

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JONATHAN SAULO BALDUINO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO
RESTRITO MAGNÉTICOS E SEU USO PARA EXTRAÇÃO DE Cu E Zn DE Cu, Zn-
SUPERÓXIDO DISMUTASE**

ALFENAS/MG
2018

JONATHAN SAULO BALDUINO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO
RESTRITO MAGNÉTICOS E SEU USO PARA EXTRAÇÃO DE Cu E Zn DE Cu, Zn-
SUPERÓXIDO DISMUTASE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Química do Programa
de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal
de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo.
Coorientador: Dr. Adriano F. Barbosa.

ALFENAS/MG
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Balduino, Jonathan Saulo.
B179s Síntese e caracterização de nanotubos de carbono de acesso restrito magnéticos e seu uso para extração de Cu e Zn de Cu, Zn- superóxido dismutase / Jonathan Saulo Balduino. – Alfenas/MG, 2018.
78 f.: il --

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.
Bibliografia.

1. Nanotubos de Carbono. 2.Cobre. 3. Zinco. 4. Superóxido Dismutase.
5. Apoproteínas. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD-543

JONATHAN SAULO BALDUINO

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE
ACESSO RESTRITO MAGNÉTICOS E SEU USO PARA EXTRAÇÃO DE Cu E
Zn de Cu, Zn-SUPERÓXIDO DISMUTASE”**

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

Aprovado em: 30/01/2018

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Flávio Soares Silva
Instituição: Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Assinatura: 

À minha família e aos meus amigos por todo apoio, carinho e compreensão durante o curso e que, assim como eu, sofreram e sonharam com este momento.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro momento, agradeço a Deus por ter aberto as portas deste curso e por ter me proporcionado tudo, especialmente durante esta etapa de minha vida, auxiliando espiritualmente e concedendo serenidade e forças para continuar. Aos meus familiares, pelo apoio incondicional, pela ajuda financeira, pelas palavras de motivação, enfim, por tudo. A todas as pessoas que estiveram ligadas direta e indiretamente com a realização deste trabalho. Ao professor e orientador Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, pelos ensinamentos e, principalmente, pela confiança e pela compreensão que ofereceu nos momentos de dificuldade. À Instituição e aos professores em geral, pois cada um, com seu ensinamento, teve seu papel de importância até o presente momento. Por fim, agradeço novamente a Deus, pela bênção de concluir mais esta etapa e por me sentir realizado.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

Neste trabalho, propomos novos sorbentes denominados nanotubos de carbono de acesso restrito magnéticos (M-RACNTs) e obtidos pela associação de nanotubos de carbono magnéticos (M-CNTs) com nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs). A síntese foi realizada cobrindo M-CNTs com uma camada de albumina de soro bovino (BSA) quimicamente entrecruzada usando glutaraldeído. A cápsula BSA atua como uma barreira biocompatível que evita a ligação das proteínas da amostra. Em pH maior que o ponto isoelétrico das proteínas, tanto as proteínas da amostra quanto as da camada BSA estão carregadas negativamente, resultando em exclusão por repulsão eletrostática. Esse novo sorvente pode ser eficientemente utilizado na extração dispersiva em fase sólida de metais a partir de fluidos biológicos, excluindo simultaneamente todas as proteínas das amostras. Os M-RACNTs foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de transmissão, confirmando a presença das nanopartículas magnéticas Fe_2O_3 , bem como a camada BSA nos CNTs. Os testes de cinética foram realizados por sorção de Cu e Zn em CNTs, M-CNTs e M-RACNTs, e os resultados confirmaram a rápida e a similar velocidade de transferência de massa para todos os sorventes. Os testes de adsorção confirmaram que os íons Cu e Zn são retidos em monocamadas, de acordo com o modelo Sips. Além disso, as capacidades máximas de adsorção para sorção de Cu e Zn em CNTs, M-CNTs e M-RACNTs tiveram média de $80,83 \text{ mg de g}^{-1}$. Os M-RACNTs foram capazes de remover cerca de 64% de Cu e Zn de Cu, Zn- superóxido dismutase com apenas uma etapa de extração de fase sólida dispersiva. Ao mesmo tempo, o sorvente foi capaz de excluir cerca de 98% de Cu, Zn- superóxido dismutase. Com base nesses resultados, acreditamos que os M-RACNTs são sorventes promissores para a extração dispersiva em fase sólida de metais diretamente de fluidos proteicos, objetivando a obtenção de apoproteínas, bem como para extração de metais ou compostos orgânicos diretamente de fluidos biológicos, com interesse analítico.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono de acesso restrito magnéticos. Exclusão de proteínas. Cobre. Zinco. Cu,Zn- superóxido dismutase. Apoproteínas.

ABSTRACT

In this paper we propose new sorbents denominated magnetic restricted access carbon nanotubes (M-RACNTs) and obtained by the association of magnetic carbon nanotubes (M-CNTs) with restricted access carbon nanotubes (RACNTs). The synthesis was carried out covering M-CNTs with a bovine serum albumin (BSA) layer, chemically crosslinked by using glutaraldehyde. The BSA capsule acts as a biocompatible barrier that avoids the bind of proteins from the sample. In pH larger than the isoelectrical point of proteins, both proteins from the sample and from the BSA layer are negatively charged, resulting in exclusion by electrostatic repulsion. This new sorbent can be efficiently used in dispersive solid phase extraction of metals from biological fluids, excluding simultaneously all the proteins from samples. M-RACNTs were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis and transmission electron microscopy, being confirmed the presence of the Fe_2O_3 magnetic nanoparticles as well as the BSA layer on the CNTs. The kinetic tests were carried out by sorption of Cu and Zn in CNTs, M-CNTs and M-RACNTs, and the results confirmed the fast and similar mass transference speed for all the sorbents. The adsorption tests confirmed that Cu and Zn ions are retained in monolayers, according to the Sips model. Additionally, the maximum adsorption capacities for Cu and Zn sorption in CNTs, M-CNTs and M-RACNTs had an average of $80,83 \text{ mg g}^{-1}$. M-RACNTs was able to remove of about 64% of Cu and Zn from Cu,Zn-superoxide dismutase with only one dispersive solid phase extraction step. At the same time, the sorbent was able to exclude of about 98% of Cu, Zn-superoxide dismutase. Based on these results, we believe the M-RACNTs are promising sorbents for dispersive solid phase extraction of metals directly from protein fluids objecting the obtaining of apoproteins as well as for extraction of metals or organic compounds directly from biological fluids, with analytical interest.

Keywords: Magnetic restricted access carbon nanotubes. Protein exclusion. Copper. Zinc. Cu,Zn-superoxide dismutase. Apoprotein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas das proteínas	21
Figura 2 - Estrutura da SOD 1	25
Figura 3 - Etapas da dSPE magnética	29
Figura 4 - Estrutura de SWCNT e de MWCNT	31
Figura 5 - Estrutura CNTs após oxidação	33
Figura 6 - Princípio básico dos RACNTs	36
Figura 7 - M-RACNTs em suspensão (esquerda) e M-RACNTs sob influência de um campo magnético produzido por ímãs (direita)	46
Figura 8 - Ilustração da reação de entrecruzamento da BSA na formação do recobrimento sobre os CNTs _{ox}	49
Figura 9 - Micrografias eletrônicas de transmissão para as amostras CNTs _{ox} . (A; B), M-CNTs (C; D), M- RACNTs (E; F)	50
Figura 10 - Curvas de perda de massa (A), diferença de temperatura (B) e DTG para CNTs _{ox} . com atmosfera de ar sintético	51
Figura 11 - Curvas de perda de massa (A), diferença de temperatura (B) e DTG para M- CNTs com atmosfera de ar sintético	52
Figura 12 - Curvas de perda de massa (A), diferença de temperatura (B) e DTG para M- RACNTs com atmosfera de ar sintético	52
Figura 13 - Espectros no IV dos materiais: CNTs _{ox} , M-CNTs, M-RACNTs	53
Figura 14 - Mudança do potencial zeta x pH dos CNTs _{ox} , M-CNTs e M-RACNTs	54
Figura 15 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) 10 mg L ⁻¹ , pH 6,8, 25 °C nos CNTs _{ox}	56
Figura 16 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) 10 mg L ⁻¹ , pH 6,8, 25° C nos M-CNTs	56
Figura 17 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) 10 mg L ⁻¹ , pH 6,8, 25° C nos M-RACNTs	57
Figura 18 - Comportamento da adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) a 10 mg L ⁻¹ , pH 6,8, 25° C, nos CNTs _{ox}	61
Figura 19 - Comportamento da adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) a 10 mg L ⁻¹ , pH 6,8, 25° C, nos M-CNTs	61
Figura 20 - Comportamento da adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) a 10 mg L ⁻¹ , pH 6,8, 25° C,	

nos M-RACNTs	62
Figura 21 - Cromatogramas obtidos por injeção de 50 μ L da solução aquosa de 44 mg mL ⁻¹ BSA no sistema sem coluna (A) e com (B) M-RACNTs e (C) M-CNTs.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de isothermas de Zn e Cu adsorvidos em CNTs e CNTox.....	45
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos da adsorção de Zn e Cu para os adsorventes e seus respectivos erros.....	59
Tabela 3 - Parâmetros das isothermas de Zn e Cu adsorvidos nos materiais	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS -	Esclerose Lateral Amiotrófica, do inglês <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
apo-SOD -	Apo-superóxido dismutase
BSA -	Albumina Bovina Sérica, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
c18 -	Octadecil sílica
CNTs -	Nanotubos de Carbono, do inglês <i>Carbon Nanotubes</i>
CNTs_{ox.} -	Nanotubos de Carbono oxidado
Cu -	Cobre
Cu,Zn- SOD -	Cu,Zn- Superóxido dismutase
dSPE -	Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
DTG -	Primeira derivada de Termogravimetria, do inglês <i>Derivative Thermogravimetry</i>
EDTA -	Ácido Tetra-acético de Etilenodiamina, do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FAAS -	Espectroscopia de Absorção Atômica da Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i>
Fe,Zn- SOD -	Fe,Zn- Superóxido dismutase
FeCl₂ -	Cloreto ferroso
FeCl₃ -	Cloreto férrico
F_{error} -	Função erro
Fe- SOD -	Fe- Superóxido dismutase
FTIR -	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
GCB -	Carbono preto grafitado, do inglês <i>Grafitized Carbon Black</i> .
GFAAS -	Espectroscopia de Absorção Atômica de Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy</i>
H₂O₂ -	Peróxido de hidrogênio
HCl -	Ácido clorídrico
HNO₃ -	Ácido nítrico
HPLC -	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDA -	Ácido iminodiacético, do inglês <i>Iminodiacetic acid</i>

IV -	Infravermelho
KBr -	Brometo de potássio
KMnO₄ -	Permanganato de potássio
LIBS -	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma induzido por Laser, do inglês <i>Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i>
M-CNTs -	Nanotubos de Carbono Magnéticos, do inglês <i>Magnetic Carbon Nanotubes</i>
Mn,Fe-SOD-	Mn, Fe- Superóxido dismutase
Mn- SOD -	Mn- Superóxido dismutase
MPs -	Partículas Magnéticas, do inglês <i>Magnetic Particles</i>
M-RACNTs -	Nanotubos de Carbono Magnético de Acesso Restrito, do inglês <i>Magnetic Restricted Acces Carbon Nanotubes</i>
MSPE -	Do inglês <i>Magnetic Solid Phase Extraction</i>
MWCNTs -	Do inglês <i>Multi-walled Carbon Nanotubes</i>
NaCN -	Cianeto de sódio
NaCO₃ -	Carbonato de sódio
NaOCl -	Hipoclorito de sódio
NaOH -	Hidróxido de sódio
NH₄OH-	Hidróxido de amônio
Ni- SOD -	Ni- Superóxido dismutase
pI-	Ponto isoelétrico
PSA -	Amina Primária-Secundária, do inglês <i>Primary Secondary Amine</i>
PTFE -	Politetrafluoretileno
R² -	Coefficiente de correlação
RACNTs –	Nanotubos de Carbono de Acesso Restrito, do inglês <i>Restricted Acces Carbon Nanotubes</i>
RACNT-BSAs -	Nanotubos de carbono restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina, do inglês <i>Restricted access carbon nanotubes capped with bovine serum albumin</i>
RAM -	Material de Acesso Restrito, do inglês <i>Restricted Access Material</i>
RAM-BSA -	Materiais de acesso restrito recoberto com albumina de soro bovino, do inglês <i>Restricted Access Media – Bovine Serum Albumin</i>
SOD1-	Cu,Zn- Superóxido dismutase
SODs -	Superóxido dismutase
SPE -	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>

- SWCNTs** - Do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes* - Nanotubos de carbono de paredes simples.
- TEM** - Microscopia Eletrônica de Transmissão
- TG** - Termogravimetria
- UV-VIS** - Espectroscopia no ultravioleta visível, do inglês *Ultraviolet-visible spectroscopy*
- Zn** - Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	PROTEÍNAS.....	19
2.2	METALÔMICA.....	22
2.3	SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	23
2.4	PREPARAÇÃO DE APOPROTEÍNAS.....	24
2.5	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA (dSPE)	27
2.6	NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)	30
2.7	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO.....	33
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	METODOLOGIA.....	39
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	39
4.2.	ANÁLISES DE Cu E Zn POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA.....	39
4.3.	PROCESSO DE OXIDAÇÃO DE CNTs E SUA INFLUÊNCIA NA ADSORÇÃO DE Cu E Zn.....	40
4.4	PREPARO DOS M-RACNTs.....	40
4.5	CARATERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO MAGNÉTICOS.....	41
4.6	ESTUDO DE CINÉTICA DE ADSORÇÃO DOS ÍONS DE Cu E Zn.....	42
4.7	ESTUDO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DOS ÍONS DE Cu E Zn.....	43
4.8	ENSAIO EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS.....	43
4.9	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO M-RACNTs EM RETER Cu E Zn DE Cu, Zn-SOD BEM COMO DE EXCLUIR A MATRIZ PROTEICA.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
5.1	INFLUÊNCIA DA OXIDAÇÃO NA ADSORÇÃO DE Cu E Zn EM CNTs.....	45
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	46
5.3	ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO.....	55
5.4	ESTUDOS DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	59

5.5 TESTES DE EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS.....	64
5.6 USO DE M-RACNTs PARA REMOÇÃO DE Cu E Zn DE Cu,Zn- SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	65
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de se analisar amostras complexas em larga escala estimulou a exploração de métodos de preparo de amostras mais rápidos, simples e seletivos (FRANQUI, 2015). Conseqüentemente, antigas técnicas foram sendo substituídas ou aprimoradas, configurando um processo de grande evolução no desenvolvimento de novas metodologias. Grandes evidências de tal fato são as técnicas de preparo de apoproteínas.

As apoproteínas são proteínas que passaram pela retirada de seus metais. Essas moléculas têm sido fonte de inúmeros estudos, pois o modo como elas interagem com seus metais, quando estão na forma de metaloproteínas, não é bem compreendido e muitas doenças estão, de forma direta, relacionadas às modificações de certas metaloproteínas. Tal fato ocorre, por exemplo, com a Cu,Zn- superóxido dismutase (Cu,Zn- SOD), uma das metaloproteínas mais estudadas e que tem sido associada com casos de esclerose lateral amiotrófica (ALS, do inglês *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) (CERQUEIRA, 2007). Contudo, mesmo com os avanços nos procedimentos para se obter apoproteínas, tais técnicas ainda demandam um bom tempo em suas metodologias para a retirada dos metais. Em muitos casos, ainda sobram concentrações residuais de metais ou somente se retira um tipo de metal específico. Portanto, obter um processo mais simples e, conseqüentemente, mais rápido seria de grande proveito para a comunidade científica.

Uma das tendências atuais, quando se trata de novos materiais, são os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *Carbon Nanotubes*) que têm sido usados em diversas áreas, principalmente, devido a suas propriedades, como elevada área superficial, favorável a processos adsorptivos, e estabilidade química e física. Paralelamente, está a extração em fase sólida dispersiva (dSPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*), proposta por Anastassiades et al. (2003), um procedimento simples para ser empregado na limpeza de extratos (CABRERA et al. 2012), sendo, dessa forma, uma metodologia promissora. Ademais, como consequência, surgiram técnicas que aplicavam os CNTs como sorventes de dSPE. Esta foi uma metodologia em que os CNTs tiveram eficiência comparada com sorventes tradicionais, como a c18 (octadecil sílica), amina primária-secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) e carbono preto grafitado (*Grafitized Carbon Black - GCB*), tanto para a limpeza dos extratos como para recuperações dos analitos (SHENG et al., 2010). No entanto, devido a sua natureza hidrofóbica e também ao seu nanotamanho, os CNTs tendem a se agregar e apresentar resistência contra fluxo de um líquido quando usados como sorventes. Este comportamento faz

com que o procedimento se torne ineficaz, especialmente quando solventes aquosos contendo partículas em suspensão são utilizados (YU; XIE, 2012). Para contornar tal problema, algumas alterações podem ser realizadas nos CNTs, como a funcionalização destes por meio de oxidação das paredes e inclusive a modificação com partículas magnéticas (MPs, do inglês *Magnetic Particles*), tornando-os, assim, nanotubos de carbonos magnéticos (M-CNTs). Em suma, os M-CNTs podem ser dispersos em água e, facilmente, separados do meio com a ajuda de um ímã (TARIGH; SHEMIRANI; MAZ'HARI, 2013).

Em 2015, Barbosa et. al. desenvolveram CNTs modificados denominados nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs, do inglês *Restrict Acess Carbon Nanotubes*). Tal material foi capaz de excluir macromoléculas e separá-las de analitos inorgânicos. Dessa forma, um sorvente recoberto com uma camada de albumina bovina sérica (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) é capaz de excluir proteínas. Logo, propõe-se, pela primeira vez, a introdução de nanopartículas magnéticas nesse material, tornando-o um nanotubo de carbono de acesso restrito magnético (M-RACNT), cuja finalidade é a separação de proteínas de seus cofatores metálicos. Sendo, assim, uma possibilidade extremamente promissora para a produção de apoproteínas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica relata sobre as proteínas, metalômica, a enzima Superóxido Dismutase, a preparação de apoproteínas, nanotubos de carbonos (CNTs) e finalmente materiais de acesso restritos (RAM).

2.1 PROTEÍNAS

Conforme afirmam Nelson e Cox (2011), citados por Gomes (2015), nos sólidos totais dos organismos vivos, são encontradas as proteínas. Estas podem ser descritas como arranjos de polímeros lineares de, aproximadamente, vinte aminoácidos, a saber, alanina, valina, prolina, leucina, etc., apresentando um peso molecular (MM) que varia significativamente, desde centenas até milhares de Daltons ($1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$). O agrupamento de tais aminoácidos, encontrados em proteínas tanto de animais quanto de plantas e que formam cadeias extensas, é o que possibilita a obtenção de uma variedade de proteínas.

Cada um dos aminoácidos constituinte das proteínas é composto tanto por grupos de ácido carboxílico quanto de amina. No entanto, a combinação em moléculas de proteínas ocorre para a formação de ligações peptídicas, excetuando o C-terminal e N-terminal da proteína. Com isso, os dois grupos importam características a esses arranjos, evidenciando, portanto, pelo menos, duas constantes de ionização, a do grupo 1-amino e a do 1-ácido carboxílico dos aminoácidos livres, que se manifestam como valores de pKa (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006).

Além das constantes de ionização citadas, os aminoácidos, por possuírem outros grupos ionizáveis em suas cadeias, podem apresentar mais de dois valores de pKa. Numa solução aquosa, ressalta-se que a carga líquida de uma molécula de proteína é dependente, além da constante de ionização das cadeias laterais dos aminoácidos constituintes, do pH da solução. Assim, há os casos de pHs baixos, intermediários e elevados. Na primeira ocorrência, em que há a presença de pHs baixos, tem-se como resultado uma carga líquida positiva para a proteína, já que não ocorre a ionização dos grupos carboxílicos e os grupos amino são protonados. No segundo caso, o dos pHs intermediários, a variação dos valores de pKa interfere, havendo, assim, somente alguns grupos da cadeia que são protonados. Já para a última ocorrência, a de pHs elevados, o resultado é uma carga líquida negativa para as proteínas, uma vez que ocorre a

ionização dos grupos carboxílicos e os grupamentos amino encontram-se desprotonados (NELSON; COX, 2011).

É importante ressaltar a existência de um pH específico (pI) para cada molécula de proteína, chamado de ponto isoelétrico, neste ponto, a proteína não apresenta carga líquida, devido ao fato de a proteína possuir um mesmo número de grupos positivos e negativos carregados. Depreende-se, dessa maneira, que as proteínas, ao considerar seus pI, para um valor determinado de pH, são diferentes e apresentam distintas cargas líquidas. Exemplificando, para valores menores que o pI, tem-se uma proteína com carga líquida positiva, ao passo que, para valores maiores que o pI, uma com carga negativa (PETERS JR., 1995 *apud* GOMES, 2015).

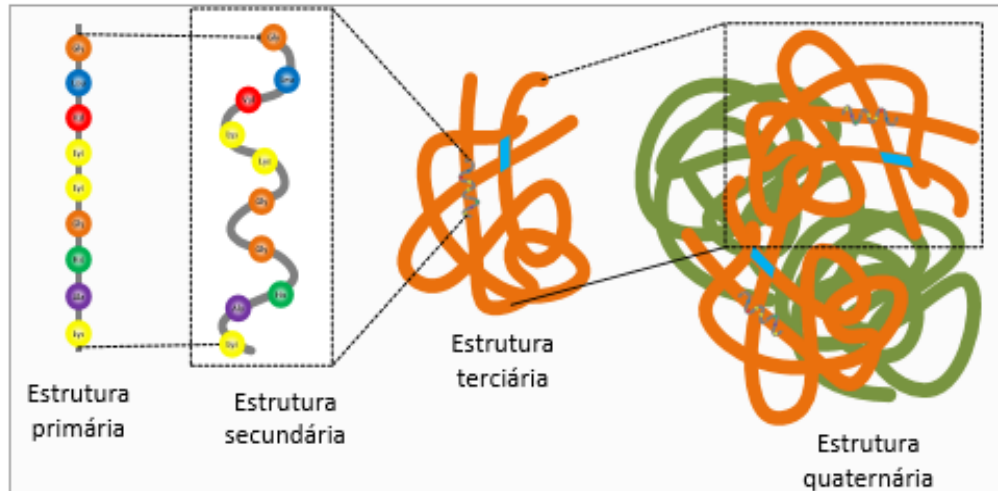
As estruturas das proteínas, as quais são extremamente complexas e determinadas a partir da fórmula estrutural geral de um polipeptídeo, submetem-se às interações necessárias para a sua manutenção e, por isso, é imprescindível, para o estudo, a compreensão dos seus vários níveis de organização. De forma generalizada, há quatro níveis de organização nas proteínas, a saber: estrutura primária; estrutura secundária; estrutura terciária e estrutura quaternária (NELSON; COX, 2011).

Gomes (2015), citando Nelson e Cox (2011), comenta sobre a existência de três cadeias características laterais: apolar (hidrofóbica), polar carregada (hidrofílica) ou polar não carregada, originadas a partir das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos das moléculas de proteínas. As ligações peptídicas e a oxidação da cisteína (formação de pontes de dissulfeto) são decorrentes dos grupos carboxílicos, aminos e demais presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos e podem afetar a estrutura das proteínas, por isso são consideradas de extrema importância.

Os níveis de organização das proteínas são descritos por Gomes (2015), conforme demonstrado na Figura 1. A estrutura primária é formada quando os grupos amino e carboxila de outro aminoácido são unidos pela ligação peptídica dos aminoácidos individuais entrelaçados. Por sua vez, a estrutura secundária advém de uma combinação regular das cadeias polipeptídicas ao longo de uma dimensão espacial como uma hélice tipo α ou uma folha plissada. Característica das proteínas globulares, a estrutura terciária é mais compacta, se comparada às demais, e decorre de trocas, ou seja, distintas interações, como as eletrostáticas, as ligações de hidrogênio, as de dissulfeto e as de Van Der Walls (hidrofóbicas), entre os resíduos de aminoácidos presentes nas cadeias laterais das proteínas. Isso faz com que as cadeias polipeptídicas unam-se na forma de um novelo de lã o qual constitui a estrutura terciária da proteína. Como uma última possibilidade, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, pontes iônicas entre os aminoácidos na superfície das subunidades de polipeptídeos e ligações

covalentes, como do tipo dissulfeto, contribuem para a formação da estrutura quaternária das proteínas, a qual é resultado de uma combinação das cadeias polipeptídicas em múltiplas cadeias compostas de subdivisões.

Figura 1 - Estruturas das proteínas



Fonte: Adaptado de NELSON; COX (2011).

Outros dois formantes da molécula de proteína podem ser citados em relação à estrutura das proteínas: o sítio ativo e o sítio alostérico. Em regiões distantes, na sequência primária, há a instalação de certos aminoácidos que possuem grupos em suas cadeias laterais, formando o sítio ativo, também denominado cavidade, responsável pela união do substrato por meio de ligações não-covalentes. Já a existência do sítio alostérico indica uma dependência das enzimas em relação às moléculas, considerando-as indispensáveis a sua atividade e sendo designadas coenzimas e co-fatores, orgânicas ou inorgânicas. Isso ocorre porque o sítio alostérico, afastado do sítio ativo, decorre da ligação de moléculas pequenas específicas que geram modificações na configuração da proteína que, além de ocasionar lesões no sítio ativo, pode aumentar ou reduzir a atividade enzimática (MOTTA, 2006).

É necessário ressaltar que um número significativo de diferentes proteínas surge da combinação de um metal com uma proteína. Em sua maioria, esses íons metálicos estão relacionados a proteínas e a enzimas específicas. Diante disso, a fim de compreender os efeitos nos sistemas biológicos, o estudo dessas espécies metálicas em tecidos e em órgãos humanos é, portanto, fundamental. Surge, a partir dessa importância, a metalômica, conforme comenta Neves (2012).

2.2 METALÔMICA

Concebido por Robert Joseph Paton Williams, o termo *metallome* refere-se à análise dos metais e das espécies metálicas no interior de uma célula ou de um tipo de tecido. Diante disso, tem-se a finalidade de fornecer uma compreensão global e sistemática no que concerne à absorção de metais, ao transporte, ao seu papel e à excreção em sistemas biológicos. Assim, nomeou-se como metalômica o campo de pesquisa inerente ao estudo de metalomas, devido as suas correlações com genomas e proteomas e com áreas tanto da genômica quanto da proteômica (MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009).

No que diz respeito a essa forma de análise, define-se como a organização dos elementos inorgânicos para o equilíbrio das concentrações dos íons de metais livres ou também como complexados que são encontrados em um compartimento celular, célula ou organismo e também biomoléculas, em especial as proteínas. No que diz respeito à pesquisa, está relacionado à exploração da função de metais associados com proteínas (CHANCE; SHI, 2008; MOUNICOU et al., 2009). Com isso, evidencia-se que o seu estudo está fundamentado em compreender a ordenação do metal entre os compartimentos celulares de um determinado tipo de célula; entender a coordenação no meio ambiente, no sentido de identificar com qual biomolécula poderá ser incorporada à célula ou também por meio de qual molécula ocorrerá a formação de complexos, e quantificar as concentrações de cada espécie metálica e as modificações de cada metaloma, levando em conta o tempo e a sua exposição a certos estímulos externos (QUEIROZ, 2015). Considerar tais parâmetros é uma investigação de metalomas necessária para elucidar, ampliar a compreensão e oferecer novas informações sobre o comportamento de um elemento, um metal ou uma espécie metálica. Além disso, há desafios analíticos os quais visam chegar a uma especificidade e a uma sensibilidade de resposta para análises realizadas com volumes amostrais extremamente reduzidos (SZPUNAR, 2004).

Há, como consequência do reduzido tempo de estudo da metalômica, menos dados se comparados com a genômica e a proteômica. No entanto, os estudos dessas áreas têm a possibilidade de oferecer quantidade significativa de dados às pesquisas relacionadas à metalômica e à metaloproteômica, o que pode gerar uma rapidez na progressão desses conteúdos (CHANCE; SHI, 2008). Ademais, é importante que se desenvolvam metodologias analíticas, principalmente em relação aos chamados micronutrientes metálicos, os quais apresentam faixa de essencialidade e de toxicidade muito próximas e que são transportados em nível celular por distintas proteínas. Com isso, tais métodos devem permitir uma avaliação

segura das metaloproteínas e/ou proteínas ligadas a metais (*metal-binding*), presentes em fluídos biológicos e em tecidos dos seres vivos, já que essas proteínas representam, de modo conjunto, aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas (POZZI, 2013).

Consideradas um dos tipos mais abundantes de proteínas, as metaloproteínas apresentam metais os quais têm ação catalisadora, reguladora ou desempenham um papel fundamental na estrutura proteica (DUDEV; LIM, 2014). Há ainda as proteínas *metal-binding* que, apesar de conterem interações formadas com menor afinidade e serem, com isso, facilmente quebradas (HERALD et al., 2003), como representam um percentual muito alto, são responsáveis por muitos processos essenciais, como o da estabilização da estrutura proteica; o da catálise enzimática; o da transdução de sinal; o da fixação de nitrogênio; o da fotossíntese e o da respiração (DUDEV; LIM, 2014).

Na atualidade, além de Fe, Mg e Ca, o Zn é o metal com maior incidência relacionado às proteínas, segundo o Banco de Dados de Análise de Proteína (PDB). Unidos às proteínas sob condições fisiológicas, também são evidenciados os íons metálicos Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^+ e Cu^{2+} , além de Co^{2+} e Co^{3+} . Tal fato, ou seja, a maior ocorrência de um metaloma em proteínas, é decorrente do processo de seleção e de competição natural que atua sobre a base de suas propriedades físico-químicas e de sua biodisponibilidade exclusivas (DUDEV; LIM, 2014).

No entanto, não são conhecidos os mecanismos pelos quais são detectados, armazenados ou incorporados como cofator em uma célula, ainda que contribuam para a estabilidade das proteínas por meio da sua presença no centro dessas grandes moléculas, auxiliem no recolhimento e dobramento de proteínas ao se ligar a elas e colaborem para torná-las funcionais e/ou aumentar, diversificar ou ajustar suas propriedades, muitas vezes, fundamentais para atividade enzimática (RULISEK; HAVLAS, 2000). Nesse sentido, importante se faz considerar, neste trabalho, o papel da metaloproteína anti-oxidante Cu,Zn-superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD).

2.3 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Com uma função primordial no que concerne à proteção de células contra estresse oxidativo, a metaloproteína anti-oxidante Cu,Zn- superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD), SOD, como geralmente é denominada, descoberta por Joe M. McCord e Irwin Fridovich, é encontrada

na maioria dos organismos aeróbicos e anaeróbicos (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). Esse tipo de proteína está relacionado a um grupo de enzimas o qual funciona como catalisador da dismutação do ânion superóxido em radical dioxigênio. Este se origina pela parcial diminuição do oxigênio molecular em metabólitos de oxigênio celular e peróxido de hidrogênio que, por meio da ação das enzimas catalase ou peroxidase, é quebrado e transformado em água (MICHEL et al., 2005).

Toichi, Yamanaka e Furukawa (2002) ressaltam que, ao assumirem forma de rede por meio de ligações dissulfeto intermoleculares, as superóxidos dismutases (SOD1s) patológicas são responsáveis pelo desenvolvimento de oligômeros insolúveis, ao passo que, por sua vez, as SOD1s de tipo selvagem estabelecem uma ligação dissulfeto intra-molecular altamente conservada. Dessa forma, uma condição tiol-dissulfeto na SOD1 assumirá uma função reguladora no que diz respeito à demarcação das vias de dobramento/enovelamento de proteína. No entanto, ainda é desconhecido o modo pelo qual as modificações patogênicas na SOD1 atingem a condição do tiol-dissulfeto, com o objetivo de favorecer o enovelamento da proteína (TOICHI; YAMANAKA; FURUKAWA, 2012).

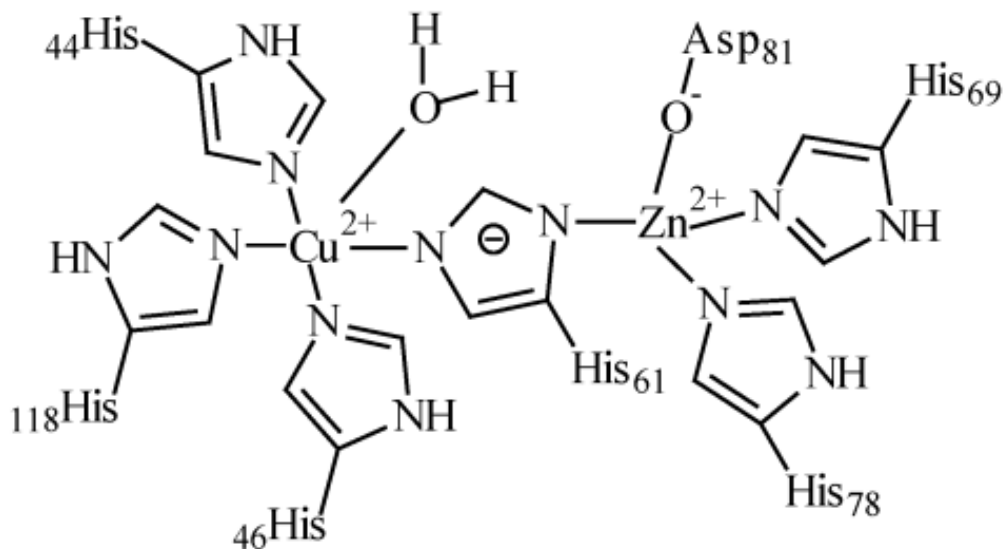
Segundo os cofatores metálicos, as SODs são divididas em formas variadas. Com estruturas e sequências similares, encontraram-se, no citoplasma de células procarióticas, SODs que possuem manganês (Mn- SOD) e ferro (Fe- SOD). Registraram Battistoni et al. (2000) a descoberta da Cu,Zn- SOD (Cu,Zn- superóxido dismutase) no periplasma de bactérias endossimbióticas que, de modo evolutivo, apresenta relação com a Mn,Fe- SOD, constituída tanto de Cobre (Cu) quanto de Zinco (Zn). Ademais, podem ser citadas SODs que contêm níquel (Ni- SOD) e ainda, conjuntamente, ferro e Zn (Fe,Zn- SOD) (SHAFEYA et al., 2008).

Sutter, Hossner e Ming (2005) ressaltam que, apesar da existência dos diferentes tipos de metaloproteína, a mais investigada é a Cu,Zn- SOD a qual, além de estar presente como uma glicoproteína extracelular tetramérica no tecido humano, também é encontrada em bactérias, como a *Escherichia coli* (MICHEL et al., 2005). A Cu,Zn-SOD é composta por duas subunidades idênticas de 16 kDa e cada uma, além de acomodar um Cu, que, em uma geometria de quadrado plano distorcido, une-se a quatro histidinas, contém um local de ligação para Zn, o qual, em uma geometria tetraédrica, está ligado a três histidinas e um resíduo de aspartato. Dos três resíduos de histidina, um se une a dois íons metálicos cuja atração, para os sítios de ligação, depende do pH. Além disso, tal enzima possui uma estrutura peculiar, já que se apresenta em forma de folha β -pragueada, da qual dois laços largos são desenrolados. Sua estrutura é evidenciada na Figura 2.

Toichi, Yamanaka e Furukawa (2012) evidenciam que as modificações em Cu,Zn-

SOD1 são consideradas uma das causas habituais de ALS, como se pode perceber, além do progressivo grupo de evidências o qual sugere um papel para a SOD1 de tipo selvagem na doença, corrobora-se a responsabilidade de mutações em células homodiméricas dessa enzima em 20% dos casos habituais, bem como em 3-5% dos esporádicos. Essas mutações (ALS ou também denominada doença de Lou Gehrig) podem progredir de forma irreversível, sendo escassas as possibilidades de tratamento (BROOM et al., 2015). Considerando a importância da SOD1, é fundamental discutir-se sobre o processo de preparação das apoproteínas.

Figura 2 - Estrutura da SOD 1.



Fonte: SZILÁGYI et al. (2005).

2.4 PREPARAÇÃO DE APOPROTEÍNAS

Segundo Bolster (1997), uma apoproteína é uma proteína que apresenta uma modificação em seus constituintes, neste caso, a proteína manifesta-se sem seu grupo prostético ou seu metal. Um exemplo dessa alteração é descrito por Segen (2010) que indica a formação da apoferritina, decorrente da ferritina, sem o hidróxido férrico.

Conforme Mccord e Fridovich (1969) e Sutter, Hossner e Ming (2005), a diálise com agentes quelantes constitui-se como um método usual dessa preparação. No entanto, esses métodos demandam um tempo extenso de preparação e apresentam a possibilidade de danificar a estrutura da enzima, além de, muitas vezes, não se remover os metais totalmente, como no

estudo de Morpurgo et al. para se obter apostellacianina livre de Cu, em 1972. Ao utilizarem o método de diálise exaustiva com uma solução 0,02 M de NaCO₃ e 0,01 M de NaCN, os pesquisadores obtiveram uma concentração residual de 10% de Cu na proteína. Com isso, emergem outros estudos com novas metodologias, podendo ser citado o da filtração em coluna gel Sephadex G25, equilibrada com um tampão contendo EDTA (Ácido Tetra-acético de Etilenodiamina, do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*), em um pH baixo (SUTTER; HOSSNER; MING, 2005). Weser e Hartmann, em 1971, efetuaram uma diálise durante 12 horas a 4 °C de 2 mL de metaloproteína concentrada em uma coluna Sephadex G25 equilibrada com solução tampão de pH 3,8 composto de 10 mM de EDTA, ajustado com ácido acético. A vantagem de aplicação dessa técnica relaciona-se ao menor tempo de preparo referente à técnica anterior, variando entre 8 e 12 horas, para a concretude do procedimento (CARRICO; DEUTSCH, 1969). Além disso, pode ser citada a cromatografia de permuta iônica em ácido iminodiacético (IDA) com coluna de Sepharose, procedimento para a remoção de metais que, se comparado aos demais métodos, apresenta menor tempo, variando de 5 a 10 horas, em temperatura ambiente (SUTTER; HOSSNER; MING, 2005). Tal metodologia foi efetuada por Michel et al., em 2005, que aplicaram 1mM de SOD na coluna de Sepharose G25, com 17mM de tampão acetado pré-equilibrado em pH 3,5, com concentração de 10mM de EDTA, durante 10 horas, em temperatura ambiente.

Gomes e colaboradores (2015) ressaltam que é possível o emprego das proteínas em bioquímica e em bioanalítica quando há a substituição dos metais ou do grupo prostético por outros sítios ativos que possibilitam uma diferente função fisiológica à proteína. Com natureza proteica e consideradas catalisadores biológicos, as enzimas são responsáveis pela aceleração de distintas reações bioquímicas que, além de possuírem versatilidade e serem estereoespecíficas, apresentam importância considerável em processos biotecnológicos, já que são favorecidas de forma termodinâmica (COELHO et al., 2008).

Como citam Michel et al. (2005), é possível que a apoenzima tratada com íons Cu II e Zn II produza uma enzima superóxido dismutase cataliticamente ativa, o que se comprovou com as primeiras experiências de reconstituição, efetuadas com a apo-superóxido dismutase (apo- SOD). Como as SODs são predispostas a modificações, segundo corroborou um dos estudos, no qual cerca de 25% dos pacientes acometidos com ALS familiar evidenciaram ter alterações na SOD (ROSEN et al., 1993), mantém-se veemente o interesse por seu estudo. Ademais, até o momento, excetuando-se o fato de que tais modificações conferem à enzima a capacidade de gerar estresse oxidativo no lugar de diminuir a atividade dismutase (MICHEL et al., 2005; CERQUEIRA, 2007), a disponibilidade de apo- SOD é importante para aclarar as

possíveis modificações. Com o isolamento de um metal de determinada metaloproteína, disponibiliza-se um novo quadro de estudos a serem realizados os quais podem responder a diversas questões concernentes à funcionalidade das proteínas e à interação com seu íon metálico.

2.5 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA (dSPE).

Sendo capaz de enriquecer traços de metais, remover a matriz e trocar o meio, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) está relacionada à disposição de analitos designados de um gás, fluido ou fase líquida para uma fase sólida, conforme comenta Camel (2003). Tal processo, segundo Barbosa (2015), fundamenta-se em mecanismos de adsorção, de troca iônica, de complexação dos íons para o desenvolvimento de par iônico ou de complexos e de outras reações químicas tanto na superfície quanto no interior dos reagentes sólidos, envolve três ou quatro fases sucessivas, relacionadas às condições do reagente sólido dissolvido com material adequado, à lavagem do reagente sólido e ao fracionamento, posteriormente, dos analitos (RAO; METILDA; GLADIS, 2006). No entanto, quando usada com matrizes muito complexas ou com um grande volume de amostra, a SPE torna-se inapropriada. No primeiro caso, isso ocorre porque o processo possui a capacidade de obstruir a coluna sorvente e, no segundo, dedica-se demasiado tempo para o carregamento de amostras (PARDASANI et al., 2011).

Como uma alternativa aos inconvenientes da SPE, Anastassiades et al. propuseram em 2003, e desse modo, surge a dSPE, vista como uma técnica promissora em relação ao tratamento de amostras, já que o sorvente, em uma solução de amostras que contém os analitos alvo, tem a possibilidade de interação total com a matriz. Tal método de preparo de amostra, utilizado na limpeza de extratos destinados à análise cromatográfica de resíduos e de contaminantes em alimentos, apresenta como base um procedimento de bastante simplicidade (CABRERA et al., 2012). Com isso, essa abordagem evidencia uma relação direta com a fase da extração, em que, por meio de uma simples centrifugação, os analitos são removidos, fornecendo, assim, a partir de uma amostra original de qualquer tamanho, uma alíquota homogênea (CABRERA et al., 2012). Desse modo, conforme Román, Chisvert e Canals (2011), a dSPE, ao reter os coextrativos da matriz e evitar, com isso, o direcionamento ou o bloqueio de cartuchos ou

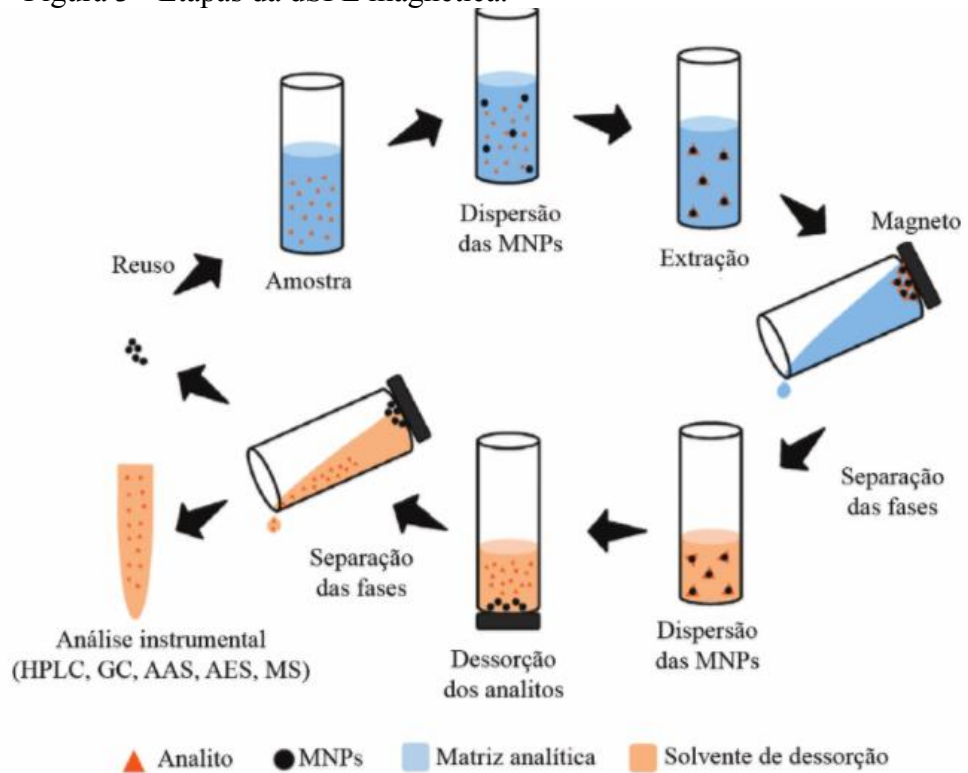
discos, bem como o direcionamento para cromatografia, como ocorre na SPE, possibilita que o sorvente, o qual funciona como um filtro químico, interaja com todas as partículas absorventes.

No que concerne às vantagens da dSPE, se comparada à SPE tradicional, pode-se citar, como a principal, a versatilidade, já que se tem a possibilidade de empregar distintas quantidades e/ ou misturas de sorventes, levando em consideração o tipo de matriz e de analitos de interesse (CABRERA et al., 2012). Outra vantagem refere-se ao uso de uma quantidade menor de sorventes e solventes e, conseqüentemente, uma decaída no custeio. Além disso, há a possibilidade de se trabalhar em outras configurações, além do cartucho, o que permite somente um ínfimo treinamento dos analistas, visto que se desconsideram as etapas prévias de pré-condicionamento (BARBOSA et al., 2015).

Decorrente da versatilidade da dSPE, podem-se utilizar os CNTs como uma forma alternativa de sorventes, para a limpeza dos extratos e a recuperação dos analitos, obtendo, assim, uma eficiência em comparação aos sorventes comumente utilizados, como c18, PSA e GCB (SHENG et al., 2010). Com isso, conforme comentam Tarigh e Shemirani (2015), muitas investigações têm sido realizadas a respeito da utilização dos CNTs para a extração de analitos, como absorventes, pesticidas, antibióticos, ansiolíticos, anti-inflamatórios, ésteres de ftalatos, compostos fenólicos, íons inorgânicos e compostos organo-metálicos.

Além das citadas, também se pode mencionar a técnica de fase sólida magnética dispersiva, exposta em 1973, por Robinson et al., para fins biotecnológicos. Em 1987, foram descritas, por Wikstrom et al., em procedimentos de extração líquido-líquido, separações de fase mais rápidas do que com aditivos magneticamente susceptíveis (ferrofluidos ou partículas de óxido de ferro) e um campo magnético externo. Com fins analíticos, Šafaříková e Šafařík, em 1999, empregaram para separações e pré-concentrações de proteínas, de íons metálicos, de biomateriais e de compostos orgânicos de diferentes polaridades (YU; XIE, 2012; MOHAMMADI et al., 2014). No caso desse procedimento, o que ocorre é a adição das MPs à solução da amostra, fazendo com que o analito alvo seja adsorvido à superfície das pérolas magnéticas. Tais partículas, ao serem compostas de elementos, como o ferro, o cobalto ou os seus óxidos e ligas com propriedades ferromagnéticas ou superparamagnéticas, portam-se como ímãs e, decorrente da interação magnética, constituem redes ou se agregam (CHEN et al., 2009). O procedimento básico pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 - Etapas da dSPE magnética.



Fonte: SILVA et al. (2016).

Conforme relatam Román, Chisvert e Canals (2011), o método pode ser aplicado em amostras aquosas, em que se empregam nanopartículas, para a extração de analitos da água, os quais podem ser separados da matriz pela utilização de um ímã e são recuperados. Com isso, por meio de um solvente adequado, o composto alvo é quimicamente libertado das nanopartículas (ROMÁN; CHISVERT; CANALS, 2011). Segundo Shen et al. (2007), se comparada aos mesmos adsorventes em um cartucho para determinação de pesticidas organofosforados, a técnica que utiliza as nanopartículas magnéticas mostrou-se mais eficiente.

Apesar de a extração magnética simples permitir, conforme comentam Chen et al. (2009), que contaminantes gasosos sejam adsorvidos nas MPs e, em seguida, separados da matriz pelo emprego de um ímã, há a desvantagem com o uso desses materiais em relação à pequena área superficial ou à baixa capacidade adsorptiva. Ademais, se comparada à SPE convencional, uma vez que não é necessário o empacotamento da coluna com o sorvente, o primeiro tratamento da amostra é simplificado. Dessa maneira, a extração em fase sólida magnética (MSPE), em que se utilizam as MPs como adsorventes, tem atraído o grande interesse dos pesquisadores da área. Devido à natureza superparamagnética e física, além das propriedades químicas, como alta dispersibilidade, elevada proporção entre a superfície e o volume e capacidade de adsorção, têm atraído a atenção da comunidade científica as

nanopartículas magnéticas com tamanho nanométrico (1-100 nm). Além de serem reutilizadas e recicladas, elas são simples de serem produzidas em grande escala e também apresentam a capacidade de modificação da superfície, permitindo, assim, aplicações em análises ambientais, biológicas e alimentares (GIAKISIKLI; ANTHEMIDIS, 2013). No que diz respeito à produção de novos materiais bem e com diferentes fins, pode-se citar os nanotubos de carbono (CNTs) e suas diferentes modificações.

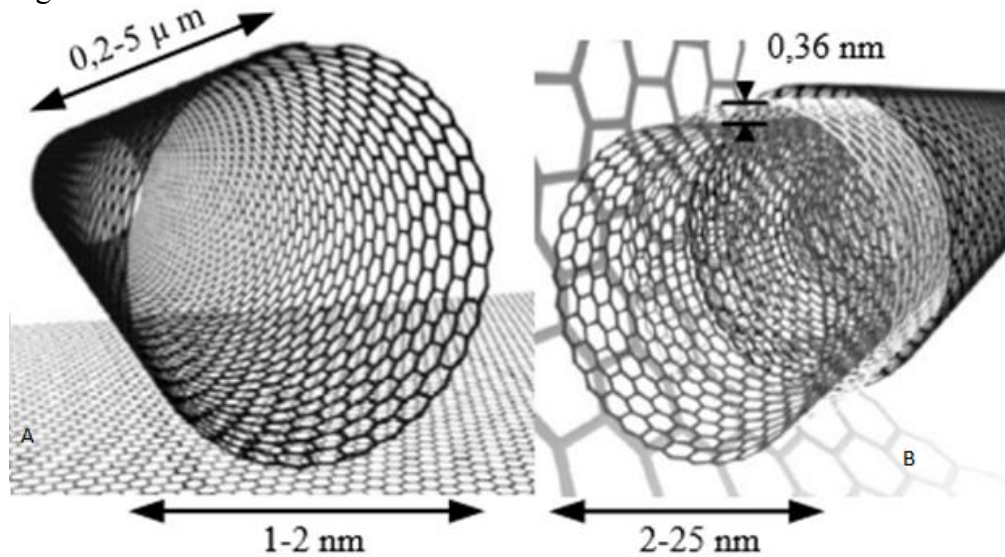
2.6 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)

De indispensável condição para o desenvolvimento de novas tecnologias, a Nanotecnologia é, no que diz respeito às inclinações científicas da atualidade, uma das mais importantes, uma vez que está relacionada à produção de materiais com tamanhos ínfimos, ou seja, de 100 nm ou ainda menores. No que tange as suas aplicações, seu campo é amplo, estando relacionadas às áreas biológicas, farmacêuticas e nos processos de fabricação industriais, na introdução de materiais avançados, etc. (BARBOSA, 2015). Incluindo na Nanotecnologia, os CNTs têm apresentado um considerável destaque, já que sua estrutura e suas propriedades únicas incluem grande área de superfície e funcionalidades químicas de superfície (TAN, 2015).

As pesquisas relacionadas aos CNTs foram propostas, inicialmente, por Sumio Iijima o qual descreveu tais estruturas como cilíndricas e ocas, compostas por uma camada circular de carbonos ligados entre si em configuração sp^2 e que possuem distintas propriedades, se comparados a outros materiais (IJIMA, 1991). Estruturalmente, no que diz respeito ao número de camadas, classificam-se em dois: CNTs de paredes múltiplas e de paredes simples. No primeiro caso, os SWCNTs (do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes*), tem-se uma única folha de grafite enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico; já no segundo, os MWCNTs (do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*), um conjunto de CNTs concêntricos (HERBST, 2004).

Os primeiros CNTs produzidos por Iijima foram os de paredes múltiplas em 1991; já em 1993, surgem os de paredes simples, suas estruturas podem ser visualizadas na figura 3B e 3A respectivamente.

Figura 4 - Estrutura de SWCNT e de MWCNT.



Fonte: GOMES (2016).

Com as pesquisas, foi comprovado também, pelos dados de microscopia eletrônica, além da possibilidade de apresentar uma ou várias camadas, a forma cilíndrica dos dois tipos, com diâmetro variável, correspondente a poucos nanômetros, de 4 a 30 nm, e comprimento que pode chegar a vários micrômetros, 1 μm ou mais de comprimento, conforme descrito por Barbosa et al. (2015) e Saito, Dresselhaus e Dresselhaus (1998). Os CNTs podem assumir distintas estruturas, a saber, de poltrona ou *armchair*, zig-zag e quiral, baseado na forma como o grafeno se enrola. Pode-se ressaltar que os MWCNTs, como são compostos por vários CNTs, têm a possibilidade de apresentar várias quiralidades. Estas, também chamadas de helicidade ou ângulo quiral, e o diâmetro são determinantes para muitas propriedades e para a estrutura dos CNTs, uma vez que o vetor quiral, que corresponde à direção de enrolamento da folha bidimensional de grafeno, é específico para cada nanotubo (BARBOSA, 2015; GOMES, 2015).

Como são constituídos por propriedades físicas e químicas únicas, os CNTs são potencialmente úteis em diversas aplicações, como na Eletrônica, na Ótica, na Química e em outros campos da ciência dos materiais, em decorrência da sua elevada estabilidade química e física e, principalmente, pela proeminente área superficial, condição importante em processos adsorptivos. Dentre as possíveis aplicações dos CNTs, considerada uma das mais importantes na ciência analítica, pode-se destacar a na SPE.

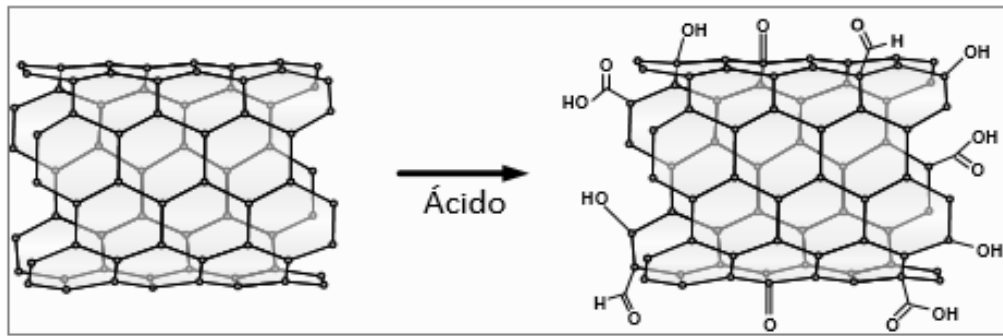
No que diz respeito ao uso dos CNTs como adsorvente em sistemas de SPE, estabelecem interações π - π , além de interações de Van der Waals com outras moléculas, especialmente com as hidrofóbicas, o que faz dos CNTs uma opção interessante como sorventes para esse tipo de sistema (DUTRA, 2014). É necessário, no entanto, considerar que a natureza hidrofóbica e

também o nanotamanho podem ocasionar infortúnios, dos quais se destaca, quando usados como adsorventes na SPE, a tendência de se agregarem facilmente e a apresentarem resistência contra fluxo de líquido. Tais efeitos, além de dificultarem ou reduzirem a capacidade de adsorção, especialmente quando solventes aquosos, contendo partículas em suspensão, são utilizados (YU; XIE, 2012), tornam o procedimento ineficaz. Entretanto, para solucionar esses problemas, podem ser realizadas alterações em sua superfície, possibilitando, assim, um aumento em relação aos recursos analíticos (PARDASANI et al., 2011). Com isso, percebe-se que a funcionalização da superfície dos CNTs é uma solução para superar a inércia química e aumentar a compatibilidade com a matriz.

Cabe ressaltar que, além de aumentar as propriedades finais do material (NOVAIS, 2012), uma funcionalização química adequada pode aprimorar a dispersão numa matriz polimérica. Além dos processos citados, há ainda a possibilidade de alteração da superfície por meio de diferentes reações, como as de adição nucleofílica, de cicloadição, de halogenação, de hidrogenação e de adição de radicais. A imobilização dos CNTs pode ser covalente e não-covalente, em que se tem, respectivamente, uma imobilização em suportes sólidos, como aço ou sílica, ou uma adsorção física, isto é, não há ligação química na parede lateral dos CNTs, englobando, assim, interações iônicas e hidrofóbicas, ligações coordenadas e de hidrogênio e forças eletrostáticas e de Van der Waals. No primeiro caso, ocorrem transformações na geometria do sorvente de SPE e, no segundo, uma ampliação tanto da estabilidade quanto da seletividade dos CNTs, decorrentes do arranjo de duas ou mais interações, sejam elas semelhantes ou diferentes (BARBOSA, 2015).

As modificações não covalentes nos CNTs podem ser realizadas pelo uso de agentes oxidantes, como HNO_3 , H_2O_2 , NaOCl , KMnO_4 , em analitos inorgânicos, promovendo defeitos na estrutura dos CNTs. Dessa forma, surgem sítios de ligação capazes de reter íons metálicos, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ e $\text{C}=\text{O}$, que se tornam funcionais com o processo de oxidação (ZHAO et al., 1997; BARBOSA, 2015), como mostra a figura 4. A capacidade de troca iônica entre a superfície e os íons metálicos que, por sua vez, gera uma consequente melhora na adsorção sofre um acréscimo devido ao fato de que tais grupos funcionais responsabilizam-se pela ampliação da carga negativa na superfície dos CNTs (LI et al., 2002).

Figura 5 - Estrutura CNTs após oxidação.



Fonte: GOMES (2016).

Em relação à modificação de CNTs com nanopartículas magnéticas, forma-se um material híbrido que combina tanto as propriedades físicas e químicas únicas dos CNTs quanto as paramagnéticas das nanopartículas magnéticas. Tais características tornam possível o uso de CNTs na remediação da poluição (QU et al., 2007), bem como em biossensores e em biomanipuladores (GAO et al., 2009).

Em 1973, Robinson et al. relataram a tecnologia de suporte magnético. A partir disso, decorrente de sua vasta gama de aplicações, a síntese de nano (ou micro) transportadores magnéticos tem atraído grande interesse. As vantagens dessa tecnologia relacionam-se à facilidade de produzi-la em grande quantidade por meio de um método simples; à alta capacidade de adsorção, considerando a sua grande área de superfície; às fortes propriedades magnéticas; às baixas toxicidades e ao fato de que podem ser facilmente isolados de soluções com a aplicação de um campo magnético exterior (MEHDINIA; ROOHI; JABBARI, 2011).

2.7 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO

Em uma determinação analítica, conforme assinala Barbosa (2015), o momento mais delicado diz respeito ao preparo de amostras, já que é a etapa em que os principais erros ocorrem, sendo assim merece atenção redobrada. A complexidade, decorrente dos riscos a que os analistas são submetidos, por exemplo, do emprego de ácidos concentrados em sistemas de aquecimento fechados ou abertos, acentua-se ainda mais quando se refere à precisão de analitos inorgânicos. Levando em consideração tais aspectos, é necessária uma agilidade e conveniência no que concerne a esses procedimentos a fim de minimizar, além de tais riscos, as perdas do material, bem como o custeio envolvido na análise.

Para tal, têm sido investigadas técnicas de introdução direta, como por meio de amostragem de líquidos e sólidos em Espectroscopia de Absorção Atômica de Forno de Grafite (GFAAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*), Espectrometria de Emissão Óptica com plasma induzido por laser (LIBS, do inglês *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*), destacando-se as técnicas com o uso de fases estacionárias do tipo RAM. Todas apresentam as vantagens de se evitar o manuseio de amostras tóxicas e infecciosas, de diminuir a probabilidade de erros humanos no que concerne ao seu manejo e de aumentar a frequência de análise (BARBOSA, 2015).

Originário do inglês *Restricted Access Material* (Materiais de Acesso Restrito), o termo RAM foi proposto em 1985, por Hagestam e Pinkerton, com a finalidade inicial de permitir, no sistema cromatográfico, a injeção direta de fluidos biológicos, ampliando, posteriormente, sua utilidade para outras aplicações, conforme salientam Neto, Lopes e Cass (2015). Essa abrangência em relação ao uso dos RAM foi preponderante para estimular os estudos sobre o material, já que se têm registradas algumas revisões tanto concernentes ao uso das colunas RAM quanto às classificações de diversos suportes em 2004, com Souverain, Rudaz e Veuthey, e, mais recentemente, em 2007, com Mullett, Sadílek, Šatínský e Solich.

De acordo com a natureza da barreira e a estrutura da superfície do sorvente, propõe-se a divisão dos RAM em quatro tipos básicos, considerados: material misto; material de superfície interna de fase reversa; materiais de fases hidrofóbicas protegidas; materiais de superfícies semipermeáveis ou materiais poliméricos. (SADILEK; SATINSKY; SOLICH, 2007; BARBOSA, 2015). No que concerne ao material misto, as propriedades das superfícies tanto internas quanto externas, fornecidas pela união covalente de dois grupos funcionais distintos ou por um grupo funcional com duas ligações, são as mesmas. O material de superfície interna de fase reversa apresenta dois tipos de superfícies, em que há a junção dos grupos funcionais que têm como resultado as fases hidrofílica e hidrofóbica, relacionadas, respectivamente, à superfície externa e à superfície interna. Concernente aos RAM de fases hidrofóbicas protegidas, estes impossibilitam o acesso das macromoléculas aos grupos funcionais dentro dos poros do material, ao apresentarem uma fase estacionária com uma barreira química. Por último, os RAM de superfícies semipermeáveis, ao exibirem uma barreira química típica de polímero hidrofílico, impedem o acesso das macromoléculas à superfície, o que ocorre devido ao fato de a superfície externa expulsar as moléculas grandes, ao passo que a interna mantém os analitos que transpassam o polímero poroso (BARBOSA, 2015).

Como apresentam alta resistência física, com uma desenvoltura satisfatória no que diz respeito à capacidade de retenção, de eficiência e de reprodutibilidade, os RAM possuem um

apanágio. Além disso, oferecem uma quantificação exata, uma vez que somente os analitos ficam retidos na coluna (RIEUX et al., 2007). Relacionado ao estudo de matrizes biológicas, as colunas RAM consistem em uma boa opção, como ressalta Gomes (2015), já que têm a capacidade de eliminar moléculas, como as proteínas, e manter somente as moléculas com menor peso. Assim, percebe-se uma das vantagens dos RAM que podem ser utilizados para determinar, excluindo as etapas prévias e/ou complexas de preparo de amostras para remoção de proteínas, compostos orgânicos em matrizes complexas, como plasma, soro humano e leite (CHICO et al., 2008). A técnica de preparo de colunas RAM proteína imobilizada do tipo albumina sérica bovina (RAM-BSA, do inglês *Restricted Access Media – Bovine Serum Albumin*) foi descrita por Lima et al. (2006), conforme sugerido por Gomes (2015).

Nos últimos anos, algumas pesquisas, destinadas à modificação química da superfície dos adsorventes comuns, têm sido desenvolvidas. Pode-se destacar, como uma estratégia bem sucedida, a formação de uma capa de albumina de soro bovino (BSA) em torno de camada de sílica, descrita por Svensson e Arnebrant (2010). Onde a albumina sérica bovina tem seu uso justificado devido sua alta biocompatibilidade, estabilidade, baixo custo e similaridade com a albumina humana.

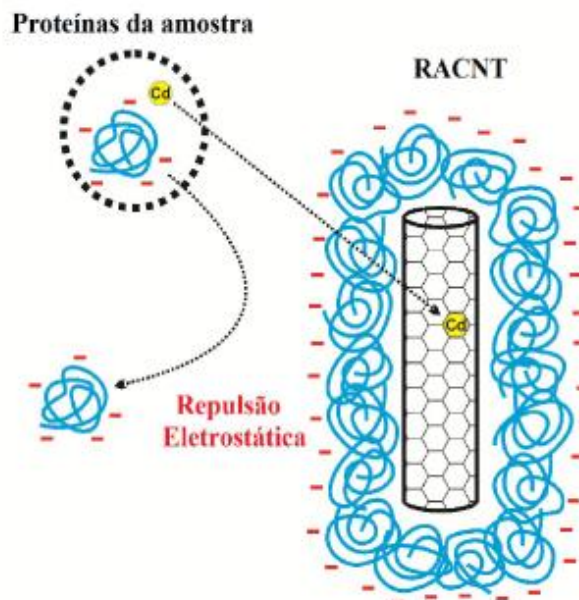
Portanto, ainda que, num primeiro momento, o emprego dos RAM tenha sido dedicado, de forma exclusiva, às extrações de compostos orgânicos, essas novas aplicações permitiram, em 2015, obter êxito em análises de analitos inorgânicos de fluidos biológicos (BARBOSA et al., 2015). Fazendo uso de glutaraldeído como reagente de ligação cruzada, a investigação foi concretizada com os CNTs revestidos com uma camada externa de BSA, fixada pelo intercruzamento entre os grupos amina da BSA, o que resultou em um material totalmente novo, denominado nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) (BARBOSA et al., 2015).

No que diz respeito à síntese do RACNT-BSA (BARBOSA et al., 2015), os CNTs de paredes simples ou múltiplas podem ser revestidos diretamente ou após uma reação de funcionalização; já os CNTs não modificados apresentam características apolares e são utilizados, principalmente, para extração/pré-concentração de compostos orgânicos. Além disso, ressalta-se que os CNTs restritos à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina (RACNT-BSA, do inglês *Restricted access carbon nanotubes capped with bovine serum albumin*) têm potencial tanto para utilização quanto para comercialização em indústrias e em laboratórios que são responsáveis pelo trabalho com análises de metais e de compostos orgânicos em fluidos biológicos, já que podem ser acondicionados em qualquer sistema de extração que utilize sorventes sólidos. Tal fator gera a

vantagem de ser possível, sem qualquer etapa prévia de desproteínização, a injeção direta de fluidos proteicos, como comentam Barbosa et al. (2015).

A exclusão de macromoléculas como proteínas pelos RACNTs pode ser explicada pelo fato de, com o pH da amostra superior ao pI da camada de BSA que reveste os CNTs, as proteínas da amostra e do recobrimento externo do material são ionizadas negativamente, o que acarreta, segundo Barbosa et al. (2015), um efeito de repulsão eletrostática e, por conseguinte, uma dificuldade na adsorção. Dessa forma, evidencia-se que o desempenho satisfatório do material está correlacionado à faixa de pH de trabalho. No entanto, é necessário considerar que há uma atração das proteínas da solução pelos CNTs em uma faixa de pH entre 3,5 e 5,2, o qual compreende os valores do pI de ambos (GOMES, 2015). Recentemente, os estudos de Barbosa et al. (2015) ocasionaram 100% de exclusão de proteínas do soro humano, empregando uma coluna de RACNTs, em um tempo de extração de 4,5 minutos. Sendo assim, os íons metálicos são adsorvidos, por meio das cadeias de proteínas, nos CNTs após a passagem (BARBOSA et al., 2015). O mecanismo de exclusão pode ser visualizado na figura 6.

Figura 6 - Princípio básico dos RACNTs.



Fonte: BARBOSA (2015).

Além da facilidade para automatização, as principais vantagens desse tipo de material encontram-se no elevado número de análises por tempo e na possibilidade de injeção direta e repetida da amostra não tratada. Ademais, as opções de aplicação dessas colunas não se limitam às análises de fármacos em biofluidos, uma vez que podem ser utilizadas em estudos de águas

(BARREIRO; VANZOLINI; CASS, 2010), em análises de alimentos (CHICO et al., 2008) e na configuração simples ou acopladas a uma coluna analítica, funcionando como uma pré-coluna (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

Apesar de todas as vantagens e aplicações, muito há ainda a ser explorado acerca desse material, como os mecanismos de interação entre os CNTs e a BSA, entre os RACNT-BSAs e as macromoléculas, entre o material e íons metálicos, etc. Além disso, a utilização de RAM para a determinação de analitos inorgânicos ainda está em fase de desenvolvimento, como sugere Barbosa (2015). Considera-se, no entanto, que, devido ao fato de os CNTs exibirem benefícios na extração de analitos inorgânicos e características vantajosas para a síntese de RAM, há, ainda, para a análise direta de analitos inorgânicos em matrizes proteicas, uma potencialidade significativa de uso desses elementos. Com isso, espera-se facilitar o preparo de amostras, reduzir resíduos provenientes do processo e o consumo de reagentes, tendo como consequência intensificar o estudo dos CNTs.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é a síntese e a caracterização de nanotubos de carbono de acesso restritos magnéticos (M-RACNTs, do inglês *Magnetic Restricted Acces Carbon Nanotubes*) e seu emprego na extração de Cu e Zn de Cu,Zn- superóxido dismutase.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Funcionalizar os CNTs com HNO₃, para obtenção de CNTsox;
- b) Sintetizar M-CNTs incorporando nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro, pelo método de coprecipitação, nos CNTsox. Revestir os M-CNTs, realizando o entrecruzamento de BSA com glutaraldeído, para obtenção de M-RACNTs;
- c) Caracterizar, morfológicamente, os M-RACNTs por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TG) e potencial zeta;
- d) Analisar a cinética e a adsorção de Cu e Zn nos M-RACNTs por espectroscopia de absorção atômica com chama;
- e) Avaliar a capacidade do material em excluir macromoléculas por meio de ensaios de exclusão de proteínas;
- f) Analisar a capacidade dos M-RACNTs na extração de Cu e Zn da metaloproteína SOD1 por espectroscopia de absorção atômica com chama.

4 METODOLOGIA

Neste item, elencam-se todas as metodologias empregadas para a pesquisa no tocante à síntese dos M-RACNTs e a sua caracterização, bem como a análise do desempenho do material na extração de Cu e Zn de Cu, Zn- SOD.

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes que foram utilizados no desenvolvimento do trabalho foram de grau analítico. No caso das soluções, foram preparadas empregando-se água deionizada 18,2ΩWcm, obtidas de um equipamento de purificação Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA). Os CNTs de paredes múltiplas utilizados e a Cu,Zn- SOD 30KU, por sua vez, foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha), assim como os demais reagentes, a saber, BSA; glutaraldeído; fosfato de sódio e boroidreto de sódio para o revestimento dos CNTs; HCl e NaOH para ajustes de pH; FeCl₃.6H₂O; FeCl₂.4H₂O; solução de amônia; etanol e HNO₃ para a funcionalização dos CNTs. No que tange às soluções padrão de Cu e Zn, em suas diferentes concentrações, foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), dissolvendo-as em quantidade adequada em água Milli-Q. Ademais, os valores de pH foram ajustados com soluções de 1 mol L⁻¹ HCl e 1 mol L⁻¹ NaOH.

4.2. ANÁLISES DE Cu E Zn POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

As leituras realizaram-se em um espectrômetro de absorção atômica Hitachi Z-8200 (Mitorika, Ibaraki, Japão), com correção de fundo por efeito Zeeman polarizado e empregando-se lâmpadas de catodo oco para Cu e Zn, ambas da Hitachi (nº 208-2011 e nº 2082034, respectivamente), as quais operaram a 10 mA. As configurações da análise do Zn foram, a saber, comprimento de onda de 213,9nm; largura da fenda de 1,3nm; altura do queimador de 7,5 mm e vazões do oxidante de 1,5L. min⁻¹. Para Cu, as condições foram comprimento de onda de

324,8nm; largura da fenda de 1,3nm; altura do queimador de 7,5 mm e vazão do gás oxidante de 10 L min⁻¹ e do combustível de 3 L min⁻¹ (ar-acetileno). As leituras realizaram-se com tempo de integração de 3 segundos para ambos os metais e em triplicata, já que essa técnica evidencia alta sensibilidade para determinar baixas concentrações de metais (PINTO, 2005).

A eluição dos metais foi efetivada com ácido nítrico 0,5 mol L⁻¹ e cada material lavado extensivamente com água do adsorvente destilada e, posteriormente, seco em uma estufa a vácuo para novas utilizações.

4.3. PROCESSO DE OXIDAÇÃO DE CNTs E SUA INFLUÊNCIA NA ADSORÇÃO DE Cu E Zn

Os CNT de paredes múltiplas comerciais foram oxidados usando HNO₃ concentrado. Foram adicionados 500 mg de CNTs comerciais num balão contendo 30 mL de HNO₃ a 65% (v / v). O sistema foi mantido a 100 ° C com agitação durante 2 h, depois de os CNT serem filtrados em membrana de PTFE (0,45 µm) e lavados com H₂O até pH neutro.

As capacidades de adsorção de Cu e Zn foram avaliadas nos CNT oxidados, bem como nos CNTs não modificados. Foi construída uma isoterma de adsorção para cada metal (Cu ou Zn) para cada material: os CNTs não modificados e os CNTox. Foram colocados 10 mg de cada sorvente em 7 tubos de ensaio, contendo 5 mL do metal em soluções tampão de fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 6,8) nas concentrações de 5, 20, 50, 80, 120, 200 e 300 mg L⁻¹, respectivamente. Os tubos foram agitados usando um vórtice durante 20 min e centrifugados a 700 g durante 10 min, e o metal foi determinado em cada sobrenadante por FAAS. O experimento foi executado em triplicata.

4.4 PREPARO DOS M-RACNTs

Para o preparo dos M-CNTs, utilizou-se o protocolo modificado de Qu et al. (2007), nomeado de síntese por coprecipitação química. Assim, 1,0 g de CNTs oxidados pelo processo anterior foi adicionado a um balão de fundo redondo, acrescentando-se uma solução de 200 mL de FeCl₃.6H₂O (0,043mol L⁻¹) e FeCl₂.4H₂O (0,022 mol L⁻¹) a 50 °C, sob atmosfera de N₂ e

agitação constante. Transcorridos 10 min, por gotejamento, incorporaram-se 10 mL de NH_4OH 8 mol L^{-1} . O resultante foi lavado extensivamente com água Milli-Q e álcool absoluto até obter pH neutro. Ademais, o material permaneceu por 12 h, a $60\text{ }^\circ\text{C}$, em uma estufa a vácuo, sendo denominado de M-CNTs.

O recobrimento dos M-CNTs com BSA foi feito de acordo com Barbosa e colaboradores (2015). Dessa forma, 20 mL de solução de BSA 1% (m/v) em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH = 6,0) e 5 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído 25% (v/v) foram percolados em um cartucho de SPE que continha 200 mg do M-CNTs, a uma vazão de 1 mL min^{-1} . Após um repouso de 5 h, foram adicionados 10 mL de boro hidreto de sódio em solução aquosa de 1% (m/v) e, por fim, fez-se a lavagem dos M-RACNTs produzidos com água destilada, seguido de secagem 12 h a $60\text{ }^\circ\text{C}$, em uma estufa a vácuo (BARBOSA, 2015). O material final foi denominado de M-RACNTs, para fins de análises e registro.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO MAGNÉTICOS

Estudaram-se as morfologias dos materiais adsorventes adquiridas por meio de TEM em um microscópio JEOL JEM 2100 (Tokyo, Japan), equipado com câmeras Gatan ES 500W e Gatan GIF Tridiem $2\text{ kx}2\text{ k}$ CCD. As amostras foram gotejadas na grade de Cu com filme de carbono e analisadas usando uma voltagem de aceleração de 200 kV.

As análises de infravermelho foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho de transformada de Fourier - FT-IR (modelo 8400S, Shimadzu®, Tóquio, Japão), com resolução espectral de 4 cm^{-1} e usando uma mistura de KBr / amostra a 1% (m/m).

As análises termogravimétricas foram efetuadas em um analisador termogravimétrico modelo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, EUA). A taxa de aquecimento foi de $20\text{ }^\circ\text{C. min}^{-1}$ em uma faixa de temperatura de 30 a $1300\text{ }^\circ\text{C}$ e sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} em suporte de amostra de alumina.

Para as análises de potencial zeta, prepararam-se suspensões de cada material na concentração de 1 mg mL^{-1} em água miliQ e em um ultrassom por 1h. 5 gotas da solução do material foram adicionadas em um volume de 10 mL de água miliQ. Efetuou-se a titulação da solução por meio de espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico, utilizando um analisador de partículas Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), e de células especiais de

poliélono, empregando soluções de HCl ou NaOH para ajustes de pH no intervalo de 3 a 10. Com isso, determinou-se o potencial zeta das nanopartículas.

4.6 ESTUDO DE CINÉTICA DE ADSORÇÃO DOS ÍONS DE Cu E Zn

Os testes cinéticos foram realizados separadamente para cada metal (Cu e Zn) e para cada material (CNTs, M-CNTs ou M-RACNTs). Foram colocados 5 mL de uma solução de Cu ou Zn nas concentrações de 10 mg L^{-1} , preparada em solução tampão fosfato de sódio (50 mmol L^{-1} , pH 6,8) em 6 tubos de polipropileno diferentes contendo 10 mg do sorvente (CNTs_{ox.}, M-CNTs ou M-RACNTs). Os tubos foram agitados em um vórtice a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10, 25, 40, 55, 70 e 90 min, respectivamente, para cada tubo. Depois, os tubos foram imediatamente centrifugados a 700 g durante 10 min, submetendo, posteriormente, os materiais magnéticos a um campo magnético de um ímã de neodímio por 1 min e o sobrenadante foi recolhido para posterior determinação dos metais por FAAS. A capacidade máxima adsortiva - q_e (mg g^{-1}) - foi obtida de acordo com a equação 1:

$$q_e = \frac{(C_o - C_f) \cdot V}{m} \quad (1)$$

Onde C_o (mg L^{-1}) é a concentração inicial, C_f (mg L^{-1}) é a concentração analisada, V (L) é o volume da solução de analito e m (g) é a massa do sorvente. Os modelos cinéticos de equilíbrio foram realizados com métodos de ajuste não-linear, usando o *software* OriginPro 8.5, testados para avaliar cinéticas de adsorção de pseudo-primeira ordem, pseudo segunda e ordem fracionária (Avrami). Foi levado em consideração o valor do coeficiente de correlação linear (R^2) e a função de erro (F_{error}) (equação 2), que correlacionaram a quantidade teórica de analito adsorvido pelo material com o valor medido experimentalmente, considerando o número de parâmetros do modelo ajustado.

$$F_{\text{error}} = \sqrt{\left(\frac{1}{n-p}\right) \sum_i^n (q_{i,\text{exp}} - q_{i,\text{teórico}})^2} \quad (2)$$

Onde n e p são o número de experimentos e parâmetros do modelo ajustado, respectivamente; $q_{i,\text{exp}}$ é cada valor de q medido experimentalmente e $q_{i,\text{teórico}}$ é cada valor

de q previsto pelo modelo ajustado.

4.7 ESTUDO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DOS ÍONS DE Cu E Zn

O estudo de isotermas de adsorção de íons de Cu e Zn foi realizado separadamente para os CNTs_{ox.}, M-CNTs e M-RACNTs. Soluções de Cu e Zn nas concentrações de 5, 20, 50, 80, 120, 200 e 300 mg L⁻¹ e preparadas em tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ e pH 6,8 foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 10 mg de cada material. Os tubos foram agitados durante 20 min, em uma mesa de agitação horizontal e em temperatura ambiente. Logo, as soluções foram centrifugadas a 700g por 10 min e, após esse processo, os materiais magnéticos, submetidos a um campo magnético de um ímã de neodímio por 1 min. O sobrenadante foi recolhido para posterior determinação de Cu e Zn por FAAS, nas condições já citadas acima e em triplicata.

O q_e para cada material foi calculado de acordo com a equação 1.

Os dados foram ajustados de acordo com os modelos Langmuir (LANGMUIR, 1918), Freundlich (FREUNDLICH, 1906) e Sips (GHAZNAVI; FATEMI; JODA, 2012), com base no valor do R² e F_{error}.

4.8 ENSAIO EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS

Avaliou-se a capacidade de exclusão proteica do material por meio da injeção de 50 µL de uma solução de BSA 44 mg mL⁻¹ em pH 6,8 em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), (Shimadzu[®], Kyoto, Japan), sem coluna analítica, empregando uma solução tampão fosfato de sódio pH 6,8 (vazão: 1mL min⁻¹) como fase móvel. Com isso, toda BSA injetada chega ao detector e sendo monitorada em 280 nm, indicando que a área do sinal de BSA adquirida representa 100% de BSA. Com o fim de verificar a exclusão das proteínas pelos M-RACNTs, baseando-se nos ensaios de exclusão de proteínas realizados por Barbosa (2015) uma coluna contendo 60 mg do material foi fixada ao sistema no HPLC, e os mesmos 50 µL de BSA 44 mg mL⁻¹ em pH 6,8 foram injetados. O pico resultante representa quanto de BSA chegou ao detector. Para avaliar a

porcentagem de BSA excluída, basta comparar os sinais obtidos com o sinal da BSA correspondente aos 100%. O mesmo experimento foi também executado para M-CNTs.

4.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO M-RACNTs EM REETER Cu E Zn DE Cu, Zn-SOD BEM COMO DE EXCLUIR A MATRIZ PROTEICA

Com o fim de se realizar uma avaliação da capacidade de remoção dos metais Cu e Zn da enzima SOD1, uma solução em tampão fosfato (pH de 6,8) de SOD1 (Sigma) na concentração de $0,624 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada. Colocaram-se 5 ml da solução em contato com 20mg de M-RACNTs em um tubo de ensaio e este foi colocado em uma mesa de agitação horizontal Vibrax VXR (Ika[®], Staufen, Germany), em temperatura ambiente e por 24h. Após isso, o sobrenadante foi retirado com auxílio de um ímã de neodímio que retém por atração magnética as partículas de M-RACNTs. Os teores de Cu e Zn contidos nos sobrenadantes foram analisados por FAAS nas condições já citadas.

Para avaliar o teor de exclusão proteica utilizou-se um espectrofotômetro marca UV-VIS (BIOSPECTRO SP-220) para análise. Onde a mesma solução aquosa de $0,624 \text{ mg mL}^{-1}$ de Cu, Zn- SOD preparada foi estudada no comprimento de onda de 280nm. A análise da solução foi feita antes e depois de ser submetida ao processo de dSPE descrito no parágrafo anterior.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões deste trabalho são apresentados a seguir referem-se à influência do processo de oxidação nos CNTs, ao processo de síntese e caracterizações dos materiais, além de estudos de cinética e isotermas de adsorção, testes de exclusão de proteínas e a aplicação de M-RACNTs para remoção de Cu e Zn da enzima SOD1.

5.1 INFLUÊNCIA DA OXIDAÇÃO NA ADSORÇÃO DE Cu E Zn EM CNTs

Os CNTs foram modificados quimicamente para aumentar sua capacidade de adsorção. Sabe-se que, para adsorção de metais, o principal procedimento de modificação é a oxidação com ácido nítrico (GOMES, 2016). Assim, as capacidades de adsorção para Cu e Zn foram avaliadas para os CNTs não modificados e oxidados (CNTs_{ox}).

Os CNTs_{ox} apresentaram capacidades de adsorção de cerca de 15 e de 20% maiores do que para CNTs não modificados, respectivamente, para Cu e Zn. Conforme os dados da tabela 1. Esta melhor performance dos CNTs_{ox} pode ser atribuída à presença de grupos funcionais contendo oxigênio, como carboxílico, hidroxílico, lactonas e fenol (GOMES, 2016). Já o mecanismo de adsorção pode ser atribuído às interações químicas e eletrostáticas entre os íons metálicos e os CNTs_{ox} (VIEIRA et al., 2007).

Tabela 1- Parâmetros de isotermas de Zn e Cu adsorvidos em CNTs e CNTox.

Material	Langmuir		Freundlich		Sips				
	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu			
CNTs	Qo	73,15	85,67	Kf	67,652	81,03	Qs	85,94	76,45
	R ²	0,935053	0,94492	R ²	0,89889	0,80902	R ²	0,96547	0,97785
	F _{error}	0,5305	7,711	F _{error}	4,224	10,825	F _{error}	10,2	3,882
	b	1,528919	0,119,2	n	0,04575	0,0326	Ks	0,442131	1,79054
						ms	1,59646	1,94064	
CNTox	Qo	89,392	94,85	Kf	88,328	79,144	Qs	90,88	83,41
	R ²	0,90795	0,9685	R ²	0,96699	0,84003	R ²	0,96158	0,97962
	F _{error}	1,1887	4,0901	F _{error}	4,864	9,061	F _{error}	1,383	6,707
	B	0,096561	0,047197	n	0,00322	0,02461	Ks	0,066643	0,12741
						ms	1,40488	1,40998	

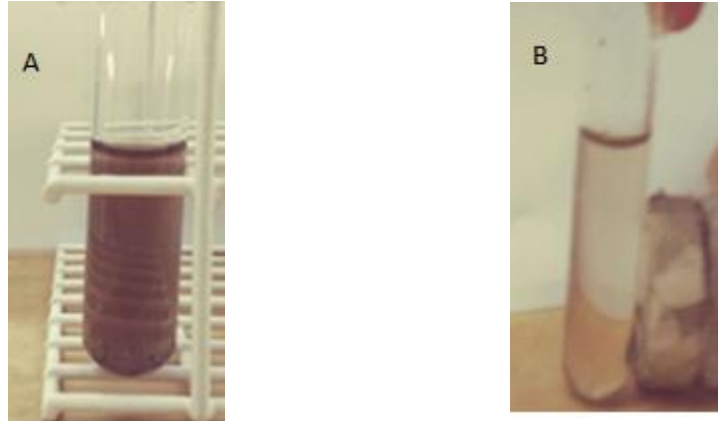
Fonte: Do autor.

Nota: As equações $q_e = Q_o b C_e / (1 + b C_e)$, $q_e = k_f C_e^{1/n}$, $q_e = (Q_o K_s C_e^{1/m_s}) / (1 + k_s C_e^{1/m_s})$ foram utilizados para ajustar os dados aos modelos de Langmuir, Freundlich e Sips, respectivamente. Qo: capacidade de saturação teórica; b: constante de afinidade de Langmuir; R₂: coeficiente de relação; F_{error}: função erro; K_F e n: constante e expoente do modelo de Freundlich, respectivamente; K_s e m_s: constante e expoente do modelo de Sips, respectivamente.

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

A Figura 7 apresenta a fotografia de um tubo contendo uma suspensão de M-RACNTs sem e com aplicação do campo magnético. Como pode ser visto, as partículas são atraídas pelo campo, tornando a solução mais límpida.

Figura 7 - M-RACNTs em suspensão (A) e M-RACNTs sob influência de um campo magnético produzido por ímãs (B).

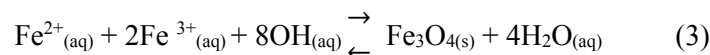


Fonte: Do autor.

Por meio da síntese de coprecipitação, nas condições citadas na Metodologia, pode-se obter: Fe_3O_4 (magnetita), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita), $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematita) e $\alpha\text{-FeO}$ (OH) (goethita). Segundo Perez et al. (1998), são considerados magnéticos somente a magnetita e maghemita (GUPTA; AGARWAL; SALEH, 2011). E a maghemita é a forma alotrópica de magnetita (SUN et al., 2004).

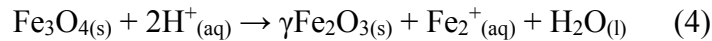
A principal diferença entre a maghemita e magnetita é a presença somente íons férricos na primeira e de íons ferrosos e férricos na segunda. Com isso, há uma maior estabilidade da maghemita, porém as propriedades magnéticas da magnetita são superiores, já que, em condições ambientais, não é possível mais oxidar o ferro (KIM; TANNENBAUM, 2011).

Nesse método, a obtenção de partículas de Fe_3O_4 a partir de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em solução ácida em meio aquoso e se inicia com a adição NH_4OH , para aumentar o pH da solução entre 8 e 14 (GUPTA; AGARWAL; SALEH; 2011). Normalmente, a relação molar recomendada para os cátions de Fe^{3+} e Fe^{2+} é de 2:1, respectivamente (KEKKONEN et al., 2009) conforme é possível observar na Equação (3).



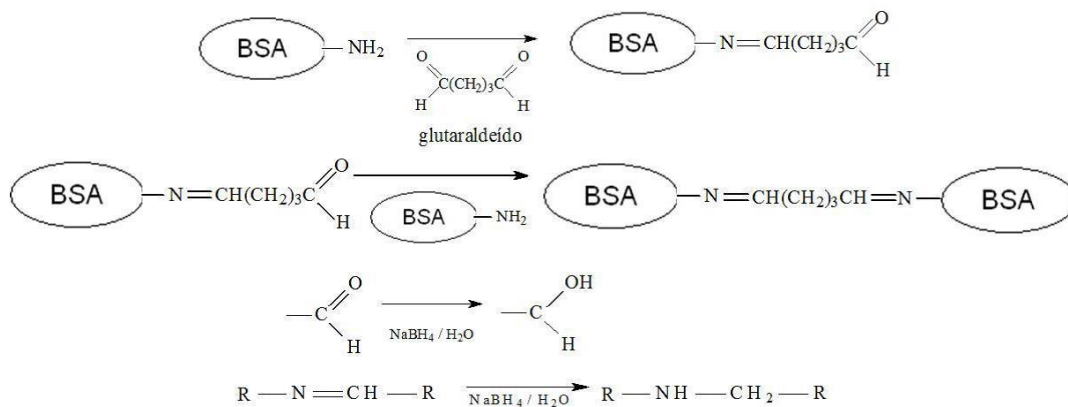
Em decorrência da instabilidade da magnetita (Fe_3O_4) na presença de O_2 , faz-se necessário um maior controle dos parâmetros de síntese. Por isso, a solução contendo Fe_3O_4 é mantida sob condições de atmosfera inerte de N_2 , as superfícies dos íons Fe^{2+} são desorvidas como complexos hexa-aquo e por outro lado, em condições alcalinas devido ao NH_4OH , o

processo de oxidação da magnetita pode ocorrer de forma mais controlada dado pelas reações de redução-oxidação da superfície de Fe_3O_4 . Portanto, a adição do NH_4OH que realizará a oxidação, obtendo, ao fim, a maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$). Assim, tem-se um material mais puro (FRANQUI, 2015), conforme a equação 4:



A Figura 8 ilustra como ocorre a reação de formação do recobrimento de BSA nos materiais. Em decorrência do entrecruzamento de grupos amina da BSA com o glutaraldeído, o qual atua como um reagente de ligação cruzada, a camada de BSA é fixada na superfície dos materiais. Dessa reação, são resultantes grupamentos imina que são altamente instáveis. Com o propósito da redução dos grupamentos aldeídos, o boroidreto de sódio foi empregado, uma vez que é capaz de reduzi-los em grupamentos aminas, proporcionando, assim, maior estabilidade para a camada de BSA (BARBOSA, 2015).

Figura 8 - Ilustração da reação de entrecruzamento da BSA na formação do recobrimento sobre os CNTs CNTs_{ox} .



Fonte: MENEZES; FELIX (1998).

Com o término desses procedimentos, os M-RACNTs foram obtidos. Estes podem ser considerados basicamente CNTs oxidados com HNO_3 , cobertos com partículas de maghemita e ainda revestidos com uma camada de BSA entrecruzada. Devido às características de cada processo de síntese descrito e da presença da camada de BSA, é possível que sejam utilizados para excluir proteínas, adsorvendo nos CNTs_{ox} somente os analitos de interesse contidos na matriz proteica. Uma simples separação do sobrenadante proteico resultante por meio de

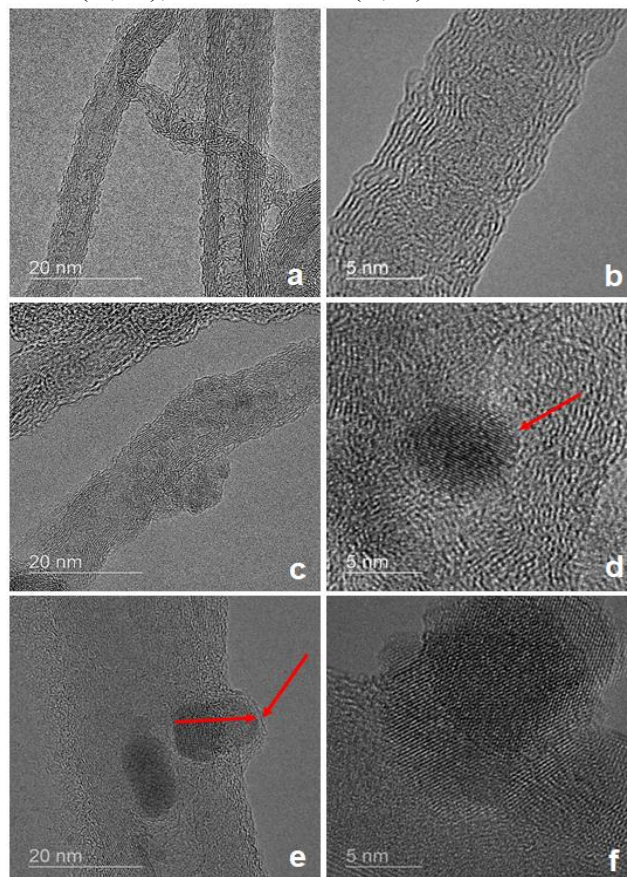
aplicação de um campo magnético que interage diretamente com as nanopartículas magnéticas, pode retirar o sobrenadante sem nenhum vestígio do material adsorvente.

As Figuras 9A e 9B representam as micrografias eletrônicas de transmissão para CNTs_{ox}. Com elas, é possível perceber defeitos nas paredes dos CNTs, decorrentes do processo de oxidação com HNO₃ concentrado. Em tais pontos, grupos carbonilas e hidroxilas, que podem ser desprotonados a fim de realizar a adsorção de metais em determinados valores de pH, são formados.

Nas Figuras 9C e 9D, nota-se que foi efetuada a síntese dos M-CNTs e, na superfície dos CNTs, depositaram-se nanopartículas magnéticas de Fe₂O₃. Por meio da Figura 9D, percebe-se uma nanopartícula de Fe₂O₃ na parede dos CNTs. Ainda é possível observar o tamanho reduzido e o formato aproximadamente esférico dessas nanopartículas.

Os M-RACNTs podem ser vistos nas Figuras 9E e 9F. Por meio da Figura 9E, é possível verificar a camada formada de BSA na nanopartícula de Fe₂O₃ depositada sobre os CNTs. Esse fato faz com que a densidade dos átomos em relação aos CNTs seja aumentada, o que restringe a passagem de elétrons pelo material e dificulta a visualização das multicamadas dos CNTs.

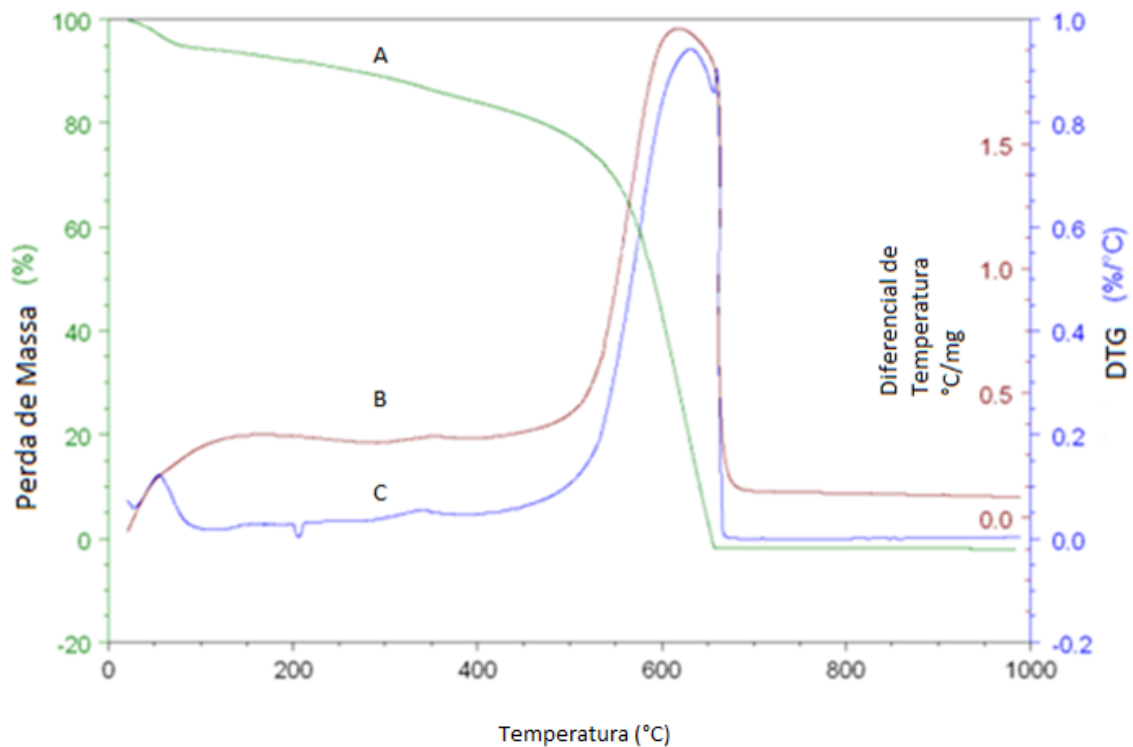
Figura 9 - Micrografias eletrônicas de transmissão para as amostras CNTs_{ox}. (A; B), M-CNTs (C; D), M- RACNTs (E; F).



Fonte: Do autor.

A análise termogravimétrica da amostra CNTs_{ox}. (FIGURA 10) evidencia que a perda de massa mais significativa ocorreu em 632,40 °C (curva **b** DTG na Figura 10 em destaque), em que se consumiu cerca de 80% do material (curva A). No entanto, como se sabe, a perda de massa menor, aproximadamente 20%, no segundo estágio da curva, é decorrente do processo de funcionalização dos CNTs, referindo-se aos CNTs_{ox}. ou com defeitos influenciados pelo tratamento ácido ou por carbono amorfo na amostra (GOMES, 2016).

Figura 10 - Curvas de perda de massa (A), diferença de temperatura (B) e (C) DTG para CNTs_{ox}. com atmosfera de ar sintético.



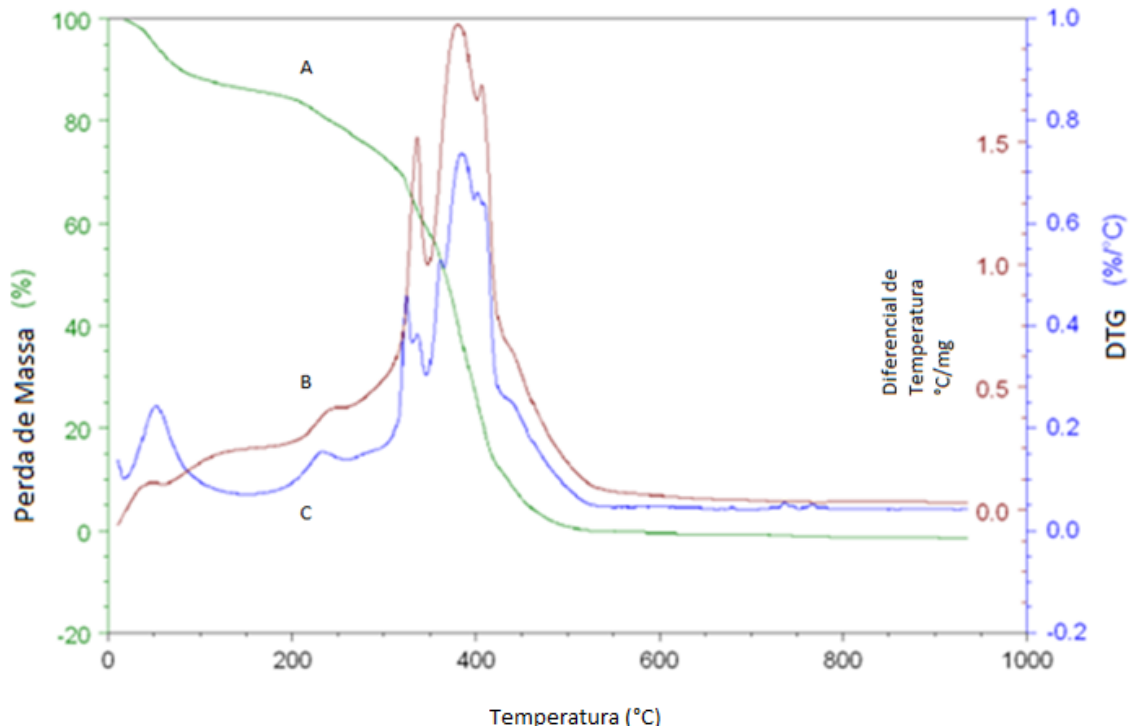
Fonte:Do autor.

A curva de TG da amostra dos M-CNTs (FIGURA 11) demonstra que a perda de massa mais significativa ocorreu em 390,32 °C (curva **(b)** DTG na Figura 11 em destaque), em que se consumiu cerca de 60% do material. No entanto, como é de conhecimento (MÁRQUEZ et al., 2011), a perda de cerca de 10% de massa menor no primeiro estágio da curva decorre, ao que se supõe, da perda de água, possivelmente absorvida pelo Fe₂O₃, característico das nanopartículas magnéticas.

Em 400 °C, aproximadamente, ocorre o processo de decomposição dos óxidos de ferro

correspondentes às nanopartículas magnéticas, contudo o valor está abaixo do esperado para a faixa de temperatura quando avaliadas separadamente, conforme indicou Franqui (2015). Essa maior decomposição, em tal faixa de temperatura, pode estar relacionada com a sua dispersão por meio das paredes dos CNTs.

Figura 11 - Curvas de perda de massa (A), diferença de temperatura (B) e (C) DTG para M- CNTs com atmosfera de ar sintético.

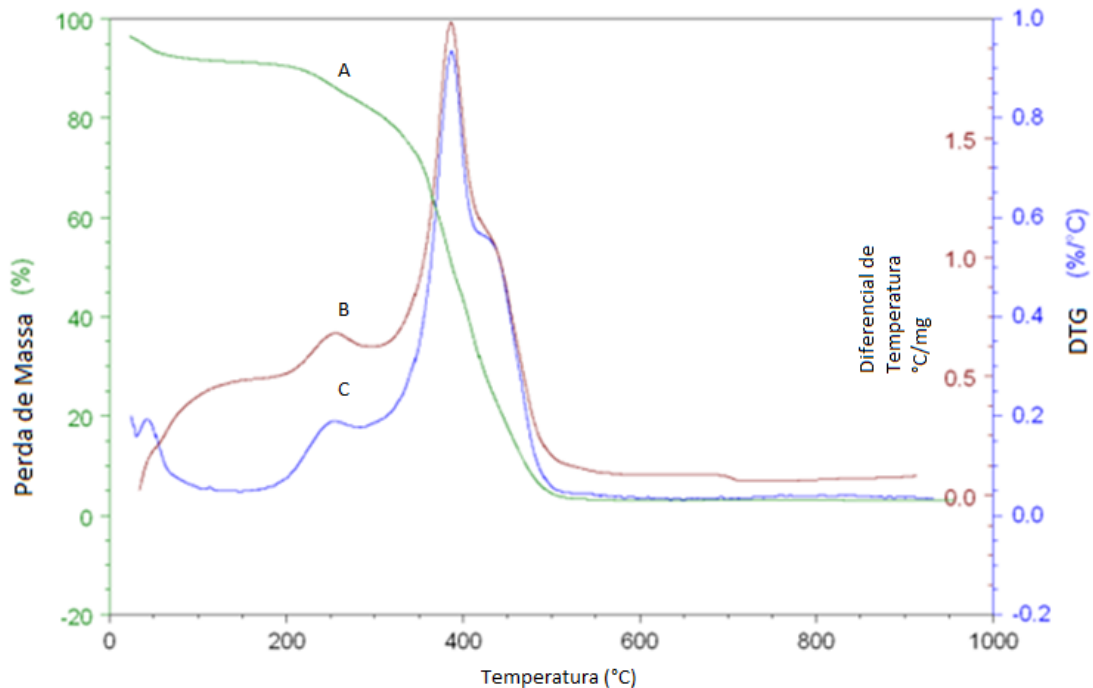


Fonte: Do autor.

Segundo a curva de TG da amostra desses CNTs (FIGURA 12), a perda de massa mais significativa ocorreu em 400,40 °C (curva **(b)** DTG na Figura 12 em destaque), em que se consumiu, aproximadamente, 60% do material (curva A).

Entretanto, é sabido que a perda de massa, cerca de 20%, no segundo estágio da curva, está relacionada à BSA empregada para o recobrimento que ocorre em 240 °C aproximadamente (MÁRQUEZ et al., 2011). Em cerca de 400 °C ocorre o processo de decomposição dos óxidos de ferro correspondentes as nanopartículas magnéticas, mas, como já citado, o valor está abaixo do esperado para a faixa de temperatura (FRANQUI, 2015).

Figura 12 - Curvas de perda de massa (A), diferença de temperatura (B) e (C) DTG para M-RACNTs com atmosfera de ar sintético.



Fonte: Do autor.

Os espectros de infravermelho dos materiais, CNT_{Sox}, M-CNTs e M-RACNTs estão representados na Figura 13.

Devido ao processo de funcionalização e a consequente existência de grupos funcionais polares na superfície dos CNTs, provavelmente as bandas encontradas entre 1750-1730 cm⁻¹ dizem respeito à carboxila (C=O), bem como as bandas em aproximadamente 1630 cm⁻¹.

Tem-se também estiramento de ligação C-H em 1400 cm⁻¹. Atribui-se ao estiramento da ligação O-H provavelmente de água ou álcool adsorvida nas amostras, consequência dos processos de síntese e de lavagem do material, a banda entre 3200 e 3550 cm⁻¹ (KIM et al., 2005; GOMES, 2016). Vê-se com visibilidade é a banda de back-ground típica do CO₂ em, aproximadamente, 2300 cm⁻¹.

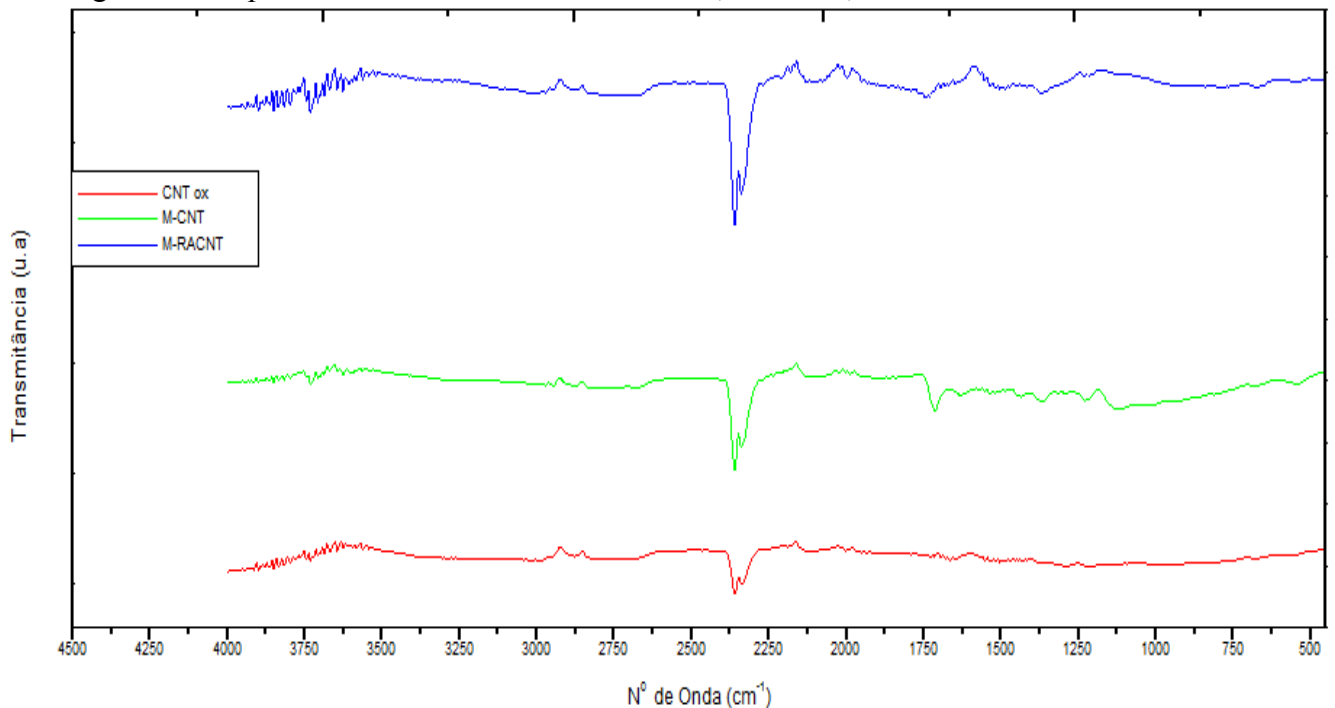
No caso dos M-RACNTs e também dos M-CNTs, há estiramento da ligação O-H (banda entre 3200 e 3550 cm⁻¹) provavelmente de água ou álcool adsorvida nas amostras como consequência dos processos de síntese e lavagem do material (KIM et al., 2005; GOMES, 2016). Assim como a banda de back-ground típica do CO₂ em, aproximadamente, 2300 cm⁻¹. Também foram encontradas bandas, tanto nos M-CNTs como nos M-RACNTs, em 1700 cm⁻¹ correspondentes a C=O e também bandas de 1300 - 1000cm⁻¹ que podem sugerir a presença de C-O.

Entretanto, nos M-RACNTs, têm-se bandas que confirmam a presença da BSA, sendo estas em 1200cm^{-1} , correspondente a amidas III. Há uma banda de estiramento de ligação C-N em 1100cm^{-1} e a banda próxima de 1650cm^{-1} representa a banda de amida I, com contribuição forte de estiramento de ligação C=O. Ainda, de acordo com a literatura, a região entre 1150 e 1000cm^{-1} presente na BSA está associada aos grupos laterais dos aminoácidos (SILVERSTEIN et al., 2014; GOMES 2016).

No entanto, após o entrecruzamento da BSA pelo agente de ligação cruzada (glutaraldeído), realizado para efetuar o recobrimento do material, a diminuição de intensidade das bandas responsáveis pelas ligações entre N-H é conhecida e relatada por Gomes (2016) e Barbosa (2015). Isso porque a reação com o glutaraldeído produz grupamentos iminas C=N, e podem ser evidenciados por fracas bandas entre 1650 - 1690cm^{-1} , indicando a confirmação da reação intermolecular dos grupos carbonilas do glutaraldeído com os grupos amins da BSA.

Em, aproximadamente, 487cm^{-1} , percebeu-se a existência de uma pequena banda de absorção que pode indicar os estiramentos de ligação de Fe e O, que, segundo Márquez et al. (2011), relaciona-se à deformação da maghemita. Assim, de forma específica, das ligações Fe-O octaédricos e tetraédricos. Portanto, confirmando a presença das nanopartículas magnéticas.

Figura 13 - Espectros no IV dos materiais: $\text{CNT}_{\text{S}_{\text{ox}}}$, M-CNTs, M-RACNTs.

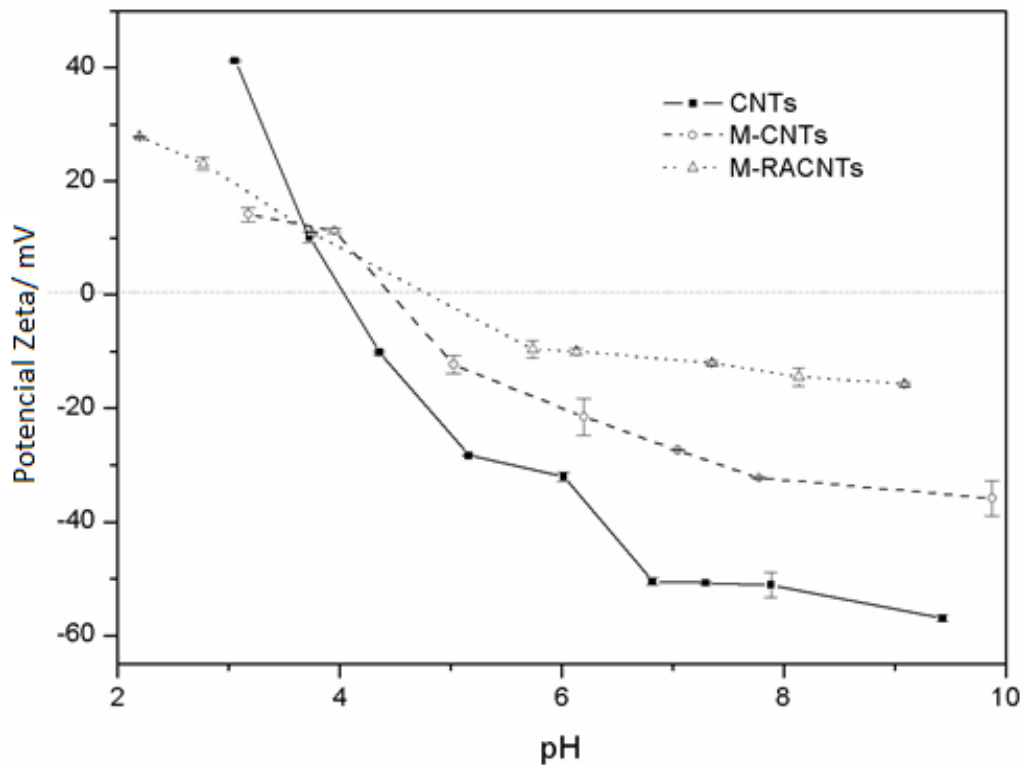


Fonte: Do autor.

Os estudos de potencial zeta das amostras foram efetuados a fim de se verificar o pI do

material. Com eles, é possível obter dados relacionados às interações de grupos funcionais fixados à superfície dos materiais, conforme a Figura 14 abaixo:

Figura 14 - Mudança do potencial zeta x pH dos CNTs_{ox.}, M-CNTs e M-RACNTs.



Fonte: Do autor.

O potencial zeta é utilizado como um parâmetro com o fim de se realizar a análise da estabilidade de uma suspensão coloidal e de se obter a carga eletrostática da superfície de uma partícula em suspensão. Se esta for alta, a tendência é a da repulsão das partículas que não se agregam e, por isso, mantêm-se estáveis (HUNTER, 1988).

O valor encontrado de pI dos CNTs_{ox.} foi de 4,0. Ressalta-se que o pI dos CNTs não oxidados varia de uma faixa de 5 a até 8, de acordo com Batiston (2012). Portanto, percebe-se um acréscimo de grupos funcionais ácidos nas paredes do material, decorrente da funcionalização com o ácido nítrico concentrado 65% v/v.

Os pIs dos M-CNTs e dos M-RACNTs foram de 4,45 e 4,8, respectivamente. Segundo a literatura (FERREIRA, 2009), é conhecido que a BSA apresenta pI entre 4,70 e -5,60, justificando a elevação do pI dos M-RACNTs, ao se comparar com os CNTs_{ox.}, ratificando a existência da camada de BSA no material.

Assim, de modo geral, os procedimentos têm uma primeira região, em que há um excesso de cargas positivas, ocorrendo, assim, repulsão eletrostática entre cargas positivas da superfície e da solução. Na região do pI, acontece a neutralização das cargas, em que as cargas na superfície do material e solução foram neutralizadas. Na última região, há um excesso de hidroxilas (OH⁻) em solução devido à adição de NaOH, o que ocorre também na superfície do material. Dessa maneira, carrega-se negativamente a superfície do material, sendo necessária, para a sua neutralização, uma concentração alta de H⁺ ou um pH baixo (MATOS, 2016).

Abaixo do pI, para todos os materiais, teve-se os potenciais zeta positivos, enquanto que, acima do pI, eles foram negativos. Esse resultado indica que uma melhor exclusão de proteínas ocorre em pH acima do pI porque favorece a repulsão eletrostática entre as proteínas da amostra e da camada de BSA presente nos M-RACNTs.

Por esse motivo, o pH 6,8 foi escolhido para realizar os testes de cinéticas e de isotermas de adsorção. Os valores de pH mais elevados não foram testados devido ao risco da BSA ser desnaturada.

5.3 ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO

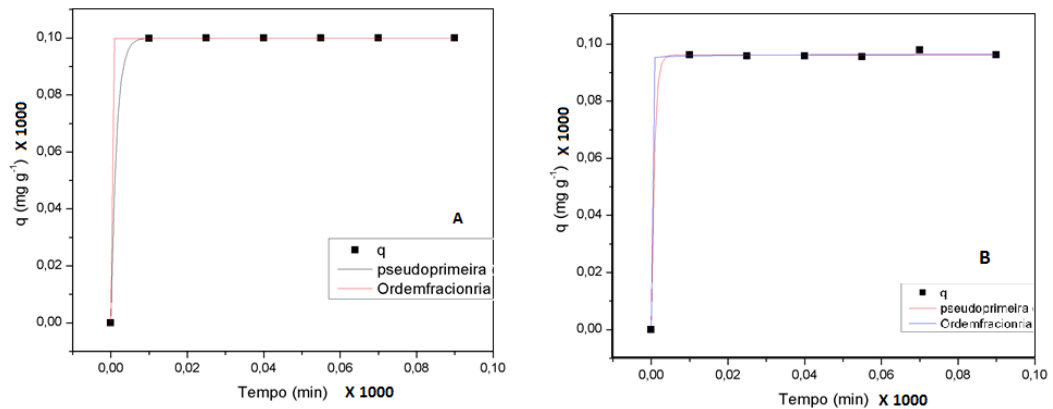
Os modelos cinéticos foram montados empregando-se métodos não lineares e os valores de q_e calculados a partir dos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e de ordem fracionária.

O estudo de cinética de adsorção de íons Cu²⁺ e Zn²⁺ nos materiais foi realizado com uma concentração de 10 mg L⁻¹ do metal em questão e 10 mg de cada material, variando a agitação em um intervalo de tempo de 10 até 90 min. O procedimento foi realizado com o objetivo de determinar o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção de cada metal nos diversos tipos de CNTs empregados. É importante ressaltar que a adsorção, tanto de Cu²⁺ quanto de Zn²⁺, atingiu um equilíbrio em, aproximadamente, 10 min, conforme demonstrado nas Figuras 9, 10 e 11. Utilizou-se a técnica de FAAS na determinação dos íons e notou-se que grande parte da adsorção ocorreu no início do processo, pois as concentrações de sobrenadantes mensurados obtiveram “ q_e ” (quantidade adsorvida) aproximadamente igual à concentração inicial de 10mg L⁻¹, mantendo-se constante ao longo do tempo de agitação.

O ensaio possibilitou a comparação e a avaliação dos três modelos a fim de identificar o que se ajustava melhor aos dados obtidos. Tal processo teve por base a comparação dos

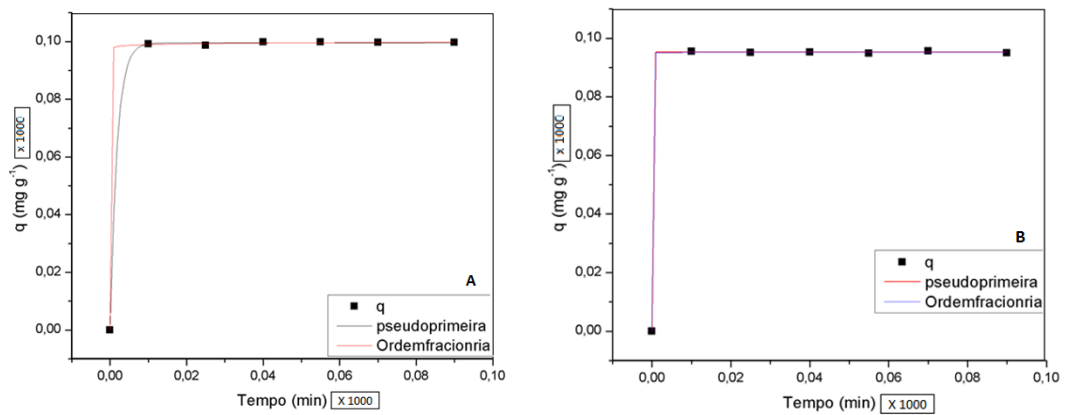
valores de R^2 (coeficiente de correlação) e também a função erro (F_{error}). Assim, ressalta-se que o melhor ajuste é obtido com um maior valor de R^2 e um menor valor para F_{error} .

Figura 15 - Efeito do tempo de agitação de íons Cu (A) e Zn (B) 10 mg L^{-1} , pH 6,8, 25°C nos CNTs_{ox} .



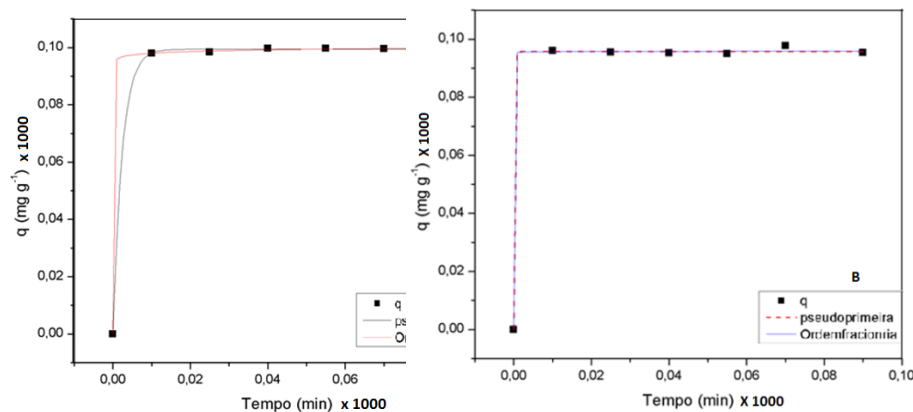
Fonte: Do autor.

Figura 16 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) 10 mg L^{-1} , pH 6,8, 25°C nos M-CNTs.



Fonte: Do autor.

Figura 17 - Efeito do tempo de agitação na adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) 10 mg L⁻¹, pH 6,8, 25° C nos M-RACNTs.



Do autor.

Fonte:

No que concerne ao estudo de Cu nos materiais adsorventes (FIGURAS 15A, 16A e 17A), ao se aplicar os modelos de cinética de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e de ordem fracionária, evidenciou-se um R² maior e uma F_{error} menor nos modelos de cinética de pseudo-segunda (TABELA 1), podendo concluir que este o modelo que se adaptou melhor ao experimento.

Ao se aplicar os mesmos modelos de cinética para avaliação de Zn nos materiais produzidos (FIGURAS 15B, 16B e 17B), o modelo da cinética pseudo-segunda ordem também foi o que forneceu o melhor ajuste.

Os estudos de Barbosa et al. (2015) obtiveram, para Cd⁺², tempo de equilíbrio igual a 10 min, ao passo que, para Gomes (2016), o tempo foi de 20 min para adsorção de íons de ferro. Um comportamento parecido também registraram Dong et al. (2010), em que foi empregada, para adsorção de Pb⁺², a magnetita funcionalizada com hidroxiapatita. Assim como, Zargoosh et al. (2013), utilizando o mesmo procedimento, tiveram o equilíbrio cinético com 25 minutos. Tais estudos evidenciaram que a influência por parte da natureza do metal para o tempo de equilíbrio da adsorção é mínima, visto que os resultados foram semelhantes para todos os metais estudados até o momento.

No que diz respeito à representação da cinética de adsorção pelo modelo de pseudo-segunda ordem, a adsorção química é o mecanismo que predomina no processo, compreendendo, entre o adsorvato e adsorvente, doação ou permuta de elétrons (HO; MCKAY, 2000). Além disso, diferente do modelo de pseudo-primeira ordem que se aplica a apenas estágios iniciais de adsorção, o modelo de pseudo-segunda ordem abrange toda a faixa de estudo. (HO; MCKAY, 2000).

Isso indica que, no início do processo, a adsorção ocorreu, provavelmente, de forma rápida e pode ser explicada por dois aspectos, a saber, pelo número de sítios ativos de

adsorventes e pela concentração de metais disponíveis na solução que é máxima no início do experimento, ou ainda que a competição para os sítios de adsorção de superfície é pequena em relação a baixas concentrações de analitos utilizadas, revelando um perfil de adsorção em monocamada, no entanto, no que diz respeito a concentrações mais altas, a competição para sítios ativos de superfície será mais elevada.

Além disso, há o processo de agitação proporciona a energia necessária para dispor os íons de metais da solução nos locais ativos do adsorvente.

Os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem assumem que a diferença entre a concentração da fase sólida em qualquer tempo e a concentração da fase sólida no equilíbrio é a força motriz da adsorção, e a taxa de adsorção, no caso da equação de pseudo-segunda ordem, é o quadrado da força motriz (HO; MCKAY, 1998). Isto explica porque no início do processo a adsorção ocorre rapidamente, pois a diferença de concentração entre a fase sólida no início do processo e no equilíbrio é bastante grande.

Portanto, isso justifica as capacidades finais de adsorção dos metais que, com concentrações iniciais de 10 mg L^{-1} , levaram os materiais a atingirem praticamente 100 mg.g^{-1} . Isso caracteriza o processo de adsorção como rápido, eficiente e total entre o sólido (adsorvente) e o líquido (adsorvato). Segundo Di et al. (2006), no tocante à adsorção de metais em CNTs, ressalta-se que ocorre, principalmente, com os grupos funcionais de superfície dos CNTs por meio de complexação química.

É necessário apontar que a adsorção de metais nos CNTs é influenciada pelo pH, assim como evidenciou Gomes (2016). Dessa forma, o pH utilizado deveria ser maximizado entre 6 e 7, o que levou ao ajuste do pH em 6,8, com tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , além de se tratar do pH fisiológico sanguíneo, simulando, então, o pH em que se encontra a SOD1.

Ao estabelecer uma comparação entre os valores de q_e experimental tanto nos experimentos com o Zn como os com o Cu, foi possível notar que, embora o modelo fracionário de Avrami presente, em alguns casos, a melhor correlação, com o fator de determinação (R^2) um pouco maior, o modelo de pseudo-segunda ordem evidenciou, em todos os casos, menor função de erro (F_{error}), conforme exposto na Tabela 1. Assim, os valores de q foram absolutamente mais próximos aos valores obtidos experimentalmente.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos da adsorção de Zn e Cu para os adsorventes e seus respectivos erros.

Material	Parametros	Pseudo-primeira ordem		Pseudo-segunda ordem		Ordem Fracionaria	
		Zn	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu
CNTs _{Sox.}	q _e (mg g ⁻¹)	96,103	98,422	96,103	98,422	96,103	98,905
	R ²	0,9991	0,9999	0,9999	0,9999	0,9992	0,8066
	F _{error}	0,4491	0,0812	3,78815x10 ⁻⁸	0,0971	0,4099	0,4375
	K	18,869	18,879	2,85141x10 ³⁵	2,29879 x10 ¹⁴	1,0	1,0
	n _{av}	-	-	-	-	1,0	1,0
M-CNTs	q _e (mg g ⁻¹)	95,218	99,740	95,218	99,470	95,686	99,9592
	R ²	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,8066	0,8066
	F _{error}	0,12548	0,24212	3,18481 x10 ⁻⁸	0,19135	0,42327	0,44217
	K	18,444	0,128	318139,41	19,35118	1,0	1,0
	n _{av}	-	-	-	-	1,0	1,0
M-RACNTs	q _e (mg g ⁻¹)	95,797	99,16961	95,79714	99,87895	95,79787	99,34156
	R ²	0,99919	0,99958	0,99919	0,99991	0,99933	0,94307
	F _{error}	0,41973	0,31321	0,59131	0,22593	0,38323	0,2444
	K	18,75177	19,31148	4,72616x10 ⁹	0,04839	1	1
	n _{av}	-	-	-	-	1	1

Fonte: Do autor.

Nota: As equações $q_t = q_e[1 - \exp(-kt)]$; $q_t = \frac{K \cdot q_e^2 \cdot t}{1 + q_e \cdot k \cdot t}$ e $q_t = q_e\{1 - \exp[-(kt)]^{n_{AV}}\}$ foram utilizados para ajustar os dados aos modelos de pseudo-primeira, pseudo-segunda ordem e ordem fracionária, respectivamente. q_t : quantidade de analito adsorvido no tempo t ; q_e : quantidade de analito adsorvido em equilíbrio por grama de material; t : tempo de contato; k : constante de velocidade de pseudo-primeira ou constante de velocidade de pseudo-segunda ordem ou constante cinética de Avrami. e n_{av} : reação de ordem fracionária (Avrami) relacionada ao mecanismo de adsorção; R^2 : coeficiente de correlação; F_{error} : função erro.

Vale ressaltar que o valor de R^2 avalia as diferenças associadas a cada ponto individual em relação à média, ou seja, trata-se de uma medida descritiva da qualidade do ajuste obtido. Já a F_{error} é responsável por comparar cada ponto, correlacionando, assim, o modelo teórico aos dados experimentais. Quanto menor for esse valor, melhor é a adequação dos dados e o modelo para descrever o comportamento do experimento. Ou seja, a diferença entre a capacidade adsorptiva calculada pelo modelo e o valor obtido experimentalmente é menor.

5.4 ESTUDOS DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

No que diz respeito à análise de isotermas de adsorção de íons Cu^{2+} e Zn^{2+} , aplicaram-

se 10 mL de solução desses íons, com uma faixa de concentração de 5 - 300 mg L⁻¹ e tempo fixado em 20 min de agitação, baseado nos tempos de equilíbrios encontrados no estudo de cinética apresentado anteriormente.

Foi aplicado o modelo de isoterma de Langmuir (equação 5) que se fundamenta no fato de que um número determinado de sítios adsorve quimicamente os adsorvatos. No que concerne aos sítios, são energeticamente equivalentes, não permitindo a interação entre as espécies adsorvidas, além de reter somente uma única espécie adsorvente.

A equação desse modelo representa-se da seguinte forma:

$$q_e = \frac{Q_0 \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (5)$$

Onde C_e diz respeito à concentração do adsorvato na solução após o sistema atingir o equilíbrio (mg L⁻¹); K_L, à constante de equilíbrio de adsorção de Langmuir (L mg⁻¹) e q_{máx}, à capacidade máxima de adsorção do material (mg g⁻¹), adquirindo, por sua vez, uma monocamada do adsorvato sobre o adsorvente.

Também se empregou o modelo de isoterma de Freundlich (equação 6) o qual evidencia que, por meio da concentração de adsorvato, a do adsorvato na superfície do adsorvente aumenta de forma infinita. Em relação as suas aplicações teóricas, pode-se afirmar que tal comportamento é amplamente aplicado a sistemas heterogêneos. O modelo acompanha um comportamento exponencial representado pela equação:

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n_F} \quad (6)$$

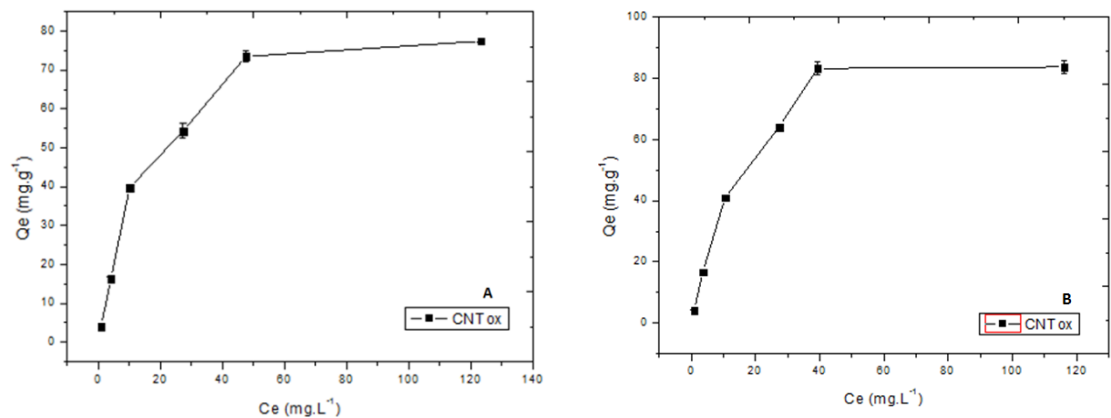
Onde K_F faz referência à constante de Freundlich que se relaciona à capacidade de adsorção [mg g⁻¹ (mg L⁻¹)^{-1/n_F}] e n_F, ao expoente de Freundlich (adimensional).

Finalmente, também foi aplicado o modelo de Sips (equação 7) que é uma combinação dos dois modelos anteriores de isotermas, representado pela equação:

$$q_e = \frac{Q_0 \cdot K_S \cdot C_e^{1/n_S}}{1 + K_S \cdot C_e^{1/n_S}} \quad (7)$$

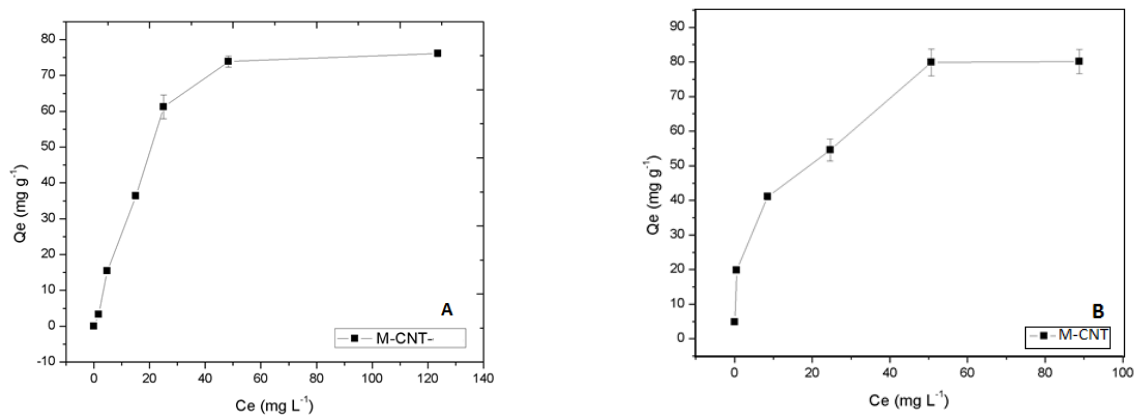
Onde K_S diz respeito à constante de equilíbrio de adsorção de Sips (mg L^{-1})^{-1/n_s}, q_{max} , à capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1}) e n_s , ao expoente de Sips (adimensional). Este modelo, em baixas concentrações de adsorvato, adquire a forma de Freundlich; ao passo que, em concentrações altas, assume a forma de adsorção de Langmuir em monocamadas. Com isso, como evidenciado nas Figuras 18, 19 e 20, têm-se os resultados de em função de C_e .

Figura 18 - Comportamento da adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) a 10 mg L^{-1} , pH 6,8, 25° C , nos CNTs_{ox}.



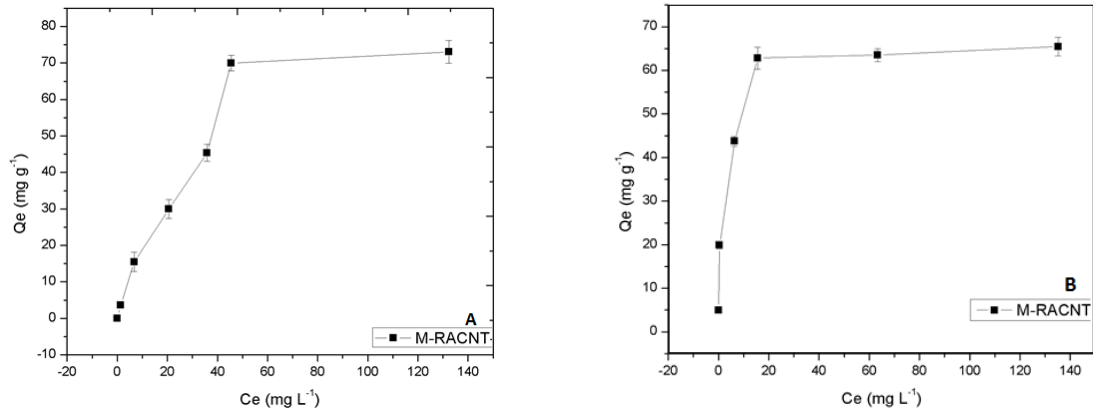
Fonte: Do autor.

Figura 19 - Comportamento da adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) a 10 mg L^{-1} , pH 6,8, 25° C , nos M-CNTs.



Fonte: Do autor.

Figura 20 - Comportamento da adsorção de íons Cu (A) e Zn (B) a 10 mg L^{-1} , pH 6,8, 25° C , nos M-RACNTs.



Fonte: Do autor.

Como é possível notar por meio dos gráficos de comportamento da adsorção de íons (FIGURAS 18, 19 e 20) devido à elevada concentração do analito na solução, houve uma primeira fase de adsorção com rápido processamento, o que indica uma alta taxa de transporte de massa. Ademais, ocorreu uma segunda etapa de adsorção na qual, visivelmente, há uma inclinação menor, significando que o adsorbato apresenta uma grande dificuldade para chegar aos sítios ativos, o que retarda a saturação do material, ou seja, o alcance do equilíbrio é estritamente dependente desse estágio. Ainda se pode perceber uma terceira etapa de adsorção em que, mesmo aumentando as concentrações do analito, não há alterações nas concentrações finais de analitos adsorvidos, considerando, então, tal etapa como uma fase de equilíbrio (WU; TSENG; JUANG, 2009).

No caso das isotermas de modelos não lineares de Langmuir, Freundlich e Sips para Cu e Zn nos adsorventes, conforme a Tabela 2, obtiveram-se, para os todos os materiais, os melhores ajustes pelo modelo de Sips que é intermediário entre Langmuir e Freundlich. Tal modelo matemático minimiza algumas das desvantagens dos outros dois. Para citar um exemplo, tem-se a restrição da isoterma de Freundlich em relação à aplicação com solutos em baixas concentrações, a qual não se apresenta no modelo de Sips (GHAZNAVI; FATEMI; JODA, 2012). Os dados estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 3 - Parâmetros das isotermas de Zn e Cu adsorvidos nos materiais.

Material	Modelo								
	Langmuir			Freundlich			Sips		
		Zn	Cu		Zn	Cu		Zn	Cu
CNTs _{ox.}	Q _o	99,6254	88,8419	K _f	17,2377	15,0789	Q _o	90,3041	84,1843
	R ²	0,96872	0,98087	R ²	0,82611	0,87252	R ²	0,97335	0,97748
	F _{error}	7,96266	5,23164	F _{error}	6,67646	5,0009	F _{error}	0,80378	0,80453
	B	0,07111	0,06977	n	0,74937	2,75789	K _s	0,03779	0,0553
						m _s	1,33809	1,14251	
M-CNTs	Q _o	89,392	94,3644	K _f	22,104	12,7486	Q _o	16,11431	82,2694
	R ²	0,89844	0,96331	R ²	0,94235	0,82304	R ²	0,93678	0,98103
	F _{error}	12,7	8,76097	F _{error}	4,41643	5,4923	F _{error}	15,23231	0,56964
	B	0,10131	0,0503	n	3,31258	2,51468	K _s	0,14351	0,01676
						m _s	0,44711	1,4978	
M-RACNTs	Q _o	64,38033	92,144	K _f	28,2568	9,1806	Q _o	70,1441	78,8221
	R ²	0,95156	0,90732	R ²	0,83978	0,81594	R ²	0,96628	0,89556
	F _{error}	3,69932	16,7864 1,0	F _{error}	5,82924	4,75685	F _{error}	0,65117	1,63165
	B	0,69139	0,03177	n	5,1446	2,27342	K _s	0,63877	0,00919
						m _s	0,68681	1,47898	

Fonte: Do autor.

Nota: As equações $q_e = Q_o b C_e / (1 + b C_e)$, $q_e = k_f C_e^{1/n}$, $q_e = (Q_o K_s C_e^{1/m_s}) / (1 + k_s C_e^{1/m_s})$ foram utilizados para ajustar os dados aos modelos de Langmuir, Freundlich e Sips, respectivamente. Q_o: capacidade de saturação teórica; b: constante de afinidade de Langmuir; R₂: coeficiente de relação; F_{error}: função erro; K_F e n: constante e expoente do modelo de Freundlich, respectivamente; K_s e m_s: constante e expoente do modelo de Sips, respectivamente.

Ao seguir o modelo de Sips no material revestido (M-RACNTs), evidencia-se, pelos resultados, que a capacidade máxima adsorptiva para Zn foi de 70,144 mg g⁻¹. Já para Cu, seguindo o modelo de melhor ajuste, Sips, a capacidade máxima adsorptiva foi de 78,82 mg g⁻¹. Uma vez que se constitui como um modelo misto, quando o adsorbato estiver em altas concentrações, como neste estudo, ocorre uma aproximação do comportamento, sendo semelhante ao modelo de Langmuir (FOO; HAMEED, 2010).

Contudo, conforme comentam Silva et al. (2016), o ajuste ao modelo de Sips permite deduzir a exclusiva heterogeneidade da superfície do adsorvente. Isso é evidenciado, no que diz respeito a esses materiais, devido aos processos de magnetização realizados de síntese por coprecipitação, em que se relaciona ao fato de que, ao longo da superfície do material, tendem a proporcionar uma baixa uniformidade na dispersão de nanopartículas. Além disso, há também a formação de pequenos aglomerados proteicos devido ao desenvolvimento da camada de BSA

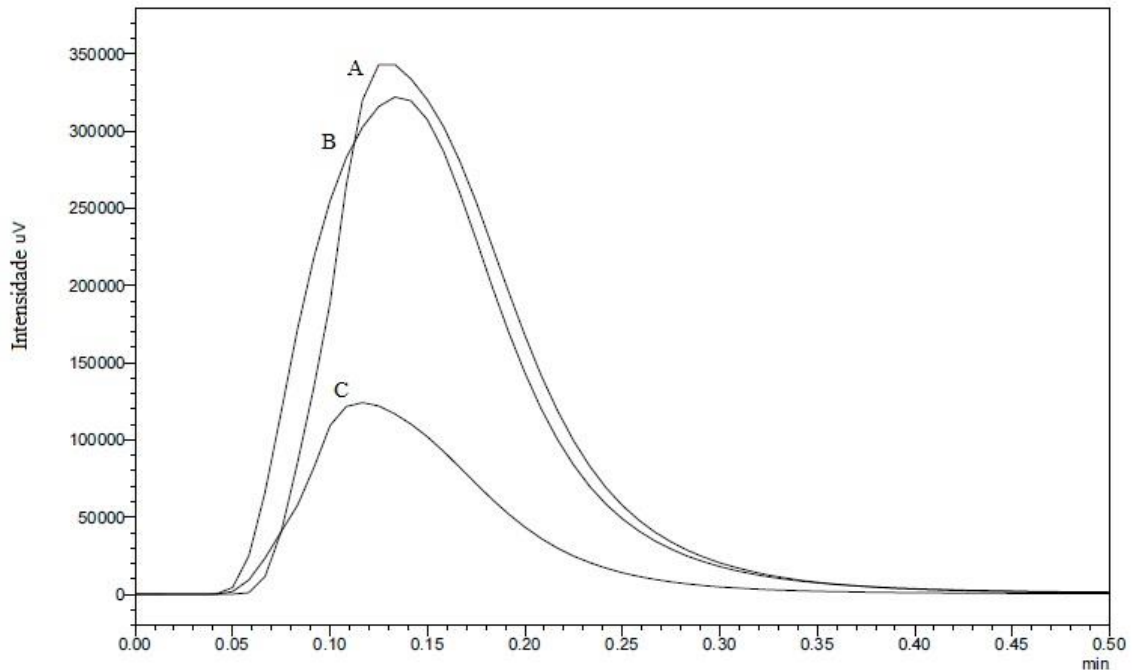
nos CNTs e da sua reação de formação decorrente do entrecruzamento dela (BARBOSA, 2015).

Ainda assim, ao se comparar os dados, a similaridade entre Sips e Langmuir é observada, uma vez que se obtiveram ajustes bem próximos tanto de R^2 como de F_{error} , ressaltando, ademais, a realização do estudo com concentrações elevadas. Além disso, levando em consideração a existência de um ponto de saturação, outra característica em questão é uma adsorção em monocamada. Fato que sugere que cada sítio ativo retém um íon independentemente da quantidade do adsorvente (BARBOSA, 2015).

5.5 TESTES DE EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS

Para o teste de exclusão de proteínas, a injeção de solução de BSA 44 mg mL^{-1} no sistema sem coluna resultou em um pico de área igual a 2.356.849, indicando que toda BSA injetada atingiu o detector. Posteriormente, a injeção da mesma solução de BSA através de colunas preenchidas com M-CNTs ou M-RACNTs resultou em picos com áreas de 777.409 e 2.313.989, respectivamente (Figura 15). Dessa forma, por comparação entre o sinal de BSA no sistema sem coluna e os sinais obtidos com as colunas de M-CNTs ou M-RACNTs, conclui-se que os M-CNTs e os M-RACNTs excluíram cerca de 33,6 e 98,18% das proteínas percoladas. A melhor performance dos M-RACNTs deve-se à presença da camada de BSA no material, sendo esta capaz de excluir as proteínas do meio por repulsão eletrostática.

Figura 21 - Cromatogramas obtidos por injeção de 50 μL da solução aquosa de 44 mg mL^{-1} BSA no sistema sem coluna (A) e com (B) M-RACNTs e (C) M-CNTs.



Fonte: Do Autor.

A capacidade de exclusão deste material está relacionada ao fato de que o pH de 6,8 utilizado no experimento é superior ao pI da camada de BSA que reveste os nanotubos. Esse fato faz com que as proteínas da amostra e do recobrimento externo do material estejam ionizadas negativamente, o que acarreta, segundo Barbosa et al. (2015), um efeito de repulsão eletrostática e, por conseguinte, uma dificuldade na adsorção.

5.6 USO DE M-RACNTs PARA REMOÇÃO DE Cu E Zn DE Cu,Zn- SUPERÓXIDO DISMUTASE

Para saber a quantidade de Cu e Zn que foi adsorvida no material e, conseqüentemente, a retirada da enzima SOD1, efetuou-se a análise dos metais restantes na solução, depois do recolhimento do sobrenadante.

A concentração de Zn encontrada na solução de SOD1 0,624 mg mL^{-1} , analisadas por FAAS, foi de 0,0691 mg L^{-1} . Depois da extração com os M-RACNTs, obteve-se uma concentração de 0,0255 mg L^{-1} no sobrenadante obtido. Com isso, em somente uma extração nessas condições, o material teve a capacidade de extrair cerca de 63,097 % de Zn da SOD1.

No caso do Cu, as concentrações analisadas na solução de SOD1 antes e depois da extração com M- RACNTs foram de 0,0771 e 0,0274 mg L⁻¹, respectivamente. Sendo possível afirmar que os M-RACNTs foram capazes de extrair cerca de 64,07 % de Cu da SOD1 nas referidas condições.

A fim de obter a confirmação da exclusão total da enzima, testes de exclusão de SOD1 foram efetuados por meio da leitura (a 280nm) da solução de SOD1 0,624 mg L⁻¹ antes e depois da extração realizada com os M-RACNTs, sendo as absorbâncias obtidas praticamente iguais e resultando em uma capacidade de exclusão de cerca de 98% de SOD1.

6 CONCLUSÃO

Foi possível depreender, em relação aos modelos cinéticos, que exibiram, no que concerne aos dados do experimento, bons ajustes, destacando como o de melhor ajuste o de pseudo-segunda ordem. Tal modelo considera que, ao compreender doação ou permuta de elétrons entre o adsorvato e o adsorvente, a adsorção química. Que se configura como o mecanismo predominante no processo. Assim, verificou-se que, com um tempo de equilíbrio de 15 minutos, a adsorção dos íons de Cu e Zn, em decorrência da pequena competição no que diz respeito aos sítios de adsorção de superfície, ocorreu em monocamadas. Ademais, certas propriedades físicas dos íons metálicos e a influência do pH sobre a adsorção, conforme demonstrado nos potenciais zeta, explicam a maior adsorção dos metais.

Em relação ao estudo das isotermas de adsorção, o melhor ajuste aos dados obtidos nos ensaios efetivou-se com o modelo de Sips. Isso se deve ao fato de que tal modelo constitui-se como misto e que permite deduzir a exclusiva heterogeneidade da superfície do adsorvente.

Já as modificações de CNTs para M-CNTs e M-RACNTs foram confirmadas por TEM, FT-IR e TG.

Segundo essas considerações, os M-RACNTs são um novo material com alto potencial para ser usado como sorvente em dSPE na obtenção de apoproteínas e na preparação direta de amostra de amostras biológicas não tratadas (por exemplo, sangue, plasma, soro e leite) podendo minimizar o número de etapas, simplificando assim, o preparo de amostras.

Em outras palavras, seu uso neste trabalho demonstrou que o material desenvolvido detém as condições necessárias para adsorver os metais e também exclui as proteínas simultaneamente. Não utiliza de condições drásticas de preparo, não demanda demasiado tempo e demonstra uma eficiência de aproximadamente 64% remoção de Cu e Zn simultaneamente da Cu, Zn- SOD, além de ser capaz de excluir cerca de 98% dessa enzima em uma única extração.

REFERÊNCIAS

- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, Rockville, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003. Disponível em: <[http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%201999-2003/J.AOAC2003/v86n2p\(mar-apr\)/v86n2p412.pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%201999-2003/J.AOAC2003/v86n2p(mar-apr)/v86n2p412.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2017.
- BARBOSA, A. F. et al. Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. *Talanta*, Amsterdam, v. 131, s.n., p. 213-220, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.051>>. Acesso em: 22 jul. 2017.
- BARBOSA, A. F. *Síntese e aplicação de nanotubos de carbono de acesso restrito para extração/pré-concentração de cádmio diretamente de amostras de soro humano seguido de análise por espectrometria de absorção atômica*. 2015. 76 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015. Disponível em: <<https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/831>>. Acesso em: 22 jul. 2017.
- BARREIRO, J. C.; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B. Direct injection of native aqueous matrices by achiral–chiral chromatography ion trap mass spectrometry for simultaneous quantification of pantoprazole and lansoprazole enantiomers fractions. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1218, n. 30, p. 2865-2870, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.064>>. Acesso em: 23 jul. 2017.
- BATISTON, Eduardo Roberto. *Incorporação de nanotubos de carbono em matriz de cimento Portland*. 2012. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/99441>>. Acesso em: 11 jan. 2018.
- BATTISTONI, A. et al. Increased expression of periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase enhances survival of Escherichia coli invasive strains within non phagocytic cells. *Infection and Immunity*, Whashington DC, v. 68, n. 1, p. 30–37, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97098/>>. Acesso em: 25 set. 2017.
- BOLSTER, M.W.G. Glossary of terms used in bioinorganic chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, New York, v. 69, n. 6, p. 1251-1303, 1997. Disponível em: <<https://www.iupac.org/publications/pac/1997/pdf/6906x1251.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2017.
- BROOM, Helen R. et al. Destabilization of the dimer interface is a common consequence of

diverse ALS-associated mutations in metal free SOD1. *Protein Science*, Medford, v. 24, n. 12, p. 2081–2089, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pro.2803>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

CABRERA, L. C et al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. *Scientia Chromatographica*, Jardim Paraíso, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.013> ISSN 1984-4433>. Acesso em: 13 jul. 2017.

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Whashington DC, v. 58, s.n., p. 1177-1233, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0584-8547\(03\)00072-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7)>. Acesso em: 25 set. 2017.

CARRICO, R. J., DEUTSCH, H. F. Isolation of human hepatocuprein and cerebropcuprein. *Journal Biology Chemical*, Rockville, v. 244, n. 22, p. 6087-6093, 1969. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4310831>>. Acesso em: 21 jul. 2017.

CERQUEIRA, F. M. *Conseqüências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas. Implicações para a esclerose lateral amiotrófica*. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11606/D.46.2007.tde-25042007-075453>>. Acesso em: 27 set. 2017.

CHANCE, M. R.; SHI, W. Metallomics and Metalloproteomics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Basel, v. 65, n. 19, p. 3040-3048, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8189-9>>. Acesso em: 27 set. 2017.

CHEN, Changlun et al. Adsorption behavior of multiwall carbon nanotube/iron oxide magnetic composites for Ni(II) and Sr(II). *Journal of Hazardous Materials*, Amsterdam, v. 164, n. 2-3, p. 923-928, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408013071>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

CHICO, J. et al. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography: Application to food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1181, n. 1-2, p. 1-8, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.033>>. Acesso em: 28 set. 2017.

COELHO, M. A. Z. et al. *Tecnologia enzimática*. Rio de Janeiro: Editora EPUB, 2008.

DI, Ze-Chao et al. Chromium adsorption by aligned carbon nanotubes supported ceria nanoparticles. *Chemosphere*, Amsterdam, v. 62, n. 5, p. 861-865, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653505012907?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

DONG, L. et al. Removal of lead from aqueous solution by hydroxyapatite/magnetite composite adsorbent. *Chemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 827-834, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11783-014-0722-5>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

DUDEV, T.; LIM, C. Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins. *Chemical Reviews*, Whashington, v. 114, n. 1, p. 538-556, 2014.

DUTRA, F. V. A. *Materiais solventes empregados em diferentes métodos de preparo de amostras*. 2014. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2014. Disponível em: <http://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/coqui/TCC/Monografia-TCC-Flavia_V_A_Dutra-20141.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2017.

EMERSON, T. E. Unique Features of Albumin - a Brief Review. *Critical Care Medicine*, Alphen ann den Rjin, v. 17, n. 7, p. 690-694, 1989.

FERREIRA, Ernando Silva. *Interação da proteína albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos*. 2009, 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <<http://text-br.123dok.com/document/zlgn68ry-interacao-da-proteina-albumina-do-soro-bovino-bsa-com-substratos-sinteticos.html>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

FOO, K.; HAMEED, B. Detoxification of pesticide waste via activated carbon adsorption process. *Journal of Hazardous Materials*. Amsterdam, v. 175, s.n., p. 1-11, 2010.

FRANQUI, L. D. *Síntese de polímeros de impressão molecular magnéticos para extração seletiva de nicotina e cotinina em urina seguido de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas*. 2015. 64 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015. Disponível em: <<https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/578>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

FREUNDLICH, H.M.F. Over the adsorption in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, Whashington, v. 57, s.n., p. 385-471, 1906.

GAO, Z. et al. Investigation of factors affecting adsorption of transition metals on oxidized carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*, Amsterdam, v. 167, s.n., p. 357-365, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.050>>. Acesso em: 24 set. 2017.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, Amsterdam, v. 69, s.n., p. 1-15, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.041>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

GHAZNAVI, Farzaneh; FATEMI, Shohreh; JODA, Marzieh. CO₂-CH₄ phase equilibria on modified multi-walled carbon nanotubes using Gibbs excess energy models based on vacancy solution theory. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, Ottawa, v. 90, n. 3, p. 3769-3776, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cjce.20526>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

GIAKISIKLI, G.; ANTHEMIDIS, A. N. Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 789, s.n., p. 1-16, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267013005321>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

GOLDBERG, R. J. A Theory of Antibody Antigen Reactions. 1. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody. *Journal of the American Chemical Society*, Whashington, v. 74, n. 22, p. 5715-5725, 1952.

GOMES, R. A. B. et al. Avaliação da influência do ph na exclusão de proteínas por nanotubos de carbono de acesso restrito. In: Congresso Brasileiro de Química, 55, 2015, Goiânia, *Anais eletrônicos...* Goiânia, 2015. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2015/trabalhos/4/7324-21190.html>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

GOMES, R. A. B. et al. Avaliação da oxidação ácida de nanotubos de carbono e seu revestimento com albumina de soro bovino por análises térmicas. In: Congresso Brasileiro de Química, 55, 2015, Goiânia, *Anais eletrônicos...* Goiânia, 2015. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2015/trabalhos/4/7664-21190.html>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

GOMES, R. A. B. et al. *Avaliação de nanotubos de carbono de acesso restrito na obtenção e determinação de apoproteínas*. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas. Disponível em: <<https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/943>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

GUPTA V. K.; AGARWAL S.; SALEH T. A., Chromium removal by combining the magnetic properties of iron oxide with adsorption properties of carbon nanotubes. *Water Research*, Amsterdam, v. 45, n. 6, p. 2207-2212, 2011. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.012>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

HERALD, V. L. et al. Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria. *Febs letters*, v. 537, n. 1-3, p. 96-100, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606038>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

HERBST, M. H.; MACEDO, M. I. F., ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000600025>. Acesso em: 20 jul. 2017.

HO, Y.S.; MCKAY, G.. Sorption of dye from aqueous solution by peat. *Chemical Engineering Journal*, v. 70, s. n., p. 115-124, 1998. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/eab0/bdb777f98b0f8f0f56902b4e4901460ec401.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

HO, Y.S.; NG, J.C.; MCKAY, G. Kinetics of pollutants sorption by biosorbents: review. *Separation Purification Methods*, v. 29, n. 2, p. 189-232, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1081/SPM-100100009>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

HUNTER, R. J. *Zeta potencial in colloid science: principles and applications*. Colloid Science, 3. ed., Amsterdam, ed. Elsevier, 1988.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, London, v. 354, s.n., p. 56-58, 1991. Disponível em: <<http://www.me.berkeley.edu/~lmlin/me138/paper1.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, London, v. 363, s.n., p. 603-605, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/363603a0>>. Acesso em: 27 mai. 2016.

KIM, Il T.; TANNENBAUM, Rina. Nanotubos de carbono magnético: síntese, caracterização e propriedades elétricas anisotrópicas. In: Marulanda, Jose Maurici (Org.). *Propriedades eletrônicas dos nanotubos de carbono*. 2011. Cap. 3. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/references/electronic-properties-of-carbon-nanotubes/magnetic-carbon-nanotubes-synthesis-characterization-and-anisotropic-electrical-properties>>. Acesso em: 09 jan. 2018.

KIM, U. J. et al. Raman and IR spectroscopy of chemically processed single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, Amsterdam, v.127, s.n., p. 15437-15445, 2005.

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, Amsterdam, v. 40, n. 9, p. 1361–1403, 1918. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ja02242a004>>. Acesso em: 12 jan. 2018

LI, Y.-H. et al. Lead adsorption on carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*, Amsterdam, v. 357, s.n., p. 263-266, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614\(02\)00502-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614(02)00502-X)>. Acesso em: 23 set. 2017.

LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media chromatographic columns protein-immobilized and their evaluation for the analysis of drugs by direct injection of human plasma. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 72-78, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100015>>. Acesso em: 24 set. 2017.

MÁRQUEZ, F. et al. Synthesis and characterization of monodisperse magnetite hollow microspheres. *Soft Nanoscience Letters*, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 25-32, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.4236/snls.2011.12005>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

MATOS, Hannah Larissa Siqueira. *Síntese de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas para remoção de Pb²⁺*. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/6015>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

MEHDINIA, A.; ROOHI, F; JABBARI, A. Rapid magnetic solid phase extraction with in situ derivatization of methylmercury in seawater by Fe₃O₄/polyaniline nanoparticle. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 1218, n. 28, p. 4269-4274, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.070>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

MENEZES, M. L.; FELIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylpara-thion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Abingdon, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998. Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/003/219/003219062.php>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

MICHEL, E. et al. Corrigendum to Kinetics properties of Cu,Zn-superoxide dismutase as a function of metal content. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Amsterdam, v. 444, n. 76, p. 234-24, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2005.05.016>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

MOHAMMAD, A. K. et al. Separation/preconcentration and speciation analysis of trace amounts of arsenate and arsenite in water samples using modified magnetite nanoparticles and molybdenum blue. *Method Journal of Chemistry*, Raidurg, v. 2014, s.n., p. 1-9, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/248065>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

MORENO-CASTILLA, Carlos. Adsorption of organic molecules from aqueous solution on carbon materials. *Carbon*, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 83-94, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2003.09.022>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

MORPURGO, L. et al. Studies of the metal sites of copper proteins. IV. Stellacyanin: preparation of apoprotein and involvement of sulfhydryl and tryptophan in the copper chromophore. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 271, n. 2, p. 292-299, 1972. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4340027>>. Acesso em: jul. 2017.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Inductively coupled plasma mass spectrometry in proteomics, metabolomics and metallomics studies. *European Journal of Mass Spectrometry*, Thousand Oaks, v. 16, n. 3, p. 243-253, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1255/ejms.1059>>. Acesso em: 24 out. 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NETO, A. J. S.; LOPES, B. R.; CASS, Q. B. Preparo de amostras empregando meios de acesso restrito (RAM). In: FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. (Orgs.). *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 97-105.

NEVES, R. C. F. et al. Copper fractionation in proteins from plasma, muscle and liver of Nile tilapia. *Química Nova*, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 493-498, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000300010>. Acesso em: 24 out. 2017.

NOVAIS, R. M. *Functionalized carbon nanotubes for polymer based nanocomposites*. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Polímeros) - Universidade do Minho, Guimarães - Portugal, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1822/21006>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

OSORIO, Alice Gonçalves. *Funcionalização de nanotubos de carbono e sua utilização como reforço em matriz de hidroxiapatita*. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

Disponível em:

<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/15536/000682736.pdf?sequence=1>>.

Acesso em: 23 dez. 2017.

PARDASANI, D. A. et al. Magnetic multi-walled carbon nanotubes assisted dispersive solid phase extraction of nerve agents and their markers from muddy water. *Talanta*, Amsterdam, v. 86, s.n., p. 248-255, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.067>>.

Acesso em: 13 jul. 2017.

PETERS JR., T.; *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*.

Academic Press: San Diego, 1995.

PINTO, F. G. et al. Determinação de cobre e zinco em cachaça por espectrometria de absorção atômica com chama usando calibração por ajuste de matriz. *Analytica*, Rio de Janeiro, v. 3, n.17, p. 48-50, 2005. Disponível em: <http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Zinco_cachaca_art031.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2017.

POZZI, C. M. C. *Análise metaloproteômica de cálcio, ferro e zinco em colostro, leite de transição e leite maduro humanos*. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_me_2013_carla_pozzi.pdf>.

Acesso em: 14 jul. 2017.

QU et al. Magnetic assembled electrochemical platform using Fe₂O₃ filled carbon nanotubes and enzyme. *Electrochemistry Communications*, Amsterdam, v. 9, s.n., p. 2812–2816, 2007.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2007.09.021>>. Acesso em: 20 out. 2017.

QUEIROZ, J. V. *Abordagem metalômica quantitativa de mercúrio em peixes da região amazônica*. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista

Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de

Botucatu, Botucatu, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/122224>>. Acesso em:

21 out. 2017.

RAO, T. P.; METILDA, P. J.; GLADIS, M. Preconcentration techniques for uranium (VI) and thorium (IV) prior to analytical determination - an overview. *Talanta*, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 1047-1064, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.07.021>>.

Acesso em: 23 ago. 2017.

RIEUX, L. et al. Restricted-access material-based high-molecular-weight protein depletion coupled on-line with nano-liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics applications. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1149, n. 2, p. 169-177, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.118>>. Acesso em: 20 out. 2017.

ROBINSON, P. J.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, Medford, v. 15, n. 3, p. 603-606, 1973. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260150318/pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

ROMÁN, I. P.; CHISVERT, A.; CANALS, A. Dispersive solid-phase extraction based on oleic acidcoated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1218, n. 18, p. 2467-2475, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.047>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

ROOSEVELT, Eleanor; SCHLUP, Leonard C., WHISENHUNT, Donald W. *It Seems to Me: Selected Letters of Eleanor Roosevelt*. University Press of Kentucky, 2005.

ROSEN, D. R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, London, v. 362, n. 6415, p. 59-62, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/362059a0>>. Acesso em: 21 out. 2017.

RULISEK, L.; HAVLAS, Z. Theoretical studies of metal ion selectivity. 1. DFT calculations of interaction energies of amino acid side chains with selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺). *Journal of Physical Chemistry B*, Rockville, v. 112, n. 42, p. 10428-10439, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ja001265g>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

SADILEK, P.; SATINSKY, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically active compounds in complex matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 375-384, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.002>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

SAITO, R.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S.; *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. Imperial College Press: London, 1998.

SANTOS, R. C. *Emprego de nanotubos de carbono de acesso restrito na extração direta de fármacos anticonvulsivantes seguido de análise por HPLC*. 2016. 90 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas,

Alfenas, 2016. Disponível em: <<https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/891>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

SHAFEYA, H. M. et al. Corynebacterium glutamicum superoxide dismutase is a manganese-strict non-cambialistic enzyme in vitro. *Microbiological Research*, Elsevier, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 80-86, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.005>>. Acesso em: 21 out. 2017.

SHENG, G. et al. Adsorption of copper (II) on multiwalled carbon nanotubes in the absence and presence of humic or fulvic acids. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, Amsterdam, v. 178, n. 1-3, p. 333-340, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.084>>. Acesso em: 11 ago. 2017.

SILVERSTEIN, R. M. et al. *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons. 2014.

SUN, S. H.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. X. Monodisperse $MFeO_4$ ($M = Fe, Co, Mn$) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, v. 126, n. 1, p. 273-279, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja0380852>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

SUTTER, B.; HOSSNER, L. R.; MING, D.W. Dissolution Kinetics of Iron-, Manganese-, and Copper Containing Synthetic Hydroxyapatites. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 69, s.n., p. 362-370, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2005.0362>>. Acesso em: 15 maio nov. 2017.

SVENSSON, O.; ARNEBRANT, T. Adsorption of serum albumin on silica - The influence of surface cleaning procedures. *Journal of Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 344, n. 1, p. 44-47, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.12.042>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Berlin, v. 378, n. 1, p. 54-56, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-2333-z>>. Acesso em: 21 out. 2017.

TAN, L. et al. Uranium extraction using a magnetic $CoFe_2O_4$ – graphene nanocomposite: kinetics and thermodynamics studies. *New Journal of Chemistry*, London, v. 39, n. 4, p. 2832-2838, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4NJ01981D>>. Acesso em: 13 out. 2017.

TARIGH, G. D.; SHEMIRANI, F. Magnetic multi-wall carbon nanotube nanocomposite as an adsorbent for preconcentration and determination of lead (II) and manganese (II) in various matrices. *Talanta*, Amsterdam, v. 115, s.n., p. 744-750, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.018>>. Acesso em: 12 out. 2017.

TARIGH, G. D.; SHEMIRANI, F.; MAZ'HARI, N. S. Fabrication of a reusable magnetic multiwalled carbon nanotube–TiO₂ nanocomposite by electrostatic adsorption: enhanced photodegradation of malachite green. *RSC Advances*, London, v. 5, s.n., p. 35070-35079, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4RA15593A>>. Acesso em: 16 out. 2017.

TOICHI K., YAMANAKA K., FURUKAWA Y. Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 288, n. 7, p. 4970-4980, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/doi:10.1074/jbc.M112.414235>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

WESER, U.; HARTMANN, H. J. Preparation of pure bovine apo-erythrocyte by gel filtration. *Febs letters*, Heidelberg, v. 17, n., p. 78-80, 1971. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80567-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(71)80567-7)>. Acesso em: 16 out. 2017.

WU, H. et al. Simultaneous speciation of inorganic arsenic and antimony in water samples by hydride generation-double channel atomic fluorescence spectrometry with on-line solid phase extraction using single-walled carbon nanotubes micro-column. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 74-80, 2011.

YU, W.; XIE, H. A review on nanofluids: preparation, stability mechanisms, and applications. *Journal of Nanomaterials*, London, v. 2012, s.n., p. 1-17, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/435873>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

ZHAO, X. et al. Preparation of high-grade carbon nanotubes by hydrogen arc discharge. *Carbon*, Elsevier, Amsterdam, v. 35, s.n., p. 775-781, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6223\(97\)00033-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6223(97)00033-X)>. Acesso em: 15 out. 2017.