

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

EDILEUZA MARCELO VIEIRA

PREPARAÇÃO DE NANOESFERA MAGNÉTICA FUNCIONALIZADA COM L-HISTIDINA PARA O ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DE BAIXA ABUNDÂNCIA EM AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO: UM FOCO EM BIOMARCADORES DE DOENÇAS HUMANAS

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

EDILEUZA MARCELO VIEIRA

PREPARAÇÃO DE NANOESFERA MAGNÉTICA FUNCIONALIZADA COM L-HISTIDINA PARA O ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DE BAIXA ABUNDÂNCIA EM AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO: UM FOCO EM BIOMARCADORES DE DOENÇAS HUMANAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Jemmyson Romário de Jesus

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V658p
2023

Vieira, Edileuza Marcelo, 1994-
Preparação de nanoesfera magnética funcionalizada com L-histidina para o enriquecimento de proteínas de baixa abundância em amostra de soro sanguíneo: um foco em biomarcadores de doenças humanas / Edileuza Marcelo Vieira. - Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Jemmyson Romario de Jesus.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, 2023.
Referências bibliográficas: f. 64-73.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.765>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteômica. 2. Marcadores bioquímicos. 3. Sangue - Análise e química. 4. Soro. I. Jesus, Jemmyson Romario de, 1989-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 572.6

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


EDILEUZA MARCELO VIEIRA

PREPARAÇÃO DE NANOESFERA MAGNÉTICA FUNCIONALIZADA COM L-HISTIDINA PARA O ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DE BAIXA ABUNDÂNCIA EM AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO: UM FOCO EM BIOMARCADORES DE DOENÇAS HUMANAS


Dissertação apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADO EM: 28 de agosto de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 EDILEUZA MARCELO VIEIRA
Data: 14/12/2023 22:05:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Edileuza Marcelo Vieira
Autora

Documento assinado digitalmente
 JEMMYSON ROMÁRIO DE JESUS
Data: 15/12/2023 08:10:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jemmyson Romário de Jesus
Orientador

*Dedico a realização desse sonho a Deus,
que nunca me abandonou nos momentos
de dificuldade e aos meus pais e meu
irmão pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, autor do meu destino, que me deu forças para concluir este trabalho, que esteve ao meu lado em todos momentos de dificuldade, por ter sido a mão invisível que guiou os meus caminhos me permitindo chegar até aqui.

À **Nossa Senhora**, que intercedeu junto a Deus por mim. Que me acalentou em seus braços todas as vezes que precisei e que me deu forças para prosseguir sempre que pensava em desistir. Obrigada Mãe Santíssima por me permitir alcançar essa Graça.

Ao meu amado pai **José Antônio Vieira** (*In memoriam*) que não está presente no dia de hoje, mas que me deu todo apoio e suporte, tanto financeiro quanto emocional. Agradeço pelos 28 anos de convivência e por todo amor e confiança depositada em mim. Sei que de onde está, o senhor se orgulha da filha que criou e educou. Obrigada por tudo e por tanto. Eu te amo!

À minha amada mãe **Neuza Custódia Marcelo Vieira**, que me ensinou a ser forte nos momentos de fraqueza, a acreditar que eu sou capaz, que junto do meu pai me deu todo apoio, amparo e amor incondicional, que foram necessários para que eu chegasse até aqui.

Ao meu amado irmão **Otávio Marcelo Vieira**, por sua parceria e seu amor incondicional.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jemmyson Romário de Jesus**, pela confiança em mim depositada, pelo total apoio, incentivo, paciência, conselhos, esclarecimentos e sugestões. Por estar presente em todos momentos necessários, por me dar forças e por acreditar em mim. Foi uma honra para mim ser orientada por ele.

À **Universidade Federal de Viçosa** (UFV) e ao **Departamento de Química**, seu corpo docente, direção, administração e funcionários, pelo ambiente amigável, pela oportunidade e pela infraestrutura fornecida que permitiu que o presente trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao **CNPq** (405828/2022-5), **FAPEMIG** (APQ-01786-22 e RED-00144-22) e **CAPES** pelo suporte financeiro e pela bolsa.

Aos integrantes do **LPBioFAM**, em especial: Jéssica (Jess), Gislaine, Marcos, Claudinéia (Néia), Josiane (Josi) e Maria Carolina (Robaina), pela amizade, parceria e momentos de descontração.

Ao meu amigo **Matheus Cancela Doriguêto** por todo suporte, pela sua amizade, por acreditar em mim, me dar forças para não desistir, por estar presente nos momentos necessários.

Aos **meus amigos** que estiveram comigo nessa trajetória, por todas a mensagem se incentivo, e por não me deixar desistir.

A todos **meus professores** que me inspiraram, por terem paciência com a qual guiaram o meu aprendizado e fizeram parte da realização desse sonho. Me sinto honrada por ter sido aluna de cada um de vocês, aqui fica o meu mais que sincero obrigada.

Por fim, sou grata a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e/ou realização desse projeto.

*“Tudo quanto fizerdes, por palavra ou por obra,
fazei-o em nome do Senhor Jesus,
dando por Ele graças a Deus Pai.”*

Colossenses 3:17

*“Nada temas, **porque estou contigo,**
não lances olhares desesperados,
pois eu sou teu Deus; **eu te fortaleço**
e venho em teu socorro, eu te
amparo com minha destra vitoriosa.”*

Isaias 41:10

RESUMO

VIEIRA, Edileuza Marcelo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Preparação de um novo compósito nanohíbrido magnético para o enriquecimento de proteínas de baixa abundância em amostra de soro sanguíneo com foco na busca de biomarcadores de doenças humanas.** Orientador: Prof. Dr. Jemmyson Romário de Jesus.

No presente estudo, a eficiência da nanoesfera magnética (Fe_3O_4) revestida com L-histidina (L-his) foi avaliada para enriquecer proteínas de baixa abundância no soro humano. A análise quimiométrica forneceu condições ótimas para concentrar proteínas de baixa abundância, reduzindo a faixa dinâmica dos níveis de proteína na amostra de soro. Três fatores independentes (temperatura, razão de massa e pH) foram testados. A condição ótima alcançada foi usando temperatura (42°C), proporção (3:1, nanomaterial/amostra) e pH (5,5). O estudo cinético revelou que a adsorção de proteínas na superfície da nanoesfera magnética monocamada segue um modelo de pseudo-segunda ordem com $R^2=0,9153$. Experimentos de isoterma de adsorção revelaram alta capacidade de adsorção de proteínas na superfície da nanoesfera, indicando uma capacidade máxima teórica de adsorção (q_{max}) de $123,45 \text{ mg g}^{-1}$. A eficiência do enriquecimento de proteínas de baixa abundância na amostra de soro foi avaliada por eletroforese em gel (SDS-PAGE). Além disso, quando comparado ao método que utiliza solvente orgânico (acetonitrila), o $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ apresentou eficiência adequada para simplificar a amostra de soro. Usando MALDI-TOF/TOF, aproximadamente 50 proteínas foram identificadas usando $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$. Esses resultados mostram que $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ pode ser uma alternativa rápida, robusta e simples para enriquecer proteínas de baixa abundância no soro humano, surgindo como uma importante estratégia na busca por biomarcadores de doenças humanas.

Palavras-chave: Proteômica, biomarcadores, preparo de amostra, nanomaterial, otimização multivariada.

ABSTRACT

VIEIRA, Edileuza Marcelo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august 2023.

Preparation of a new magnetic nanohybrid composite for the enrichment of low-abundance proteins in a blood serum sample with a focus on the search for biomarkers of human diseases. Advisor: Prof. Dr. Jemmyson Romário de Jesus.

In the present study, the efficiency of magnetic nanosphere (Fe_3O_4) coated with L-histidine (L-his) was evaluated to enrich proteins of low-abundance in human serum. The chemometric analysis provided optimal conditions to concentrate low-abundance proteins, reducing the dynamic range of protein levels in the serum sample. Three independent factors (temperature, mass ratio and pH) were tested. The optimal condition achieved was using temperature (42°C), ratio (3:1, nanomaterial/sample) and pH (5.5). The kinetic study revealed that the adsorption of proteins on the surface of the monolayer magnetic nanosphere follows a pseudo-second order model with $R^2=0.9153$. Adsorption isotherm experiments revealed high capacity of protein adsorption on the surface of the nanosphere, indicating a maximum theoretical adsorption capacity (q_{max}) of 123.45 mg g^{-1} . The efficiency of enrichment of low-abundance proteins in the serum sample was evaluated by gel electrophoresis (SDS-PAGE). Furthermore, when compared to the method using organic solvent (acetonitrile), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ showed adequate efficiency to simplify the serum sample. Using MALDI-TOF/TOF, approximately 50 proteins were identified using $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$. These results show that $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ can be a fast, robust and simple alternative to enrich low-abundance proteins in human serum, emerging as an important strategy in the search for biomarkers of human diseases.

Keywords: Proteomics, biomarkers, sample preparation, nanomaterial, multivariate optimization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática de uma separação eletroforéticas unidimensional (SDS-PAGE) aplicadas em estudos proteômicos.....	25
Figura 2 - Representação dos fundamentos da espectrometria de massas aplicadas em estudos de proteômica com foco em biomarcadores de doenças humanas.....	27
Figura 3- Espectro na região de FTIR onde: (–) Nanopartícula bruta de Fe ₃ O ₄ ; (–) L-histidina; (–) Material Sintetizado - Fe ₃ O ₄ @L-his	41
Figura 4- Termograma da decomposição térmica de Fe ₃ O ₄ @L-his	43
Figura 5- Difratoograma experimental de Fe ₃ O ₄ @L-his.....	44
Figura 6- Micrografia da Fe ₃ O ₄ @L-his.....	45
Figura 7- (a) Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS); (b) Potencial Zeta	46
Figura 8- Estudo do Ponto de carga zero (pH _{PCZ}).	47
Figura 9- Análise Multivariada – (A,B,C) Gráfico tridimensional da superfície de resposta; (D,E F) Gráfico das curvas de nível.....	49
Figura 10- Valores observados vs previstos após otimização multivariada, usando Fe ₃ O ₄ @L-his.....	52
Figura 11- Isoterma de Adsorção da Fe ₃ O ₄ @L-his	53
Figura 12- Cinética de adsorção da Fe ₃ O ₄ @L-his onde: (A) Pseudo-primeira ordem e (B)Pseudo-segunda ordem	55
Figura 13- Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com Coomassie Brilliant Blue R250.....	56
Figura 14- Eletroforese em gel comparando a eficiência do uso do método de depleção com Fe ₃ O ₄ @L-his e com ACN em duplicata.....	57
Figura 15- Proteínas identificadas na depleção utilizando o método Fe ₃ O ₄ @L-his e ACN.....	62
Figura 16- Eletroforese em gel comparando a eficiência do reuso da Fe ₃ O ₄ @L-his.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nanomateriais reportados na literatura para simplificar amostras biológicas com foco em biomarcadores	24
Tabela 2- Os níveis codificados das variáveis independentes.....	37
Tabela 3- Matriz para o planejamento fatorial (2^3)	37
Tabela 4- Resultado da análise elementar (CHN) para o material sintetizado.	42
Tabela 5- Total de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) após planejamento fatorial completo 2^3	50
Tabela 6- Dados ANOVA para o delineamento composto central (DCC)	51
Tabela 7- Parâmetros obtidos a partir do estudo isotérmico.....	53
Tabela 8- Parâmetros obtidos a partir do estudo cinético	55
Tabela 9- Identificação de proteínas após aplicação de depleção de ACN e $\text{Fe}_3\text{O}_4@L$ -his.....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN - acetonitrila

APS - persulfato de amônio

BSA - albumina de soro bovino

CBB - *coomassie* azul brilhante G-250

CHN - análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio

CS - controles saudáveis

DCC - delineamento composto central

DLS - dispersão de luz dinâmica

DP - desvio padrão

DRX - difração de pó de raios

DTT – ditioneitol

EM – espectrometria de massas

FT- IR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

L-his - L-histidina

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

NFL - cadeia leve de neurofilamento

NPs - nanopartículas

NPMs - nanopartículas magnéticas

PDI - índice de polidispersão

pH_{PCZ} - ponto de carga zero

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida

TB - transtorno bipolar

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletileno-diamina

TGA - análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Biomarcadores de doenças humanas	17
2.2 Proteoma do sangue e os desafios na busca de biomarcadores	20
2.3 Nanomateriais para aplicações em estudos clínicos	22
2.4 Técnicas analíticas aplicadas na busca por proteínas candidatas a biomarcadores de doenças humanas	25
2.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional	25
2.4.2 Espectrometria de massas	27
3. OBJETIVO	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Produtos Químicos e Reagentes	30
4.2 Preparação de nanopartículas (Fe₃O₄)	30
4.3 Preparação de Fe₃O₄@L-his	31
4.4 Caracterização da Fe₃O₄@L-his	31
4.4.1 Difração de raio X em pó	31
4.4.2 Análise termogravimétrica	32
4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
4.4.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	32
4.4.5 Análise elementar por CHN	33
4.4.6 Potencial Zeta	33

4.5 Determinação do ponto de carga zero (pH _{Pcz})	34
4.6 Experimento de adsorção	34
4.7 Estudo cinético de adsorção	35
4.8 Amostras de soro humano.....	36
4.9 Preparo da amostra	36
4.9.1 Enriquecimento de proteínas pouco abundantes usando Fe ₃ O ₄ @L-his.	36
4.9.2 Estudo de reusabilidade	38
4.9.3 Depleção de proteínas usando solvente orgânico	38
4.10 Quantificação de proteínas	39
4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	39
4.12 Espectrometria de massas.....	40
4.13 Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Caracterização da Fe ₃ O ₄ @L-his.....	40
5.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	41
5.1.2 Análise elementar por CHN.....	42
5.1.3 Análise termogravimétrica.....	42
5.1.4 Difratomia de raio X (DRX).....	43
5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
5.1.6 – Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta	45
5.1.7 Experimento da determinação do ponto de carga zero (pH _{Pcz}).....	46
5.2 Otimização multivariada para enriquecimento de proteínas de baixa abundância usando Fe ₃ O ₄ @L-his.....	47
5.3 Estudo da Isoterma de Adsorção	52
5.4 Estudo da Cinética de Adsorção	54

5.5 Eficiência de equalização de proteínas usando Fe₃O₄@L-his.....	56
5.6 Estudo de reuso da Fe₃O₄@L-his	62
6. CONCLUSÕES.....	63
7. PERSPECTIVAS	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

As doenças humanas são condições patológicas ou alterações fisiológicas que afetam a saúde e o funcionamento do corpo humano¹. As doenças humanas podem ser causadas por uma variedade de fatores, que incluem fatores genéticos e ambientais, tais como estilo de vida e fatores socioeconômicos². As doenças humanas podem ser temporárias ou crônicas, leves ou graves, e podem afetar diferentes sistemas e órgãos do corpo³.

O sangue (plasma ou soro) é uma das amostras mais importante para o monitoramento da saúde humana e é comumente usada nas práticas médicas, permitindo o diagnóstico e o acompanhamento do tratamento das doenças humanas¹. Isso ocorre porque o sangue circula por todo o corpo, transportando diversos elementos, como células, hormônios, proteínas, metabólitos e até mesmo microrganismos, o que possibilita obter um perfil geral e atual do sistema biológico. Nesse sentido, a análise do sangue pode fornecer informações cruciais sobre o estado de saúde geral do indivíduo e ajudar na identificação, diagnóstico e monitoramento de várias condições médicas por meio de biomarcadores.

Os biomarcadores (ou marcadores biológicos) são definidos como substâncias ou entidades mensuráveis que podem fornecer informações sobre processos biológicos, condições de saúde ou o estado de uma doença⁴. Eles são fundamentais para a medicina personalizada, diagnóstico precoce, monitoramento de doenças e desenvolvimento de tratamentos eficazes⁴⁻⁶. Os marcadores biológicos (proteínas, lipídeos, metabólitos entre outros) têm mostrado forte associação com diferentes tipos de doenças, tais como: câncer^{7,8}, doenças cardiovasculares^{9,10} e até mesmo doenças psiquiátricas¹¹ e têm sido amplamente utilizados como método auxiliar no diagnóstico de doenças endócrinas e inflamatórias crônicas, como, por exemplo, diabetes¹² e artrite degenerativa¹³. Por exemplo, a glicose é considerada um biomarcador da condição do diabetes. A proteína PSA (Antígeno Prostático Específico) é considerada um biomarcador para condição de tumor prostático. Corroborando com esses dados, Khalil *et al*¹⁴ sugeriram proteínas de neurofilamentos como biomarcadores em distúrbios neurológicos a partir sangue, indicando lesão neuronais.

Embora os biomarcadores sejam uma ferramenta importante para monitorar a saúde humana, a sua descoberta impõe diversos desafios. De um modo geral, a etapa de descoberta de biomarcadores está relacionada à aplicação de estratégias ômicas que visam extrair e identificar possíveis biomarcadores em amostras biológicas (tecido, célula, fluido)¹⁵. Entre as estratégias ômicas mais aplicadas na busca de biomarcadores, a proteômica é destaque.

A proteômica permite avaliar o conjunto de proteínas em uma determinada amostra biológica, evidenciando possíveis diferenças nos níveis proteicos, quando há alguma condição patológica. O proteoma sanguíneo representa uma das fontes inesgotáveis de biomarcadores de doenças humanas. No entanto, a complexidade da amostra é o principal gargalo à busca por biomarcadores¹⁶.

Embora a composição do sangue seja bastante diversificada, cerca de vinte proteínas representam aproximadamente 90% de seu conteúdo total, sendo chamadas de proteínas de alta abundância¹⁷. Entre estas proteínas de alta abundâncias, destacam-se as imunoglobulinas, albumina, transferrina, mioglobina e haptoglobina, que são consideradas as top cinco proteínas mais abundantes no sangue humano. Em estudos que focam a busca de biomarcadores de doenças humanas, proteínas de alta abundância podem interferir na detecção de proteínas de baixa abundância (potenciais biomarcadores), exigindo métodos de preparos de amostras eficientes para simplificar a amostra, e permitir a sua detecção^{18,19}.

Algumas abordagens têm sido reportadas como estratégias para simplificar o sangue humano, por exemplo a tecnologia ProteoMiner®²⁰ e colunas de imunodepleção²¹ têm sido utilizadas para remover proteínas abundantes, principalmente a albumina presente no soro sanguíneo. Estas estratégias têm permitido a detecção de componentes proteicos minoritários presentes no sangue. Apesar da eficácia de tais métodos, o custo para aquisição dos métodos de depleção é alto, tornando assim necessário a busca por novas alternativas mais acessíveis. Além disso, algumas dessas abordagens não são reutilizáveis, como por exemplo os kits comerciais.

Nesse sentido, há um grande esforço por parte dos pesquisadores da proteômica em desenvolver novos materiais de baixo custo e reutilizáveis, capazes de simplificar amostras biológicas complexas, inclusive de sangue, e que permitam o enriquecimento

de proteínas de baixa abundância com potencial para serem biomarcadores de doenças humanas.

Nesse cenário, as nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) têm apresentado grande potencial para diversas aplicações tecnológicas, incluindo a remoção de proteínas abundantes em amostras biológicas e o enriquecimento de proteínas de baixa abundância.

Assim, a hipótese que orientou esse trabalho de mestrado foi: pode nanoesferas magnéticas (Fe_3O_4) revestidas com L-histidina (L-his) enriquecer proteínas de baixa abundância por meio de interações mais específicas?

Para avaliar essa hipótese, nanopartículas magnéticas revestidas com L-his ($\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$) foram sintetizadas, caracterizadas e aplicadas em amostras de sangue humano. Análise multivariada foi planejada para obter a condição ideal para simplificar a amostra de soro humano, usando $\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$. Além disso, estudo de reusabilidade do material preparado foi realizado a fim de avaliar a aplicabilidade do nanomaterial em análises de rotinas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomarcadores de doenças humanas

A identificação de biomarcadores, voltados para o diagnóstico é uma ferramenta essencial para detectar possíveis anormalidades ou disfunções no corpo humano. Esses marcadores biológicos são recursos importantes em pesquisas médicas e nas práticas clínicas, pois auxiliam na detecção precoce de doenças, monitoramento de tratamentos e avaliação do estado de saúde dos indivíduos⁵. A seleção e validação de biomarcadores exigem atenção à sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade e correlação com o efeito observado. Essas características são essenciais para garantir que os biomarcadores sejam confiáveis e úteis para o diagnóstico e monitoramento de doenças humanas. Além disso, é desejável que sejam não invasivos e apresentem especificidade em relação à exposição de interesse em estudos epidemiológicos. A validação rigorosa é fundamental para garantir a relevância e eficácia dos biomarcadores em aplicações clínicas e de pesquisa²².

Em 1989, o termo biomarcador foi introduzido para descrever uma substância que serve como indicador de um estado específico no organismo. Essa definição destaca a ampla aplicabilidade dos biomarcadores em diversos campos da medicina e pesquisa, fornecendo informações valiosas para avaliações e diagnósticos relacionados à saúde. Sua versatilidade os torna ferramentas essenciais para avançar o conhecimento médico e aprimorar os cuidados clínicos⁶. Já em 2001, o Grupo de Definições de Biomarcadores dos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (NIH) propôs uma descrição para biomarcadores, considerando-os como características mensuráveis e objetivas que indicam processos biológicos normais, patológicos ou respostas a tratamentos terapêuticos. Essa definição ressalta a importância dos biomarcadores como ferramentas fundamentais para compreender a saúde, a doença e desenvolver abordagens terapêuticas adequadas²³.

Os biomarcadores desempenham um papel crucial na detecção de doenças, no acompanhamento da saúde e no monitoramento da eficácia de intervenções médicas. Sua importância é indiscutível para uma abordagem médica mais precisa e personalizada, contribuindo significativamente para pesquisas clínicas, identificação de alvos terapêuticos e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes²⁴. Exemplos concretos são observados em condições como diabetes e distúrbios cardiovasculares, nos quais os níveis elevados de glicose e lipoproteína de baixa densidade, respectivamente, representam biomarcadores característicos das doenças⁴.

Existem várias fontes para a obtenção de biomarcadores, tais como saliva, sangue, líquido cefalorraquidiano, urina e tecidos. Essas amostras biológicas são fundamentais para a pesquisa e diagnóstico médico, fornecendo informações valiosas sobre os processos fisiológicos e patológicos do organismo. Essa variedade de fontes permite uma abordagem abrangente na busca por biomarcadores relevantes, essenciais para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento de diversas doenças. Esses biomarcadores desempenham um papel crucial tanto na pesquisa científica quanto na prática clínica⁶.

Os biomarcadores podem ser classificados de acordo com a presença e o efeito de uma dada substância no organismo. Assim, os biomarcadores podem ser

classificados como: (i) biomarcadores de exposição, (ii) biomarcadores de efeito e (iii) biomarcadores de suscetibilidade.

- (i) biomarcadores de exposição confirmam a presença de substâncias no organismo;
- (ii) biomarcadores de efeito registram as alterações biológicas causadas por essas substâncias no organismo;
- (iii) biomarcadores de suscetibilidade indicam a resposta individual a tais substâncias.

Esses indicadores norteiam as pesquisas para uma ciência mais precisa e possibilitam a implementação de uma medicina personalizada, permitindo abordagens mais eficazes para a saúde e bem-estar do indivíduo^{22,25}. A escassez de biomarcadores pode dificultar a distinção de doenças, especialmente as doenças psiquiátricas, em que o diagnóstico é dado exclusivamente pela experiência do médico psiquiátrico¹⁹. Além disso, a ausência de biomarcadores pode impedir a descoberta de tratamentos ou mesmo a detecção dos estágios iniciais de uma doença²⁴.

Uma solução adotada por pesquisadores para enfrentar a escassez de biomarcadores validados é a investigação do proteoma do sangue humano (plasma e soro). Essa abordagem utiliza as proteínas presentes nesses fluidos como biomarcadores para diagnóstico precoce, prognóstico e monitoramento da progressão de doenças. A análise dessas proteínas permite identificar variações significativas que indicam a presença de patologias em estágios iniciais, possibilitando intervenções terapêuticas mais precoces e eficazes. Além disso, a pesquisa no proteoma do sangue fornece informações sobre a eficácia dos tratamentos e permite ajustes personalizados²⁶. A área de estudo e aplicação de biomarcadores tem sido objeto de grande interesse e atividade, especialmente com o surgimento de novas tecnologias ômicas, como a proteômica. Essas inovações têm impulsionado significativamente a pesquisa e o desenvolvimento de biomarcadores, oferecendo novas perspectivas para diagnósticos mais precisos e tratamentos personalizados. A pesquisa nessa área é de grande importância para melhorar a compreensão e o manejo de doenças humanas, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes de tratamento e cuidados²³.

2.2 Proteoma do sangue e os desafios na busca de biomarcadores

O termo "proteoma" refere-se ao conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento²⁹. A proteômica é uma área de conhecimento avançada de pesquisa que tem como objetivo analisar e quantificar as proteínas presentes em um organismo utilizando diversas técnicas de separação e identificação^{29,30}. Além disso, ela estuda as interações e mudanças que ocorrem em resposta a condições fisiológicas ou patológicas³⁰. Ao utilizar a proteômica, é possível obter uma descrição detalhada do conjunto de proteínas de uma organela e do ambiente em que estão inseridas, contribuindo para uma compreensão mais profunda dos processos biológicos³¹.

O avanço da proteômica tem possibilitado a condução de estudos abrangentes sobre a expressão de proteínas em diversos tecidos e fluidos corporais^{32,33}. Através dela, é possível realizar a investigação detalhada do proteoma, incluindo a expressão, estrutura, funções, interações e modificações das proteínas em todas as fases³¹. Essa evolução, proporciona novas oportunidades para obter informações relevantes sobre diferentes processos que ocorrem no organismo humano³⁰.

Esse campo de pesquisa é de grande relevância nas neurociências, especialmente ao mapear as proteínas presentes nos tecidos cerebrais. Essas informações são importantes para a compreensão das complexas doenças neurodegenerativas e para a identificação de marcadores que possibilitam o diagnóstico precoce dessas doenças²³. A proteômica também tem aplicação na bioquímica clínica. A análise das proteínas no plasma humano é uma ferramenta valiosa para identificar alterações biológicas e manifestações de patologias que se refletem nos níveis de proteínas plasmáticas. Essa abordagem permite detectar diversas anomalias e fornece informações cruciais para o diagnóstico e tratamento de doenças³⁴. Em suma, a proteômica desempenha um papel essencial na compreensão dos mecanismos biológicos, na descoberta de biomarcadores e no desenvolvimento de medicamentos com alvos específicos^{29,31}.

Devido à sua facilidade de obtenção, disponibilidade, além de proporcionar uma visão abrangente do sistema biológico e conter uma grande quantidade e variedade de proteínas, o sangue humano é uma amostra biológica frequentemente utilizada em

ensaios clínicos. O soro sanguíneo consiste em dezenas de milhares de diferentes espécies de proteínas que abrangem uma faixa de concentração de cerca de 10 ordens de magnitude¹⁷. Essa complexidade torna a busca por biomarcadores uma tarefa desafiadora na área de proteômica. A concentração de proteínas no sangue pode variar amplamente, o que inclui tanto proteínas altamente abundantes quanto proteínas de menor abundância. Embora a composição do sangue seja altamente diversa, acredita-se que apenas vinte e duas proteínas compreendam cerca de 99% do conteúdo proteico total do soro sanguíneo. Nesse grupo de 22 proteínas, conhecidas como proteínas mais abundantes, estão inclusas a albumina, a mioglobina, as imunoglobulinas, transferrina e haptoglobina^{17,35}. Embora essas proteínas tenham um papel funcional no sangue, elas podem interferir na identificação de biomarcadores de doenças humanas¹⁹. Em estudos que focam na descoberta de biomarcadores de doenças humanas, as proteínas de alta abundância são importantes interferentes, sendo recomendado equalizar sua concentração, destacando-se as proteínas de menor abundância, que são potenciais biomarcadores³⁶⁻³⁸.

Nesse contexto, torna-se necessário um preparo de amostra a fim de remover as proteínas abundantes e superar a complexidade do proteoma sanguíneo³⁹. Apesar dos enormes avanços na instrumentação analítica, até o momento não existe um método universal para realizar esse preparo. Portanto, muitos protocolos diferentes para depletar proteínas abundantes podem ser encontrados na literatura, como por exemplo: (i) colunas de HPLC contendo anticorpos para as proteínas mais abundantes, (ii) colunas de *spin* (velocidade), (iii) o uso de produtos químicos, ou mesmo (iv) kits sofisticados usados para comprimir a faixa dinâmica das proteínas em vez de esgotá-las^[26-28].

Park e colaboradores⁴⁰, por exemplo, relataram cadeia leve de neurofilamento (NFL) combinada com proteínas amilóides e tau como biomarcadores para diagnosticar e monitorar o progresso da doença de Alzheimer⁴⁰. De Jesus *et al.*, por sua vez, identificaram treze diferentes proteínas que podem estar associadas ao transtorno bipolar (TB)⁴¹. É importante observar que para todos os estudos citados acima, pelo menos uma condição de preparação da amostra foi usada para minimizar a complexidade da amostra de sangue antes da análise por espectrometria de massa, como colunas de imunodepleção ou kits comerciais (por exemplo, ProteoMiner®). No entanto, apesar da

maioria dessas estratégias resolverem parte da complexidade do sangue, e embora sejam eficazes, algumas estratégias apresentam limitações, como baixo rendimento da amostra, perda não específica de proteínas-albumina e problemas de especificidade de espécie e custo elevado^{42,43}. Além disso, algumas dessas abordagens não são reutilizáveis tornando necessário, a busca por novas estratégias que sejam ambientalmente sustentável e economicamente vantajosas. Nesse sentido, há um grande esforço por parte dos pesquisadores da proteômica em desenvolver novos materiais de baixo custo e reutilizáveis, capazes de simplificar amostras biológicas complexas, inclusive de sangue, e que permitam o enriquecimento de proteínas de baixa abundância com potencial para serem biomarcadores de doenças humanas⁴⁴⁻⁴⁶.

Araújo *et al.*⁴⁷ por exemplo, relataram um novo nanomaterial híbrido à base de magnetita revestido com nanopartículas de ouro semelhantes a morangos, em meio aquoso, para esgotar proteínas de alta abundância de amostras de soro⁴⁷. Porém, neste estudo, os autores utilizaram uma etapa química prévia para simplificar a amostra, evidenciando a baixa eficiência do nanomaterial preparado para remover proteínas de alta abundância. Em outro estudo, de Jesus *et al.*²⁰ relataram nanopartículas magnéticas cruas para esgotar proteínas de alta abundância de amostras de sangue em apenas uma etapa, mostrando o potencial da magnetita bruta para esgotar proteínas de alta abundância formando proteínas corona²⁰. Embora os autores tenham observado remoção significativa de proteínas usando nanopartículas magnéticas cruas, eles também observaram baixa especificidade para o enriquecimento de proteínas de baixa abundância.

2.3 Nanomateriais para aplicações em estudos clínicos

A definição de nanotecnologia surgiu em 1959, quando o físico americano Richard Phillips Feynman propôs a aquisição de materiais em dimensões nanométricas (<100 nm)⁴⁸. A partir de então, a nanotecnologia tem revolucionado as diferentes áreas do conhecimento.

A nanotecnologia se concentra na manipulação, controle e aplicação de nanomateriais para desenvolver novos produtos, dispositivos e processos com

funcionalidade aprimorada, permitindo diversas aplicações tecnológicas, eletrônica, energética e biomédicas⁴⁸⁻⁵⁰.

As nanopartículas magnéticas (NPMs) constituem um importante grupo de nanopartículas (NPs) que podem ser compostos por uma variedade de materiais como ligas metálicas, e óxidos metálicos⁵¹. As propriedades magnéticas fazem com que as NPMs assumam propriedades distintas de outras NPs⁵², permitindo diversas aplicações (bio) analíticas. As nanopartículas de óxidos magnéticos são compostas principalmente por magnetita (Fe_3O_4) e por hematita (Fe_2O_3)⁵³. Elas têm apresentado grande potencial para diversas aplicações tecnológicas, como o armazenamento de informações, uso em dispositivos eletrônicos, diagnósticos médicos⁵⁴, tratamento anticâncer por magnetohipertemia, carreadores de fármacos, separação magnética de células⁵⁵⁻⁵⁷, e remoção de proteínas abundantes em amostras biológicas etc⁴⁹.

A vantagem do uso de NPMs está na síntese desses materiais, que é simples e de baixo custo, além de serem biocompatíveis, apresentar baixa toxicidade e alta capacidade de funcionalização⁵⁸.

As principais rotas sintéticas de NPMs envolvem (i) a coprecipitação, (ii) microemulsão, (iii) decomposição térmica, (iv) solvotérmica, e (v) sonoquímica, além outras^{59,60}.

Tenzer *et al.*, reportaram a síntese de NPs de sílica para simplificar o plasma de sanguíneo humano^{49,61}. Como resultado, os pesquisadores observaram satisfatória redução da complexidade da amostra. Em outro estudo, Araújo *et al.*, mostraram através de seus experimentos a eficácia no uso de NPMs revestidas em ouro na depleção de proteínas presentes no soro na busca de potenciais biomarcadores para o diagnóstico e controle de progressão do mieloma múltiplo⁶⁰. Além disso, de Monopoli e colaboradores reportaram que as MNPs adsorvem menos proteínas do complemento do plasma em concentrações plasmáticas mais altas^{49,62}.

A Tabela 1 resume alguns trabalhos descritos na literatura que apresentam nanomateriais aplicados em estudos para simplificar a amostra de sangue com foco em descobrir biomarcadores de doenças humanas.

Tabela 1- Nanomateriais reportados na literatura para simplificar amostras biológicas com foco em biomarcadores

Nanopartícula	Funcionalização	Sensibilidade	Amostra biológica	Ref.
ZrAs-Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	Grupo Arseniato	10 fmol L ⁻¹	Soro Humano	63
Fe ₃ O ₄ @Au	-	-	Soro Humano	64
Fe ₃ O ₄ @PDA	Polidopamina (PDA)	2 fmol L ⁻¹	Soro Humano	65
Fe ₃ O ₄ @PDA@Zr@MOF	Polidopamina (PDA)	1 fmol L ⁻¹	Soro Humano	66
Fe ₃ O ₄ @MIL-100	-	0,5 fmol L ⁻¹	Soro Humano	67
y- Fe ₃ O ₄ @REVO ₄	-	1x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	Soro Humano	68
Fe ₃ O ₄ @LnPO ₄	-	-	-	69
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ PVA-Cel(IV)	-	5x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	Soro Humano	70
Fe ₃ O ₄ @GO	Óxido de Grafeno	-	Soro bovino	71
AuNPET	-	-	Soro	72

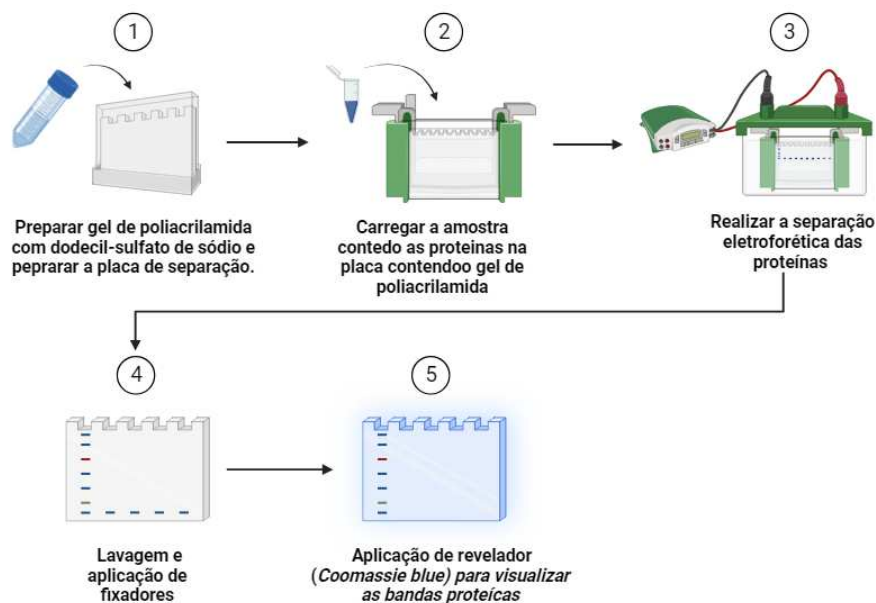
O mecanismo que rege o processo de depleção de proteínas de amostras biológicas na superfície de NPs ainda não está bem claro, no entanto, acredita-se que a depender do tipo de funcionalização, as proteínas podem ser adsorvidas na superfície das NPs por meio de interações de Van der Waals, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas.

2.4 Técnicas analíticas aplicadas na busca por proteínas candidatas a biomarcadores de doenças humanas

2.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional

A eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma técnica amplamente utilizada para separar proteínas baseadas em seu tamanho molecular⁷³. Essa técnica é importante em estudos proteômicos, permitindo a análise da composição proteica de diversas amostras biológicas e clínicas. A Figura 1 ilustra uma das etapas envolvidas em uma análise eletroforética baseada em SDS-PAGE.

Figura 1- Representação esquemática de uma separação eletroforética unidimensional (SDS-PAGE) aplicadas em estudos proteômicos.



Fonte: Autoria própria.

Nas separações eletroforéticas, o gel de poliacrilamida é preparado através da polimerização de monômeros de acrilamida e bisacrilamida em uma solução aquosa (etapa 1 da Figura 1). A proporção entre os dois monômeros determina a porosidade do gel, sendo comum o uso de gel com concentração entre 5% a 20% (m/v) de acrilamida, dependendo do tamanho das proteínas a serem alcançadas. O polímero resultante forma uma matriz tridimensional com poros de diferentes tamanhos⁷⁴.

Antes de aplicar a amostra no gel de poliacrilamida, é comum tratá-las com um detergente aniônico chamado dodecil sulfato de sódio (SDS), que desnatura as proteínas e confere uma carga negativa proporcional à massa das proteínas (etapa 2 da Figura 1). Isso permite que as proteínas sejam separadas principalmente com base em seu tamanho, superando a influência da carga elétrica original das proteínas⁷⁵.

Quando uma corrente elétrica é aplicada ao gel (etapa 3 da Figura 1), as proteínas processadas migram para o polo positivo através da matriz de poliacrilamida. As proteínas são retidas, na malha polimérica, durante a sua migração eletroforética, com proteínas menores passando mais rapidamente pelas porosidades do gel do que proteínas maiores⁷⁶. As proteínas de maior massa molecular tendem a ficar retidas na parte superior do gel.

Após a separação eletroforética, as proteínas são frequentemente marcadas com corantes, tal como o *Coomassie Blue*, que permitem a sua visualização (etapas 4 e 5 da Figura 1). O padrão resultante de bandas indica a distribuição das proteínas com base em seus tamanhos moleculares. Marcadores de tamanho conhecido (pesos moleculares) são, geralmente, usados para estimar o tamanho das proteínas desconhecidas retidas no gel.

Lemanska-Perek *et al.*⁷⁷ reportou o uso de SDS-PAGE aliado a técnica de espectrometria de massas (EM) para identificar potenciais biomarcadores de câncer de bexiga a partir do plasma sanguíneo. Nesse estudo, foi possível identificar três grupos de proteínas com diferença relativas em seus níveis para pacientes e controles saudáveis. O primeiro grupo compreendeu formas modificadas de transferrina, fibrinogênio gama e complemento C3b que estava ausentes em indivíduos saudáveis. O segundo grupo foi composto por haptoglobina, alfa-2-macroglobulina, proteína de ligação à vitamina D e pigmento derivado do epitélio, que foram observadas nas amostras cancerígenas em

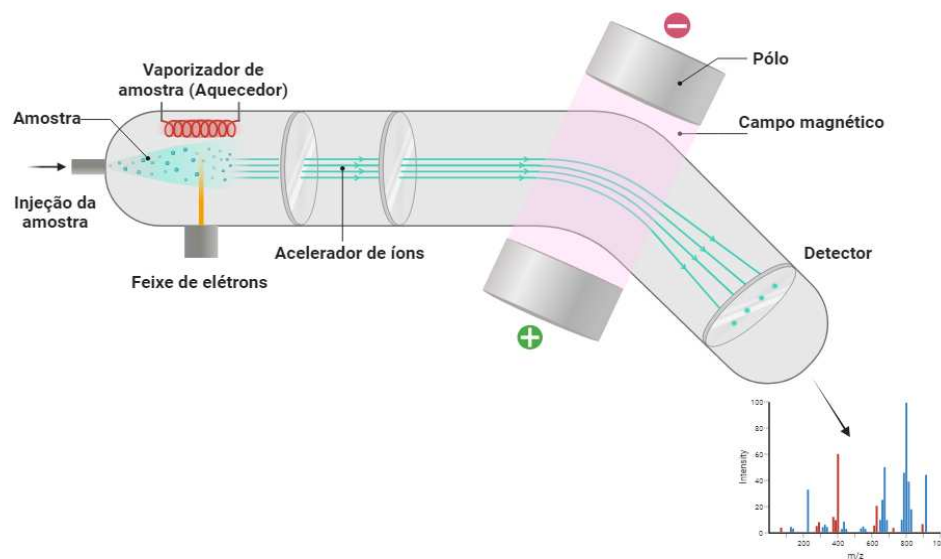
grandes quantidades. Por fim o terceiro grupo consistiu em três formas de imunoglobulina M (IgM), cuja abundância relativa foi significativamente menor nas amostras de pacientes com câncer⁷⁷.

Em estudos de busca de biomarcadores de doenças humanas, a separação eletroforética é aplicada em uma etapa prévia à análise envolvendo a técnica de espectrometria de massas, simplificando a complexidade da amostra e permitido uma análise mais precisa.

2.4.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica poderosa e versátil utilizada para identificar e quantificar moléculas com base em sua razão massa/carga (m/z)⁷⁸. A técnica de EM tem sido amplamente aplicada na identificação, caracterização e quantificação de biomarcadores em estudos de doenças humanas⁷⁹. Esta técnica se baseia em três importantes etapas: (i) ionização; (ii) separação dos íons; e (iii) detecção dos íons. A Figura 2 ilustra uma representação esquemática dos fundamentos da técnica de EM.

Figura 2 - Representação dos fundamentos da espectrometria de massas aplicadas em estudos de proteômica com foco em biomarcadores de doenças humanas.



Fonte: Autoria própria.

O processo de ionização da mostra é realizado para converter as moléculas neutras em íons carregados, uma vez que os íons são mais fáceis de serem manipulados magneticamente, permitindo a sua separação com base em sua razão massa/carga (m/z)^{78,80}. Existem várias técnicas de ionização, no entanto as mais comuns são: (i) a ionização por *electrospray* (ESI)^{81,82} e (ii) a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)⁸³.

A diferença entre ESI e MALDI está associada a condição da amostra. A ionização por ESI ocorre a partir de soluções aquosas, enquanto a ionização por MALDI, o extrato peptídico se encontra em estado sólido misturada a uma matriz ácida que potencializa a ionização após a incidência do laser.

Após o processo de ionização, os íons gerados são então acelerados pela aplicação de um campo elétrico e magnético para o interior de analisador de massas⁸⁴. Os analisadores de massas são responsáveis por separar os íons gerados a partir de sua razão m/z . Os analisadores de massa mais comuns incluem espectrômetros de tempo de voo (TOF)⁸⁵, espectrômetros de quadrupolo (Q)⁸⁶, espectrômetros de armadilha iônica (*ion trap*)^{87,88}, e *orbitrap*^{89,90} entre outros. Os analisadores de massa aplicam campos elétricos e/ou magnéticos para separar os íons de acordo com suas massas. Isto resulta em uma distribuição de sinais de diferentes m/z , que são coletados para gerar o espectro de massa. Os íons separados são detectados por um detector que mede a intensidade dos sinais em função do tempo de chegada ou posição, dependendo do tipo de analisador de massa usada⁹¹. A detecção é feita eletronicamente, convertendo os sinais em pulsos elétricos que são amplificados e registrados. O resultado final da espectrometria de massas é o espectro de massa, que é um gráfico que mostra a intensidade dos sinais (íons) detectados em função das razões m/z ^{78,80} (Figura 2). Cada pico no espectro representa um íon com uma massa específica. A interpretação dos espectros de massa envolve a identificação dos íons e a detecção da massa molecular das apresentadas na amostra. Isso pode ser feito comparando os picos do espectro com bancos de dados de espectros de massas conhecidos ou usando softwares de identificação e análise de dados.

Shu *et al.*⁹² reportou uma estratégia proteômica fazendo usado da técnica de espectrometria de massa combinada com eletroforese em gel e validação proteômica

para identificar potenciais biomarcadores da COVID-19, usando o plasma sanguíneo como amostra biológica. Ao final do estudo, os autores sugeriram um painel de onze proteínas como potenciais marcadores de uma condição de infecção por SARS-CoV-II⁹².

Em outro estudo, Bader *et al.*⁹³ apresentam uma estratégia proteômica baseada em EM altamente reprodutível para detecção de biomarcadores de doença de Alzheimer (DA) a partir do líquido cefalorraquidiano de 197 indivíduos. Como resultado, os pesquisadores observaram diferenças nos níveis de proteínas de pacientes com DA. Proteínas com ligações fortes à neurodegeneração, tais como tau, SOD1 e PARK7, foram observadas em altos níveis para os pacientes com DA, confirmando que tais proteínas podem ser utilizadas para o diagnóstico precoce da doença⁹³.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar, caracterizar e aplicar um novo material nanohíbrido baseado em nanopartícula magnética, e grupo ligante (L-histidina) como um novo adsorvente de baixo custo para enriquecimento de proteínas de baixa abundância em amostras de soro sanguíneo humano com foco na busca de biomarcadores de doenças humanas.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o material nanohíbrido ($\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$).
- Caracterizar o nanomaterial usando nano híbrido as técnicas de Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), Análise termogravimétrica (TGA), Difração de pó de raios X (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Potencial zeta e Dispersão dinâmica de luz (DLS), Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN).
- Realizar o estudo do ponto de carga zero (pH_{PCZ}),
- Encontrar a melhor condição para a remoção das proteínas majoritárias (albumina e imunoglobulina) usando $\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$ sintetizado, usando análise multivariada.

envolvendo três fatores: (i) a razão massa/massa entre adsorvente e amostra, (ii) pH do meio, e (iii) tempo de incubação (planejamento fatorial);

- Traçar o perfil do soro sanguíneo após o processo de depleção, usando eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).
- Identificar as proteínas adsorvidas na superfície de Fe₃O₄@L-his;
- Realizar estudo de reusabilidade de Fe₃O₄@L-his.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produtos Químicos e Reagentes

Com exceção dos reagentes utilizados para a síntese da nanoesfera magnética, todos os reagentes apresentaram alto grau de pureza (>95%). Cloreto de ferro (III) hexahidratado, citrato de sódio (Na₃Cit.2H₂O) e etilenoglicol foram obtidos da *Synth* (São Paulo, Brasil). Padrão de amostra de soro e L-histidina foram adquiridos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA). Etanol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e acetonitrila foram obtidos da Dinâmica Química (São Paulo, Brasil). Tris-base, acrilamida/bis-acrilamida, glicina, azul de bromofenol, ditioneitol (DTT), ureia, tiourea, glicerol, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). β-mercaptoetanol, persulfato de amônio (APS), *coomassie* azul brilhante G-250 (CBB) foram obtidos de JT Baker (Mex, México). Água deionizada (resistividade > 18,0 MΩ cm) foi produzida usando um sistema de purificação de água Millipore (França).

4.2 Preparação de nanopartículas (Fe₃O₄)

Para a preparação da nanoesfera magnética o método desenvolvido por Zheng *et al.*⁹⁴ foi aplicado. Resumidamente, aproximadamente 0,51g de FeCl₃.6H₂O, 0,90 g de acetato de sódio e 0,15 g de Na₃Cit.2H₂O foram dissolvidos em etilenoglicol. A solução amarela homogênea obtida foi transferida para um reator de aço inoxidável, e então aquecida a 200 ° C por 10 h. Após a reação, o material preparado foi separado com um

ímã, lavado com água e etanol e em seguida seco a uma temperatura de 40 °C por 4 horas.

4.3 Preparação de Fe₃O₄@L-his

Nanopartículas de Fe₃O₄ (0,18 g) foram dispersas em 15,00 mL de solução de etanol: água (1:1, v/v), 0,20 g de Cu(NO₃)₂ e 17,00 µL de HCl (37%, m/v). Em seguida, 5,00 mL de solução de etanol: água (1:1, v/v) contendo 0,40 g de L-his foram adicionados à suspensão acima. A mistura foi agitada com ultrassom à temperatura ambiente por 60 min. O nanomaterial foi coletado com um ímã e lavado com solução de etanol: água (1:1, v/v).

A eficiência de carregamento (LE, %) de L-his na superfície da nanopartícula foi definida como a razão entre a concentração de equilíbrio (C_{equilíbrio}) e a concentração inicial (C_{inicial}) de L-his, conforme descrito pela equação 1:

$$LE (\%) = \frac{C_{equilíbrio}}{C_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.4 Caracterização da Fe₃O₄@L-his

4.4.1 Difração de raio X em pó

A análise por difração de raio X (DRX) permite determinar a estrutura cristalina de materiais sólidos⁹⁵. A técnica de DRX em pó utiliza um feixe de raios X para interagir com o material cristalino em pó, apresentado em um padrão característico de difração devido à dispersão dos raios X pelos planos de átomos na estrutura cristalina. Esse padrão de difração é registrado e analisado para obter informações sobre a organização atômica do material^{95,96}.

Para obter informações da estrutura cristalina, a análise de difração de raios X em pó foi realizada à temperatura ambiente usando um difratômetro Rigaku com geometria Bragg-Brentano em modo contínuo na faixa 2θ de 25 a 700° usando radiação CuKα.

4.4.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) permite medir as mudanças de massa de uma amostra à medida que a temperatura é controladamente aumentada durante o experimento⁹⁷. Por meio da TGA, é possível investigar as propriedades térmicas e o comportamento de diferentes materiais. A técnica é especialmente útil para estudar a estabilidade térmica, determinar a composição, identificar componentes voláteis e analisar processos de reação e reações químicas que ocorrem na amostra durante o aquecimento⁹⁸.

Através da curva termogravimétrica, é possível identificar os eventos térmicos da amostra, tais como perdas de massa relacionadas à liberação de água ou solventes, mudanças de fases, reações de dissolução, entre outros. Essas informações são essenciais para compreender as características do material sintetizado⁹⁹.

Nesse estudo, TGA foi realizada em uma termobalança (2950, TA Instruments). Para isso, aproximadamente 3,00 mg de sólido sintetizado foram colocados em porta amostras de alumina e as análises posteriores foram realizadas. As amostras foram analisadas sob fluxo de nitrogênio (50 mL min^{-1}) aquecido de 25 a 900°C , a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia e estrutura da superfície das nanopartículas sintetizada, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada¹⁰⁰. MEV é uma técnica de imagem que utiliza feixes de elétrons para obter imagens de alta resolução. Neste estudo, as imagens de MEV foram adquiridas com um microscópio JEOL JSM-360 - LV operando a 20 kV com imagens eletrônicas secundárias. As amostras foram analisadas em um porta amostras Cu-Zn metalizado com uma camada de ouro de 10 nm (revestimento por pulverização catódica Bal-tec MED020).

4.4.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise por infravermelho foi realizada para avaliar a eficiência da funcionalização das nanopartículas magnéticas pelo ligante (L-his). Um FT-IR (Nicolet 6700, Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, MA, EUA) equipado com um acessório ATR com um cristal de germânio foi utilizado para verificar a funcionalização do nanomaterial. O monitoramento foi feito na faixa do infravermelho médio ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$).

4.4.5 Análise elementar por CHN

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) do material sintetizado foi realizada em um instrumento Varian MACRO, equipado com um detector de condutividade. O tubo de combustão foi montado a 1150°C e o tubo de redução a 850°C . A sulfanilamida foi utilizada como CHN padrão. A análise elementar CHN permite confirmar as informações obtidas pela análise do FT-IR evidenciando ou não a funcionalização das nanopartículas magnéticas.

4.4.6 Potencial Zeta

O potencial zeta é uma ferramenta fundamental para compreender o comportamento coloidal de suspensões e emulsões^{101,102}. O potencial zeta é determinado pela distribuição de cargas elétricas na superfície das partículas coloidais e é influenciado pelas propriedades do dispersante (geralmente um líquido). Quando partículas coloidais se dispersam em um líquido, elas podem adsorver íons da solução, adquirindo uma camada de cargas elétricas na superfície. Esse fenômeno é conhecido como "dupla camada elétrica". Se o potencial zeta é alto e as partículas têm cargas opostas, as partículas coloidais tendem a se dispersar e se manter em suspensão estável, pois as cargas elétricas repelem umas às outras, evitando que as partículas se agreguem. Por outro lado, se o potencial zeta é baixo, ou as partículas têm cargas semelhantes, as forças de atração podem superar as forças de repulsão, levando à aglomeração e formação de agregados.

O potencial zeta é realizado através de técnicas onde se aplica um campo elétrico às partículas em suspensão e se mede sua velocidade de condução. Com base nessa velocidade, pode-se calcular o potencial zeta^{102,103}.

Nesse estudo, o potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética usando um Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600 (modelo Malvern, Reino Unido), enquanto o tamanho de partícula e o índice de polidispersão (PDI) foram medidos por dispersão dinâmica de luz (DLS). Antes das medições, as amostras foram diluídas em água ultrapura e solução aquosa de NaCl 10 mmol L⁻¹ (para medir o potencial Zeta) de acordo com as instruções dos fornecedores.

4.5 Determinação do ponto de carga zero (pH_{PCZ})

O método descrito por Mahmood *et al.*¹⁰⁴ com pequenas modificações foi usado para avaliar a carga de ponto zero (pH_{PCZ}). Este método é baseado na mudança de pH. Resumidamente, foram preparadas soluções aquosas de NaCl 0,100 mol L⁻¹ com volume de 50,00 mL. Em seguida, o pH inicial das soluções, variando entre 2,0 e 11,0, foi ajustado com soluções de HCl e NaOH, ambas com concentração de 0,100 mol L⁻¹. Em seguida, cerca de 50,00 mg de material foi adicionado a cada solução, e as misturas resultantes foram colocadas sob agitação mecânica (20 rpm) por 24 horas à temperatura ambiente. O pH_{PCZ} é determinado no pH no qual a carga superficial líquida do material é zero. Neste pH, a diferença entre o pH_{final} e o pH_{inicial} (Δ pH) é zero. Δ pH foi determinado pela equação 2:

$$\Delta_{pH} = pH_{final} - pH_{inicial} \text{ (Equação 2)}$$

4.6 Experimento de adsorção

O estudo de adsorção de proteínas em Fe₃O₄@L-his foi realizado pelo método descrito por Gul *et al.*¹⁰⁵ com poucas modificações. Para este estudo, a albumina de soro bovino (BSA) foi usada como padrão de proteína. Quantidades conhecidas de material sintetizado (12,00 mg) foram incubadas com solução de BSA (1,50 mL) de concentrações conhecidas (5-20 µg mL) a 42 °C por 24 horas. O pH 5,5 foi ajustado usando tampão

citrato. Após atingir o equilíbrio, a concentração de proteína restante foi estimada usando um espectrofotômetro (evolution 600, Thermo Scientific) em λ 595 nm. A capacidade de adsorção (Q_e , mg g⁻¹) do material sintetizado foi calculada de acordo com a equação 3:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m} V \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, V é o volume da solução de proteína (mL) e m é a massa de Fe₃O₄@L-his (g). C₀ é a concentração inicial de proteína (mg mL⁻¹) C_e é a concentração de proteína sobrenadante (mg mL⁻¹). As isotermas de adsorção foram ajustadas pelo modelo de Langmuir (equação 4) e pelo modelo de Freundlich (equação 5) [94].

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_i} + \frac{C_e}{q_{max}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\ln q_e = \ln k_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (\text{Equação 5})$$

Onde, K_L é a constante de equilíbrio de adsorção de Langmuir (L mg⁻¹) relacionada à energia de adsorção. q_{max} é a capacidade máxima de adsorção (mg g⁻¹). K_F (mg^{1-1/n} L^{1/n} g⁻¹) é a constante de equilíbrio de Freundlich que indica a capacidade de adsorção do sistema. n representa a intensidade de adsorção. Normalmente, quando n > 1, a isoterma é favorável, e quando n < 1, a isoterma é desfavorável.

4.7 Estudo cinético de adsorção

No estudo da cinética de adsorção, aproximadamente 40,00 mg de Fe₃O₄@L-his foram incubados com 1,50 mL de solução de BSA por diferentes tempos de incubação até 24 horas a 42°C. Em seguida, o método de Bradford foi usado para quantificar a proteína residual usando um espectrofotômetro em λ = 595 nm. A concentração aparente de proteína foi analisada por modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (equação 6) e pseudo-segunda ordem (equação 7)¹⁰⁶.

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (\text{Equação 6})$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{t}{q_e} + \frac{1}{k_2 q_e^2} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde, q_t e q_e referem-se à quantidade de proteína adsorvida (mg g^{-1}) em cada tempo (min) e no equilíbrio, respectivamente. K_1 é a constante de taxa de reação de pseudo-primeira ordem (min^{-1}). K_2 é a constante de velocidade para uma reação de pseudo-segunda ordem (min^{-1}).

4.8 Amostras de soro humano

Amostras de soro humano foram utilizadas nesse estudo. As amostras foram coletadas de voluntários anônimos no Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas, Brasil em colaboração com os professores Marco Zezzi Arruda (Instituto de Química da UNICAMP) e Cláudio Eduardo Muller (Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP), após aprovação pelo Comitê de Ética local (protocolo número 775/2010). Um *pool* de quinze amostras de soro sanguíneo foi utilizado para o estudo.

4.9 Preparo da amostra

4.9.1 Enriquecimento de proteínas pouco abundantes usando $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$

Para obter a condição ideal para enriquecer proteínas pouco abundantes de amostras de soro, um planejamento fatorial completo (2^3) foi realizado. Os fatores avaliados foram: (i) relação $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ /amostra (1:1; 1:5; 1:10 m/m); (ii) pH (5,0; 7,4 e 9,2); e (iii) temperatura (4; 25 e 37°C). A Tabela 2 mostra os níveis codificados das variáveis independentes. A análise composta central (superfície de resposta) foi usada para o ajuste do modelo.

Tabela 2- Os níveis codificados das variáveis independentes.

Corrida	Temperatura (°C)	pH	Razão
A11	0	-1,68	0
A1	-1	-1	-1
A16(C)	0	0	0
A3	-1	1	-1
A2	-1	-1	1
A6	1	-1	1
A10	1,68	0	0
A14	0	0	1,68
A7	1	1	-1
A8	1	1	1
A15 (C)	0	0	0
A9	-1,68	0	0
A5	1	-1	-1
A13	0	0	-1,68
A12	0	1,68	0
A4	-1	1	1

A Tabela 3 mostra a matriz utilizada para desenvolver o experimento (2^3). As análises foram realizadas aleatoriamente, garantindo que as variáveis incontrolláveis fossem distribuídas ao longo do experimento, evitando vieses (tendências).

Tabela 3- Matriz para o planejamento fatorial (2^3)

Variáveis	Símbolos	Códigos Variáveis		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	x ₁	4	25	37
pH	x ₂	5.0	7.4	9.2
Razão (amostra/material)	x ₃	1:1	1:5	1:10

Uma série de alíquotas de soro foi utilizada para verificar a influência do processo de enriquecimento em proteínas de baixa abundância. 20 µL de solução de soro (54 µg

μL^{-1} da concentração de proteína total) foram misturados com $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ (em diferentes massas) para obter as seguintes proporções de material/proteína: 1:2, 1:5, 1:10. Em seguida, foi adicionado DTT 500 mM fresco (2,2 μL) à mistura e agitado brevemente no vórtex. O pH foi ajustado usando tampão citrato (0,100 mol L^{-1} , pH 5,0), tampão fosfato (0,100 mol L^{-1} , pH 7,4) e tampão carbonato (0,100 mol L^{-1} , pH 9,2). A mistura foi encubada por 90 min a uma temperatura que variou de 4 a 42°C. Após a extração da proteína, o sobrenadante e a fase sólida (*pellet*), que continha a proteína adsorvida na superfície da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$, foram separados magneticamente. O sobrenadante foi transferido para um tubo LoBind limpo (Eppendorf). A proteína adsorvida na superfície da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ foi reconstituída em 100 μL de uma solução contendo uréia (7 mol L^{-1}) e tiourea (2 mol L^{-1}) e armazenada a -20 °C até a quantificação e análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

4.9.2 Estudo de reusabilidade

O estudo de reciclabilidade foi realizado utilizando uma solução de uréia (7 mol L^{-1}) e tiourea (2 mol L^{-1}) seguida de vórtex (2 min) e centrifugação (8 000 rpm por 5 min). A eficiência de reuso foi avaliada por eletroforese em gel (SDS-PAGE). Para avaliar a estabilidade do nanomaterial sintetizado, testes de reuso foram realizados por cinco ciclos de adsorção e dessorção.

4.9.3 Depleção de proteínas usando solvente orgânico

Para este estudo, foi aplicado o protocolo, previamente descrito por Kay *et al.*¹⁰⁷ usando acetonitrila (ACN). Resumidamente, 20 μL de soro humano foram transferidos para um microtubo eppendorf, diluídos com 40 μL de água e agitados no vórtex. Em seguida, aproximadamente 90 μL de ACN foram adicionados e a amostra foi sonicada por 20 min. Para separar o *pellet* (corpo de fundo) e o sobrenadante, o extrato foi centrifugado por 10 minutos em temperatura ambiente a uma rotação de 13.000 xg . Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para um novo microtubo, sendo a amostra

reconstituída em 100 µL de solução contendo uréia (7,00 mol L⁻¹), tiourea (2,00 mol L⁻¹). Em seguida, a amostra foi armazenada a -20°C até posterior quantificação e análise por SDS-PAGE.

4.10 Quantificação de proteínas

O método de Bradford foi usado para determinar a concentração de proteína no sedimento e no sobrenadante. Resumidamente, uma curva analítica para BSA foi preparada com uma faixa linear de 0,0 a 25,0 µg mL⁻¹. Alíquotas de 3,0 a 5,0 µL de cada amostra foram transferidas para um microtubo Eppendorf, e o reagente de Bradford foi adicionado ao microtubo e misturado. Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro Uv-vis e a absorbância foi medida a 595 nm. A curva de calibração foi então usada para determinar a concentração de proteína nas amostras. Cada experimento foi realizado em triplicata. A equação a seguir descreve a eficiência de extração de proteínas (E):

$$E = (C_e/C_0) \times 100\% \text{ (Equação 8)}$$

Onde, C_e é a concentração de proteína no equilíbrio (µg mL⁻¹) e C₀ é a concentração inicial de proteína (µg mL⁻¹).

4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Sete microlitros (7 µL) de amostra de soro bruto ou amostra de soro tratado foram misturados com tampão de amostra (10% v/v β-mercaptoetanol, 50% v/v glicerol, Tris-base 40 mmol L⁻¹, pH 6,8; 10% p/v SDS, 0,1% v/v azul de bromofenol) na proporção de 1:1. A desnaturação complementa da amostra foi promovida por aquecimento (98 °C) durante 3 min. Em seguida, 12% (p/p) géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram executados para cada amostra. As condições das corridas eletroforéticas foram: 200 V por 50 min. Em seguida, o gel foi corado com *coomassie brilliant blue G-250* (CBB) por 1 hora e descolorido por lavagem com solução contendo 50% (v/v) de água, 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético por 24 horas em temperatura ambiente.

4.12 Espectrometria de massas

Após a etapa de digestão com tripsina, os peptídeos obtidos foram secos e resuspensores em ácido fórmico (0,1%, v/v). Posteriormente, a mistura de peptídeos resultante foi analisada por MALDI-TOF-TOF (Waters Co., Manchester, Reino Unido). O espectrômetro de massa foi operado no modo de íons positivos. Os espectros foram adquiridos na faixa m/z de 600–3500. Para identificação de proteínas, o *Mascot Server* 2.3 MS/MS foi usado com os seguintes parâmetros: oxidação de metionina como modificação variável, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, falha de clivagem de tripsina e tolerância de $\pm 0,1$ Da para precursor e fragmentos de íons. O limite de significância foi estabelecido em um mínimo de 95% ($p < 0,05$), correspondendo a uma pontuação mínima de 30.

4.13 Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foram utilizados os softwares MetaboAnalyst (versão 5), Origin® (versão 2018) e STATITISTIC (versão 7). A Análise de Variância (ANOVA) foram usados para determinar as diferenças significativas entre os ensaios. Foram realizados ensaios em triplicado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

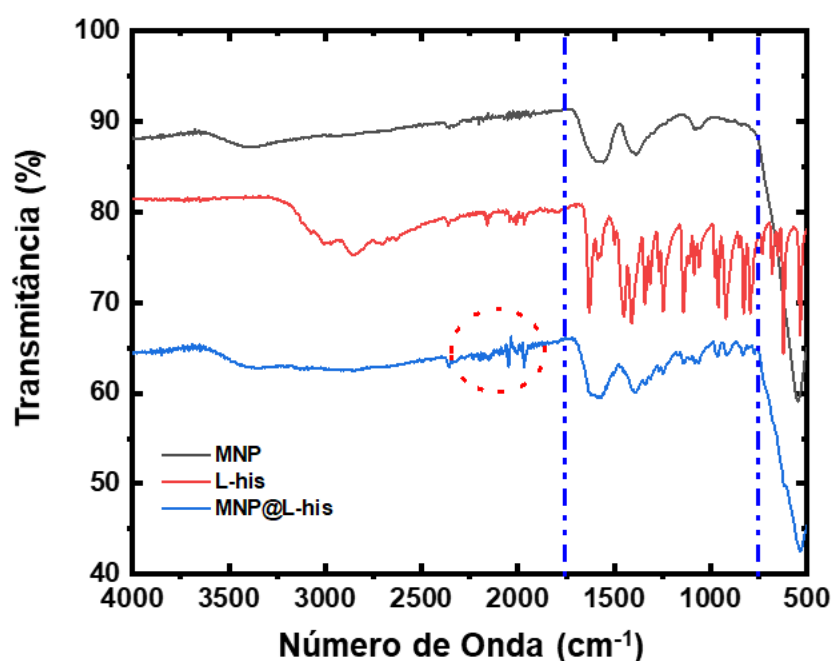
5.1 Caracterização da Fe₃O₄@L-his

A síntese bem-sucedida de Fe₃O₄@L-his foi totalmente caracterizada por FT-IR, análise elementar (CHN), TGA, MEV, DRX, potencial zeta, DLS e estudo de ponto de carga zero (pH_{PCZ}).

5.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FT-IR foi empregada para certificar a modificação bem-sucedida das nanopartículas magnéticas com L-his. A Figura 3 mostra os espectros de infravermelho para a nanopartícula bruta, L-his e o material sintetizado ($\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$).

Figura 3- Espectro na região de FTIR onde: (—) Nanopartícula bruta de Fe_3O_4 ; (—) L-histidina; (—) Material Sintetizado - $\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$



Na Figura 3 é possível observar que a superfície da nanopartícula magnética foi modificada satisfatoriamente. A banda de absorção em $\sim 3330\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída às frequências de alongamento da amina ($-\text{NH}_2$) características da L-his. Os picos de absorção correspondentes às frequências de estiramento assimétrico e simétrico do carboxilato (COO^-) podem ser observados em 1635 cm^{-1} e 1411 cm^{-1} . Em $\sim 2700\text{ cm}^{-1}$, os picos de absorção indicam frequências de estiramento resultantes de C-H. Além disso, o pico em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ é atribuído ao alongamento $-\text{NH}$ de acordo com as vibrações de alguns aminos carboxilatos e carboxilatos¹⁰⁸. Além disso, a presença de nanopartículas

de óxido de ferro é evidenciada pelas fortes bandas de absorção em torno de 570-590 cm^{-1} que confirmam o alongamento metal-oxigênio (Fe-O)¹⁰⁸.

5.1.2 Análise elementar por CHN

A funcionalização do nanomaterial foi confirmada por análise elementar de CHN (Tabela 4). A análise elementar por CHN, fornece informações básicas sobre composição química de um material e sobre a presença dos elementos Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio.

Tabela 4-Resultado da análise elementar (CHN) para o material sintetizado.

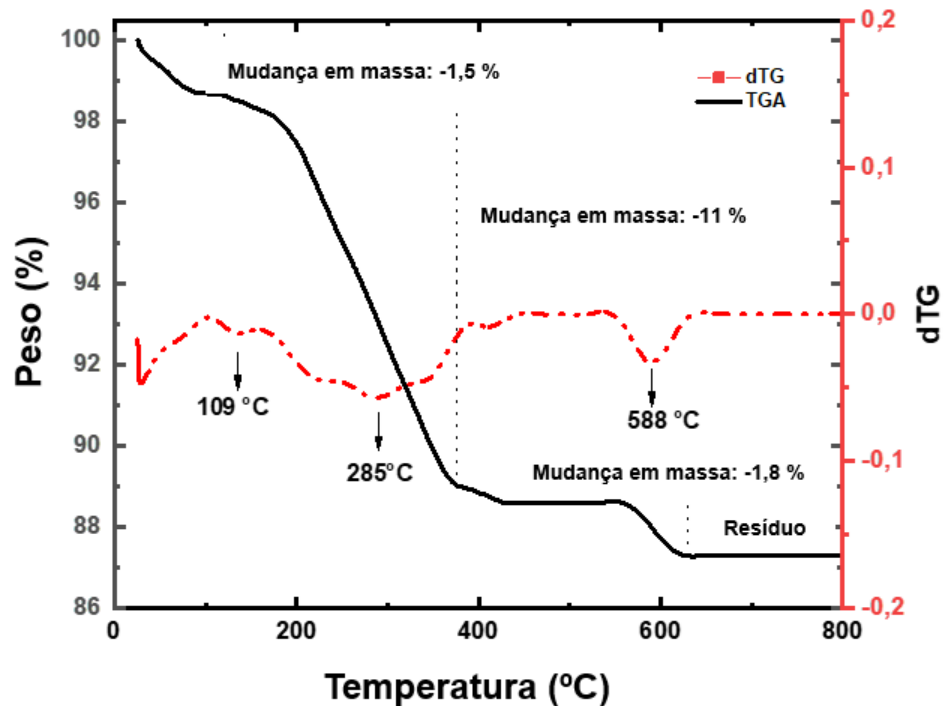
Material	C (%)	H (%)	N (%)
Fe_3O_4	0,00	0,42	0,00
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$	73,05	6,48	2,59

De acordo com a Tabela 4, a análise de CHN sugere que L-his permanece adsorvida quimicamente na superfície do óxido de ferro.

5.1.3 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ foi avaliada por meio de análise termogravimétrica. A Termogravimetria é uma técnica que mede a variação da massa de uma amostra conforme a temperatura ou tempo de aquecimento são controlados. É utilizada para determinar umidade, componentes voláteis, cinzas, estudar a cinética de decomposição e degradação térmica oxidativa de substâncias. Essa análise fornece informações essenciais sobre a composição e comportamento térmico de materiais diversos⁹⁷. O termograma resultante deste estudo é apresentado na Figura 4.

Figura 4- Termograma da decomposição térmica de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$



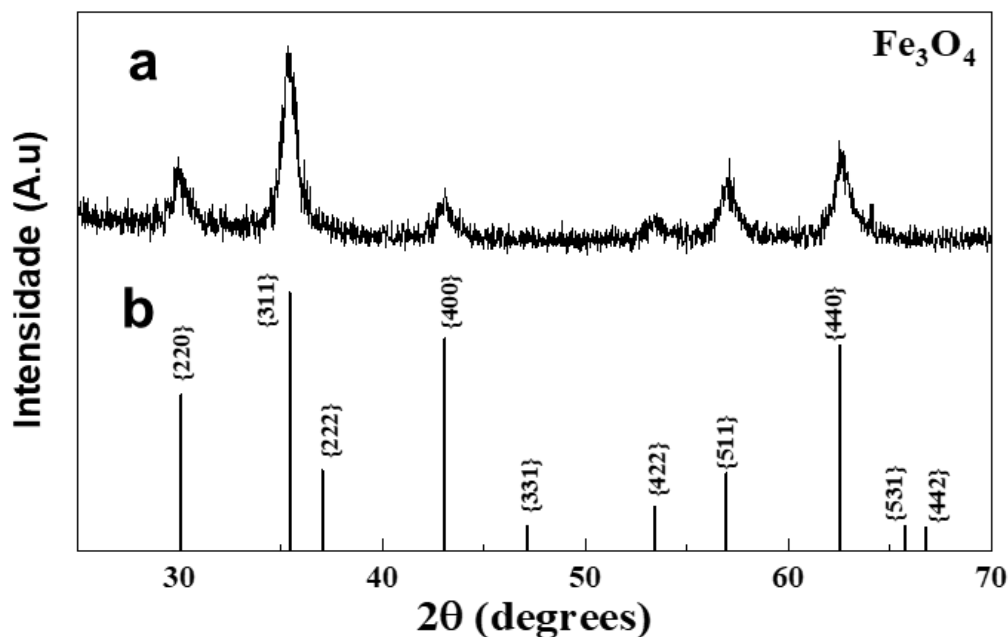
Com base no termograma da Figura 4, pode-se observar que há uma perda de peso inicial em temperaturas abaixo de 200°C para a amostra. Isso é atribuído à remoção de resíduos de água e solvente. Após este evento, o material apresentou uma perda de massa de aproximadamente 2%. Quando as temperaturas continuaram subindo acima de 250°C , o material continuou a perder peso ($\sim 11\%$). Possivelmente, neste evento térmico, ocorreu a decomposição de L-his. Em seguida, uma lenta perda de massa de aproximadamente 2% foi observada a 585°C . Após isso, a massa do material manteve-se estável atingindo o resíduo. Esses resultados indicam que a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ possui estabilidade térmica satisfatória e que houve boa adesão do L-his à superfície do Fe_3O_4 durante o processo de síntese.

5.1.4 Difratomia de raio X (DRX)

A técnica de difração de Raios-X é de extrema importância na caracterização de estruturas cristalinas, utilizando as células unitárias dos cristais para permitir a difração do feixe de raios-X em direções específicas. Os feixes difratados são então detectados

com base no ângulo de difração (2θ)^{94,95}. Por meio da análise das posições angulares e da intensidade desses feixes, é possível determinar a estrutura dos materiais de interesse⁹⁵. A fase cristalina da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ foi então investigada por DRX (Figura 5).

Figura 5- Difratoograma experimental de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$.



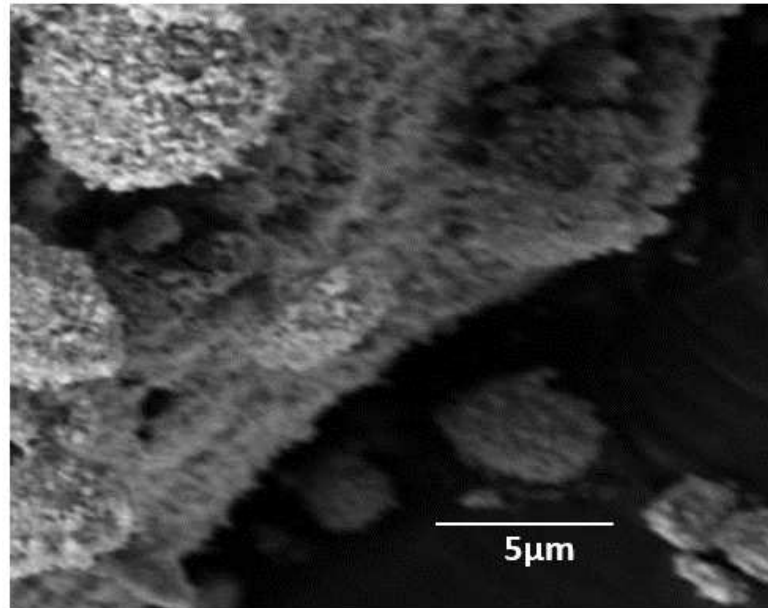
O difratograma experimental da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ (Figura 5-a) mostrou boa concordância com a estrutura padrão de Fe_3O_4 (Figura 5-b), o que provou que as partículas alcançaram estabilidade de fase e integridade estrutural. Os principais picos de DRX para $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ foram a $30,1^\circ$, $35,5^\circ$, $43,1^\circ$, $53,4^\circ$, $57,0^\circ$ e $62,6^\circ$, correspondendo às posições indexadas de (220), (311), (400), (422), (511) e (440), respectivamente (Figura 5-b)¹⁰⁹.

5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para analisar sua microestrutura e prever as propriedades do material sintetizado, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi aplicada. Essa técnica fornece imagens detalhadas e de alta resolução das superfícies dos materiais, possibilitando a

caracterização da morfologia do material, composição química e determinação da estrutura⁹⁹. A estrutura morfológica do Fe₃O₄ revestido com L-his foi analisada usando MEV (Figura 6).

Figura 6- Micrografia da Fe₃O₄@L-his.



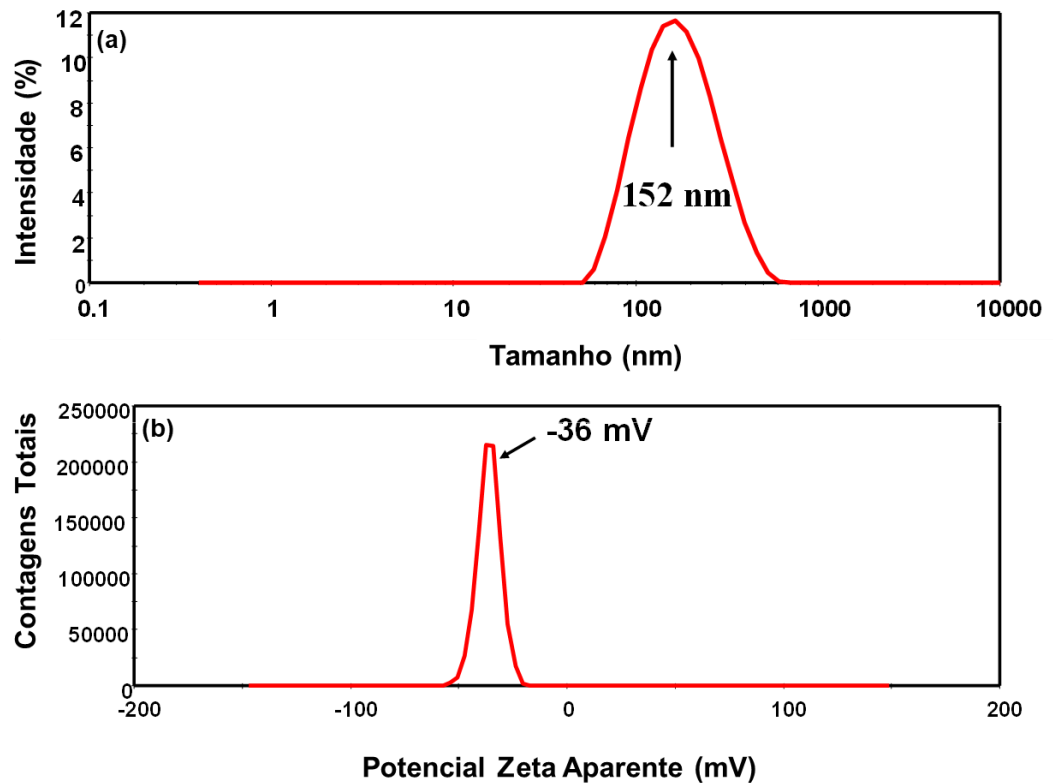
As nanopartículas exibem predominantemente morfologia esférica, o que revela a natureza cristalina das nanopartículas de óxido de ferro.

5.1.6 – Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é essencial para determinar o tamanho hidrodinâmico e a distribuição de nanopartícula. Ela se baseia no espalhamento multidirecional da luz que ocorre quando a amostra é iluminada. A análise é feita através das flutuações na intensidade dessa luz espalhada em um ângulo específico¹¹⁰. A análise DLS indicou um tamanho médio de partícula de 152±9 nm com um índice de polidispersão (PDI) inferior a 0,2 (Figura 7-a). Os resultados do nanomaterial

desenvolvido neste estudo mostraram uma distribuição de tamanho estreita adequada para sistemas nanométricos.

Figura 7- (a) Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS); (b) Potencial Zeta



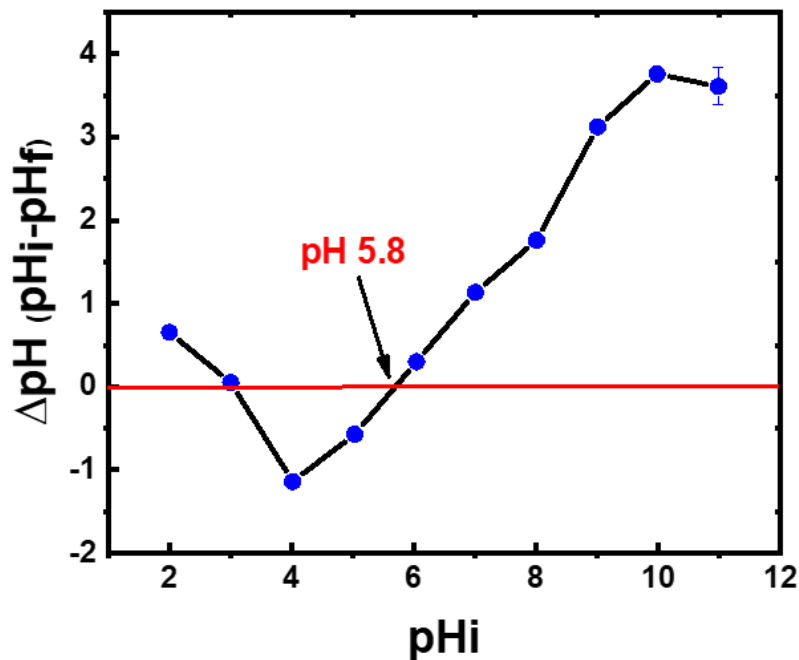
O potencial Zeta indica o potencial de superfície das partículas. Considerando que grandes forças repulsivas tendem a impedir a agregação devido a colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes, um valor relativamente alto, em módulo, do potencial Zeta indica uma boa estabilidade físico-química da suspensão contendo as nanoesferas¹¹¹. A análise do potencial zeta foi de $-36,0 \pm 2,8$ mv (Figura 7-b).

5.1.7 Experimento da determinação do ponto de carga zero (pH_{PCZ})

A partir do experimento pH_{PCZ} , observou-se que a $Fe_3O_4@L$ -his tem um ponto de carga zero em pH 5,8 (Figura 8). Isso indica que, nesse pH, as cargas negativas e

positivas presentes na superfície do nanomaterial são iguais, resultando em uma carga global igual a zero. Assim, observou-se que a superfície do material assume carga negativa para pHs > 5,8 e carga positiva para pHs < 5,8, sugerindo que a adsorção de proteínas pode ser favorecida pelo ajuste do pH.

Figura 8- Estudo do Ponto de carga zero (pH_{PCZ}).



5.2 Otimização multivariada para enriquecimento de proteínas de baixa abundância usando $\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$

Para avaliar a condição ideal para o enriquecimento de proteínas séricas humanas de baixa abundância, uma estratégia de análise multivariada foi realizada, incluindo (i) planejamento fatorial completo (2^3) e (ii) delineamento composto central (DCC).

Para avaliar as variáveis independentes que podem influenciar o enriquecimento de proteínas pouco abundantes usando $\text{Fe}_3\text{O}_4@L\text{-his}$, um planejamento fatorial completo foi realizado. Três fatores foram testados: (i) relação amostra/material (1:1, 1:5, 1:10); (ii) pH (5,0, 7,4, 9,2) e (iii) temperatura (4, 25, 42°C). Em seguida, o DCC foi utilizado para avaliar a condição ótima do processo, dependendo da recuperação (%) de proteínas. O

software STATISTICS 7 foi utilizado para obtenção dos dados estatísticos. A Figura 9 mostra os gráficos de superfície de resposta obtidos para a recuperação de proteínas, indicando a condição ótima.

Figura 9- Análise Multivariada – (A,B,C) Gráfico tridimensional da superfície de resposta; (D,E F) Gráfico das curvas de nível.



Conforme mostrado na Figura 9, as condições ideais para o enriquecimento de proteínas de baixa abundância foram alcançadas usando a (i) relação material: amostra de 1:3, (ii) temperatura de incubação a 42°C e (iii) pH 5,5. Nestas condições, o nanomaterial foi capaz de adsorver a maior quantidade de proteínas em sua superfície. Os resultados mostrados na Figura 9 podem ser descritos usando um modelo quadrático do tipo:

$$Z = -126.8 + 9.9 * x_1 - 0.1 * x_1^2 + 11076.5 * x_3 - 17.8 * x_3^2 - 0.1 * 7.1 * x_1 - 161.4 * x_1 * x_3 - 709.8 * 7.1 * x_3 + 90.7$$

A Tabela 5 mostra o resultado da extração de proteína, usando Fe₃O₄@L-his após otimização multivariada.

Tabela 5- Total de proteína (µg mL⁻¹) após planejamento fatorial completo 2³

Corrida	Temperatura (°C)	pH	Razão	Concentração (µg mL ⁻¹)
A11	0	-1,68	0	274.7184611
A1	-1	-1	-1	245.0097093
A16(C)	0	0	0	261.3733744
A3	-1	1	-1	231.8168811
A2	-1	-1	1	273.9822112
A6	1	-1	1	278.9893186
A10	1,68	0	0	225.0399544
A14	0	0	1,68	272.5276408
A7	1	1	-1	266.0294501
A8	1	1	1	243.7190219
A15 (C)	0	0	0	258.3733744
A9	-1,68	0	0	252.2805972
A5	1	-1	-1	277.5782736
A13	0	0	-1,68	291.4740354
A12	0	1,68	0	273.6842446
A4	-1	1	1	269.0156141

A qualidade do ajuste dos dados foi avaliada usando ANOVA. A Tabela 6 mostra ANOVA para otimização DCC.

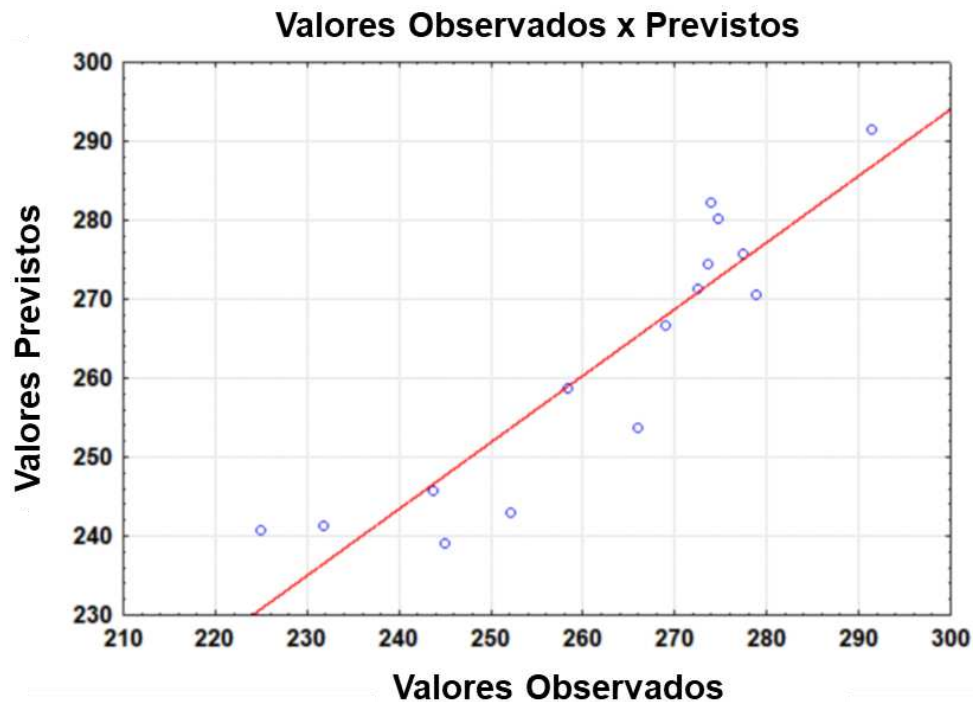
Tabela 6- Dados ANOVA para o delineamento composto central (DCC)

Fator	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F_{calc} (95%)	p-valor
x₁	293.541	1	293.5414	2.235504	0.04855
x₂	664.48	1	664.4803	5.06044	0.065482
x₃	851.028	1	851.0281	6.48112	0.043737
Interações x₁ vs x₂	46.899	1	46.8989	0.357165	0.571935
Interações x₁ vs x₃	544.436	1	544.4365	4.14623	0.087902
Interações x₂ vs x₃	220.692	1	220.6919	1.680709	0.242457
Erro Puro	787.853	6	131.3088		
Resíduo Total	5038.857	15			
R²	0.84364				
R ajustado	0.9165				

x₁ – Temperatura; x₂ – pH; x₃ – razão (amostra: material)

Com base na Tabela 6, é possível observar que as variáveis independentes (razão de massa e temperatura) influenciam significativamente a adsorção de proteínas na superfície da nanoesfera. Além disso, observou-se que, para o método de extração proposto, o modelo quadrático não apresentou falta de ajuste ao nível de confiança de 95%. Portanto, a Fe₃O₄@L-his pode ser usada para extrair proteínas de forma adequada e confiável. A Figura 10 mostra valores previstos *versus* valores obtidos experimentalmente. O coeficiente de determinação (R²) de 0,84 e R-ajustado de 0,91 (Tabela 6) indicam uma correlação adequada entre os dados, explicando satisfatoriamente o modelo proposto.

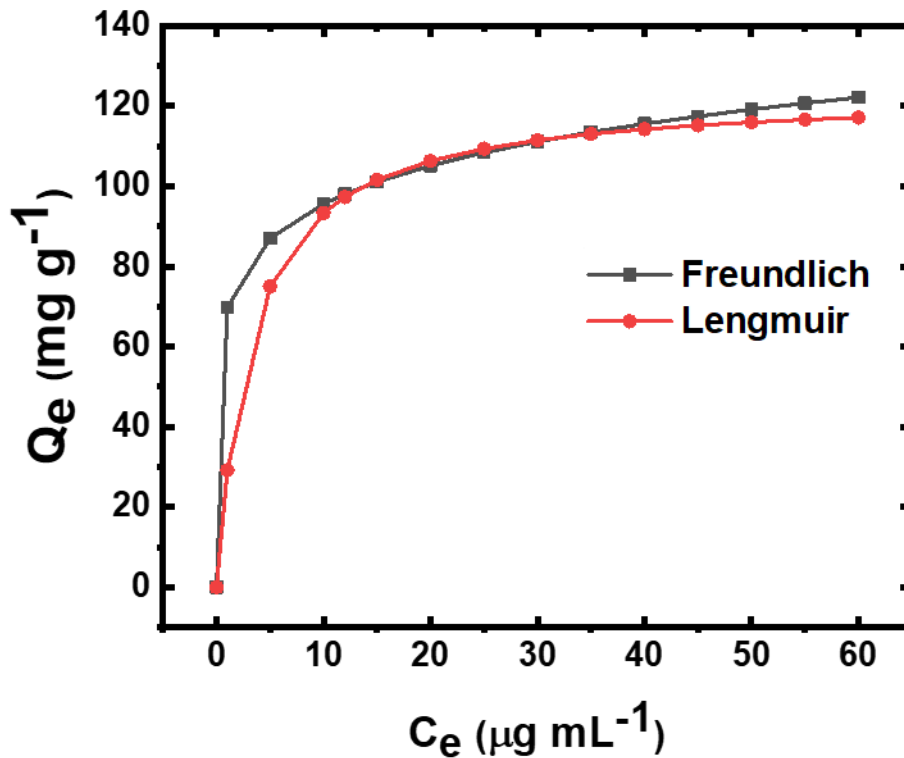
Figura 10- Valores observados vs previstos após otimização multivariada, usando $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$.



5.3 Estudo da Isoterma de Adsorção

As isotermas de adsorção permitem explicar como o nanomaterial preparado (adsorvente) interage com o analito de interesse (adsorvato), em condições de equilíbrio e temperatura constante¹¹². As duas principais equações isotérmicas (Langmuir e Freundlich) foram utilizadas para explicar e modelar os dados experimentais obtidos neste estudo. Os experimentos foram conduzidos nas condições ótimas obtidas no estudo de otimização multivariada. A massa do adsorvente foi de 12,00 mg, pH 5,5 e temperatura de 42°C. Foi usado o programa Origin® (versão 2018) para realizar uma análise de regressão não linear de mínimos quadrados com base nos dados experimentais e, em seguida, os parâmetros isotérmicos característicos foram obtidos. A Figura 11 ilustra os gráficos obtidos a partir das isotermas de adsorção segundo os modelos de Langmuir e Freundlich.

Figura 11- Isoterma de Adsorção da Fe₃O₄@L-his



A Tabela 7 resume os parâmetros obtidos após as análises dos modelos matemáticos das isotermas.

Tabela 7- Parâmetros obtidos a partir do estudo isotérmico

Modelo	Parâmetro	
Isoterma de Langmuir	K_L ($mL\ mg^{-1}$)	0.31
	q_{max} ($mg\ g^{-1}$)	123.45
	R^2	0.88
Isoterma de Freundlich	K_F ($mL^{1/n}\ mg^{(1-1/n)}/g$)	69.83
	n	7.32
	R^2	0.95

A isoterma de Langmuir revela que a capacidade máxima teórica de adsorção (q_{max}) da Fe₃O₄@L-his pode ser de 123,45 mg de adsorvato por 1,00 g de material (Tabela 7). Neste modelo, assume-se que o material é revestido por uma monocamada e que há adsorção homogênea de uma molécula adsorvida na superfície do material

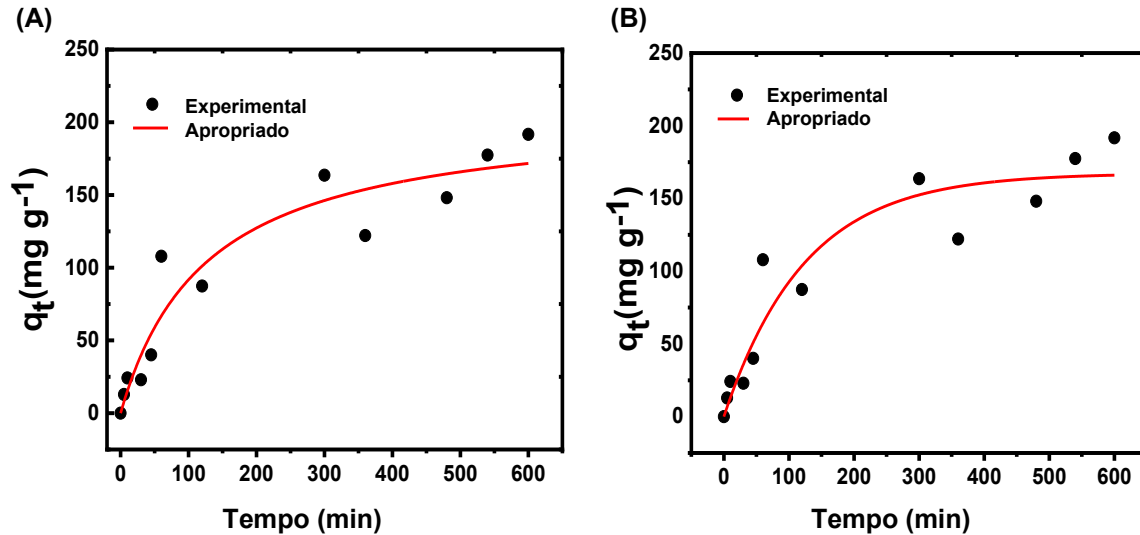
constituída por uma distribuição de sítios energeticamente equivalentes e não interativos¹¹². Em outras palavras, este modelo assume que, uma vez que uma molécula captura um sítio, outros sítios são impedidos de realizar adsorção adicional. Na isoterma de Langmuir, a energia de ativação de adsorção de cada molécula é igual.

Ao contrário da isoterma de Langmuir, a isoterma de Freundlich é um modelo baseado em 3 suposições bem definidas: (i) a adsorção é multicamada, (ii) há interações entre as moléculas adsorvidas, (iii) a adsorção na superfície heterogênea não é ideal, não uniforme e reversível¹¹². Considerando a isoterma de Freundlich, pode-se observar que a Fe₃O₄@L-his tem forte interação com as proteínas, pois apresentou “n” igual a 7,3 e um $K_F = 69,8 \text{ mL}^{1/n} \text{ mg}^{(1-1/n)} / \text{g}$ (Tabela 7). A adsorção favorável pode ser obtida quando os valores de “n” estão entre 1 e 10. Além disso, valores mais altos de K_F resultam em maiores capacidades de adsorção. Considerando o R^2 , este estudo pode ser bem representado pela isoterma de Freundlich, pois apresentou um R^2 igual a 0,95, enquanto para a isoterma de Langmuir o R^2 foi de 0,88 (Tabela 7). De fato, este modelo corrobora com os dados de caracterização do material, que indicam uma superfície heterogênea, permitindo uma adsorção não ideal, não uniforme e reversível.

5.4 Estudo da Cinética de Adsorção

Outro processo importante a ser avaliado no processo de adsorção por um novo material é a cinética de adsorção. Neste estudo é possível entender o comportamento e mecanismo de adsorção¹¹³. De acordo com os resultados experimentais observados nas Figuras 12 A e B, a adsorção das proteínas na superfície da Fe₃O₄@L-his foi muito rápida nos primeiros 30 minutos devido à presença de vários sítios ativos livres no adsorvente. Após a ocupação gradativa dos sítios ativos, observou-se uma diminuição na taxa de adsorção, bem como na eficiência de adsorção. Para avaliar a cinética do processo de adsorção, dois modelos cinéticos, pseudo-primeira ordem (Figura 12 A) e pseudo-segunda ordem (Figura 12 B) foram aplicados para ajustar os dados experimentais.

Figura 12- Cinética de adsorção da Fe₃O₄@L-his onde: (A) Pseudo-primeira ordem e (B) Pseudo-segunda ordem



A Tabela 8 resume os parâmetros obtidos para cada modelo.

Tabela 8- Parâmetros obtidos a partir do estudo cinético

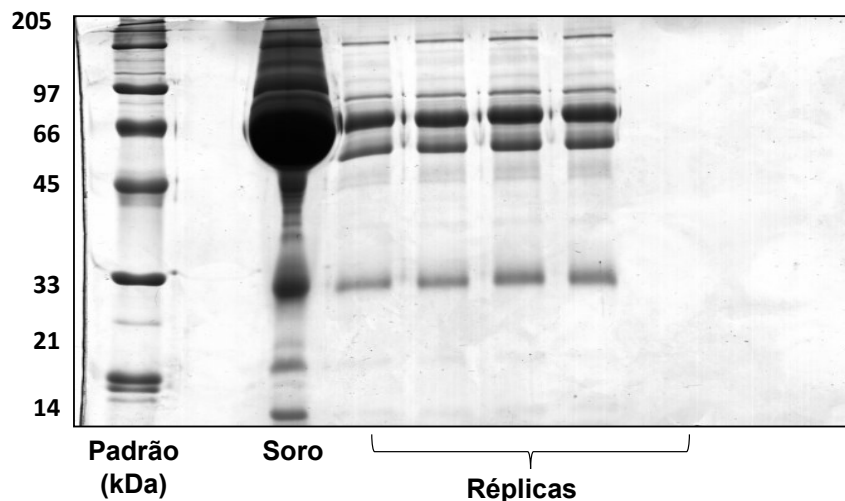
Modelo	Parâmetro	
Pseudo-primeira ordem	$q_e (mg\ g^{-1})$	167.3 ± 13.1
	$K (1/min)$	$8.1 \times 10^{-3} \pm 2.3 \times 10^{-3}$
	R^2	0.9045
Pseudo-segunda ordem	$q_e (mg\ g^{-1})$	207.9 ± 24.3
	$K (1/min)$	$3.8 \times 10^{-5} \pm 1.8 \times 10^{-6}$
	R^2	0.9153

A validade de cada modelo pode ser verificada pelo R^2 . O valor de R^2 da pseudo-segunda ordem foi maior ($R^2 = 0,9153$) quando comparado ao valor da pseudo-primeira ordem ($R^2 = 0,9045$), sugerindo que o processo de adsorção entre nanomaterial e proteína pode seguir um pseudo-segundo mecanismo cinético de ordem. Este resultado sugere que há pelo menos duas etapas durante o processo de adsorção entre proteínas e Fe₃O₄@L-his.

5.5 Eficiência de equalização de proteínas usando Fe₃O₄@L-his

Obtidas as condições ótimas para a simplificação das amostras de soro com Fe₃O₄@L-his, foram obtidos os perfis eletroforéticos do *pellet* (nanopartícula + proteínas). A Figura 13 ilustra a imagem do gel de SDS-PAGE após a análise.

Figura 13- Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com *Coomassie Brilliant Blue R250*.



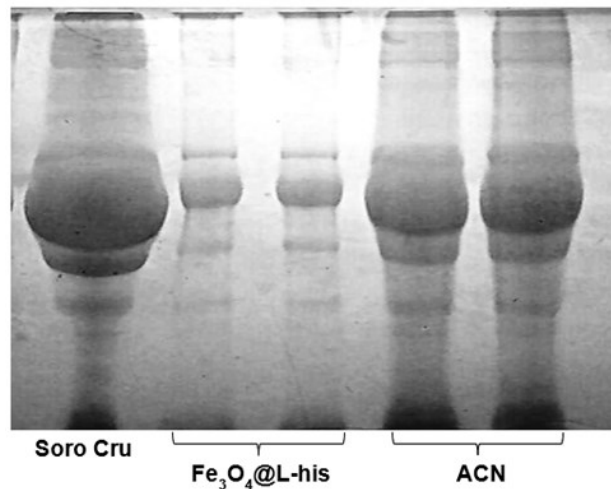
A partir da Figura 13 é possível avaliar a eficiência da equalização de proteínas de alta e baixa abundância na amostra de soro. Quando o *pellet* (Fe₃O₄@L-his + proteína) é comparado com o soro bruto, observa-se um aumento na resolução das bandas. Além disso, a resolução da banda do *pellet* indica claramente a remoção de algumas proteínas de alto peso molecular (> 80 kDa), bem como o enriquecimento daquelas de baixo peso molecular, quando comparadas ao sobrenadante e ao soro bruto. Além disso, observou-se que a Fe₃O₄@L-his reduziu significativamente a albumina, destacando-se a banda de 66 kDa.

Embora o mecanismo físico de adsorção ainda não esteja totalmente resolvido, sabe-se que a adsorção de proteínas na superfície da Fe₃O₄@L-his pode ser um processo multifatorial que depende não apenas do meio, mas do tipo de proteínas que

interagem com a L-his que está carregada na superfície da nanopartícula. Várias forças podem estar envolvidas no processo de adsorção, incluindo interações de *van der Waals*, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e, principalmente, interações eletrostáticas⁹⁴. O ajuste do pH do meio pode influenciar fortemente a interação proteína-proteína e proteína- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@L-his}$ ²⁰.

Quando o método utilizando a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@L-his}$ é comparado ao método ACN descrito por Kay¹⁰⁷, observa-se uma maior eficiência de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@L-his}$ para o enriquecimento de proteínas de baixa abundância (Figura 14) como gelsolina, plasminogênio, componente subcomponente C1s, antitrombina-III, fibronectina, alfa-2-macroglobulina (Tabela 9).

Figura 14- Eletroforese em gel comparando a eficiência do uso do método de depleção com $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@L-his}$ e com ACN em duplicata.



Parte dessas proteínas estão envolvidas em importantes funções moleculares e processos biológicos, incluindo o envolvimento de doenças humanas. Por exemplo, Rick *et al.*¹¹⁴ associaram a fibronectina a alterações específicas do câncer. A gelsolina foi relatada como um importante regulador multifuncional da estrutura celular e do metabolismo, sendo associada ao câncer, lesão cardíaca e doença pulmonar¹¹⁵, e a alfa-2-macroglobulina foi associada à inflamação, infecções e função imunológica¹¹⁶. Além disso, é importante notar que das 20 proteínas mais abundantes, apenas cinco foram identificadas usando $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@L-his}$ de um total de 49 proteínas (redundância não

excluída), enquanto usando o método ACN, aproximadamente doze de alta as proteínas de abundância foram identificadas de um total de 41 proteínas (redundância não excluída) (Tabela 9).

Tabela 9- Identificação de proteínas após aplicação de depleção de ACN e Fe₃O₄@L-his.

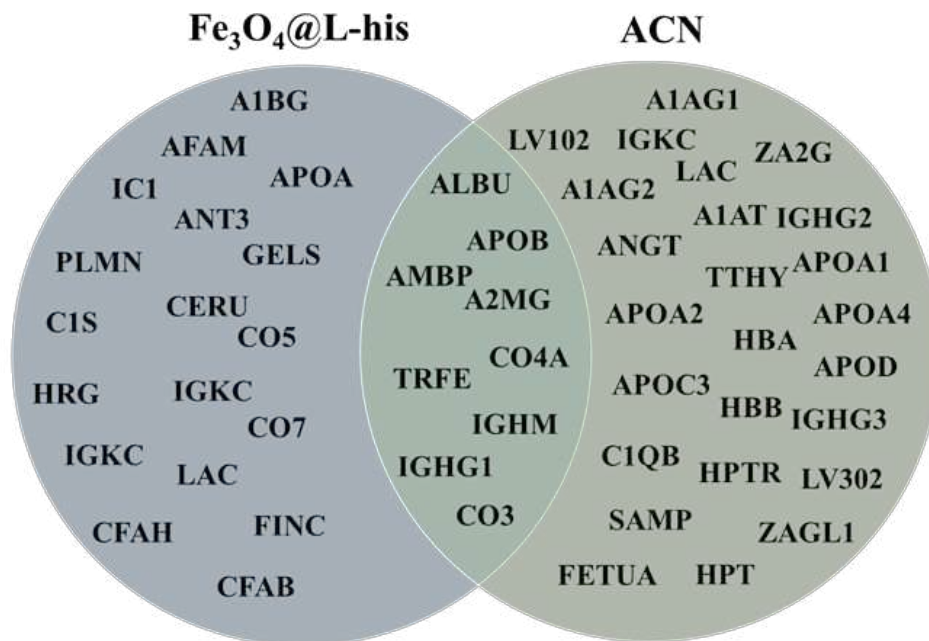
Método	Proteína	Nome de entrada	pl	MM (Da)	score	Cobertura (%)
Depleção com ACN	região C da cadeia kappa de Ig	IGKC	5.58	11773	30	18
	Apolipoproteína C-III	APOC3	5.23	10845	111	23
	Transtirretina	TTHY	5.52	15991	101	13
	Alfa-1-antitripsina	A1AT	5.37	46878	96	8
	Apolipoproteína A-II	APOA2	6.26	11282	23	21
	Subunidade beta da hemoglobina	HBB	6.75	16102	162	52
	Subunidade alfa da hemoglobina	HBA	8.72	15305	146	44
	sorotransferrina	TRFE	6.81	79280	47	5
	albumina sérica	ALBU	5.92	71317	118	10
	Alfa-1-antitripsina	A1AT	5.37	46878	108	27
	Angiotensinogênio	ANGT	5.87	534069	38	7
	Alfa-1-antitripsina	A1AT	5.37	46878	576	24
	Apolipoproteína A-IV	APOA4	5.28	45371	182	17
	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	A1AG1	4.93	23725	167	27
	zinco-alfa-2-glicoproteína putativa tipo 1	ZAGL1	5.84	23080	67	4
	zinco-alfa-2-glicoproteína	ZA2G	5.57	34.079	82	13
	Alfa-2-HS-glicoproteína	FETUA	5.43	40098	133	6
	Angiotensinogênio	ANGT	5.87	53406	126	8
	Apolipoproteína A-IV	APOA4	5.28	45371	499	38
	Zinco-alfa-2-glicoproteína	ZA2G	5.57	34079	154	17
	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	A1AG1	4.93	23725	125	26
	Alfa-1-Antitripsina	A1AT	5.37	46878	108	8
	Haptoglobina	HPT	6.13	45861	104	5
	Alfa-1-glicoproteína ácida 2	A1AG2	5.03	23873	79	17
	Apolipoprotein D	APOD	5.06	21547	100	17
	Transthyretin	TTHY	5.52	15991	89	9
	Proteína relacionada à haptoglobina	HPTR	6.63	39518	202	9
	Alfa-1-antitripsina	A1AT	5.37	46878	181	8
	Apolipoproteína C-III	APOC3	5.23	10845	98	16

Método	Proteína	Nome de entrada	pl	MM (Da)	score	Cobertura (%)
	Apolipoproteína A-II	APOA2	6.26	11282	31	21
	Apolipoproteína A-I	APOA1	5.56	30759	718	67
	Complemento C3	CO3_HUMANA	6.02	188569	455	5
	Complemento C1q subcomponente subunidade B	C1QB_HUMANA	8.83	26670	247	20
	Regiões C da cadeia lambda de Ig	LAC_HUMANA	6.92	11401	187	46
	Componente amilóide P sérico	SAMP_HUMANA	6.10	25485	119	20
	Região C da cadeia Ig gama-1	IGHG1_HUMANA	8.46	36596	111	7
	Região C da cadeia Ig gama-3	IGHG3_HUMANA	8.23	42287	79	6
	LOI da região V-III da cadeia lambda de Ig	LV302_HUMANA	4.95	12042	59	21
	Complemento C4-A	CO4A_HUMANA	6.65	194247	44	1
	Região C da cadeia Ig gama-2	IGHG2_HUMANA	7.66	36505	44	7
	Cadeia lambda Ig região V-I HA	LV102_HUMANA	9.07	12003	44	11
Fe ₃ O ₄ @L-his	Apolipoproteína B-100	APOB_HUMANA	6.61	516666	701	12
	albumina sérica	ALBU_HUMANA	5.92	71317	237	28
	Glicoproteína rica em histidina	HRG_HUMANA	7.09	60510	196	15
	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMANA	6.00	164614	152	12
	Complemento C3	CO3_HUMANA	6.02	188569	135	4
	Proteína AMBP	AMBP_HUMANA	5.95	39886	76	17
	Complemento C4-A	CO4A_HUMANA	6.65	194247	59	0
	Região C da cadeia Ig gama-1	IGHG1_HUMANA	8.46	36596	48	7
	Apolipoproteína A	APOA_HUMANA	5.58	514737	44	0
	região C da cadeia mu de Ig	IGHM_HUMANA	6.35	49960	34	5
	sorotransferrina	TRFE_HUMANA	6.81	79280	792	32
	Inibidor da protease plasmática C1	IC1_HUMANA	6.09	55347	374	15
	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMANA	6.00	164614	364	9
	Gelsolina	GELS_HUMANA	5.90	86043	292	12
	Plasminogênio	PLMN_HUMANA	7.04	93247	216	9
	Subcomponente C1s do complemento	C1S_HUMANA	4.86	78174	69	2
	Antitrombina-III	ANT3_HUMANA	6.32	53025	63	2
	região C da cadeia mu de Ig	IGHM_HUMANA	6.35	49960	54	6

Método	Proteína	Nome de entrada	pl	MM (Da)	score	Cobertura (%)
	Componente do complemento C7	CO7_HUMANA	6.09	96650	45	2
	Afamin	AFAM_HUMANA	5.64	70963	43	2
	Fibronectina	FINC_HUMANA	5.45	266034	56	4
	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMANA	6.00	164614	54	8
	Fator de complemento H	CFAH_HUMANA	6.21	143680	547	28
	ceruloplasmina	CERU_HUMANA	5.44	122983	196	13
	região C da cadeia kappa de Ig	IGKC_HUMANA	5.58	11773	194	51
	Complemento C5	CO5_HUMANA	6.11	189897	118	5
	Regiões C da cadeia lambda de Ig	LAC_HUMANA	6.92	11401	113	32
	sorotransferrina	TRFE_HUMANA	6.02	188569	108	11
	Plasminogênio	PLMN_HUMANA	7.04	93247	46	2
	albumina sérica	ALBU_HUMANA	5.92	71317	662	60
	Fator de complemento B	CFAB_HUMANA	6.67	86847	462	32
	Plasminogênio	PLMN_HUMANA	7.04	93247	407	37
	Inibidor da protease plasmática C1	IC1_HUMANA	6.09	55347	310	24
	Região C da cadeia Ig gama-1	IGHG1_HUMANA	8.46	36596	155	37
	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMANA	6.00	164614	121	10
	Complemento C4-A	CO4A_HUMANA	6.65	194247	78	1
	ceruloplasmina	CERU_HUMANA	5.44	122983	667	31
	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMANA	6.00	164614	418	22
	Apolipoproteína B-100	APOB_HUMANA	6.61	516666	179	5
	Região C da cadeia Ig gama-1	IGHG1_HUMANA	8.46	36596	109	32
	Regiões C da cadeia lambda de Ig	LAC_HUMANA	6.92	11401	42	28
	sorotransferrina	TRFE_HUMANA	6.81	79280	35	5
	sorotransferrina	TRFE_HUMANA	6.81	79280	1154	55
	albumina sérica	ALBU_HUMANA	5.92	71317	889	59
	região C da cadeia mu de Ig	IGHM_HUMANA	6.35	49960	433	36
	Região C da cadeia Ig gama-1	IGHG1_HUMANA	8.46	36596	120	24
	Alfa-2-macroglobulina	A2MG_HUMANA	6.00	164614	51	3
	Afamin	AFAM_HUMANA	5.64	70963	50	15
	Alfa-1B-glicoproteína	A1BG_HUMANA	5.58	54809	49	8

Das 90 proteínas identificadas (redundância não excluída) pelos métodos ACN e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ descritas na Tabela 9, nove proteínas foram comuns para ambos os métodos (Figura 15). Portanto, esses resultados sugerem que $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ pode ser usado para a descoberta de biomarcadores de doenças humanas a partir da amostra de soro.

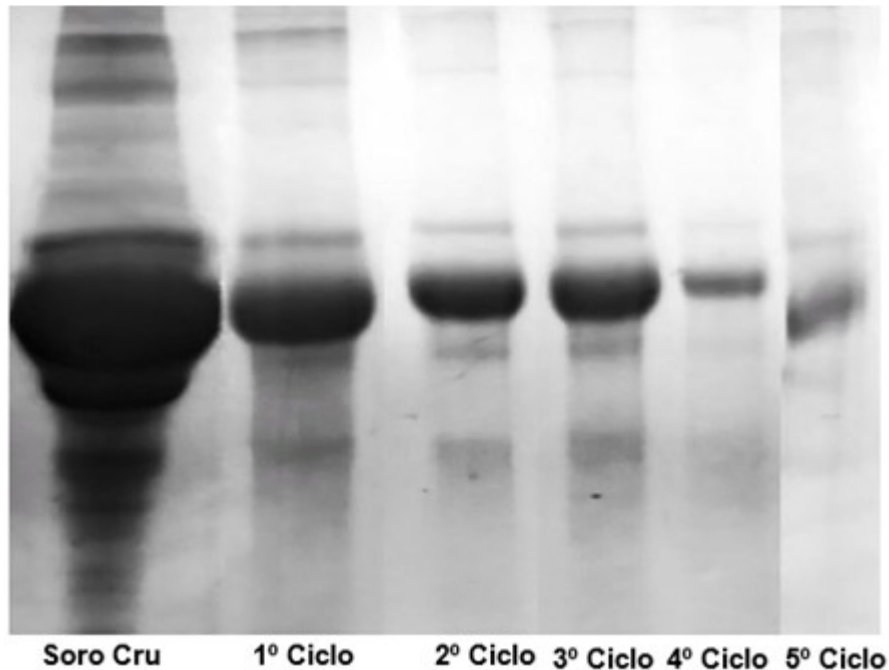
Figura 15- Proteínas identificadas na depleção utilizando o método $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ e ACN.



5.6 Estudo de reuso da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$

Para evitar a geração de poluentes emergentes e gerar maior custo-benefício, a regeneração do material adsorvente é uma propriedade de grande valia. No presente estudo, nenhuma diminuição significativa na capacidade de adsorção de proteínas foi observada após quatro ciclos consecutivos de adsorção-dessorção, conforme mostrado na Figura 16. No entanto, observou-se que no quinto ciclo de adsorção/dessorção, o material apresentou perda na eficiência de adsorção de proteínas, indicando que o material compósito possui relativa estabilidade a longo prazo, podendo ser utilizado até quatro vezes de reciclagem.

Figura 16- Eletroforese em gel comparando a eficiência do reuso da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$.



6. CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho foi alcançado. Aqui, a síntese e caracterização da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ foram devidamente apresentadas. Além disso, após otimização multivariada, observou-se que a nanoesfera magnética monocamada foi capaz de simplificar a amostra de soro humano, permitindo o enriquecimento de proteínas de baixa abundância. Assim, o uso da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{L-his}$ pode ser considerada uma abordagem alternativa para técnicas de depleção de proteínas baseadas em imun química (que são caras e demoradas) em estudo de proteômica para procurar biomarcadores de doenças humanas.

7. PERSPECTIVAS

- Explorar a viabilidade de novas amostras para a detecção de biomarcadores de doenças, com destaque para a saliva e a urina, que ganharam reconhecimento devido à sua coleta não invasiva e à sua distinção em relação ao soro sanguíneo.

REFERÊNCIAS

- ¹ J.R. De Jesus, M. Arruda, Human disease biomarkers: challenges, advances, and trends in their validation, *J Integr OMICS*. 11 (2021) 16–28.
<https://doi.org/10.5584/jiomics.v11i2.207>.
- ² V.C. Sgarbieri, M.T.B. Pacheco, *Brazilian Journal of Food Technology*. 20 (2017) 1-23.
<https://doi.org/10.1590/1981-6723.00717>.
- ³ F.A.S. Addor, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 11 (2018) 437–443.
<https://doi.org/10.2147/CCID.S177448>.
- ⁴ Huang, J.T.J.; Leweke, F.M; Oxley, D.; Wang, L.; Harris, N.; Koethe, D.; Gerth, C.W.; Nolden, B.M.; Gross, S.; Schreiber, D.; Reed, B.; Bahn, S. Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis. *Plos medicine*, v. 3, n. 1.1, p. 2145–2158, 2006.
- ⁵ Von thun und hohenstein-blaul, n.; funke, s.; grus, f. H. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Experimental eye research*, v.117, p.126–37, 2013.
- ⁶ Lei Zhang; He Li; David Benedek; Xiaoxia Li; Robert Ursano (2009). A strategy for the development of biomarker tests for PTSD., 73(3), 0–409.
doi:10.1016/j.mehy.2009.02.038
- ⁷ S. Esteban, P. Moya, A. Fernandez-Suarez, M. Vidaurreta, P. Gonzalez-Peramato, M. Sanchez-Carbayo. Diagnostic and prognostic utility of methylation and protein expression patterns of myopodin in colon cancer. *Tumour Biol.*, 33 (2012), pp. 337-346, 10.1007/s13277-012-0320-8.
- ⁸ Njoku, K. et al. Proteomic Biomarkers for the Detection of Endometrial Cancer. *Cancers*, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1572, 16 out. 2019.
- ⁹ Troncoso MF, Ortiz-Quintero J, Garrido-Moreno V, Sanhueza-Olivares F, Guerrero-Moncayo A, Chiong M, Castro PF, García L, Gabrielli L, Corbalán R, Garrido-Olivares L, Lavandero S. VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021 Sep 1;1867(9):166170. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166170. Epub 2021 May 14. PMID: 34000374.
- ¹⁰ May BM, Pimentel M, Zimmerman LI, Rohde LE. GDF-15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Arq Bras Cardiol*. 2021 Mar;116(3):494-500. English, Portuguese. doi: 10.36660/abc.20200426. PMID: 33566936; PMCID: PMC8159541.
- ¹¹ Giusti, L.; Mantua, V., Da Valle, Y.; Ciregia, F.; Ventroni, T.; Orsolini, G.; Donadio, E.; Giannaccini, G.; Mauri, M.; Cassano, G.B.; Lucacchini, A. Search for peripheral biomarkers in patients affected by acutely psychotic bipolar disorder: a proteomic approach. *Molecular biosystems*, v. 10, n. 6, p. 1246–1254, 2014.

- ¹² Shao, S.; Guo, T.; Aebersold, R. Mass spectrometry-based proteomic quest for diabetes biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, [s. l.], v. 1854, n. 6, p. 519–527, jun. 2015.
- ¹³ Fanali, G. *et al.* Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 209–290, jun. 2012.
- ¹⁴ M. Khalil, C.E. Teunissen, M. Otto, F. Piehl, M.P. Sormani, T. Gattringer, C. Barro, L. Kappos, M. Comabella, F. Fazekas, A. Petzold, K. Blennow, H. Zetterberg, J. Kuhle, Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders, *Nat Rev Neurol*. 14 (2018) 577–589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>.
- ¹⁵ Zamora-Obando, H. *et al.* Biomarcadores moleculares de doenças humanas: conceitos fundamentais, modelos de estudo e aplicações clínicas. *Química nova*, 2022.
- ¹⁶ EE, P. Y. *et al.* Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high abundance proteins for biomarker discovery. *Bioanalysis*, v. 11, n. 19, p. 1799–1812, out. 2019.
- ¹⁷ H. Zhang, High Throughput Quantitative Analysis of Serum Proteins Using Glycopeptide Capture and Liquid Chromatography Mass Spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics*. 4 (2004) 144–155.
- ¹⁸ R.S. Tirumalai, Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome, *Mol. Cell. Proteomics*. 2 (2003) 1096–1103.
- ¹⁹ A. Sussulini, H. Dihazi, C.E.M. Banzato, M.A.Z. Arruda, W. Stühmer, H. Ehrenreich, O. Jahn, H.D. Kratzin, Apolipoprotein A-I as a candidate serum marker for the response to lithium treatment in bipolar disorder, *Proteomics*. 11 (2011) 261–269.
- ²⁰ Jesus, J. R. *et al.* Depleting high-abundant and enriching low-abundant proteins in human serum: An evaluation of sample preparation methods using magnetic nanoparticle, chemical depletion and immunoaffinity techniques. *Talanta*, [s. l.], v. 170, p. 199–209, ago. 2017.
- ²¹ Wu, C. *et al.* Contributions of immunoaffinity chromatography to deep proteome profiling of human biofluids. *Journal of Chromatography B*, [s. l.], v. 1021, p. 57–68, maio 2016.
- ²² World Health Organization — International Programme on Chemical Safety (IPCS) — Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles Geneva; 1993.
- ²³ Patel, S. Role of proteomics in biomarker discovery and psychiatric disorders: current status, potentials, limitations and future challenges. *Expert review proteomics*. n.9, p.249–265, 2012
- ²⁴ Atkinson, A.J; Warren, G. *et.al*, Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. (2001). *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89–95. doi:10.1067/mcp.2001.113989

- ²⁵ Lauwerys R.R. Industrial Chemical Exposure Guidelines for Biological Monitoring 2^a ed. London: Lewis Publishers; 1993.
- ²⁶ C. Fernandez, V. Calamia, P. Fernández-Puente, J.-L. Capelo, C. Ruiz-Romero, F.J. Blanco, Sequential depletion of human serum for the search of osteoarthritis biomarkers, *Proteome Sci.* 10 (2012) 55.
- ²⁷ J.R. De Jesus, B.K. De Campos, R.M. Galazzi, J.L.C. Martinez, M.A.Z. Arruda, Bipolar disorder : recent advances and future trends in bioanalytical developments for biomarker discovery, *Anal Bioanal Chem.* 407 (2015) 661–667
- ²⁸ V. Polaskova, A. Kapur, A. Khan, M.P. Molloy, M.S. Baker, High-abundance protein depletion: Comparison of methods for human plasma biomarker discovery, *Electrophoresis.* 31 (2010) 471–482.
- ²⁹ Cristea, I.M., Gaskell, S.J., Whetton, A.D.; Proteomics techniques and their application to hematology; *Blood*, (2004); 103(10): 3624–3634.
- ³⁰ Barbosa, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 366–375, maio 2012.
- ³¹ Aslam, B. *et al.* Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 182–196, fev. 2017
- ³² Matsumoto, J.; Sugiura, Y.; Yuki, D.; Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Zaima, N.; Kunii, Y.; Wada, A.; Yang, Q.; Nishiura, Hashizume, Y.; Yamamoto, T. Ikemoto, K.; Setou, M. Niwa, S. Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption / ionization imaging mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 400, p.1933–1943, 2011.
- ³³ Sokolowska, I.; Ngounou, A.G. The potential of biomarkers in psychiatry : focus on proteomics. *Journal of Neural Transmission*, v.122, p.1-9, 2013.
- ³⁴ Kullolli, M. *et al.* Performance evaluation of affinity ligands for depletion of abundant plasma proteins. *Journal of Chromatography B*, [s. l.], v. 939, p. 10–16, nov. 2013
- ³⁵ R.S. Tirumalai, Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome, *Mol. Cell. Proteomics.* 2 (2003) 1096–1103.
- ³⁶ J.R.R. de Jesus, G. de S. Pessôa, A. Sussulini, J.L.C. Martínez, M.A.Z.A.Z. Arruda, G. de S. Pessôa, A. Sussulini, J.L.C. Martínez, M.A.Z.A.Z. Arruda, Proteomics strategies for bipolar disorder evaluation: From sample preparation to validation, *J Proteomics.* 145 (2016) 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.034>.
- ³⁷ P.E. Geyer, L.M. Holdt, D. Teupser, M. Mann, Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics, *Mol Syst Biol.* 13 (2017) 942. <https://doi.org/10.15252/msb.20156297>.
- ³⁸ Anderson NL, Anderson NG: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1(11):845–867.
- ³⁹ S.E. Warder, L. a Tucker, T.J. Strelitzer, E.M. McKeegan, J.L. Meuth, P.M. Jung, A.

- Saraf, B. Singh, J. Lai-Zhang, G. Gagne, J.C. Rogers, Reducing agent-mediated precipitation of high-abundance plasma proteins., *Anal. Biochem.* 387 (2009) 184–93.
- ⁴⁰ J.E. Park, T.I. Gunasekaran, Y.H. Cho, S.M. Choi, M.K. Song, S.H. Cho, J. Kim, H.C. Song, K.Y. Choi, J.J. Lee, Z.Y. Park, W.K. Song, H.S. Jeong, K.H. Lee, J.S. Lee, B.C. Kim, Diagnostic Blood Biomarkers in Alzheimer's Disease, *Biomedicines*. 10 (2022) 1–15. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010169>.
- ⁴¹ J.R. de Jesus, R.M. Galazzi, T.B. de Lima, C.E.M. Banzato, L.F. de Almeida Lima e Silva, C. de Rosalmeida Dantas, F.C. Gozzo, M.A.Z. Arruda, Simplifying the human serum proteome for discriminating patients with bipolar disorder of other psychiatry conditions, *Clin Biochem.* 50 (2017) 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.06.009>
- ⁴² R. López-Cortés, E. Oliveira, C. Núñez, C. Lodeiro, M. Páez De La Cadena, F. Fdez-Riverola, H. López-Fernandez, M. Reboiro-Jato, D. Glez-Peña, J.L. Capelo, H.M. Santos, Fast human serum profiling through chemical depletion coupled to gold-nanoparticle-assisted protein separation, *Talanta*. 100 (2012) 239–245.
- ⁴³ A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schüth, Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 1222–1244
- ⁴⁴ Decibel.P. Elpa, C.M. Raju, H.Y. Chiu, S.P. Wu, P.L. Urban, Rapid skin biomarker discovery using hydrogel-phase sampling followed by semi-automated liquid-phase re-extraction high-resolution mass spectrometry, *Anal Chim Acta*. 1252 (2023) 341028. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341028>.
- ⁴⁵ A. Deb, G.R. Nalkar, D. Chowdhury, Biogenic carbon dot-based fluorescence-mediated immunosensor for the detection of disease biomarker, *Anal Chim Acta*. 1242 (2023) 340808. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340808>.
- ⁴⁶ W. Zhang, J. Du, K. Wang, Y. Li, C. Chen, L. Yang, Z. Kan, B. Dong, L. Wang, L. Xu, Integrated dual-channel electrochemical immunosensor for early diagnosis and monitoring of periodontitis by detecting multiple biomarkers in saliva, *Anal Chim Acta*. 1247 (2023) 340878. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340878>.
- ⁴⁷ J.E. Araújo, C. Lodeiro, J.L. Capelo, B. Rodríguez-González, A.A. dos Santos, H.M. Santos, J. Fernández-Lodeiro, Novel nanocomposites based on a strawberry-like gold-coated magnetite (Fe@Au) for protein separation in multiple myeloma serum samples, *Nano Res.* 8 (2015) 1189–1198. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0599-4>.
- ⁴⁸ Sargentelli, V. Nanociência: aplicações tecnológicas em química, saúde, agricultura e meio ambiente: uma sinopse. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 95- 101, 2012.
- ⁴⁹ Yang, S.T.; Liu, Y.; Wang, Y.W.; cao, A. Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions. *Small*, v. 9, n. 9–10, p.1635–1653, 2013.

- ⁵⁰ Yokoyama, T.; Masuda, H.; Suzuki, M.; Ehara, K.; Nogi, K.; Fuji, M.; Fukui, T.; Suzuki, H.; Tatami, J.; Hayashi, K.; Toda, K. Basic properties and measuring methods of nanoparticles. In: Naito, M.; Yokoyama, T.; Hosokawa, K.; Nogi, K. (ed). Nanoparticle Technology Handbook. Amsterdam: Elsevier, 2018, p. 3-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-044453122-3.50004-0>.
- ⁵¹ Govan, J.; Gun'ko, Y. K. Recent advances in the application of magnetic nanoparticles as a support for homogeneous catalysts. *Nanomaterials*, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 222-241, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nano4020222>.
- ⁵² Souza, Caio Guilherme Secco de. Nanopartículas magnéticas multifuncionais: síntese e propriedades visando aplicação em diagnóstico e terapia em biomedicina. 2011. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. doi:10.11606/D.75.2011.tde-19052011-110028. Acesso em: 2022-12-20.
- ⁵³ Fontanive, V. C. P.; Khalil, N. M.; Cotica, L. F.; Mainardes, R. M. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, [s.l.], v. 35, n. 4, p. 549-558, 2014.
- ⁵⁴ Wang, C.; Sun, S. Chemical synthesis of monodisperse magnetic nanoparticles. In: Kronmüller, H.; Parkin, S. Handbook of magnetism and advanced magnetic materials. New York: John Wiley & Sons, 2007. p. 1681-1692. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470022184.hmm323>.
- ⁵⁵ Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.
- ⁵⁶ Mornet, S. *et al.* Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Journal of materials chemistry*, v. 14, n. 14, p. 2161-2175, 2004.
- ⁵⁷ Tartaj, P. *et al.* The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, v. 36, n. 13, p. R182-R197, 2003.
- ⁵⁸ Boruah, P. K.; Borthakur, P.; Das, M. R. Magnetic metal/metal oxide nanoparticles and nanocomposite materials for water purification. In: Thomas, S.; Pasquini, D.; Leu, S.-Y.; Gopakumar, D. A. Nanoscale materials in water purification. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 473-503. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813926-4.00024-0>.
- ⁵⁹ Faraji, M.; Yamini, Y.; Rezaee, M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization and applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*, [s.l.], v. 7, p. 1-37, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03245856>.
- ⁶⁰ Araújo, J.E.; Lodeiro, C.; Capelo, J.L.; Rodriguez-González, B.; Santos, A.; Santos, H.M.; Fernández-Lodeiro, J. Novel nanocomposites based on a strawberry-like goldcoated magnetite (Fe@Au) for protein separation in multiple myeloma serum samples. *Nano research*, v. 8, n. 4, p. 1189-1198, 2015.

- ⁶¹ S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekić, S. K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild, R. H. Stauber, *ACS Nano* 2011, 5, 7155.
- ⁶² M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. B. Bombelli, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 2525.
- ⁶³ P.X. Zhao, X.F. Guo, H. Wang, C.B. Qi, H.S. Xia, H.S. Zhang, Zirconium arsenate-modified silica nanoparticles for specific capture of phosphopeptides and direct analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* 402 (2012) 1041–1056. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5547-5>.
- ⁶⁴ J.E. Araújo, C. Lodeiro, J.L. Capelo, B. Rodríguez-González, A.A. dos Santos, H.M. Santos, J. Fernández-Lodeiro, Novel nanocomposites based on a strawberry-like gold-coated magnetite (Fe@Au) for protein separation in multiple myeloma serum samples, *Nano Res.* 8 (2015) 1189–1198. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0599-4>.
- ⁶⁵ L. Zhang, Q. Zhao, Z. Liang, K. Yang, L. Sun, L. Zhang, Y. Zhang, Synthesis of adenosine functionalized metal immobilized magnetic nanoparticles for highly selective and sensitive enrichment of phosphopeptides, *Chemical Communications.* 48 (2012) 6274–6276. <https://doi.org/10.1039/c2cc31641b>.
- ⁶⁶ Y. Yan, Z. Zheng, C. Deng, X. Zhang, P. Yang, Facile synthesis of Ti⁴⁺-immobilized Fe₃O₄@polydopamine core–shell microspheres for highly selective enrichment of phosphopeptides, *Chemical Communications.* 49 (2013) 5055–5057. <https://doi.org/10.1039/c3cc41330f>.
- ⁶⁷ M. Zhao, C. Deng, X. Zhang, The design and synthesis of a hydrophilic core-shell-shell structured magnetic metal-organic framework as a novel immobilized metal ion affinity platform for phosphoproteome research, *Chemical Communications.* 50 (2014) 6228–6231. <https://doi.org/10.1039/c4cc01038h>.
- ⁶⁸ Z.G. Wang, G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni, Magnetic γ -Fe₂O₃@REVO₄ (RE = Sm, Dy, Ho) affinity microspheres for selective capture, fast separation and easy identification of phosphopeptides, *J Mater Chem B.* 1 (2013) 1491–1500. <https://doi.org/10.1039/c2tb00431c>.
- ⁶⁹ Z.G. Wang, G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni, Fabrication of novel hierarchical structured Fe₃O₄@LnPO₄ (Ln=Eu, Tb, Er) multifunctional microspheres for capturing and labeling phosphopeptides, *Small.* 8 (2012) 3456–3464. <https://doi.org/10.1002/smll.201200601>.
- ⁷⁰ Z.G. Wang, G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni, Novel core-shell Cerium (IV)-immobilized magnetic polymeric microspheres for selective enrichment and rapid separation of phosphopeptides, *J Colloid Interface Sci.* 417 (2014) 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.11.004>.
- ⁷¹ Sharafeldin, Mohamed; Bishop, Gregory W.; Bhakta, Snehasis; El-Sawy, Abdelhamid; Suib, Steven L.; Rusling, James F. (2017). Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide

sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 91(), 359–366.
doi:10.1016/j.bios.2016.12.052

- ⁷² Adrian Arendowski; Krzysztof Ossoliński; Anna Ossolińska; Tadeusz Ossoliński; Joanna Nizioł; Tomasz Ruman; (2021). Serum and urine analysis with gold nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for renal cell carcinoma metabolic biomarkers discovery. *Advances in Medical Sciences*, doi: 10.1016/j.advms.2021.07.003
- ⁷³ García-Descalzo, L. *et al.* Gel Electrophoresis of Proteins. In: *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. [s.l.] InTech, 2012.
- ⁷⁴ Bio-Rad Laboratories, Inc. A Guide to Polyacrylamide Gel: Electrophoresis and Detection. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
<https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf>.
- ⁷⁵ Shapiro, A. L.; Viñuela, E.; V. Maizel, J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 815–820, set. 1967.
- ⁷⁶ Gallagher, S. R. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, [s. l.], v. 97, n. 1, jan. 2012.
- ⁷⁷ Lemańska-Perek A, Lis-Kuberka J, Lepczyński A, Dratwa-Chałupnik A, Tupikowski K, Kątnik-Prastowska I, Ożgo M. Potential plasma biomarkers of bladder cancer identified by proteomic analysis: A pilot study. *Adv Clin Exp Med*. 2019 Mar;28(3):339-346. doi: 10.17219/acem/79296. PMID: 29963784.
- ⁷⁸ May, C. *et al.* Instruments and Methods in Proteomics. In: [s.l.: s.n.]. p. 3–26.
- ⁷⁹ Thomas, S. *et al.* Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. *Proteomics - Clinical Applications*, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 358–370, abr. 2016.
- ⁸⁰ Aebersold, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, n. 6928, p. 198–207, mar. 2003.
- ⁸¹ Cole, R. B. *Em Electropray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*; Cole, R.B., ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997, p. 12.
- ⁸² Moraes, M.C.B.; Lago, C.L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química nova*, v.26, n.4, p. 556–563, 2003.
- ⁸³ Mantini, D.; Petrucci, F.; Del Boccio, P.; Pieragostino, D.; Di Nicola, M.; Lugaresi, A.; Federici, G.; Sacchetta, P.; Di Llio, C.; Urbani, A. Independent component analysis for the extraction of reliable protein signal profiles from maldi-tof mass spectra.

- ⁸⁴ Domon, B.; Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, v. 312, n. 5771, p. 212–7, 2006.
- ⁸⁵ Mamyrin BA (2001) Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *Int J Mass Spectrom* 206:251–266
- ⁸⁶ Miller PE, Denton MB (1986) The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *J Chem Educ* 63:617–622
- ⁸⁷ Stafford GC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE, Todd JFJ (1984) Recent improvements in and applications of advanced ion trap technology. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 60(1):85–98
- ⁸⁸ Wong PSH, Cooks RG (1997) Ion trap mass spectrometry. *Currentseparations.com* 16(3)
- ⁸⁹ Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG (2005) The orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40:430–443
- ⁹⁰ Zubarev RA, Makarov A (2013) Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem* 85:5288–5296
- ⁹¹ Yates, J. R.; Ruse, C. I.; Nakorchevsky, A. *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*. Annual Review of Biomedical Engineering, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 49–79, 1 ago. 2009.
- ⁹² Shu T, Ning W, Wu D, Xu J, Han Q, Huang M, Zou X, Yang Q, Yuan Y, Bie Y, Pan S, Mu J, Han Y, Yang X, Zhou H, Li R, Ren Y, Chen X, Yao S, Qiu Y, Zhang DY, Xue Y, Shang Y, Zhou X. Plasma Proteomics Identify Biomarkers and Pathogenesis of COVID-19. *Immunity*. 2020 Nov 17;53(5):1108-1122.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.008.
- ⁹³ Bader JM, Geyer PE, Müller JB, Strauss MT, Koch M, Leypoldt F, Koertvelyessy P, Bittner D, Schipke CG, Incesoy EI, Peters O, Deigendesch N, Simons M, Jensen MK, Zetterberg H, Mann M. Proteome profiling in cerebrospinal fluid reveals novel biomarkers of Alzheimer's disease. *Mol Syst Biol*. 2020 Jun;16(6): e9356. doi: 10.15252/msb.20199356. PMID: 32485097; PMCID: PMC7266499.
- ⁹⁴ J. Zheng, Z. Lin, G. Lin, H. Yang, L. Zhang, Preparation of magnetic metal-organic framework nanocomposites for highly specific separation of histidine-rich proteins, *J Mater Chem B*. 3 (2015) 2185–2191. <https://doi.org/10.1039/c4tb02007c>
- ⁹⁵ H.D.F. Filho, G.A.C. Lopes, Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difractometria de Raios-X, *Estação Científica (UNIFAP)*. 3 (2013) 31–45.
- ⁹⁶ W.D. Callister, *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*, 5th ed., Livros Técnicos e Científicos, São Paulo, 2002.
- ⁹⁷ T.M. de M. Pereira, *Caracterização térmica (TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de Hormônios bioidênticos (estriol estradiol)*, (2013).

- ⁹⁸ Ionashiro, M.; Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial, Giz Editorial: São Paulo, 2005.
- ⁹⁹ Haines, P. J. (1992). Principles of Thermal Analysis And Calorimetry. Cambridge, UK: Lynx Edicions. ISBN 0-85404-610-0
- ¹⁰⁰ M. DE ASSUMPÇÃO PEREIRA-DA-SILVA, F.A. FERRI, Microscopia Eletrônica De Varredura, Técnicas de Nanocaracterização. (2015) 1–42. <https://doi.org/10.1016/b978-85-352-8091-3.50010-5>.
- ¹⁰¹ M. Kaszuba, J. Corbett, F.M. Watson, A. Jones, High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques, Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci. 368 (2010) 4439-4451.
- ¹⁰² Bhattacharjee, Sourav (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Journal of Controlled Release, (), S0168365916303832–. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- ¹⁰³ F.J. Montes Ruiz-Cabello, G. Trefalt, P. Maroni, M. Borkovec, Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy, Phys. Rev. E 90 (2014) 012301.
- ¹⁰⁴ T. Mahmood, M.T. Saddique, A. Naeem, P. Westerhoff, S. Mustafa, A. Alum, Comparison of different methods for the point of zero charge determination of NiO, Ind Eng Chem Res. 50 (2011) 10017–10023. <https://doi.org/10.1021/ie200271d>.
- ¹⁰⁵ K. Gul, S. Sohni, M. Waqar, F. Ahmad, N.A.N. Norulaini, M.O. A. K., Functionalization of magnetic chitosan with graphene oxide for removal of cationic and anionic dyes from aqueous solution, Carbohydr Polym. 152 (2016) 520–531. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.045>.
- ¹⁰⁶ F. Rosário, J. Creylman, G. Verheyen, S. Van Miert, C. Santos, P. Hoet, H. Oliveira, Impact of Particle Size on Toxicity, Tissue Distribution and Excretion Kinetics of Subchronic Intratracheal Instilled Silver Nanoparticles in Mice, Toxics. 10 (2022). <https://doi.org/10.3390/toxics10050260>.
- ¹⁰⁷ Richard Kay, Chris Barton, Lucy Ratcliffe, Balwir Matharoo-Ball, Pamela Brown, Jane Roberts, Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis, Rapid Commun Mass Spectrom. 22 (2008) 3255–3260. <https://doi.org/10.1002/rcm>.
- ¹⁰⁸ B. Ünal, Z. Durmus, A. Baykal, H. Sözeri, M.S. Toprak, L. Alpsoy, L-Histidine coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, structural and conductivity characterization, J Alloys Compd. 505 (2010) 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2010.06.022>.
- ¹⁰⁹ J. Chen, Y. Wang, X. Ding, Y. Huang, K. Xu, Magnetic solid-phase extraction of proteins based on hydroxy functional ionic liquid-modified magnetic nanoparticles, Analytical Methods. 6 (2014) 8358–8367. <https://doi.org/10.1039/c4ay01786b>.
- ¹¹⁰ D.A. Nomura, T.A. Enoki, C. Goldman, M.T. Lamy, Espalhamento dinâmico de luz, Apostila Para a 2a Esc. Colóides Da USP. (2014) 1–18.

- ¹¹¹ T. de Araujo Andrade, P. dos Passos Menezes, Y.M.B.G. de Carvalho, B. dos Santos Lima, E.P.B.S.S. de Souza, A.A. de Souza Araujo, M.A.O. Melo, L.J. Quintans-Júnior, J. de Souza Siqueira Quintans, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, S. Shanmugam, L.A. Frank, M.R. Serafini, (-) -linalool-Loaded Polymeric Nanocapsules Are a Potential Candidate to Fibromyalgia Treatment, *AAPS PharmSciTech.* 21 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01719-8>.
- ¹¹² J. Zolgharnein, M. Rastgordani, Multivariate optimization and characterization of simultaneous removal of binary mixture of Cu (II) and Pb (II) using Fe₃O₄@MoS₂ nanoparticles, *J Chemom.* 32 (2018) 1–19. <https://doi.org/10.1002/cem.3043>.
- ¹¹³ A.M. Aljeboree, A.N. Alshirifi, A.F. Alkaim, Kinetics and equilibrium study for the adsorption of textile dyes on coconut shell activated carbon, *Arabian Journal of Chemistry.* 10 (2017) S3381–S3393. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.020>.
- ¹¹⁴ J.W. Rick, A. Chandra, C. Dalle Ore, A.T. Nguyen, G. Yagnik, M.K. Aghi, Fibronectin in malignancy: Cancer-specific alterations, protumoral effects, and therapeutic implications, *Semin Oncol.* 46 (2019) 284–290. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.08.002>.
- ¹¹⁵ J. Feldt, M. Schicht, F. Garreis, J. Welss, U.W. Schneider, F. Paulsen, Structure, regulation and related diseases of the actin-binding protein gelsolin, *Expert Rev Mol Med.* 20 (2019). <https://doi.org/10.1017/erm.2018.7>.
- ¹¹⁶ J. Vandooren, Y. Itoh, Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections, *Front Immunol.* 12 (2021) 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803244>.