrio final, onde o soluto se move lentamente dos poros maiores para os microporos, causando uma taxa lenta de adsorção. O tempo necessário para a segunda etapa geralmente depende das variações do sistema (incluindo concentração de soluto, temperatura e tamanho de partícula adsorvente), o que é difícil de ser previsto ou controlado.

Em Gupta e Bhattacharyya (2011), os autores ressaltam que o modelo de Weber e Morris representa uma aproximação simplista da cinética de difusão dos poros, por não considerar os possíveis impactos das dimensões dos poros. Segundo os autores, a literatura é em grande parte omissa sobre esses aspectos e poucos trabalhos apareceram relatando um estudo detalhado do impacto dos processos de difusão dos poros e os efeitos do raio e tamanho dos poros na cinética de adsorção.

### **2.3.3 As isotermas de adsorção**

Isotermas de adsorção são expressões matemáticas que correlacionam uma quantidade de adsorbato, em relação a uma massa do material adsorvente ( $qe$ ) com a concentração desse adsorbato ( $ce$ ). Para as diversas aplicações do processo de adsorção, a obtenção, modelagem e interpretação das isotermas de equilíbrio são um estudo chave e fundamental. As isotermas de adsorção possibilitam a caracterização de um determinado material adsorvente, permitindo uma ideia de como ocorre a interação adsorvente-adsorbato e em quais mecanismos ocorre a adsorção, permitem a estimativa de parâmetros termodinâmicos, entre outros (PICCIN *et al.*, 2017).

Os parâmetros dos modelos de equilíbrio de adsorção fornecem informações úteis sobre as propriedades da superfície, mecanismo de adsorção e interação entre o adsorvente e o adsorbato (LIMA; ADEBAYO; MACHADO, 2015). Ao levar em consideração os dados de equilíbrio e as propriedades de adsorção tanto do adsorvente quanto do adsorbato, os modelos de isotermas de adsorção podem descrever os mecanismos de interação entre o adsorvente e o adsorbato a temperatura constante. Portanto, entender a modelagem dos dados de equilíbrio é uma maneira muito essencial de prever os mecanismos de adsorção de vários sistemas de adsorção.

Há diversos trabalhos de revisão na literatura que abordam tais modelos e suas aplicações nas mais variadas áreas (ABEBE; MURTHY; AMARE, 2018; AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020; AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; FEBRIANTO *et al.*, 2009; FOO;

HAMEED, 2010; LIMA; ADEBAYO; MACHADO, 2015). Existem isotermas de um, dois, três, quatro e cinco parâmetros, mas neste trabalho o enfoque será dado aos modelos de dois e três parâmetros. As unidades de medida de alguns parâmetros são colocadas de acordo com os ensaios experimentais aqui utilizados. As isotermas de dois parâmetros a serem apresentadas são as de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Temkin, Elovich, Harkins-Jura, Halsey e Jovanovic, enquanto as de três parâmetros são Sips, Koble-Corrigan, Toth, Redlich-Peterson, Langmuir-Freundlich, Hill, Khan, Radke-Plausnitz, BET (Brunauer, Emmett e Teller) e Jossens.

### 2.3.3.1 Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir (1916), desenvolvida inicialmente para descrever a adsorção de fase gás-sólida, é uma das mais utilizadas devido à sua simplicidade, aplicabilidade em diversos processos e pela facilidade de estimação dos seus parâmetros por meio de linearizações. De acordo com Foo e Hameed (2010), tal modelo descreve o processo de adsorção que ocorre em monocamada, quando o adsorvente possui um número definido de sítios, sendo esses sítios energeticamente homogêneos e equivalentes, podendo comportar apenas uma molécula adsorvida, em que não há ocorrência de interações laterais ou impedimento estérico entre as moléculas adsorvidas. A expressão do modelo é:

$$q_e = \frac{q_m b c_e}{1 + b c_e} \quad (12)$$

Em que  $q_e$  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 ( $\text{L mg}^{-1}$ ).

Uma aplicação adicional da isoterma de Langmuir, associada ao grau de desenvolvimento do processo de adsorção, a qual foi proposta por Hall *et al.* (1966), consiste no cálculo de uma constante adimensional chamada de fator de separação ou parâmetro de equilíbrio, denotado por  $R_L$ , sendo obtido pela expressão:

$$R_L = \frac{1}{1 + b \times c_e} \quad (13)$$

Em que  $b$  ( $L \text{ mg}^{-1}$ ) refere-se à constante de Langmuir. De acordo com os valores obtidos para o fator  $R_L$ , o processo de adsorção pode ser classificado como favorável quando  $0 < R_L < 1$ , linear quando  $R_L = 1$ , desfavorável quando  $R_L > 1$  e irreversível quando  $R_L = 0$ .

### 2.3.3.2 Isoterma de Freundlich

A isoterma de Freundlich também é uma das mais utilizadas para a descrição do equilíbrio de adsorção. O modelo de Freundlich (1906) assume que a adsorção ocorre em uma superfície com sítios energeticamente heterogêneos, sendo que a adsorção pode ocorrer em multicamadas. Segundo o modelo, há uma distribuição exponencial dos sítios de adsorção e das energias associadas, sendo os sítios de maior energia ocupados primeiro, e os de mais baixa ocupados posteriormente, de modo que a energia de adsorção diminua exponencialmente durante o processo de adsorção. A isoterma de Freundlich não estabelece que a quantidade de analito adsorvido atinja um valor constante à medida que as concentrações de equilíbrio aumentam, tal como visto na isoterma de Langmuir (FOO; HAMEED, 2010). Conforme Lima, Adebayo e Machado (2015), a equação tem a seguinte forma (11):

$$qe = k_F c_e^{1/n_F} \quad (14)$$

Em que  $k_F$  é a constante de equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}(\text{mg L}^{-1})^{-1/n}$ ) e  $n_F$  é o expoente (adimensional) relacionado à intensidade da adsorção.

Avaliando-se o valor de  $1/n_F$  é possível analisar a intensidade da adsorção ou heterogeneidade de superfície, a distribuição relativa de energia e a heterogeneidade dos sítios de adsorbato. Quando  $1/n_F$  é maior que zero ( $0 < 1/n_F < 1$ ) a adsorção é considerada favorável, quando  $1/n_F > 1$  o processo de adsorção é desfavorável, e é irreversível quando  $1/n_F = 1$  (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020). Quanto mais  $1/n_F$  se aproxima de zero, maior é a intensidade de adsorção e a heterogeneidade da superfície (FOO; HAMEED, 2010).

### 2.3.3.3 Isoterma de Dubinin-Radushkevich

Proposto em 1947, (DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947), trata-se de um modelo adsorção, geralmente aplicado para expressar um mecanismo de adsorção com distribuição de energia gaussiana em superfícies heterogêneas (DĄBROWSKI, 2001). Esta isoterma é mais adequada para concentrações de adsorbato em uma faixa intermediária, uma vez que exibe um comportamento assintótico irreal e não prevê as leis de Henry em baixa pressão (FOO; HAMEED, 2010). De acordo com Ayawei, Ebelegi, Wankasi (2017), o modelo é expresso por:

$$qe = (q_m) \exp(-k_{ad} e^2) \quad (15)$$

$$e = RT \ln \left( 1 + \frac{1}{c_e} \right) \quad (16)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $k_{ad}$  é constante de Dubinin-Radushkevich ( $\text{mol}^2/\text{kJ}^2$ ),  $R$  é constante dos gases ( $8,31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta (K).

Uma das características únicas do modelo de Dubinin-Radushkevich reside no fato de que ele é dependente da temperatura. Considerando o modelo linearizado, quando os dados de adsorção em diferentes temperaturas são plotados em função do logaritmo da quantidade adsorvida versus o quadrado da energia potencial  $\epsilon$ , os dados adequados estarão na mesma curva, denominada curva característica (FOO; HAMEED, 2010).

### 2.3.3.4 Isoterma de Temkin

A isoterma de Temkin (1940), mais indicada para adsorção gás-sólido, pressupõe que o calor de adsorção em função da temperatura ( $\Delta H_{ads}$ ) de todas as moléculas na camada diminui linearmente como resultado do aumento da cobertura de adsorbato da superfície do adsorvente, sendo caracterizada por uma distribuição uniforme de energias nos sítios de ligação (TEMKIN, 1940; FOO, HAMEED, 2010). Este modelo leva em consideração a interação adsorvente/adsorbato, ignorando os valores extremos de concentrações muito elevadas ou muito baixas, sendo mais utilizada para uma faixa intermediária de concentrações. É dada pela expressão:

$$qe = \frac{RT}{b_T} \ln(A_T c_e) \quad (17)$$

Em que  $b_T$  é a constante de Temkin em relação ao calor de adsorção ( $\text{Jmol}^{-1}$ ),  $A_T$  é a constante de Temkin ( $\text{L g}^{-1}$ ),  $R$  é constante dos gases ( $8,31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta (K).

### 2.3.3.5 Isoterma de Elovich

A equação que define este modelo é baseada em um princípio cinético que assume que os sítios de adsorção aumentam exponencialmente com a adsorção, o que implica uma adsorção multicamada. Segundo o modelo os sítios de adsorção aumentam exponencialmente com a adsorção, o que isso implica uma adsorção multicamada (ELOVICH; LARIONOV, 1962). A isoterma tem a forma:

$$qe = q_m k_e \exp\left(\frac{c_e}{q_m}\right) \quad (18)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e  $k_e$  é a constante de equilíbrio ( $\text{L mg}^{-1}$ ).

### 2.3.3.6 Isoterma de Harkins-Jura

O modelo de isoterma de Harkins-Jura pressupõe a possibilidade de adsorção multicamada na superfície de adsorventes com distribuição heterogênea de poros (HARKINS; JURA, 1944), geralmente é mais aplicada na adsorção de sólido-gasosa e para a determinação da área superficial do adsorvente. Este modelo é expresso da seguinte forma:

$$qe = \left( \frac{A_{HJ}}{B_{HJ} - \log(c_e)} \right)^{1/2} \quad (19)$$

Em que  $A_{HJ}$  e  $B_{HJ}$  são os parâmetros da isoterma de Harkins-Jura.

### 2.3.3.7 Isoterma de Halsey

A isoterma de Halsey avalia um sistema de adsorção multicamada e descreve sua condensação a uma distância relativamente grande da superfície. Da mesma forma, analogamente ao modelo de Freundlich, o modelo Halsey é adequado para a adsorção multicamada, bem como para as superfícies heterogêneas nas quais o calor de adsorção é distribuído de forma não uniforme (HALSEY, 1952). O modelo tem a seguinte expressão:

$$qe = \left( \frac{K_H}{c_e} \right)^{1/n_H} \quad (20)$$

Em que  $K_H$  e  $n_H$  são os parâmetros do modelo.

### 2.3.3.8 Isoterma de Jovanovic

O modelo proposto por Jovanovic (1969) possui premissas bastante semelhantes ao de Langmuir, juntamente com a possibilidade de alguns contatos mecânicos entre as adsorbatos. Ela é aplicável à adsorção móvel e a adsorção em monocamada sem interações laterais. Esta equação se reduz à lei de Henry em baixas concentrações. A equação de Jovanovich tem uma abordagem mais lenta para a atingir a saturação máxima, quando comparada à equação de Langmuir (DO, 1998). O modelo é expresso por:

$$qe = q_m \left( 1 - e^{-K_J c_e} \right) \quad (21)$$

Em que  $q_m$  descreve a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e  $K_J$  é a constante de Jovanovic ( $\text{L mg}^{-1}$ ).

### 2.3.3.9 Isoterma de Sips

A isoterma de Sips (1948) é uma combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich utilizado para prever a heterogeneidade dos sistemas de adsorção, bem como para contornar as limitações associadas ao aumento das concentrações do modelo de adsorbato de Freundlich (FOO; HAMEED, 2010). Isso, por sua vez, leva à

produção de uma expressão que tem um limite finito em alta concentração. Em baixas concentrações de adsorbato, reduz-se ao modelo de Freundlich, enquanto que em altas concentrações, ele prevê uma capacidade de adsorção em monocamada característica da isoterma de Langmuir (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020; LIMA; ADEBAYO; MACHADO, 2015). Os parâmetros do modelo de Sips são regidos principalmente pelas condições operacionais como pH, temperatura e concentração de adsorbato.

$$qe = \frac{q_m K_S c_e^{1/bes}}{1 + K_S c_e^{1/bes}} \quad (22)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K_S$  é a constante de equilíbrio ( $\text{mg L}^{-1}$ )<sup>-1/n</sup> e  $b_{es}$  é o expoente do modelo (adimensional).

O modelo é válido quando  $0 < 1/b_{es} \leq 1$ , embora poucos trabalhos na literatura levam em conta essa consideração (LIMA; ADEBAYO; MACHADO, 2015).

#### 2.3.3.10 Isotherma de Koble-Corrigan

Semelhante ao modelo de Sips, a isoterma de Koble e Corrigan (1952) também é combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich para representar o dados de adsorção de equilíbrio. O modelo só é válido quando  $n_K$  é menor que 1.

$$qe = \frac{A_K c_e^{n_K}}{1 + B_K c_e^{n_K}} \quad (23)$$

Em que  $A_K$  é constant ( $\text{L}^n \text{mg}^{1-n} \text{g}^{-1}$ ),  $B_K$  é constant ( $\text{L mg}^{-1}$ )<sup>n</sup> e  $n_K$  é o expoente adimensional. Reparametrizando-se o modelo (20) considerando-se  $A_K = q_m B_K$  tem-se a expressão:

$$qe = \frac{q_m B_K c_e^{n_K}}{1 + B_K c_e^{n_K}} \quad (24)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

### 2.3.3.11 Isoterma de Toth

O modelo de Toth (1971) é uma modificação da equação de Langmuir utilizado na descrição de sistemas heterogêneos de adsorção em uma ampla faixa de concentrações do adsorbato (FOO; HAMEED, 2010) e em monocamada (DO, 1998). Uma das premissas deste modelo é uma distribuição de energia quasi-gaussiana assimétrica dos sítios de adsorção, na qual a maioria dos sítios tem energia de adsorção menor do que o valor médio ou o pico (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; FOO; HAMEED, 2010).

Dada a heterogeneidade da energia dos sítios, fisicamente, é preferível que o adsorbato seja adsorvido nos sítios de alta energia no início e, com o progresso da adsorção, as moléculas vão sendo adsorvidas em sítios de menor energia, o que por sua vez leva a um aumento mais lento da quantidade adsorvida (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020). De acordo com Do (1998), o modelo tem a seguinte forma:

$$qe = \frac{q_m k_T c_e}{\left[1 + (k_T c_e)^{n_T}\right]^{1/n_T}} \quad (25)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $k_T$  é a constante de equilíbrio de Toth ( $\text{L mg}^{-1}$ ) e  $n_T$  é o expoente do modelo de Toth (adimensional).

O parâmetro  $n_T$  caracteriza a heterogeneidade do sistema. Quando  $n_T = 1$ , a isoterma de Toth se reduz à de Langmuir e quanto mais distante de 1, maior é a heterogeneidade do sistema (DO, 1998).

### 2.3.3.12 Isoterma de Redlich-Peterson

O modelo de Redlich e Peterson (1959) é um híbrido dos modelos de Langmuir e Freundlich, que pode ser ajustado considerando uma ampla faixa de concentração, podendo ser aplicado para adsorção em sistemas homogêneos ou heterogêneos (FOO; HAMEED, 2010). A isoterma é representada pela seguinte equação:

$$qe = \frac{K_{RP} c_e}{1 + a_{RP} c_e^{g_{RP}}} \quad (26)$$

Em que  $K_R$  ( $L g^{-1}$ ) e  $a_R$  ( $mg^{-1}$ ) são as constantes de Redlich-Peterson,  $g_{RP}$  é o expoente do modelo (adimensional) e  $0 < g_{RP} \leq 1$ .

De acordo com Lima, Adebayo e Machado (2015), esta equação se torna linear em uma baixa cobertura da superfície ( $g_{RP} = 0$ ) e se reduz a uma isoterma de Langmuir quando  $g_{RP} = 1$ .

### 2.3.3.13 Isoterma de Langmuir-Freundlich

A Isoterma de Langmuir-Freundlich, proposta em 1952 (KOBLE; CORRIGAN, 1952), descreve a distribuição da energia de adsorção de adsorventes com superfície sheterogêneas. Em baixas concentrações de adsorbato, esse modelo se torna o modelo de Freundlich, enquanto que em altas concentrações o de Langmuir (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017). O modelo pode ser expresso como:

$$qe = \frac{q_m (K_{LF} c_e)^{m_{LF}}}{1 + (K_{LF} c_e)^{m_{LF}}} \quad (27)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção ( $mg L^{-1}$ ),  $K_{LF}$  é a constante de equilíbrio para sólidos heterogêneos ( $L mg^{-1}$ ) e  $m_{LF}$  é a constante de heterogeneidade ( $0 < 1/m_{LF} < 1$ ).

### 2.3.3.14 Isoterma de Hill

O modelo de Hill (1946) foi postulado para descrever a ligação de diferentes espécies em adsorventes com superfície homogênea. O modelo assume que a adsorção é um fenômeno cooperativo, em que o adsorbato em um sítio no adsorvente pode influenciar outros sítios de ligação no mesmo adsorvente. O modelo tem a seguinte expressão:

$$qe = \frac{q_m c_e^{n_H}}{K_H + c_e^{n_H}} \quad (28)$$

Em que  $q_m$  é capacidade máxima de adsorção ( $mg g^{-1}$ ),  $K_H$  é a constate de Hill [ $(mg L^{-1})^{n_H}$ ] (LIMA; ADEBAYO; MACHADO, 2015) e  $n_H$  é o constate de cooperatividade da interação (FOO; HAMEED, 2010).

### 2.3.3.15 Isoterma de Khan

A isoterma de Khan (KHAN; ATAULLAH; AL-HADDAD, 1997) é um modelo generalizado sugerido para o equilíbrio de adsorção em soluções puras (FOO; HAMEED, 2010):

$$qe = \frac{q_m b_K c_e}{(1 + b_K c_e)^{a_K}} \quad (29)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $b_K$  é a constante isotérmica de equilíbrio de Khan ( $\text{L mg}^{-1}$ ) e  $a_K$  é o expoente de Khan (adimensional).

Em altos valores de concentração de equilíbrio, a isoterma de Khan se reduz ao modelo de Freundlich e em baixas concentrações ao modelo de Langmuir, quando o parâmetro  $a_K$  é igual à unidade (KHAN; AL-WAHEAB; AL-HADDAD, 1996).

### 2.3.3.16 Isoterma de Radke-Plausnitz

A isoterma de Radke-Prausnitz é encontrada na literatura com várias reparametrizações distintas. Em Abebe, Murthy e Amare (2018), Ayawei, Ebelegi, Wankasi (2017), os autores trazem a expressão:

$$qe = \frac{q_{RPI} K_{RPI} c_e}{(1 + K_{RPI} c_e)^{m_{RPI}}} \quad (30)$$

No entanto essa expressão é idêntica à isoterma de Khan, diferindo apenas nos nomes atribuídos aos parâmetros. Em Rangabhashiyam *et al.* (2014) os autores incluem também mais estas duas expressões

$$qe = \frac{q_{RPII} K_{RPII} c_e}{1 + K_{RPII} c_e^{m_{RPII}}} \quad (31)$$

$$qe = \frac{q_{RPIII} K_{RPIII} c_e^{m_{RPIII}}}{1 + K_{RPIII} c_e^{m_{RPIII} - 1}} \quad (32)$$

Em que  $q_{RPI}$ ,  $q_{RPII}$  e  $q_{RPIII}$  são as capacidades máximas de adsorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K_{RPI}$ ,  $K_{RPII}$  e  $K_{RPIII}$  são as constantes de equilíbrio e  $m_{RPI}$ ,  $m_{RPII}$  e  $m_{RPIII}$  são os expoentes adimensionais dos modelos Radke-Prausnitz (RANGABHASHIYAM *et al.*, 2014).

Em Lima, Adebayo e Machado (2015), os autores trazem a expressão:

$$qe = \frac{q_{RPiV} K_{RPiV} c_e}{(1 + K_{RPiV} c_e)^{1/m_{RPi}}} \quad (33)$$

Para Foo e Hameed (2010), Vijayaraghavan *et al.* (2006) e Liu e Liu (2008), a isoterma de Radke-Prausnitz tem a forma:

$$qe = \frac{q_{RPiV} K_{RPiV} c_e^{m_{RPiIII}}}{q_{RPiV} + K_{RPiV} c_e^{m_{RPiIII}-1}} \quad (34)$$

Conforme Liu e Liu (2008), a expressão anterior pode ser rearranjada como:

$$qe = \frac{a_{RP} \times c_e^{m_{RP}}}{K_{RP} \times c_e^{m_{RP}-1}} \quad (35)$$

em que  $K_{RP} = a_{RP}/b_{RP}$ . Para  $K_{RP} \gg c_e^{m_{RP}-1}$  a equação original torna-se uma isoterma do tipo Freundlich:

$$qe = \frac{a_{RP} \times c_e^{m_{RP}}}{K_{RP}} \quad (36)$$

Por outro lado, quando  $K_{RP} \ll c_e^{m_{RP}-1}$ , a equação pode ser simplificada na forma linear:

$$qe = a_{RP} \times c_e \quad (37)$$

Em outras palavras, em baixas concentrações de adsorbato, este modelo reduz-se à forma linear (37). Sob altas concentrações torna-se a isoterma de Freundlich e quando  $m_{RP} = 0$ , torna-se a isoterma de Langmuir. Outra característica importante desta isoterma é que ela permite um bom ajuste em uma ampla faixa de concentrações (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017).

### 2.3.3.17 Isoterma de BET

A isoterma de Brunauer, Emmett e Teller (1938) é um modelo desenvolvido para estudos de adsorção em sistemas gás-sólido com adsorção em multicamada. Uma aplicação comum deste modelo é para a determinação da área superficial de um adsorvente a partir de dados de adsorção de nitrogênio (FOO; HAMEED, 2010). O modelo é descrito pela expressão:

$$qe = \frac{q_m c_{BET} c_e}{(c_s - c_e) [1 + (c_{BET} - 1)(c_e / c_s)]} \quad (38)$$

Em que  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção da monocamada ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $c_{BET}$  é a constante de adsorção BET relativa à energia de interação com a superfície ( $\text{L mg}^{-1}$ ), e  $c_s$  concentração de saturação de monocamada de adsorbato ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Embora a expressão (38) seja a mais utilizada pela maioria dos autores, Ebadi, Mohammadzadeh, Khudiev (2009) apresentam uma discussão sobre a isoterma de BET, em que são discutidas sutilezas da aplicação da isoterma BET para adsorção em fase líquida. Foi demonstrado que o uso direto da equação BET (38) para adsorção em fase líquida pode levar a resultados ambíguos e errôneos. Através de um exame minucioso do desenvolvimento da equação clássica (38), as causas dos mal-entendidos foram elucidadas e a forma mais adequada da equação BET para adsorção da fase líquida é descrita pela equação:

$$qe = \frac{q_m K_S c_e}{(1 - K_L c_e)(1 - K_L c_e + K_S c_e)} \quad (39)$$

Em que  $q_m$  é a quantidade máxima de adsorbato correspondente à adsorção completa em monocamada ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K_S$  é a constante de equilíbrio de adsorção para 1ª camada de adsorbato ( $\text{mg L}^{-1}$ )<sup>-1</sup>,  $K_L$  é constante de equilíbrio de adsorção para camadas superiores na isoterma de BET ( $\text{mg L}^{-1}$ )<sup>-1</sup>.

#### 2.3.3.18 Isoterma de Jossens

O modelo de Jossens *et al.* (1978) é uma equação baseada na distribuição de energia das interações adsorbato-adsorvente nos sítios de adsorção. Este modelo assume que o adsorvente possui uma superfície heterogênea em relação às interações que com o adsorbato (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017):

$$c_e = \frac{qe}{H} \exp(Fqe^p) \quad (40)$$

Em que  $H$  é a constante de Jossens (correspondente a constante de Henry),  $p$  é a constante de Jossens característica do adsorvente e independentemente da temperatura e  $F$  é outra constante de Jossens. Os parâmetros  $H$  e  $F$  são dependentes

da temperatura (HAMDAOUI; NAFFRECHOUX, 2007; JOSSENS *et al.*, 1978). A isoterma de Jossens é pouco utilizada nos dias atuais.

Após a apresentação dos principais modelos de cinética e de isotermas de adsorção, a questão que surge é como fazer o ajuste e qual é a forma de seleção do(s) modelo(s) que melhor descreve o comportamento dos dados de adsorção. Nas próximas seções serão apresentados alguns conceitos associados à regressão não linear, classe à qual os modelos de cinética e de isotermas são pertencentes.

#### 2.3.4 Regressão não linear: Conceitos, ajuste e seleção

De modo geral, conforme Bates e Watts (1988) e Draper e Smith (1998) os modelos de regressão assumem a seguinte forma (37):

$$Y = f(X, \theta) + \varepsilon \quad (41)$$

Em que  $Y$  é a variável resposta ou dependente, no caso a quantidade adsorvida  $q_e$  ou  $qt$ ,  $f$  é uma função (modelo) que associa uma variável independente ou preditora  $X$  (concentração de equilíbrio ou tempo) e um parâmetro (ou vetor de parâmetros)  $\theta$  e  $\varepsilon$  é o erro aleatório associado ao processo.

Os modelos de regressão linear são aqueles lineares nos parâmetros, ou seja, nenhuma derivada parcial em relação a algum parâmetro dependerá de qualquer parâmetro do modelo. Por outro lado, os modelos de regressão não linear são caracterizados por funções  $f(X, \theta)$  não lineares em pelo menos um dos parâmetros  $\theta_i$ , isso significa que ao menos uma das derivadas parciais de  $f(X, \theta)$  em relação a  $\theta_i$  dependerá de pelo menos um dos parâmetros  $\theta_i$  (MAZUCHELI; ACHCAR, 2002).

Para ilustrar essa diferença, seja o modelo de regressão:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \varepsilon \quad (42)$$

Suas derivadas parciais são:

$$\frac{\partial y}{\partial \beta_0} = 1, \quad \frac{\partial y}{\partial \beta_1} = x, \quad \frac{\partial y}{\partial \beta_2} = x^2 \quad (43)$$

Como nenhuma de suas derivadas parciais em relação aos parâmetros depende de qualquer parâmetro, então o modelo é dito linear. Considerando-se agora o modelo dado por:

$$y = e^{\theta_1 + \theta_2 x} + \varepsilon \quad (44)$$

Obtém-se as derivadas parciais:

$$\frac{\partial y}{\partial \theta_1} = e^{\theta_1 + \theta_2 x}, \quad \frac{\partial y}{\partial \theta_2} = x e^{\theta_1 + \theta_2 x} \quad (45)$$

em que ambas estão em função dos parâmetros  $\theta_1$  e  $\theta_2$ .

As estimativas dos parâmetros de modelos de regressão geralmente são obtidas pelo método de mínimos quadrados, o qual consiste em encontrar os valores dos parâmetros de modo a minimizar a soma de quadrado dos resíduos do modelo. Os resíduos ( $e_i$ ) são a diferença entre os valores experimentais  $y_i$  e os preditos pelo modelo  $\hat{y}_i$ :

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (46)$$

Sendo L a soma dos quadrados dos resíduos, tem-se a representação:

$$L = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i, \theta))^2 \quad (47)$$

Se  $f(X, \theta)$  for o modelo de regressão linear simples  $y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$ , e substituindo  $\beta_0$  e  $\beta_1$  por  $\hat{\beta}_0$  e  $\hat{\beta}_1$  para indicar os valores dos parâmetros que minimizam L e aplicando-se a técnica de minimização tem-se:

$$\frac{\partial L(\beta_0, \beta_1)}{\partial \beta_0} = -2 \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\beta}_0 - \hat{\beta}_1 x_i) = 0 \quad (48)$$

$$\frac{\partial L(\beta_0, \beta_1)}{\partial \beta_1} = -2 \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\beta}_0 - \hat{\beta}_1 x_i) x_i = 0 \quad (49)$$

Resolvendo-se as expressões, obtém-se os estimadores de mínimos quadrados de  $\beta_0$  e  $\beta_1$ :

$$\hat{\beta}_0 = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} - \hat{\beta}_1 \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{ou então} \quad \hat{\beta}_0 = \bar{y} - \hat{\beta}_1 \bar{x} \quad (50)$$

$$\hat{\beta}_1 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \bar{x} n \bar{y}}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \bar{x}^2} \quad (51)$$

Quando se considera  $f(X, \theta)$  um modelo de regressão não linear, os estimadores obtidos não possuem solução explícita, o que traz a necessidade do uso de métodos numéricos iterativos, tais como Newton Raphson, Gauss-Seidel, Jacobi, Steepest-Descent ou método do gradiente, Gauss Newton, Marquardt, Ralston-Jennrich, D.U.D. (*doesn't use derivatives*). Embora haja uma complexidade na obtenção desses estimadores, existem muitos softwares estatísticos que já possuem estes métodos implementados, possibilitando a obtenção de estimativas bastante similares com rápida convergência, embora a convergência dependa da complexidade do modelo e da qualidade dos valores iniciais, cujo fornecimento é necessário em qualquer método iterativo (MAZUCHELI; ACHCAR, 2002).

Outra estratégia bastante utilizada por muitos autores é a linearização de alguns modelos não lineares por meio de reparametrizações adequadas, no entanto, essa estratégia pode gerar vieses nas estimativas e alterar a estrutura dos resíduos dos modelos (FEBRIANTO *et al.*, 2009; FOO; HAMEED, 2010; MAZUCHELI; ACHCAR, 2002).

Os modelos de regressão não linear têm algumas vantagens como interpretabilidade dos parâmetros, maior precisão das estimativas e o fato de serem parcimoniais, mas têm desvantagens como maior complexidade de ajuste e a necessidade de procedimentos iterativos para a estimação dos parâmetros, e um conhecimento a priori acerca do modelo para os valores iniciais do procedimento iterativo (MAZUCHELI; ACHCAR, 2002). Há diversos softwares disponíveis para ajuste dos modelos de regressão linear e não linear, tais como o R, POLYMAT, MATLAB, EXCEL, Origin, SAS, a linguagem de programação Python, entre outros.

Tanto modelos de regressão lineares quanto os não lineares devem passar por uma avaliação da qualidade do ajuste, a qual é feita por alguns procedimentos, dos quais o principal é a análise dos resíduos do modelo (diagnósticos de regressão). Tal análise é feita verificando-se se os resíduos são normalmente distribuídos, independentes e se a variância é constante entre os diferentes níveis da variável independente. Para estas verificações existem os métodos formais, no caso testes específicos, e os informais, os quais se baseiam em análises gráficas das dispersões dos resíduos.

Para pressuposição de normalidade pode ser verificada por meio de um gráfico de probabilidade normal para os resíduos, em que cada resíduo é representado em função de seu valor esperado, o qual é calculado com a suposição de que os resíduos seguem uma distribuição normal. Existem alguns testes para essa finalidade, dos quais os principais são os testes de Shapiro e Wilk (1965), Kolmogorov-Smirnov (K-S), K-S corrigido de Lilliefors, Anderson-Darling, Cramer von Mises, teste de assimetria de D'Agostino, teste de curtose de Anscombe-Glynn, teste omnibus de D'Agostino-Pearson e teste de Jarque-Bera (ÖZTUNA; ATILLA; TÜCCAR, 2006).

Já a pressuposição de homocedasticidade de variâncias indica que a variância da variável resposta (Y) deve ser constante para todos os valores da variável preditora (X), é esperado que no gráfico, a variância dos resíduos seja constante ao longo dos valores de X e também que a dispersão dos valores dos resíduos, sejam eles positivos ou negativos, sejam similares para os diferentes valores de Y preditos. Alguns testes propostos para a avaliação da homoscedasticidade são os testes de Bartlett (1937), Levene (1960), Goldfeld e Quandt (1965), Brown e Forsythe (1974), Breusch e Pagan (1979) e O'brien (1979).

Quanto à independência dos resíduos, na análise gráfica a quebra dessa pressuposição é indicada pela presença de sequências de resíduos positivos e negativos com um padrão de comportamento. Em um gráfico de resíduos em função dos valores estimados, pode se observar a independência e a homoscedasticidade dos resíduos, se eles se distribuírem de modo aleatório (disperso, sem tendenciosidade) e com mesma amplitude oscilando em torno do zero. O teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1950, 1951) e o de Box e Pierce (1970) podem ser utilizados para verificar formalmente a independência dos resíduos.

Após o ajuste e a verificação das pressuposições da regressão pelos modelos, a próxima etapa é a seleção do modelo que melhor se ajusta aos dados. Esta etapa

geralmente baseia-se na comparação entre os dados experimentais e os preditos pelos respectivos modelos a fim de avaliar-se a concordância entre eles. Existem diversas alternativas disponíveis, tais como a utilização dos critérios de informação de Akaike, Bayesiano e de Akaike corrigido, o uso da função de verossimilhança, o uso do coeficiente de determinação múltipla, uma das medidas mais utilizadas na literatura, e/ou a utilização de métricas de ajuste.

O critério de informação de Akaike, AIC, (AKAIKE, 1998), é fundamentado na teoria da informação. Nas situações em que um modelo estatístico é usado para representar um determinado fenômeno, a representação quase nunca será exata, de modo que algumas informações serão perdidas. O AIC estima a quantidade relativa de informações perdidas por um determinado modelo, sendo assim quanto menos informações um modelo perder, maior será a qualidade do mesmo. O AIC pode ser obtido pela expressão:

$$AIC = -\log L(\hat{\theta}) + 2(p) \quad (52)$$

Em que em que  $p$  é o número de parâmetros do modelo ajustado e  $L(\hat{\theta})$  é a função de máxima verossimilhança do modelo.

De acordo com Burnham e Anderson, (2002), o AIC é assintoticamente eficiente, no entanto pode haver uma perda de eficiência nas situações em que há muitos parâmetros no modelo em relação ao tamanho da amostra. Diante disso, alguns autores propuseram correções do AIC a fim de minimizar o viés, tais como apresentado em Sugiura (1978), cuja expressão é:

$$AICc = -\log L(\hat{\theta}) + 2(p) + 2 \frac{p(p+1)}{n-p-1} \quad (53)$$

Em que  $n$  é o número de observações nos dados experimentais.

Outro critério que tem sido bastante utilizado pelos autores é o Critério de informação bayesiano (BIC), proposto por Schwarz (1978), o qual é baseado na avaliação de modelos definidos em termos da probabilidade *a posteriori*, o BIC pode ser obtido pela expressão:

$$BIC = -\log f(x_n | \theta) + p \times \log(n) \quad (54)$$

em que  $n$  e  $p$  são o número de observações nos dados experimentais e o número de

parâmetros do modelo respectivamente,  $f(x_n | \theta)$  é a expressão do modelo estudado e  $x_n$  é a variável independente (tempo  $t$  para os modelos de cinética ou concentração  $c_e$  para as isotermas),  $\theta$  são os parâmetros.

Outra medida que pode ser utilizada na seleção de modelos é o logaritmo  $l(\theta; qe)$  da função de verossimilhança  $L(qe; \theta)$ ; a qual é obtida por:

$$l(\theta; qe) = \log(L(\theta; qe)) \quad (55)$$

$$L(qe; \theta) = \prod_{i=1}^n f(qe_{i,\text{exp}}; \theta) \quad (56)$$

Em que  $qe_{i,\text{exp}}$  é cada observação experimental e  $f(qe_{i,\text{exp}}; \theta)$  é a expressão do modelo avaliado. Quanto maior o valor da log-verossimilhança, mais adequado é o ajuste do modelo a um conjunto de dados.

A medida mais utilizada na literatura para a seleção de modelos é o coeficiente de determinação múltipla  $R^2$ , o qual descreve a variação total (%) de uma variável dependente que é explicada pelo modelo. O  $R^2$  pode ser obtido por:

$$R^2 = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (qe_{i,\text{exp}} - \bar{q}_{e,\text{exp}})^2 - \sum_{i=1}^n (qe_{i,\text{exp}} - qe_{i,\text{calc}})^2}{\sum_{i=1}^n (qe_{i,\text{exp}} - \bar{q}_{e,\text{exp}})^2} \right] \quad (57)$$

Em que  $qe_{i,\text{exp}}$  é cada observação experimental de  $qe$  e  $qe_{i,\text{calc}}$  é valor teórico de  $qe$  predito pelo modelo avaliado. O coeficiente  $R^2$  tende a apresentar maiores valores conforme o maior número de parâmetros do modelo ( $n_p$ ), assim o coeficiente de determinação múltipla ajustado  $R^2_{\text{ajust}}$ , o qual faz uma ponderação pelo  $n_p$ , fornece uma mediada mais realista:

$$R^2_{\text{ajust}} = 1 - (1 - R^2) \left( \frac{n_p - 1}{n_p - p - 1} \right) \quad (58)$$

Na literatura, complementando a utilização do coeficiente  $R^2$ , outras métricas de avaliação da qualidade de ajuste têm sido utilizadas. Estas métricas geralmente baseiam-se em diferentes medidas da diferença entre os valores experimentais e aqueles preditos por um modelo (dados teóricos). Algumas dessas métricas mais citadas na literatura são apresentadas a seguir na Tabela 3:

Tabela 3 - Principais métricas de avaliação da qualidade de ajuste para seleção de modelos.

<b>Sigla</b>	<b>Expressão</b>	<b>Nome</b>
ARE	$\frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left  \frac{qe_{i.exp} - qe_{i.calc}}{qe_{i.exp}} \right $	Erro médio relativo ( <i>Average Relative Error</i> )
SSE	$\sum_{i=1}^n (qe_{i.calc} - qe_{i.exp})^2$	Soma de quadrado dos erros ( <i>Sum Squares Errors</i> )
HYBRID	$\frac{100}{n-p} \sum_{i=1}^n \left[ \frac{qe_{i.exp} - qe_{i.calc}}{qe_{i.exp}} \right]$	Erro fracionário híbrido ( <i>Hybrid Fractional Error Function</i> )
EABS	$\sum_{i=1}^n  qe_{i.exp} - qe_{i.calc} $	Soma de erros absolutos ( <i>Sum of the Absolute Erros</i> )
MPSD	$100 \times \sqrt{\frac{1}{n-p} \sum_{i=1}^n \left[ \frac{qe_{i.exp} - qe_{i.calc}}{qe_{i.exp}} \right]^2}$	Desvio padrão percentual de Marquardt ( <i>Derivative of Marquardt's Percent Standard Deviation</i> )
SRE	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(qe_{i.exp} - qe_{i.calc}) - ARE]^2}{n-1}}$	Desvio padrão do erro relativo ( <i>Standard Deviation of Relative Errors</i> )
$\chi^2$	$\sum_{i=1}^n \frac{(qe_{i.calc} - qe_{i.exp})^2}{qe_{i.exp}}$	Estatística de Qui-quadrado

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

$qe_{i.exp}$ : observação experimental de  $qe$ ;  $qe_{i.calc}$ : valor teórico de  $qe$  predito pelo modelo;  $n$ : número de observações;  $p$ : número de parâmetros;  $\theta$ : vetor de parâmetros do modelo.

Algumas descrições mais detalhadas destas métricas podem ser encontradas em Ayawei, Ebelegi e Wankasi (2017), Foo e Hameed (2010) e Hadi, Samarghandi e Mckay (2010).

Uma outra medida que pode ser avaliada é o desvio padrão residual. Considerando um modelo genérico  $y = f(x_n, \theta) + \varepsilon$ , em  $y$  é a variável resposta,  $f(x_n, \theta)$  uma função com parâmetro(s)  $\theta(s)$  e variável independente  $x$ ,  $\varepsilon$  é o erro aleatório, e  $\varepsilon \sim N(0, \sigma_\varepsilon)$ , o desvio padrão residual é uma estimativa de  $\sigma_\varepsilon$  que reflete a variabilidade de  $\varepsilon$ . Quanto menor a estimativa do desvio padrão residual, maior a precisão do modelo estudado.

## 2.3.5 Aplicações do processo de adsorção

### 2.3.5.1 Adsorção de poluentes

Com a crescente disponibilidade de vários tipos de adsorventes atualmente, um aumento expressivo das aplicações do processo de adsorção vem ocorrendo em diversos campos. Algumas das aplicações da adsorção são a remoção de corantes, remoção de metais pesados, remoção de compostos fenólicos, tratamento avançado de efluentes, recuperação e concentração de proteínas, remoção de outros contaminantes emergente, entre outros (KAYKHALI; SASANI; MARGHZARI, 2018).

Uma das áreas que mais utilizam a adsorção é a remoção de poluentes como os metais pesados, devido principalmente à sua alta eficiência de remoção e o baixo custo (CHAKRABORTY *et al.*, 2022). Existem diversos tipos de materiais que podem ser utilizados como adsorventes. Em Chai *et al.* (2021) os autores apresentam uma revisão sobre materiais convencionais e alguns novos que podem ser utilizados como adsorventes de metais pesados no tratamento de efluentes. Fiyadh *et al.* (2019) discutem sobre a utilização de nanotubos de carbono com diferentes funcionalizações como adsorventes de vários tipos de metais. Adsorventes com diferentes propriedades físico-químicas podem ser usados para remover diferentes tipos de poluentes (BABEL, 2003).

Em Chakraborty *et al.* (2022), os autores fazem uma revisão sobre a adsorção de metais pesados, apresentando adsorventes comerciais como grafeno, carvão ativado e nanotubos de carbono, materiais naturais como argilas, zeólitas e materiais siliciosos, bioadsorventes como quitinas e quitosana, turfa, leveduras, biomassa fúngica ou biomassa bacteriana. Estes autores enfatizam o uso de resíduos naturais como adsorventes de baixo custo, de modo que estes materiais adsorventes podem ser classificados em cinco categorias: minerais naturais (carvão, turfa, argilas, etc.), resíduos agrícolas (cascas, palha de trigo, farelo de milho etc.), resíduos florestais (cascas, folhas, sementes, etc.), resíduos animais (penas de frango, cascas de ovos, cascas de caranguejo, escamas de peixe, etc), e resíduos industriais (cinzas, lama vermelha e escórias de forno). Muitos destes materiais podem ser utilizados na adsorção de diversos outros compostos inorgânicos e até mesmo compostos orgânicos complexos como as enzimas (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020).

Em Lu *et al.* (2021) os autores empregaram o processo de adsorção na remoção de fungicidas azólicos de amostras de água ambiental em um compósito de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZnAl-LDH}@\text{MIL-53(Al)}$ , sendo que a cinética de adsorção obedeceu a um modelo de pseudo-segunda ordem atingindo o equilíbrio em 5 minutos e os dados de equilíbrio foram melhor descritos pela isoterma de Langmuir, com capacidade máxima de adsorção de na faixa de 43,54 - 71,79  $\text{mg g}^{-1}$  nas diferentes condições estudadas.

Ainda no que diz respeito à utilização do processo de adsorção para remoção de poluente ambientais, Titchou *et al.* (2021) fazem uma revisão sobre a remoção de poluentes orgânicos persistentes (POPs) de água e efluentes por processo de adsorção e eletrocoagulação, para o processo de adsorção, esta revisão discute ainda várias isotermas de adsorção, modelos cinéticos, estudos termodinâmicos e a regeneração do suporte utilizado em reatores descontínuos e contínuos.

No trabalho de Nodehi, Shayesteh e Rahbar-Kelishami (2022), os autores descreveram a síntese de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NiO}$  para a remoção por adsorção de corante vermelho S de alizarina de efluentes contaminados, sendo que a cinética de adsorção obedeceu a um modelo de pseudo-segunda ordem e os dados de equilíbrio foram melhor descritos pela isoterma de Freundlich, com capacidade máxima de adsorção de 223,30  $\text{mg g}^{-1}$ .

Em Ibrahim *et al.* (2021) os autores apresentam uma revisão sobre alguns avanços no emprego do processo de adsorção utilizando como materiais adsorventes novas estruturas metal-orgânicas (MOFs: *Metal-organic frameworks*) para a remoção de diferentes contaminantes dos ecossistemas. O estudo também destacou alguns adsorventes de MOFs promissores usados para a adsorção de diferentes poluentes, incluindo metais pesados,  $\text{CO}_2$ , compostos orgânicos voláteis clorados (CVOCs), corantes, pesticidas, aditivos alimentares, produtos veterinários, farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCP), antibióticos, resíduos industriais, etc.

#### 2.3.5.2 Adsorção de proteínas

O processo de adsorção de proteínas tem sido investigado em diversas áreas de pesquisa, tais como imobilização de enzimas, purificação de proteínas, estudo de camada de proteína corona em sistemas *in vivo/in vitro*, entre outros. A adsorção de proteínas em superfícies de nanopartículas desempenha um papel crítico em sistemas biológicos e a albumina de soro bovino (BSA) é um modelo útil devido à sua alta

abundância e propriedades semelhantes à sua variante humana (XU; GRASSIAN, 2017), de modo que sua adsorção tem sido estudada em diversos materiais adsorventes. Liu *et al.* (2017a) realizaram um estudo de adsorção de BSA em nanopartículas magnéticas de  $ZnFe_2O_4$ , em que o processo obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem e é descrito pela isoterma de Temkin. Maleki, Moradi e Tahmasebi (2017) estudaram a adsorção de BSA em nanopartículas de ouro, demonstrando que a cinética do processo segue um modelo de pseudo-primeira ordem e é descrito pela isoterma de Freundlich.

Em Wang *et al.* (2017a) os autores estudaram a adsorção de BSA em NPs de prata, demonstrando que houve evidências de mudanças conformacionais significativas na BSA e sendo o processo descrito por uma cinética de pseudo-segunda ordem e pela isoterma de Freundlich. A adsorção de BSA em nanopartículas de  $TiO_2$  foi estudada por Xu e Grassian (2017). Os autores demonstraram que o íon fosfato pode impedir a desnaturação da BSA na superfície das  $TiO_2$  em pH muito ácido e até alterar a afinidade da BSA em relação às superfícies das NPs. Foi demonstrando também que a estrutura da proteína adsorvida pode ser alterada várias vezes, por meio da modificação do pH do meio.

A adsorção de BSA em nanopartículas de prata (AgNPs) também foi estudada por Wang *et al.* (2017a), foi mostrado que a BSA é adsorvida nas AgNPs para formar um complexo estável, cujas principais forças atuantes são ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A cinética do processo de adsorção seguiu um modelo de pseudo-segunda ordem e os dados de equilíbrio foram descritos pela isoterma de Freundlich. Em Kopac, Bozgeyik e Flahaut (2018) os autores utilizaram nanotubos de carbono de paredes múltiplas para adsorção de BSA, sendo a cinética do processo descrita por um modelo de pseudo-primeira ordem e os dados de equilíbrio ajustados pela isoterma de Langmuir com capacidade de adsorção de  $1221 \text{ mg g}^{-1}$ .

No trabalho de Fan *et al.* (2018), foram desenvolvidas novas nanoesferas magnéticas de poli (líquidos iônicos) de impressão molecular oca para o reconhecimento específico de BSA. Foram estudados dois tipos de adsorventes, as  $Fe_3O_4@void@PILMIP$  quando se utilizou a BSA como molde na síntese e as  $Fe_3O_4@void@PILNMIP$  sem a BSA no meio reacional. A adsorção de BSA foi bastante influenciada pelo pH e temperatura, apresentando capacidades máximas de adsorção, estimadas pelo modelo de Langmuir, respectivamente para as  $Fe_3O_4@void@PILMIP$  e  $Fe_3O_4@void@PILNMIP$ , em  $30^\circ \text{ C}$  de  $296,54$  e  $94,07 \text{ mg g}^{-1}$ ,

e em 20° C de 353,14 e 126,92 mg g<sup>-1</sup>. Outro resultado importante discutido foi que os experimentos de reconhecimento seletivo e competitivo indicaram que as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@void@PILMIP apresentaram alta seletividade para adsorção de BSA em soluções contendo outras proteínas (hemoglobina bovina, ovalbumina e lisozima).

Os resultados de isoterma e cinética de adsorção mostraram que as nanoesferas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@void@PILMIP possuem bom reconhecimento e alta capacidade de adsorção da albumina sérica bovina. Os experimentos de reconhecimento seletivo e competitivo indicaram que as nanoesferas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@void@PILMIP podem reconhecer seletivamente a albumina sérica bovina em comparação com outras proteínas (hemoglobina bovina, ovalbumina e lisozima).

Em outra aplicação do processo de adsorção, Merces *et al.* (2020) realizaram a adsorção e posterior identificação de proteínas do plasma sanguíneo (serpinas, protrombina e albumina humana) utilizando micropartículas magnéticas de quitosana revestidas com heparina. Em Santos *et al.* (2021), os autores utilizaram nanopartículas revestidas com tetraetilortosilicato (TEOS) e BSA (mesmo material proposto neste trabalho) para adsorção de lisozima de clara de ovo de galinha. O melhor pH de adsorção de lisozima foi o pH 10,0, em que a capacidade máxima de adsorção foi de 193,19 mg g<sup>-1</sup> de acordo com a isoterma de Langmuir e a maior porcentagem de dessorção ocorreu em pH 5,0. Os dados de cinética de adsorção foram melhores descritos pelo modelo de pseudo-segunda ordem e os de equilíbrio pela isoterma de Freundlich.

Outra aplicação do processo de adsorção de proteínas foi feita por Cheeveewattanagul *et al.* (2021). Utilizando uma partícula magnética funcionalizada com aptâmero, os autores desenvolveram um método de detecção seletiva de albumina urinária humana em amostras clínicas de nefropatia diabética e outras doenças do trato renal. Nesse método, a urina era incubada com as partículas durante 30 min para adsorção da albumina, em seguida era realizada a separação magnética e o descarte do sobrenadante, posteriormente as partículas eram incubadas com uma solução de azul de metileno (esse corante adsorve-se na albumina) e outra separação magnética era feita. Após isso, o azul de metileno do sobrenadante era quantificado em um sensor voltamétrico em uma medida indireta da concentração de albumina era obtida.

Em Yin *et al.* (2015), os autores sintetizaram um polímero de impressão molecular magnético na superfície de nanotubos de carbono de paredes múltiplas

magnéticas (MMWNTs), usando albumina de soro humano (HSA) como molde e dopamina como monômero funcional. O MWNTs@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MIP resultante exibiu altas propriedades magnéticas e capacidade de adsorção de HSA de 66,23 mg g<sup>-1</sup>, não foram realizados estudos de cinética e equilíbrio de adsorção, a capacidade máxima foi estimada apenas com a isoterma de Langmuir. Os autores combinaram a técnica de extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência para adsorção de HSA de amostras de urina.

A adsorção de HSA em óxido de grafeno (GO) foi estudada por Liu, Yan e Chen (2019), os autores demonstraram que um aumento na força iônica do meio em condições de pH neutro resultou em uma ligação mais forte entre HSA e GO, bem como camadas de HSA mais compactas na superfície do GO. Os autores concluíram que íons de cálcio também facilitaram a adsorção de HSA provavelmente por meio de neutralização de carga e efeito de ponte. Em condições de força iônica fisiológica (150 mM), a adsorção máxima de HSA foi observada no ponto isoelétrico de HSA (4,7). Em condições ácidas, a adsorção de HSA em GO levou à formação de camadas proteicas com alto grau de fluidez devido à conformação estendida de HSA.

Em Shah e Alveroglu (2021) foi desenvolvido um nanocompósito para adsorção de BSA e HSA. Inicialmente foram sintetizadas nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, as quais foram recobertas em seguida por uma fina camada de nanopartículas de prata (Ag), seguidas por um recobrimento com sílica (TEOS) e por último com nanogéis de Poli(N-isopropil acrilamida) (PNIPA), formando o nanocompósito polimérico de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag@SiO<sub>2</sub>-PNIPA. Para adsorção de BSA e HSA, foram avaliados os efeitos do pH em diferentes meios tamponados com acetato, carbonato/bicarbonato, fosfato e em água pura. Os dados de equilíbrio de adsorção de BSA e HSA foram melhor explicados respectivamente pelo modelo de Langmuir com capacidades máximas de adsorção de 322 e 166 (mg g<sup>-1</sup>) e os dados de cinética para ambas proteínas foram descritos pelo modelo de pseudo-segunda ordem.

Semelhante à proposta deste trabalho, Bhakta *et al.* (2017) desenvolveram *nanopockets* utilizando a HSA como molde em uma nanopartícula de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> e os monômeros de silano de hidroximetiltriethoxissilano, benziltriethoxissilano, n-propiltriethoxissilano e 3-aminopropiltriethoxissilano para formar os sítios de ligação ao redor da proteína molde na formação do polímero. O nanomaterial resultante apresentou alta especificidade de adsorção para a HSA e capacidade máxima de adsorção de 21 mg g<sup>-1</sup>, estimada pela isoterma de Langmuir-Freundlich de sítios

múltiplos. Foi demonstrada a alta seletividade do material pela HSA em um experimento de adsorção conjunta em uma solução de lisozima, IgG e HSA. A eficiência do nanomaterial desenvolvido foi comparado ao kit comercial de remoção de albumina *ProteoExtract*, demonstrando resultados semelhantes entre as duas metodologias com relação às bandas de separação em um gel de eletroforese de SDS-PAGE. Outro importante resultado apresentado foi a possibilidade de enriquecimento da PSA (*Prostate Specific Antigen*) adicionada em amostras de soro e quantificada antes e depois da aplicação das metodologias de depleção de HSA com a aplicação do nanomaterial desenvolvido e com o kit comercial.

Outro tipo de MNP para adsorção de HSA foi proposta em Borowska *et al.* (2019), em que foi realizada sínteses de MNPs de magnetita aminadas revestidas com quitosana, com diferentes números de grupos amino ligados à unidade piranose na quitosana:  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)_{1-3}$ . Os autores também avaliaram o efeito do método de secagem (liofilização ou estufa a vácuo) sobre a eficiência de adsorção de HSA. Foi mostrado que o método de secagem das MNPs tem uma influência chave na eficiência de adsorção de HSA. Para os materiais aminados  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)_3$  secos por liofilização, a eficiência de adsorção foi 200% maior do que para as nanopartículas secas em estufa a vácuo. Além disso, o método de aminação teve efeito sobre a eficiência de adsorção, para materiais obtidos sem solvente, o rendimento foi aumentado em cerca de 35%. Infelizmente, resultados semelhantes não foram observados para nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)_2$ . Nem o método de síntese nem a secagem por liofilização aumentaram o rendimento de imobilização de HSA, que foi muito baixo em comparação com as restantes nanopartículas

Uma MNP revestida com amido aminado para imobilização de HSA foi apresentada por Borowska (2019). Diferente das estratégias de adsorção até aqui apresentadas, a imobilização de HSA foi feita por ligação química com glutaraldeído. A quantidade de HSA na superfície das MNPs de AS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi determinada a partir da diferença HSA utilizada para imobilização e a HSA no sobrenadante após a separação das MNPs por aplicação de um ímã. Nestas condições as AS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentaram uma capacidade de adsorção de HSA de  $149,96 \text{ mg g}^{-1}$ .

Outra metodologia para adsorção de HSA, e também para IgG, foi apresentada em Gondim *et al.* (2018), em que foi utilizado um hidróxido duplo em camadas de Mg-Al não calcinado (Mg-Al LDH) como adsorvente, e avaliado o efeito da solução tampão e do pH sobre a adsorção das proteínas. Os resultados indicaram que as capacidades

máximas de adsorção, estimadas pela isoterma de Langmuir, foram de 239 mg g<sup>-1</sup> para IgG e 105 mg g<sup>-1</sup> para HSA em tampão TRIS-HCl. Por outro lado, a maior seletividade para adsorção de IgG foi obtida com tampão fosfato em pH 6,5, em que as capacidades máximas foram de 165 e 36 mg g<sup>-1</sup> para a IgG e a HSA respectivamente, e ambas puderam ser totalmente recuperadas por eluição dos Mg-Al LDH com cloreto de sódio (NaCl 1 mol L<sup>-1</sup>).

## 2.4 OBJETIVOS

### 2.4.1 Objetivo geral

Desenvolver um método rápido, o qual possa ser aplicado em minutos, simples, que envolva poucas etapas e não necessite de equipamentos complexos, e de custo reduzido para depleção de HSA de soro, por meio da utilização de nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) revestidas com TEOS, e também com TEOS e BSA.

### 2.4.2 Objetivos específicos

De acordo com Fang e Zhang (2008), um método ideal utilizado para separações de misturas complexas de proteínas ou enriquecimento de grupos específicos de PBAs deve possuir as seguintes características:

- a) Sintetizar nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e revesti-las com tetraetilortossilicato (TEOS) e albumina sérica bovina (BSA).
- b) Realizar a caracterização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> puras e das revestidas, por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), medida do potencial zeta, análise termogravimétrica (TG), Difractometria de raios-X (DRX);
- c) Otimizar as condições experimentais de adsorção e dessorção de HSA de soro sanguíneo das nanopartículas;
- d) Estudar a interação da HSA com as nanopartículas por meio dos estudos de cinética e equilíbrio (isotermas) de adsorção;
- e) Avaliar a eficiência do método de depleção desenvolvido por meio técnica de eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 REAGENTES

HSA, cloreto de ferro (III) tetrahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de ferro (II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), TEOS, BSA e borohidreto de sódio foram adquiridos da Sigma Aldrich® (Steinheim, Alemanha). Hidróxido de amônio e álcool isopropílico foram obtidos da Isofar® (Rio de Janeiro, Brasil). O ácido clorídrico foi obtido da Exodus Scientifica (São Paulo, Brasil). O glutaraldeído foi adquirido da Rioquímica (São José do Rio Preto, Brasil). Fosfato de potássio monobásico e dibásico, hidróxido de sódio e cloreto de sódio foram obtidos da Synth (Diadema, Brasil). A água deionizada ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) foi obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). As soluções padrão foram preparadas diariamente

O reagente de Bradford foi preparado com base em Bradford (1976), no qual, em um balão de 500 mL, misturou-se 50 mg de azul de cromassie, 25 mL de etanol 95% e 50 mL de ácido fosfórico (85% PA). A solução foi agitada manualmente até a solubilização do cromassie, completando-se o volume com água ultrapura. Encapouse o balão com papel alumínio e manteve-os em banho ultrassônico por cerca de 4 horas. Posteriormente o reagente de Bradford foi filtrado e armazenado na geladeira em frasco âmbar (também encapado com papel alumínio). Sempre antes da utilização nos experimentos, a quantidade do reagente a ser utilizada é levada ao banho ultrassônico por 2 horas novamente.

#### 3.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

##### 3.2.1 Síntese de magnetita

A síntese das nanopartículas magnéticas foi feita pelo método de coprecipitação descrito em Salviano *et al.* (2018) e Valenzuela *et al.* (2009) com algumas modificações. Inicialmente, 4g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,015 mol de  $\text{Fe}^{2+}$ ) e 7g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , (0,030 mol de  $\text{Fe}^{3+}$ ) foram dissolvidos em um balão de três bocas contendo 300 mL de água ultrapura previamente aquecida a  $80^\circ\text{C}$ . Após dissolução dos sais de ferro, a solução foi mantida sob fluxo de  $\text{N}_2$  e agitação de 600 rpm por 10 min para desoxigenação. Em seguida adicionou-se 48 mL de uma solução a 30% de

NH<sub>4</sub>OH durante 5 min, utilizando uma bomba peristáltica com um fluxo de aproximadamente 9,6 mL/min. Posteriormente, a solução foi mantida sob o fluxo de N<sub>2</sub> e agitação de 600 rpm durante 40 minutos. A solução resultante contendo o precipitado preto (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) foi resfriada à temperatura ambiente e lavada com água deionizada até atingir-se o pH neutro. Em seguida as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> resultantes foram secas em estufa a 60°C durante 24 horas.

### 3.2.2 Revestimento das nanopartículas com TEOS

O principal objetivo desse revestimento é estabilizar as nanopartículas evitando que elas se aglomerem. O procedimento foi baseado em Zeng *et al.* (2012), para isso, em 6 tubos de 50 mL contendo cada um 300 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, adicionou-se 30 mL de uma solução isopropanol/água na proporção de 5:1 V/V. Posteriormente os tubos foram sonicados durante 20 minutos e adicionados em cada um, 5 mL de NH<sub>4</sub>OH (28%) e 2 mL de TEOS (Tetraetilortossilicato). Após as adições, os tubos foram deixados sob agitação horizontal máxima durante 12 horas ininterruptas. Concluído o revestimento, as nanopartículas resultantes (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS) foram lavadas com o auxílio do imã e posteriormente secadas em estufa a 60° C durante 24 horas.

### 3.2.3 Revestimento das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS com BSA

O protocolo de revestimento foi baseado em Moraes *et al.* (2013). Inicialmente preparou-se uma solução aquosa de BSA 1% (m/v), em que 1,5 g de BSA foram solubilizadas em 150 mL de uma solução tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> e pH 6,0. Posteriormente, em 6 tubos de 50 mL, adicionou-se 500 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS e 20 mL da solução de BSA 1%. Em seguida os tubos contendo as soluções foram sonicados por 20 min e deixados em repouso por outros 10 min, sendo então separados usando um ímã.

Em seguida, adicionou-se 5 mL de uma solução de glutaraldeído 25% em cada tubo, sendo logo em seguida colocados no agitador horizontal em agitação de 1,6 durante 5 h. Retirou-se a solução de glutaraldeído 25% e adicionou-se a cada tubo, 10 mL de uma solução de borohidreto de sódio 1% (preparada no momento da utilização). Os tubos foram agitados manualmente por 10 s e colocados em repouso por 3 min, sendo este processo de agitação/repouso repetido 10 vezes. Por último, a

dispersão foi lavada exaustivamente com água deionizada e com auxílio de ímã até que toda a espuma residual fosse retirada e a água de lavagem se tornasse límpida. O material obtido ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ ) foi secado em estufa a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h.

### 3.5 CARACTERIZAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS

#### 3.5.1 Difractometria de raios-X

A difração de raios-X foi realizada com um difratômetro automático de pó da marca Rigaku modelo Ultima IV localizado no Laboratório de Cristalografia da Universidade Federal de Alfenas - Campus Santa Clara. Foi utilizada radiação Cu K $\alpha$  (tubo selado) com 40 kV e 40 mA. A varredura foi realizada de modo contínuo, à temperatura ambiente, com velocidade de  $2^\circ\ 2\theta\ \text{min}^{-1}$ , na faixa de  $10 - 70^\circ\ 2\theta$ , sendo as medidas obtidas da DRX obtidas a cada  $0,05^\circ\ 2\theta$ .

#### 3.5.2 Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento da marca Netzsch, modelo TG 209 F3 Tarsus<sup>®</sup>. As análises foram realizadas utilizando-se um cadinho de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , com uma massa de 11,5 mg de amostra, a faixa de temperatura analisada foi de 40 a  $800^\circ\text{C}$  com rampa de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$  sob atmosfera inerte de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) com fluxo de  $40\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$ .

#### 3.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras de cada nanopartícula foram preparadas por trituração de 1 mg de nanopartícula com 100 mg de KBr, sendo a mistura comprimida com uma prensa hidráulica para formar discos com aproximadamente 1 mm de espessura. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente na faixa de comprimento de onda de 400 a  $4000\ \text{cm}^{-1}$  em um espectrofotômetro Varian 3100, a temperatura ambiente, com resolução de  $4\ \text{cm}^{-1}$  e número de varreduras igual a 32, com o disco KBr servindo como pano de fundo.

### 3.5.4 Potencial zeta

As medidas de (potenciais zeta) foram obtidos utilizando-se um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Assim, foram preparadas soluções tampão (e eletrólitos) com concentração analítica de  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , na faixa de pH de 2 a 11, com a utilização de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $4 \text{ mol L}^{-1}$ ). Foram preparadas soluções de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de HSA e suspensões aquosas ( $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  para cada ponto de pH da faixa estudada.

Para cada valor de pH foram realizadas 6 medidas de potencial zeta. Avaliou-se a presença de observações discrepantes (outliers) em todos os valores de potencial conforme o pH, mediante a aplicação do teste de Grubbs (1950) ao nível de 5% de significância e por análises gráficas, de modo que as observações consideradas *outliers* foram retiradas dos dados. Para aplicação deste teste, foi utilizada a função `grubbs.test()` disponível no pacote *outliers* (KOMSTA, 2011) do Sistema Computacional R (R CORE TEAM, 2021).

### 3.5.5 Microscopias eletrônicas de varredura

O tamanho e morfologia foram analisados por imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FEI Company – XL30 FEG), trabalhando em 10 a 25 keV e spot 3. As amostras foram preparadas colocando uma gota da dispersão coloidal diluída em etanol anidro depositado sobre uma placa de metal silício (111). Os contatos entre a amostra e o suporte foram feitos com tinta condutora de prata (Degussa). Foi adicionado filme de silicone fixado em fita de carbono e, por fim, as amostras foram secas em estufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12 h. Os histogramas foram construídos usando o software de processamento de imagens Image-J de domínio público. As análises do detector de raios X dispersivo de energia 2D, EDX ou EDS foram realizadas com mapeamento 2D trabalhando a 25 keV e ponto 4. O gráfico foi plotado analisando a energia liberada da emissão  $\text{C K}\alpha$ ,  $\text{O K}\alpha$ ,  $\text{Fe K}\alpha$  e  $\text{Si L}\alpha 1$ .

### 3.6 ESTUDOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO

#### 3.6.1 Otimização da adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA

Para estabelecer-se as condições ótimas de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) com pontos centrais em triplicata, analisando-se as variáveis pH (3,02 - 6,38), massa de nanopartícula (6,59 - 23,41 mg) e concentração de HSA da solução (49,09 - 250,91 mg L<sup>-1</sup>).

Em relação ao procedimento experimental, para cada ensaio do DCCR, foram adicionadas as soluções de HSA de concentrações e pH específicas em tubos de vidro de 10 mL contendo as respectivas massas. Em seguida esses tubos foram agitados em um agitador de tubos horizontal durante 1 hora e depois submetidos a duas extrações magnéticas de no mínimo 10 minutos cada. Por último, aliquotou-se 0,2 mL de cada ensaio e 2,8 mL do reagente de Bradford em tubos de 10 mL, agitou-os manualmente e, após 5 minutos de repouso, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm em cubetas de vidro. A variável resposta analisada foi a eficiência de remoção de HSA (%), obtida conforme expressão (59):

$$Re = 100 \times \frac{c_o - c_e}{c_o} \quad (59)$$

Em Re é a eficiência de remoção de HSA (%),  $c_o$  e  $c_e$  (mg L<sup>-1</sup>) são as concentrações iniciais e de equilíbrio de HSA, respectivamente.

##### 3.6.1.1 Avaliação complementar do efeito do pH na adsorção de HSA

Foi realizado um estudo complementar para validar os resultados das otimizações da adsorção e avaliar a influência do pH na adsorção da HSA nos nanomateriais (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA) Para isso, mediu-se 5 mg de nanopartícula em tubos de ensaio de vidro de 10 mL. Em seguida foram preparadas soluções de HSA (tampão fosfato) com concentração analítica de 20 mg L<sup>-1</sup> nos pHs de 2,0; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,5; 8,5, utilizando-se H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4 mol L<sup>-1</sup>) NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>), ressalta-se que algumas dessas soluções são apenas eletrólitos, uma vez que o fosfato não tampona em todas as regiões de pH estudadas.

Posteriormente, adicionou-se 1 mL de cada solução de HSA em pH específico nos tubos contendo o nanomaterial (em triplicata). A suspensão foi mantida em um agitador de tubos a uma velocidade 1000 rpm por 1 h. Em seguida, os tubos foram submetidos a um campo magnético de ímãs de neodímio (40mm x 20mm x10mm) para separação das nanopartículas. Recolheu-se 0,5 mL do sobrenadante em um tubo de 10 mL, adicionou-se 1,5 mL de reagente de Bradford, agitou-se manualmente e após 5 min realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

A porcentagem de adsorção de HSA foi determinada pela razão da média da absorbância das triplicatas pela média das duplicatas de cada solução padrão, de acordo com o valor de pH avaliado. O uso da absorbância como variável resposta é encontrado em literatura (BASAGLIA *et al.*, 2017), aqui não se utilizou a quantidade de proteínas adsorvidas pelo fato de que do reagente de Bradford pode ser influenciado pelo pH, o que faz com que fosse necessário uma curva de calibração para cada região, um esforço desnecessário por se tratar apenas de um estudo preliminar envolvendo uma única variável.

### **3.6.2 Estudos de cinética de adsorção**

#### **3.6.2.1 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA**

Adicionou-se 5 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA em tubos de ensaio de 10 mL. Para cada tubo (triplicata) foi adicionado 1 mL de uma solução de HSA (20 mg L<sup>-1</sup>) em pH 3,5 e mantidos sob agitação de 500 rpm nos tempos específicos de 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20 e 60 minutos à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, as nanopartículas foram separadas com auxílio dos ímãs de neodímio, recolheu-se 0,5 mL do sobrenadante em um tubo de 10 mL, adicionou-se 1,5 mL de reagente de Bradford e agitou-se manualmente, realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm após 5 minutos.

Com a curva analítica ajustada e os valores de absorbância encontrados com o estudo de cinética, obteve-se os dados de quantidade de HSA adsorvida  $qt$  com o tempo (mg g<sup>-1</sup>) utilizando-se a expressão (56) (TAN; HAMEED, 2017), em que  $c_0$  é a concentração inicial de HSA (20 mg L<sup>-1</sup>),  $c_e$  a concentração no tempo  $t$  (mg L<sup>-1</sup>),  $V$  é o volume de solução de HSA adicionado (1 mL) e  $m$  (5 mg) é a massa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA adicionada no tubo.

$$q_t = \frac{(c_0 - c_e) \times V}{m} \quad (60)$$

Com os dados de  $qt$  e  $t$  obtidos, os modelos de cinética de adsorção de pseudo-primeira ordem (PFO), pseudo-segunda ordem (PSO), ordem fracionária (Avrami), quimissorção (Elovich) e difusão intrapartícula (TAN; HAMEED, 2017) foram ajustados.

### 3.6.2.2 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS

O estudo de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS foi conduzido analogamente ao de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, com a diferença de que a concentração do padrão de HSA foi de 100 mg L<sup>-1</sup>, o pH foi 4,5, a massa de nanopartículas foi de 10 mg e os tempos de agitação foram de 0,05, 0,08, 0,17, 0,42, 0,67, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 23, 35, e 60 minutos.

### 3.6.3 Estudos de isotermas de adsorção

#### 3.6.3.1 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA

Inicialmente, 1 mL de soluções de HSA (solução de fosfato dibásico, 0,02 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,5) nas diferentes concentrações (100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 850 e 1000 mg L<sup>-1</sup>) foram adicionados em tubos de vidro contendo 10 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA. Os tubos foram agitados (1000 rpm) a 25 °C por 1 h, e as nanopartículas foram separadas magneticamente. Posteriormente recolheu-se 0,2 mL do sobrenadante em um tubo de 10 mL, adicionou-se 2,8 mL do reagente de Bradford e agitou-se manualmente, realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm após 5 minutos.

#### 3.6.3.2 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS

Um procedimento análogo foi realizado para as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, as únicas diferenças foram as soluções de HSA (solução de fosfato dibásico, 0,02 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5) nas concentrações de 220, 270, 330, 410, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 e 1200 mg L<sup>-1</sup>.

Com as curvas analíticas ajustadas para cada pH (3,5 e 4,5) e os valores de absorvância do estudo de isotermas, obteve-se os dados de concentração de equilíbrio  $c_e$  (mg L<sup>-1</sup>). A quantidade de HSA adsorvida  $q_e$  (mg.g<sup>-1</sup>) foi obtida de acordo com a expressão (57) (TAN; HAMEED, 2017), em que  $c_0$  (mg L<sup>-1</sup>) é a concentração inicial de HSA (diferentes padrões),  $V$  (mL) é o volume de solução de HSA adicionado e  $m$  (g) a massa de nanopartícula adicionada no tubo.

$$q_e = \frac{(c_0 - c_e) \times V}{m} \quad (61)$$

Com os dados de  $q_e$  e  $c_e$  obtidos, pode-se ajustar os modelos de isotermas de adsorção de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Liu, Redlich-Peterson, Sips, Hill, Toth, Koble-Corrigan, Khan, Langmuir-Freundlich, Temkin, Jossens e Brunauer-Emmett-Teller (BET), obtidas a partir dos trabalhos de Ayawei, Ebelegi e Wankasi (2017), Foo e Hameed (2010), Lima, Adebayo e Machado (2015) e Gritti e Guiochon (2003).

### **3.6.4 Estudos de otimização da dessorção de HSA e reutilização das nanopartículas magnéticas**

Os estudos de otimização da dessorção foram realizados a fim de se avaliar a recuperação da HSA adsorvida e a possível reutilização das nanopartículas.

#### **3.6.4.1 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA**

Para se determinar as melhores condições de dessorção de HSA utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) com quatro repetições no ponto central, analisando-se as variáveis pH (3,14 - 9,86) e volume das soluções de dessorção (0,32 - 3,68 mL) e o tempo de agitação (4,77 - 55,22 min). As variáveis respostas analisadas foram a recuperação de HSA (%) para ambos os estudos de dessorção e reutilização.

Com relação ao procedimento experimental de dessorção, inicialmente adicionou-se 10,0 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA em tubos de vidro de 10,0 mL. Em seguida promoveu-se a adsorção de HSA adicionando-se 1,0 mL de uma solução de HSA 200 mg L<sup>-1</sup> em pH 3,5 e agitou-se durante 60 minutos em um agitador de tubos

a 1000 rpm. Após isso, realizou-se a separação magnética (2 etapas iguais) das nanopartículas deixando a solução sob influência de um campo magnético durante 25 minutos, separando o sobrenadante após esse período. Obteve-se a absorbância desse sobrenadante a fim de se avaliar a quantidade de HSA adsorvida da primeira adsorção, a quantificação foi feita pelo método de Bradford, já descrito anteriormente.

Com as nanopartículas com a HSA adsorvidas, realizou-se os ensaios do DCCR, adicionando os eluentes de dessorção em cada ensaio conforme o delineamento. Realizou-se então duas separações magnéticas, a primeira foi logo após a agitação, deixando as soluções sob campo magnético durante 2 minutos, a fim de que este tempo de separação não influencie a cinética de dessorção do processo. Logo em seguida, a fim de se remover possíveis nanopartículas ainda em suspensão na solução, realizou-se uma segunda separação magnética com o tempo de 25 minutos. De acordo com estudos pilotos de dessorção realizados, a recuperação de HSA ocorre em baixas porcentagens, abaixo do limite de quantificação da curva analítica ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), diante disso foi necessária a adição de uma solução padrão de HSA para quantificação pelo método de Bradford. Desse modo, para as medidas da absorbância do eluato de dessorção resultante, mediu-se  $100 \mu\text{L}$  do eluato de cada ensaio e adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  de uma solução padrão de HSA  $50 \text{ mg L}^{-1}$  em pH igual ao da solução de dessorção do ensaio, a solução resultante foi quantificada pelo método de Bradford, já descrito anteriormente.

Para o cálculo da concentração de HSA recuperada baseado nas absorbâncias dos ensaios do DCCR, utilizou-se as curvas analíticas obtidas em cada pH de dessorção (4,5; 6,5 e 8,5), os pontos axiais correspondentes à variável pH (3,14 e 9,86) foram quantificados pelas curvas construídas em pH 3,5 e 8,5 respectivamente, com os devidos fatores de correção.

Após os testes de dessorção, promoveu-se então a reutilização das nanopartículas com uma nova adsorção de HSA, repetindo-se os mesmos procedimentos da primeira adsorção para obtenção dos eluatos dos ensaios. As concentrações de HSA no sobrenadante foram determinadas pelo método de Bradford, já descrito anteriormente. As respectivas porcentagens de adsorção foram obtidas de acordo com a expressão (57):

$$R_c = 100 \times \frac{c_{rec}}{c_o - c_e} \quad (62)$$

Em que  $R_c$  é a recuperação de HSA (%),  $c_o$ ,  $c_e$  e  $c_{rec}$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) são as concentrações inicial, de equilíbrio (após a adsorção) e de HSA recuperada, respectivamente. Os modelos obtidos e as condições ótimas foram análogas à otimização de adsorção já descritos acima.

#### 3.6.4.2 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS

Os estudos de otimização da dessorção de HSA e da reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS foram feitos seguindo o mesmo procedimento geral descrito nos estudos com as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS@BSA. Utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) com quatro repetições no ponto central, analisando-se as variáveis pH (4,98 – 10,02) e volume das soluções de dessorção (0,32 - 3,68 mL) e o tempo de agitação (4,77 – 55,22 min). As variáveis respostas analisadas foram a recuperação de HSA (%) para ambos os estudos de dessorção e reutilização.

Foram feitas curvas de calibração nos pHs de 6, 7,5 e 9, o padrão de HSA utilizado na adsorção foi de  $250 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 4,5 e os padrões adicionados para as leituras, que foram na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . As variáveis respostas analisadas também foram a recuperação de HSA (%) para ambos os estudos de dessorção e reutilização.

#### 3.6.5 Análises estatísticas

As curvas de calibração foram ajustadas com a função  $lm$ , e a qualidade do ajuste da curva foi avaliada por meio da análise das pressuposições básicas da análise de regressão (normalidade, independência e homogeneidade de variância dos resíduos do modelo) e pelo coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ). Para obtenção dos modelos de otimização, das superfícies e das curvas de nível foi utilizado o pacote *rsm* (LENTH, 2009), o qual contém todas as funções necessárias. Todas as funções e o pacote *rsm* citados estão disponíveis no Sistema Computacional R (R CORE TEAM, 2021).

Para avaliar as pressuposições básicas dos modelos de otimização e das curvas de calibração, os resíduos foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro e Wilk (1965), à independência pelo teste de Box e Pierce (1970) e

à homocedasticidade da variância pelo teste de Breusch e Pagan (1979). As pressuposições básicas também foram avaliadas por meio de análises gráficas das dispersões dos resíduos.

Os modelos de cinética e isotermas foram ajustados com programação direta dos modelos com a função *nls*, também disponível no Sistema Computacional R (R CORE TEAM, 2021). A seleção dos modelos foi realizada com base na análise das pressuposições básicas da análise de regressão, critérios de informações de Akaike corrigido (AICc), Bayesiano (BIC) e de Akaike (AIC), desvio padrão residual (RSD), métricas de ajuste apresentadas na Tabela 4 e na significância dos parâmetros do modelo. O AICc, o BIC e o AIC foram obtidos respectivamente pelas expressões:

$$\text{AICc} = -\log L(\hat{\theta}) + 2(p) + 2 \frac{p(p+1)}{n-p-1} \quad (63)$$

$$\text{BIC} = -\log f(x_n | \theta) + p \times \log(n) \quad (64)$$

$$\text{AIC} = -\log L(\hat{\theta}) + 2(p) \quad (65)$$

em que  $n$  e  $p$  são os números de ensaios experimentais e de parâmetros do modelo ajustado respectivamente,  $L(\hat{\theta})$  é a função de máxima verossimilhança do modelo,  $p$  é o número de parâmetros,  $n$  é o número de observações do experimento  $f(x_n|\theta)$  é o modelo estudado,  $x_n$  é a variável independente (tempo para os modelos de cinética ou concentração para as isotermas,  $\theta$  são os parâmetros). Considerando um modelo genérico  $y = f(x_n, \theta) + \varepsilon$ ,  $y$  é a variável de resposta,  $\varepsilon$  é o erro aleatório, em que  $\varepsilon \sim N(0, \sigma_e)$ , o desvio padrão residual é uma estimativa de  $\sigma_e$  que reflete a variabilidade de  $\varepsilon$ .

Tabela 4 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste utilizadas para seleção dos modelos de cinética e isoterma.

Sigla	Expressão	Nome
ARE	$\frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left  \frac{qe_{i.exp} - qe_{i.calc}}{qe_{i.exp}} \right $	Erro médio relativo
SSE	$\sum_{i=1}^n (qe_{i.calc} - qe_{i.exp})^2$	Soma de quadrado dos resíduos
HYBRID	$\frac{100}{n-p} \sum_{i=1}^n \left[ \frac{qe_{i.exp} - qe_{i.calc}}{qe_{i.exp}} \right]$	Erro fracionário híbrido
EABS	$\sum_{i=1}^n  qe_{i.exp} - qe_{i.calc} $	Soma de erros absolutos
MPSD	$100 \times \sqrt{\frac{1}{n-p} \sum_{i=1}^n \left[ \frac{qe_{i.exp} - qe_{i.calc}}{qe_{i.exp}} \right]^2}$	Desvio padrão percentual de Marquardt
SRE	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(qe_{i.exp} - qe_{i.calc}) - ARE]^2}{n-1}}$	Desvio padrão do erro relativo
$\chi^2$	$\sum_{i=1}^n \frac{(qe_{i.calc} - qe_{i.exp})^2}{qe_{i.exp}}$	Estatística de Qui-quadrado
Log-veros	$L(qe, \theta) = \prod_{i=1}^n f(qe_{i.exp}; \theta)$	Log-verossimilhança
$R^2$	$\left[ \frac{\sum_{i=1}^p (qe_{i.exp} - \overline{qe_{exp}})^2 - \sum_{i=1}^p (qe_{i.exp} - qe_{i.calc})^2}{\sum_{i=1}^n (qe_{i.exp} - \overline{qe_{exp}})^2} \right]$	Coeficiente de determinação múltipla
$R^2_{ajust}$	$1 - (1 - R^2) \left( \frac{n_p - 1}{n_p - p - 1} \right)$	Coeficiente de determinação ajustado

Fonte: Elaborado pelo autor (2023), baseada em Foo e Hameed (2010).

$qe_{i.exp}$ : cada observação experimental de  $qe$ ;  $qe_{i.calc}$ : valor teórico de  $qe$  previsto pelo modelo;

$n$ : número de observações (número de concentrações ou tempos);  $p$ : número de parâmetros;  $\theta$ : vetor de parâmetros do modelo.

Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando-se o nível de significância de 5%.

## 3.7 ANÁLISES DE AMOSTRAS DE SORO HUMANO

### 3.7.1 Quantificação de proteínas totais

Inicialmente centrifugou-se uma amostra de sangue a 3300 rpm por 4 minutos (duas etapas iguais). Em seguida, coletou-se o soro resultante e fez-se as diluições de estudo. Para as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , as diluições foram feitas em balões de 5 mL, considerando os fatores de diluição de aproximadamente 1087, 758, 373, 250 e 188 vezes, o volume dos balões foram então completados com água em pH ótimo de 3,5. Analogamente, para as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , os fatores de diluição foram de 758, 373, 250, 188 e 150 vezes, completando o volume com água em pH 4,5. Pelo fato de que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  possuem maior capacidade de adsorção, não se avaliou a diluição de 1087 vezes, mas incluiu-se a de 150 vezes.

Adicionou-se 1 mL de cada padrão de soro das diferentes diluições nos tubos (em triplicata) contendo 15 mg de nanopartícula. A suspensão foi mantida em um agitador de tubos a uma velocidade de no mínimo 600 rpm por 30 minutos para promover a adsorção das proteínas presentes no soro. Em seguida, os tubos foram submetidos à duas extrações magnéticas de 10 minutos cada para separação das nanopartículas da suspensão e obtenção do sobrenadante. As proteínas totais do sobrenadante foram então quantificadas pelo método de Bradford. Tal procedimento foi feito para ambas as nanopartículas.

Quantificou-se também as proteínas totais dos padrões de soro de diferentes diluições pelo método de Bradford, para avaliar a quantidade de proteínas adsorvidas após a adsorção pelas nanopartículas. Para o cálculo aproximado das concentrações de proteínas totais foram utilizadas as curvas de calibração de HSA obtidas nos pHs ótimos de 3,5 e 4,5 respectivamente para as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

### 3.7.2 Corridas de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS)

Inicialmente foram preparadas as soluções necessárias à eletroforese, as quais foram 1 L de eletrólito (tampão de corrida), adicionando-se 3,0 g de tris base, 14,8 g de glicina e 1,0 g de SDS e completando volume com água destilada para 1 L. Em

seguida, preparou-se 500 mL da solução corante adicionando-se 1,25 g de *Cromassie Blue R 250*, 227 mL de metanol, 46 mL de ácido acético e completando volume para 500 mL. Posteriormente preparou-se 1 L de solução descorante, misturando-se 430 mL de metanol e 70 mL de ácido acético completando volume para 1 L. Por último foi preparado o tampão de ruptura das amostras, adicionando-se 3,5 mL de água ultrapura (*MILI-Q*), 1,0 mL de tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de tris-HCl pH 6,8; 0,8 mL de glicerol, 1,6 mL de uma solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) 10%, 0,4 mL de 2-mercaptoetanol e 0,4 mL de azul de bromofenol 1% (m/v).

Obtidas as soluções necessárias, o próximo passo foi realizar o preparo de amostras para eletroforese. O procedimento consiste em transferir para um tubo *Eppendorf* com a tampa furada, 150  $\mu\text{L}$  de amostra e 50  $\mu\text{L}$  de tampão de ruptura, mantendo-se o tubo em água fervente (mínimo de  $80^\circ \text{C}$ ) durante 2 minutos. A amostra depois de preparada é então transferida para outro *ependorf*, podendo ser utilizada no momento ou armazenada na geladeira por até dois dias.

O último estágio é o preparo do gel de acrilamida/bis-acrilamida. O gel de eletroforese SDS utilizado é formado por duas regiões, a primeira um gel de concentração de 4% e a segunda por um de separação 12%. O gel de separação foi preparado do seguinte modo: inicialmente adicionou-se em um béquer 4,0 mL de uma solução de acrilamida/bisacrilamida (30/2,67 %), 3,350 mL de água destilada, 2,500 mL de uma solução tampão  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  de tris-HCl 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. A solução resultante foi adicionada nas placas de vidro e logo em seguida adicionou-se n-butanol sobre a superfície da solução para homogeneização da superfície. O sistema resultante foi mantido em repouso durante 20 minutos até a completa polimerização do gel. Decorrido o tempo, o n-butanol foi lavado com água destilada e a região entre as placas de vidro foi seca com papel filtro.

Posteriormente, foi preparado o gel de concentração acima da superfície do gel de separação, para isso foram adicionados 0,667mL de uma solução de acrilamida/bisacrilamida (30/2,67 %), 3,050 mL de água destilada, 1,250 mL de uma solução tampão  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de tris-HCl 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. Em seguida foi colocado o pente de fossos no gel e o sistema também foi mantido em repouso durante 20 minutos até a completa polimerização.

Obtido o gel final, retirou-se o pente e adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de cada amostra em cada um dos respectivos fossos e 20  $\mu\text{L}$  dos marcadores de corrida e peso. Montou-se então o sistema, adicionou-se a solução de eletrólito e realizou-se a corrida a uma voltagem constante de 150 V. Na próxima etapa o gel foi separado das placas de vidro e transferido para um recipiente contendo a solução corante, sendo mantido em agitação manual por 10 minutos. Em seguida o gel foi lavado com água destilada e deixado mergulhado na solução descorante durante 24 horas. Em todos os géis de eletroforese pelo menos uma banda na corrida referia-se a uma solução padrão de HSA, cuja concentração calculada posteriormente foi utilizada no cálculo de fatores de correção para minimizar variações experimentais nos resultados decorrentes de variações inter dia em relação às curvas de calibração.

Terminado todo o processo, o gel foi então 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). A variável resposta selecionada para análises foi o volume ajustado. O volume corresponde à soma de todas as intensidades dentro dos limites da banda e o volume ajustado é o volume corrigido pelo *background* da banda.

### 3.7.3 Diluições do soro

A fim de definir-se a diluição do soro mais adequada para os estudos de eletroforese, realizou-se um teste de triagem avaliando-se uma corrida de eletroforese de seis diferentes diluições de soro, as quais consistiram de 758, 373, 250, 188, 150 e 5 vezes. As bandas das proteínas de soro no gel obtido foram avaliadas visualmente quanto à intensidade, e foi escolhida a diluição que apresentou a intensidade das bandas entre média e alta.

### 3.7.4 Curvas de calibração

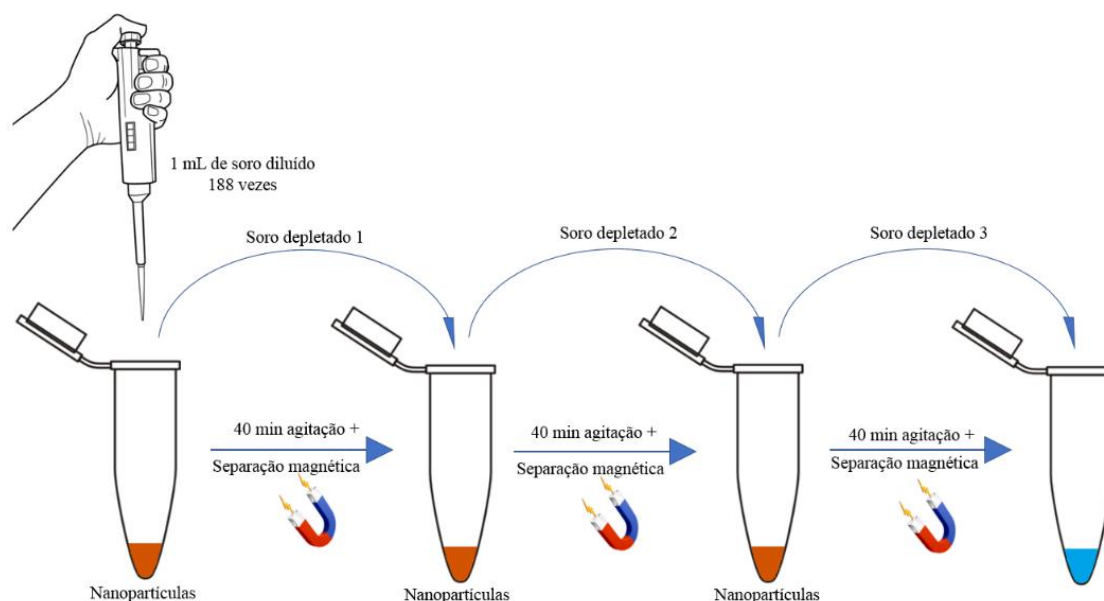
Obteve-se uma curva de calibração em duplicata (duas curvas em géis diferentes) para cálculo das concentrações de HSA na eletroforese a partir do volume ajustado obtido com o *Image Lab*. Para isso, avaliou-se os calibradores nas concentrações de HSA de 0, 40, 70, 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg L}^{-1}$ . Como a eletroforese independe do pH, a mesma curva foi utilizada tanto para os estudos da

depleção e dessorção das proteínas com ambas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

### 3.7.5 Depleções múltiplas

A fim de avaliar-se o efeito da massa de nanopartículas na depleção de HSA de soro e comparar os resultados obtidos com os da otimização da adsorção de HSA solubilizada em água, realizou-se um estudo de diferentes depleções de HSA consecutivas com 20 mg de nanopartículas em soro diluído. Para as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , o soro foi diluído 188 vezes com água em pH de 3,5 e para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , 188 vezes com água em pH 4,5. Avaliou-se o efeito da depleção em 1, 2 e 3 etapas (duplicata) com 20 mg de nanopartícula. O procedimento experimental representado na Figura 6, foi análogo para ambas as nanopartículas.

Figura 6 - Esquematização das depleções consecutivas.



Fonte: Autor (2023).

Para a primeira depleção, adicionou-se 1 mL de soro diluído em 6 tubos de ensaio contendo 20 mg de nanopartículas em cada um e agitou-os durante 40 minutos a 500 rpm a 25°C, separando-os com o ímã logo seguida. Obteve-se assim o soro depletado 1 (tubos 1 e 2, duplicatas). Os sobrenadantes de depleção restantes (tubos 3 – 6, duplicatas) foram transferidos para outros tubos contendo 20 mg de

nanopartículas e todo processo de agitação e separação foi repetido, nessa etapa foi obtido o soro depletado 2 (tubos 3 e 4). Em seguida, repetiu-se todo o processo para os tubos 5 e 6 (duplicatas) obtendo-se o soro depletado 3.

### 3.7.6 Dessorção

Nos experimentos de otimização da dessorção de HSA realizados anteriormente não foi possível utilizar o NaCl por ele ser um interferente do reagente de Bradford, mas como há na literatura vários relatos de sua ação como auxiliar na dessorção (NICOLÁS; FERREIRA; LASSALLE, 2019; SANTOS *et al.*, 2021; ALMEIDA NETO; VIEIRA; DA SILVA, 2014), decidiu-se avaliar seu efeito na dessorção da HSA de soro das nanopartículas na eletroforese.

Para isso, inicialmente promoveu-se a depleção de HSA adicionando-se 1 mL de soro diluído 188 vezes (pH 3,5) em 6 tubos contendo 70 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, agitando-os durante 40 minutos a 500 rpm. Em seguida, realizou-se duas extrações magnéticas de 10 minutos cada. Posteriormente, aos tubos contendo as nanopartículas, adicionou-se as soluções de dessorção do seguinte modo:

- a) Tubos 1 e 2: 0,5 mL de água em pH 9,2;
- b) Tubos 3 e 4: 0,5 mL de uma solução de NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 9,2;
- c) Tubos 5 e 6: 0,5 mL de uma solução de NaCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> pH 9,2.

Em seguida agitou-se os tubos durante 40 minutos a 500 rpm e realizou-se a separação magnética. Obtidos então os eluatos de dessorção, realizou-se então o processo de ruptura das amostras, conforme já descrito.

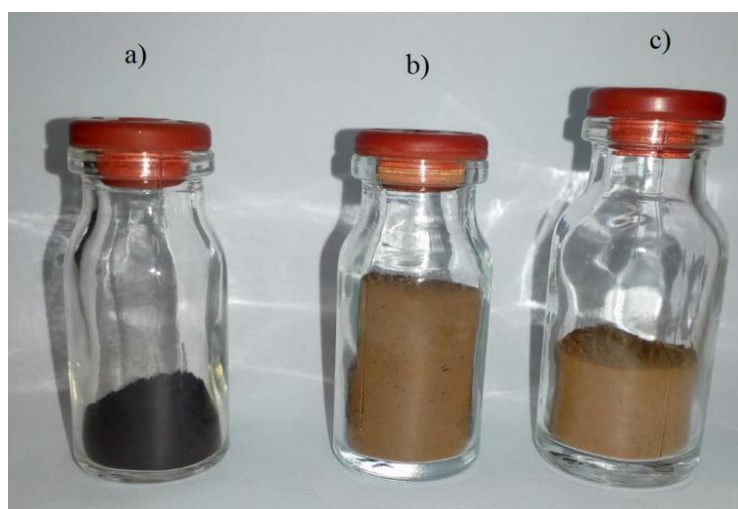
Para as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, seguiu-se os mesmos procedimentos, as únicas diferenças foram o pH do soro diluído (pH 4,5), a massa de nanopartículas nos tubos (50 mg) e o pH das soluções de dessorção (pH 8,3).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (FIGURA 7 - a) foram obtidas com massa próxima a 3g de acordo com o protocolo utilizado, apresentando coloração negra após a secagem. As MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS, (FIGURA 7 - b), foram obtidas com massa média em torno de 3g, apresentando coloração amarronzada depois de secas. Já as MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS@BSA, (FIGURA 7 - c) apresentaram massa em torno de 2g, com coloração amarronzada levemente mais claras que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS.

Figura 7 - Nanopartículas obtidas em cada etapa.



Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

b) MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS

c) MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS@BSA

NOTA: As quantidades dos frascos não representam o produto de uma síntese ou revestimento, tratam-se de ilustrações de quantidades em estoque.

É importante ressaltar que os rendimentos foram menores que o esperado, uma vez que durante o processo de lavagem após os revestimentos com TEOS e com BSA, notou-se a presença de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  não revestida pela forte coloração escura. Para retirada deste material, baseou-se em sua maior magnetização e densidade, de modo que as partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se sedimentem mais rápido que sob ação do campo magnético. Aproveitando-se disso, realizou-se sucessivas de adições de água deionizada, agitação e magnetização seguida de rápida separação da dispersão de

$\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS ou  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS@BSA para outro béquer, reiniciando todo o procedimento em seguida. Durante essa etapa de separação, pequenas quantidades de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  revestidas eram perdidas ao se sedimentar junto com as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  não revestidas. Embora haja uma redução na quantidade de nanopartículas obtidas, há uma maior pureza do material resultante.

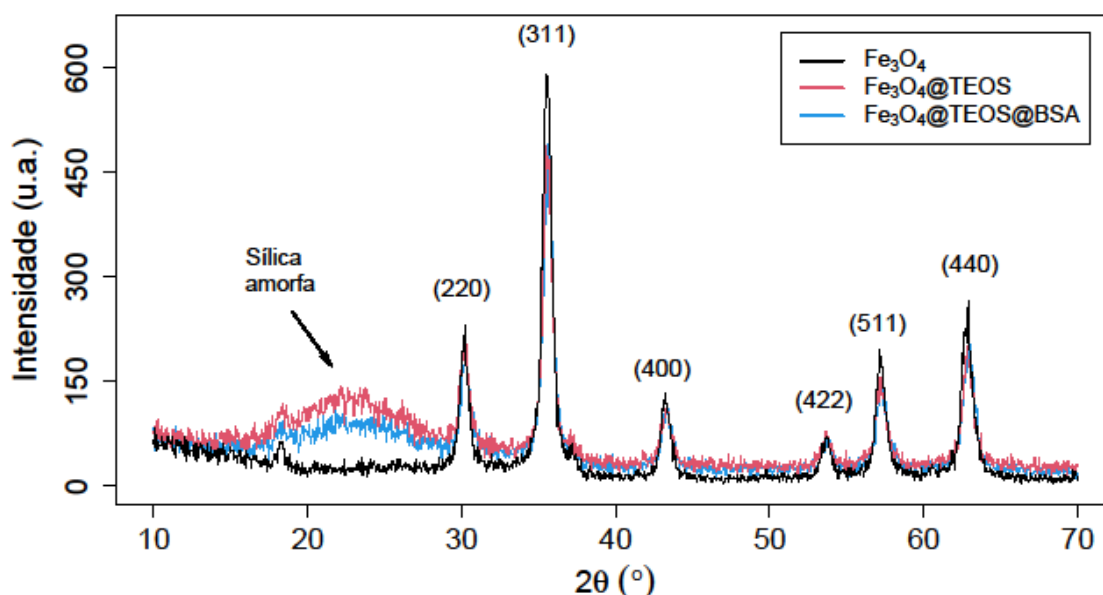
## 4.2 CARACTERIZAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS

As MNPs sintetizadas e revestidas foram caracterizadas pelas técnicas de difratometria de raios-X (DRX), análises termogravimétricas (ATG), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) e potencial zeta, cujos resultados são apresentados nas seções a seguir.

### 4.2.1 Difratomia de Raios-X (DRX)

Os resultados das análises de DRX são apresentados no Gráfico 1:

Gráfico 1- Padrões de difração de DRX das MNPs estudadas.



Fonte: Autor (2023).

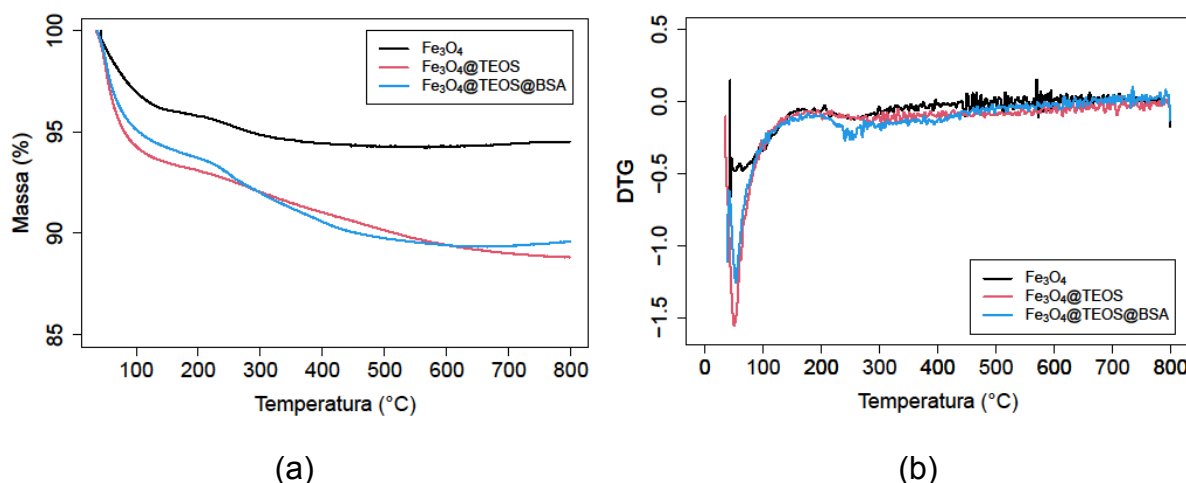
Os difratogramas apresentados no Gráfico 1 confirmam as modificações na superfície das nanopartículas bem como sua integridade cristalina após os

revestimentos. As  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentaram picos de difração com  $2\theta$  a  $30^\circ$ ,  $35,5^\circ$ ,  $43^\circ$ ,  $53,5^\circ$ ,  $57^\circ$  e  $63^\circ$ , o que corresponde aos planos de cristal de (220), (311), (400), (422), (611) e (440), respectivamente. Isso é indicativo de uma estrutura de espinel cúbico da magnetita. O mesmo conjunto de picos característicos também foi observado para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$ , indicando a estabilidade da fase cristalina das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  durante os revestimentos com TEOS e com BSA. Nota-se uma pequena diminuição da intensidade dos picos após os revestimentos com TEOS e BSA e também uma diminuição de intensidade do sinal da sílica amorfa após o revestimento com BSA. Padrões de DRX semelhantes de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram encontrados por Loh *et al.* (2008), Wang *et al.* (2010), Liu *et al.* (2015), Wanjeri *et al.* (2018) e Chen *et al.* (2020).

#### 4.2.2 Análise termogravimétrica

Os resultados das análises termogravimétricas são apresentados no Gráfico 2:

Gráfico 2 - Análise termogravimétrica das nanopartículas: Termogravimetria (TG)  
Termogravimetria derivada (DTG).



Fonte: Autor (2023).

Legenda: (a) Termogravimetria (TG)

(b) Termogravimetria derivada (DTG).

A análise do Gráfico 2 (a) e (b) demonstra a efetividade dos revestimentos com TEOS e BSA tendo em vista as diferenças nas curvas de perda de massa das respectivas nanopartículas, percebe-se também a alta estabilidade térmica das mesmas, devido à mínima perda de massa ao longo do aumento de temperatura. Na

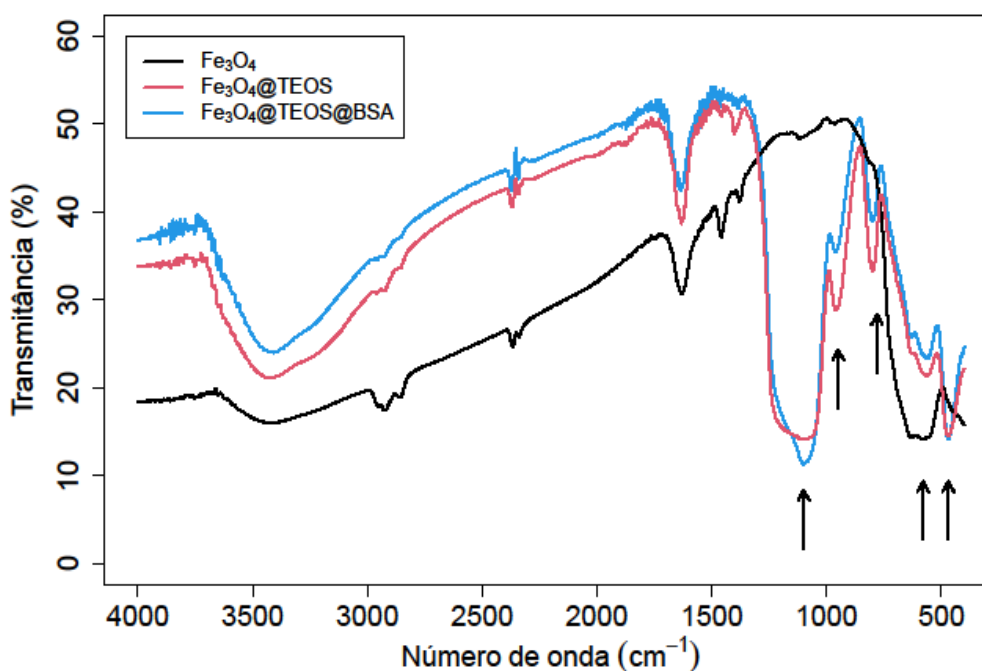
Figura 9 é demonstrada a perda de massa característica das MNPs, para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , por se tratar de um material inorgânico, a perda de massa, em torno de 5%, é atribuída a eliminação de água das amostras por volta de  $80^\circ\text{C}$ , o que fica mais nítido no pico apresentado na Figura 9 (b). Após a primeira perda de massa devido a água adsorvida na superfície do material, a segunda perda de massa que ocorre entre 200 e  $320^\circ\text{C}$ , mais especificamente em  $270^\circ\text{C}$ , é atribuída à conversão de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) em  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemita), e por volta de  $320^\circ\text{C}$  a  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  passa a  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , que é a conversão da maghemita em hematita, alterando a estrutura cristalina e as propriedades magnéticas do material.

As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  apresentaram um perfil de perda de massa bastante semelhante, em que essa perda foi inferior a 13%. A camada de BSA formou um filme muito fino nas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , o que justifica as diferenças inexpressivas na perda de massas das nanopartículas. Além da perda de água mencionada, os recobrimentos com TEOS e BSA também demonstram perdas provenientes da condensação de grupamentos hidroxilas presentes nas suas superfícies, degradação de grupamentos etóxidos do revestimento com TEOS e da decomposição da camada de BSA propriamente dita, sendo essa última mais nítida pelo pequeno pico em azul, o qual se inicia em torno de  $210^\circ\text{C}$  na DTG Figura 9 (b), resultado semelhante foi observado em Li *et al.* (2013b). A elevada estabilidade térmica das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  é reportada em Liu *et al.* (2015) e as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  em Santos *et al.* (2021).

#### 4.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR das MNPs são apresentados no Gráfico 3:

Gráfico 3 - Espectro de Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das nanopartículas.



Fonte: Autor (2023).

Os espectros apresentados no Gráfico 3 confirmam as modificações na superfície das nanopartículas bem como sua integridade após os revestimentos. A banda característica da vibração de estiramento da ligação Fe-O, localizado em torno de  $580\text{ cm}^{-1}$ , foi encontrado nas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e nas demais, o que mostra a integridade das nanopartículas após as etapas de revestimento. As bandas situadas em aproximadamente  $790$ ,  $950$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas respectivamente ao estiramento simétrico da ligação Si-O e estiramentos assimétricos de Si-OH e Si-O-Si, o que mostra que a superfície das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi revestida com TEOS, essas bandas estão presentes nas MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$ , confirmando a integridade da camada de sílica após o revestimento com BSA. Resultados semelhantes foram obtidos por Shahabadi *et al.* (2016).

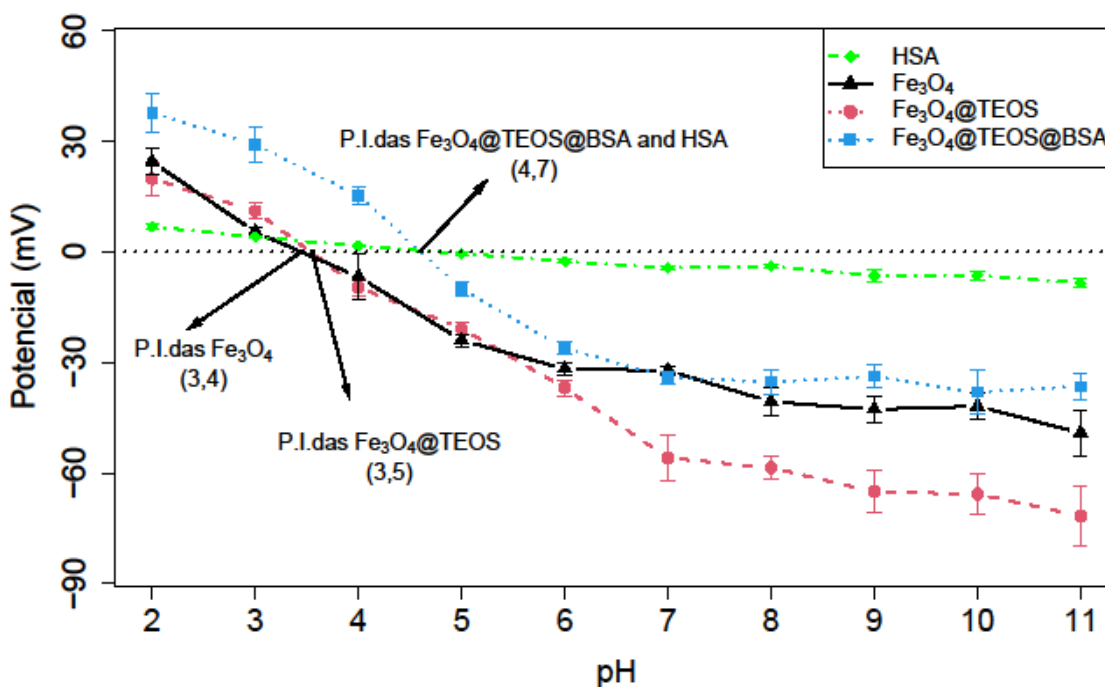
A ausência de bandas em  $1550$  e  $1250\text{ cm}^{-1}$  nas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$ , os quais correspondem às amidas II e III, pode ser explicada pela alta densidade de grupos químicos na superfície devido aos grupamentos originários do TEOS (SANTOS *et al.*, 2021). A fina camada de recobrimento com BSA apresenta uma quantidade de BSA muito pequena que provavelmente foi insuficiente para apresentar bandas que sejam mais nítidas que os ruídos dos espectros.

Observou-se que a banda característica da vibração de estiramento da ligação Fe-O sofreu um deslocamento, situando-se em aproximadamente 480 nm, indicando que o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi influenciada pelo revestimento de sílica devido à possível formação de ligação Fe-O-Si, o que também foi observado por Liu *et al.* (2015) e Wanjeri *et al.* (2018). As bandas localizadas em 3432 e 1630  $\text{cm}^{-1}$  são características de estiramento vibracional de -OH, provavelmente devido à existência de hidroxilas e  $\text{H}_2\text{O}$  na superfície das nanopartículas (WANJERI *et al.*, 2018).

#### 4.2.4 Potencial zeta

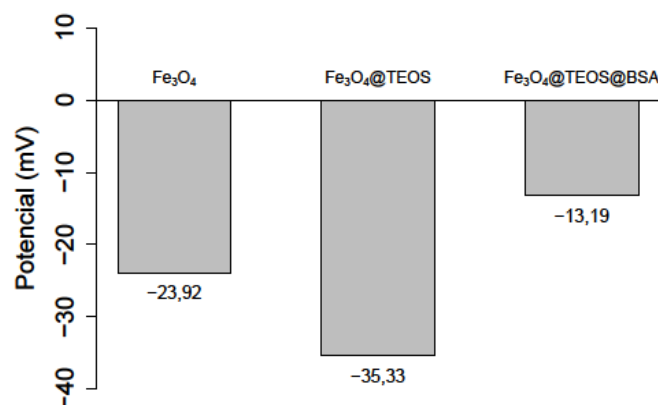
As medidas de potencial zeta foram realizadas para se determinar a carga superficial das nanopartículas e da HSA. No Gráfico 4 e no Gráfico 5 são apresentados respectivamente o perfil das curvas de potencial e o potencial zeta médio das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS e das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS@BSA:

Gráfico 4 - Potencial zeta e ponto isoelétrico das nanopartículas e da HSA.



Fonte: Autor (2023).

Gráfico 5 - Potencial zeta médio das nanopartículas magnéticas.

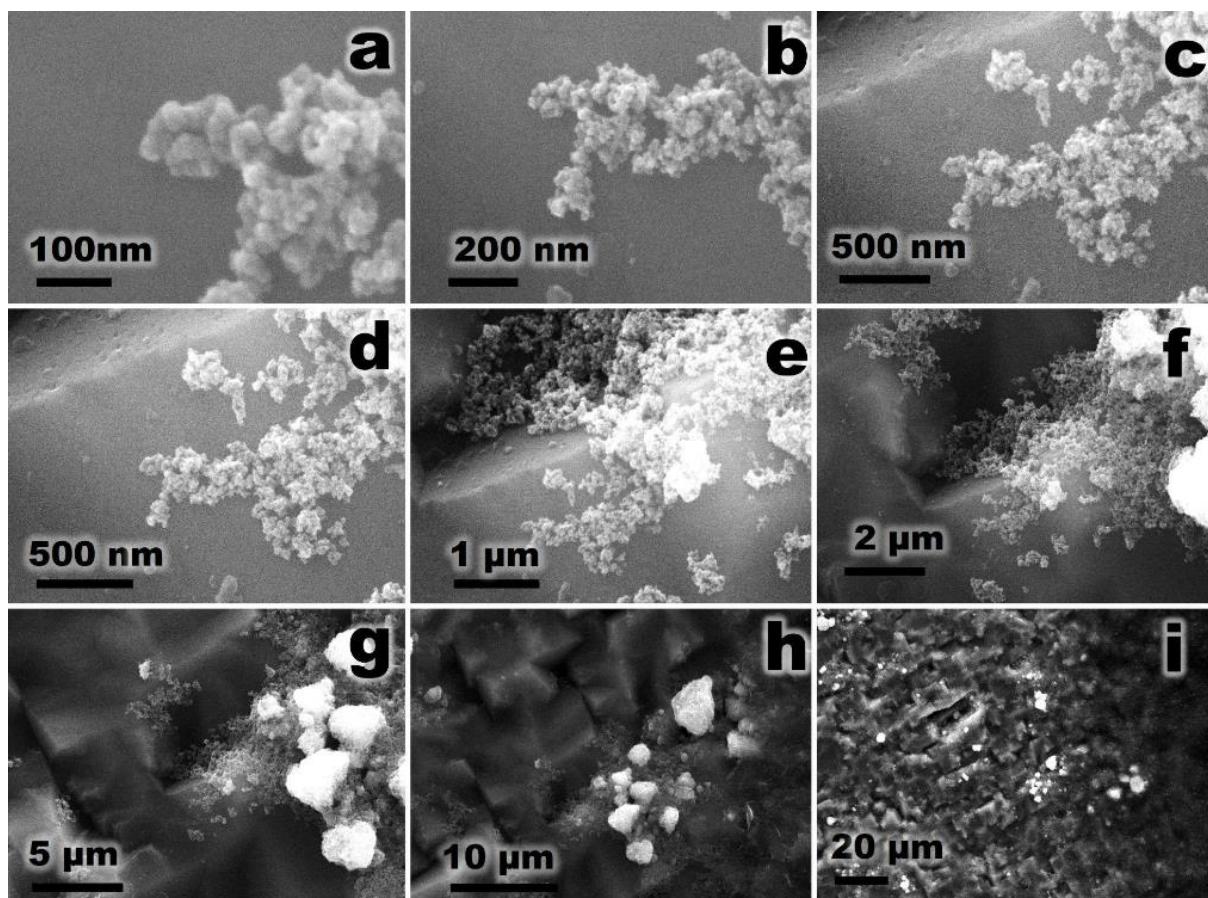


Fonte: Autor (2023).

A forma de representação do potencial zeta médio no Gráfico 5 foi baseada em Wanjeri *et al.* (2018). O Gráfico 4 evidencia que o revestimento foi efetivo, uma vez que cada nanopartícula apresentou uma curva de potencial com um perfil diferente, assim como diferentes valores do ponto isoelétrico (PI). As nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apresentaram uma variação de potencial de -73,55 mV ao longo da faixa estudada (GRÁFICO 4), sendo o potencial médio de -23,92 mV (GRÁFICO 5). O ponto isoelétrico encontrado foi o pH de 3,5. As nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS apresentaram uma variação de potencial de -91,42 mV ao longo da faixa (GRÁFICO 4), sendo o potencial médio de -35,33 mV (GRÁFICO 5). O ponto isoelétrico obtido foi o pH de 3,5. As diferenças nos valores destes parâmetros, quando comparados aos das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> demonstram que o revestimento com TEOS foi efetivo. Para as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, a variação de potencial foi de -75,78 mV (GRÁFICO 4) e o potencial médio de -13,18 mV (GRÁFICO 5). As diferenças nos valores destes parâmetros, quando comparados aos das MNPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS demonstram que o revestimento com BSA foi obtido. O PI encontrado foi o pH de 4,7, o qual corresponde também ao PI da BSA pura, sendo outro indício quanto a efetividade do recobrimento com a BSA.

#### 4.2.5 Microscopias eletrônicas de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para examinar o tamanho e a morfologia das de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

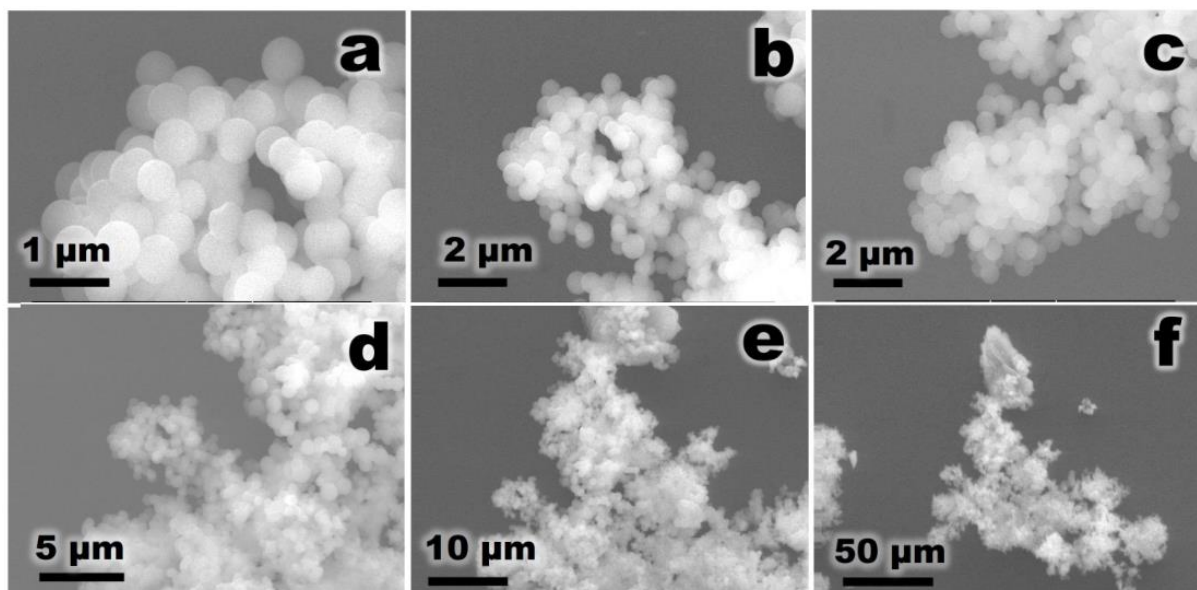
Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Fonte: Autor (2023).

a-i) Diferentes ampliações de imagem mostrando que as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> são menores a 50 nm.

A análise MEV das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apresentadas na Figura 8 mostrou que as nanopartículas são menores que 50 nm e essas partículas aglomeram-se formando clusters maiores que 1 µm. O tamanho de partícula do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> não pode ser determinado com precisão em todas as imagens, mas o tamanho menor que 50 nm corresponde aos tamanhos obtidos por outros autores usando a mesma metodologia (SALVIANO *et al.*, 2018; VALENZUELA *et al.*, 2009).

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

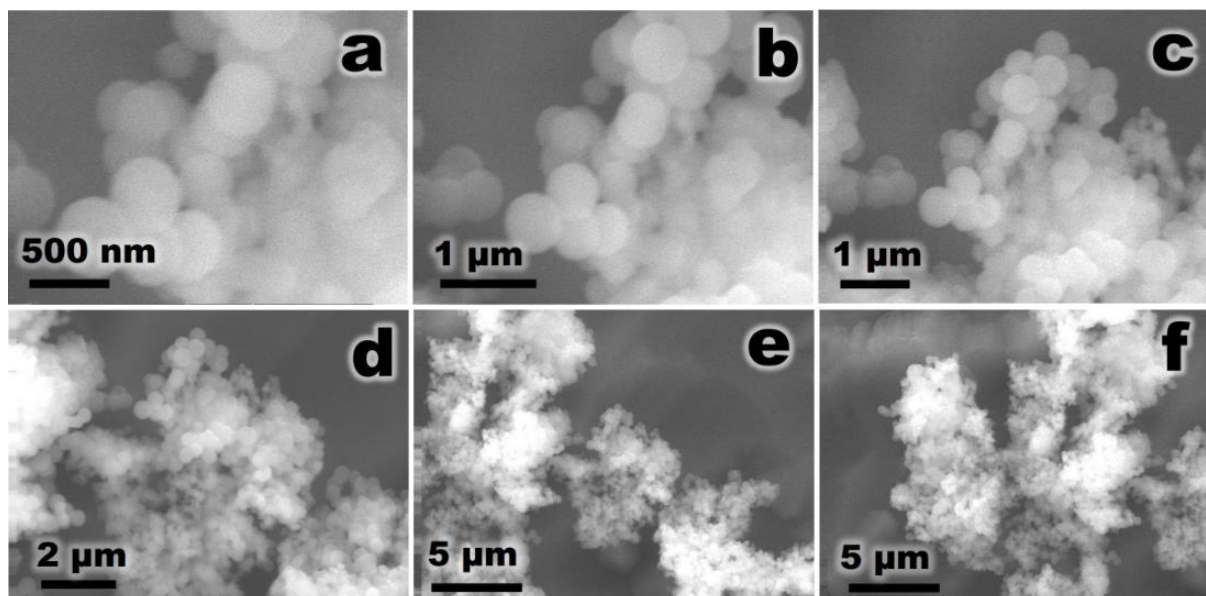


Fonte: Autor (2023).

a-f) Diferentes ampliações de imagem das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

A análise MEV das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  (FIGURA 9) mostrou partículas possuem formato esférico uniforme, monodispersas e com tamanho médio de  $695 \pm 229$  nm. O revestimento das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com TEOS promoveu a formação de “núcleo-casca” das partículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  e protegeu as nanopartículas de possível aglomeração e crescimento como ocorreu nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  puras. As  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  são muito homogêneas, com uma faixa de distribuição de tamanho estreita.

Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .



Fonte: Autor (2023).

a-f) Diferentes ampliações de imagem das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

As partículas foram encapsuladas com BSA resultando nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  (FIGURA 10). A camada de BSA formou um filme fino nas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , portanto não foram observadas alterações expressivas nos tamanhos e formatos das partículas, o que é condizente com os resultados das análises de termogravimetria (TG) e infravermelho (FT-IR) de ambas as nanopartículas discutidas anteriormente.

#### 4.3 ESTUDOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO

Após as caracterizações de algumas propriedades das MNPs, prosseguiu-se então para os estudos de adsorção, em que inicialmente avaliou-se a interação da HSA com as MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  sob diferentes pHs a fim de se avaliar em qual pH há maior adsorção. Após essa avaliação inicial, definiu-se qual a nanopartícula mais adequada e a faixa de pH em que ocorre maior adsorção de HSA. Em seguida, estas informações foram utilizadas nos estudos de triagem das principais variáveis que influenciam no processo de adsorção (pH, massa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e concentração de HSA) para definir quais as condições dos experimentos de cinética e isotermas de adsorção.

### 4.3.1 Estudos de otimização da adsorção de HSA

Antes de se apresentar os estudos de otimização da adsorção propriamente ditos, apresentar-se-ão as principais informações relacionadas às curvas de calibração de HSA em diferentes pHs, as quais foram utilizadas na obtenção das concentrações de HSA nos delineamentos de otimização. Inicialmente avaliou-se a precisão das absorbâncias dos calibradores das curvas pela análise dos coeficientes de variação associados, sendo os resultados apresentados na Tabela 5:

Tabela 5 - Coeficientes de variação (%) dos calibradores das curvas de HSA conforme o pH.

Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Coeficientes de variação		
	pH 3,7	pH 4,7	pH 5,7
0	..	..	..
25	10,27	13,7	7,15
50	7,39	21,80	2,68
75	2,44	9,44	7,39
100	1,77	3,66	2,68
125	3,73	0,57	4,28
150	2,61	1,11	6,79
175	0,15	1,70	0,48
200	1,28	3,52	4,83
230	1,32	3,45	1,46
260	3,04	3,58	0,47

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar na Tabela 5, as absorbâncias dos calibradores apresentaram pequenos valores dos respectivos coeficientes de variação, sendo que todos os valores foram menores de 20%. A única exceção ocorreu para o calibrador de 50 mg L<sup>-1</sup> do pH 4,7, para o qual o coeficiente foi de 21,80%, mas como este calibrador tem concentração maior que o limite de quantificação da curva, então provavelmente essa medida está associada a erros experimentais, os quais não

interferem no ajuste da curva e nem comprometem as pressuposições da análise de regressão, conforme será apresentado posteriormente.

Com os dados dos calibradores e suas respectivas absorvâncias, ajustou-se curvas de calibração de primeiro e segundo grau. As curvas de primeiro grau apresentaram diversas violações na análise de resíduos, principalmente casos de heterocedasticidade dos resíduos. Desse modo, foi necessária a utilização dos modelos de segundo grau. Na Tabela 6, apresenta-se as estimativas dos parâmetros das curvas em cada pH, o desvio padrão, a estatística-t e o valor-p associados aos parâmetros do modelo, a análise de significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) bem como o coeficiente de determinação múltipla.

Tabela 6 - Informações das curvas de calibração de HSA obtidas em diferentes pHs: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) e coeficiente de determinação múltipla (R<sup>2</sup>).

pH	Par	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p	Valor-p <sub>m</sub>	R <sup>2</sup> (%)
3,7	β <sub>0</sub>	0,0063	0,0080	0,7817	0,4569		
	β <sub>1</sub>	0,0026	0,0001	17,8299	<0,0001	<0,0001	99,62
	β <sub>2</sub>	-0,0003x10 <sup>-2</sup>	0,0001x10 <sup>-2</sup>	-5,4725	0,0006		
4,7	β <sub>0</sub>	-0,0005	0,0047	-0,0995	0,9232		
	β <sub>1</sub>	0,0026	0,0001	30,8268	<0,0001	<0,0001	99,86
	β <sub>2</sub>	-0,0003x10 <sup>-2</sup>	0,0003x10 <sup>-3</sup>	-10,4373	<0,0001		
5,7	β <sub>0</sub>	0,0139	0,0089	1,5593	0,1575		
	β <sub>1</sub>	0,0024	0,0002	15,2429	<0,0001	<0,0001	99,53
	β <sub>2</sub>	-0,0002x10 <sup>-2</sup>	0,0001x10 <sup>-2</sup>	-4,1181	0,0034		

Fonte: Autor (2023).

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

As curvas de primeiro grau têm a forma  $y = \beta_0 + \beta_1x$ , e as de segundo  $y = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2$ , em que y é a absorvância, x é a concentração de HSA (mg L<sup>-1</sup>), β<sub>0</sub> é o intercepto; β<sub>1</sub> é o coeficiente de primeiro grau e β<sub>2</sub> é o coeficiente de segundo grau.

Ao que se pode observar da Tabela 6, nenhum dos interceptos das curvas de calibração foi significativo, o que indica que o branco não apresentou absorvância em nenhum dos pHs estudados. As estimativas dos parâmetros β<sub>2</sub> foram estatisticamente significativas (p < 0,05). É importante frisar que as estimativas dos parâmetros dos modelos de otimização obtidas se utilizando curvas polinomiais quadráticas apresentaram maiores precisões quando comparadas àquelas obtidas com modelos

de primeiro grau. Por não ser objeto de estudo nesse momento, as estimativas obtidas com as curvas de primeiro grau não serão apresentadas. Ao analisar-se os parâmetros  $\beta_1$ , observa-se que todas as estimativas foram significativas ( $p < 0,05$ ) e bastante próximas entre si ( $\sim 0,0026$ ), resultados semelhantes aos parâmetros  $\beta_2$ . Diante disso, pode-se dizer que o pH não influenciou nas medidas de absorvâncias obtidas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Na Tabela 7 apresenta-se a análise das pressuposições da regressão:

Tabela 7 - Análise de resíduos (pressuposições) das curvas de HSA em diferentes pHs.

<b>pH</b>	<b>Teste de Shapiro-Wilk</b>	<b>Teste de Box-Pearse</b>	<b>Teste de Breusch-Pagan</b>
3,7	0,8510	0,1962	0,0646
4,7	0,7649	0,8156	0,2795
5,7	0,5989	0,7648	0,4426

Fonte: Autor (2023).

De acordo com a Tabela 7, nenhuma das curvas de calibração apresentou violações de pressuposições, o que indica que elas estão adequadas para serem utilizadas na quantificação da HSA nos delineamentos de otimização de adsorção.

Obtidas as curvas, realizou-se os delineamentos compostos centrais para otimização da adsorção de HSA nas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS e de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS@BSA. As informações do planejamento experimental e as respostas obtidas (porcentagem de adsorção) são apresentadas a seguir na Tabela 8:

Tabela 8 - Planejamento experimental para o estudo da adsorção de HSA nas nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS e de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

n	pH	cod	m. (mg)	cod	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )	cod	Ads <sub>TEOS</sub> (%)	Ads <sub>BSA</sub> (%)
1	3,70	-1,00	10,00	-1,00	90,00	-1,00	88,95	61,19
2	5,70	1,00	10,00	-1,00	90,00	-1,00	75,56	33,61
3	3,70	-1,00	20,00	1,00	90,00	-1,00	100,00	66,56
4	5,70	1,00	20,00	1,00	90,00	-1,00	81,69	32,83
5	3,70	-1,00	10,00	-1,00	210,00	1,00	50,73	38,82
6	5,70	1,00	10,00	-1,00	210,00	1,00	40,26	23,59
7	3,70	-1,00	20,00	1,00	210,00	1,00	75,93	39,21
8	5,70	1,00	20,00	1,00	210,00	1,00	59,96	27,02
9	3,02	-1,68	15,00	0,00	150,00	0,00	35,17	54,57
10	6,38	1,68	15,00	0,00	150,00	0,00	47,72	13,21
11	4,70	0,00	6,59	-1,68	150,00	0,00	54,80	33,89
12	4,70	0,00	23,41	1,68	150,00	0,00	79,80	41,35
13	4,70	0,00	15,00	0,00	49,09	-1,68	100,00	71,4
14	4,70	0,00	15,00	0,00	250,91	1,68	61,28	26,07
15	4,70	0,00	15,00	0,00	150,00	0,00	72,75	39,34
16	4,70	0,00	15,00	0,00	150,00	0,00	75,12	37,09
17	4,70	0,00	15,00	0,00	150,00	0,00	78,06	33,08

Fonte: Autor (2023).

Ads<sub>TEOS</sub>.: porcentagem de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS; Ads<sub>BSA</sub>.: (idem) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA; cod.: valor codificado.; conc.: concentração de HSA; m.: massa;

Com os dados da Tabela 8 obteve-se os modelos de otimização da adsorção de HSA nas respectivas nanopartículas. As informações e os resultados detalhados para cada nanopartícula são apresentados nas seções a seguir.

#### 4.3.1.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA

Inicialmente ajustou-se o modelo geral, o qual contém todos os coeficientes de primeiro e segundo grau e todas as interações entre as variáveis (fatores) do estudo. As informações da análise de variância do modelo geral são apresentadas a seguir na Tabela 9:

Tabela 9 - Análise de variância do modelo geral de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	9	3756,25	417,36	22,05	0,0002***
x <sub>1</sub>	1	1834,57	1834,57	96,94	<0,0001***
x <sub>2</sub>	1	32,16	32,16	1,70	0,2336
x <sub>3</sub>	1	1471,59	1471,59	77,76	<0,0001***
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	51,71	51,71	2,73	0,1423
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	9,45	9,45	0,50	0,5026
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	211,98	211,98	11,20	0,0123*
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	1,21	1,21	0,06	0,8079
x <sub>1</sub> :x <sub>3</sub>	1	143,52	143,52	7,58	0,0284*
x <sub>2</sub> :x <sub>3</sub>	1	0,07	0,07	3,8x10 <sup>-3</sup>	0,9524
Resíduos	7	132,48	18,93		
Falta de ajuste	5	112,40	22,48	2,24	0,3370
Erro puro	2	20,08	10,04		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: massa de nanopartículas; x<sub>3</sub>: concentração de HSA; gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

Como alguns coeficientes do modelo foram não significativos, reajustou-se vários modelos retirando-se estes termos e recalculando os coeficientes restantes. As informações da análise de variância do modelo ótimo e a análise das pressuposições básicas são apresentadas nas Tabelas 10 e 11 respectivamente:

Tabela 10 - Informações da análise de variância do modelo reduzido de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	5	3739,99	748,00	55,32	<0,0001***
x <sub>1</sub>	1	1834,57	1834,57	135,67	<0,0001***
x <sub>2</sub>	1	32,16	32,16	2,38	0,1513
x <sub>3</sub>	1	1471,59	1471,59	108,83	<0,0001***
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	258,16	258,16	19,09	0,0011**
x <sub>1</sub> :x <sub>3</sub>	1	143,52	143,52	10,61	0,0076**
Resíduos	11	148,74	13,52		
Falta de ajuste	9	128,66	14,30	1,42	0,4794
Erro puro	2	20,08	10,04		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: fonte de variação; x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: massa de nanopartículas; x<sub>3</sub>: concentração de HSA; gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

Tabela 11 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos do modelo ajustado para adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,5385	0,4759	0,0895

Fonte: Autor (2023).

Os resultados apresentados na Tabela 10 e na Tabela 11 mostram que o modelo ótimo não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,4794$ ) e nem violações nas pressuposições da análise de regressão. Ao que se pode observar na Tabela 10, a variável massa foi não significativa na faixa estudada ( $p = 0,1513$ ). Entretanto, devido à sua importância optou-se por mantê-la no modelo. Tal escolha é reforçada por resultados de experimentos de otimização anteriores (aqui não apresentados), em que se fixou o pH e variou-se a massa e a concentração de HSA, os quais indicaram a significância da massa. Além do mais, o modelo recalculado sem a variável massa apresentou uma tendência de falta de ajuste, evidenciada pela queda no valor- $p$  de 0,4794 (TABELA 10) para 0,0776, próximo do nível de significância. Soma-se a isso

o fato de que as condições de otimalidade obtidas com ou sem a variável massa no modelo foram praticamente as mesmas. Diante disso, obtiveram-se os coeficientes do modelo, e as informações são apresentadas na Tabela 12:

Tabela 12 - Estimativas dos coeficientes do modelo ótimo de adsorção reduzido de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.

Parâmetros	Estim.	D.p.	t-calc	valor-p
Intercepto	36,00	1,21	29,74	<0,0001***
pH	-11,59	0,99	-11,65	<0,0001***
massa	1,53	0,99	1,54	0,1513
conc.	-10,38	0,99	-10,43	<0,0001***
conc. <sup>2</sup>	4,45	1,02	4,37	0,0011**
pH:conc	4,24	1,30	3,26	0,0076**

Fonte: Autor (2023).

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

D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t calculada.; conc.: concentração

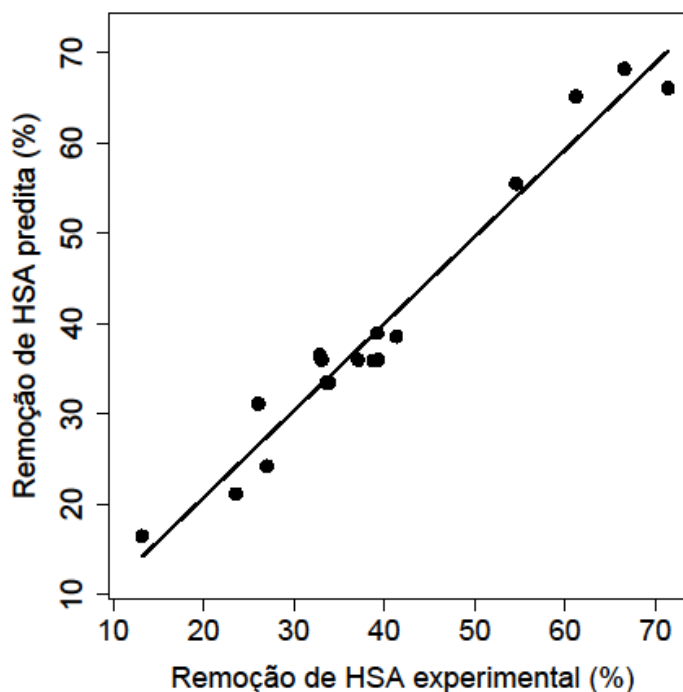
O valor obtido a partir do modelo para a estatística F (55,32) foi maior que o F tabelado (3,20), o que demonstra alta significância. Assim, o modelo apresentado Tabela 12 e sumarizado na equação (66) é adequado para descrição dos dados e pode ser usado para obtenção dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno (GRÁFICO 7) para a análise dos efeitos das variáveis na eficiência de remoção de HSA por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

$$R_e = -11,59 x_1 + 1,53 x_2 - 10,38 x_3 + 4,45 x_3^2 + 4,24 x_1:x_3 + 36,00 \quad (66)$$

Em que R<sub>e</sub> é a eficiência de remoção de HSA (%), x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> e x<sub>3</sub> são respectivamente as variáveis independentes codificadas pH, massa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA e concentração de HSA. O modelo (66) apresentou um R<sup>2</sup> de 0,9618, o que indica que ele é capaz de explicar 96,18% da variabilidade dos dados de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

No Gráfico 6 a seguir é apresentado a dispersão dos valores da quantidade de HSA removida predita pelo modelo e os valores experimentais:

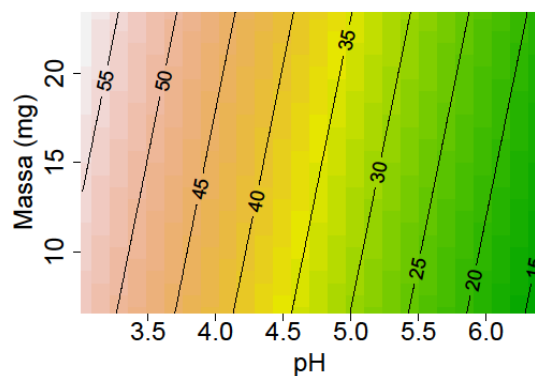
Gráfico 6 - Eficiência de remoção de HSA (%) predita pelo modelo em função da eficiência experimental para os dados de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .



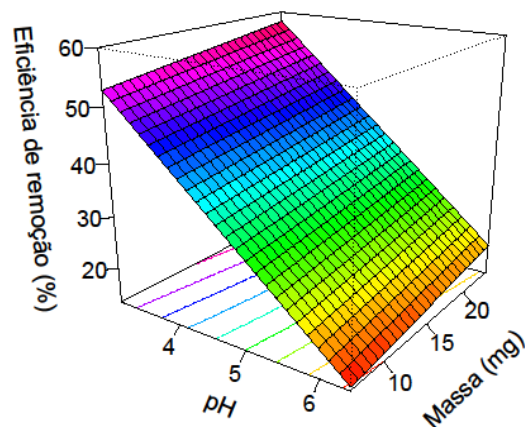
Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado no Gráfico 6, há uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo (66) e os valores reais (experimentais) obtidos, o que reafirma a adequabilidade do ajuste do modelo (66) aos dados. Em seguida, foram obtidas as superfícies de resposta e as curvas de contorno para descrever a porcentagem de adsorção de HSA de acordo com o efeito das variáveis do estudo, sendo tais resultados apresentados no Gráfico 7:

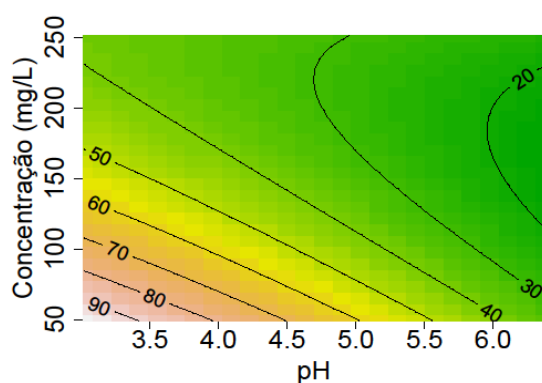
Gráfico 7 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$  de acordo com as variáveis avaliadas duas a duas e fixando a terceira no valor correspondente ao ponto central do delineamento.



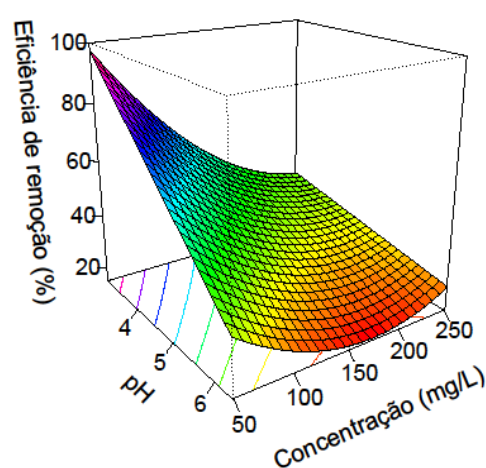
(a)



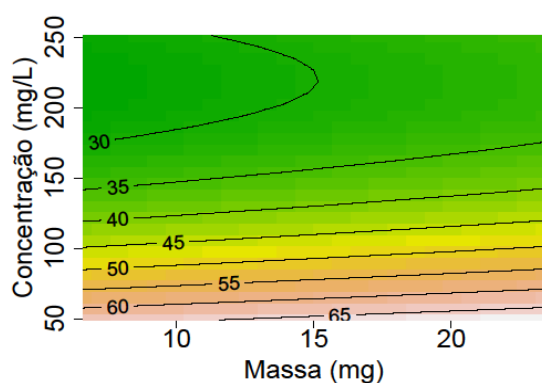
(b)



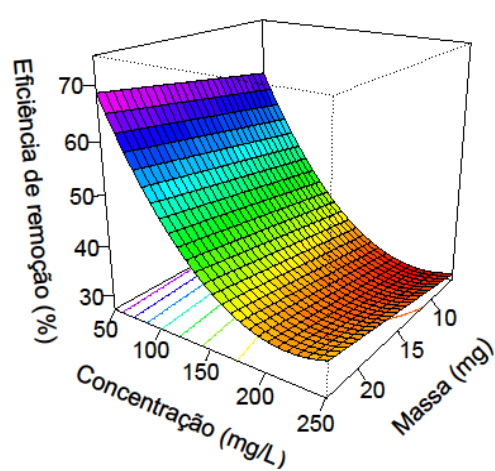
(c)



(d)



(e)



(f)

Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) e b) pH e massa de nanopartículas (mg);

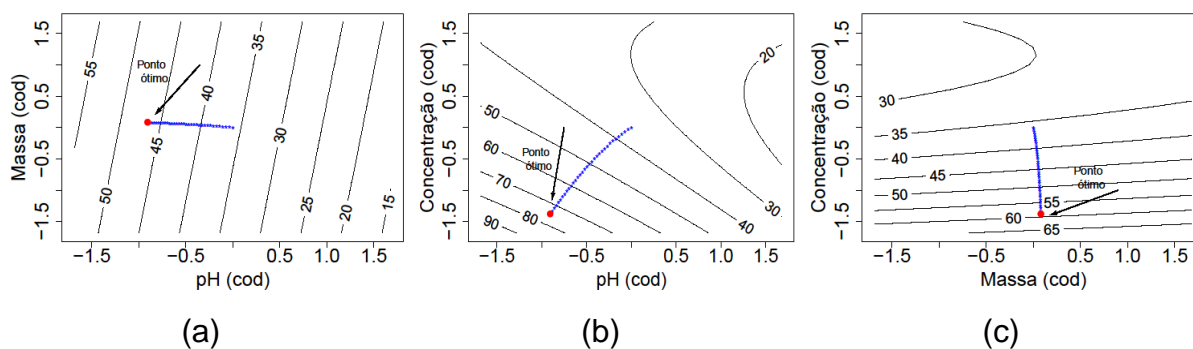
c) e d) pH e concentração de HSA ( $\text{mg L}^{-1}$ );

e) e f) massa de nanopartículas (mg) e concentração de HSA ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Pode-se observar pelas curvas de contorno e superfície de respostas no Gráfico 7 que a adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  aumenta consideravelmente com a diminuição do pH e pela diminuição da concentração de HSA da solução, nota-se também que a massa de nanopartícula na faixa estudada pouco influencia na adsorção. De modo geral, as maiores porcentagens de adsorção foram obtidas nas regiões com os menores pHs e concentração de HSA e maiores massas.

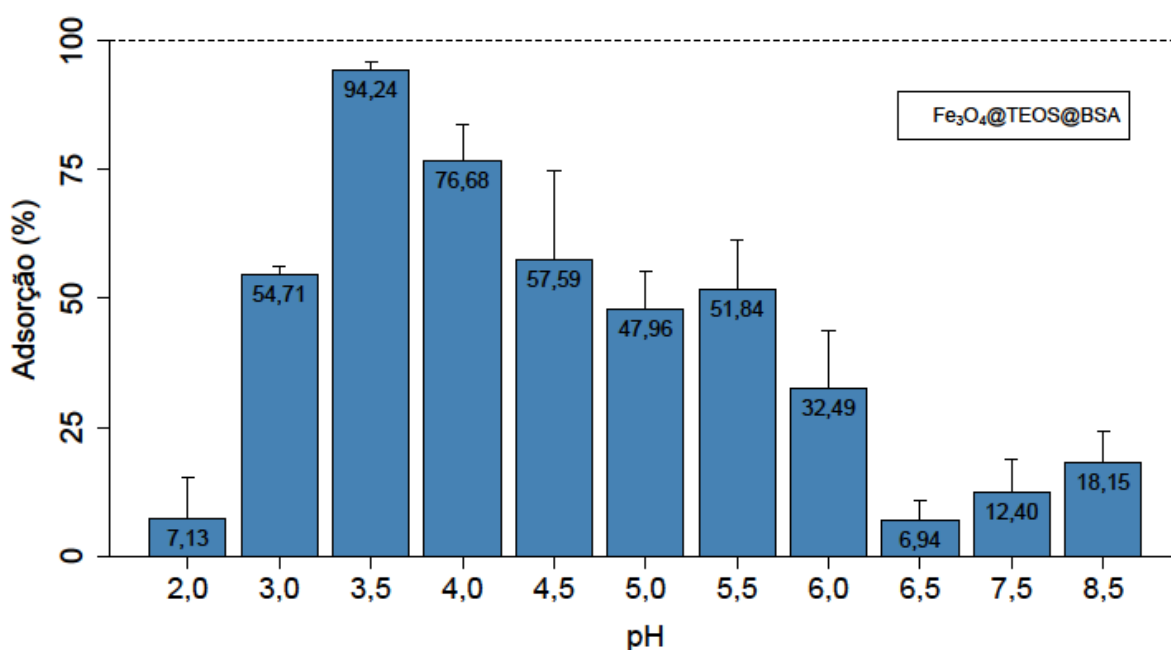
De acordo com o modelo obtido, obteve-se as condições ótimas de adsorção de HSA, as quais foram pH = 1,4; massa = 15 mg e concentração de HSA de 314 mg L<sup>-1</sup>. A fim de avaliar estes valores, realizou-se a análise canônica do modelo ótimo, a qual permite determinar a natureza do ponto estacionário (mínimo, máximo ou ponto de sela) com base no valor dos autovalores da matriz hessiana do modelo de otimização (5,3; 0 e -0,84). Como estes valores apresentam sinais diferentes, tem-se assim um ponto de sela, o que é esperado, uma vez que as condições ótimas se localizam fora da região de experimentação. Para contornar essa situação realizou-se uma análise *ridge*. A análise *ridge*, a qual é baseada no método *steepest ascent*, para uma distância especificada *d*, ele encontra o ponto no qual a resposta prevista é um máximo entre todas as combinações das variáveis preditoras no raio *d*. É importante ressaltar também que o modelo ótimo não considera a natureza bioquímica associada ao processo, uma vez que em pH 1,4 ocorre a precipitação da HSA da solução, assim, a análise *ridge* também é justificada pela necessidade de se restringir a faixa do pH ótimo do delineamento. A análise *ridge* é apresentada no Gráfico 8:

Gráfico 8 - Ponto ótimo da análise *ridge* representado nas curvas de contorno do modelo da adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  de acordo com as variáveis.



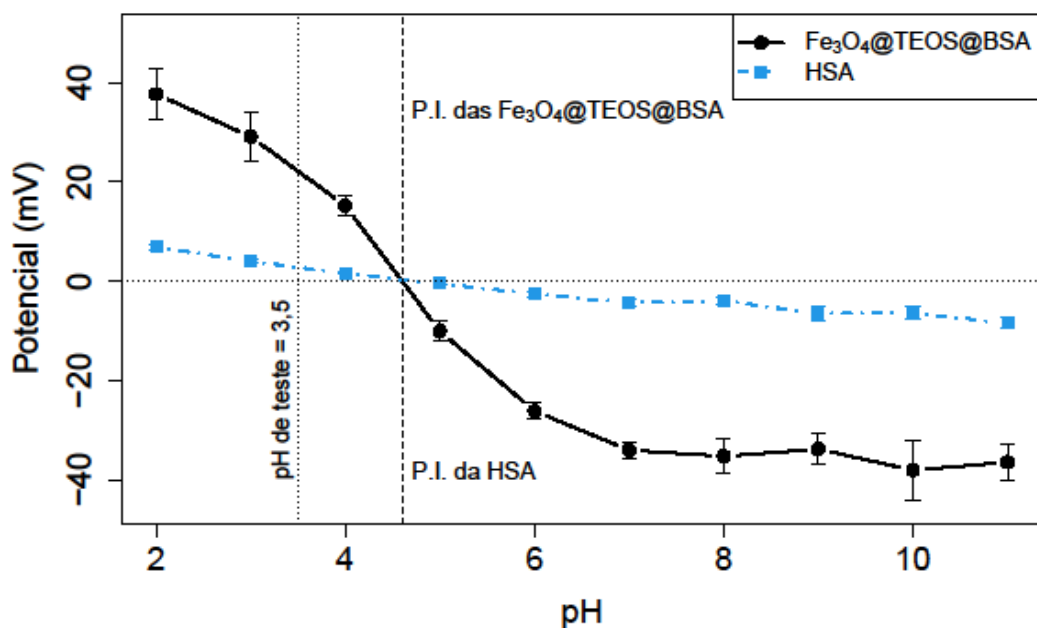
De acordo com a análise *ridge*, a porcentagem máxima de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  (74,64 %) é obtida com as condições experimentais de pH de 3,8; uma massa de 15,4 mg e uma concentração de HSA de  $67,4 \text{ mg L}^{-1}$ . A fim de validar os resultados deste experimento de otimização da adsorção, realizou-se um estudo de avaliação do pH fixando a massa de nanopartículas (5 mg) e a concentração de HSA ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os resultados são apresentados no Gráfico 9:

Gráfico 9 - Porcentagem de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  de acordo com o pH.



Fonte: Autor (2023).

Os resultados apresentados no Gráfico 9 validam os resultados de otimização mostrando o ótimo de adsorção ao redor de 3,5, valor muito próximo dos 3,8 indicados pelo modelo. A explicação para este valor de pH ótimo pode ser também correlacionada com as curvas de potencial zeta das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e da HSA, mostradas no Gráfico 10.

Gráfico 10 - Curvas de potencial zeta das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e da HSA.

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode concluir com base nos Gráficos 6 - 10, o pH ótimo de adsorção da HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , está ao redor de 3,5. Devido à complexidade do revestimento com BSA das nanopartículas, sua superfície apresenta diversos grupamentos químicos, os quais são bastante influenciados por variações do pH. Conforme pode ser observado no Gráfico 10, em pHs ao redor de 3,5 tanto as nanopartículas quanto a HSA estão com carga líquida superficial positiva, uma vez que este pH está abaixo do ponto isoelétrico de ambas (4,7), isso sugere que a adsorção está ocorrendo em regiões bastante específicas, uma vez que como as cargas das proteínas e das nanopartículas são iguais, o efeito predominante é a repulsão eletrostática, o que justifica a baixa capacidade de adsorção.

Discussões semelhantes também foram apresentadas em Gomes *et al.* (2016), em que os autores demonstraram que a BSA tem uma maior porcentagem de adsorção em nanotubos de carbono revestidos com BSA na faixa de pH de 3,5 a 4,6. A importância do pH também foi reportada por Santos *et al.* (2021), em que os autores utilizando estas mesmas nanopartículas para extração de lisozima e obtiveram melhores porcentagens de adsorção em pH 10,0, no qual os grupos carboxila das nanopartículas estão negativamente carregadas ( $\text{COO}^-$ ) e a lisozima está com carga líquida positiva.

De modo geral, acredita-se que o fato de o pH estar próximo do ponto isoelétrico da proteína (4,7), e conseqüentemente a carga líquida superficial tendendo a zero, faz com que haja um balanceamento entre as interações de atração e repulsão eletrostáticas entre as nanopartículas e a HSA, o que por sua vez permite que as proteínas se compactem ao máximo na superfície das nanopartículas, favorecendo o processo de adsorção. Em pHs ácidos abaixo de 4,3, a HSA assume a forma (F) (ASCENZI *et al.*, 2006; FOSTER, 1977; SHAW; PAL, 2008), na qual provavelmente a HSA sofre expansão na sua estrutura, expondo seus grupos funcionais na superfície com predomínio das pontes de dissulfeto e grupos amino (protonados), e o grupo carboxílico em sua forma neutra, o que favorece a adsorção.

Resultados semelhantes também foram apresentadas em Rezwan *et al.* (2004), os quais investigaram a adsorção de BSA em partículas coloidais de  $Al_2O_3$ , e em Wang *et al.* (2013), os quais obtiveram uma maior adsorção de BSA em nanopartículas magnéticas de carboximetilquitosana em pH 4,8.

A fim de se validar o modelo, realizou-se uma adsorção (em quadruplicada) considerando as condições ótimas obtidas a partir do modelo. Para isso, essas condições foram uma massa de nanopartículas de 15,4 mg, concentração de HSA de 68 mg L<sup>-1</sup> e pH 3,5. Nas referidas condições e com o de pH 3,5, uma predição com o modelo indica que a porcentagem de adsorção de HSA será de 79,48%. Nas amostras de soro o valor obtido foi de 62,90%, o que representa uma exatidão de cerca de 79,14% em comparação com o valor predito. Embora tal valor seja menor que o coeficiente de determinação linear do modelo ( $R^2 = 96,18\%$ ), uma exatidão de quase 80% pode ser considerada alta, dada a complexidade do comportamento de proteínas como HSA. A fim de comparação, realizou-se um teste em quadruplicata nas mesmas condições de otimalidade referidas, mas com pH de 3,8, obtendo-se uma porcentagem de adsorção de 35,67% contra 74,26% preditos pelo modelo. Tal disparidade entre as porcentagens obtidas nos pHs de 3,5 e 3,8 mostram que a escolha pelo pH de 3,5 como ótimo de adsorção foi adequada.

Considerando-se agora uma massa de 10 mg, uma concentração de HSA de 200 mgL<sup>-1</sup> e um pH 3,5, obteve-se uma porcentagem de adsorção de 31,24%. Nessas condições o valor da predição com o modelo foi de 38,58%, o que indica uma exatidão de 80,97% em relação ao valor experimental. Os dois cenários avaliados mostraram uma alta concordância em relação à exatidão das predições do modelo, a qual está em cerca de 80 %.

4.3.1.2 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS

As informações da análise de variância do modelo geral ajustado são apresentadas na Tabela 13:

Tabela 13 - Análise de variância do modelo geral de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	9	4796,68	532,96	5,00	0,0227*
x <sub>1</sub>	1	61,50	61,50	0,58	0,4723
x <sub>2</sub>	1	735,87	735,87	6,90	0,0340*
x <sub>3</sub>	1	2307,95	2307,95	21,65	0,0023**
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	1401,89	1401,89	13,15	0,0084**
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	20,50	20,50	0,19	0,6743
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	168,50	168,50	1,58	0,2490
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	16,04	16,04	0,15	0,7096
x <sub>1</sub> :x <sub>3</sub>	1	6,87	6,87	0,06	0,8068
x <sub>2</sub> :x <sub>3</sub>	1	77,55	77,55	0,73	0,4219
Resíduos	7	746,27	106,61		
Falta de ajuste	5	732,32	146,46	21,00	0,0461*
Erro puro	2	13,95	6,97		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: massa de nanopartículas; x<sub>3</sub>: concentração de HSA; gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

Como pode ser observado na Tabela 13, apenas os coeficientes de primeiro grau associados às variáveis massa e concentração de HSA e o coeficiente da interação pH:massa foram significativos no nível de significância adotado. Nota-se também que a falta de ajuste foi significativa. Reajustou-se vários modelos retirando-se os coeficientes não significativos e recalculando os coeficientes restantes. As informações da análise de variância do modelo final obtido e a análise das pressuposições básicas são apresentadas nas Tabelas 14 e 15 respectivamente:

Tabela 14 - Análise de variância do modelo ótimo de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	7	4712,262	673,18	7,29	0,0041**
x <sub>1</sub>	1	61,50	61,50	0,67	0,4354
x <sub>2</sub>	1	735,87	735,87	7,97	0,0199*
x <sub>3</sub>	1	2307,95	2307,95	25,01	0,0007***
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	1401,89	1401,89	15,19	0,0036**
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	20,50	20,50	0,22	0,6487
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	168,5	168,50	1,83	0,2096
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	16,04	16,04	0,17	0,6866
Resíduos	9	830,69	92,30		
Falta de ajuste	7	816,74	116,68	16,73	0,0575
Erro puro	2	13,95	6,97		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: massa de nanopartículas; x<sub>3</sub>: concentração de HSA; gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

Tabela 15 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ajustado para adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,9462	0,7756	0,0745

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar na Tabela 14, o coeficiente de primeiro grau associado à variável pH e os de segundo grau associados às variáveis massa de nanopartículas e concentração de HSA não foram significativos, no entanto foram mantidos no modelo para correção da falta de ajuste e de violações nas pressuposições da regressão. Ressalta-se que a presença desses coeficientes não alterou de forma expressiva o coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ) e nem os valores das condições de otimalidade. De acordo com a Tabela 15, não houve violações nas pressuposições da regressão. As estimativas e as demais informações associadas aos coeficientes do modelo final são apresentadas na Tabela 16:

Tabela 16 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo de adsorção reduzido de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.

Parâmetros	Estim.	D. p.	t-calc	valor-p
Intercepto	74,75	5,54	13,5	<0,0001***
x <sub>1</sub>	-2,12	2,60	-0,82	0,4354
x <sub>2</sub>	7,34	2,60	2,82	0,0199*
x <sub>3</sub>	-13,00	2,60	-5,00	0,0007***
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-9,52	2,86	-3,33	0,0088**
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,15	2,86	-0,05	0,9604
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	3,87	2,86	1,35	0,2096
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	-1,42	3,40	-0,42	0,6866

Fonte: Autor (2023).

Estim.: Estimativa; D. p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t calculada.

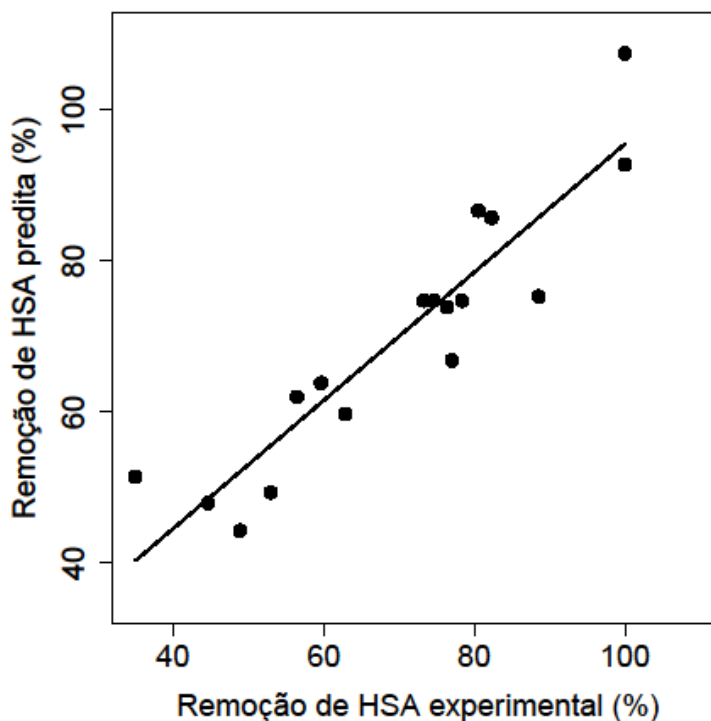
x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: massa de nanopartículas; x<sub>3</sub>: concentração de HSA.

O valor obtido a partir do modelo para a estatística F (7,29) foi maior que o F tabelado (3,68), o que demonstra significância. Assim, o modelo apresentado na Tabela 16 e sumarizado na equação (67) é adequado para descrição dos dados e pode ser usado para obtenção dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno (GRÁFICO 12) para a análise dos efeitos das variáveis na eficiência de remoção de HSA por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

$$R_e = -2,12 x_1 + 7,34 x_2 - 13,00 x_3 - 9,52 x_1^2 - 0,15 x_2^2 + 3,87 x_3^2 - 1,42 x_1:x_2 + 74,75 \quad (67)$$

Em que R<sub>e</sub> é a eficiência de remoção de HSA (%), x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> e x<sub>3</sub> são respectivamente as variáveis independentes codificadas pH, massa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS e concentração de HSA. O modelo (67) é capaz de explicar 85,01% da variabilidade dos dados da eficiência de remoção de HSA (%), conforme o valor de R<sup>2</sup>. No Gráfico 11 a seguir é apresentada a dispersão dos valores da quantidade de HSA removida predita pelo modelo e os valores experimentais:

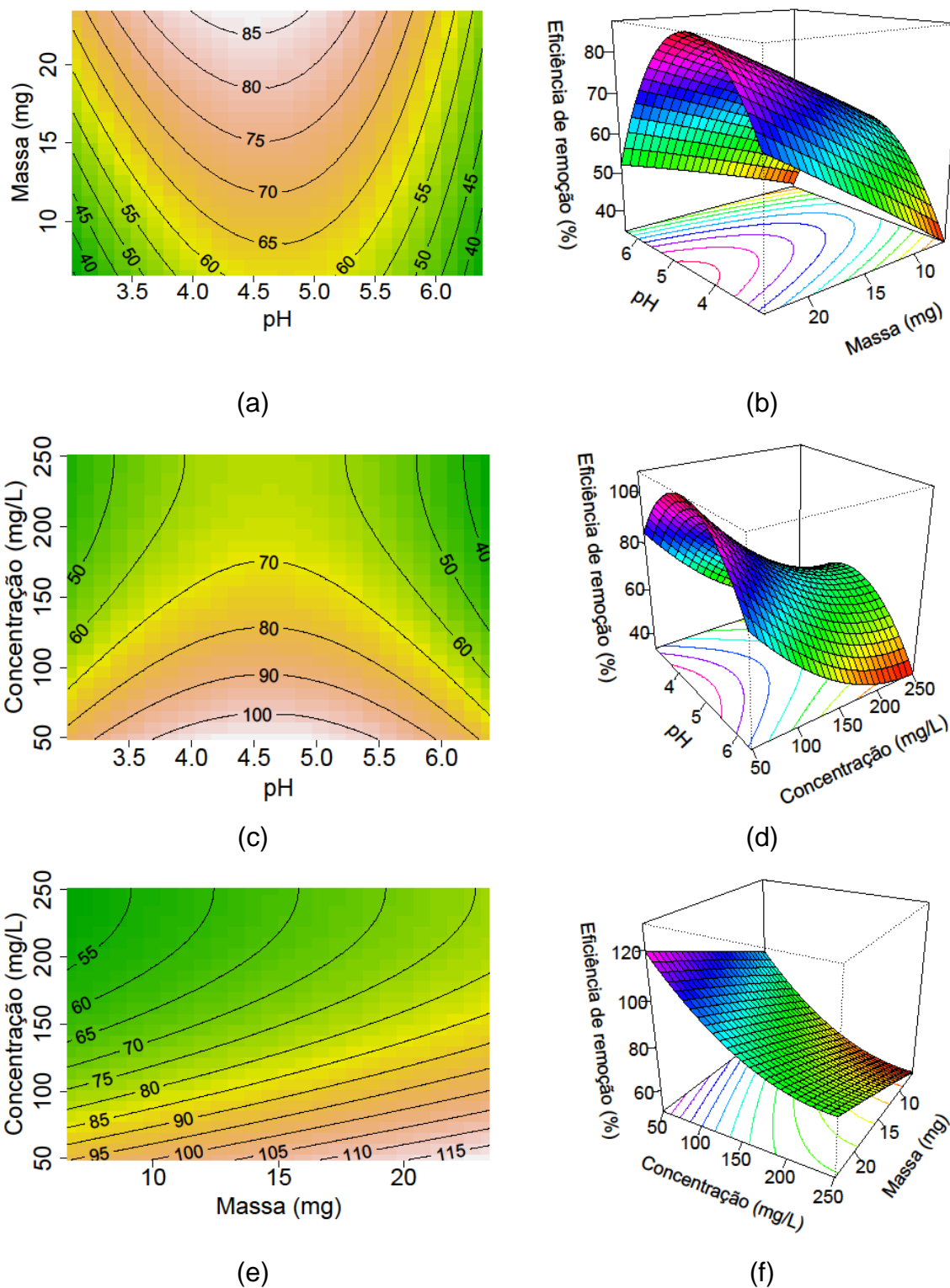
Gráfico 11 - Eficiência de remoção de HSA (%) predita pelo modelo em função da eficiência experimental para os dados de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .



Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado no Gráfico 11, há uma boa concordância entre os valores de eficiência de remoção de HSA preditos pelo modelo (62) e os valores reais (experimentais) obtidos, o que reafirma a adequabilidade do ajuste do modelo (62) aos dados. Em seguida, foram obtidas as superfícies de resposta e as curvas de contorno para descrever a porcentagem de adsorção de HSA de acordo com o efeito das variáveis do estudo, sendo tais resultados apresentados no Gráfico 12:

Gráfico 12 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  de acordo com as variáveis avaliadas duas a duas e fixando a terceira no valor correspondente ao ponto central do delineamento.



Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) e b) pH e massa de nanopartículas (mg);

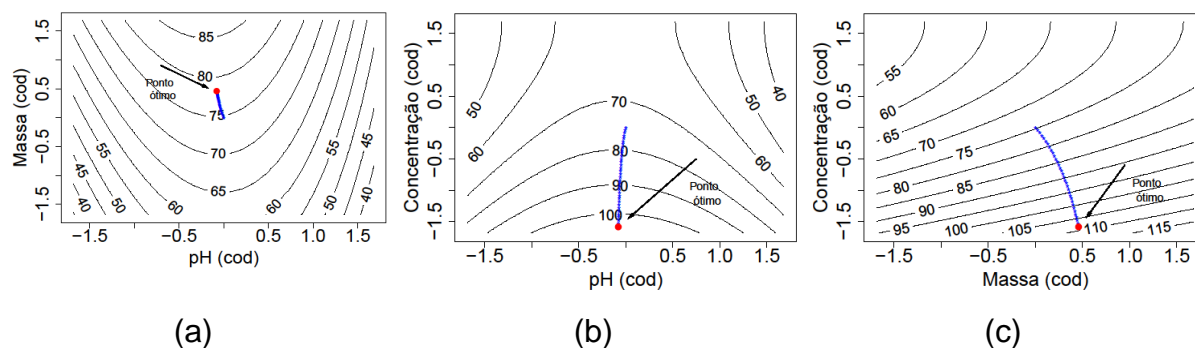
c) e d) pH e concentração de HSA ( $\text{mg L}^{-1}$ );

e) e f) massa de nanopartículas (mg) e concentração de HSA ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Pode-se observar pelas curvas de contorno e superfície de respostas na Figura 20, que a adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  aumenta consideravelmente com a diminuição do pH e também pela diminuição da concentração de HSA da solução, e pelo aumento da massa de nanopartícula. De modo geral, conforme esperado, as maiores porcentagens de adsorção foram obtidas nas regiões com os menores pHs e concentração de HSA e maiores massas de nanopartículas.

De acordo com o modelo obtido, obteve-se as condições ótimas de adsorção de HSA, as quais foram  $\text{pH} = 1,6$ ; massa = 215,51 mg e concentração de HSA de  $250,87 \text{ mg L}^{-1}$ . A análise canônica do modelo ótimo revelou que o ponto estacionário é um ponto de sela, uma vez que os autovalores encontrados apresentam sinais diferentes (3,87; -0,09 e -9,58). Como estes valores, tem-se assim um ponto de sela, o que é esperado, uma vez que as condições ótimas segundo o modelo se localizam fora da região de experimentação. No Gráfico 13 a seguir são apresentadas as curvas de contorno da análise *ridge* do modelo de otimização.

Gráfico 13 - Curvas de contorno da análise ridge do modelo de otimização da adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  de acordo com as variáveis.

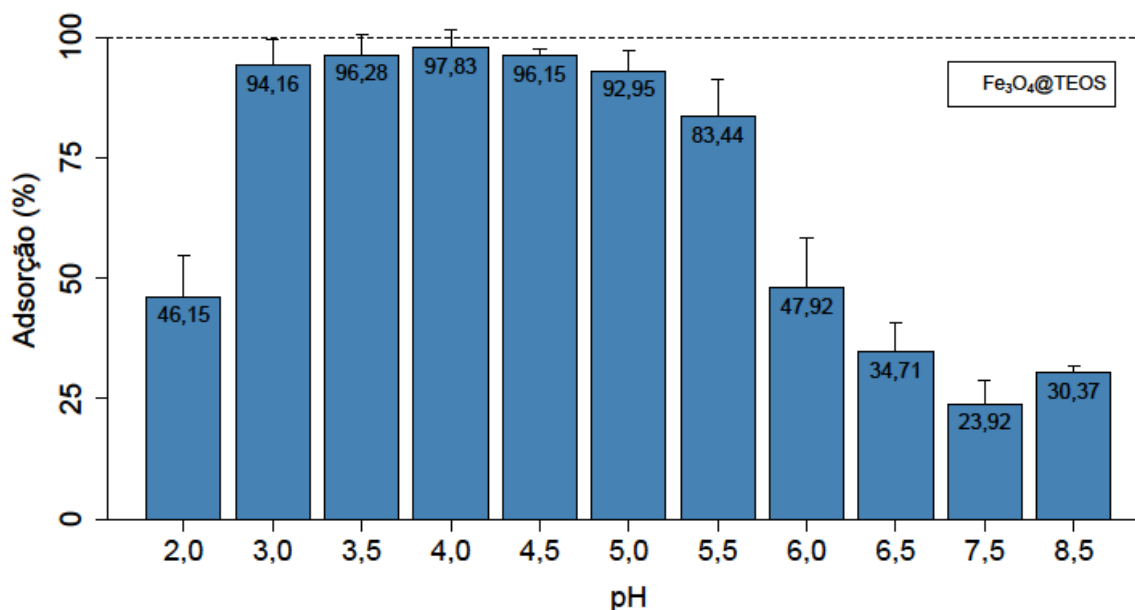


Fonte: Autor (2023).

A análise *ridge* indicou que a porcentagem máxima de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  (108,51 %) é obtida com as condições experimentais de pH de 4,5; massa de nanopartículas de 17,29 mg e uma concentração de HSA de  $55,02 \text{ mg L}^{-1}$ . No ponto ótimo de adsorção a HSA está na conformação (N) (ASCENZI *et al.*, 2006; PETERS JR, 1996) a qual se caracteriza pela estrutura típica em forma de coração.

Analogamente aos estudos com as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , a fim de validar os resultados deste experimento de otimização da adsorção, realizou-se um estudo de avaliação univariado do pH fixando a massa de nanopartículas (5 mg) e a concentração de HSA ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os resultados são apresentados no Gráfico 14:

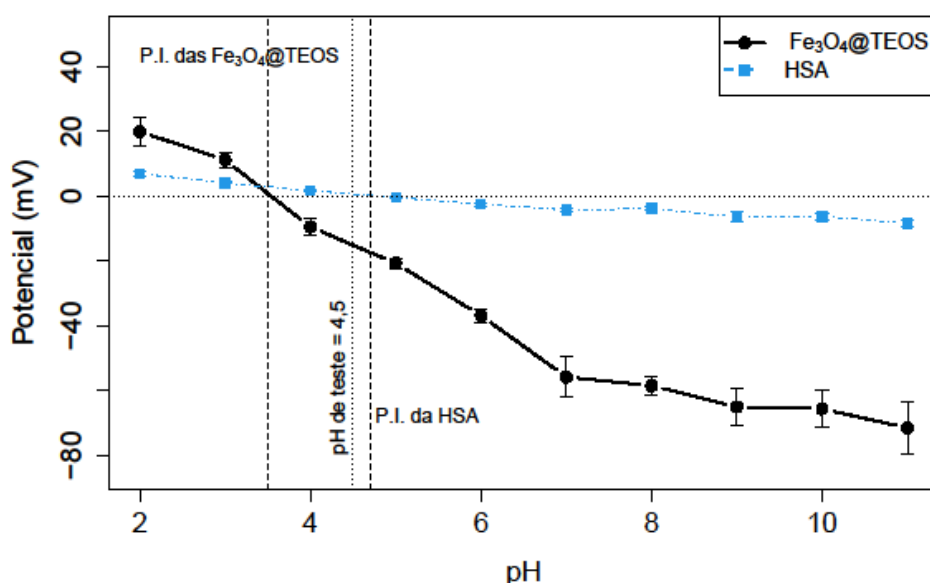
Gráfico 14 - Porcentagem de adsorção de HSA nas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS de acordo com o pH.



Fonte: Autor (2023).

Os resultados apresentados no Gráfico 14 são coerentes com os resultados de otimização dos Gráficos 12 e 13, mostrando não apenas um ótimo pontual de adsorção, mas sim uma região entre os pHs de 3,0 a 5,5, com o valor ótimo da análise *ridge* incluído nessa faixa. Para discussão desse resultado, considera-se as curvas de potencial zeta das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS e da HSA, mostradas no Gráfico 15:

Gráfico 15 - Curvas de potencial zeta das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS e da HSA.



Fonte: Autor (2023).

As curvas de potencial zeta do Gráfico 15 mostram que na faixa de pH ótimo (~3,5 – 5,5), as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS apresentam carga líquida superficial negativa ao passo que a HSA apresenta carga positiva. Desse modo, como as cargas são opostas, há um favorecimento das interações eletrostáticas de atração e conseqüentemente do processo de adsorção. O fato destas nanopartículas serem mais simples que as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA e apresentarem sua superfície compostas em sua maioria por grupos silanóis, faz com que a adsorção de HSA não seja tão influenciada pelo pH, uma vez que há uma diminuição da repulsão de cargas iguais de grupamentos da nanopartícula com a HSA. A adsorção ocorre em uma faixa de pHs que em que a HSA pode se encontrar nas conformações (N) e (F).

A interação de BSA com nanopartículas revestidas com TEOS foi estudada por Galdino *et al.* (2020), os quais demonstraram que a adsorção ocorre em pH 6,0. Em estudo semelhante, Givens *et al.* (2017) obtiveram resultados em que a adsorção de BSA diminuiu consideravelmente em pH 2,0, semelhante ao que foi mostrado na Figura 22. Em Xu *et al.* (2010), os autores demonstraram a síntese e a caracterização de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> revestidas com TEOS e um peptídeo poli-L-alanina resultando em microesferas magnéticas (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@poly-L-alanine), as quais foram aplicadas para adsorção de BSA em pH 6,6, ressalta-se que os autores não realizaram um estudo com o objetivo específico de avaliar o efeito do pH tal como neste trabalho.

Para validação do modelo, realizou-se uma adsorção (em quadruplicada) considerando as condições ótimas obtidas a partir do modelo. Tais condições foram uma massa de nanopartículas de 17 mg, 1 mL de uma solução com concentração de HSA de 55 mg L<sup>-1</sup> em pH 4,5. Nessas condições, o modelo prediz que toda a HSA é adsorvida, o que foi confirmado nos ensaios experimentais. Outros estudos preliminares corroboram com estes resultados, os quais demonstraram que uma massa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS de 10 mg é capaz de adsorver toda HSA em 1 mL de qualquer solução em concentrações de até 120 mg L<sup>-1</sup>.

Realizou-se outro estudo de validação complementar em quadruplicata, no qual se utilizou uma massa de 10 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, uma concentração de HSA de 250 mgL<sup>-1</sup> e um pH 4,48. A porcentagem de adsorção obtida foi de 47,67%, enquanto que a porcentagem predita pelo modelo foi de 56,03%, tais resultados indicam uma exatidão de 85,09% comparando-se o valor real e o experimental, o que indica que o modelo de otimização da adsorção de HSA nas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS tem maior exatidão na

predição da porcentagem de HSA adsorvida que o modelo obtido para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

#### 4.3.2 Estudos de cinética de adsorção

Os estudos de cinética de adsorção de HSA nas nanopartículas serão apresentados nas seções a seguir:

##### 4.3.2.1 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$

Inicialmente avaliou-se o coeficiente de variação dos calibradores da curva analítica em pH 3,5. Os valores obtidos apresentados na Tabela 17:

Tabela 17 - Coeficiente de variação para os calibradores da curva analítica em pH 3,5.

<b>Concentrações (Mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coeficientes de variação (%)</b>
0	..
10	10,96
20	8,73
40	9,50
60	2,28
80	2,21
100	2,72
120	3,17
150	2,00
200	1,51
250	0,85

Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado da Tabela 17, nenhum calibrador da curva apresentou um coeficiente de variação maior que 20%, logo todos podem ser utilizados no ajuste das curvas. Ajustou-se então curvas de primeiro, segundo e

terceiro grau e em seguida os modelos de cinética considerando os dados obtidos com cada curva. Comparando-se cada um dos modelos entre si de acordo com a curva de calibração, os modelos que apresentaram os menores erros foram obtidos com a curva de terceiro grau. As informações associadas à curva, tais como os parâmetros (par), desvio padrão (d.p.), estatística t (t-calc), e valores-p dos parâmetros e do modelo, bem como o coeficiente de determinação múltipla do modelo ( $R^2$ ) são apresentados na Tabela 18:

Tabela 18 - Informações da curva de calibração de HSA em pH 3,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor- $p_m$ ) e coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ).

Par.	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p	Valor- $p_m$	$R^2$ (%)
$\beta_0$	-0,0070	0,0073	-0,954	0,3716		
$\beta_1$	0,0081	0,0003	26,230	<0,0001***	<0,0001***	99,91
$\beta_2$	$-3,0 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-6}$	-9,5020	<0,0001***		
$\beta_3$	$4,6 \times 10^{-8}$	$8,6 \times 10^{-9}$	5,3130	0,0011**		

Fonte: Autor (2023).

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

Ao que se pode observar da Tabela 18, a estimativa do intercepto não foi significativa ( $p = 0,3716$ ), o que indica que quando não há HSA na solução, a absorbância é estatisticamente igual a zero. As estimativas dos parâmetros  $\beta_2$  e  $\beta_3$  foram próximas de 0, mas significativas ( $p < 0,0001$ ) e o modelo apresentou um  $R^2$  bastante elevado, indicando que 99,91% da variabilidade dos dados de absorbância de acordo com a concentração de HSA pode ser explicada pelo modelo.

É importante ressaltar que, a título de comparação, todas as análises foram refeitas utilizando-se a curva de segundo grau, e a conclusão que se chegou é que os estudos de cinética, independente do grau da curva de calibração (segundo ou terceiro) o modelo selecionado é o mesmo. A análise das pressuposições é apresentada na Tabela 19:

Tabela 19 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos da curva de HSA em pH 3,5.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,9714	0,9139	0,4175

Fonte: Autor (2023).

De acordo com a Tabela 19, o modelo polinomial de grau 3 não apresentou nenhuma violação nas pressuposições da regressão, sendo adequado para o cálculo das concentrações de HSA nos estudos de cinética de adsorção em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Com a curva resultante pode-se obter as concentrações de HSA de acordo com o tempo, sendo estes dados utilizados para o cálculo das quantidades de HSA adsorvidas nas nanopartículas. Posteriormente ajustou-se os modelos de cinética de pseudo-primeira e segunda ordens, Elovich e Avrami. As informações dos modelos ajustados, como estimativas dos parâmetros, desvio padrão e os valores-p são apresentados na Tabela 20:

Tabela 20 - Expressões, estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Modelo	Expressão	Parâmetro	Estimativa	D.p.	Valor-p
<b>PPO</b>	$q_t = q_{e1}(1 - \exp(-k_f t))$	$q_{e1}$ (mg g <sup>-1</sup> )	3,4315	0,1539	<0,0001***
		$k_f$ (min <sup>-1</sup> )	0,9813	0,1924	0,0005
<b>PSO</b>	$q_t = \frac{q_{e2}^2 k_s t}{1 + q_{e2} k_s t}$	$q_{e2}$ (mg g <sup>-1</sup> )	3,7957	0,1201	<0,0001***
		$k_s$ (g mg <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> )	0,3427	0,0596	0,0002***
<b>Elovich</b>	$q_t = \frac{\ln(1 + \alpha \beta t)}{\beta}$	$\alpha$ (mg g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> )	22,0339	10,13	0,0547
		$\beta$ (mg g <sup>-1</sup> )	1,7724	0,1953	<0,0001***
		$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	3,8193	0,1409	<0,0001***
<b>Avrami</b>	$q_t = q_e(1 - \exp(-k_{AV} t^{n_{AV}}))$	$k_{AV}$ (min <sup>-1</sup> )	0,7648	0,0681	<0,0001***
		$n_{AV}$	0,5718	0,0591	<0,0001***

Fonte: Autor (2023).

\*\*\* significativo a 0,1%.

D.p.: Desvio padrão; PPO: Pseudo-primeira ordem; PSO: Pseudo-segunda ordem.

De acordo com a Tabela 20, apenas o parâmetro  $\alpha$  do modelo de Elovich foi não significativo ( $p = 0,0547$ ). A fim de se avaliar a adequabilidade dos modelos

ajustados, verificou-se as pressuposições da regressão não linear, de forma análoga às curvas de regressão, cujos resultados são apresentados na Tabela 21:

Tabela 21 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos dos modelos de cinética de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .

<b>Modelo</b>	<b>Teste de Shapiro-Wilk</b>	<b>Teste de Box-Pearse</b>	<b>Teste de Breusch-Pagan</b>
PPO	0,0075**	0,1849	0,1313
PSO	0,2390	0,6178	0,2532
Elovich	0,7637	0,6285	0,1731
Avrami	0,1431	0,2097	0,4575

Fonte: Autor (2023).

PPO: Pseudo-primeira ordem; PSO: Pseudo-segunda ordem.

Ao que se pode observar na Tabela 21, apenas o modelo de cinética de primeira ordem apresentou uma violação na pressuposição de normalidade dos resíduos, o que indica que não houve um ajuste satisfatório. Com relação aos demais modelos, as conclusões obtidas a partir dos mesmos são válidas. Prosseguiu-se então para a seleção do modelo que melhor se ajustou aos dados, primeiramente analisando-se os critérios de informação AICc, AIC e BIC, cujos resultados são apresentados na Tabela 22:

Tabela 22 - Critérios de seleção dos modelos de cinética de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .

<b>Modelos</b>	<b>AICc</b>	<b>AIC</b>	<b>BIC</b>
PSO	3,0308	0,0308	1,4855
Avrami	4,0026	-1,7117	0,2279
Elovich	13,4457	10,4457	11,9004
PPO	15,4212	12,4212	13,8759

Fonte: Autor (2023).

AICc: Critério de informação de Akaike corrigido; BIC: Critério de informação Bayesiano; AIC: Critério de informação de Akaike.

Conforme pode ser observado na Tabela 22, o modelo de cinética de segunda ordem e o de ordem fracionária de Avrami apresentaram os menores valores dos

critérios, com uma diferença maior que 2 unidades em relação aos demais, e assim, de acordo com esses critérios, PSO e Avrami melhor se ajustaram aos dados. No entanto, dada a proximidade dos valores entre os dois, não se pode afirmar qual é o mais adequado. Assim, para prosseguir com a seleção, calculou-se uma série de métricas que analisam a intensidade dos resíduos como as apresentadas em Foo e Hameed (2010), cujos resultados são apresentados na Tabela 23:

Tabela 23 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA ajustados.

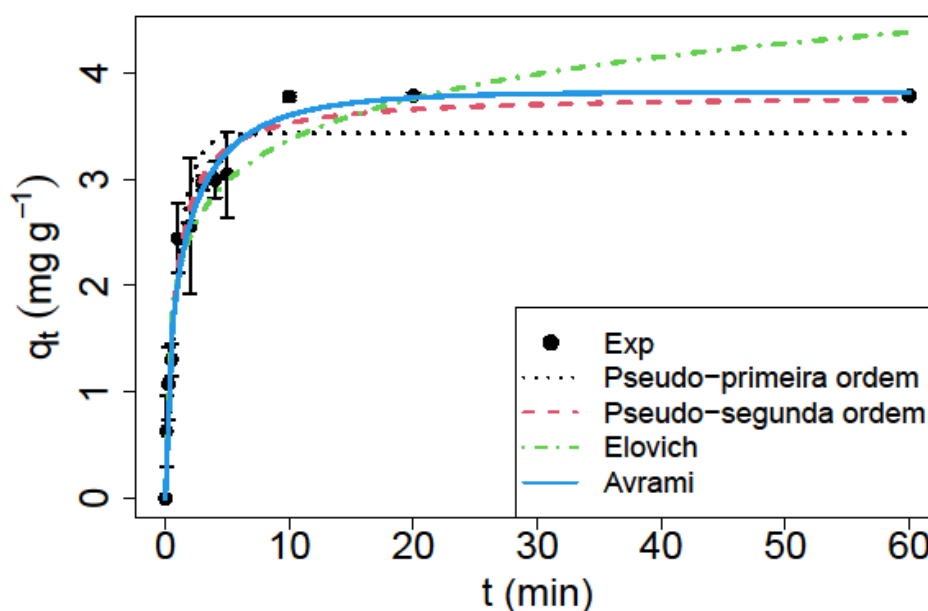
Modelo	Avrami	PSO	Elovich	PPO	Nome da função
SSE	<b>0,3128</b>	0,4272	1,0177	1,1998	Soma de quadrado dos erros
HYBRID	<b>1,7246</b>	2,8757	5,1774	6,8885	Erro fracionário híbrido
ARE	<b>5,4202</b>	10,5472	13,2349	16,2782	Erro médio relativo
EABS	<b>1,3320</b>	1,9857	2,8057	3,4744	Soma de erros absolutos
MPSD	<b>9,2793</b>	16,5609	18,4789	24,1984	Desvio padrão percentual de Marquardt
SRE	<b>0,1072</b>	0,1686	0,2534	0,2382	Desvio padrão do erro relativo
X <sup>2</sup>	<b>0,1380</b>	0,2588	0,4660	0,6200	Estatística de Qui-quadrado
RSD	<b>0,1864</b>	0,2067	0,3190	0,3464	Desvio padrão residual
Log-veros	<b>4,8558</b>	2,9846	-2,2228	-3,2106	Log-verossimilhança
R <sup>2</sup>	<b>0,9832</b>	0,9784	0,9455	0,9426	Coefficiente de determinação
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	<b>0,9770</b>	0,9736	0,9334	0,9299	Coefficiente de determinação ajustado

Fonte: Autor (2023).

Os resultados na Tabela 23 mostram que o modelo de Avrami apresentou os melhores resultados das métricas de ajuste (em negrito): menores valores de todas as métricas baseadas em resíduos (SSE, HYBRID, ARE, EABS, MPSD, SRE,  $\chi^2$ , RSD) e maiores valores de log-verossimilhança e dos coeficientes de determinação múltipla (R<sup>2</sup>) e ajustado (R<sup>2</sup><sub>ajust</sub>). De acordo com o modelo de ordem fracionária de Avrami, a capacidade máxima adsorptiva na concentração de HSA estudada é de 3,82 mg g<sup>-1</sup> (intervalo de confiança de 95%, IC95%: 3,52 - 4,18) na concentração avaliada (20,00 mg L<sup>-1</sup>). O expoente de Avrami refere-se a um número fracionário relacionado com possíveis alterações do mecanismo de adsorção durante o processo, o que significa que, ao invés do mecanismo de adsorção seguir apenas uma ordem de cinética inteira e constante, ele poderia seguir cinéticas de múltiplas ordens que se alteram durante o contato da HSA com as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

De modo geral a Tabela 23 mostra que os modelos apresentaram uma qualidade de ajuste satisfatória, com baixos valores das métricas de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos e elevados valores de  $R^2_{ajust}$ , em que os modelos de Avrami, PSO, Elovich e PPO são capazes de descrever cerca de 98,32; 97,84; 94,55 e 94,26 % da variabilidade dos dados de quantidade de HSA adsorvida nas  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$  conforme o tempo. As curvas do modelo de cinética de Avrami e os demais modelos ajustados são apresentados no Gráfico 16:

Gráfico 16 - Modelos de cinética de adsorção de HSA em  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$  ajustados.



Fonte: Autor (2023).

A possibilidade de resistência de difusão intrapartícula afetar o processo de adsorção foi explorada usando o modelo de difusão intrapartícula de Weber-Morris, cujas informações são apresentadas na Tabela 24:

Tabela 24 - Informações dos modelos de difusão intrapartícula de Weber - Morris no estudo de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Modelo	Parâmetro	Estimativa	D.p.	Valor-p	R <sup>2</sup>
Modelo 1	C <sub>1</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	-0,065	0,1534	0,6964	0,9655
	k <sub>id1</sub> (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-0.5</sup> )	2,3200	0,2533	0,0027**	
Modelo 2	C <sub>2</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	1,7764	0,1204	<0,0001***	0,9648
	k <sub>id2</sub> (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-0.5</sup> )	0,6170	0,0590	0,0005***	
Modelo 3	C <sub>3</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	3,7740	0,0077	0,0013**	0,5193
	k <sub>id3</sub> (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-0.5</sup> )	0,0015	0,0014	0,4877	

Fonte: Autor (2023).

\*\*\*Significativo a 0,1%; \*\*Significativo a 1%; D.p.: Desvio padrão.

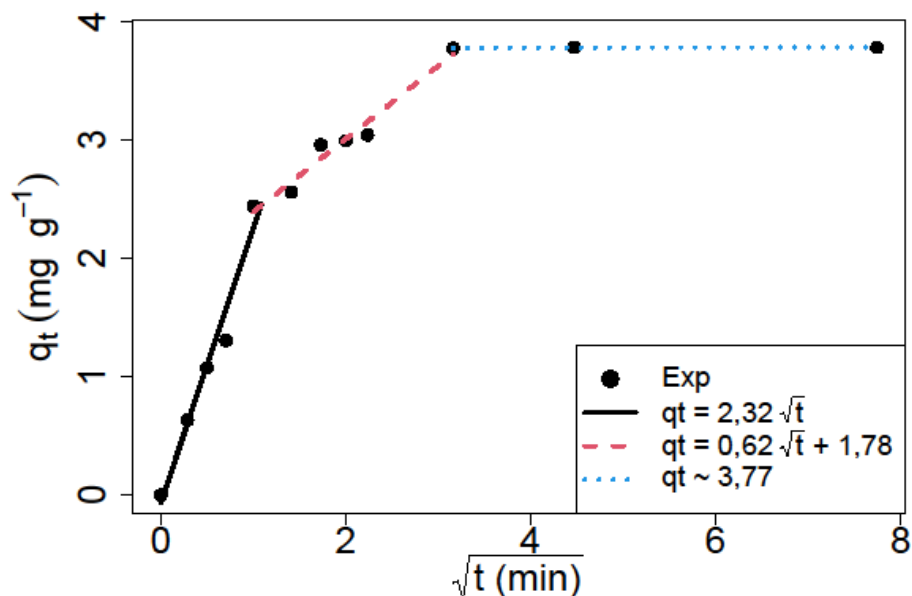
Conforme a Tabela 24, os modelos 1 e 2 foram estatisticamente significativos, uma vez que os parâmetros k<sub>id1</sub> e k<sub>id2</sub>, taxas de difusão intrapartícula, foram significativos (p = 0,0027 e p = 0,0005 respectivamente). Sendo o coeficiente de correlação linear  $\rho = \sqrt{R^2}$ , observa-se também que os modelos apresentaram alta correlação aos dados (ρ<sub>1</sub> = 0,9825 e ρ<sub>2</sub> = 0,9822 respectivamente). Estes resultados, sugerem que a velocidade do processo de adsorção é influenciada por duas etapas determinantes. A primeira que ocorre à uma taxa k<sub>id1</sub> = 2,32 mg g<sup>-1</sup> min<sup>-0.5</sup> pode ser atribuída ao processo de difusão da HSA sobre a superfície das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA juntamente com a dispersão (desagregação) das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA na solução de HSA, que corresponde à etapa mais rápida. Nesta etapa a quantidade inicial de HSA adsorvida é C<sub>1</sub> = 0, uma vez que o parâmetro C<sub>1</sub> foi não significativo (p = 0,6967), e que corresponde ao início do processo de adsorção.

A segunda etapa do processo, a qual ocorre à uma taxa de k<sub>id2</sub> = 0,62 mg<sup>-1</sup>min<sup>0.5</sup>, corresponde à difusão da HSA nos “poros da camada de HSA adsorvida” até que se atinja o equilíbrio de adsorção nas nanopartículas, que é a etapa mais lenta, limitante da velocidade do processo de adsorção. Durante esta etapa a espessura da camada de HSA adsorvida é de C<sub>2</sub> = 1,78 mg g<sup>-1</sup>.

Para o modelo 3, a taxa de difusão de HSA é k<sub>id3</sub> = 0 (p = 0,4877), a partir desta etapa a superfície das nanopartículas já atingiu o equilíbrio de adsorção e a quantidade de HSA adsorvida é aproximadamente de C<sub>3</sub> = 3,77 mg g<sup>-1</sup> (p = 0,0013). Nota-se que este valor é bem próximo da capacidade máxima de adsorção q<sub>e</sub> = 3,81 mg g<sup>-1</sup> do modelo de Avrami (TABELA 20).

No Gráfico 17 são apresentados os modelos de Weber-Morris para os dados de cinética de adsorção.

Gráfico 17 - Modelos de difusão intrapartícula de Weber-Morris para a cinética de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .



Fonte: Autor (2023).

A análise das pressuposições dos modelos de Weber-Morris é apresentada na Tabela 25:

Tabela 25 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições dos modelos de difusão intrapartícula de Weber - Morris no estudo de cinética de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .

Modelo	Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pearse	Teste de Breusch-Pagan
Modelo 1	0,5785	0,3763	0,1536
Modelo 2	0,6560	0,2046	0,8103
Modelo 3	0,4632	0,2765	0,2494

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar na Tabela 25, nenhuma pressuposição da análise de regressão foi violada para os modelos ajustados, sendo válidas as informações obtidas a partir dos mesmos.

#### 4.3.2.2 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS

Inicialmente avaliou-se o coeficiente de variação dos calibradores da curva de calibração analítica em pH 4,5. Os valores obtidos apresentados na Tabela 26:

Tabela 26 - Coeficientes de variação dos calibradores da curva de HSA em pH 4,5.

<b>Concentrações (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coeficientes de variação (%)</b>
0	..
20	5,68
30	2,86
40	10,38
60	2,99
80	1,30
100	2,22
120	2,09
150	3,51
200	3,91
300	0,78
400	3,17
500	0,47
600	1,23

Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado da Tabela 26, nenhum calibrador da curva apresentou um coeficiente de variação maior que 20%, logo todos podem ser utilizados no ajuste das curvas. Ajustou-se então curvas de primeiro, segundo e terceiro grau e em seguida os modelos de cinética considerando os dados obtidos com cada curva. Comparando-se cada um dos modelos entre si de acordo com a curva de calibração, os modelos que apresentaram os menores erros foram obtidos com a curva de terceiro grau. As informações associadas à curva, tais como os parâmetros (par), desvio padrão (d.p.), estatística t (t-calc), e valores-p

dos parâmetros e do modelo, bem como o coeficiente de determinação múltipla do modelo ( $R^2$ ) são apresentados na Tabela 27:

Tabela 27 - Informações da curva de calibração de HSA em pH 4,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor- $p_m$ ) e coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ).

Par.	Estimativa	D. p.	t-calc	Valor-p	Valor- $p_m$	$R^2$ (%)
$\beta_0$	0,0016	0,0075	0,2180	0,8318		
$\beta_1$	0,0026	0,0001	18,7676	<0,0001	<0,0001	99,85
$\beta_2$	$-3,66 \times 10^{-6}$	$5,91 \times 10^{-7}$	-61871	0,0001		
$\beta_3$	$2,62 \times 10^{-9}$	$6,69 \times 10^{-10}$	3,9115	0,0029		

Fonte: Autor (2023).

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

Ao que se pode observar da Tabela 27, a estimativa do intercepto não foi significativa ( $p = 0,8318$ ), o que indica que quando não há HSA na solução, a absorbância é estatisticamente igual a zero. As estimativas dos parâmetros  $\beta_2$  e  $\beta_3$  foram significativas ( $p < 0,0001$ ) e a curva apresentou um  $R^2$  bastante elevado, indicando que 99,85% da variabilidade dos dados de absorbância de acordo com a concentração de HSA pode ser explicada pelo modelo. A análise das pressuposições é apresentada na Tabela 28:

Tabela 28 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições da curva de HSA em pH 4,5.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,5846	0,2991	0,7408

Fonte: Autor (2023).

De acordo com a Tabela 28, a curva não apresentou nenhuma violação nas pressuposições da regressão, mostrando-se adequada para o cálculo das concentrações de HSA nos estudos de cinética de adsorção em  $Fe_3O_4@TEOS$ . Com a curva resultante pode-se obter as concentrações de HSA de acordo com o tempo, sendo estes dados utilizados para o cálculo das quantidades de HSA adsorvidas nas nanopartículas. Posteriormente ajustou-se os modelos de cinética de

pseudo-primeira e segunda ordens, Elovich e Avrami. As informações dos modelos ajustados, como estimativas dos parâmetros, desvio padrão e os valores-p são apresentados na Tabela 29:

Tabela 29 - Equações, estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Modelo	Expressão	Parâmetro	Estimativa	D.p.	Valor-p
<b>PPO</b>	$q_t = q_{e1}(1 - \exp(-k_f t))$	$q_{e1}$ (mg g <sup>-1</sup> )	6,7682	0,2121	<0,0001***
		$k_f$ (min <sup>-1</sup> )	8,5146	1,607	0,0001***
<b>PSO</b>	$q_t = \frac{q_{e2}^2 k_s t}{1 + q_{e2} k_s t}$	$q_{e2}$ (mg g <sup>-1</sup> )	7,0136	0,1598	<0,0001***
		$k_s$ (g mg <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> )	1,8113	0,3324	0,0001***
<b>Elovich</b>	$q_t = \frac{\ln(1 + \alpha \beta t)}{\beta}$	$\alpha$ (mg g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> )	6771,9584	5271,4509	0,2213
		$\beta$ (mg g <sup>-1</sup> )	1,6539	0,1372	<0,0001***
		$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	7,6033	0,2804	<0,0001***
<b>Avrami</b>	$q_t = q_e(1 - \exp(-k_{AV} t^{n_{AV}}))$	$k_{AV}$ (min <sup>-1</sup> )	1,4717	0,1755	<0,0001***
		$n_{AV}$	0,2856	0,0384	<0,0001***

Fonte: Autor (2023).

\*\*\* significativo a 0,1%.

D.p.: Desvio padrão; PPO: Pseudo-primeira ordem; PSO: Pseudo-segunda ordem.

De acordo com a Tabela 29, apenas o parâmetro  $\alpha$  do modelo de Elovich foi não significativo ( $p = 0,2213$ ). A fim de se avaliar a adequabilidade dos modelos ajustados, verificou-se as pressuposições da regressão não linear, sendo os resultados apresentados na Tabela 30:

Tabela 30 - Análise das pressuposições dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Modelo	Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pearse	Teste de Breusch-Pagan
PPO	0,2234	0,0166*	0,3171
PSO	0,1149	0,0241*	0,6677
Elovich	0,6103	0,0986	0,4920
Avrami	0,5751	0,0990	0,3726

Fonte: Autor (2023).

PPO: Pseudo-primeira ordem; PSO: Pseudo-segunda ordem.

Ao que se pode observar da Tabela 30, apenas os modelos de cinética de pseudo primeira e segunda ordem apresentaram uma violação na pressuposição de independência dos resíduos ( $p = 0,0166$  e  $0,0241$  respectivamente), o que indica que não houve um ajuste satisfatório dos mesmos. Com relação aos demais modelos, as conclusões obtidas são válidas. Prosseguiu-se então para a seleção do modelo que melhor se ajustou aos dados, primeiramente analisando-se os critérios de informação AICc, AIC e BIC. Os resultados são apresentados na Tabela 31:

Tabela 31 - Critérios de informação dos modelos de cinética de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

<b>Modelos</b>	<b>AICc</b>	<b>AIC</b>	<b>BIC</b>
Avrami	<b>17,4509</b>	<b>13,4509</b>	<b>16,2831</b>
Elovich	21,3267	19,1449	21,2690
PSO	26,1205	23,9386	26,0628
PPO	37,4842	35,3024	37,4266

Fonte: Autor (2023).

De acordo com a Tabela 31, o modelo de Avrami apresentou os menores valores dos critérios, com uma diferença maior que 2 unidades em relação aos demais, o que indica melhor adequação aos dados. Para reafirmar este resultado, calculou-se as métricas de ajuste e os resultados são apresentados na Tabela 32:

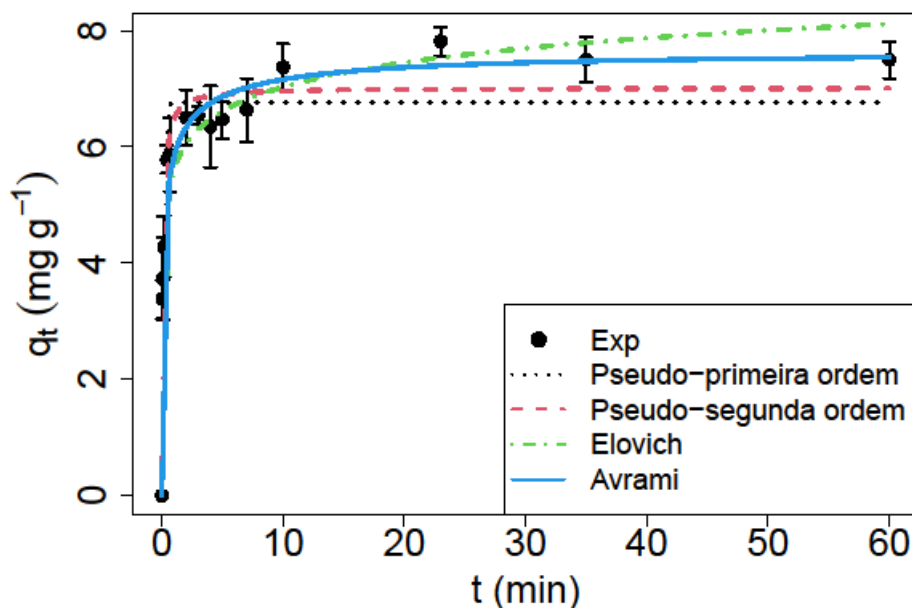
Tabela 32 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Função	Modelos de cinética de adsorção				Nome da função
	Avrami	Elovich	PSO	PPO	
SSE	<b>1,2631</b>	2,1096	2,904	6,1945	Soma de quadrado dos erros
HYBRID	<b>1,8853</b>	3,1354	4,1745	9,5015	Erro fracionário híbrido
ARE	<b>4,2784</b>	6,2938	7,1459	10,6105	Erro médio realtivo
EABS	<b>3,5147</b>	4,9486	5,8113	8,2879	Soma de erros absolutos
MPSD	<b>5,6678</b>	7,7986	8,9688	13,9401	D.p. percentual de Marquardt
SRE	<b>0,0714</b>	0,1044	0,1116	0,1684	Desvio padrão do erro relativo
$\chi^2$	<b>0,2074</b>	0,3762	0,5009	1,1402	Estatística de Qui-quadrado
RSD	<b>0,3244</b>	0,4028	0,4726	0,6903	Desvio padrão residual
Log-veros	<b>-2,7254</b>	-6,5724	-8,9693	-14,6512	Log-verossimilhança
R <sup>2</sup>	<b>0,9792</b>	0,9653	0,9527	0,9015	Coeficiente de determinação
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	<b>0,9736</b>	0,9595	0,9448	0,8850	Coeficiente de determ. ajustado

Fonte: Autor (2023).

Os resultados apresentados na Tabela 32 mostram que o modelo de Avrami apresentou os menores valores (em negrito) de todas as métricas de avaliação da qualidade de ajuste e maiores valores de log-verossimilhança e dos coeficientes de determinação múltipla (R<sup>2</sup>) e ajustado (R<sup>2</sup><sub>ajust</sub>). De acordo com o modelo de ordem fracionária de Avrami, a capacidade máxima adsortiva na concentração de HSA estuda é de 7,60 mg g<sup>-1</sup> (IC95%: 7,09 - 8,70), as demais discussões são análogas às feitas para cinética com as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA. As curvas do modelo de cinética de Avrami e os demais modelos ajustados são apresentados no Gráfico 18:

Gráfico 18 - Modelos de cinética de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .



Fonte: Autor (2023).

A possibilidade de resistência de difusão intrapartícula afetar o processo de adsorção foi explorada usando o modelo de difusão intrapartícula de Weber-Morris, cujas informações são apresentadas na Tabela 33:

Tabela 33 - Informações dos modelos de difusão intrapartícula de Weber - Morris para os dados de cinética de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

Modelo	Parâmetro	Estimativa	D.p.	Valor-p	R <sup>2</sup>
Modelo 1	$C_1$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	0,7570	0,5778	0,2814	0,9128
	$k_{id1}$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0,5}$ )	8,5501	1,5261	0,0112***	
Modelo 2	$C_2$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	5,4941	0,1901	<0,0001***	0,8318
	$k_{id2}$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0,5}$ )	0,5171	0,0949	0,0016**	
Modelo 3	$C_3$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	7,5008	0,3916	0,0027**	0,0073
	$k_{id3}$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0,5}$ )	0,0084	0,0692	0,9146	

Fonte: Autor (2023).

\*\*\*Significativo a 0,1%; \*\*Significativo a 1%; D.p.: Desvio padrão.

A análise das pressuposições dos modelos é apresentada na Tabela 34:

Tabela 34 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições dos modelos de Weber-Morris no estudo de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

<b>Modelo</b>	<b>Teste de Shapiro-Wilk</b>	<b>Teste de Box-Pearse</b>	<b>Teste de Breusch-Pagan</b>
Modelo 1	0,6485	0,8014	0,1240
Modelo 2	0,2006	0,8050	0,0856
Modelo 3	0,1764	0,3157	0,3652

Fonte: Autor (2023).

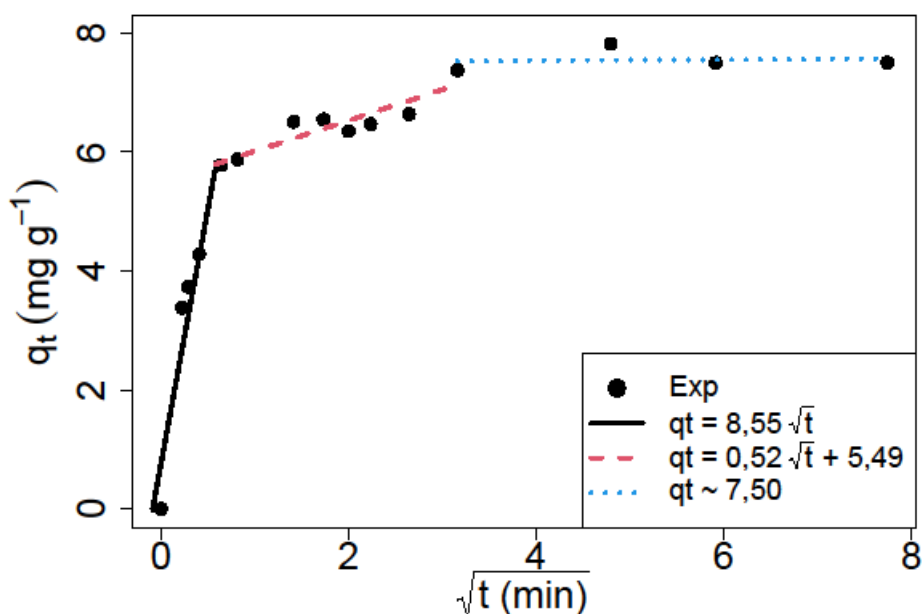
Ao que se pode observar na Tabela 34, nenhuma pressuposição da análise de regressão foi violada para os modelos ajustados, sendo válidas as informações obtidas a partir dos mesmos. Conforme pode ser observado na Tabela 32, os modelos 1 e 2 foram estatisticamente significativos, uma vez que os parâmetros  $k_{id1}$  e  $k_{id2}$ , taxas de difusão intrapartícula, foram significativos ( $p = 0,0112$  e  $p = 0,0016$ , respectivamente,  $\rho = \sqrt{R^2}$ ), observa-se também que os modelos apresentaram alta correlação aos dados ( $\rho_1 = 0,9554$  e  $\rho_2 = 0,9120$  respectivamente). Estes resultados, sugerem que a velocidade do processo de adsorção é influenciada por duas etapas determinantes, a primeira que ocorre à uma taxa  $k_{id1} = 8,55 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$  pode ser atribuída ao processo de difusão da HSA sobre a superfície das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS juntamente com a dispersão (desagregação) das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS na solução de HSA, que corresponde à etapa mais rápida. Nesta etapa inicial a quantidade de HSA adsorvida é 0, uma vez que o parâmetro  $C_1$  foi não significativo ( $p = 0,2814$ ).

A segunda do processo, a qual ocorre à uma taxa  $k_{id2} = 0,52 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ , corresponde à difusão da HSA nos poros das multicamadas de HSA adsorvidas até que se atinja a saturação máxima da superfície das nanopartículas, que é a etapa mais lenta, limitante da velocidade do processo de adsorção. Durante esta etapa a quantidade de HSA adsorvida é de  $C_2 = 5,49 \text{ mg g}^{-1}$ .

Para o modelo 3, a taxa de difusão de HSA é  $k_{id3} = 0$  ( $p = 0,9146$ ), uma vez que partir desta etapa a superfície das nanopartículas já está saturada e a quantidade de HSA adsorvida é de cerca de  $C_3 = 7,39 \text{ mg g}^{-1}$  ( $p = 0,0073$ ), nota-se que este valor é concordante com a capacidade máxima de adsorção  $q_e = 7,5 \text{ mg g}^{-1}$  do modelo de Avrami.

No Gráfico 19 são apresentados os modelos de Weber-Morris para os dados de cinética de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Gráfico 19 - Modelos de difusão intrapartícula de Weber-Morris para cinética de adsorção de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.



Fonte: Autor (2023).

De modo geral, na maioria dos estudos de adsorção de proteínas, são ajustados apenas os modelos de cinética de pseudo-primeira e segunda ordens, o que muitas vezes justifica a grande quantidade de trabalhos em que uma ou outra é citada como melhor ajuste aos dados. No estudo de Wang *et al.* (2013), os dados de cinética de adsorção de BSA em nanopartículas magnéticas de carboximetilquitosana foram melhor ajustados pelo modelo de pseudo-segunda ordem. Resultados semelhantes também foram encontrados por Wang *et al.* (2017a) estudando a adsorção de BSA em nanopartículas de prata, e por Santos *et al.* (2021) para cinética de adsorção de lisozima em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA. Em Maleki, Moradi e Tahmasebi (2017) e em Liu *et al.* (2017), o modelo de pseudo-primeira ordem foi o que melhor se ajustou aos dados de adsorção de BSA em nanopartículas de ouro e em nanopartículas magnéticas de ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> respectivamente.

### 4.3.3 Estudos das isotermas de adsorção

Analogamente ao que foi feito para os estudos de cinética de adsorção, inicialmente avaliou-se o coeficiente de variação dos calibradores para obtenção da curva analítica nos pHs de ótima adsorção para cada nanopartícula. Os ajustes das isotermas de cada nanopartícula serão apresentados a seguir.

#### 4.3.3.1 Isotermas de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA

Os valores dos coeficientes de variação obtidos para os calibradores da curva de HSA em pH 3,5 são apresentados na Tabela 35 a seguir.

Tabela 35 - Coeficientes de variação (%) para os calibradores da curva analítica de HSA em pH 3,5.

Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Coeficientes de variação (%)
0	..
20	21,73
40	4,14
60	1,16
80	4,57
100	2,51
125	1,10
150	1,86
200	2,61
250	2,47
300	0,69
350	1,68
400	0,98
500	0,72
600	0,83

Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado na Tabela 35, apenas o calibrador na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> apresentou um coeficiente de variação elevado (21,73%), mas como este valor está pouco acima dos 20% e a média da absorbância das triplicatas apresentou um comportamento dentro da linha de tendência, optou-se por manter o calibrador de 20 mg L<sup>-1</sup> no ajuste das curvas. A curva de calibração mais adequada aos dados foi um polinômio de segundo grau, cujas informações são apresentadas na Tabela 36:

Tabela 36 - Informações da curva de calibração de HSA em pH 3,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) e coeficiente de determinação múltipla (R<sup>2</sup>).

Par.	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p	Valor-p <sub>m</sub>	R <sup>2</sup> (%)
β <sub>0</sub>	0,0086	0,0039	2,1731	0,0505		
β <sub>1</sub>	0,0020	3,7 x 10 <sup>-5</sup>	55,1117	<0,0001	<0,0001	99,93
β <sub>2</sub>	-1,3 x 10 <sup>-6</sup>	6,3 x 10 <sup>-8</sup>	-19,8825	<0,0001		

Fonte: Autor (2023).

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

Ao que se pode observar na Tabela 36, a estimativa do intercepto não foi significativa ( $p = 0,0505$ ), o que indica que quando não há HSA na solução, a absorbância é estatisticamente igual a zero. O modelo apresentou um R<sup>2</sup> bastante elevado, indicando que 99,93% da variabilidade dos dados de absorbância de acordo com a concentração de HSA pode ser explicada pelo modelo. Na Tabela 37 é apresentada a análise das pressuposições da curva de HSA.

Tabela 37 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos da curva de HSA em pH 3,5.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,2676	0,9756	0,5132

Fonte: Autor (2023).

De acordo com a Tabela 37, a curva de HSA em pH 4,5 não apresentou nenhuma violação nas pressuposições da regressão, sendo adequado para o

cálculo das concentrações de HSA nos estudos de isotermas de adsorção em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

Com a utilização da curva de calibração, obteve-se os dados de concentrações de equilíbrio e posteriormente os de quantidades de HSA adsorvidas. Os coeficientes de variações destas variáveis de acordo com as concentrações de HSA iniciais são apresentados na Tabela 38:

Tabela 38 - Coeficientes de variação (%) para os dados de concentrações de HSA no equilíbrio e quantidades adsorvidas nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  de acordo com as concentrações iniciais.

<b>Concentrações Iniciais (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>C.V.s das <math>c_e</math> (%)</b>	<b>C.V.s das <math>q_e</math> (%)</b>
100	12,65	8,14
150	8,25	10,34
200	3,69	5,24
250	5,27	10,20
300	3,97	9,97
400	0,84	2,67
500	2,78	9,54
600	2,94	13,45
700	3,39	17,22
850	3,93	31,29
1000	4,57	35,50

Fonte: Autor (2023).

C.V.s.: Coeficientes de variação;  $c_e$ : concentrações de HSA de equilíbrio;  $q_e$ : quantidades de HSA adsorvidas.

Ao que se pode observar na Tabela 38, alguns pontos apresentaram elevados coeficientes de variação, o que ocorreu devido à presença de *outliers* nos dados, principalmente nas concentrações mais elevadas. Diante disso, foi necessária a retirada de alguns destes *outliers* quando os mesmos prejudicaram o ajuste das isotermas, tal retirada foi feita baseada no gráfico de dispersão dos dados, nos coeficientes de variação da Tabela 38 e no teste de Grubbs (1950).

Obtidos os dados, ajustou-se os principais modelos de isotermas de adsorção de dois e de três parâmetros. Na Tabela 39 a seguir são apresentadas as principais informações dos modelos ajustados das isotermas de dois parâmetros:

Tabela 39 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de dois parâmetros para adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Modelos	Expressão	Parâmetros	Estimativas	D. p.	Valor-p
Langmuir	$q_e = \frac{q_{\max} b c_e}{1 + b c_e}$	q <sub>max</sub>	11,9298	0,4453	<0,0001***
		b	0,0171	0,0031	0,0004***
Freundlich	$q_e = k_F c_e^{1/n_F}$	n <sub>F</sub>	2,7311	0,3213	<0,0001***
		k <sub>F</sub>	4,5971	0,4187	<0,0001***
Dubinin-	$q_e = (q_s) \exp(-k_{ad} e^2)$	q <sub>s</sub>	10,0692	0,4897	<0,0001***
Radushkevich	$e = RT \ln(1 + 1/c_e)$	k <sub>ad</sub>	0,0002	0,0001	0,0290*
Temkin	$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln(A_T c_e)$	b <sub>T</sub>	1281,8435	102,7571	<0,0001***
		A <sub>T</sub>	0,4663	0,1821	0,0307*
Elovich	$q_e = q_m k_e \exp\left(\frac{c_e}{q_m}\right)$	q <sub>m</sub>	1691,2202	337,1823	0,0007
		k <sub>e</sub>	0,0044	0,0007	0,0001***
Harkins-Jura	$q_e = \left(\frac{A_{HJ}}{B_{HJ} - \log(c_e)}\right)^{1/2}$	A <sub>HJ</sub>	37,787	4,4805	<0,0001***
		B <sub>HJ</sub>	4,5100	0,2224	<0,0001***
Halsey	$q_e = \left(\frac{K_H}{c_e}\right)^{1/n_H}$	K <sub>H</sub>	0,0099	0,0095	0,3244
		n <sub>H</sub>	-4,5971	0,4187	<0,0001***
Jovanovic	$q_e = q_{\max} (1 - e^{-K_J c_e})$	q <sub>max</sub>	10,742	0,4411	<0,0001***
		K <sub>J</sub>	0,0114	0,0020	0,0003***

Fonte: Autor (2023).

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

D. p.: desvio padrão.

Ao que se pode observar da Tabela 39, apenas a isoterma de Halsey apresentou parâmetro com estimativa estatisticamente não significativa. Para as demais, todas as estimativas foram significativas. Na Tabela 40 são apresentadas as principais informações dos modelos ajustados das isotermas de três parâmetros:

Tabela 40 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de três parâmetros para adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Modelos	Expressão	Parâmetros	Estimativa	D. p.	Valor-p
Sips	$q_e = \frac{q_{\max} K_S c_e^{1/b_{eS}}}{1 + a_S c_e^{1/b_{eS}}}$	q <sub>max</sub>	18,1866	7,8797	0,0498*
		K <sub>S</sub>	0,0895	0,0237	0,0054*
		b <sub>eS</sub>	2,2547	1,0052	0,0552
Koble-Corrigan	$q_e = \frac{A_K c_e^{n_K}}{1 + B_K c_e^{n_K}}$	A <sub>K</sub>	18,1866	7,8797	0,0498*
		n <sub>K</sub>	0,4435	0,1977	0,0552
		B <sub>K</sub>	0,0895	0,0237	0,0054**
Toth	$q_e = \frac{q_{\max} k_T c_e}{[1 + (k_T c_e)^{n_T}]^{1/n_T}}$	q <sub>max</sub>	23,1907	20,2669	0,2856
		k <sub>T</sub>	0,5278	2,371	0,8294
		n <sub>T</sub>	3,7842	3,5487	0,3174
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_{RP} + c_e}{1 + a_{RP} c_e^{g_{RP}}}$	K <sub>RP</sub>	0,8496	1,0302	0,4335
		a <sub>RP</sub>	0,2329	0,3682	0,5447
		g <sub>RP</sub>	0,8245	0,0573	<0,0001***
Langmuir-Freundlich	$q_e = \frac{q_{LF} (K_{LF} c_e)^{m_{LF}}}{1 + (K_{LF} c_e)^{m_{LF}}}$	q <sub>LF</sub>	18,1863	7,8792	0,0498*
		K <sub>LF</sub>	0,0043	0,0088	0,6362
		m <sub>LF</sub>	0,4435	0,1977	0,0552
Hill	$q_e = \frac{q_{\max} c_e^{n_H}}{K_H + c_e^{n_H}}$	q <sub>max</sub>	18,1865	7,8795	0,0498*
		n <sub>H</sub>	0,4435	0,1977	0,0552
		K <sub>H</sub>	11,1785	2,9613	0,0054*
Khan	$q_e = \frac{q_{\max} b_K c_e}{(1 + b_K c_e)^{a_K}}$	q <sub>max</sub>	4,8706	2,4541	0,0825
		b <sub>K</sub>	0,1346	0,2054	0,5306
		a <sub>K</sub>	0,8129	0,0498	<0,0001***
Radke-Prausnitz	$q_e = \frac{q_{RP11} K_{RP11} c_e}{1 + K_{RP11} c_e^{m_{RP11}}}$	q <sub>RP11</sub>	3,6485	1,4112	0,0323*
		K <sub>RP11</sub>	0,2329	0,3682	0,5447
		m <sub>RP11</sub>	0,8245	0,0573	<0,0001***
Brunauer, Emmett and Teller	$q_e = \frac{q_m K_S c_e}{(1 - K_L c_e)(1 - K_L c_e + K_S c_e)}$	q <sub>m</sub>	10,1881	0,8954	<0,0001***
		K <sub>S</sub>	0,0269	0,0089	0,0161*
		K <sub>L</sub>	0,0002	0,0001	0,0975
Jossens	$c_e = \frac{q_e}{H} \exp(F q_e^p)$	H	3,7565	109,790	0,9735
				2	
		FF	0,9841	15,3854	0,9506
		p	0,7022	4,2199	0,8720

Fonte: Autor (2023).

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

Ao que se pode observar da Tabela 40, todas as isotermas de três parâmetros apresentaram pelo menos um parâmetro com estimativa estatisticamente não significativa ao nível de 5%, no entanto alguns dos valores-p associados à estas estimativas estão muito próximas do valor de 0,05, como por exemplo, o parâmetro  $b_{es}$  da isoterma de Sips com valor-p = 0,0552. Como a variabilidade aleatória dos dados de adsorção de HSA nas  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$  é relativamente alta, parâmetros cujas estimativas apresentaram valores-p muito próximos a 5% foram considerados significativos. Diante disso, apenas os modelos de Sips, Koble-Corrigan e de Hill apresentaram todos os parâmetros com estimativas significativas. A análise das pressuposições dos modelos apresentados na Tabela 39 e da Tabela 40 é apresentada na Tabela 41:

Tabela 41 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições das isotermas de adsorção de HSA em  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .

<b>Modelos</b>	<b>Teste de Shapiro-Wilk</b>	<b>Teste de Box-Pearse</b>	<b>Teste de Breusch-Pagan</b>
Elovich	0,8467	0,0780	0,9583
Dubini-Radushkevich	0,0353*	0,0908	0,3076
Harkins-Jura	0,4865	0,2824	0,2715
Jovanovic	0,4541	0,3128	0,1719
Freundlich	0,4448	0,6352	0,1830
Halsey	0,4447	0,6352	0,1830
Langmuir	0,7806	0,7279	0,0724
BET	0,0334*	0,7927	0,7575
Khan	0,2774	0,8714	0,6595
Redlich-Peterson	0,2468	0,9110	0,6942
Radke-Prausnitz	0,2468	0,9110	0,6942
Sips	0,1583	0,9152	0,8019
Hill	0,1583	0,9152	0,8019
Koble-Corrigan	0,1583	0,9152	0,8019
Langmuir-Freundlich	0,1583	0,9152	0,8019
Toth	0,1668	0,9561	0,7907
Jossens	0,1802	0,6164	0,1932

Fonte: Autor (2023).

BET: Brunauer, Emmett e Teller

Ao que se pode observar na Tabela 41, apenas os modelos de Dubinin-Radushkevich e de BET apresentaram violações nas pressuposições, sendo os resíduos não normais ( $p = 0,0353$  e  $0,0334$  respectivamente), não se mostrando adequados para análise/descrição dos dados. Na etapa seguinte obteve-se os critérios de informação para seleção dos modelos que melhor se ajustaram aos dados de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ . Os resultados são apresentados na Tabela 42:

Tabela 42 - Critérios de seleção dos modelos de isotermas de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

<b>Modelos</b>	<b>AICc</b>	<b>AIC</b>	<b>BIC</b>
Temkin	<b>22,4866</b>	<b>19,0581</b>	<b>20,2518</b>
Halsey	<b>23,5542</b>	<b>20,1256</b>	<b>21,3193</b>
Freundlich	<b>23,5542</b>	<b>20,1256</b>	<b>21,3193</b>
Hill	26,8586	<b>20,1919</b>	<b>21,7835</b>
Sips	26,8586	<b>20,1919</b>	<b>21,7835</b>
Koble-Corrigan	26,8586	<b>20,1919</b>	<b>21,7835</b>
Langmuir-Freundlich	26,8586	<b>20,1919</b>	<b>21,7835</b>
Toth	27,1446	<b>20,4780</b>	<b>22,0695</b>
Harkins-Jura	27,4986	24,0700	25,2637
Radke-Prausnitz	28,0070	21,3404	22,9319
Redlich-Peterson	28,0070	21,3404	22,9319
Khan	28,1949	21,5282	23,1198
Langmuir	29,8514	26,4228	27,6165
BET	32,1934	25,5268	27,1183
Jovanovic	39,0965	35,668	36,8616
Elovich	39,6511	36,2225	37,4162
Dubini-Radushkevich	45,9529	42,5243	43,7180
Jossens	148,5564	141,8897	143,4813

Fonte: Autor (2023).

BET: Brunauer, Emmett and Teller

AICc: Critério de informação de Akaike corrigido; AIC: Critério de informação de Akaike; BIC: Critério de informação Bayesiano.

Para a discriminação entre os modelos por meio dos critérios de seleção, a diferença entre os valores desses critérios deve ser maior ou igual a dois. Diante disso, conforme a Tabela 42, os modelos que apresentaram os menores valores dos critérios AICc, AIC e BIC, também apresentaram esses valores bem próximos entre si, só sendo possível uma diferenciação por meio do AICc. Dessa forma, os modelos que melhor se ajustaram aos dados foram os de Temkin, Halsey e Freundlich seguidos pelos de Hill, Sips, Koble-Corrigan e Langmuir-Freundlich. Prosseguiu-se então a etapa de seleção pela obtenção dos valores das métricas de avaliação da qualidade do ajuste, os quais são apresentados na Tabela 43:

Tabela 43 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos de isotermas de adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Modelos	SSE	HYBRID	ARE	EABS	MPSD	SRE	X <sup>2</sup>	Log-v.	RSD	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub>
Koble-C.	<b>1,9511</b>	2,5729	4,0342	4,0388	5,3621	0,0648	<b>0,2058</b>	<b>-6,0959</b>	0,4938	<b>0,9495</b>	0,9278
Sips	<b>1,9511</b>	2,5729	4,0342	4,0388	5,3621	0,0648	<b>0,2058</b>	<b>-6,0959</b>	0,4938	<b>0,9495</b>	0,9278
Hill	<b>1,9511</b>	2,5729	4,0342	4,0388	5,3621	0,0648	<b>0,2058</b>	<b>-6,0959</b>	0,4938	<b>0,9495</b>	0,9278
Lang.-Freund	<b>1,9511</b>	2,5729	4,0342	4,0388	5,3621	0,0648	<b>0,2058</b>	<b>-6,0959</b>	0,4938	<b>0,9495</b>	0,9278
Toth	2,0025	2,6318	4,0604	4,0753	5,4129	0,0655	0,2105	-6,2390	0,5003	0,9481	0,9259
Temkin	2,1109	<b>2,5118</b>	4,1925	4,1724	5,3442	0,0683	0,2261	-6,5290	<b>0,4843</b>	0,9453	<b>0,9317</b>
Redlich-P.	2,1658	2,7973	4,0957	4,1610	5,5240	0,0668	0,2238	-6,6702	0,5203	0,9439	0,9199
Radke-P.	2,1658	2,7973	4,0957	4,1610	5,5240	0,0668	0,2238	-6,6702	0,5203	0,9439	0,9199
Khan	2,2031	2,8268	4,0773	4,1625	5,5306	0,0668	0,2261	-6,7641	0,5248	0,9429	0,9185
Halsey	2,3260	2,5251	<b>3,7410</b>	<b>4,0292</b>	<b>5,0618</b>	<b>0,0643</b>	0,2273	-7,0628	0,5084	0,9398	0,9248
Freundlich	2,3260	2,5251	<b>3,7410</b>	<b>4,0292</b>	<b>5,0618</b>	<b>0,0643</b>	0,2273	-7,0628	0,5084	0,9398	0,9248
BET	3,1688	4,6010	5,4951	5,2636	7,5621	0,0890	0,3681	-8,7634	0,6294	0,9186	0,8837
Harkins-Jura	3,3292	3,7515	4,8523	5,0275	6,3425	0,0836	0,3376	-9,0350	0,6082	0,9151	0,8939
Langmuir	4,1232	6,0429	6,0713	5,4767	9,1626	0,1052	0,5439	-10,2114	0,6769	0,8989	0,8737
Jovanovic	9,5554	14,5878	8,5087	7,6153	14,4800	0,1540	1,3129	-14,834	1,0304	0,8122	0,7653
Elovich	10,0495	12,8074	9,0410	8,8470	12,6076	0,1628	1,1527	-15,1113	1,0567	0,7407	0,6759
Dubini-R.	17,8216	23,7567	14,0867	13,3002	17,3017	0,2303	2,1381	-18,2622	1,4072	0,5418	0,4272
Jossens	124468,5622	2363171,75	3448,3816	805,8985	1122,6187	12,3841	11186,195	-66,9448	124,734	0,9379	0,9113

Fonte: Autor (2023).

SSE: Soma de quadrado dos erros; HYBRID: Erro fracionário híbrido; ARE: Erro médio realtivo; EABS: Soma de erros absolutos; MPSD: Desvio padrão percentual de Marquardt; SRE: Desvio padrão do erro relativo;  $\chi^2$ : Estatística de Qui-quadrado; RSD: Desvio padrão residual; Log-v.: Log-verossimilhança; R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação múltipla; R<sup>2</sup><sub>ajust</sub>: Coeficiente de determinação múltipla ajustado.

Dubini-R.: Dubini-Radushkevich; Lang.-Freund.: Langmuir-Freundlich; Redlich-P.: Redlich-Peterson; Radke-P: Radke-Prausnitz; Koble-C.: Koble-Corrigan.

Os valores apresentados na Tabela 43 são condizentes com os resultados dos critérios de informação (TABELA 42) e indica que os modelos que melhor se ajustaram aos dados foram os de Koble-Corrigan, Sips, Hill, Langmuir-Freundlich, Toth, Temkin, Redlich-Peterson, Radke-Prausnitz, Khan, Halsey e Freundlich, conforme os elevados valores dos coeficiente de determinação múltipla ( $R^2 > 0,90$ ), coeficiente de determinação múltipla ajustado ( $R^2_{ajus} > 0,90$ ) e da função de log-verossimilhança, bem como os menores valores das métricas de ajuste (SSE, HYBRID, ARE, EABS, MPSD, SRE,  $\chi^2$  e RSD). É importante ressaltar que nenhum dos modelos apresentou ao mesmo tempo todos os melhores valores das métricas de avaliação da qualidade de ajuste. Como os modelos de Langmuir-Freundlich, Toth, Redlich-Peterson, Radke-Prausnitz, Khan e Halsey apresentaram parâmetros não significativos, eles foram desprezados da análise.

De acordo com Sips (1948), o modelo de Sips possui uma premissa para ser utilizado, a qual estabelece que  $1/b_{eS}$  deve ser menor que a unidade. Como a estimativa de  $b_{eS}$  aqui obtida foi  $b_{eS} = 2,25$  (TABELA 40) então  $1/b_{eS} = 0,44$ , o que mostra que o modelo de Sips pode ser avaliado para modelagem dos dados. Analogamente, de acordo com Koble e Corrigan (1952), a isoterma proposta por estes autores só é válida se a estimativa do parâmetro  $n_{KC}$  for maior ou igual a 1, como obteve-se  $n_{KC} = 0,44$  (TABELA 40), tal modelo é inapropriado.

As isotermas de Hill e Sips são reparametrizações dos modelos de Langmuir e Freundlich, que possuem a mesma estrutura de modelo, o que justifica tais modelos apresentarem os mesmos valores dos critérios de seleção, métricas de ajuste e resultados da análise de resíduos. Para diferenciação entre eles deve-se avaliar a curvatura do modelo devido ao efeito da parametrização, quanto menor o valor da curvatura mais adequado é o modelo. Para a isoterma de Sips a curvatura obtida foi de 11,00, enquanto para a de Hill o valor foi 41,33, o que sugere a escolha do modelo de Sips.

Embora a isoterma de Temkin tenha apresentado resultados satisfatórios do ponto de vista estatístico, ela não será utilizada nas discussões. De acordo com Foo e Hameed (2010) ela é mais adequada em sistemas de adsorção em fase gasosa. Conforme Febrianto *et al.* (2009), a adsorção na fase líquida é um fenômeno mais complexo do que a adsorção na fase gasosa, pois as moléculas adsorvidas não estão necessariamente organizadas em uma estrutura compacta com orientação idêntica, soma-se a isso a presença de moléculas de solvente e possíveis interações

intermoleculares da HSA. Outros fatores podem aumentar a complexidade da adsorção da fase líquida, incluindo pH, solubilidade do HSA no solvente, temperatura e os grupamentos químicos na superfície das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

A isoterma de Temkin assume que a queda do calor de adsorção é um fenômeno linear ao invés de logarítmico. O calor de adsorção de todas as moléculas na camada diminuiria linearmente com a cobertura devido às interações HSA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ . Uma vez que a base de derivação para a equação de Temkin é uma suposição simples, a referida complexidade envolvida na adsorção da fase líquida discutida anteriormente não é levada em conta. Como resultado, esta equação muitas vezes não é adequada para a representação de dados experimentais em sistemas complexos. O que reforça tais argumentos são os resultados das isotermas de Sips e Radke-Prausnitz que corroboram com a isoterma de Freundlich, conforme será discutido posteriormente.

Diante das justificativas apresentadas para a recusa da isoterma de Temkin, dos resultados de seleção discutidos, a análise das pressuposições da regressão, significância estatística dos parâmetros, os valores dos critérios de seleção, das métricas de ajuste e premissas dos próprios modelos, os modelos que melhor se ajustaram aos dados foram o de Freundlich seguido por Sips.

O modelo de Freundlich prevê que o processo de adsorção da HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  ocorre em multicamadas, sendo os sítios de adsorção energeticamente heterogêneos, o valor de  $1/n_F = 0,22$  (TABELA 39), estando na faixa  $0 < 1/n_F < 1$ , o que indica que a adsorção é considerada favorável, com uma intensidade de adsorção e heterogeneidade da superfície relativamente altas, uma vez que quanto mais  $1/n_F$  está próximo de 0 no intervalo de 0 a 1, maior a intensidade da adsorção (FOO; HAMEED, 2010).

De acordo com o modelo de Sips, a capacidade máxima de adsorção de HSA nas nanopartículas é  $q_{\max} = 18,19 \text{ mg g}^{-1}$  (TABELA 40). O parâmetro  $q_{\max}$  parece ter sido superestimado pela isoterma de Sips e todas as outras de três parâmetros, tais como a de Hill, Koble-Corrigan e a de Toth, uma vez que a maior quantidade  $q_e$  experimental encontrada foi  $q_e = 11,51 \text{ mg g}^{-1}$ , por outro lado a estimativa obtida pela isoterma de Langmuir  $q_{\max} = 11,93 \text{ mg g}^{-1}$  é mais condizente com a realidade dos dados experimentais. A estimativa obtida para a constante de equilíbrio ou de afinidade foi  $a_s = 0,09 \text{ (L mg}^{-1}\text{)}^{-1/n}$ . Para o parâmetro de afinidade, a estimativa obtida foi  $b_{es} = 2,25$ , de modo que  $1/b_{es} \neq 1$ , o que indica que o processo de adsorção é

energeticamente heterogêneo, estando de acordo com o que foi discutido para a isoterma de Freundlich.

Quanto à isoterma de Radke-Prausnitz, de acordo com Liu e Liu (2008), a expressão pode ser rearranjada do seguinte modo:

$$q_e = \frac{a_{RP} \times c_e^{m_{RP}}}{K_{RP} \times c_e^{m_{RP}-1}}$$

em que  $K_{RP} = a_{RP}/b_{RP}$ . Para  $K_{RP} \gg c_e^{m_{RP}-1}$  a equação original torna-se uma isoterma do tipo Freundlich:

$$q_e = \frac{a_{RP} \times c_e^{m_{RP}}}{K_{RP}}$$

Por outro lado, quando  $K_{RP} \ll c_e^{m_{RP}-1}$ , a equação pode ser simplificada como:

$$q_e = a_{RP} \times c_e$$

A partir desse rearranjo e das estimativas obtidas para os parâmetros da isoterma de Radke-Prausnitz, obteve-se  $K_{RP} = 15,67$ . Comparando-se os valores de  $c_e^{m_{RP}-1}$  com o valor de  $K_{RP}$  obteve-se a Tabela 44:

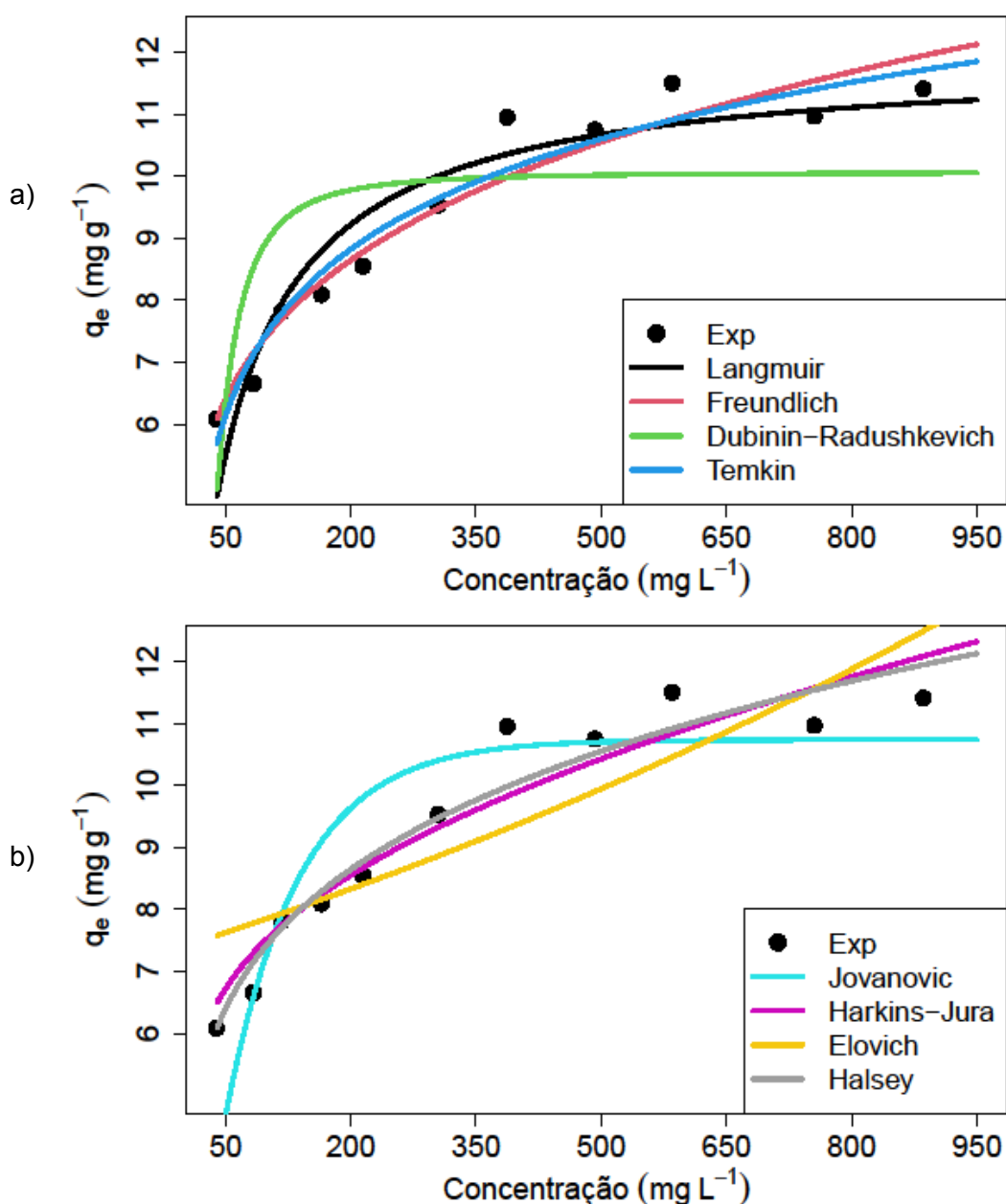
Tabela 44 - Comparação dos valores de  $c_e^{m_{RP}-1}$  com o valor de  $K_{RP}$  para as  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .

Concentração	$c_e^{m_{RP}-1}$	$K_{RP} > c_e^{m_{RP}-1}$	$K_{RP} < c_e^{m_{RP}-1}$
39,138	0,525	sim	não
83,434	0,460	sim	não
117,399	0,433	sim	não
164,843	0,408	sim	não
214,491	0,390	sim	não
304,644	0,367	sim	não
387,084	0,351	sim	não
492,479	0,337	sim	não
584,865	0,327	sim	não
755,155	0,313	sim	não
885,851	0,304	sim	não

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar da Tabela 44, em todas regiões de concentração de HSA obteve-se  $K_{RP} > c_e^{m_{RP}-1}$ , o que significa que a isoterma de Radke-Prausnitz indica uma favorabilidade do modelo de Freundlich. Tais resultados também são coerentes com a seleção dos modelos, a qual demonstrou o ajuste mais adequado da isoterma de Freundlich em comparação ao de Langmuir. No Gráfico 20 (a) e (b) são apresentados os gráficos das isotermas de dois parâmetros:

Gráfico 20 - Modelos de isotermas de dois parâmetros de adsorção de HSA nas  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .



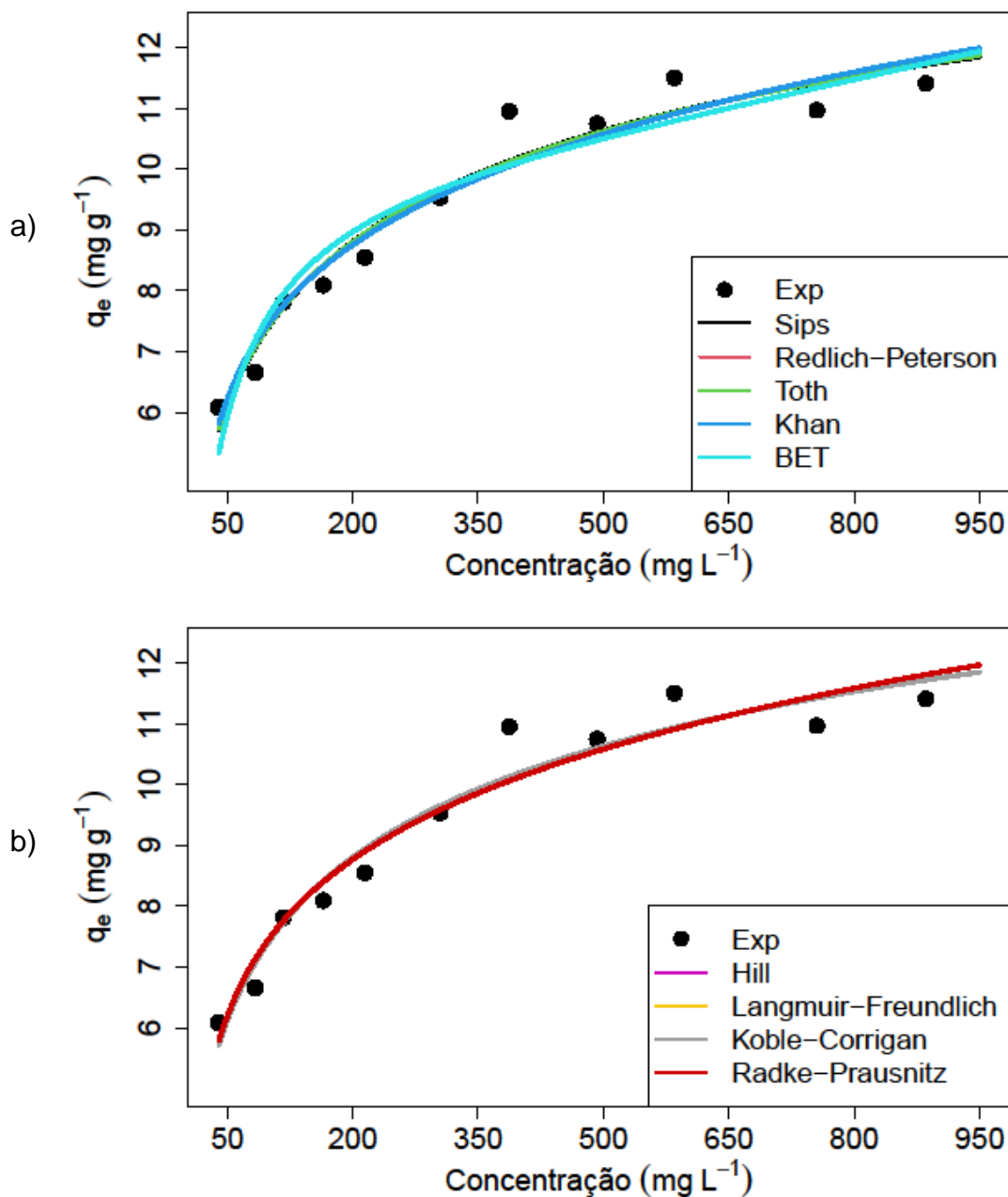
Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) Isotermas de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich e de Temkin;

b) Isotermas de Jovanovic, Harkins-Jura, Elovich e Halsey.

No Gráfico 21 (a) e (b) e no Gráfico 22 são apresentados os modelos de isotermas de três parâmetros:

Gráfico 21 - Modelo de isotermas de três parâmetros de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .

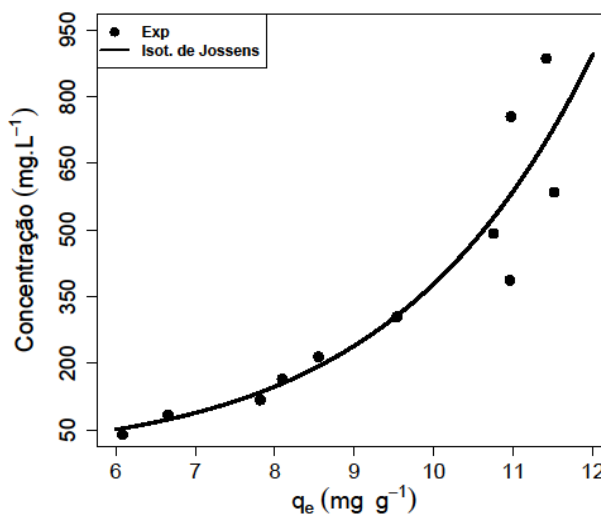


Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) Isotermas de adsorção de Sips, Redlich-Peterson, Toth e Khan;

b) Isotermas de adsorção de Hill, Langmuir-Freundlich, Koble-Korigan e de Radke-Prausnitz.

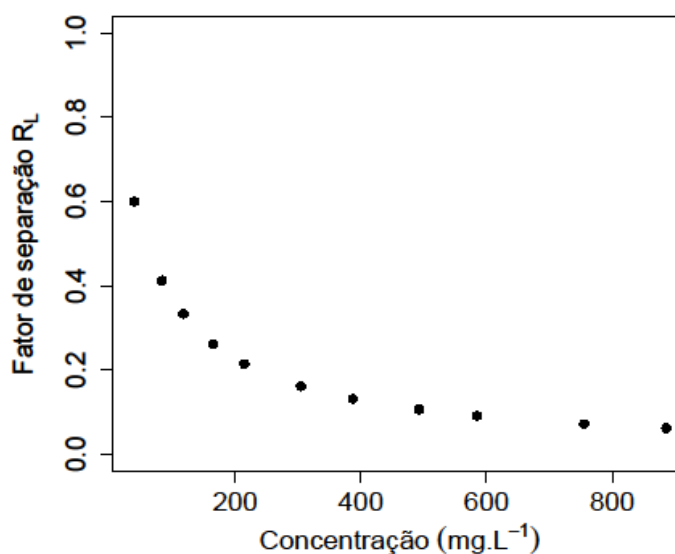
Gráfico 22 - Isoterma de Jossens.



Fonte: Autor (2023).

Os Gráficos 20 - 22 enfatizam a qualidade geral de todos os modelos ajustados, conforme os elevados valores dos coeficientes de determinação múltipla ( $R^2$ ) e ajustado ( $R^2_{ajust}$ ) da Tabela 43, evidenciando que as isotermas de Freundlich e de Sips foram as mais adequadas para ajuste dos dados.

Como a isoterma de Langmuir mostrou boa qualidade de ajuste, utilizou-se a mesma avaliar o grau de desenvolvimento do processo de adsorção por meio da avaliação do fator de separação  $R_L$ , cujos resultados são apresentados na Gráfico 23.

Gráfico 23 - Fator de separação para a adsorção de HSA nas  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ .

Fonte: Autor (2023).

Os valores obtidos de  $R_L$  do Gráfico 23 estão na faixa de 0,06 a 0,60, indicando que a adsorção ocorre de modo favorável em toda faixa de concentração analisada, isso sugere que a HSA tem maior afinidade pelas nanopartículas de  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$  do que pela água.

#### 4.3.3.2 Isotermas de adsorção de HSA em $Fe_3O_4@TEOS$

Analogamente ao que foi feito para os estudos de isothermas com as  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$ , inicialmente avaliou-se o coeficiente de variação dos calibradores para obtenção da curva analítica no pHs de ótima adsorção (4,5). Os valores obtidos para os calibradores da curva são apresentados na Tabela 45:

Tabela 45 - Coeficientes de variação para os calibradores da curva analítica de HSA em pH 4,5.

<b>Concentrações (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coeficientes de variação (%)</b>
0	..
20	11,02
40	2,80
60	3,25
80	10,12
100	3,41
130	3,79
150	2,27
180	0,83
220	3,03
270	2,07
330	0,48
410	0,68
500	1,52
600	0,65

Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado na Tabela 45, nenhum calibrador apresentou coeficiente de variação maior que 20%, logo todos podem ser utilizados na obtenção das curvas. A curva de calibração mais adequada aos dados foi um polinômio de segundo grau, cujas informações são apresentadas na Tabela 46:

Tabela 46 - Informações da curva de calibração de HSA em pH 4,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) e coeficiente de determinação múltipla (R<sup>2</sup>).

Par.	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p	Valor-p <sub>m</sub>	R <sup>2</sup> (%)
$\beta_0$	-0,0049	0,0045	-1,0921	0,2962		
$\beta_1$	0,0019	$4,21 \times 10^{-5}$	45,7444	<0,0001	<0,0001	99,90
$\beta_2$	$-1,07 \times 10^{-6}$	$7,17 \times 10^{-8}$	-14,8631	<0,0001		

Fonte: Autor (2023).

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

Ao que se pode observar da Tabela 46, a estimativa do intercepto não foi significativa ( $p = 0,2962$ ). A estimativa do parâmetro  $\beta_2$  foi próxima de 0, porém significativa ( $p < 0,0001$ ) e o modelo apresentou um R<sup>2</sup> bastante elevado, indicando que 99,90% da variabilidade dos dados de absorvância de acordo com a concentração de HSA é explicada pelo modelo. A análise dos resíduos do modelo não indicou nenhuma violação das pressuposições da regressão, conforme os valores-p obtidos, 0,0567; 0,5443 e 0,8259 para os testes de Shapiro-Wilk, Box-Pearse e de Breusch-Pagan respectivamente.

Utilizando-se essa curva de calibração obteve-se os dados de concentrações de equilíbrio e posteriormente os de quantidades de HSA adsorvidas. Para as concentrações de HSA acima de 600 mg L<sup>-1</sup> diluiu-se as amostras em 50% para que pudessem ser quantificadas por esta curva, no entanto, a variabilidade dos dados obtidos para a quantidade de HSA adsorvida foi muito alta, com diversos pontos caracterizados como *outliers*. Diante disso, foi necessária a repetição dos ensaios das isotermas nessas concentrações, entretanto, a quantificação da HSA foi feita utilizando-se uma nova curva de calibração com uma modificação no método de Bradford, a qual consistiu em utilizar-se 100  $\mu$ L de amostra e 3,0 mL de reagente de Bradford. As informações sobre os coeficientes de variação dos calibradores da nova curva são mostradas a seguir na Tabela 47:

Tabela 47 - Coeficiente de variação (%) para os calibradores da curva de HSA em pH 4,5 com o método de Bradford modificado.

<b>Concentrações (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coeficientes de variação (%)</b>
0	..
100	4,82
200	11,04
300	6,17
500	4,56
700	3,43
800	4,44
900	2,95
1000	1,85
1200	2,86
1500	0,51

Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado na Tabela 47, nenhum calibrador apresentou coeficiente de variação maior que 20%, logo todos podem ser utilizados na obtenção das curvas. A curva de calibração mais adequada aos dados foi um polinômio de segundo grau, cujas informações são apresentadas na Tabela 48:

Tabela 48 - Informações da nova curva de calibração de HSA em pH 4,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) e coeficiente de determinação múltipla (R<sup>2</sup>).

Par.	Estimativa	D. p.	t-calc	Valor-p	Valor-p <sub>m</sub>	R <sup>2</sup> (%)
$\beta_0$	0,0043	0,0060	0,7228	0,4904		
$\beta_1$	0,0005	$1,9 \times 10^{-5}$	27,5845	<0,0001	<0,0001	99,84
$\beta_2$	$-9,4 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-8}$	-7,0906	0,0001		

Fonte: Autor (2023).

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

Ao que se pode observar da Tabela 48, a estimativa do intercepto não foi significativa ( $p = 0,4904$ ). A estimativa do parâmetro  $\beta_2$  foi significativa ( $p < 0,0001$ ) e o modelo apresentou um R<sup>2</sup> bastante elevado, indicando que 99,84% da variabilidade dos dados de absorvância de acordo com a concentração de HSA pode ser explicada pelo modelo. A análise dos resíduos do modelo não indicou nenhuma violação das pressuposições da regressão, conforme os valores-p obtidos, 0,5892; 0,8894 e 0,3424 para os testes de Shapiro-Wilk, Box-Pearse e de Breusch-Pagan respectivamente.

Com a utilização das curvas de calibração, obteve-se os dados de concentrações de equilíbrio e posteriormente os de quantidades de HSA adsorvidas nas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS. Os coeficientes de variações destas variáveis de acordo com as concentrações de HSA iniciais são apresentados na Tabela 49:

Tabela 49 - Coeficientes de variação (%) para os dados de concentrações de HSA no equilíbrio e quantidades adsorvidas nas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS de acordo com as concentrações iniciais.

<b>Concentrações Iniciais (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>C.V.s das c<sub>e</sub> (%)</b>	<b>C.V.s das q<sub>e</sub> (%)</b>
220	8,53	7,33
270	2,36	3,21
330	2,59	4,77
410	0,93	2,20
500	0,60	1,74
600	1,37	4,81
700	5,81	22,27
800	1,59	7,33
900	0,40	2,13
1000	0,93	5,41
1200	2,53	21,53

C.V.s.: Coeficientes de variação; c<sub>e</sub>: concentrações de HSA de equilíbrio; q<sub>e</sub>: quantidades de HSA adsorvidas.  
Fonte: Autor (2023).

Conforme observado na Tabela 49, as concentrações de 700 e 1200 mg L<sup>-1</sup> apresentaram elevados coeficientes de variação, o que ocorreu devido à presença de *outliers* nos dados. Diante disso, foi necessária a retirada de três observações do conjunto de dados devido à influência destes pontos no ajuste das isotermas, tal retirada foi feita com base no gráfico de dispersão dos dados, nos coeficientes de variação da Tabela 49 e no teste de Grubbs (1950). Obtidos os dados, ajustou-se os principais modelos de isotermas de adsorção de dois e de três parâmetros. Na Tabela 50 são apresentadas as principais informações dos modelos ajustados das isotermas de dois parâmetros:

Tabela 50 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de adsorção de dois parâmetros para adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Modelos	Expressões	Parametros	Estimativas	D.p.	Valor-p
Langmuir	$q_e = \frac{q_{\max} b c_e}{1 + b c_e}$	q <sub>max</sub>	14,8882	0,2951	<0,0001***
		b	0,0212	0,0032	0,0001***
Freundlich	$q_e = k_F c_e^{1/n_F}$	k <sub>F</sub>	5,8104	0,4646	<0,0001***
		n <sub>F</sub>	7,4598	0,7224	<0,0001***
Dubinin-	$q_e = (q_s) \exp(-k_{ad} e^2)$	q <sub>s</sub>	13,7497	0,2968	<0,0001***
Radushkevich	$e = RT \ln(1 + 1/c_e)$	k <sub>ad</sub>	0,0005	0,0001	0,0032**
Temkin	$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln(A_T c_e)$	b <sub>T</sub>	1451,9314	131,4757	<0,0001***
		A <sub>T</sub>	4,9231	3,3974	0,1812
Elovich	$q_e = q_m k_e \exp\left(\frac{c_e}{q_m}\right)$	q <sub>m</sub>	3599,4939	660,674	0,0004***
		k <sub>e</sub>	0,0031	0,0005	0,0001***
Harkin	$q_e = \left(\frac{A_{HJ}}{B_{HJ} - \log(c_e)}\right)^{1/2}$	A <sub>HJ</sub>	84,2083	9,0446	<0,0001***
		B <sub>HJ</sub>	5,8613	0,3399	<0,0001***
Halsey	$q_e = \left(\frac{K_H}{c_e}\right)^{1/n_H}$	K <sub>H</sub>	2,0 x 10 <sup>-6</sup>	3,7 x 10 <sup>-6</sup>	0,6049
		n <sub>H</sub>	-7,4598	0,7224	<0,0001***
Jovanovic	$q_e = q_{\max} \left(1 - e^{-K_J c_e}\right)$	q <sub>max</sub>	13,7405	0,3079	<0,0001***
		K <sub>J</sub>	0,0119	0,0016	<0,0001***

Fonte: Autor (2023).

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

D. p.: desvio padrão.

Ao que se pode observar da Tabela 50, apenas as isotermas de Halsey e de Temkin apresentaram parâmetros com estimativas não significativas. Na Tabela 51 são apresentadas as principais informações das isotermas de três parâmetros:

Tabela 51 - Estimativas, desvio padrão e significância dos parâmetros das isotermas de adsorção de três parâmetros da adsorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Modelos	Expression	Parâmetros	Estimativa	D. p.	Valor-p
Sips	$q_e = \frac{q_{\max} K_S c_e^{1/b_{eS}}}{1 + a_S c_e^{1/b_{eS}}}$	q <sub>max</sub>	20,3574	9,4078	0,0624
		K <sub>S</sub>	0,2012	0,0908	0,0575
		b <sub>eS</sub>	2,7383	2,1672	0,2420
Koble-Corrigan	$q_e = \frac{A_K c_e^{n_K}}{1 + B_K c_e^{n_K}}$	A <sub>K</sub>	4,09632	3,63632	0,2926
		n <sub>K</sub>	0,3652	0,2890	0,2420
		B <sub>K</sub>	0,2012	0,0908	0,0575
Toth	$q_e = \frac{q_{\max} k_T c_e}{[1 + (k_T c_e)^{n_T}]^{1/n_T}}$	q <sub>max</sub>	6,9465	2,3304	0,0176*
		k <sub>T</sub>	0,2048	0,4282	0,6452
		n <sub>T</sub>	0,8910	0,0477	<0,0001***
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_{RP} + c_e}{1 + a_{RP} c_e^{g_{RP}}}$	K <sub>RP</sub>	22,5074	16,4089	0,2074
		a <sub>RP</sub>	4,0500	37,8556	0,9174
		g <sub>RP</sub>	0,2568	0,3329	0,4626
Langmuir-Freundlich	$q_e = \frac{q_{LF} (K_{LF} c_e)^{m_{LF}}}{1 + (K_{LF} c_e)^{m_{LF}}}$	q <sub>LF</sub>	1,4227	2,5112	0,5866
		K <sub>LF</sub>	0,2048	0,4282	0,6452
		m <sub>LF</sub>	0,8910	0,0477	<0,0001***
Hill	$q_e = \frac{q_{\max} c_e^{n_H}}{K_H + c_e^{n_H}}$	q <sub>max</sub>	20,3576	9,4083	0,0624
		n <sub>H</sub>	0,0124	0,0292	0,6824
		K <sub>H</sub>	0,3652	0,289	0,2420
Khan	$q_e = \frac{q_{\max} b_K c_e}{(1 + b_K c_e)^{a_K}}$	q <sub>max</sub>	20,3577	9,4084	0,0624
		b <sub>K</sub>	0,3652	0,2890	0,2420
		a <sub>K</sub>	4,9697	2,2418	0,0575
Radke-Prausnitz	$q_e = \frac{q_{RP11} K_{RP11} c_e}{1 + K_{RP11} c_e^{m_{RP11}}}$	q <sub>RP11</sub>	8,4298	3,7258	0,0535
		K <sub>RP11</sub>	0,1350	0,2732	0,6344
		m <sub>RP11</sub>	0,8867	0,0439	<0,0001***
Brunauer, Emmett and Teller	$q_e = \frac{q_m K_S c_e}{(1 - K_L c_e)(1 - K_L c_e + K_S c_e)}$	q <sub>m</sub>	13,6759	0,8115	<0,0001***
		K <sub>S</sub>	0,0304	0,0100	0,0158*
		K <sub>L</sub>	0,0001	0,0001	0,1728

Fonte: Autor (2023).

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

A isoterma de Jossens não pode ser ajustada para os dados de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  na faixa de concentração estudada, acredita-se que para esta isoterma, seria necessária uma faixa de concentrações mais ampla. Ao que se pode observar na Tabela 51, todos os modelos apresentaram pelo menos um parâmetro com estimativa estatisticamente não significativa. A análise das pressuposições básicas de todos os modelos é apresentada na Tabela 52:

Tabela 52 - Valor-p obtido para os testes da análise dos resíduos das isotermas de adsorção de HSA em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

<b>Modelos</b>	<b>Teste de Shapiro-Wilk</b>	<b>Teste de Box-Pearse</b>	<b>Teste de Breusch-Pagan</b>
Langmuir	0,5629	0,0959	0,0681
Harkins-Jura	0,8866	0,1907	0,0775
Jovanovic	0,2672	0,0585	0,0815
Freundlich	0,9772	0,2071	0,0984
Halsey	0,9772	0,2071	0,0984
Elovich	0,9928	0,1135	0,1499
Temkin	0,9907	0,2012	0,1623
Khan	0,9876	0,1928	0,3706
Dubini-R.	0,0434*	0,0350*	0,3856
Redlich-P.	0,9792	0,1926	0,3868
Radke-P.	0,9792	0,1926	0,3868
Toth	0,9194	0,1900	0,4968
Sips	0,9159	0,1907	0,5115
Hill	0,9159	0,1907	0,5115
Koble-C	0,9159	0,1907	0,5115
Lang.-Freund	0,9159	0,1907	0,5115
BET	0,4376	0,1543	0,8877

Fonte: Autor (2023).

Dubini-R.: Dubini-Radushkevich; Koble-C.: Koble-Corrigan; Lang-Freund.: Langmuir-Freundlich; Redlich-P.: Redlich-Peterson; Radke-P.: Radke-Prausnitz.

Ao que se pode observar na Tabela 52, apenas o modelo de Dubini-Radushkevich apresentou violações nas pressuposições, sendo que os resíduos deste modelo não podem ser considerados independente. Na etapa seguinte utilizou-

se os critérios de seleção de modelos para escolha do modelo que melhor se ajustou aos dados de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ . Os resultados são apresentados a seguir na Tabela 53:

Tabela 53 - Valores dos critérios de seleção dos modelos de isotermas de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

<b>Modelos</b>	<b>AICc</b>	<b>AIC</b>	<b>BIC</b>
Temkin	<b>16,4634</b>	<b>13,0348</b>	<b>14,2285</b>
Freundlich	<b>17,1916</b>	<b>13,7630</b>	<b>14,9567</b>
Halsey	<b>17,1916</b>	<b>13,7630</b>	<b>14,9567</b>
Harkins-Jura	18,6202	<b>15,1916</b>	16,3853
Sips	21,3415	<b>14,6748</b>	16,2664
Koble-Corrigan	21,3415	<b>14,6748</b>	16,2664
Langmuir-Freundlich	21,3415	<b>14,6748</b>	16,2664
Hill	21,3415	<b>14,6748</b>	16,2664
Toth	21,4477	<b>14,7811</b>	16,3727
Redlich-Peterson	22,0304	15,3637	16,9553
Radke-Prausnitz	22,0304	15,3637	16,9553
Langmuir	22,0545	18,6259	19,8196
Khan	22,0978	15,4312	17,0228
BET	24,9327	18,266	19,8576
Elovich	29,7456	26,3171	27,5108
Dubini-Radushkevich	33,6594	30,2309	31,4246
Jovanovic	34,1169	30,6883	31,8820

Fonte: Autor (2023).

AICc: Critério de informação de Akaike corrigido; AIC: Critério de informação de Akaike; BIC: Critério de informação Bayesiano.

Ao analisar as informações da Tabela 53, nota-se que as isotermas de Temkin, Freundlich e Halsey, seguidas pela isoterma de Harkins-Jura apresentaram os menores valores de AICc, AIC e BIC. No entanto a pequena diferença entre os valores não permite uma diferenciação entre eles. Posteriormente obteve-se os valores das métricas de ajuste, os quais são apresentados na Tabela 54:

Tabela 54 - Métricas de avaliação da qualidade de ajuste das isotermas de adsorção de HSA nas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Modelos	SSE	HYBRID	ARE	EABS	MPSD	SRE	X <sup>2</sup>	Log-v	RSD	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub>
Hill	<b>1,1815</b>	1,1039	2,0488	2,9539	2,8848	0,0339	<b>0,0883</b>	<b>-3,3374</b>	0,3843	<b>0,9335</b>	0,9050
Langmuir-Freundlich	<b>1,1815</b>	1,1040	2,0488	2,9539	2,8848	0,0339	<b>0,0883</b>	<b>-3,3374</b>	0,3843	<b>0,9335</b>	0,9050
Koble-Corrigan	<b>1,1815</b>	1,1040	2,0488	2,9539	2,8848	0,0339	<b>0,0883</b>	<b>-3,3374</b>	0,3843	<b>0,9335</b>	0,9050
Sips	<b>1,1815</b>	1,1040	2,0488	2,9539	2,8848	0,0339	<b>0,0883</b>	<b>-3,3374</b>	0,3843	<b>0,9335</b>	0,9050
Toth	1,1930	1,1136	2,0515	2,9602	2,8958	0,0340	0,0891	-3,3905	0,3862	<b>0,9328</b>	0,9041
Temkin	1,2209	<b>0,9989</b>	1,9870	2,8940	<b>2,7212</b>	0,0336	0,0899	-3,5174	<b>0,3683</b>	0,9313	<b>0,9141</b>
Redlich-Peterson.	1,2579	1,1637	2,0459	2,9716	2,9455	0,0344	0,0931	-3,6819	0,3965	0,9292	0,8988
Radke-Prausnitz	1,2579	1,1637	2,0459	2,9716	2,9455	0,0344	0,0931	-3,6819	0,3965	0,9292	0,8988
Khan	1,2656	1,1688	2,0390	2,9657	2,9492	0,0344	0,0935	-3,7156	0,3978	0,9288	0,8982
Freundlich	1,3044	1,0501	<b>1,8919</b>	<b>2,8055</b>	2,7645	<b>0,0334</b>	0,0945	-3,8815	0,3807	0,9266	0,9082
Halsey	1,3044	1,0501	<b>1,8919</b>	<b>2,8055</b>	2,7645	<b>0,0334</b>	0,0945	-3,8815	0,3807	0,9266	0,9082
Harkins-Jura	1,4853	1,1902	2,0173	2,9939	2,9356	0,0356	0,1071	-4,5958	0,4062	0,9166	0,8957
BET	1,6377	1,5714	2,5491	3,6346	3,4917	0,0416	0,1257	-5,1330	0,4525	0,9079	0,8684
Langmuir	2,0296	1,8323	2,9804	4,1448	3,8777	0,0486	0,1649	-6,3129	0,4749	0,8864	0,8581
Elovich	4,0838	3,4161	3,8430	5,5156	5,1023	0,0648	0,3075	-10,1585	0,6736	0,7704	0,7131
Jovanovic	6,0764	5,5320	5,2966	7,3313	6,7636	0,0850	0,4979	-12,3442	0,8217	0,6803	0,6004
Dubini-Radushkevich	5,8289	5,2147	5,3736	7,4805	6,5098	0,0855	0,4693	-12,1154	0,8048	0,6723	0,5904

Fonte: Autor (2023).

SSE: Soma de quadrado dos erros; HYBRID: Erro fracionário híbrido; ARE: Erro médio realtivo; EABS: Soma de erros absolutos; MPSD: Desvio padrão percentual de Marquardt; SRE: Desvio padrão do erro relativo;  $\chi^2$ : Estatística de Qui-quadrado; RSD: Desvio padrão residual; Log-v.: Log-verossimilhança; R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação múltipla; R<sup>2</sup><sub>ajust</sub>: Coeficiente de determinação múltipla ajustado.

Analisando-se os dados da Tabela 54, percebe-se que os modelos de Sips, Hill, Koble-Carrigan, Langmuir-Freundlich, Temkin, Freundlich e Halsey apresentaram os melhores resultados das métricas de ajuste. Diante dos resultados de seleção discutidos, a análise das pressuposições da regressão, significância estatística dos parâmetros, os valores dos critérios de seleção, das métricas de ajuste, os modelos que melhor se ajustaram aos dados foi o de Freundlich seguido por Harkins-Jura.

O modelo de Freundlich prevê que o processo de adsorção da HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  ocorre em multicamadas, sendo os sítios de adsorção energeticamente heterogêneos, o valor de  $1/n_F = 0,13$  (TABELA 50), presente na faixa  $0 < 1/n < 1$ , indica que a adsorção é considerada favorável, com uma intensidade de adsorção e heterogeneidade da superfície relativamente altas. Avaliando-se a capacidade máxima de adsorção das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , a estimativa obtida pela isoterma de Langmuir  $q_{\max} = 14,89 \text{ mg g}^{-1}$  também parece ser mais condizente com a realidade dos dados experimentais.

A isoterma de Harkins-Jura é pouco utilizada na maioria dos estudos de adsorção, geralmente ela é mais aplicada na adsorção de sólido-gasosa e para a determinação da área superficial do adsorvente. Por outro lado, suas premissas são semelhantes às da isoterma de Freundlich e coerentes com o que foi discutido aqui. De acordo com o modelo de Harkins-Jura, a adsorção da HSA pelas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  ocorre em multicamadas e pode ser explicada pela existência de uma distribuição “heterogênea de poros”. Acredita-se que estes “poros” sejam espaços entre as moléculas de HSA adsorvidas, uma vez que a formação das camadas de HSA não é uniforme e dada a heterogeneidade dos sítios de adsorção, aqueles de maior energia são ocupados primeiro. Mais detalhes sobre a orientação de proteínas adsorvidas sobre superfícies sólidas podem ser encontrados em Rabe, Verdes e Seeger (2011).

Embora tenha apresentado parâmetros com estimativas não significativas, avaliou-se a isoterma de Radke-Prausnitz e sua tendência para o modelo de Freundlich ou de Langmuir. Para  $K_{RP}$ , obteve-se o valor de 33,92, e comparando-o com os valores de  $c_e^{m_{RP}-1}$  tem-se a Tabela 55:

Tabela 55 - Comparação dos valores de  $c_e^{m_{RP}-1}$  com o valor de  $K_{RP}$  para as  $Fe_3O_4@TEOS$ .

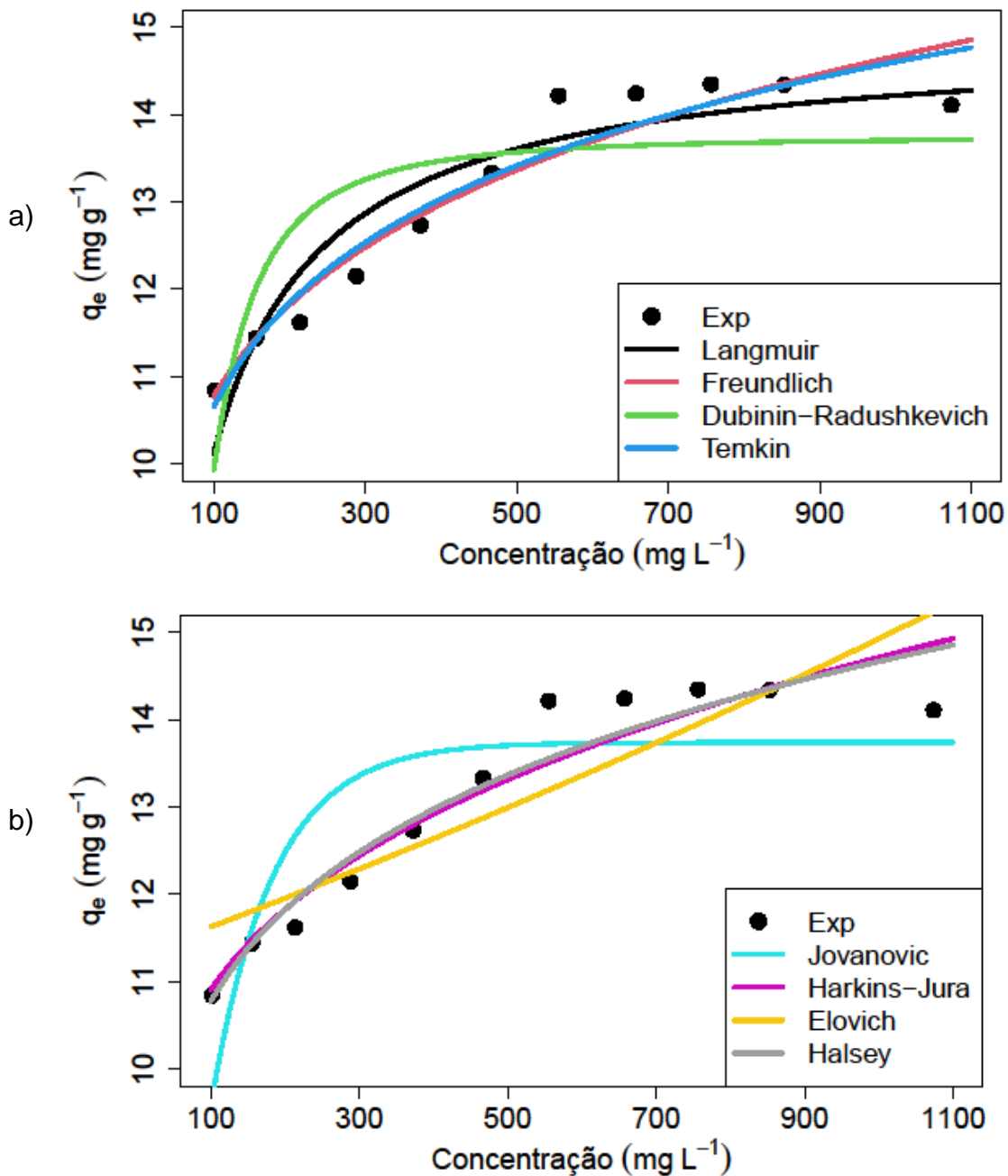
Concentração	$c_e^{m_{RP}-1}$	$K_{RP} > c_e^{m_{RP}-1}$	$K_{RP} < c_e^{m_{RP}-1}$
101,618	0,604	sim	não
155,601	0,577	sim	não
213,828	0,557	sim	não
288,484	0,539	sim	não
372,662	0,525	sim	não
466,673	0,512	sim	não
555,23	0,502	sim	não
657,601	0,493	sim	não
756,522	0,486	sim	não
852,905	0,479	sim	não
1073,744	0,467	sim	não

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar na Tabela 55, em todas regiões de concentração de HSA obteve-se  $K_{RP} > c_e^{m_{RP}-1}$ , o que significa que a isoterma de Radke-Prausnitz indica uma favorabilidade do modelo de Freundlich. Tais resultados também são coerentes com a seleção dos modelos, a qual demonstrou o ajuste mais adequado da isoterma de Freundlich em comparação ao de Langmuir.

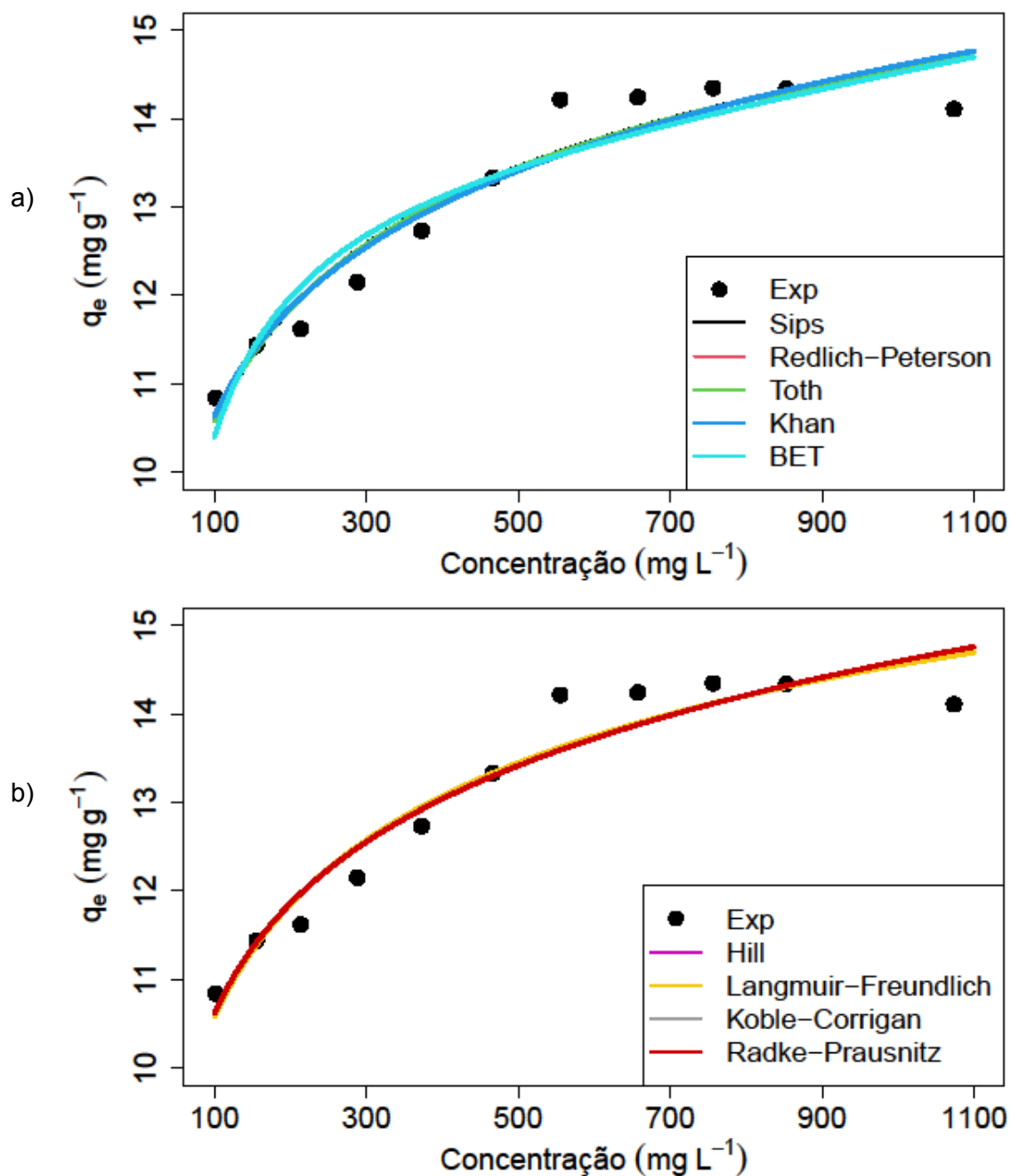
No Gráfico 24 (a) e (b) são apresentadas as curvas dos modelos de isotermas de dois parâmetros:

Gráfico 24 - Modelos de isotermas de dois parâmetros de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .



No Gráfico 25 a) e b) são apresentados as curvas dos modelos de isotermas de três parâmetros:

Gráfico 25 - Modelo de isotermas de três parâmetros de adsorção de HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .



Fonte: Autor (2023).

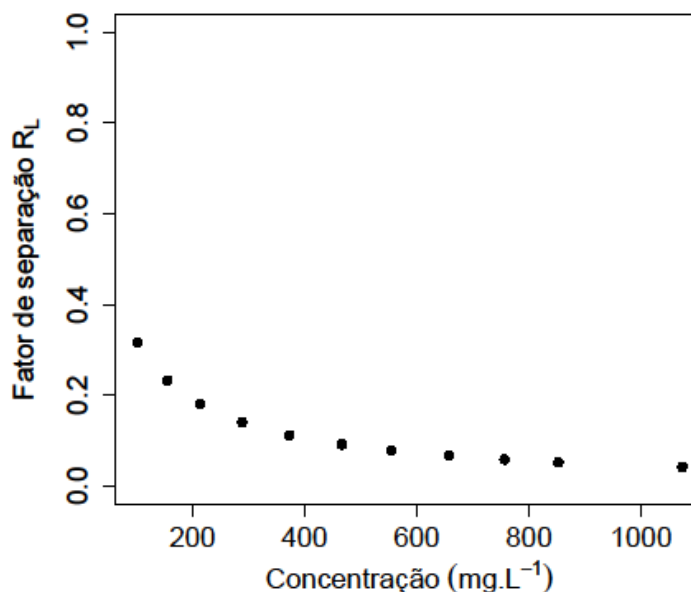
Legenda: a) Isotermas de adsorção de Sips, Redlich-Peterson, Toth, Khan e de BET;

b) Isotermas de adsorção de Hill, Langmuir-Freundlich, Koble-Korigan e de Radke-Prausnitz.

Os gráficos 24 e 25 enfatizam a qualidade dos modelos ajustados, evidenciando que as isotermas de três parâmetros foram mais adequadas para ajuste dos dados, o que corrobora com os valores dos coeficientes de determinação múltipla ( $R^2$ ) e ajustado ( $R^2_{\text{ajust}}$ ) apresentados na Tabela 54.

Como a isoterma de Langmuir mostrou boa qualidade de ajuste em termos de resíduos e métricas de ajuste, utilizou-a para avaliar o grau de desenvolvimento do processo de adsorção por meio da avaliação do fator de separação  $R_L$ , cujos resultados são apresentados no Gráfico 26:

Gráfico 26 - Fator de separação para a adsorção de HSA nas  $Fe_3O_4@TEOS$ .



Fonte: Autor (2023).

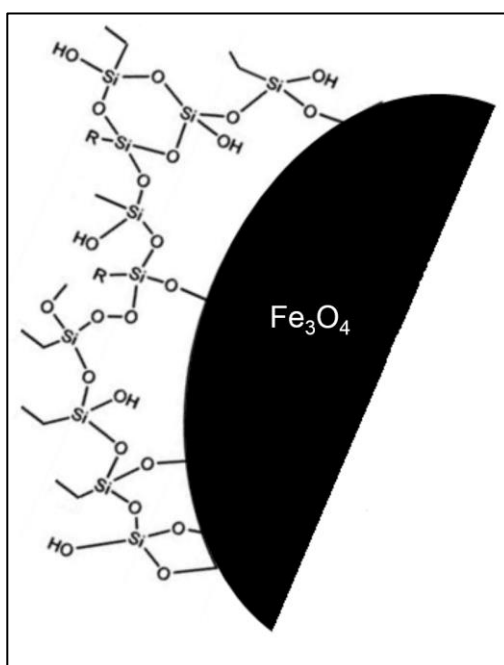
Os valores obtidos de  $R_L$  do Gráfico 26 estão na faixa de 0,04 a 0,32, indicando que a adsorção ocorre de modo favorável em toda faixa de concentração analisada, isso sugere que a HSA tem maior afinidade pelas nanopartículas de  $Fe_3O_4@TEOS$  do que pela água.

Diante dos resultados discutidos nas seções anteriores, quando se comparam as nanopartículas de  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$  e  $Fe_3O_4@TEOS$ , percebe-se que elas apresentam mecanismos de cinética e equilíbrio de adsorção bastante semelhantes. Ambas atingem o equilíbrio de adsorção em cerca de 10 minutos, o processo de adsorção ocorre em duas etapas, há a ocorrência de “difusão intrapartícula” da HSA e também há a adsorção em multicamada em sítios de adsorção energeticamente heterogêneos, conforme as características especificadas pela isoterma de Freundlich.

Com relação à capacidade máxima de adsorção, para as  $Fe_3O_4@TEOS$ , a estimativa obtida utilizando-se a isoterma de Langmuir,  $q_{max} = 14,89 \text{ mg g}^{-1}$ , (IC95%:

14,23 - 15,59 mg g<sup>-1</sup>) é quase 20% maior que o  $q_{\max} = 11,93 \text{ mg g}^{-1}$  (IC95%: 10,93 - 13,08 mg g<sup>-1</sup>) das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, como os intervalos de confiança para as estimativas não se sobrepõem, pode-se dizer que as capacidades máximas de adsorção para as nanopartículas são estatisticamente diferentes. Diversos fatores podem estar associados à maior capacidade das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, um deles é a menor diversidade de grupamentos na superfície das nanopartículas, os quais consistem majoritariamente em grupamentos silanóis, conforme pode ser observado na representação da Figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.



Fonte: Adaptado de Wijk *et al.* (2014).

Essa menor diversidade de grupos na superfície leva à uma menor diversidade de cargas iguais e com isso um menor efeito de repulsão eletrostática. A maior complexidade da superfície das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, a qual possui diversos grupamentos com diferentes cargas elétricas no pH ótimo de adsorção (3,5), pode aumentar o efeito repulsivo tanto entre a HSA e as nanopartículas quanto entre as próprias moléculas de HSA. Em Xu e Grassian (2017) foi relatado que a adsorção de proteínas é ótima em seu ponto isoelétrico, pois a repulsão eletrostática nas interações proteína-proteína é reduzida, o que permite que moléculas de proteína se acumulem na superfície em maior extensão. Como o pH ótimo de

adsorção nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  (4,5) é bem próximo do ponto isoelétrico da HSA (4,7), há uma minimização desses efeitos eletrostáticos de repulsão entre as moléculas de HSA adsorvidas, permitindo um aumento na adsorção.

Com relação à literatura da modelagem do processo de adsorção, algumas considerações devem ser feitas a respeito de muitos estudos. Em primeiro lugar, quanto à quantidade de ensaios (número de concentrações) realizados e a faixa de concentração analisada. Em alguns trabalhos como o de Wanjeri *et al.* (2018), a faixa de concentração de pesticidas organofosforados estudada foi de 0 a 2 mg L<sup>-1</sup> para ajuste das isotermas, o que não permitiu que o formato das isotermas apresentasse um comportamento de estabilidade que fosse condizente com a determinação da capacidade máxima de adsorção grafeno modificado adsorvente. Em Maleki, Moradi e Tahmasebi (2017), que estudaram a adsorção de BSA em nanopartículas de ouro, foram avaliadas quatro formas de linearização da isoterma de Langmuir e uma de Freundlich, selecionando o melhor modelo conforme o coeficiente de determinação R<sup>2</sup> e o erro médio relativo (ARE), entretanto foram analisadas apenas as concentrações de 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup>, um número muito baixo para este tipo de experimento.

Em Shah, Alveroglu (2021), os autores estudaram a adsorção de BSA e HSA em nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e prata revestidas com TEOS e poli(N-isopropil acrilamida), para as isotermas foram avaliadas apenas 5 concentrações das proteínas na faixa de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>, o ajuste das isotermas de Langmuir e Freundlich foi feito por meio de linearizações dos modelos e transformações dos dados, selecionando o melhor modelo com base nos valores de R<sup>2</sup>. Os autores obtiveram capacidades máximas de adsorção de 166,67 e 322 mg g<sup>-1</sup> para a HSA e BSA respectivamente, no entanto tais estimativas parecem superestimadas tendo em vista a falta de informações divulgadas a respeito dos modelos e a estreita faixa de concentrações das proteínas utilizadas para o ajuste das isotermas.

Em Liu *et al.* (2017b), os autores avaliaram a adsorção de pepsina em nanopartículas de ouro funcionalizadas com pepsina (*pepsin-GNP*), considerando a faixa de estudo das isotermas aproximadamente de 0 a 6000 mg L<sup>-1</sup>, foram avaliados seis pontos, sendo cinco deles em concentrações abaixo de 1500 mg L<sup>-1</sup> e o último acima de 5000 g L<sup>-1</sup>, possuindo uma longa faixa sem nenhum ponto. Para este estudo deveria ter sido avaliado um número bem maior de concentrações a fim de se analisar adequadamente uma faixa tão ampla. Foram ajustadas as isotermas de

Langmuir e Freundlich, mas não foi detalhado como foram feitos os ajustes, a seleção dos modelos e nem mesmo as estimativas dos parâmetros da isoterma de Langmuir, apenas foi dito que a isoterma de Freundlich se ajustou melhor aos dados.

Outro fator que merece atenção é a estratégia de ajuste dos modelos de isotermas. Muitos trabalhos na literatura linearizam os modelos a fim de que estes possam ter seus parâmetros estimados pelo método de mínimos quadrados da regressão linear, no entanto, de acordo com (MAZUCHELI; ACHCAR, 2002) esta estratégia pode levar à obtenção de estimativas viesadas, uma vez que as transformações podem alterar a estrutura e distribuição dos resíduos dos modelos, de modo que os resíduos do novo modelo poderão não satisfizerem as pressuposições usuais de normalidade, independência e homogeneidade de variância. A grande maioria dos trabalhos não avaliam as pressuposições básicas da regressão.

Outra questão importante a se considerar é a seleção do modelo que melhor se ajusta aos dados. Diversos trabalhos consideram apenas o coeficiente de determinação múltipla  $R^2$  (SHAH; ALVEROGLU, 2021) como forma de seleção, outros avaliam uma ou duas métricas de ajuste além do coeficiente  $R^2$  (LIU *et al.*, 2017a; MALEKI; MORADI; TAHMASEBI, 2017; VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2006), alguns no entanto incluem um número maior métricas de seleção de modelos baseadas no resíduo (VISHALI; MULLAI, 2016; WANG *et al.*, 2013) e até mesmo critérios de informação AIC e AICc (HADI; SAMARGHANDI; MCKAY, 2010; SANTOS *et al.*, 2021). Ressalta-se que o coeficiente  $R^2$  não deve ser utilizado como valor único para seleção de modelos quando se comparam isotermas de dois e três parâmetros, uma vez que ele tende a apresentar maiores valores quanto mais parâmetros tiver o modelo. Por outro lado, o coeficiente de determinação múltipla ajustado  $R^2_{ajust}$  faz uma ponderação do  $R^2$  pelo número de parâmetros do modelo, sendo então mais adequado nesse caso.

De modo geral, como foi mostrado no estudo das isotermas de adsorção de HSA nas nanopartículas de  $Fe_3O_4@TEOS@BSA$  e  $Fe_3O_4@TEOS$ , em estudos de modelagem de adsorção mais detalhados, sugere-se que a seleção do modelo que melhor se ajusta aos dados seja feita com diferentes estratégias, tais como análise de resíduos dos modelos, significância dos parâmetros, critérios de informação (AICc, AIC e BIC) e métricas de ajuste. Como foi mostrado nas Tabelas 41 e 52, nenhum modelo apresenta ao mesmo tempo os melhores resultados de todas as

métricas de ajuste. Em outros casos, alguns modelos podem apresentar elevados  $R^2$ , menores valores de outras métricas baseadas em resíduos, mas possuem maiores valores dos critérios de seleção e alguns de seus parâmetros podem ainda não ser estatisticamente significativos.

Deve-se também ater-se ao fato de que modelos como o de Redlich-Peterson, Sips, Koble-Corrigan e Langmuir-Freundlich devem atender à algumas premissas características para suas respectivas utilizações. Ressalta-se ainda a importância de uma análise conjunta das isotermas que melhor se ajustaram aos dados, avaliando se tais isotermas indicam características semelhantes no que tange à adsorção em mono ou multicamadas, heterogeneidade energética dos sítios de adsorção da superfície do adsorvente, intensidade da adsorção, entre outras.

#### **4.3.4 Estudos de otimização da dessorção de HSA**

Alguns estudo da literatura (CHEN; LIN; JIA, 2015; SUN *et al.*, 2011; SUN; XU; YANG, 2011; WANG *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021) relataram um aumento na dessorção de proteínas (lisozima) com o aumento da força iônica do meio com a adição de NaCl. Assim, realizou-se alguns testes iniciais de dessorção de HSA com soluções de NaCl, no entanto não se identificou nenhuma melhora substancial no processo de dessorção, por isso a variável concentração de NaCl não foi incluída nos planejamentos de otimização da dessorção de HSA. Ressalta-se ainda que o NaCl no meio reacional é um interferente do reagente de Bradford (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998), o qual pode diminuir a absorvância em mais de 50% em comparação à uma solução padrão de HSA sem NaCl, resultando em um falso negativo e comprometendo as análises.

O objetivo dos estudos de otimização da dessorção foi recuperar a HSA adsorvida nas nanopartículas e ao mesmo tempo fazer a “limpeza” das mesmas, a fim de possibilitar a reutilização em novas adsorções subsequentes.

##### **4.3.4.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA**

Antes de se apresentar os estudos de otimização da dessorção propriamente ditos, apresentar-se-á as principais informações relacionadas às curvas de calibração de HSA em diferentes pHs de dessorção, as quais foram utilizadas na

obtenção as concentrações de HSA nos delineamentos de otimização. Inicialmente avaliou-se a precisão dos calibradores das curvas pela análise dos coeficientes de variação associados, sendo os resultados apresentados na Tabela 56:

Tabela 56 - Coeficientes de variação (%) dos calibradores das curvas de HSA nos pHs de 4,5; 6,5 e 8,5.

Concentrações de HSA (mg L <sup>-1</sup> )	Coeficientes de variação (%)		
	pH 4,5	pH 6,5	pH 8,5
0	..	..	..
25	9,09	30,54	11,98
50	4,03	3,06	4,03
75	2,03	1,00	6,13
100	4,86	4,34	8,12
125	3,07	3,84	3,75
150	3,45	3,38	7,08
175	4,08	1,61	0,92
200	1,68	0,18	1,61

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar na Tabela 56, apenas o coeficiente de variação do calibrador de 25 mg L<sup>-1</sup> apresentou um valor elevado (30,54%) devido à presença de um *outlier*, o qual foi indicado pelas análises gráficas. No entanto, como a curva ajustada nesse pH não apresentou violações nas pressuposições da regressão e as estimativas dos parâmetros  $\beta$ 's foram praticamente as mesmas e com o mesmo valor-p associado, optou-se por manter o ponto no conjunto de dados. Na Tabela 57, são apresentadas as principais informações das curvas ajustadas nos diferentes pHs:

Tabela 57 - Informações das curvas de calibração de HSA obtidas nos pHs de 4,5; 6,5 e 8,5: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) e coeficiente de determinação múltipla (R<sup>2</sup>).

pH	Par.	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p	Valor-p <sub>m</sub>	R <sup>2</sup> (%)
4,5	$\beta_0$	0,0125	0,0091	1,3736	0,2187		
	$\beta_1$	0,0024	0,0004	11,4577	<0,0001***	<0,0001	99,42
	$\beta_2$	$-2,90 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-6}$	-2,8517	0,0291		
6,5	$\beta_0$	0,0083	0,0056	1,4853	0,1880		
	$\beta_1$	0,0022	0,0001	16,833	<0,0001***	<0,0001	99,71
	$\beta_2$	$-2,9 \times 10^{-6}$	$6,2 \times 10^{-7}$	-4,7001	0,0033**		
8,5	$\beta_0$	0,0059	0,0103	0,5744	0,5866		
	$\beta_1$	0,0025	0,0002	10,5711	<0,0001***	<0,0001	99,27
	$\beta_2$	$-3,38 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$	-2,9395	0,0260*		

Fonte: Autor (2023).

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

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

Ao que se pode observar na Tabela 57, nenhum dos interceptos das curvas de calibração foi significativo, o que indica que o branco não apresentou absorvância em nenhum dos pHs estudados. As estimativas dos parâmetros  $\beta_2$  foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Ao analisar-se os parâmetros  $\beta_1$ , observa-se que todas as estimativas foram significativas ( $p < 0,05$ ) e bastante próximas entre si ( $\sim 0,0024$ ). Observa-se que tais resultados são semelhantes aos das curvas de calibração de otimização da adsorção, em que também se obtiveram curvas de segundo grau e com praticamente as mesmas estimativas dos parâmetros. Diante disso, pode-se dizer que o pH não influenciou nas medidas de absorvâncias obtidas pelo método de Bradford. Na Tabela 58, apresenta-se a análise das pressuposições das curvas:

Tabela 58 - Valor-p obtido para os testes da análise das pressuposições das curvas de HSA obtidas nos pHs de 4,5; 6,5 e 8,5.

<b>pH</b>	<b>Teste de Shapiro-Wilk</b>	<b>Teste de Box-Pearse</b>	<b>Teste de Breusch-Pagan</b>
4,5	0,7271	0,1164	0,1062
6,5	0,5614	0,7167	0,0953
8,5	0,3926	0,6642	0,3028

Fonte: Autor (2023).

De acordo com Tabela 58, nenhuma das curvas de calibração apresentou alguma violação de pressuposições. Realizou-se então os delineamentos compostos centrais para otimização da dessorção de HSA nas nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA. As informações do planejamento experimental e as respostas obtidas (porcentagem de recuperação de HSA) são apresentadas na Tabela 59:

Tabela 59 - Planejamento experimental e resposta (absorbância) para o estudo da dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

<b>Ensaio</b>	<b>pH</b>	<b>cod</b>	<b>Volume</b>	<b>cod</b>	<b>Tempo</b>	<b>cod</b>	<b>Recup. (%)</b>
1	4,50	-1	1,00	-1	15,00	-1	1,62
2	8,50	1	1,00	-1	15,00	-1	23,48
3	4,50	-1	3,00	1	15,00	-1	~0,00
4	8,50	1	3,00	1	15,00	-1	4,10
5	4,50	-1	1,00	-1	45,00	1	~0,00
6	8,50	1	1,00	-1	45,00	1	20,08
7	4,50	-1	3,00	1	45,00	1	~0,00
8	8,50	1	3,00	1	45,00	1	10,03
9	3,14	-1,68	2,00	0	30,00	0	~0,00
10	9,86	1,68	2,00	0	30,00	0	21,82
11	6,50	0	0,32	-1,68	30,00	0	15,94
12	6,50	0	3,68	1,68	30,00	0	~0,00
13	6,50	0	2,00	0	4,77	-1,68	3,01
14	6,50	0	2,00	0	55,22	1,68	5,97
15	6,50	0	2,00	0	30,00	0	2,52
16	6,50	0	2,00	0	30,00	0	0,56
17	6,50	0	2,00	0	30,00	0	4,00

Fonte: Autor (2023).

cod.: valor codificado; Recup.: Recuperação obtida a partir do eluato de dessorção.

Com os dados da Tabela 59 ajustou-se os modelos de otimização. A análise de variância do modelo geral é apresentada na Tabela 60:

Tabela 60 - Análise de variância do modelo geral de otimização da dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	9	1099,09	122,12	42,26	<0,0001***
X <sub>1</sub>	1	630,18	630,18	218,09	<0,0001***
X <sub>2</sub>	1	245,16	245,16	84,84	<0,0001***
X <sub>3</sub>	1	2,54	2,54	0,88	0,3795
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	69,75	69,75	24,14	0,0017**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	33,64	33,64	11,64	0,0113*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	4,01	4,01	1,39	0,2774
X <sub>1</sub> :X <sub>2</sub>	1	96,65	96,65	33,45	0,0007***
X <sub>1</sub> :X <sub>3</sub>	1	2,17	2,17	0,75	0,4149
X <sub>2</sub> :X <sub>3</sub>	1	15,00	15,00	5,19	0,0568
Resíduos	7	20,23	2,89		
Falta de ajuste	5	14,29	2,86	0,96	0,5803
Erro puro	2	5,93	2,97		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; X<sub>1</sub>: pH; X<sub>2</sub>: volume de eluente de dessorção (mL); X<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

De acordo com a análise de variância do modelo geral apresentada na Tabela 60, os coeficientes associados à variável tempo de primeiro e segundo graus, bem como as suas interações com as demais variáveis foram não significativas. Reajustou-se então o modelo considerando apenas os termos significativos, sendo a análise de variância apresentada na Tabela 61.

Tabela 61 - Análise de variância do modelo recalculado de otimização da dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	5	1075,37	215,07	53,84	<0,0001***
x <sub>1</sub>	1	630,18	630,18	157,75	<0,0001***
x <sub>2</sub>	1	245,16	245,16	61,37	<0,0001***
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	69,75	69,75	17,46	0,0015**
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	33,64	33,64	8,42	0,0144*
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	96,65	96,65	24,19	0,0005***
Resíduos	11	43,94	3,99		
Falta de ajuste	3	3,49	1,16	0,23	0,8728
Erro puro	8	40,45	5,06		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; X<sub>1</sub>: pH; X<sub>2</sub>: volume de eluente de dessorção (mL); gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

As informações da Tabela 61 são coerentes com as da Tabela 60, em que o modelo e todos os coeficientes foram significativos e não houve falta de ajuste ( $p = 0,8728$ ). Foram então obtidas as estimativas dos parâmetros e a análise de resíduos do modelo ótimo, cujas informações são apresentadas na Tabela 62 e na Tabela 63 respectivamente:

Tabela 62 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo da dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.

Parâmetros	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p
Intercepto	3,17	0,86	3,66	0,0037**
pH	6,79	0,54	12,56	<0,0001***
volume	-4,24	0,54	-7,83	<0,0001***
pH <sup>2</sup>	2,69	0,57	4,73	0,0006***
volume <sup>2</sup>	1,65	0,57	2,90	0,0144*
pH:volume	-3,48	0,71	-4,92	0,0005***

Fonte: Autor (2023).

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

D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t calculada.

Tabela 63 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ótimo de dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

<b>Teste de Shapiro-Wilk</b>	<b>Teste de Box-Pierce</b>	<b>Teste de Breusch-Pagan</b>
0,7252	0,6335	0,2798

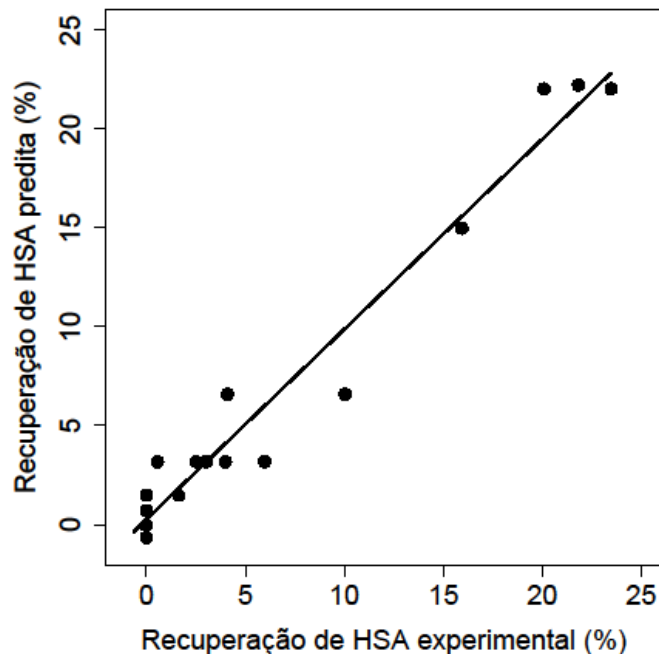
Fonte: Autor (2023).

O valor da estatística F (53,84) obtido a partir do modelo foi muito maior que o F tabelado (3,20), o que demonstra alta significância. Assim, o modelo apresentado na Tabela 62 e sumarizado na equação (63) é adequado para descrição dos dados e pode ser usado para obtenção dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno do Gráfico 28 para a análise dos efeitos das variáveis na recuperação de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA:

$$R_{\text{recup}} = 3,17 + 6,79 x_1 - 4,24 x_2 + 2,69 x_1^2 + 1,65 x_2^2 - 3,48 x_1:x_2 \quad (68)$$

Em que  $R_{\text{recup}}$  é a recuperação de HSA (%),  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são respectivamente as variáveis independentes codificadas: pH, volume do eluente de dessorção (mL) e tempo de agitação (min). O modelo (68) apresentou um  $R^2$  de 0,9607, o que indica que ele é capaz de explicar 96,07% da variabilidade dos dados de recuperação de HSA (%). No Gráfico 27 é apresentada a dispersão dos valores de recuperação de HSA predita pelo modelo e os valores experimentais:

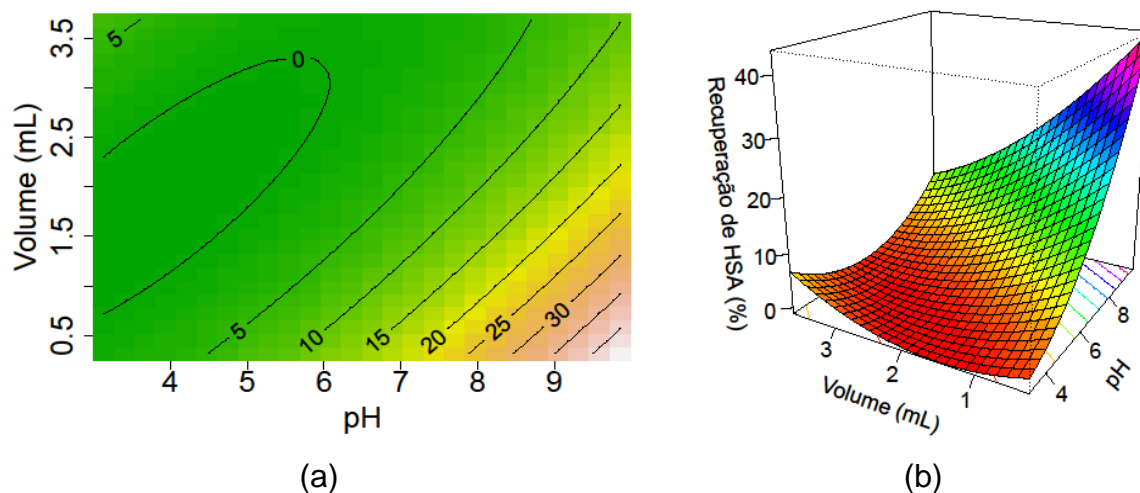
Gráfico 27 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental da dessorção de HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .



Fonte: Autor (2023).

As superfícies de resposta e as curvas de contorno da recuperação de HSA obtidas com o modelo são apresentadas no Gráfico 28:

Gráfico 28 - Curvas de contorno e superfície de resposta do efeito do pH e do volume de eluente sobre a recuperação de HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$  de acordo com o modelo ótimo de dessorção.



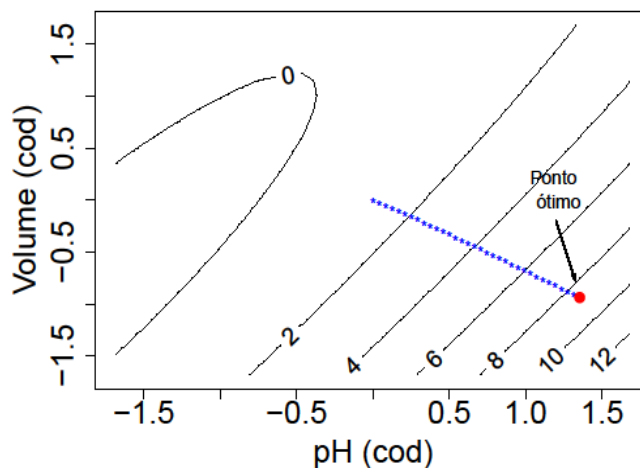
Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) Curvas de contorno;  
b) Superfície de resposta.

O Gráfico 28 evidencia que a recuperação aumenta significativamente com o aumento do pH e com a diminuição do volume. Como a variável resposta é a concentração recuperada e a variável volume de solução de dessorção é significativa, é esperado que maiores concentrações ocorram em menores volumes, conforme evidenciado tanto nas curvas de contorno quanto nas superfícies de resposta (FIGURA 36). Observa-se também que em pH ao redor de 4, que é próximo ao ótimo de adsorção, a recuperação foi praticamente nula.

De acordo com o modelo obtido, obteve-se as condições ótimas de dessorção de HSA, especificadas em pH = 3,79 e volume de 1,86 mL. No entanto, com a análise canônica do modelo ótimo, obteve-se os autovalores de 3,98 e 0,36, o que indica que o ponto estacionário corresponde a um ponto de mínimo. Assim, foi necessária a realização de uma análise *ridge*, cujos resultados são apresentados no Gráfico 29:

Gráfico 29 - Ponto ótimo da análise *ridge* das curvas de contorno do modelo ótimo para dessorção de HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .



Fonte: Autor (2023).

De acordo com a análise *ridge* apresentada no Gráfico 29, a recuperação máxima de HSA no processo de dessorção das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  (27,19%) é obtida com as condições experimentais de pH de 9,2 e volume de eluente de dessorção de 1,06 mL. Nesse valor de pH a HSA encontra-se em sua conformação B (ASCENZI *et al.*, 2006; PETERS JR, 1996).

De modo geral, a recuperação de HSA foi relativamente baixa, o que por sua

vez pode ser explicada pela complexidade das interações entre a HSA e as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ . Em valores de pH mais altos a ionização de diferentes grupamentos na superfície das nanopartículas e da HSA resultam em interações eletrostáticas (forças de Van der Waals) de cargas iguais, promovendo a dessorção da HSA. O fato de o tempo de dessorção não ter sido significativo na faixa estudada mostra (~5 a 55 min) reforça a hipótese de adsorção física, uma vez que a dessorção foi obtida em um tempo relativamente baixo.

Para validação do modelo de otimização da dessorção de HSA das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , realizou-se uma adsorção (em quadruplicada) com 1 mL de uma solução de HSA  $200 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 3,5 em tubos contendo 10 mg de nanopartículas seguidas de uma dessorção considerando as condições ótimas aproximadas obtidas a partir do modelo. Tais condições foram 1 mL de volume de eluente em pH 9,2. Nessas condições, uma predição com o modelo indica que a porcentagem de HSA recuperada é de 27,82%. Nos ensaios experimentais o valor real obtido foi de 23,04%, o que representa uma variação de cerca de 4,78% em comparação com o valor predito, o que sugere que o modelo de otimização tem boa capacidade de predição da quantidade de HSA recuperada na dessorção das nanopartículas com cerca de 83% de exatidão.

#### *4.3.4.1.1 Otimização da reutilização das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$*

Utilizando-se o mesmo delineamento do experimento do estudo de dessorção da HSA, obteve-se as recuperações de HSA após a reutilização das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e as informações são apresentadas na Tabela 64:

Tabela 64 - Planejamento experimental e resposta (recuperação) para o estudo da reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Ensaio	pH	cod	Volume	cod	Tempo	cod	Recup. (%)
1	4,50	-1	1,00	-1	15,00	-1	101,21
2	8,50	1	1,00	-1	15,00	-1	80,16
3	4,50	-1	3,00	1	15,00	-1	91,93
4	8,50	1	3,00	1	15,00	-1	77,64
5	4,50	-1	1,00	-1	45,00	1	92,52
6	8,50	1	1,00	-1	45,00	1	80,44
7	4,50	-1	3,00	1	45,00	1	97,28
8	8,50	1	3,00	1	45,00	1	80,44
9	3,14	-1,68	2,00	0	30,00	0	91,64
10	9,86	1,68	2,00	0	30,00	0	80,72
11	6,50	0	0,32	-1,68	30,00	0	84,98
12	6,50	0	3,68	1,68	30,00	0	84,41
13	6,50	0	2,00	0	4,77	-1,68	90,76
14	6,50	0	2,00	0	55,22	1,68	90,18
15	6,50	0	2,00	0	30,00	0	81,57
16	6,50	0	2,00	0	30,00	0	90,47
17	6,50	0	2,00	0	30,00	0	84,69
18	6,50	0	2,00	0	30,00	0	84,41

Fonte: Autor (2023).

cod.: valor codificado; Recup.: Recuperação obtida a partir do sobrenadante da reutilização (segunda adsorção).

Com os dados da Tabela 64 ajustou-se os modelos de otimização da reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA. Inicialmente, ajustou-se o modelo geral, cujas informações da análise de variância são apresentadas na Tabela 65:

Tabela 65 - Análise de variância do modelo geral de otimização da reutilização das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	9	595,65	66,18	3,87	0,0349
X <sub>1</sub>	1	499,90	499,90	29,24	0,0006***
X <sub>2</sub>	1	4,68	4,68	0,27	0,6149
X <sub>3</sub>	1	0,11	0,11	0,01	0,9369
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	0,15	0,15	0,01	0,9285
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	3,46	3,46	0,20	0,6648
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	47,46	47,46	2,78	0,1343
X <sub>1</sub> :X <sub>2</sub>	1	0,50	0,50	0,03	0,8683
X <sub>1</sub> :X <sub>3</sub>	1	5,15	5,15	0,30	0,5980
X <sub>2</sub> :X <sub>3</sub>	1	34,23	34,23	2,00	0,1948
Resíduos	8	136,78	17,10		
Falta de ajuste	5	94,96	18,99	1,36	0,4251
Erro puro	3	41,82	13,94		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; X<sub>1</sub>: pH; X<sub>2</sub>: volume de eluente de dessorção (mL); X<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

Ao que se pode observar na Tabela 65, apenas o coeficiente associado à variável pH apresentou efeito significativo sobre a recuperação de HSA na reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA. Assim, o modelo recalculado reduz-se à uma regressão linear simples, cuja análise de variância é apresentada na Tabela 66:

Tabela 66 - Informações da análise de variância do modelo ótimo de recuperação de HSA na reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	1	499,9	499,90	34,40	<0,0001***
x <sub>1</sub>	1	499,9	499,90	34,40	<0,0001***
Resíduos	16	232,53	14,53		
Falta de ajuste	3	83,78	27,93	2,44	0,1108
Erro puro	13	148,75	11,44		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; X<sub>1</sub>: pH; X<sub>2</sub>: volume de eluente de dessorção (mL); X<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

As informações da Tabela 66 são coerentes com as da Tabela 65, em que o modelo e todos os coeficientes foram significativos e não houve falta de ajuste ( $p = 0,1108$ ). Foram então obtidas as estimativas dos parâmetros e a análise de resíduos do modelo ótimo, as quais são apresentadas respectivamente na Tabela 67 e na Tabela 68:

Tabela 67 - Estimativas dos parâmetros, desvio padrão, estatística t e valor-p associados ao modelo ótimo para recuperação de HSA após a reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Parâmetros	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p
Intercepto	86,97	0,90	96,79	<0,0001***
pH	-6,05	1,03	-5,86	<0,0001***

Fonte: Autor (2023).

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

D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t calculada.

Tabela 68 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo reduzido para recuperação de HSA após a reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,2322	0,2604	0,0888

Fonte: Autor (2023).

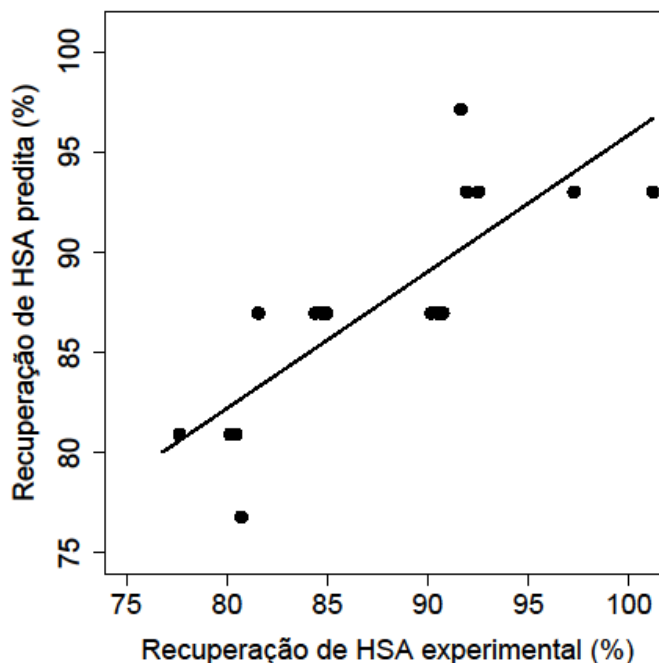
O valor da estatística F (34,49) obtido a partir do modelo foi muito maior que o F tabelado (4,49), o que demonstra alta significância. Assim, o modelo apresentado na Tabela 67 e sumarizado na equação (64) é adequado para descrição dos dados.

$$R_{\text{reut}} = 86,97 - 6,05 x_1 \quad (69)$$

Em que  $R_{\text{reut}}$  é a recuperação de HSA (%),  $x_1$  representa a variável pH codificada. O modelo apresentou um  $R^2$  de 0,6825; o que indica que ele é capaz de explicar 68,25% da variabilidade dos dados de recuperação de HSA após a reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

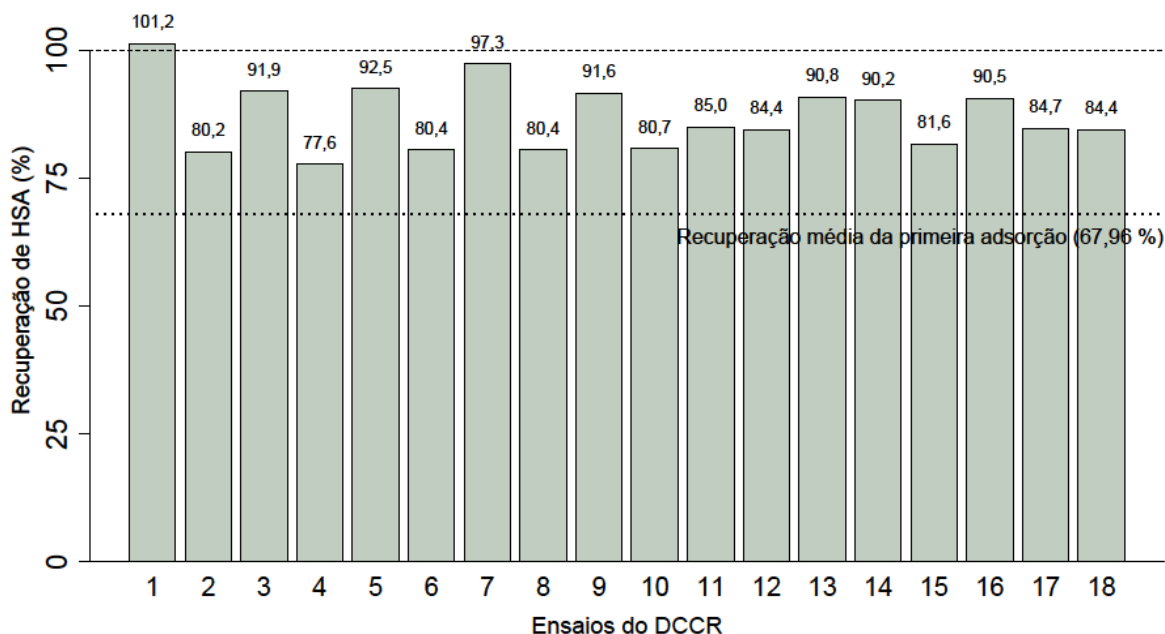
De acordo com o modelo (69), a recuperação média de HSA após a reutilização das nanopartículas é de cerca de 86,97%, de modo que a recuperação diminui em média 6,05% para cada unidade de aumento na faixa estudada de pH. A queda na recuperação indica maior adsorção de HSA pelas nanopartículas. Tais resultados corroboram com o estudo de dessorção de HSA, em que as maiores recuperações foram obtidas com os maiores pHs de dessorção. No Gráfico 30 é apresentada a dispersão dos valores de recuperação de HSA predita pelo modelo e os valores experimentais:

Gráfico 30 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental de HSA após a reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .



Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado no Gráfico 30, há uma variabilidade relativamente alta entre os valores preditos e experimentais de recuperação de HSA. Tais resultados estão consoantes com o valor do coeficiente de determinação  $R^2$  relativamente baixo (68,25%), embora o modelo tenha se mostrado adequado estatisticamente para descrição dos dados. Nota-se que a recuperação de HSA foi bem maior na reutilização quando comparada à primeira adsorção com as nanopartículas, a capacidade de adsorção diminuiu cerca de 21,43 %. No Gráfico 31 apresenta-se a recuperação de HSA após a reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ :

Gráfico 31 - Recuperação de HSA após a reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Fonte: Autor (2023).

O Gráfico 31 evidencia os resultados já discutidos, em que se obteve uma alta recuperação de HSA após a reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, que conforme já discutido, indica que há moléculas de HSA não dessorvidas na superfície das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA. Tais resultados indicam a necessidade de um estudo posterior mais aprofundado a fim de descobrirem-se outras possíveis variáveis que possam aumentar a dessorção da HSA e conseqüentemente possibilitar uma reutilização viável das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Alguns autores relataram um aumento na dessorção de proteínas ao utilizarem diferentes concentrações de NaCl na solução de dessorção (SANTOS *et al.*, 2021). Entretanto, estudos preliminares não indicaram efeito expressivo do NaCl sobre a dessorção de HSA. Além disso, o NaCl é um interferente do reagente de Bradford (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). Bhakta *et al.* (2017) realizaram a dessorção da HSA de *nanopockets* de nanopartículas magnéticas revestidas com sílica pelo tratamento com glicina 0,2 mol L<sup>-1</sup> em pH 2,5 e Tris-HCl 1 mol L<sup>-1</sup> em pH 9,0.

Para validação do modelo de reutilização das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, utilizou-se os mesmos tubos usados na validação da otimização da dessorção e realizou-se uma nova adsorção (em quadruplicada) com 1 mL de uma solução de HSA 200 mg L<sup>-1</sup> em pH 3,5. Uma predição do modelo indica que a porcentagem de recuperação de HSA é de 78,80%. Nos ensaios experimentais

o valor real obtido foi de 78,90%, o que representa uma exatidão de 99,87% em comparação com o valor predito, isso indica que o modelo de otimização da reutilização tem alta capacidade de predição da quantidade de HSA recuperada na reutilização das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .

#### 4.3.4.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$

Como nos casos anteriores, inicialmente apresentar-se-á as principais informações relacionadas às curvas de calibração de HSA em diferentes pHs de dessorção, as quais foram utilizadas na obtenção das concentrações de HSA no delineamento de otimização. O intervalo de estudo do pH de dessorção foi maior, uma vez que a faixa ótima de adsorção de HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  é mais ampla. Na Tabela 69 são apresentados os coeficientes de variação dos calibradores das curvas:

Tabela 69 - Coeficientes de variação (%) dos calibradores das curvas de HSA nos pHs de 6, 7,5 e 9.

Concentrações	Coeficientes de variação (%)		
	pH 6	pH 7,5	pH 9
0	-	-	-
10	9,96	15,16	12,5
25	9,72	2,05	1,62
50	5,12	1,92	3,39
75	4,83	1,30	2,12
100	3,18	3,30	4,44
125	1,44	0,73	0,92
150	2,26	1,30	1,07
175	1,72	0,50	3,49
200	4,79	0,50	1,35

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar na Tabela 69, todos os coeficientes de variação do apresentaram valores abaixo de 20 %, mesmo nas concentrações menores,

podendo serem usados para ajuste das curvas. As informações das curvas são apresentadas na Tabela 70:

Tabela 70 - Informações das curvas de calibração de HSA obtidas nos pHs de 6, 7,5 e 9: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) e coeficiente de determinação múltipla (R<sup>2</sup>).

pH	Par.	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p	Valor-p <sub>m</sub>	R <sup>2</sup> (%)
6,0	β <sub>0</sub>	-0,0098	0,0059	-1,6602	0,1408		
	β <sub>1</sub>	0,0034	0,0004	22,0122	<0,0001 <sup>***</sup>	<0,0001 <sup>***</sup>	99,77
	β <sub>2</sub>	-5,7 x 10 <sup>-6</sup>	7,6 x 10 <sup>-6</sup>	-7,6061	0,0001 <sup>***</sup>		
7,5	β <sub>0</sub>	0,0058	0,0054	1,0727	0,3190		
	β <sub>1</sub>	0,0034	0,0001	24,4713	<0,0001 <sup>***</sup>	<0,0001 <sup>***</sup>	99,81
	β <sub>2</sub>	-5,8 x 10 <sup>-6</sup>	7,0 x 10 <sup>-7</sup>	-8,3990	0,0001 <sup>***</sup>		
9,0	β <sub>0</sub>	0,0022	0,0062	0,3596	0,7298		
	β <sub>1</sub>	0,0036	0,0004	22,5669	<0,0001 <sup>***</sup>	<0,0001 <sup>***</sup>	99,75
	β <sub>2</sub>	-7,1 x 10 <sup>-6</sup>	8,0 x 10 <sup>-7</sup>	-8,8345	<0,0001 <sup>***</sup>		

Fonte: Autor (2023).

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

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t calculada.

As discussões a respeito da Tabela 70, são análogas às apresentadas nos estudos anteriores de otimização. Na Tabela 71 apresenta-se a análise das pressuposições das curvas:

Tabela 71 - Análise das pressuposições das curvas de HSA obtidas nos pHs de 6, 7,5 e 9.

pH	Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pearse	Teste de Breusch-Pagan
6,0	0,3603	0,8670	0,8293
7,5	0,2365	0,2378	0,6908
9,0	0,5094	0,9748	0,0982

Fonte: Autor (2023).

De acordo com a Tabela 71, nenhuma das curvas de calibração apresentou alguma violação de pressuposições. Utilizando-se as curvas para as respectivas

quantificações, obteve-se as recuperações de HSA na dessorção a partir das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ . As informações do planejamento experimental e as respostas obtidas (porcentagem de recuperação de HSA) são apresentadas a seguir na Tabela 72.

Tabela 72 - Planejamento experimental e recuperação de HSA para o estudo da dessorção de HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

Ensaio	pH	cod	Volume	cod	Tempo	cod	Recup (%)
1	6,00	-1	1,00	-1	15,00	-1	2,15
2	9,00	1	1,00	-1	15,00	-1	24,46
3	6,00	-1	3,00	1	15,00	-1	~0,00
4	9,00	1	3,00	1	15,00	-1	11,04
5	6,00	-1	1,00	-1	45,00	1	3,15
6	9,00	1	1,00	-1	45,00	1	23,04
7	6,00	-1	3,00	1	45,00	1	~0,00
8	9,00	1	3,00	1	45,00	1	10,25
9	4,98	-1,68	2,00	0	30,00	0	0,06
10	10,02	1,68	2,00	0	30,00	0	12,63
11	7,50	0	0,32	-1,68	30,00	0	45,39
12	7,50	0	3,68	1,68	30,00	0	4,03
13	7,50	0	2,00	0	4,77	-1,68	5,16
14	7,50	0	2,00	0	55,22	1,68	10,34
15	7,50	0	2,00	0	30,00	0	10,27
16	7,50	0	2,00	0	30,00	0	9,52
17	7,50	0	2,00	0	30,00	0	7,71

Fonte: Autor (2023).

cod.: valor codificado; Recup.: 1: Recuperação obtida a partir do eluato de dessorção.

Os modelos de otimização foram ajustados com os dados da Tabela 72. O modelo geral e todos os outros modelos recalculados sem os termos significativos apresentaram problemas de violações nas pressuposições e de falta de ajuste, o que levou à necessidade de transformação da variável resposta (recuperação de HSA %) com uma operação de raiz quadrada. A análise de variância do modelo geral considerando a raiz quadrada da recuperação de HSA é apresentada na Tabela 73.

Tabela 73 - Análise de variância do modelo geral de otimização da dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	9	47,4626	5,2736	9,3525	0,0038**
x <sub>1</sub>	1	25,3133	25,3133	44,8919	0,0003***
x <sub>2</sub>	1	15,2174	15,2174	26,9872	0,0013**
x <sub>3</sub>	1	0,1947	0,1947	0,3453	0,5752
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	3,9613	3,9613	7,0251	0,0329*
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	2,1590	2,1590	3,8288	0,0913
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	0,5652	0,5652	1,0024	0,3501
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	0,0001	0,0001	0,0001	0,9925
x <sub>1</sub> :x <sub>3</sub>	1	0,0415	0,0415	0,0736	0,7940
x <sub>2</sub> :x <sub>3</sub>	1	0,0102	0,0102	0,0181	0,8968
Resíduos	7	3,9471	0,5639		
Falta de ajuste	5	3,8495	0,7699	15,7681	0,0607
Erro puro	2	0,0977	0,0488		

Fonte: Autor (2023).

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

x<sub>1</sub>: pH; x<sub>2</sub>: volume de eluente de dessorção (mL); x<sub>3</sub>: tempo de agitação (min);

Fonte de var.: Fonte de variação; gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

De acordo com a análise de variância do modelo geral apresentada na Tabela 73, apenas os coeficientes associados às variáveis pH, volume e pH<sup>2</sup> foram significativos. O modelo não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,0607$ ). Reajustou-se então o modelo considerando apenas os coeficientes significativos, sendo a análise de variância apresentada na Tabela 74.

Tabela 74 - Análise de variância do modelo ótimo de dessorção de HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	6	47,41	7,90	19,76	<0,0001***
X1	1	25,31	25,31	63,30	<0,0001***
X2	1	15,22	15,22	38,05	0,0001***
X3	1	0,20	0,19	0,49	0,5012
X1 <sup>2</sup>	1	3,96	3,96	9,91	0,0104*
X2 <sup>2</sup>	1	2,16	2,16	5,40	0,0425*
X3 <sup>2</sup>	1	0,56	0,56	1,41	0,2619
Resíduos	10	4,00	0,40		
Falta de ajuste	8	3,90	0,49	9,99	0,0942
Erro puro	2	0,10	0,05		

Fonte: Autor (2023).

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

X1: pH; X2: volume de eluente de dessorção (mL); X3: tempo de agitação (min);

Fonte de var.: Fonte de variação; gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

Embora não tenham apresentado significância estatística ao nível de 5%, a os coeficientes da variável tempo de primeiro e segundo graus foram mantidos no modelo, uma vez que se retirados o modelo apresenta violações nas pressuposições (heterocedasticidade dos resíduos) e falta de ajuste. As informações da Tabela 74 são coerentes com as da Tabela 73, em que o modelo foi significativo, os coeficientes associados às variáveis mantiveram a significância após redução do número de coeficientes e não houve falta de ajuste ( $p = 0,0942$ ). Foram então obtidas as estimativas dos coeficientes do modelo ótimo, e as informações são apresentadas na Tabela 75.

Tabela 75 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo da dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.

Parâmetros	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p
Intercepto	3,06	0,36	8,39	<0,0001***
pH	1,36	0,17	7,96	<0,0001***
vol	-1,06	0,17	-6,17	0,0001***
tempo	0,12	0,17	0,70	0,5012
pH <sup>2</sup>	-0,52	0,19	-2,77	0,0197*
vol <sup>2</sup>	0,35	0,19	1,87	0,0912
tempo <sup>2</sup>	-0,22	0,19	-1,19	0,2619

Fonte: Autor (2023).

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

D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t calculada.

Tabela 76 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ótimo de dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,4186	0,5207	0,0696

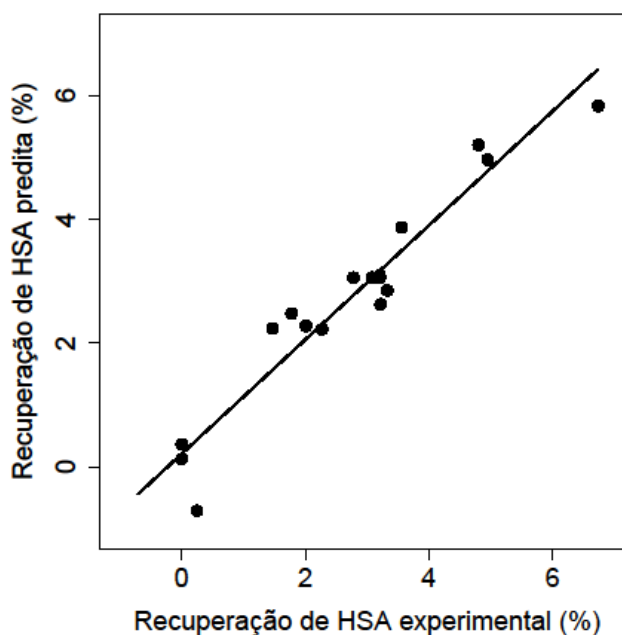
Fonte: Autor (2023).

As informações da Tabela 75 são condizentes com as da Tabela 74, e a análise de resíduos na Tabela 76 não indicou nenhuma violação das pressuposições de regressão. O valor da estatística F (19,76) obtido a partir do modelo foi maior que o F tabelado (3,22), o que demonstra alta significância. Assim, o modelo apresentado na Tabela 75 e sumarizado na equação (70) é adequado para descrição dos dados e pode ser usado para obtenção dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno (GRÁFICO 33) para a análise dos efeitos das variáveis na recuperação de HSA na dessorção das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS:

$$\sqrt{R_{\text{recup}}} = 2,44 + 1,08 x_1 - 0,85 x_2 + 0,10 x_3 - 0,42 x_1^2 + 0,28 x_2^2 - 0,17 x_3^2 \quad (70)$$

Em que  $R_{\text{recup}}$  é a recuperação de HSA (%),  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são respectivamente as variáveis independentes codificadas: pH, volume do eluente de dessorção (mL) e tempo de agitação (min). O modelo (70) apresentou um  $R^2$  de 0,9222; o que indica que ele é capaz de explicar 92,22% da variabilidade dos dados de recuperação de HSA da dessorção. A presença dos coeficientes associados às variáveis estatisticamente não significativas tempo, tempo<sup>2</sup> e volume<sup>2</sup> não altera de forma expressiva o coeficiente  $R^2$  do modelo, uma vez que o modelo recalculado sem os mesmos apresenta um  $R^2$  de 90,74%. No Gráfico 32 é apresentada a dispersão dos valores de recuperação de HSA predita pelo modelo e os valores experimentais:

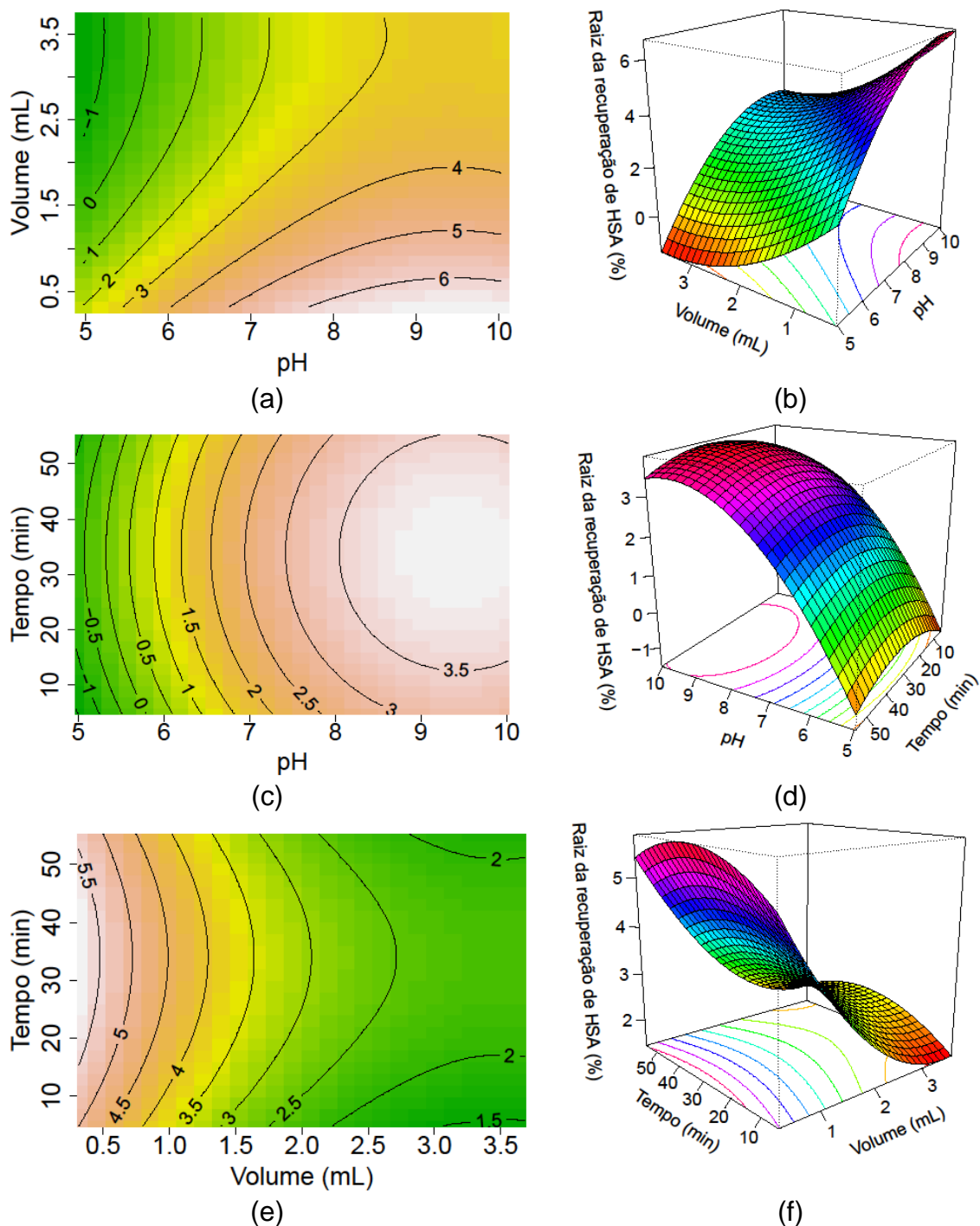
Gráfico 32 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental da dessorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.



Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado no Gráfico 32, há uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo (70) e os valores reais (experimentais) obtidos, o que reafirma a adequabilidade do ajuste do modelo (70) aos dados. Em seguida, foram obtidas as superfícies de resposta e as curvas de contorno para descrever a porcentagem de recuperação de HSA de acordo com o efeito das variáveis do estudo, sendo tais resultados apresentados no Gráfico 33:

Gráfico 33 - Curvas de contorno (a) e superfície de resposta (b) para o modelo de otimização da dessorção de HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  de acordo com o modelo ótimo de dessorção.



Fonte: Autor (2023).

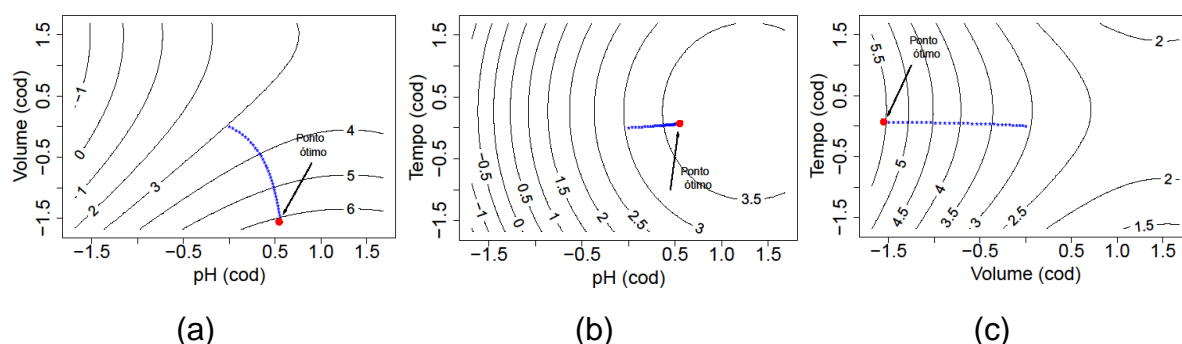
Legenda: a) e b) pH e volume de eluente de dessorção (mL);  
 c) e d) pH e tempo (min);  
 e) e f) volume de eluente de dessorção (mL) e tempo (min).

Ao que se pode observar do Gráfico 33, a recuperação aumenta significativamente com o aumento do pH e com a diminuição do volume, o tempo

de agitação não influenciou significativamente na recuperação, corroborando com os resultados da Tabela 75 e do Gráfico 33. Observa-se também que na região de pHs menores que 5 (ótimo de adsorção), a recuperação foi praticamente nula.

Com a análise canônica do modelo ótimo, obteve-se os autovalores de 0,35, -0,23 e -0,52, o que indica que o ponto estacionário corresponde a um ponto de sela. Assim, foi necessária a realização de uma análise *ridge*, e os resultados são apresentados no Gráfico 34:

Gráfico 34 - Curvas de contorno da análise *ridge* do modelo de otimização da dessorção de HSA em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.



Fonte: Autor (2023).

De acordo com a análise *ridge*, a recuperação máxima de HSA no processo de dessorção de HSA das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS (37,77 %) é obtida com as condições experimentais de pH de 8,34, volume de solução de dessorção de 0,45 mL e um tempo de agitação de 30,97 minutos. Nesse valor de pH a HSA encontra-se em sua conformação B (ASCENZI *et al.*, 2006; PETERS JR, 1996).

De modo geral, a recuperação de HSA também foi relativamente baixa, o que por sua vez pode ser explicada pela complexidade das interações entre a HSA e as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS. Assim como no caso das nanopartículas revestidas com BSA, a recuperação foi maior nos pHs maiores, o que também pode ser explicado pelas diferenças entre os potenciais de carga de superfície, conforme pode ser visualizado no Gráfico 15, em que as maiores diferenças ocorrem em pHs maiores que 7, de modo que tanto a HSA quanto as nanopartículas estão com carga líquida positiva, favorecendo a repulsão eletrostática. Acredita-se que as maiores quantidade de HSA dessorvida em comparação com as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA sejam devido a maior homogeneidade de grupos de superfície das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, majoritariamente compostos por grupos silanóis, o que faz com que existam menos interações

eletrostáticas de cargas opostas com as diferentes regiões da HSA e assim menor possibilidade de adsorção em outros sítios.

Para validação do modelo de otimização da dessorção de HSA das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , realizou-se uma adsorção (em quadruplicada) de uma solução de HSA  $250 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 4,5 em tubos contendo 10 mg de nanopartículas seguidas de uma dessorção considerando as condições ótimas aproximadas obtidas a partir do modelo. Dada a necessidade de um maior volume de solução de recuperação, optou-se por utilizar 1 mL de solução de dessorção em pH 8,3 e 31 minutos de agitação. Nas referidas condições, uma predição com o modelo indica que a raiz quadrada da porcentagem de recuperação de HSA é de 5,07, já nos ensaios experimentais o valor real obtido foi de 4,31, o que representa uma exatidão maior que 85% em comparação com o valor predito, o que sugere que o modelo de otimização tem boa capacidade de predição da quantidade de HSA recuperada na dessorção das nanopartículas.

#### *4.3.4.2.1 Otimização da reutilização das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$*

Para estudos de reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , obteve-se as recuperações de HSA de acordo com o planejamento, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 77:

Tabela 77 - Planejamento experimental e resposta para o estudo da reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Ensaio	pH	cod	Volume	cod	Tempo	cod	Recup (%)
1	6,00	-1	1,00	-1	15,00	-1	67,25
2	9,00	1	1,00	-1	15,00	-1	65,05
3	6,00	-1	3,00	1	15,00	-1	67,47
4	9,00	1	3,00	1	15,00	-1	67,03
5	6,00	-1	1,00	-1	45,00	1	71,93
6	9,00	1	1,00	-1	45,00	1	62,23
7	6,00	-1	3,00	1	45,00	1	67,91
8	9,00	1	3,00	1	45,00	1	66,37
9	4,98	-1,68	2,00	0	30,00	0	74,65
10	10,02	1,68	2,00	0	30,00	0	68,13
11	7,50	0	0,32	-1,68	30,00	0	66,37
12	7,50	0	3,68	1,68	30,00	0	67,03
13	7,50	0	2,00	0	4,77	-1,68	65,93
14	7,50	0	2,00	0	55,22	1,68	62,88
15	7,50	0	2,00	0	30,00	0	60,72
16	7,50	0	2,00	0	30,00	0	62,23
17	7,50	0	2,00	0	30,00	0	62,01

Fonte: Autor (2023).

cod.: valor codificado; Recup.: Recuperação obtida após a reutilização das nanopartículas.

Com os dados da Tabela 77 ajustou-se os modelos de otimização. As informações do modelo geral são apresentadas a seguir na Tabela 78.

Tabela 78 - Análise de variância do modelo geral de otimização da reutilização das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	9	192,97	21,44	11,06	0,0023**
X <sub>1</sub>	1	45,18	45,18	23,30	0,0019**
X <sub>2</sub>	1	0,86	0,86	0,44	0,5265
X <sub>3</sub>	1	0,89	0,89	0,46	0,5188
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	94,96	94,96	48,98	0,0002***
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	22,45	22,45	11,58	0,0114*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	6,54	6,54	3,37	0,1089
X <sub>1</sub> :X <sub>2</sub>	1	12,28	12,28	6,33	0,0400*
X <sub>1</sub> :X <sub>3</sub>	1	9,26	9,26	4,78	0,0651
X <sub>2</sub> :X <sub>3</sub>	1	0,54	0,54	0,28	0,6147
Resíduos	7	13,57	1,94		
Falta de ajuste	5	12,24	2,45	3,69	0,2270
Erro puro	2	1,33	0,66		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; X<sub>1</sub>: pH; X<sub>2</sub>: volume de eluente de dessorção (mL); X<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

Conforme pode ser observado na Tabela 78, as variáveis pH (primeira e segunda ordens), volume (segunda ordem) e a interação pH:volume apresentaram efeito sobre a recuperação de HSA após a reutilização das nanopartículas. Assim ajustou-se o modelo reduzido sem as variáveis não significativas, e a análise de variância é apresentada na Tabela 79:

Tabela 79 - Informações da análise de variância do modelo ótimo de recuperação de HSA na reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Fonte de var.	gl	SQ	QM	F	Valor-p
modelo	5	175,73	35,15	12,55	0,0003***
x <sub>1</sub>	1	45,18	45,18	16,13	0,0020**
x <sub>2</sub>	1	0,86	0,86	0,31	0,5903
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	94,96	94,96	33,91	0,0001***
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	22,45	22,45	8,02	0,0163*
x <sub>1</sub> :x <sub>2</sub>	1	12,28	12,28	4,39	0,0602
Resíduos	11	30,81	2,80		
Falta de ajuste	3	0,49	0,16	0,04	0,9871
Erro puro	8	30,31	3,79		

Fonte: Autor (2023).

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

Fonte de var.: Fonte de variação; X<sub>1</sub>: pH; X<sub>2</sub>: volume de eluente de dessorção (mL); X<sub>3</sub>: tempo de agitação (min); gl.: Graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística F calculada.

As informações da Tabela 79 estão de acordo com as da Tabela 78. Os efeitos da interação e da variável volume de eluente foram não significativos ao nível de 5%, mas optou-se por mantê-los no modelo devido à importância dos mesmos. Os demais coeficientes foram significativos e não houve falta de ajuste ( $p = 0,9871$ ). Foram então obtidas as estimativas dos parâmetros e a análise de resíduos do modelo ótimo, sendo as informações apresentadas na Tabela 80 e na Tabela 81 respectivamente:

Tabela 80 - Estimativas dos parâmetros do modelo ótimo de reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, desvio padrão, estatística t e valor-p associados.

Parâmetros	Estim.	D.p.	t-calc	valor-p
Intercepto	62,69	0,72	86,59	<0,0001***
pH	-1,82	0,45	-4,02	0,0020**
volume	0,25	0,45	0,55	0,5903
pH <sup>2</sup>	3,01	0,48	6,32	0,0001***
volume <sup>2</sup>	1,35	0,48	2,83	0,0163*
pH:volume	1,24	0,59	2,09	0,0602

Fonte: Autor (2023).

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

D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t calculada.

Tabela 81 - Valor-p obtido para os testes na análise dos resíduos do modelo ajustado para reutilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pierce	Teste de Breusch-Pagan
0,3760	0,5075	0,4117

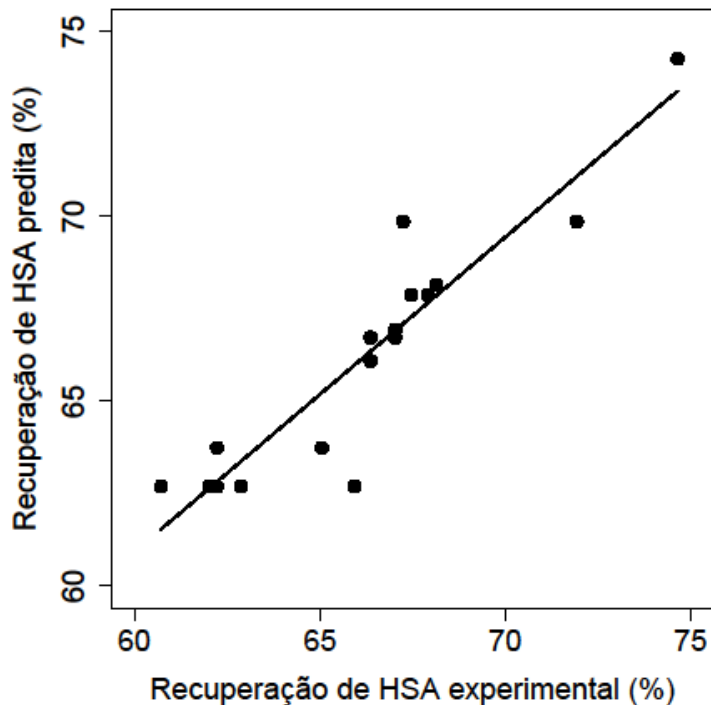
Fonte: Autor (2023).

Conforme a análise dos resíduos da Tabela 81, o modelo não apresentou nenhuma violação nas pressuposições. O valor da estatística F (12,15) obtido a partir do modelo foi maior que o F tabelado (3,20), o que demonstra alta significância. Assim, o modelo apresentado na Tabela 80 e sumarizado na equação (66) é adequado para descrição dos dados:

$$R_{\text{reut}} = 62,69 - 1,82 x_1 + 0,25 x_2 + 3,01 x_1^2 + 1,35 x_2^2 + 1,24 x_1:x_2 \quad (71)$$

Em que  $R_{\text{reut}}$  é a recuperação de HSA (%),  $x_1$  e  $x_2$  são respectivamente as variáveis independentes codificadas pH e volume do eluente de dessorção (mL). O modelo (66) apresentou um  $R^2$  de 0,8508, o que indica que ele é capaz de explicar 85,08% da variabilidade dos dados. No Gráfico 35 é apresentada a dispersão dos valores de recuperação de HSA predita pelo modelo e os valores experimentais:

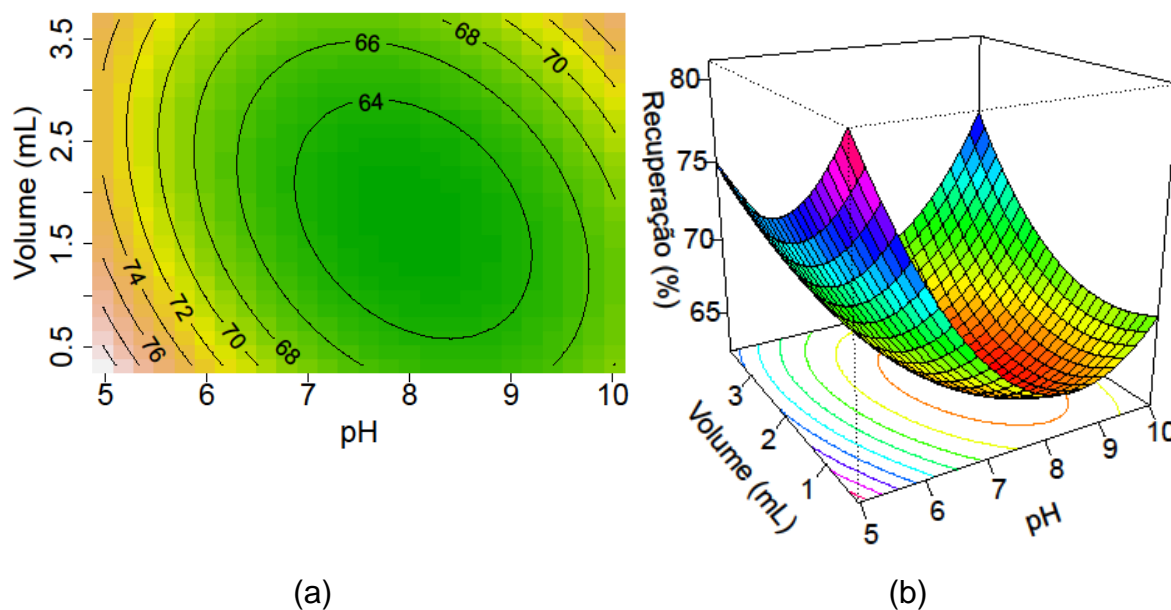
Gráfico 35 - Recuperação de HSA (%) predita pelo modelo em função da recuperação experimental após a reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .



Fonte: Autor (2023).

Conforme pode ser observado no Gráfico 35, há uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo (71) e os valores reais (experimentais) obtidos, o que reafirma a adequabilidade do ajuste do modelo (71) aos dados. Em seguida, foram obtidas as superfícies de resposta e as curvas de contorno (GRÁFICO 36) para descrever a porcentagem de recuperação de HSA após a reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  de acordo com o efeito das variáveis em estudo:

Gráfico 36 - Curvas de contorno e superfície de respostas do modelo de otimização da reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  de acordo com as variáveis avaliadas.



Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) e b) pH e volume de eluente de dessorção (mL);

De acordo com as curvas de contorno e superfície de respostas do Gráfico 36, a recuperação de HSA após a reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  é menor na região ao redor do pH 8 e de um volume de 2 mL. Nota-se também que, assim como com as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , a recuperação é maior nos pHs mais ácidos, próximos ao ótimo de adsorção, o que evidencia que a HSA adsorvida na etapa de adsorção não foi totalmente dessorvida, impedindo a adsorção de novas moléculas de HSA.

De acordo com o modelo, as condições ótimas de recuperação de HSA, ocorrem nas condições de dessorção de pH = 8,03 e volume de solução de dessorção de 1,74 mL, que levam a uma recuperação de HSA de 62,33%, valor quase o dobro dos 37,73% da recuperação da primeira adsorção, mas quase 20% menor quando comparados às menores recuperações de HSA (em torno de 80%) da reutilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  (GRÁFICO 31). Pela análise canônica do modelo ótimo, obteve-se os autovalores de 3,21 e 1,14, o que indica que o ponto estacionário é um ponto de mínimo, validando as condições de otimalidade aqui discutidas. Embora a recuperação ainda tenha se mostrado relativamente alta, as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  mostraram maior potencial para reutilização quando comparadas com as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  dadas as maiores quantidades de HSA

adsorvidas/recuperadas, mas ainda assim são necessários estudos mais detalhados a fim de se otimizar o processo de reutilização até que se torne viável.

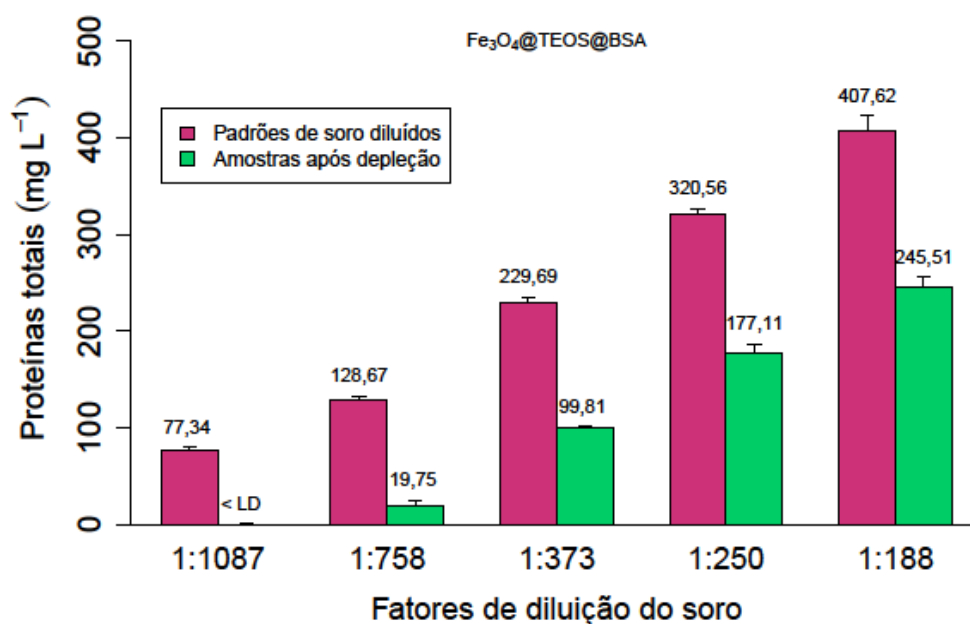
Para validação do modelo de reutilização das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , utilizou-se os mesmos tubos usados na validação da otimização da reutilização e realizou-se uma nova adsorção (em quadruplicada) com 1 mL de uma solução de HSA  $250 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 4,5. Uma predição do modelo nas condições de pH 8,3 e volume de solução de dessorção de 1 mL indica que a porcentagem de recuperação de HSA é de 63,01% em relação ao padrão de  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . Nos ensaios experimentais o valor obtido foi de 81,30%, o que representa uma exatidão de 77,50% em comparação com o valor predito, isso indica que o modelo de otimização da reutilização tem uma capacidade intermediária de predição da quantidade de HSA recuperada na reutilização das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

##### 4.4.1 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$

No Gráfico 37 são apresentados os resultados da quantificação de proteínas totais de soro humano antes e após a depleção com as de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ :

Gráfico 37 - Concentração de proteínas antes e depois da depleção com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .



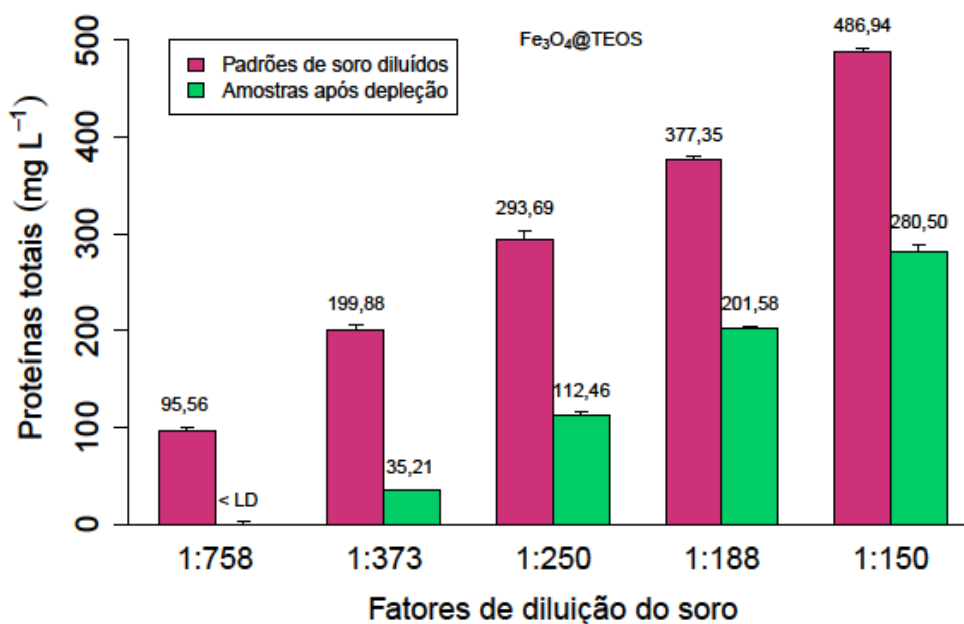
Fonte: Autor (2023).

No Gráfico 37 é demonstrada a efetividade das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  na adsorção de proteínas de soro sanguíneo em toda a faixa de diluição estudada. De acordo com as informações apresentadas, a redução das concentrações de proteínas foram de 77,34; 108,92; 129,88; 143,45 e 162,11  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente, o que corresponde a porcentagens de adsorção de 100,00, 84,65, 56,55, 44,75 e 39,77 %. A redução nas porcentagens de adsorção com o aumento da concentração de proteínas (menores fatores de diluição) evidencia a tendência de saturação da superfície das nanopartículas. Não se pode afirmar com exatidão quais proteínas estão sendo adsorvidas, mas há indícios suficientes para se dizer que há uma adsorção expressiva de HSA, uma vez que ela é a proteína de maior abundância, com uma faixa de concentração entre 65 e 85  $\text{g.L}^{-1}$ , o que representa mais de 60 % do total de proteínas.

#### 4.4.2 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$

No Gráfico 38 são apresentados os resultados da quantificação de proteínas totais de soro antes e após a depleção com as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ :

Gráfico 38 - Concentração de proteínas antes e depois da depleção com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .



Fonte: Autor (2023).  
LD: Limite de detecção.

Conforme pode ser visto no Gráfico 38, as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  também demonstraram efetividade na adsorção de proteínas de soro sanguíneo em toda a faixa de diluição estudada, e sobretudo apresentaram maiores capacidades de adsorção quando comparadas às nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ . De acordo com as informações apresentadas, a redução das concentrações de proteínas foram de 95,56; 164,67; 181,23; 175,77 e 206,44  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente, o que corresponde à porcentagens de adsorção de 100,00; 82,38; 61,71; 46,58 e 42,39 %. A redução nas porcentagens de adsorção com o aumento da concentração de proteínas evidencia a tendência de saturação da superfície das nanopartículas. Conforme discutido acima, há indícios suficientes para se dizer que há uma adsorção expressiva de HSA, uma vez que ela é a proteína de maior abundância do soro.

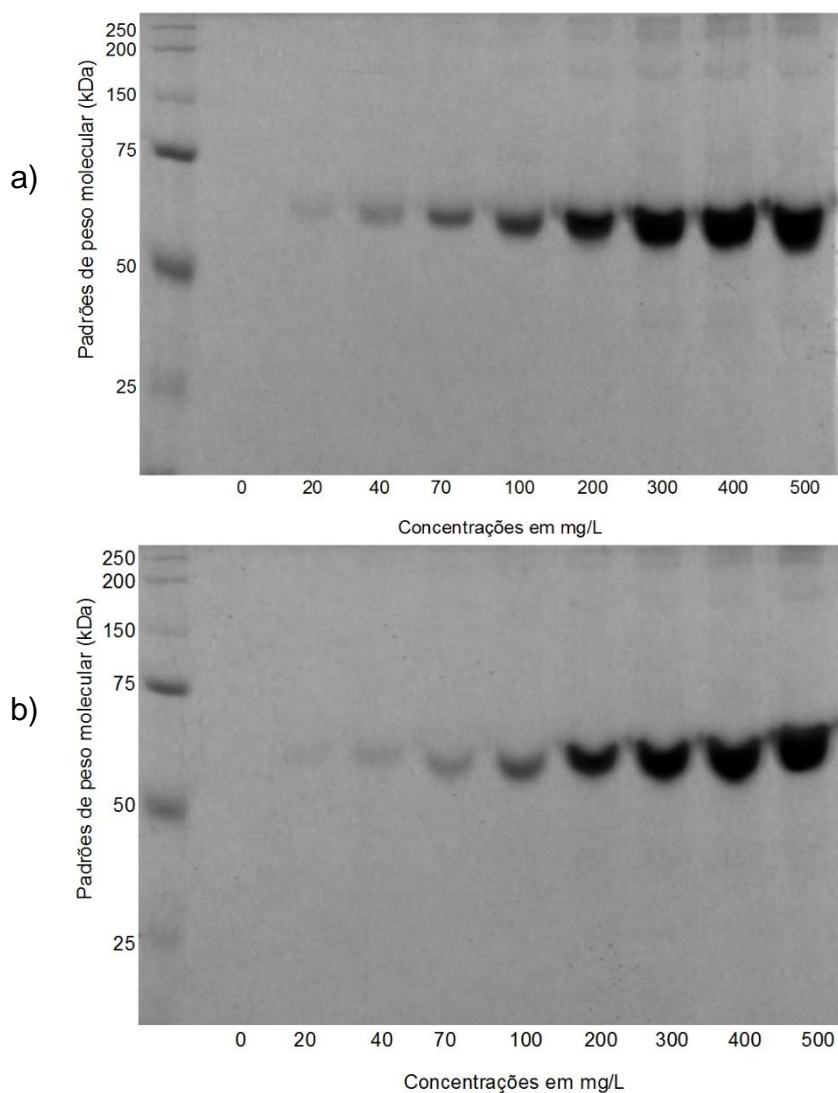
De modo geral, ambas as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  apresentaram boa adsorção das proteínas do soro, e assim resolveu-se estudar o perfil das proteínas adsorvidas mais detalhadamente através dos experimentos de eletroforese.

## 4.5 ELETROFORESE

### 4.5.1 Curvas de calibração

Em um primeiro momento, obteve-se os géis de eletroforese obtidos para as curvas de calibração (duplicata), os quais são mostrados na Figura 12:

Figura 12 - Curvas de calibração de HSA obtidas através de SDS-PAGE.



Fonte: Autor (2023).

Legenda: a) Eletroforese da primeira curva;  
b) Eletroforese da segunda curva.

A partir desses géis e com o software *Image Lab* obteve-se os dados de volume ajustado. Analogamente ao que foi apresentado nos estudos de quantificação de HSA pelo método de Bradford, inicialmente obteve-se os coeficientes de variação dos calibradores da curva, cujos resultados são apresentados na Tabela 82.

Tabela 82 - Coeficientes de variação (%) para os calibradores da curva analítica de HSA obtida na eletroforese.

<b>Concentrações (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coeficientes de variação (%)</b>
0	..
20	30,75
40	48,90
70	29,19
100	27,11
200	11,44
300	13,71
400	9,22
500	5,76

Fonte: Autor (2023).

Ao que se pode observar da Tabela 82, todos os calibradores de concentrações menores que 200 mg L<sup>-1</sup> apresentaram coeficientes maiores que 20%. O objetivo dessas análises é demonstrar a efetividade das nanopartículas na depleção da HSA, comparando-se para isso o total de HSA na amostra de soro com a quantidade obtida nos diferentes tratamentos, os quais são todos efetuados no mesmo gel, dessa forma, mesmo que houvesse um viés resultante da curva, ele seria o mesmo para todas as amostras e não comprometeria o objetivo geral da análise.

A eletroforese não é uma técnica quantitativa muito sensível, sendo mais utilizada qualitativamente, caso fossem necessárias maiores precisão e exatidão na quantificação da HSA, utilizar-se-iam outras metodologias de análises, como cromatografia ou espectrometria de massas de alta resolução. Outro fator a ser considerado é que este estudo não envolve validação analítica. Soma-se a isso o baixo número de repetições de cada calibrador da curva (duplicata), embora na literatura haja trabalhos em que os autores utilizaram apenas uma réplica dos calibradores da curva, como em Jesus, Guimarães e Arruda (2019).

Com relação ao maior valor de coeficiente de variação da Tabela 82, 48,90 % para 40 mg L<sup>-1</sup>, nota-se que ele ocorre devido à uma variação aleatória do experimento, uma vez que na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> o valor quase foi 40 % menor (30,75 %). Desse modo, optou-se por retirá-lo dos dados para ajuste da curva. As concentrações de 20, 70 e 100 mg L<sup>-1</sup>, apresentaram valores de cv bastante próximos entre si (pouco abaixo de 30 %).

Obtidos então os dados dos calibradores e suas respectivas respostas (volumes ajustados), ajustou-se curvas de calibração com graus variando de 1 a 3, sendo a curva mais adequada a de segundo grau, cujas informações são apresentadas na Tabela 83:

Tabela 83 - Informações da curva de calibração de HSA obtida na eletroforese: Estimativas, desvio padrão, estatística-t e valor-p associados aos parâmetros, significância do modelo (valor-p<sub>m</sub>) e coeficiente de determinação múltipla (R<sup>2</sup>).

Par.	Estimativa	D.p.	t-calc	Valor-p	Valor-p <sub>m</sub>	R <sup>2</sup> (%)
β <sub>0</sub>	-3,9537	2,3170	-1,7064	0,1487		
β <sub>1</sub>	0,4492	0,0266	16,8643	<0,0001***	<0,0001***	99,70
β <sub>2</sub>	-0,0004	5,3x10 <sup>-5</sup>	-6,5828	0,0012**		

Fonte: Autor (2023).

Par.: parâmetro; D.p.: desvio padrão; t-calc.: estatística t.

Ao que se pode observar da Tabela 83, a estimativa do intercepto não foi significativa (p = 0,1487), o que indica que quando não há HSA na solução pura e o volume ajustado é estatisticamente igual a zero. A estimativa do parâmetro β<sub>2</sub> foi significativa (p < 0,0001) e a curva apresentou um R<sup>2</sup> bastante elevado, indicando que 99,70% da variabilidade dos dados é explicada pelo modelo. A análise das pressuposições é apresentada na Tabela 84.

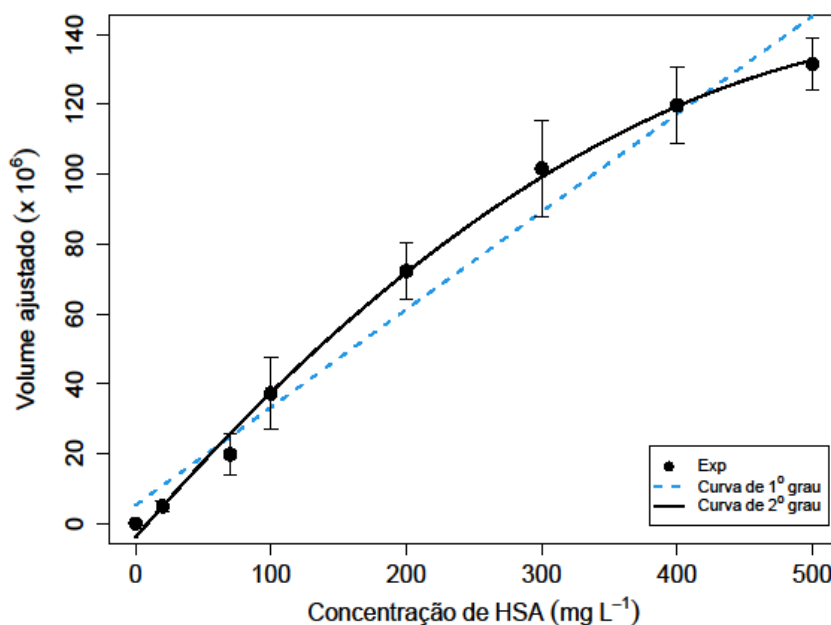
Tabela 84 - Análise das pressuposições da curva de HSA obtida com a eletroforese.

Teste de Shapiro-Wilk	Teste de Box-Pearse	Teste de Breusch-Pagan
0,2405	0,9041	0,4967

Fonte: Autor (2023).

De acordo com a Tabela 84, o modelo não apresentou nenhuma violação nas pressuposições da regressão, sendo adequado para quantificação da HSA das amostras. No Gráfico 39 seguir são apresentados os dados e as curvas de calibração de HSA obtidos na eletroforese:

Gráfico 39 - Dados obtidos com a eletroforese e curvas de calibração de HSA ajustadas.



Fonte: Autor (2023).

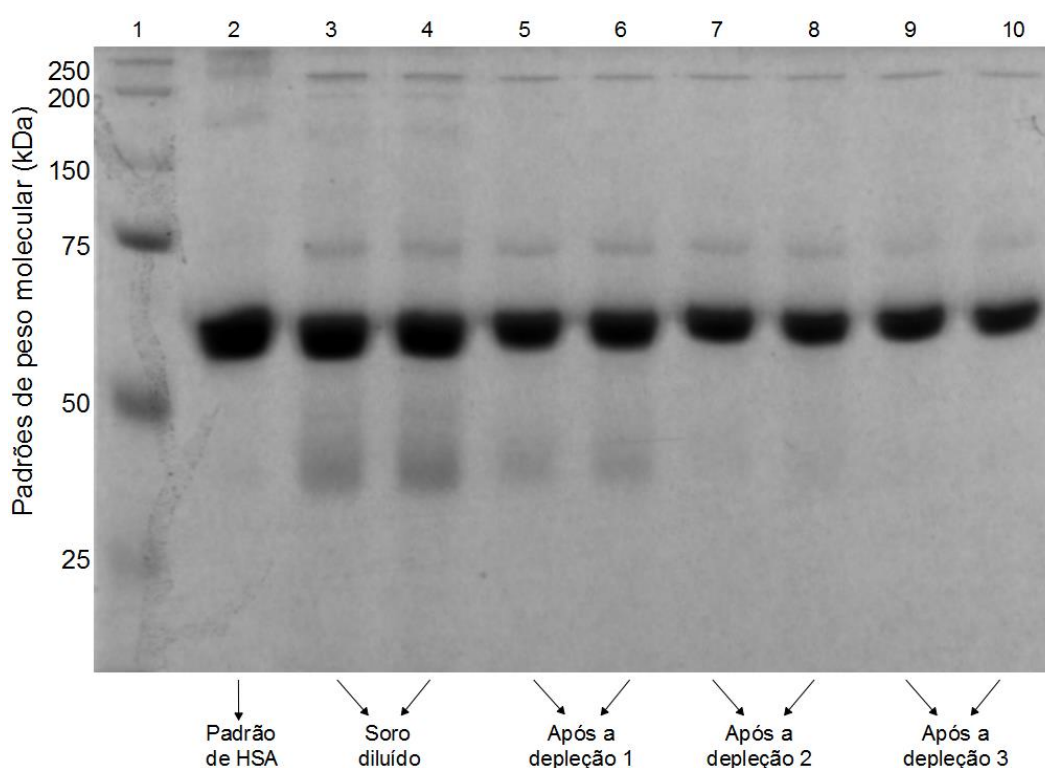
Conforme pode ser visto no Gráfico 39, é bem evidente no comportamento dos dados, o aumento na resposta de acordo com a concentração de HSA. Nota-se que os erros associados às réplicas foram reativamente altos, o que justifica os valores dos coeficientes de variação apresentados na Tabela 82. No entanto, os dados apresentaram um comportamento linear (de segundo grau) bastante expressivo, o que é condizente com o elevado coeficiente  $R^2$  de 99,70% (Tabela 83) da curva de segundo grau, bem como a inadequação da curva de primeiro grau (em azul).

## 4.5.2 Eletroforese das depleções múltiplas

### 4.5.2.1 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA

Na Figura 13 é apresentado o gel de eletroforese dos sobrenadantes obtidos após as depleções consecutivas (duplicatas) de HSA com 20 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA:

Figura 13 - Perfil eletroforético dos eluatos de depleções consecutivas com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA após separação via SDS-PAGE.



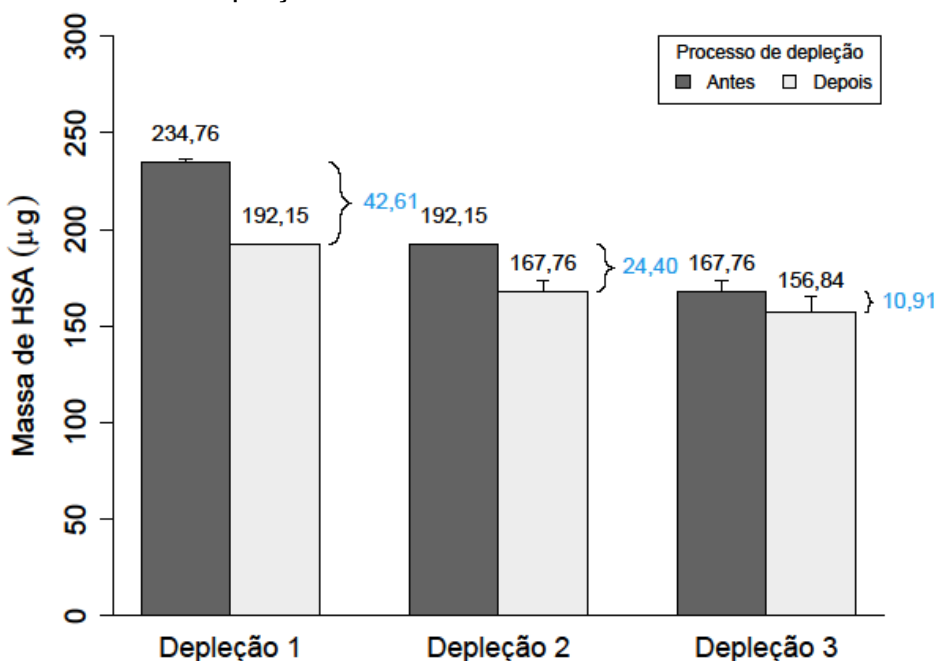
Fonte: Autor (2023).

Na Figura 13 é mostrado o perfil das sucessivas depleções de proteínas do soro com as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, conforme evidenciado pela comparação das bandas do soro antes da depleção (colunas 3 e 4) com as resultantes das etapas de depleção (colunas de 5 - 10). As nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA foram pouco efetivas na depleção de HSA, conforme evidenciado pela comparação das bandas do soro antes da depleção (colunas 3 e 4) com as resultantes das etapas de depleção (colunas de 5 - 10) em que houve uma diminuição pouco expressiva na intensidade das bandas. Embora essas diferenças

tenham sido pouco expressivas, percebe-se que a quantidade de nanopartícula influencia na depleção de HSA, visto a diminuição das intensidades das bandas, corroborando com a inclusão da variável massa de nanopartícula no modelo de otimização da adsorção de HSA (62).

Pode-se dizer que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$  apresentaram baixa afinidade pelas proteínas de peso molecular ao redor de 75 kDa, em que a intensidade das bandas se manteve praticamente constante, com uma pequena diminuição na terceira etapa (colunas 9 e 10). Já para as proteínas com peso molecular abaixo de 50 kDa, as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$  promoveram uma depleção cruzada, visto a diminuição da intensidade das bandas, as quais praticamente desapareceram na terceira etapa. De acordo com Mahmoudi *et al.* (2011), proteínas como HSA e fibrinogênio podem cobrir a superfície de nanopartículas por curtos períodos de tempo, enquanto proteínas de baixa abundância com maiores afinidades e cinética mais lenta podem substituí-las em tempos subsequentes, o que explica a baixa adsorção de HSA e a alta adsorção das demais proteínas. Uma análise quantitativa dessas bandas é apresentada no Gráfico 40:

Gráfico 40 - Quantidade de HSA adsorvida em cada etapa de depleção com  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ .



Fonte: Autor (2023).

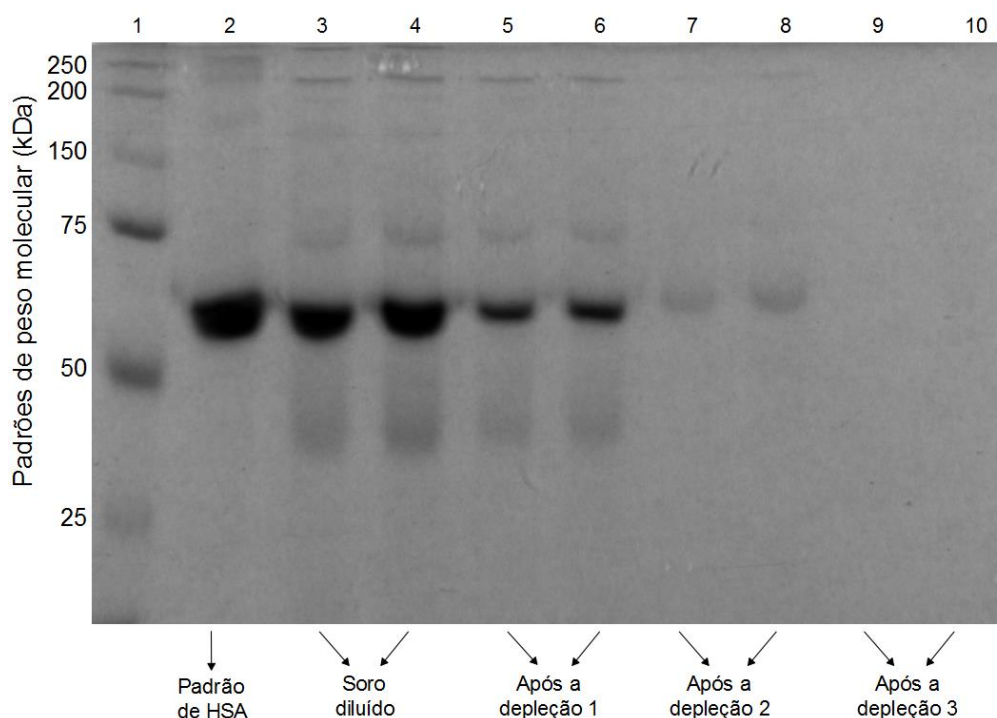
Os resultados mostrados no Gráfico 40 corroboram com o perfil da eletroforese da Figura 13. Há uma ordem decrescente na quantidade de HSA depletada, em que 42,61 µg foram depletadas na primeira etapa, seguidas por 24,40 e 10,91 µg nas segunda e terceira etapas respectivamente. Tal comportamento é semelhante ao discutido nos estudos das isotermas de adsorção, em que a capacidade máxima de adsorção diminui com a redução da concentração de HSA disponível. Outro fator importante para explicar a menor capacidade de adsorção é que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$  também adsorvem outras proteínas, tais como as de peso molecular abaixo de 50 kDa.

Os resultados aqui descritos corroboram com o fato de que a variável massa de nanopartículas estudada nos experimentos de otimização da adsorção de HSA (seção 4.3.1.1) em água não tenha apresentado efeito significativo. Fica evidente que devido à reduzida capacidade de adsorção das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@\text{BSA}$ , na faixa estudada, o efeito ocasionado pelo aumento da massa de nanopartículas sobre a adsorção de HSA é inexpressivo.

#### 4.5.2.2 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$

Na Figura 14 é apresentado o gel SDS dos eluatos das depleções consecutivas (duplicatas) de HSA de soro com 20 mg de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ :

Figura 14 - Perfil eletroforético dos eluatos de depleções consecutivas com  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  após separação via SDS-PAGE.



Fonte: Autor (2023).

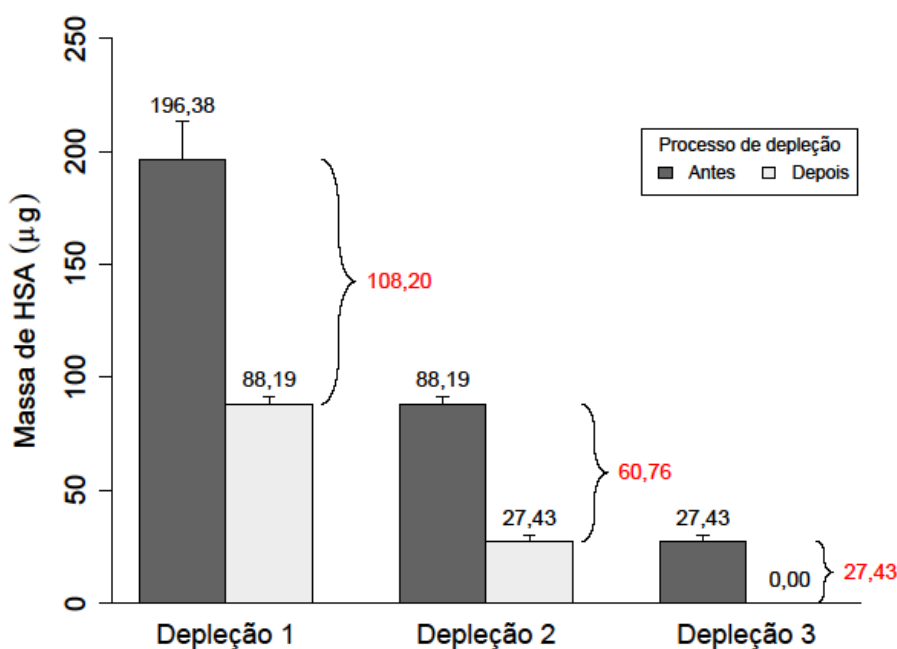
Na Figura 14 é mostrado o perfil das sucessivas depleções de proteínas do soro com as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , conforme evidenciado pela comparação das bandas dos padrões de soro (colunas 3 e 4) com as resultantes das etapas de depleção (colunas de 5 - 10). Nota-se que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  apresentaram alta capacidade de adsorção para a HSA e as demais proteínas do soro. De modo que já na segunda etapa de depleção quase a totalidade da HSA havia sido depletada. Resultados semelhantes foram obtidos por Lu *et al.* (2021a), os quais realizaram uma método de depleção de HSA utilizando um polímeros de impressão molecular.

Na primeira etapa de depleção (colunas 5 e 6) percebe-se que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  apresentaram alta afinidade pela HSA e baixa para as demais proteínas, uma vez que a intensidade das bandas das proteínas de peso molecular ao redor de 75 kDa permaneceu inalterada e a das bandas de peso molecular abaixo de 50 kDa praticamente não sofreu alteração. Em um meio com baixas concentrações de proteína, proteínas como albumina podem dominar a superfície de uma nanopartícula, o que é condizente com a adsorção da HSA nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

As proteínas que se ligam mais fortemente a nanotubos de carbono (CNTs), nanopartículas de óxido de ferro, lipossomas e nanopartículas poliméricas são albumina, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento, fibrinogênio e apolipoproteínas (NEL *et al.*, 2009).

Já na segunda etapa de depleção (colunas 7 e 8), apenas as bandas correspondentes à HSA foram visíveis, enquanto na terceira (colunas 9 e 10), quase todas as proteínas foram depletadas. A análise quantitativa dessas bandas é apresentada a seguir no Gráfico 41:

Gráfico 41 - Quantidade de HSA adsorvida em cada etapa de depleção com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.



Fonte: Autor (2023).

Os resultados apresentados no Gráfico 41 são condizentes com os resultados de eletroforese apresentados na Figura 14. Observa-se que há uma ordem decrescente na quantidade de HSA depletada, em que 108,20 µg foram adsorvidas na primeira etapa de depleção, seguidas por 60,76 e 27,43 µg nas segunda e terceira etapas respectivamente. Não é possível afirmar qual é a capacidade de adsorção das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS na terceira etapa, uma vez que toda HSA foi depletada, sabe-se apenas que esse valor é de no mínimo 27,43 µg. Discussões semelhantes às feitas para as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA são também aplicáveis a estes resultados para as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS.

No que tange aos experimentos de otimização da adsorção de HSA (seção 4.3.1.2), os resultados aqui descritos na eletroforese são condizentes, de modo que se percebe claramente o efeito expressivo do aumento da massa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS no aumento da depleção de HSA.

De modo geral, acredita-se que para futuros estudos de busca de biomarcadores, os quais envolvam um preparo de amostras envolvendo as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS, o ponto de partida inicial que se parece mais adequado é a depleção descrita na primeira etapa (FIGURA 14, colunas 5 e 6), uma vez que praticamente só as bandas de HSA foram depletadas. Já para as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA, mais estudos são necessários.

Sabe-se que durante o processo de depleção de HSA pode haver a depleção cruzada de proteínas de baixa abundância (GRANGER *et al.*, 2005; PETRICOIN; LIOTTA, 2004; ZHOU *et al.*, 2004) devido à possibilidade da HSA ligar-se a certas proteínas de baixo peso molecular, fragmentos de proteínas ou peptídeos durante vários métodos de depleção de proteínas de alta abundância, o chamado efeito esponja (ZOLOTARJOVA *et al.*, 2005). Ressalta-se também que é importante reconhecer que muitas proteínas estão ligadas à albumina (por exemplo, o chamado albuminoma) e a depleção cruzada pode ocorrer, pois muitas proteínas abundantes têm funções transportadoras (IGNJATOVIC *et al.*, 2019). Em Jesus *et al.* (2017) os autores demonstraram que a depleção de HSA com nanopartículas magnéticas permitiu a detecção de uma quantidade bem maior de novas proteínas em comparação ao kit comercial *Proteominer*, embora o total de HSA depletado pelo kit tenha sido maior.

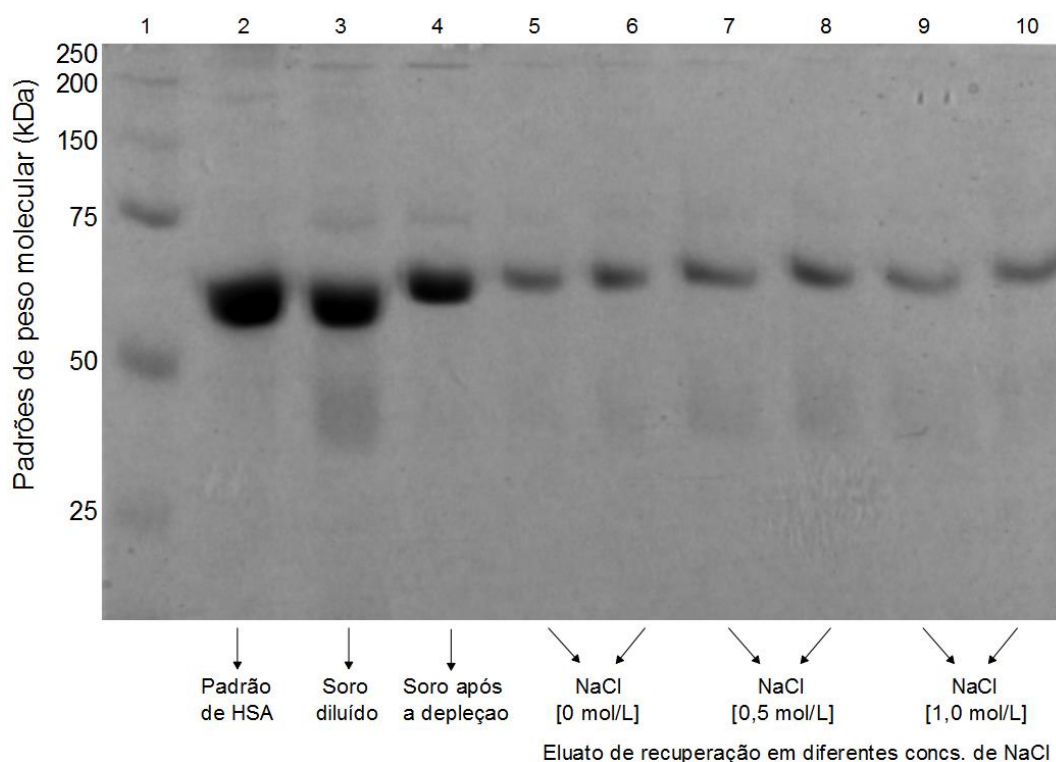
Diante disso, o número de proteínas de baixa abundância encontradas no sobrenadante de depleção pode variar de acordo com a quantidade de HSA depletada. Nos kits comerciais essa quantidade é alta, porém é fixa, o que por sua vez limita o número de biomarcadores que podem ser encontrados. Por outro lado, a utilização das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS tem a versatilidade de possibilitar que a quantidade de HSA depletada seja controlada pela massa de nanopartículas utilizada no processo de depleção, podendo permitir que um maior número de biomarcadores seja encontrado, o que é uma grande vantagem em relação aos kits comerciais.

### 4.5.3 Eletroforese das dessorções

#### 4.5.3.1 Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA

Na Figura 15 é apresentado o gel de eletroforese dos eluatos das dessorções a partir das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA (70 mg por ensaio), considerando eluentes de dessorção em pH 9,2 com as concentrações de NaCl de 0 (colunas 5 e 6); 0,5 (colunas 7 e 8) e 1 mol L<sup>-1</sup> (colunas 9 e 10):

Figura 15 - Perfil eletroforético dos eluatos de dessorção das proteínas adsorvidas nas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TEOS@BSA após separação via SDS-PAGE.



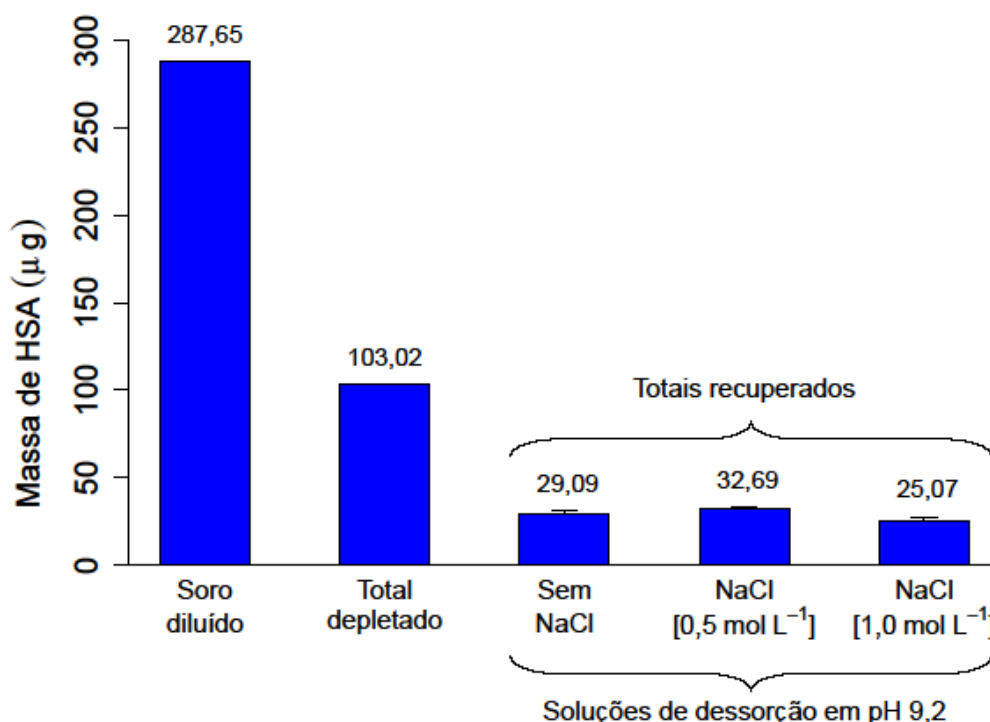
Fonte: Autor (2023).

A partir dos resultados apresentados na Figura 15, nota-se que as bandas correspondentes à HSA recuperada na dessorção foram bastante semelhantes, embora na concentração de NaCl de 1 mol L<sup>-1</sup> (colunas 9 e 10) a recuperação foi levemente menor em comparação às demais, o que pode ser visto pela menor intensidade. Na concentração de NaCl de 0,5 mol L<sup>-1</sup> houve uma maior recuperação de proteínas de peso molecular abaixo de 50 kDa. Embora não se tenha atingido uma recuperação de 100% das proteínas adsorvidas nas nanopartículas, isso não é

um problema, visto que a digestão proteica por tripsinização, para estudos em espectrometria de massas, pode ser feita mesmo que as proteínas estejam adsorvidas nas nanopartículas (CORTÉS *et al.*, 2012).

De acordo com Koutroukides *et al.* (2011) o conjunto das proteínas codepletadas na fração sérica de proteínas de alta abundância é chamado depletoma. De acordo com estes autores, esta fração sérica comumente ignorada pode fornecer novos insights sobre a proteômica clínica, desse modo, em estudos futuros os quais envolvam a análise do depletoma obtidos a partir da dessorção das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , a solução de NaCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 9,2 se mostra como ponto de partida mais viável. A recuperação de proteínas além da HSA sugere que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  são potenciais candidatas a suporte para enriquecimento de proteínas de baixa abundância. Com relação à HSA, uma análise quantitativa das bandas associadas é apresentada a seguir no Gráfico 42:

Gráfico 42 - Estudo da dessorção da HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  com diferentes soluções de dessorção.



Fonte: Autor (2023).

Conforme se observa no Gráfico 42, as diferenças entre a HSA recuperadas nas três soluções foram pouco perceptíveis, contudo, o uso do NaCl na concentração

de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  proporcionou maior recuperação de HSA. Uma possível explicação é que haja uma competição de íons do NaCl e a HSA pelos sítios de adsorção das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ , o que faz com que menos moléculas de HSA continuem adsorvidas. Comportamento semelhante foi observado por Santos *et al.* (2021), em que uma solução de NaCl  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 5 foi utilizada para dessorção de lisozima de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$ .

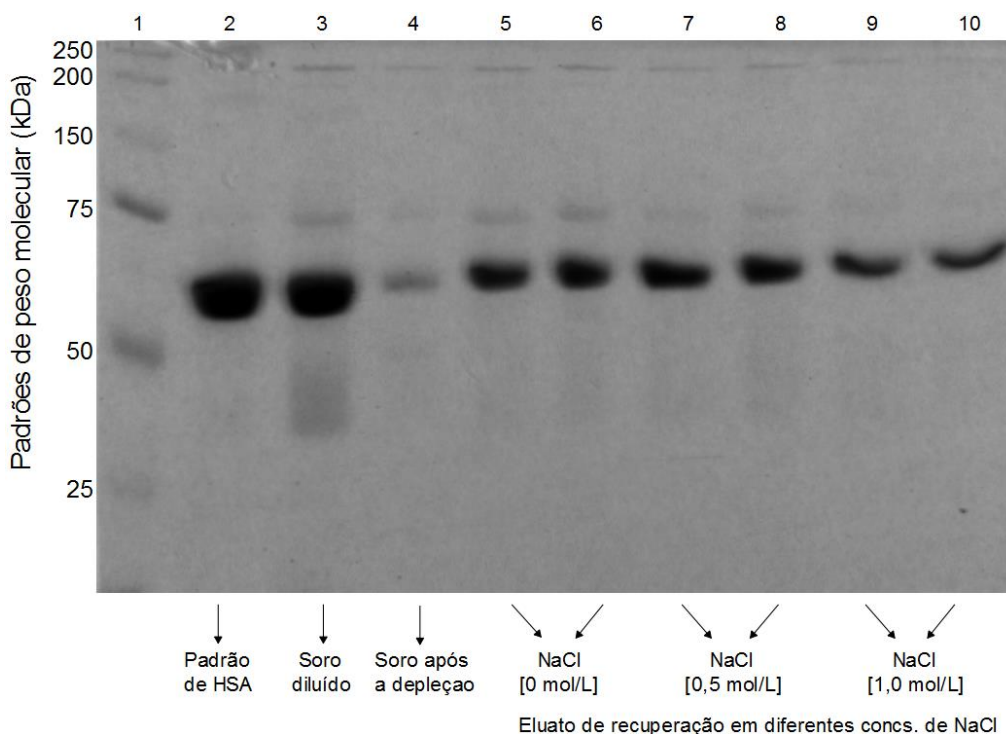
A literatura discute o uso bem sucedido de pequenas concentrações de NaCl na dessorção. Zhao *et al.* (2020) usaram uma solução de NaCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7 para dessorção de lisozima de um polímero com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com aptâmeros. Em Nicolás, Ferreira e Lassalle (2019) foi utilizado NaCl  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  na dessorção de proteínas de soro de queijo adsorvidas em nanopartículas de magnetita revestidas com ácido cítrico e íons  $\text{Cu}^{2+}$ .

Os resultados do Gráfico 42 estão de acordo com o perfil de eletroforese da Figura 15, conforme os números apresentados, obteve-se uma maior quantidade de HSA,  $32,69 \mu\text{g}$  das  $103,02 \mu\text{g}$  depletadas (31,73%), com uma solução de NaCl de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A menor recuperação foi obtida na concentração de NaCl de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , acredita-se que o excesso de NaCl provoque uma solvatação e estabilização de cargas elétricas de grupamentos na superfície das nanopartículas que seriam responsáveis por ocasionar uma maior repulsão da HSA e das demais proteínas adsorvidas, diminuindo a eficiência do processo de dessorção.

#### 4.5.3.2 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$

Na Figura 16 é apresentado o gel de eletroforese dos eluatos das dessorções a partir das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  (50 mg), considerando as diferentes soluções de dessorção em pH 8,3 com as concentrações de NaCl de 0 (colunas 5 e 6);  $0,5$  (colunas 7 e 8) e  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (colunas 9 e 10):

Figura 16 - Perfil eletroforético dos eluatos de dessorção das proteínas adsorvidas nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  após separação via SDS-PAGE.



Fonte: Autor (2023).

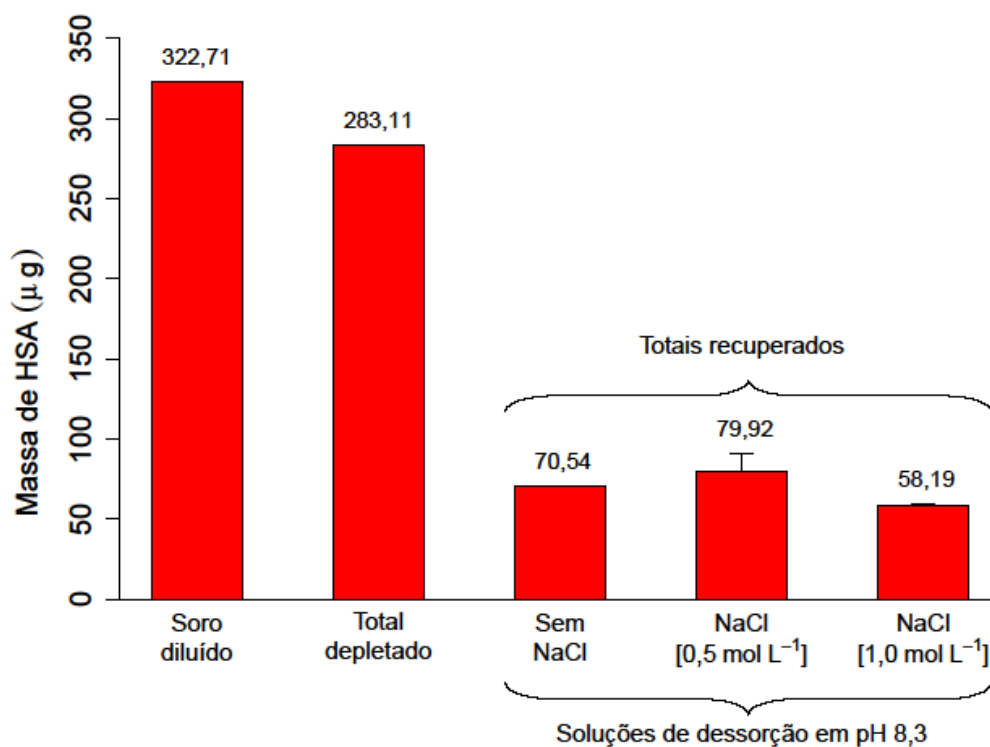
De modo semelhante ao que foi observado na Figura 15, na Figura 16 as bandas correspondentes à HSA recuperada foram bastante semelhantes, embora na concentração de NaCl de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (colunas 9 e 10) a recuperação foi menor. Na concentração de NaCl de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  também houve uma maior recuperação de proteínas de peso molecular abaixo de 50 kDa. Com o eluente de lavagem composto apenas por água em pH 8,3 e a concentração de NaCl de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , houve uma maior recuperação de proteínas de peso molecular abaixo de 50 kDa.

Por outro lado, sem o NaCl (colunas 5 e 6), obteve-se maior quantidade e variabilidade de proteínas recuperadas, o que é de suma importância em estudo proteômicos. Uma outra grande vantagem da utilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  é a possibilidade do uso como fase extratora de HSA como etapa inicial para purificação dessa proteína (terceira utilidade). Como pode ser visto na Figura 16, nas colunas de 7 a 10, é evidente que a HSA recuperada apresenta maior grau de pureza com solventes com maiores concentrações de NaCl em comparação às demais, o que é de interesse quando se usa o processo com o objetivo de extração de HSA especificamente.

Aqui foi demonstrado apenas a utilização da água como solvente, com diferentes concentrações de NaCl em pH fixado em 8,3. Ressalta-se que há diversas possibilidades de formulação de eluentes de dessorção, o que fica a critério do pesquisador e de acordo com o objetivo do estudo. Estes resultados reforçam a versatilidade do uso das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ .

As demais discussões feitas anteriormente para os resultados da dessorção das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  podem ser consideradas para a dessorção das proteínas adsorvidas nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ . A análise quantitativa das bandas associadas à HSA é apresentada no Gráfico 43:

Gráfico 43 - Estudo da dessorção da HSA das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  com diferentes soluções de dessorção.



Fonte: Autor (2023).

Os resultados apresentados no Gráfico 43 corroboram com os da Figura 16 e indicam que se obteve uma maior recuperação de HSA, 79,92 µg das 283,11 µg depletadas (28,23%), com uma solução de NaCl de 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Nas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ , as diferentes soluções de dessorção apresentaram diferenças um pouco mais nítidas em relação à quantidade de HSA recuperada.

As de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$  apresentaram comportamentos semelhantes em relação aos efeitos do NaCl nos eluentes de dessorção, em que as maiores recuperações de HSA foram com NaCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , o mesmo se observa nas recuperações de HSA, 31,73 e 28,23% respectivamente para as nanopartículas. Ressalta-se que em termos de massa absoluta as quantidades de HSA recuperadas das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$  são mais que o dobro das quantidades das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@BSA$ , devido em parte à maior capacidade de adsorção.

## 5 CONCLUSÕES

As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram sintetizadas e revestidas com tetraetilortosilicato (TEOS) e albumina de soro bovino (BSA), de modo que os resultados das caracterizações por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, medida do potencial zeta, análise termogravimétrica, difratometria de raios-X e microscopia eletrônica (MEV), demonstraram a efetividade da síntese e da integridade das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  após os respectivos revestimentos.

Este trabalho é um dos poucos a exemplificar a aplicação de metodologia de superfície de respostas na otimização da adsorção de proteínas, o emprego de diversos modelos de cinética e de isothermas de adsorção, bem como várias estratégias de seleção, sendo estes estudos realizados para avaliar a interação das nanopartículas com a HSA. A otimização da adsorção de HSA com delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), revelou que adsorção máxima de HSA ocorre em pH de 3,5 e 4,5 para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  respectivamente.

Para ambas as nanopartículas, a cinética de adsorção foi descrita pelo modelo de Avrami e o tempo de equilíbrio alcançado em 10 minutos. Com relação aos dados de equilíbrio de adsorção, os modelos que melhor se ajustaram foram as isothermas de Freundlich e Sips para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@BSA$  e de Freundlich e Harkins-Jura para as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ . As capacidades máximas de adsorção foram estimadas pela isoterma de Langmuir em aproximadamente 11,93 e 14,89  $\text{mg g}^{-1}$  respectivamente.

As condições de dessorção e reutilização também foram otimizadas com DCCRs, mas para ambas as nanopartículas, as porcentagens de recuperações de HSA foram baixas, de modo que a reutilização das mesmas ainda é inviável, sendo necessários estudos mais aprofundados explorando outras estratégias para dessorção e reutilização.

As eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) mostraram padrões diferenciados das bandas de proteínas do soro quando se realizam depleções consecutivas utilizando-se as nanopartículas. Conforme os resultados obtidos na primeira etapa depleção, foi evidente que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$  apresentaram maior afinidade pela HSA e maior capacidade de adsorção, haja vista que houve uma expressiva diminuição da quantidade de HSA,

enquanto as outras proteínas do soro praticamente não sofreram alterações em suas concentrações. Uma característica importante do processo é a sua versatilidade, em que a quantidade de HSA a ser depletada pode ser controlada variando-se a massa de nanopartícula utilizada.

Foi evidente que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS apresentaram maior afinidade pela HSA e eficiência na depleção. Uma característica importante apresentada pelo processo é a sua versatilidade, em que a quantidade de HSA a ser depletada pode ser controlada variando-se a massa de nanopartícula utilizada. Em suma, este estudo mostrou que a depleção, utilizando-se as nanopartículas, principalmente as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS, provou ser uma técnica de preparo de amostras para a depleção rápida (em torno de 1 hora), confiável e específica de HSA, mesmo que tenham demonstrado codepleção de outras proteínas. No entanto, os estudos de eletroforese em SDS-PAGE do depletoma das proteínas dessorvidas das nanopartículas revelou que boa parte destas proteínas codepletadas puderam ser recuperadas, o que reforça a eficiência e viabilidade das nanopartículas, podendo ser usadas como suporte para enriquecimento de proteínas de baixa abundância.

De modo geral, o método de utilização das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS@BSA e das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS para depleção de HSA foi um processo eficiente, robusto, versátil, simples, controlável e de baixo custo. Acredita-se que a aplicabilidade destas nanopartículas possa ser estendida às demais proteínas de alta abundância do soro, bem como a outros tipos de proteínas de interesse biotecnológico ou clínico.

## REFERÊNCIAS

- ABEBE, B.; MURTHY, H. C. A.; AMARE, E. Summary on Adsorption and Photocatalysis for Pollutant Remediation: Mini Review. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 08, n. 04, p. 225–255, 2018.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, mar. 2003.
- AHMED, F. E. Sample preparation and fractionation for proteome analysis and cancer biomarker discovery by mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, p. NA-NA, 12 fev. 2009.
- AHMED, N. et al. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. **PROTEOMICS**, v. 3, n. 10, p. 1980–1987, out. 2003.
- AIRES, A. et al. BSA-coated magnetic nanoparticles for improved therapeutic properties. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 30, p. 6239–6247, 2015.
- AKAIKE, H. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In: Parzen, E., Tanabe, K., Kitagawa, G. (eds) **Selected Papers of Hirotugu Akaike**. Springer Series in Statistics. Springer, New York, NY, p. 199–213, 1998.
- AKERSTRÖM, B. et al. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 135, n. 4, p. 2589–2592, 1985.
- AL-GHOUTI, M. A.; DA'ANA, D. A. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 393, p. 122383, jul. 2020.
- ALHARBI, R. A. Proteomics approach and techniques in identification of reliable biomarkers for diseases. **Saudi Journal of Biological Sciences**, jan. 2020.
- ALTINTAS, E.; DENIZLI, A. Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 832, n. 2, p. 216–223, 7 mar. 2006.
- AMENÁBAR, J. M.; DA SILVA, B. M.; PUNYADEERA, C. Salivary protein biomarkers for head and neck cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, p. 1–9, 27 jan. 2020.
- AMIN, M. et al. Polyamine biomarkers as indicators of human disease. **Biomarkers**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 77–94, 17 fev. 2021.
- AN, G. S. et al. In situ synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles via surface treatment. **Ceramics International**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 12233–12237, ago. 2018.

ANDAÇ, M. et al. Molecularly imprinted composite cryogel for albumin depletion from human serum. **Journal of Molecular Recognition**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 555–563, nov. 2012.

ANDAÇ, M.; DENIZLI, A. Affinity-recognition-based polymeric cryogels for protein depletion studies. **RSC Adv.**, [s. l.], v. 4, n. 59, p. 31130–31141, 2014.

ANDAC, M.; GALAEV, I. Y.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 109, p. 259–265, set. 2013.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The Human Plasma Proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 1, n. 11, p. 845–867, nov. 2002.

ASCENZI, P. et al. Allosteric Modulation of Drug Binding to Human Serum Albumin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 483–489, 1 abr. 2006.

ASCENZI, P.; FASANO, M. Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 148, n. 1–3, p. 16–22, maio 2010.

ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and Their Applications. **Journal of Chromatographic Science**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 182–196, fev. 2017.

AYAWEI, N.; EBELEGI, A. N.; WANKASI, D. Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms. **Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 2017, p. 1–11, 2017.

BABEL, S. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 97, n. 1–3, p. 219–243, 28 fev. 2003.

BAI, H.-X. et al. A Prefractionation Method Can Separate Proteomic Proteins into Multigroups by One-step Extraction. **Journal of the Chinese Chemical Society**, [s. l.], v. 57, n. 5A, p. 1007–1014, out. 2010.

BAI, H.; YANG, F.; YANG, X. Novel Prefractionation Method Can Be Used in Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 840–845, 1 abr. 2006.

BANDOW, J. E. Comparison of protein enrichment strategies for proteome analysis of plasma. **PROTEOMICS**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1416–1425, abr. 2010.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 366–375, maio 2012.

BARTLETT, S. M. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences**, [s. l.], v. 160, n. 901, p. 268–282, 18 maio 1937.

BASAGLIA, A. M. et al. Synthesis of Pb(II)-imprinted poly(methacrylic acid) polymeric particles loaded with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) for micro-solid phase preconcentration of Pb<sup>2+</sup> on-line coupled to flame atomic absorption

spectrometry. **RSC Advances**, [s. l.], v. 7, n. 52, p. 33001–33011, 2017.

BASTOS, P. et al. EDTA-functionalized magnetic nanoparticles: A suitable platform for the analysis of low abundance urinary proteins. **Talanta**, [s. l.], v. 170, p. 81–88, ago. 2017.

BATES, D. M.; WATTS, D. G. **Nonlinear Regression Analysis and Its Applications**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1988.

BATLLE, X. et al. Magnetic nanoparticles: From the nanostructure to the physical properties. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 543, p. 168594, fev. 2022.

BAUMGARTNER, J. et al. Nucleation and growth of magnetite from solution. **Nature Materials**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 310–314, 3 abr. 2013.

BELCZACKA, I. et al. Proteomics biomarkers for solid tumors: Current status and future prospects. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 49–78, 11 jan. 2019.

BERELI, N. et al. Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 323–329, jan. 2010.

BHAKTA, S. et al. Albumin removal from human serum using surface nanopockets on silica-coated magnetic nanoparticles. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 53, n. 66, p. 9254–9257, 2017.

BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S.; FRANKS, N. P. Binding of the General Anesthetics Propofol and Halothane to Human Serum Albumin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 49, p. 38731–38738, 8 dez. 2000.

BÍBLIA. Provérbios. In: Bíblia sagrada. Tradução: Monges Beneditinos de Maredsous (Bélgica). 155 ed. São Paulo, SP: Ave-Maria, p. 796, 2002.

BJÖRHALL, K.; MILIOTIS, T.; DAVIDSSON, P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. **Proteomics**, [s. l.], [s. l.], v. 5, n. 1, p. 307–317, jan. 2005.

BOJA, E. S. et al. Analytical Validation Considerations of Multiplex Mass-Spectrometry-Based Proteomic Platforms for Measuring Protein Biomarkers. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 5325–5332, 5 dez. 2014.

BOLLINENI, R. C. et al. A differential protein solubility approach for the depletion of highly abundant proteins in plasma using ammonium sulfate. **The Analyst**, [s. l.], v. 140, n. 24, p. 8109–8117, 2015.

BOROWSKA, M. Z. Magnetic nanoparticles coated with aminated starch for HSA immobilization- simple and fast polymer surface functionalization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

BOROWSKA, M. Z. et al. Effect of Geometrical Structure, Drying, and Synthetic

Method on Aminated Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles Utility for HSA Effective Immobilization. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1925, 18 maio 2019.

BOSCHETTI, E. et al. Romancing the “hidden proteome”, Anno Domini two zero zero seven. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1153, n. 1–2, p. 277–290, jun. 2007.

BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P. G. Optimized sample treatment protocol by solid-phase peptide libraries to enrich for protein traces. **Amino Acids**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 1431–1442, 28 dez. 2013.

BOX, G. E. P.; PIERCE, D. A. Distribution of Residual Autocorrelations in Autoregressive-Integrated Moving Average Time Series Models. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 65, n. 332, p. 1509–1526, dez. 1970.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A Simple Test for Heteroscedasticity and Random Coefficient Variation. **Econometrica**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 1287, set. 1979.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 69, n. 346, p. 364–367, jun. 1974.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 309–319, fev. 1938.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. **Model Selection and Multimodel Inference**. New York, NY: Springer New York, 2002.

BÜYÜKTIRYAKI, S. et al. Simultaneous depletion of albumin and immunoglobulin G by using twin affinity magnetic nanotraps. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 2080–2089, 12 ago. 2016.

CAN, K.; OZMEN, M.; ERSOZ, M. Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 154–159, jun. 2009.

CAO, M. et al. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 47–56, set. 2012.

CAO, X. et al. Evaluation of Spin Columns for Human Plasma Depletion to Facilitate MS-Based Proteomics Analysis of Plasma. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 4610–4620, 3 set. 2021.

CARNEIRO, L. A. B. C.; WARD, R. J. Functionalization of paramagnetic nanoparticles for protein immobilization and purification. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 540–541, p. 45–51, jan. 2018.

CHAI, W. S. et al. A review on conventional and novel materials towards heavy metal adsorption in wastewater treatment application. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 296, p. 126589, maio 2021.

CHAKRABORTY, R. et al. Adsorption of heavy metal ions by various low-cost adsorbents: a review. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 342–379, 26 jan. 2022.

CHAO, C. et al. **Method for removing high abundance protein using gold magnetic particle** China, 2006.

CHEEVEEWATTANAGUL, N. et al. Aptamer-functionalised magnetic particles for highly selective detection of urinary albumin in clinical samples of diabetic nephropathy and other kidney tract disease. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1154, p. 338302, abr. 2021.

CHEN, C.-X. et al. Rapidly detecting antibiotics with magnetic nanoparticle coated CdTe quantum dots. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1966–1970, 2020.

CHEN, J.; LIN, Y.; JIA, L. Preparation of anionic polyelectrolyte modified magnetic nanoparticles for rapid and efficient separation of lysozyme from egg white. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1388, p. 43–51, abr. 2015.

CHEN, L.; WANG, T.; TONG, J. Application of derivatized magnetic materials to the separation and the preconcentration of pollutants in water samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 1095–1108, jul. 2011.

CHEN, Y.-Y. et al. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. **ELECTROPHORESIS**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 2117–2127, jun. 2005.

CHEN, Y. et al. Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis. **Open Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 3, 1 jan. 2012.

CHU, H.-W. et al. Identification of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection with Untargeted and Targeted Quantitative Proteomics Approaches. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1796–1806, set. 2019.

COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 107–114, 2011.

COSTANZO, M. et al. COVIDomics: The Proteomic and Metabolomic Signatures of COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 2414, 22 fev. 2022.

CUI, M.; CHENG, C.; ZHANG, L. High-throughput proteomics: a methodological mini-review. **Laboratory Investigation**, 3 ago. 2022.

CURRY, S. Plasma albumin as a fatty acid carrier. In: [s.l: s.n.]. p. 29–46.

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent Advances in

the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 104, n. 9, p. 3893–3946, 1 set. 2004.

D. S. JOVANOVIĆ. Physical adsorption of gases II: Practical application of derived isotherms for monolayer and multilayer adsorption. **Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere**, [s. l.], v. 235, p. 1214–1225, 1969.

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

DAŹBROWSKI, A. Adsorption — from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 93, n. 1–3, p. 135–224, out. 2001.

DAYON, L.; KUSSMANN, M. Proteomics of human plasma: A critical comparison of analytical workflows in terms of effort, throughput and outcome. **EuPA Open Proteomics**, [s. l.], v. 1, p. 8–16, 2013.

DE ALMEIDA NETO, A. F.; VIEIRA, M. G. A.; DA SILVA, M. G. C. Adsorption and desorption processes for copper removal from water using different eluents and calcined clay as adsorbent. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 3, p. 90–97, set. 2014.

DE BOCK, M. et al. Comparison of three methods for fractionation and enrichment of low molecular weight proteins for SELDI-TOF-MS differential analysis. **Talanta**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 245–254, jun. 2010.

DE FARIA, H. D. et al. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 959, p. 43–65, mar. 2017.

DE JESUS, J. R.; GUIMARÃES, I. C.; ARRUDA, M. A. Z. Quantifying proteins at microgram levels integrating gel electrophoresis and smartphone technology. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 198, p. 45–49, abr. 2019.

DEHGHAN, M. et al. Novel approach to synthesizing polymer-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> via an ultrasound-assisted method for catalytic selective oxidation of alcohols to aldehydes and ketones in a DMSO/water mixture. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 112, p. 92335–92343, 2015.

DERRINGER, GEORGE. SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DEUTSCH, E. W. et al. Advances and Utility of the Human Plasma Proteome. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 5241–5263, 3 dez. 2021.

DO, D. D. **Adsorption analysis: equilibria and kinetics**. 1. ed. London: Imperial College Press, 916 f, 1998.

DOCKAL, M.; CARTER, D. C.; RÜKER, F. Conformational Transitions of the Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin Depending on pH. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 5, p. 3042–3050, fev. 2000.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. 3. ed. [s.l.: s.n.]. 736 f, 1998.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression: I. **Biometrika**, [s. l.], v. 37, n. 3/4, p. 409, dez. 1950.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression: II. **Biometrika**, [s. l.], v. 38, n. 1–2, p. 159–178, 1951.

EBADI, A.; SOLTAN MOHAMMADZADEH, J. S.; KHUDIEV, A. What is the correct form of BET isotherm for modeling liquid phase adsorption? **Adsorption**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 65–73, 19 fe[s. l.], v. 2009.

ELIASSON, M. et al. Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 263, n. 9, p. 4323–7, 25 mar. 1988.

ELOVICH, S. Y.; LARIONOV, O. G. Theory of adsorption from nonelectrolyte solutions on solid adsorbents. **Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 198–203, fev. 1962.

FAN, J.-P. et al. Preparation, characterization, and application of multiple stimuli-responsive rattle-type magnetic hollow molecular imprinted poly (ionic liquids) nanospheres ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@void@PILMIP$ ) for specific recognition of protein. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 337, p. 722–732, abr. 2018.

FANALI, G. et al. Human serum albumin: From bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 209–290, jun. 2012.

FANG, X.; ZHANG, W.-W. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 284–303, ago. 2008.

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

FÍLA, J.; HONYŠ, D. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. **Amino Acids**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 1025–1047, 15 set. 2012.

FILIP, S. et al. Comparison of Depletion Strategies for the Enrichment of Low-Abundance Proteins in Urine. **Plos One**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. e0133773, 24 jul. 2015.

FINDEISEN, P.; NEUMAIER, M. 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, 1 jan. 2009.

FIYADH, S. S. et al. Review on heavy metal adsorption processes by carbon nanotubes. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 230, p. 783–793, set. 2019.

FONSLOW, B. R. et al. Improvements in Proteomic Metrics of Low Abundance Proteins through Proteome Equalization Using ProteoMiner Prior to MudPIT.

**Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 3690–3700, 5 ago. 2011.

FONSLOW, B. R. et al. Digestion and depletion of abundant proteins improves proteomic coverage. **Nature Methods**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 54–56, 18 jan. 2013.

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

FOSTER, J. F. SOME ASPECTS OF THE STRUCTURE AND CONFORMATIONAL PROPERTIES OF SERUM ALBUMIN. In: **Albumin: Structure, Function and Uses**. [s. l.] Elsevier, p. 53–84, 1977.

FRANTZI, M. et al. Developing proteomic biomarkers for bladder cancer: towards clinical application. **Nature Reviews Urology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 317–330, 26 jun. 2015.

FRANZREB, M. et al. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 505–516, 23 maio 2006.

FREUNDLICH, H. M. F. Over the adsorption in solution. **Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], v. 57, p. 385–470, 1906.

FÜZÉRY, A. K. et al. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. **Clinical Proteomics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 13, 2 dez. 2013.

GALDINO, F. E. et al. Effect of particle functionalization and solution properties on the adsorption of bovine serum albumin and lysozyme onto silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 186, p. 110677, fev. 2020.

GALLAGHER, S. R. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. **Current Protocols in Molecular Biology**, [s. l.], v. 97, n. 1, jan. 2012.

GARCÍA-DESCALZO, L. et al. Gel Electrophoresis of Proteins. In: **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**. [s.l.] InTech, 2012.

GARCIA, S. et al. Depletion of Highly Abundant Proteins of the Human Blood Plasma: Applications in Proteomics Studies of Psychiatric Disorders. In: [s.l.: s.n.]. p. 195–204.

GIANAZZA, E. et al. With or without you — Proteomics with or without major plasma/serum proteins. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 140, p. 62–80, maio 2016.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 244, p. 125368, abr. 2020.

GIVENS, B. E. et al. Bovine serum albumin adsorption on SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticle surfaces at circumneutral and acidic pH: A tale of two nano-bio surface interactions. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 493, p. 334–341, maio 2017.

GÖKTÜRK, I. et al. Protein depletion with bacterial cellulose nanofibers. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 1099, p. 1–9, nov. 2018.

GOLDFELD, S. M.; QUANDT, R. E. Some Tests for Homoscedasticity. **Journal of the American Statistical Association**, v. 60, n. 310, p. 539–547, jun. 1965.

GOMES, R. A. B. et al. Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 51, n. 16, p. 7407–7414, 12 ago. 2016.

GONDIM, D. R. et al. Influence of buffer solutions in the adsorption of human serum proteins onto layered double hydroxide. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 106, p. 396–409, jan. 2018.

GOWARD, C. R. et al. Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 267, n. 1, p. 171–177, 1 abr. 1990.

GRANGER, J. et al. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. **Proteomics**, [s. l.], v. 5, n. 18, p. 4713–4718, dez. 2005.

GREENOUGH, C. et al. A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma. **Proteomics**, [s. l.], v. 4, n. 10, p. 3107–3111, out. 2004.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. New thermodynamically consistent competitive adsorption isotherm in RPLC. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 264, n. 1, p. 43–59, ago. 2003.

GRUBBS, F. E. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. **The Annals of Mathematical Statistics**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 27–58, 1950.

GUERRIER, L.; RIGHETTI, P. G.; BOSCHETTI, E. Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 883–890, 24 maio 2008.

GUNDRY, R. L. et al. Assessment of albumin removal from an immunoaffinity spin column: Critical implications for proteomic examination of the albuminome and albumin-depleted samples. **Proteomics**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 2021–2028, abr. 2009.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 3995–4021, jun. 2005.

GUPTA, S. S.; BHATTACHARYYA, K. G. Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 162, n. 1–2, p. 39–58, fev. 2011.

HADI, M.; SAMARGHANDI, M. R.; MCKAY, G. Equilibrium two-parameter isotherms of acid dyes sorption by activated carbons: Study of residual errors.

**Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 160, n. 2, p. 408–416, jun. 2010.

HAJDUK, J.; MATYSIAK, J.; KOKOT, Z. J. Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 458, p. 84–98, jul. 2016.

HALL, K. R. et al. Pore- and Solid-Diffusion Kinetics in Fixed-Bed Adsorption under Constant-Pattern Conditions. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 212–223, 1 maio 1966.

HALSEY, G. D. The Role of Surface Heterogeneity in Adsorption. In: [s.l: s.n.]. p. 259–269.

HAMDAOUI, O.; NAFFRECHOUX, E. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon Part II. Models with more than two parameters. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 147, n. 1–2, p. 401–411, 17 ago. 2007.

HANASH, S. Disease proteomics. **Nature**, [s. l.], v. 422, n. 6928, p. 226–232, mar. 2003.

HARKINS, W. D.; JURA, G. The Decrease ( $\pi$ ) of Free Surface Energy ( $\gamma$ ) as a Basis for the Development of Equations for Adsorption Isotherms; and the Existence of Two Condensed Phases in Films on Solids. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 112–113, mar. 1944.

HASSIS, M. E. et al. Evaluating the effects of preanalytical variables on the stability of the human plasma proteome. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 478, p. 14–22, jun. 2015.

HE, J. et al. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 101, p. 84–101, dez. 2014.

HEEMSTRA, J.; JAHNKE, F.; PETERSON, A. **Depletion of abundant serum proteins to facilitate biomarker discovery** WIPO (PCT), , 2016. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/WO2016210448A1/en?q=Depletion+of+abundant+serum+proteins+PCT%2FUS2016%2F039671>>

HERMIDA-NOGUEIRA, L. et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 210, p. 103529, jan. 2020.

HILL, T. L. Statistical Mechanics of Multimolecular Adsorption II. Localized and Mobile Adsorption and Absorption. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 441–453, jul. 1946.

HJELM, H.; HJELM, K.; SJÖQUIST, J. Protein a from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 73–76, 15 nov. 1972.

HO, Y. S.; NG, J. C.Y.; MCKAY, G. Kinetics of pollutant sorption by biosorbents: review. **Separation & Purification Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 189–232, 2000.

HO, Y.-S. Second-order kinetic model for the sorption of cadmium onto tree fern: A comparison of linear and non-linear methods. **Water Research**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 119–125, 2006.

HO, Y. .; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 451–465, jul. 1999.

HONG, P.; KOZA, S.; BOUVIER, E. S. P. A REVIEW SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS OF PROTEIN BIOTHERAPEUTICS AND THEIR AGGREGATES. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [s. l.], v. 35, n. 20, p. 2923–2950, 30 jan. 2012.

HOVESTADT, [S. L.], V. et al. Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 42–56, 9 jan. 2020.

HÜTTENHAIN, R. et al. A Targeted Mass Spectrometry Strategy for Developing Proteomic Biomarkers: A Case Study of Epithelial Ovarian Cancer. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1836–1850, set. 2019.

IBRAHIM, A. O. et al. Adsorptive removal of different pollutants using metal-organic framework adsorbents. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 333, p. 115593, jul. 2021.

IGNJATOVIC, V. et al. Mass Spectrometry-Based Plasma Proteomics: Considerations from Sample Collection to Achieving Translational Data. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 4085–4097, 6 dez. 2019.

IYER, L.; MURIITHI, B. W. **Non-antibody high-affinity-based sample preparation, sorbent, devices and methods**. United States, 2018. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US11155575B2/en?q=%22NON+-ANTIBODY+HIGH+-+AFFINITY+-+BASED+SAMPLE+PREPARATION+%2C+SORBENT+%2C+DEVICES+AND+METHODS%22&oq=%22NON+-ANTIBODY+HIGH+-+AFFINITY+-+BASED+SAMPLE+PREPARATION+%2C+SORBENT+%2C+DEVICES+AND+METHODS%22>> Acesso em 19/maio/2023.

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, mar. 2014.

JESUS, J. R. et al. Depleting high-abundant and enriching low-abundant proteins in human serum: An evaluation of sample preparation methods using magnetic nanoparticle, chemical depletion and immunoaffinity techniques. **Talanta**, [s. l.], v. 170, p. 199–209, ago. 2017.

JIANG, B. et al. Preparation and application of silver nanoparticle-functionalized magnetic graphene oxide nanocomposites. **Nanoscale**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1607–1615, 2017.

JMEIAN, Y.; EL RASSI, Z. Tandem Affinity Monolithic Microcolumns with Immobilized Protein A, Protein G', and Antibodies for Depletion of High Abundance

Proteins from Serum Samples: Integrated Microcolumn-Based Fluidic System for Simultaneous Depletion and Tryptic Digestion. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 947–954, 1 mar. 2007.

JMEIAN, Y.; EL RASSI, Z. Liquid-phase-based separation systems for depletion, prefractionation and enrichment of proteins in biological fluids for in-depth proteomics analysis. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 249–261, jan. 2009.

JOSENS, L. et al. Thermodynamics of multi-solute adsorption from dilute aqueous solutions. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1097–1106, 1978.

KANG, H.; KIESS, A.; CHUNG, C. H. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 11–26, 18 jan. 2015.

KAUR, G. et al. Extending the Depth of Human Plasma Proteome Coverage Using Simple Fractionation Techniques. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1261–1279, 5 fev. 2021.

KAWASHIMA, Y. et al. High-Yield Peptide-Extraction Method for the Discovery of Subnanomolar Biomarkers from Small Serum Samples. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1694–1705, 5 abr. 2010.

KAY, R. et al. Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 22, n. 20, p. 3255–3260, 30 out. 2008.

KAYKHAII, M.; SASANI, M.; MARGHZARI, S. Removal of Dyes from the Environment by Adsorption Process. **Chemical and Materials Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 31–35, jul. 2018.

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, jan. 1996.

KHAN, A. R.; ATAULLAH, R.; AL-HADDAD, A. Equilibrium Adsorption Studies of Some Aromatic Pollutants from Dilute Aqueous Solutions on Activated Carbon at Different Temperatures. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 194, n. 1, p. 154–165, out. 1997.

KIM, K. et al. Online monitoring of immunoaffinity-based depletion of high-abundance blood proteins by UV spectrophotometry using enhanced green fluorescence protein and FITC-labeled human serum albumin. **Proteome Science**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 62, 2010.

KLEIN, J.; SCHANSTRA, J. P. Implementation of Proteomics Biomarkers in Nephrology: From Animal Models to Human Application? **Proteomics – Clinical Applications**, [s. l.], [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1800089, 12 mar. 2019.

KOBLE, R. A.; CORRIGAN, T. E. ADSORPTION ISOTHERMS FOR PURE HYDROCARBONS. **Industrial & Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 44, n. 2, p.

383–387, fev. 1952.

KOMSTA, L. outliers: Tests for outliers. **R package version 0.14**, 2011.

KOPAC, T.; BOZGEYIK, K.; FLAHAUT, E. Adsorption and interactions of the bovine serum albumin-double walled carbon nanotube system. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 252, p. 1–8, fev. 2018.

KOSTANSKI, L. K.; KELLER, D. M.; HAMIELEC, A. E. Size-exclusion chromatography—a review of calibration methodologies. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 159–186, fev. 2004.

KOUTROUKIDES, T. A. et al. Characterization of the human serum depletome by label-free shotgun proteomics. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 34, n. 13, p. 1621–1626, jul. 2011.

KULLOLLI, M. et al. Performance evaluation of affinity ligands for depletion of abundant plasma proteins. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 939, p. 10–16, nov. 2013.

KUPCIK, R. et al. New Interface for Purification of Proteins: One-Dimensional TiO<sub>2</sub> Nanotubes Decorated by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 9, n. 34, p. 28233–28242, 30 ago. 2017.

KUSTATSCHER, G. et al. Understudied proteins: opportunities and challenges for functional proteomics. **Nature Methods**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 774–779, 9 jul. 2022.

LAGERGREN, S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens**, [s. l.], v. 4, p. 1–39, 1898.

LAL, C. et al. Proteomic biomarkers of cognitive impairment in obstructive sleep apnea syndrome. **Sleep and Breathing**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 251–257, 2 mar. 2019.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 11, p. 2221–2295, nov. 1916.

LAURENT, S. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, 1 jun. 2008.

LEE, P. Y. et al. Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery. **Bioanalysis**, v. 11, n. 19, p. 1799–1812, out. 2019.

LENTH, R. V. Response-Surface Methods in R , Using rsm. **Journal of Statistical Software**, v. 32, n. 7, 2009.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. **Contributions to probability and statistics**, p. 278–292, 1960.

- LI, L. **Dynamic Range Compression with ProteoMiner™**: Principles and Examples. In: Posch, A. (eds) *Proteomic Profiling. Methods in Molecular Biology*, vol 1295. Humana Press, New York, NY, p. 99–107, 2015.
- LI, X.-S. et al. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 45, p. 233–247, abr. 2013a.
- LI, X.; WANG, W.; CHEN, J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. **Science China Life Sciences**, [s. l.], v. 60, n. 10, p. 1093–1113, 13 out. 2017.
- LI, Y.; ZHANG, X.; DENG, C. Functionalized magnetic nanoparticles for sample preparation in proteomics and peptidomics analysis. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 21, p. 8517, 2013.
- LI, Z. et al. Synthesis and characterization of monodisperse magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BSA core–shell nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 436, p. 1145–1151, set. 2013b.
- LIANG, C.; TAN, G. S.; CHUNG, M. C. M. 2D DIGE Analysis of Serum After Fractionation by ProteoMiner™ Beads. In: [s.l: s.n.]. p. 181–194.
- LIMA DE CARVALHO, J. R. et al. Proteomic biomarkers in vitreoretinal disease. In: **Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 247–254.
- LIMA, É. C.; ADEBAYO, M. A.; MACHADO, F. M. Kinetic and Equilibrium Models of Adsorption. In: [s.l: s.n.]. p. 33–69.
- LIU, F. et al. Synthesis, characterization, and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> nanoparticles. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 23, p. 18128–18136, 2015a.
- LIU, G. et al. A Novel and Cost Effective Method of Removing Excess Albumin from Plasma/Serum Samples and Its Impacts on LC-MS/MS Bioanalysis of Therapeutic Proteins. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. 16, p. 8336–8343, 19 ago. 2014.
- LIU, J. et al. Preparation of protein imprinted materials by hierarchical imprinting techniques and application in selective depletion of albumin from human serum. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 5487, 30 maio 2015b.
- LIU, R. et al. Adsorption Kinetics and Adsorption Isotherms of Bovin Serum Albumin (BSA) onto Magnetic ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 2899–2905, 1 maio 2017a.
- LIU, S. et al. Accurate and reliable quantification of the protein surface coverage on protein-functionalized nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 989, p. 29–37, out. 2017b.
- LIU, S. et al. Protein A- and Protein G-gold nanoparticle bioconjugates as nano-immunoaffinity platform for human IgG depletion in plasma and antibody extraction from cell culture supernatant. **Talanta**, [s. l.], v. 194, p. 664–672, mar. 2019.

LIU, S. et al. Preparation, surface functionalization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 281, p. 102165, jul. 2020.

LIU, X.; YAN, C.; CHEN, K. L. Adsorption of Human Serum Albumin on Graphene Oxide: Implications for Protein Corona Formation and Conformation. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 53, n. 15, p. 8631–8639, 6 ago. 2019.

LIU, Y.; LIU, Y.-J. Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 229–242, 15 jul. 2008.

LOH, K.-S. et al. Use of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Enhancement of Biosensor Response to the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. **Sensors**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 5775–5791, 18 set. 2008.

LOPES, E. 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**, [s. l.], v. 263, n. 2, p. 542–547, jul. 2003.

LÓPEZ-CORTÉS, R. et al. Fast human serum profiling through chemical depletion coupled to gold-nanoparticle-assisted protein separation. **Talanta**, [s. l.], v. 100, p. 239–245, out. 2012.

LU, W. et al. Human serum albumin-imprinted polymers with high capacity and selectivity for abundant protein depletion. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 126, p. 249–258, maio 2021a.

LU, Z.-H. et al. Synthesis and adsorption properties investigation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ZnAl-LDH@MIL-53(Al) for azole fungicides removal from environmental water. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 276, p. 119282, dez. 2021b.

M.I. TEMKIN, V. P. Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst. **Acta Physicochimica USSR**, [s. l.], v. 12, p. 327–356, 1940.

MAHMOUDI, M. et al. Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 111, n. 9, p. 5610–5637, 14 set. 2011.

MAHN, A. et al. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by hydrophobic interaction chromatography for proteomic analysis. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 878, n. 15–16, p. 1038–1044, maio 2010.

MAHN, A.; ISMAIL, M. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 879, n. 30, p. 3645–3648, nov. 2011.

MALEKI, M. S.; MORADI, O.; TAHMASEBI, S. Adsorption of albumin by gold nanoparticles: Equilibrium and thermodynamics studies. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 10, p. S491–S502, fev. 2017.

MALHERBE, R. M. A. R. **Adsorption and Diffusion in Nanoporous Materials**, 2 ed, [s. l.] CRC Press, 2018.

MALLAKPOUR, S.; MADANI, M. A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles. **Progress in Organic Coatings**, [s. l.], v. 86, p. 194–207, set. 2015.

MALTAS, E. et al. Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles. **Materials Letters**, [s. l.], v. 65, n. 23–24, p. 3499–3501, dez. 2011.

MAPIOUR, M.; ABDELRASOUL, A. Critical Influences of Plasma pH on Human Protein Properties for Modeling Considerations: Size, Charge, Conformation, Hydrophobicity, and Denaturation. **Journal of Composites Science**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 28, 10 jan. 2023.

MAY, C. et al. Instruments and Methods in Proteomics. In: [s.l: s.n.]. p. 3–26.

MAZUCHELI, J.; ACHCAR, J. A. Algumas considerações em regressão não linear. **Acta Scientiarum Technology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1761–1770, 2002.

MELBY, J. A. et al. Novel Strategies to Address the Challenges in Top-Down Proteomics. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1278–1294, 2 jun. 2021.

MERCES, A. A. D. DAS et al. Identification of blood plasma proteins using heparin-coated magnetic chitosan particles. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 247, p. 116671, nov. 2020.

MILLIONI, R. et al. High Abundance Proteins Depletion vs Low Abundance Proteins Enrichment: Comparison of Methods to Reduce the Plasma Proteome Complexity. **Plos One**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. e19603, 4 maio 2011.

MORAES, G. DE O. I. et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 405, n. 24, p. 7687–7696, 13 set. 2013.

MOUTON-BARBOSA, E. et al. In-depth Exploration of Cerebrospinal Fluid by Combining Peptide Ligand Library Treatment and Label-free Protein Quantification. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1006–1021, maio 2010.

MURPHY, S.; DOWLING, P. DIGE Analysis of ProteoMiner™ Fractionated Serum/Plasma Samples. In: [s.l: s.n.]. p. 119–125.

MYERS, D. **Surfaces, interfaces and colloids**. Second ed. [s.l: s.n.].

NASCIMENTO, R. F. DO et al. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. 1. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Materials**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 543–557, 14 jul. 2009.

NESET, L. et al. Comparing Efficiency of Lysis Buffer Solutions and Sample Preparation Methods for Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Human Cells and Plasma. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 3390, 25 maio 2022.

NICOLÁS, P.; FERREIRA, M. L.; LASSALLE, V. Magnetic solid-phase extraction: A nanotechnological strategy for cheese whey protein recovery. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 263, p. 380–387, dez. 2019.

NIKKEL, H. J.; FOSTER, J. F. Reversible sulfhydryl-catalyzed structural alteration of bovine mercaptalbumin. **Biochemistry**, [s. l.], v. 10, n. 24, p. 4479–4486, 1 nov. 1971.

NJOKU, K. et al. Proteomic Biomarkers for the Detection of Endometrial Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1572, 16 out. 2019.

NODEHI, R.; SHAYESTEH, H.; RAHBAR-KELISHAMI, A. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NiO core–shell magnetic nanoparticle for highly efficient removal of Alizarin red S anionic dye. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 2899–2912, 7 abr. 2022.

O'BRIEN, R. G. A General ANOVA Method for Robust Tests of Additive Models for Variances. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 74, n. 368, p. 877–880, dez. 1979.

OECKL, P. et al. Proteomics in cerebrospinal fluid and spinal cord suggests UCHL1, MAP2 and GPNMB as biomarkers and underpins importance of transcriptional pathways in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 139, n. 1, p. 119–134, 7 jan. 2020.

OLVER, C. S. et al. ORIGINAL RESEARCH: Comparison of methods for depletion of albumin and IgG from equine serum. **Veterinary Clinical Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 337–345, set. 2010.

OMENN, G. S. The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: Reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. **Proteomics**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 1235–1240, maio 2004.

OMENN, G. S. et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. **Proteomics**, [s. l.], v. 5, n. 13, p. 3226–3245, ago. 2005.

ÖZTUNA, D.; ATILLA, H. E.; TÜCCAR, E. Investigation of Four Different Normality Tests in Terms of Type 1 Error Rate and Power under Different Distributions. **Turkish Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 171–176, 2006.

PAUL, J.; VEENSTRA, T. D. Separation of Serum and Plasma Proteins for In-Depth Proteomic Analysis. **Separations**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 89, 1 abr. 2022.

PEPE, M. S. et al. Phases of Biomarker Development for Early Detection of Cancer. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 93, n. 14, p. 1054–1061, 18 jul. 2001.

PERNEMALM, M. et al. Evaluation of Three Principally Different Intact Protein Prefractionation Methods for Plasma Biomarker Discovery. **Journal of Proteome**

**Research**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 2712–2722, jul. 2008.

PETERS-JR, T. **All About Albumin**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 432 f, 1995.

PETERS JR, T. **All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications**. 1. ed. San Diego and London.: Academic Press, 1996.

PETRIČ, T. Č. et al. Anion-exchange chromatography using short monolithic columns as a complementary technique for human serum albumin depletion prior to human plasma proteome analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 243–249, jan. 2007.

PETRICOIN, E. F.; LIOTTA, L. A. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 24–30, fev. 2004.

PICCIN, J. S. et al. Adsorption Isotherms in Liquid Phase: Experimental, Modeling, and Interpretations. In: **Adsorption Processes for Water Treatment and Purification**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 19–51.

PIETROWSKA, M. et al. **MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal**. In: [s.l: s.n.]. p. 57–76, 2019.

PISANU, S. et al. Comparative evaluation of seven commercial products for human serum enrichment/depletion by shotgun proteomics. **Talanta**, [s. l.], v. 185, p. 213–220, ago. 2018.

PONZINI, E. et al. Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 842–860, 24 set. 2022.

QIAN, L. et al. Immobilization of BSA on ionic liquid functionalized magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for use in surface imprinting strategy. **Talanta**, [s. l.], v. 168, p. 174–182, jun. 2017.

QIU, H. et al. Critical review in adsorption kinetic models. **Journal of Zhejiang University-Science A**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 716–724, 1 maio 2009.

QU, F. et al. Selective separation and enrichment of proteins in aqueous two-phase extraction system. **Chinese Chemical Letters**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1100–1102, set. 2009.

R CORE TEAM, R. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2021.  
Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 162, n. 1–2, p. 87–106, fev. 2011.

RADUSHKEVICH, M. M. D. L. V. Equation of the Characteristic Curve of Activated

Charcoal. **Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR: Physical Chemistry Section**, [s. l.], v. 55, p. 331–337, 1947.

RANGABHASHIYAM, S. et al. Relevance of isotherm models in biosorption of pollutants by agricultural byproducts. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 398–414, mar. 2014.

RAY, S. et al. Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead. **Proteomics**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 2139–2161, jun. 2011.

REDLICH, O.; PETERSON, D. L. A Useful Adsorption Isotherm. **The Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 1024–1024, jun. 1959.

REZWAN, K. et al. Bovine Serum Albumin Adsorption onto Colloidal Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Particles: A New Model Based on Zeta Potential and UV–Vis Measurements. **Langmuir**, [s. l.], v. 20, n. 23, p. 10055–10061, nov. 2004.

RIGHETTI, P. G. et al. Protein Equalizer™ Technology: The quest for a “democratic proteome”. **Proteomics**, [s. l.], v. 6, n. 14, p. 3980–3992, jul. 2006.

RIGHETTI, P. G.; BOSCHETTI, E. Current Low-Abundance Protein Access. In: **Low-Abundance Proteome Discovery**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 41–77.

RITCHIE, H.; SPOONER, F.; ROSER, M. **Causes of death**. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/causes-of-death>>. Acesso em: 21 jan. 2023.

ROTHSCHILD, M. A.; ORATZ, M.; SCHREIBER, S. S. Serum albumin. **Hepatology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 385–401, mar. 1988.

S ZELDOVICH; YB ROGINSKY. The catalytic oxidation of carbon monoxide on manganese dioxide. **Acta physicochimica U.R.S.S**, [s. l.], v. 1, 1934.

SAFARIK, I. SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 1–17, 2004.

SAHU, S. K. et al. Single step surface modification of highly stable magnetic nanoparticles for purification of His-tag proteins. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 2475–2484, 17 jun. 2011.

SALVIANO, L. B. et al. Microstructural Assessment of Magnetite Nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Obtained by Chemical Precipitation Under Different Synthesis Conditions. **Materials Research**, [s. l.], v. 21, n. 2, 15 fev. 2018.

SANTOS, M. G. 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**, [s. l.], v. 353, p. 129442, ago. 2021.

SCHWARZ, G. Estimating the Dimension of a Model. **The Annals of Statistics**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 461–464, 1978.

SHAH, M. T.; ALVEROGLU, E. Facile synthesis of nanogels modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag NPs for the efficient adsorption of bovine & human serum albumin. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 118, p. 111390, jan. 2021.

SHAHABADI, N. et al. Functionalization of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles using the antiviral drug zidovudine: synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and DNA interaction studies. **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 77, p. 73605–73616, 2016.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S.; SHIRI, F. New water-soluble Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> magnetic nanoparticles functionalized with levetiracetam drug for adsorption of essential biomolecules by case studies of DNA and HSA. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 283–294, 2 jan. 2020.

SHAO, S.; GUO, T.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry-based proteomic quest for diabetes biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1854, n. 6, p. 519–527, jun. 2015.

SHAPIRO, A. L.; VIÑUELA, E.; V. MAIZEL, J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 815–820, set. 1967.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, [s. l.], v. 52, n. 3–4, p. 591–611, 1 dez. 1965.

SHAW, A. K.; PAL, S. K. Spectroscopic studies on the effect of temperature on pH-induced folded states of human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 69–77, jan. 2008.

SHU, T. et al. Plasma Proteomics Identify Biomarkers and Pathogenesis of COVID-19. **Immunity**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 1108- 1122.e5, nov. 2020.

SILVA-COSTA, L. C. et al. Blood plasma high abundant protein depletion unintentionally carries over 100 proteins. **Separation Science Plus**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 449–456, 21 dez. 2019.

SINHA, S. et al. Darkness in the Human Gene and Protein Function Space: Widely Modest or Absent Illumination by the Life Science Literature and the Trend for Fewer Protein Function Discoveries Since 2000. **Proteomics**, [s. l.], v. 18, n. 21–22, p. 1800093, nov. 2018.

SIPS, R. Combined form of Langmuir and Freundlich equations. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 16, p. 490–495, 1948.

SMITH, B. J.; MARTINS-DE-SOUZA, D. Biological Applications for LC-MS-Based Proteomics. In: [s.l: s.n.]. p. 17–29.

SMITH, J. E. et al. Optimization of antibody-conjugated magnetic nanoparticles for target preconcentration and immunoassays. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 410, n. 1, p. 124–132, mar. 2011a.

SMITH, M. P. W. et al. A systematic analysis of the effects of increasing degrees of

serum immunodepletion in terms of depth of coverage and other key aspects in top-down and bottom-up proteomic analyses. **Proteomics**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 2222–2235, jun. 2011b.

SRIVASTAVA, S.; KRAMER, B. S. Early Detection Cancer Research Network. **Laboratory Investigation**, [s. l.], v. 80, n. 8, p. 1147–1148, ago. 2000.

STEEL, L. F. et al. Efficient and Specific Removal of Albumin from Human Serum Samples. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 262–270, abr. 2003.

STRIEGEL, A. M. et al. **Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

SUGIURA, N. Further analysts of the data by akaike' s information criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics - Theory and Methods**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 13–26, 27 jan. 1978.

SUN, B. et al. Applications of multifunctional magnetic nanoparticles for the enrichment of proteins for PAGE separation. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 32, n. 16, p. 2091–2098, ago. 2011a.

SUN, J. et al. Separation of lysozyme using superparamagnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 879, n. 23, p. 2194–2200, ago. 2011b.

SUN, J.; XU, R.; YANG, Y. Conformational changes and bioactivity of lysozyme on binding to and desorption from magnetite nanoparticles. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 879, n. 28, p. 3053–3058, out. 2011.

SUN, Y. et al. An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 285, n. 1–2, p. 65–70, jan. 2005.

SURINOVA, S. et al. On the Development of Plasma Protein Biomarkers. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 5–16, 7 jan. 2011.

TAINSKY, M. A. Genomic and proteomic biomarkers for cancer: A multitude of opportunities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1796, n. 2, p. 176–193, dez. 2009.

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**, [s. l.], v. 74, p. 25–48, maio 2017.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1076–1086, dez. 2005.

TEJA, A. S.; KOH, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in Crystal Growth and Characterization of**

**Materials**, [s. l.], v. 55, n. 1–2, p. 22–45, mar. 2009.

THAKUR, G. et al. Investigation of pH-Induced Protein Conformation Changes by Nanomechanical Deflection. **Langmuir**, [s. l.], v. 30, n. 8, p. 2109–2116, 4 mar. 2014.

THIEDE, B. et al. Peptide mass fingerprinting. **Methods**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 237–247, mar. 2005.

THOMAS, S. et al. Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. **Proteomics - Clinical Applications**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 358–370, abr. 2016.

THULASIRAMAN, V. et al. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 3561–3571, set. 2005.

TITCHOU, F. E. et al. Removal of Persistent Organic Pollutants (POPs) from water and wastewater by adsorption and electrocoagulation process. **Groundwater for Sustainable Development**, [s. l.], v. 13, p. 100575, maio 2021.

TOTH, J. State equations of the solid gas interface layer. **Acta chimica Academiae Scientiarum Hungaricae**, [s. l.], v. 69, p. 311–317, 1971.

TRAN, H. N. et al. Mistakes and inconsistencies regarding adsorption of contaminants from aqueous solutions: A critical review. **Water Research**, [s. l.], v. 120, p. 88–116, set. 2017.

UZUN, L. et al. Simultaneous depletion of immunoglobulin G and albumin from human plasma using novel monolithic cryogel columns. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 112, p. 1–8, dez. 2013.

VALENZUELA, R. et al. Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) by the co-precipitation method. **Journal of Alloys and Compounds**, [s. l.], v. 488, n. 1, p. 227–231, nov. 2009.

VAN WIJK, J. et al. Formation of hybrid poly(styrene- co -maleic anhydride)–silica microcapsules. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 2, n. 30, p. 4826–4835, 2014.

VARSHNEY, A. et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be utilized? **Chirality**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 77–87, jan. 2010.

VASCONCELOS, I.; FERNANDES, C. Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 89, p. 41–52, abr. 2017.

VIJAYARAGHAVAN, K. et al. Biosorption of nickel(II) ions onto *Sargassum wightii*: Application of two-parameter and three-parameter isotherm models. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 133, n. 1–3, p. 304–308, 20 maio 2006.

VIJAYARAGHAVAN, K.; PALANIVELU, K.; VELAN, M. Biosorption of copper(II) and

cobalt(II) from aqueous solutions by crab shell particles. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 97, n. 12, p. 1411–1419, ago. 2006.

VISHALI, S.; MULLAI, P. Analysis of two-parameter and three-parameter isotherms by nonlinear regression for the treatment of textile effluent using immobilized *Trametes versicolor*: comparison of various error functions. **Desalination and Water Treatment**, [s. l.], v. 57, n. 56, p. 27061–27072, 1 dez. 2016.

WAHAJUDDIN; ARORA. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplateforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3445, jul. 2012.

WANG, G. et al. Probing the binding behavior and kinetics of silver nanoparticles with bovine serum albumin. **RSC Advances**, [s. l.], v. 7, n. 15, p. 9393–9401, 2017a.

WANG, J. et al. Amino-functionalized  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2010.

WANG, J. et al. Fabrication of diverse pH-sensitive functional mesoporous silica for selective removal or depletion of highly abundant proteins from biological samples. **Talanta**, [s. l.], v. 162, p. 380–389, jan. 2017b.

WANG, L. et al. Adsorption Behavior of Lysozyme on Carbon-Coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  Nanoparticles. **Current Nanoscience**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 159–166, 24 fev. 2017c.

WANG, L. et al. Rational design, synthesis, adsorption principles and applications of metal oxide adsorbents: a review. **Nanoscale**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 4790–4815, 2020.

WANG, Z. et al. Kinetics of adsorption of bovine serum albumin on magnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 58, p. 57–65, jul. 2013.

WANJERI, V. W. O. et al. Isotherm and kinetic investigations on the adsorption of organophosphorus pesticides on graphene oxide based silica coated magnetic nanoparticles functionalized with 2-phenylethylamine. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1333–1346, fev. 2018.

WEBER, W. J.; MORRIS, J. C. Kinetics of Adsorption on Carbon from Solution. **Journal of the Sanitary Engineering Division**, [s. l.], v. 89, p. 31–60, 1963.

WESTWOOD, S. et al. Validation of Plasma Proteomic Biomarkers Relating to Brain Amyloid Burden in the EMIF-Alzheimer's Disease Multimodal Biomarker Discovery Cohort. **Journal of Alzheimer's Disease**, p. 1–13, 22 jan. 2020.

WIEDERIN, J.; CIBOROWSKI, P. Immunoaffinity Depletion of Highly Abundant Proteins for Proteomic Sample Preparation. In: **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 101–114.

WIERUCKA, M.; BIZIUK, M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic

solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 59, p. 50–58, jul. 2014.

WU, C. et al. Contributions of immunoaffinity chromatography to deep proteome profiling of human biofluids. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 1021, p. 57–68, maio 2016.

WU, F.-C.; TSENG, R.-L.; JUANG, R.-S. Initial behavior of intraparticle diffusion model used in the description of adsorption kinetics. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 153, n. 1–3, p. 1–8, nov. 2009.

WU, W.; JIANG, C. Z.; ROY, V. A. L. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, [s. l.], v. 8, n. 47, p. 19421–19474, 2016.

XEPAPADAKI, P. et al. Utility of biomarkers in the diagnosis and monitoring of asthmatic children. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 100727, jan. 2023.

XU, Z. et al. Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@poly-L-alanine, peptide brush–magnetic microspheres through NCA chemistry for drug delivery and enrichment of BSA. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 503–507, dez. 2010.

XU, Z.; GRASSIAN, V. H. Bovine Serum Albumin Adsorption on TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Surfaces: Effects of pH and Coadsorption of Phosphate on Protein–Surface Interactions and Protein Structure. **The Journal of Physical Chemistry C**, [s. l.], v. 121, n. 39, p. 21763–21771, 5 out. 2017.

YANG, C. et al. Depletion of abundant human serum proteins by per se imprinted cryogels based on sample heterogeneity. **Proteomics**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 1600284, maio 2017.

YANG, H.-H. et al. Depletion of albumin and immunoglobulin G from human serum using epitope-imprinted polymers as artificial antibodies. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [s. l.], v. 101A, n. 7, p. 1935–1942, jul. 2013.

YANG, H. et al. Establishing an optimized method for the separation of low and high abundance blood plasma proteins. **PeerJ Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 2, p. e6, 10 fev. 2020.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 49–79, 1 ago. 2009.

YELDU, M. H. et al. Oxidative stress biomarkers in pulmonary tuberculosis patients in Gombe, North-eastern Nigeria. **Asian Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 57–62, 30 out. 2019.

YIN, Y. et al. Magnetic molecularly imprinted polydopamine nanolayer on multiwalled carbon nanotubes surface for protein capture. **Talanta**, [s. l.], v. 144, p. 671–679, nov. 2015.

YOUSEF, R. I.; EL-ESWED, B.; AL-MUHTASEB, A. H. Adsorption characteristics of natural zeolites as solid adsorbents for phenol removal from aqueous solutions: Kinetics, mechanism, and thermodynamics studies. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 1143–1149, jul. 2011.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 787–793, nov. 1998.

ZENG, H. et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for separating rutin from Chinese medicinal plants. **The Analyst**, [s. l.], v. 137, p. 2503–2512, 2012.

ZHANG, X. et al. Highly sensitive thrombin detection by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with aptamer functionalized core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C@Au magnetic microspheres. **Talanta**, [s. l.], v. 88, p. 295–302, jan. 2012.

ZHAO, L. et al. pH-responsive polymer assisted aptamer functionalized magnetic nanoparticles for specific recognition and adsorption of proteins. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1097, p. 161–168, fev. 2020.

ZHAO, X. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Exosome Protein Content Changes Induced by Hepatitis B Virus in Huh-7 Cells Using SILAC Labeling and LC-MS/MS. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 5391–5402, 5 dez. 2014a.

ZHAO, Y. et al. Synthesis of amidoxime-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell magnetic microspheres for highly efficient sorption of U(VI). **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 235, p. 275–283, jan. 2014b.

ZHAO, Y. et al. Mining the human plasma proteome with three-dimensional strategies by high-resolution Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 904, p. 65–75, jan. 2016.

ZHOU, M. et al. An investigation into the human serum “interactome”. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1289–1298, maio 2004.

ZHU, Z.; LU, J. J.; LIU, S. Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 709, p. 21–31, jan. 2012.

ZOLOTARJOVA, N. et al. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. **Proteomics**, v. 5, n. 13, p. 3304–3313, ago. 2005.