



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**FERNANDA NASCIMENTO RODRIGUES**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS  
DE ÓXIDO DE FERRO FUNCIONALIZADAS COM FRUTALINA, LECTINA  $\alpha$ -D-  
GALACTOSE LIGANTE DE *Artocarpus incisa* L.**

**FORTALEZA**

**2022**

FERNANDA NASCIMENTO RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS  
DE ÓXIDO DE FERRO FUNCIONALIZADAS COM FRUTALINA, LECTINA  $\alpha$ -D-  
GALACTOSE LIGANTE DE *Artocarpus incisa* L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R613d Rodrigues, Fernanda Nascimento.

Desenvolvimento de uma matriz de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro funcionalizadas com frutalina, lectina alfa-D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L. / Fernanda Nascimento Rodrigues. – 2022.  
70 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.

1. *Artocarpus altilis*. 2. Nanopartículas. 3. Lectinas vegetais. 4. Coprecipitação. I. Título.

CDD 572

---

FERNANDA NASCIMENTO RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS  
DE ÓXIDO DE FERRO FUNCIONALIZADAS COM FRUTALINA, LECTINA  $\alpha$ -D-  
GALACTOSE LIGANTE DE *Artocarpus incisa* L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.

Aprovada em 12/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.a Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Rogênio da Silva Mendes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Ângelo Roncalli Alves e Silva  
Universidade de Fortaleza (Unifor)

---

Prof.a Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira  
Universidade de Fortaleza (Unifor)

A Deus.

À minha família e aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todas as oportunidades, pelas pessoas queridas e por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, Rosenir e Manoel, e à minha irmã, Renata, por serem meu suporte, por sempre me apoiarem nos estudos e em tantas áreas da vida, devo tudo a vocês.

Ao meu orientador, prof. Dr. Renato Moreira, pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa desde 2014 e pelos ensinamentos científicos e de vida ao longo desses anos, sempre serei grata.

À professora Dra. Ana Cristina, por toda ajuda nas pesquisas laboratoriais e aceite em contribuir nesse trabalho como membro da banca.

Aos professores Dr. Ângelo Roncalli e Dra. Ana Lúcia Freitas pelo aceite em participar da banca, tenho grande admiração pelo trabalho de vocês.

Aos meus colegas de trabalho da Unilab e amigos de vida: Camila, Débora, Henrique, Julie, Lívia, Roberta, Sarah, Simone, Talita, Tatyane, Venícios e Victor, vocês foram fundamentais na concretização deste trabalho. Jamais teria conseguido sem o apoio e suporte de vocês no dia a dia. Essa tese também é de vocês.

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos (F-66): Antônio Neto, Carol Viana, George, Hyldecia, Kueirislene, Larissa, Nidy, Rachel, Ronielly e Rosueti por todos os anos de amizade, palavras de contribuição e ajuda nos mais diversos momentos. Vocês tornaram essa caminhada mais divertida.

Quero agradecer especialmente aos amigos Felipe, Rogênio e Nyanne pela contribuição direta na execução desse trabalho, pelas discussões e por todo o amparo nos momentos difíceis e por não me deixarem desistir. Se cheguei até aqui, também foi graças a vocês.

Agradeço também às minhas amigas Débora Leite e Débora Oliveira que, apesar das distâncias físicas, sempre se fizeram presentes e contribuíram de forma a me manter seguindo neste objetivo. Muito obrigada pela confiança, amizade e palavras de incentivo.

A todos os meus amigos, tanto os mais recentes quanto os de longa data, vocês contribuíram imensamente com esse trabalho, mesmo nos momentos que não estavam relacionados a ele, pois vocês me dão forças e me motivam a continuar seguindo os meus sonhos sempre.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram na execução desse trabalho, direta ou indiretamente, meu muito obrigada!

A todas as instituições de fomento à pesquisa envolvidas na colaboração e desenvolvimento desta tese: Universidade Federal do Ceará, Universidade de Fortaleza, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, obrigada pelo suporte financeiro para a execução deste trabalho.

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

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos." (CURIE *apud* D'ITRI, 1977, p. 3).



## RESUMO

Nanopartículas de óxido de ferro possuem ótimas propriedades, o que permite o seu uso em processos industriais, ambientais, biotecnológicos, dentre outros, com ampla variedade de aplicações. A frutalina é uma lectina  $\alpha$ -D-galactose ligante, com diversas atividades biológicas já descritas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma matriz de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com frutalina com potencial aplicação biotecnológica. As nanopartículas foram obtidas por coprecipitação e submetidas a um processo de modificação de superfície com frutalina mediante a reticulação com glutaraldeído e APTES. O material foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), análise termogravimétrica (TGA), além da realização de ensaios biológicos. Os resultados de MEV e DLS mostraram que as nanopartículas de óxido de ferro (NPFe) apresentaram-se com diâmetro médio de 700 nm, enquanto as nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL) demonstraram diâmetro médio de 780 nm, além de possuírem aspecto arredondado e uniforme. O FTIR mostrou bandas de absorções em 1635 e 1539  $\text{cm}^{-1}$ , referentes às amidas I e II, característico de proteínas, a qual indica a imobilização da frutalina na superfície das NPFe. O DRX mostrou que o processo de funcionalização não modificou o estado cristalino característico de óxido de ferro. O TGA demonstrou que NPFTL apresenta uma degradação térmica mais lenta, comparada à proteína livre. O ensaio hemaglutinante mostrou que o processo de funcionalização não afetou a estrutura tridimensional da frutalina, pois a proteína manteve sua capacidade de aglutinar células. Além disso, foi possível observar a interação da lectina com as nanopartículas e o sangue ao aplicar-se um campo magnético externo e se perceber uma deposição do complexo formado no fundo dos poços. A capacidade de reconhecimento à galactose foi comprovada através do deslocamento do pico de FTIR em 3500  $\text{cm}^{-1}$  após interação da NPFTL com galactomanana. A matriz não apresentou toxicidade em testes *in vitro* até 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  utilizando células L929. Em suma, a produção da matriz de nanopartículas funcionalizadas com frutalina mostrou-se eficiente e com potencial para aplicações futuras em processos de purificação envolvendo glicoconjugados.

**Palavras-chave:** *Artocarpus altilis*; coprecipitação; lectinas vegetais; nanopartículas.

## ABSTRACT

Iron oxide nanoparticles have good properties, which allows their use in industrial, environmental, biotechnological processes, among others, with a wide variety of applications. Frutalin is an  $\alpha$ -D-galactose binding lectin, with several biological activities already described. Thus, the objective of this work was to develop a matrix of magnetic nanoparticles functionalized with frutalin with potential biotechnological application. The nanoparticles were obtained by coprecipitation and subjected to a surface modification process with frutalin through crosslinking with glutaraldehyde and APTES. The material was characterized by scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS), zeta potential, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (DRX), thermogravimetric analysis (TGA), in addition to carrying out biological tests. The results of SEM and DLS showed that the iron oxide nanoparticles (NPFe) had an average diameter of 700 nm, while the nanoparticles functionalized with frutalin (NPFTL) showed an average diameter of 780 nm, in addition to having a rounded and uniform appearance. The FTIR showed absorption bands at 1635 and 1539  $\text{cm}^{-1}$ , referring to amides I and II, characteristic of proteins, which indicates the immobilization of frutalin on the surface of NPFe. XRD showed that the functionalization process did not modify the characteristic crystalline state of iron oxide. The TGA demonstrated that NPFTL presents a slower thermal degradation, compared to the free protein. The hemagglutinating assay showed that the functionalization process did not affect the three-dimensional structure of frutalin, as the protein maintained its ability to agglutinate cells. In addition, it was possible to observe the interaction of the lectin with the nanoparticles and the blood when an external magnetic field was applied and a deposition of the complex formed at the bottom of the wells was observed. The ability to recognize galactose was proven by shifting the FTIR peak at 3500  $\text{cm}^{-1}$  after interaction between NPFTL and galactomannan. The matrix showed no toxicity in *in vitro* tests up to 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  using L929 cells. In summary, the production of the matrix of nanoparticles functionalized with frutalin proved to be efficient and with potential for future applications in purification processes involving glycoconjugates.

**Keywords:** *Artocarpus altilis*; coprecipitation; nanoparticles; plant lectins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação gráfica das estruturas cristalinas fundamentais de $Fe_2O_3$ .....	18
Figura 2 -	Comparação entre os métodos de síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPFe).....	20
Figura 3 -	Representação da dimensão das nanopartículas em comparação ao tamanho de átomos e moléculas de seres vivos.....	25
Figura 4 -	Estrutura tridimensional da Frutalina.....	31
Figura 5 -	Esquema de síntese das NPFe pelo método de coprecipitação.....	36
Figura 6 -	Representação esquemática do processo de funcionalização da frutalina nas NPFe.....	37
Figura 7 -	SDS-PAGE referente à purificação da Frutalina. Poços: (1) Marcador LMW GE; (2) Frutalina.....	43
Figura 8 -	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) referentes às amostras magnéticas sintetizadas com seus respectivos gráficos de distribuição de tamanho, obtidos por DLS. (A – C) Nanopartículas magnéticas (NPFe); (D – F) Nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).....	45
Figura 9 -	Espectros de FTIR das amostras de Nanopartículas de $Fe_3O_4$ (NPFe), Frutalina (FTL) e Nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).....	48
Figura 10 -	Difratogramas de DRX das amostras de nanopartículas de óxido de ferro (NPFe) e de nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFLT). A estrela se refere a um pico que é um resíduo do processo de síntese das NPs.....	49
Figura 11 -	Termograma da amostra de nanopartículas de óxido de ferro (NPFe).....	51
Figura 12 -	Termograma da amostra de frutalina (FTL).....	52

Figura 13 -	Termograma da amostra de nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).....	52
Figura 14 -	Atividade hemaglutinante das amostras de NPs e NPFTL.....	55
Figura 15 -	Atividade hemaglutinante da amostra de NPFTL após 12 meses de armazenamento à 4 °C.....	56
Figura 16 -	Espectros de FTIR das amostras: (A) frutalina (FTL), (B) galactomanana (Gal), (C) nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL) e (D) nanopartículas funcionalizadas com frutalina interagindo com galactomanana (NPFTL+Gal).....	57
Figura 17 -	Viabilidade das células L929 incubadas com NPFTL.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Técnicas de síntese de NPFe e comparação em relação aos aspectos morfológicos, vantagens e desvantagens.....	21
Tabela 2 -	Exemplos de diferentes biomoléculas e agentes de revestimentos usados na fabricação de biocompósitos magnéticos.....	26
Tabela 3 -	Variáveis independentes e valores codificados e reais dos níveis utilizados no planejamento experimental fatorial $2^2$ .....	39
Tabela 4 -	Planejamento experimental fatorial $2^2$ com valores reais e codificados para cada ensaio.....	40
Tabela 5 -	Valores de potencial zeta das amostras de Frutalina (FTL); Nanopartículas de óxido de ferro (NPFe) e Nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).....	46
Tabela 6 -	Presença ou ausência de magnetização das partículas após tratamentos.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTES	3-Aminopropiltrietoxisilano
ConA	Concanavalina A
DRX	Difração de Raios-X
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)
FTL	Frutalina
NP	Nanopartículas
NPF <sub>e</sub>	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
NPFTL	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com frutalina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TGA	Análise Termogravimétrica

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1	Nanopartículas magnéticas.....	17
2.1.1	<i>Principais métodos de síntese.....</i>	19
2.1.2	<i>Modificação de superfície de nanopartículas magnéticas.....</i>	23
2.1.3	<i>Aplicações biotecnológicas das nanopartículas magnéticas.....</i>	25
2.2	Lectinas Vegetais.....	28
2.2.1	<i>Frutalina.....</i>	30
3	HIPÓTESE.....	33
4	OBJETIVOS.....	34
4.1	Objetivo Geral.....	34
4.2	Objetivos Específicos.....	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1	Coleta, extração e purificação da frutalina.....	35
5.2	Síntese das nanopartículas de ferro (NPFe).....	36
5.3	Funcionalização das nanopartículas de ferro com frutalina.....	36
5.4	Eficiência de imobilização.....	38
5.5	Caracterização das nanopartículas.....	38
5.5.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	38
5.5.2	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta.....</i>	38
5.5.3	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....</i>	38
5.5.4	<i>Difração de Raios-X.....</i>	38
5.5.5	<i>Análise termogravimétrica (TGA).....</i>	39
5.5.6	<i>Análise da influência da temperatura (°C) e tempo e contato (min) na estabilidade da magnetização das nanopartículas.....</i>	39
5.6	Atividades biológicas.....	40
5.6.1	<i>Atividade hemaglutinante das NPFTL.....</i>	40

5.6.2	<i>Ensaio de interação ao carboidrato.....</i>	41
5.6.3	<i>Ensaio in vitro com fibroblastos.....</i>	41
5.6.3.1	<i>Ensaio de viabilidade celular com as NPFTL.....</i>	41
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	43
6.1	<b>Purificação da frutalina.....</b>	43
6.2	<b>Eficiência de imobilização.....</b>	43
6.3	<b>Caracterização das nanopartículas.....</b>	44
6.3.1	<b><i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Tamanho de Partícula.....</i></b>	44
6.3.2	<b><i>Potencial Zeta.....</i></b>	46
6.3.3	<b><i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....</i></b>	47
6.3.4	<b><i>Difração de Raios-X.....</i></b>	49
6.3.5	<b><i>Análise termogravimétrica (TGA).....</i></b>	50
6.3.6	<b><i>Análise da influência da temperatura (°C) e tempo e contato (min) na estabilidade da magnetização das nanopartículas.....</i></b>	53
6.4	<b>Atividades biológicas.....</b>	54
6.4.1	<b><i>Atividade hemaglutinante das NPFTL.....</i></b>	54
6.4.2	<b><i>Ensaio de interação ao carboidrato.....</i></b>	57
6.4.3	<b><i>Ensaio de viabilidade celular das NPFTL.....</i></b>	58
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	61
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	62



## 1 INTRODUÇÃO

O primeiro conceito de nanotecnologia foi apresentado por Richard Feynman numa palestra intitulada “*There’s plenty of room at the bottom*” na *American Institute of Technology* em 1959. Ele defendeu uma visão tecnológica e futurista, na qual citava os benefícios de possíveis grandes descobertas que poderiam surgir da fabricação e manipulação de materiais em escalas moleculares e atômicas. Para isso, ele destacou a importância do desenvolvimento de novas tecnologias que permitissem a fabricação, manipulação e caracterização das propriedades físicas e químicas de materiais em escalas nanométricas (SCHIRMER, 1999).

As nanopartículas apresentam, de modo geral, tamanhos variando de 0,1 a 1000 nm em cada dimensão espacial e são comumente sintetizadas usando duas abordagens: *top-down* e *bottom-up* (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010). Na abordagem *top-down*, os materiais são gradualmente “quebrados” até atingir a escala nanométrica, enquanto na *bottom-up*, átomos ou moléculas são montados em estruturas moleculares na faixa nanométrica. A abordagem *bottom-up* é comumente utilizada para sínteses químicas e biológicas de nanopartículas.

Neste contexto, surgem as nanopartículas magnéticas (NP), em particular as oriundas do óxido de ferro, as quais possuem baixa toxicidade, quando comparadas às provenientes de outras fontes metálicas, biocompatibilidade e baixo custo (HUA et al., 2012). Várias aplicações biotecnológicas podem ser atribuídas a essas nanopartículas, tais como: análise de alimentos (CAO et al., 2012), imobilização de enzimas/proteínas (XU et al., 2014), purificação de proteínas (XU et al., 2014), tratamento de águas (LAKSHMANAN et al., 2013), biossensores (OMIDINIA; SHADJOU; HASANZADEH, 2013), carreadores de drogas (ESTELRICH et al., 2015), separação celular e detecção (ARIAS et al., 2018), dentre outras.

Em relação ao uso para imobilização de proteínas, as NPs são suportes interessantes por apresentarem uma superfície não-porosa, alta área superficial, alta relação superfície/volume e fácil separação sob um campo magnético externo (ASSA et al., 2016). Essas características as tornam competitivas no âmbito industrial e bastante promissoras de serem aplicadas.

Ao se tratar da classe de proteínas, as lectinas são biomoléculas que também têm despertado o interesse de pesquisadores quanto às suas propriedades. Essas são proteínas ou glicoproteínas amplamente distribuídas na natureza, desempenhando diferentes papéis e funções em processos biológicos, tais como: (I) reconhecimento de moléculas; (II) proteínas de reserva; e (III) mecanismos de defesas em plantas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Além disso, diversas atividades biológicas já lhes são relatadas, dentre elas a sua eficácia na busca de biomarcadores para diferentes tipos de cânceres (CAVALCANTE *et al.*, 2016; LOBO *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Isso é possível devido a sua capacidade em reconhecer carboidratos de maneira específica e reversível (SHARON, 2007).

A utilização de nanopartículas e lectinas também apresenta várias aplicabilidades relatadas na literatura, dentre elas o uso em processos de purificação de glicoproteínas (LAI *et al.*, 2013), na melhora das características de catálise enzimática (YONG *et al.*, 2018), como marcadores específicos de células cancerígenas (MARANGONI; PAINO; ZUCOLOTTO, 2013) e como agente inibidor de crescimento bacteriano e formação de biofilmes (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2021). Esses são alguns exemplos do grande potencial que a junção desses dois materiais apresenta de forma a otimizar processos de purificação e/ou de reconhecimento celular.

Diante das possíveis aplicações e propriedades tanto das nanopartículas quanto das lectinas, o presente trabalho propôs sintetizar nanopartículas magnéticas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), funcionalizá-las com frutalina, lectina  $\alpha$ -D-galactose ligante extraída das sementes de *Artocarpus incisa* L., realizar as caracterizações físico-químicas dos materiais e averiguar, através de ensaios biológicos, se o complexo formado mantinha a atividade da lectina e seu reconhecimento específico ao carboidrato para uma futura aplicação biotecnológica.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Nanopartículas magnéticas

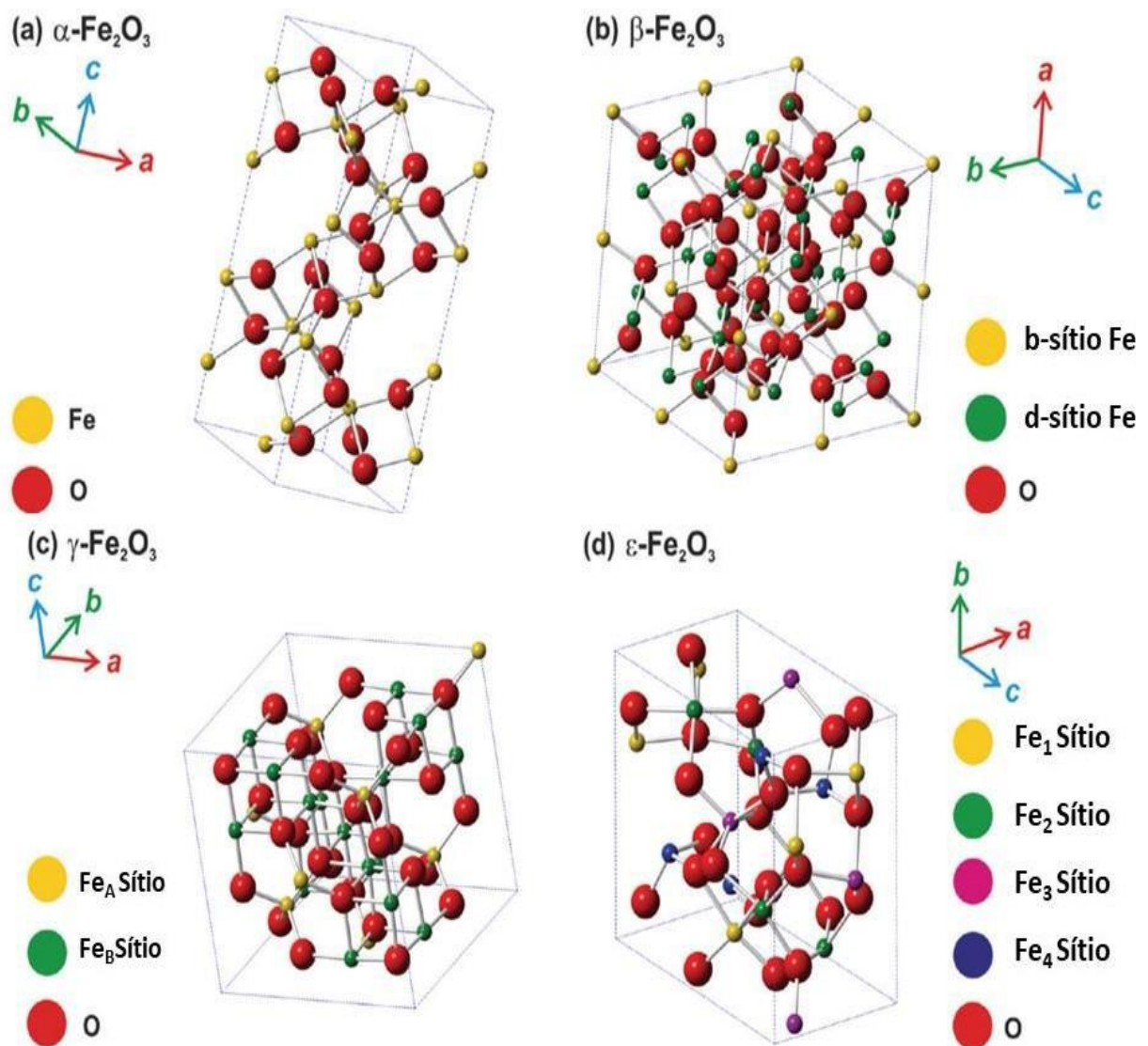
Nas últimas duas décadas, a nanotecnologia tem atraído grande interesse em muitas áreas de pesquisa devido ao desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, os quais podem ser obtidos através de diferentes métodos, como os físicos ou químicos (CAMPOS *et al.*, 2015). Elas podem ser produzidas a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos, possuindo propriedades únicas quando comparadas a materiais de tamanhos maiores. Essa mudança nas propriedades ocorre, dentre outros aspectos, pela redução de tamanho, a qual leva ao aumento da relação superfície/volume (CAMPOS *et al.*, 2015). Materiais nanoestruturados apresentam diferentes propriedades físicas, químicas, ópticas, mecânicas, elétricas e magnéticas, possuindo, dessa forma, aplicações em diferentes áreas tecnológicas, dentre elas a medicina, a biotecnologia e a agricultura (SRIVASTAVA; CHAUBEY; OJHA, 2009).

Dentre as nanopartículas mais estudadas, estão as provenientes do óxido de ferro. Alguns de seus polimorfos cristalinos são mais conhecidos e caracterizados, como mostrados na Figura 1, apresentando propriedades magnéticas únicas. As principais formas, a hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), ocorrem na natureza, enquanto as formas beta ( $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e épsilon ( $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) são geralmente sintetizadas em laboratório (BABAY; MHIRI; TOUMI, 2015; MACHALA; TUČEK; ZBOŘIL, 2011). Além destas, a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) também é uma das mais interessantes formas cristalográficas do óxido de ferro (BABAY; MHIRI; TOUMI, 2015).

Machala; Tuček; Zbořil (2011) descreveram a existência de diferentes polimorfismos na estrutura de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ : (1) o  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (hematita) possui uma estrutura de cristal hexagonal centrada em romboedro com uma rede compactada de oxigênios, na qual dois terços dos sítios octaédricos estão ocupados por íons  $\text{Fe}^{3+}$  (Fig.1a). A estrutura é descrita como sendo fracamente ferromagnética ou antiferromagnética, a depender da temperatura. (2) o  $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$  tem uma estrutura cristalina centrada no corpo cúbico do tipo “*bixbyite*”. Ele exibe um comportamento paramagnético a temperatura ambiente. É um polimorfo raro do óxido de ferro, existindo apenas na sua forma nanométrica. Os íons  $\text{Fe}^{3+}$  ocupam dois sítios cristalográficos octaédricos não-

equivalentes (Fig.1b). (3) o  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemita) possui uma estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio inverso e possui propriedades ferromagnéticas. Ele contém cátions em dois sítios cristalográficos não-equivalentes, nas posições octaédrica e tetraédrica (Fig.1c). (4) o  $\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , assim como  $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , é um polimorfo raro de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  que existe apenas na forma de nanoestruturas. Possui uma estrutura cristalina ortorrômbica. Ele possui seis ânions e quatro cátions ( $\text{Fe}_1$ ,  $\text{Fe}_2$ ,  $\text{Fe}_3$  e  $\text{Fe}_4$ ) em posições cristalograficamente não-equivalentes (Fig.1d).

Figura 1: Representação gráfica das estruturas cristalinas fundamentais de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .



Fonte: Adaptado de Machala; Tuček; Zbořil (2011).

A magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) apresenta propriedades ferromagnéticas ou superparamagnéticas, a depender da temperatura, e difere das outras formas de óxido

de ferro por conter em sua estrutura as formas bivalente e trivalente do ferro. Ela é formada por uma estrutura de cristal de espinélio cúbico inverso (CAMPOS *et al.*, 2015).

Apesar da existência de diversos polimorfos, as formas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  foram consideradas as mais promissoras para aplicações biomédicas e biotecnológicas devido às suas propriedades superparamagnéticas, além da baixa toxicidade e metodologia de separação simples (ALI *et al.*, 2016).

As nanopartículas de óxido de ferro (NPFe) podem ser implantadas internamente no organismo, podem ser controladas espacialmente dentro do corpo humano por meio de um campo magnético externo que seja considerado fisiologicamente seguro e sua localização pode ser detectada por ressonância magnética de imagem (ASSA *et al.*, 2016) São geralmente consideradas biocompatíveis e biodegradáveis, uma vez que, após sua liberação, o ferro livre é integrado ao ferro de reserva do corpo, usado para processos metabólicos e, eventualmente, eliminado do organismo (PHILOSOF-MAZOR *et al.*, 2013; REDDY *et al.*, 2012).

Dessa forma, são as propriedades físico-químicas das nanopartículas de ferro que permitem que sejam aplicadas em sistemas biológicos. Métodos de síntese, cristalização, tamanho, formato, propriedades magnéticas e qualidade das NPFe afetam essas propriedades. Portanto, é evidente que a escolha da melhor abordagem para a síntese de NPFe é fundamental para oferecer um material de qualidade para essas aplicações (ALI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2014).

### **2.1.1 Principais métodos de síntese**

Diferentes métodos de síntese podem ser utilizados na preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (WU *et al.*, 2015). O método de preparação desempenha um papel fundamental na determinação do tamanho e forma, distribuição das partículas e química da superfície, portanto, influencia diretamente nas aplicações do material. Além disso, o método utilizado também determina o grau de defeitos estruturais ou impurezas presentes nas partículas, bem como a distribuição de tais defeitos (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012).

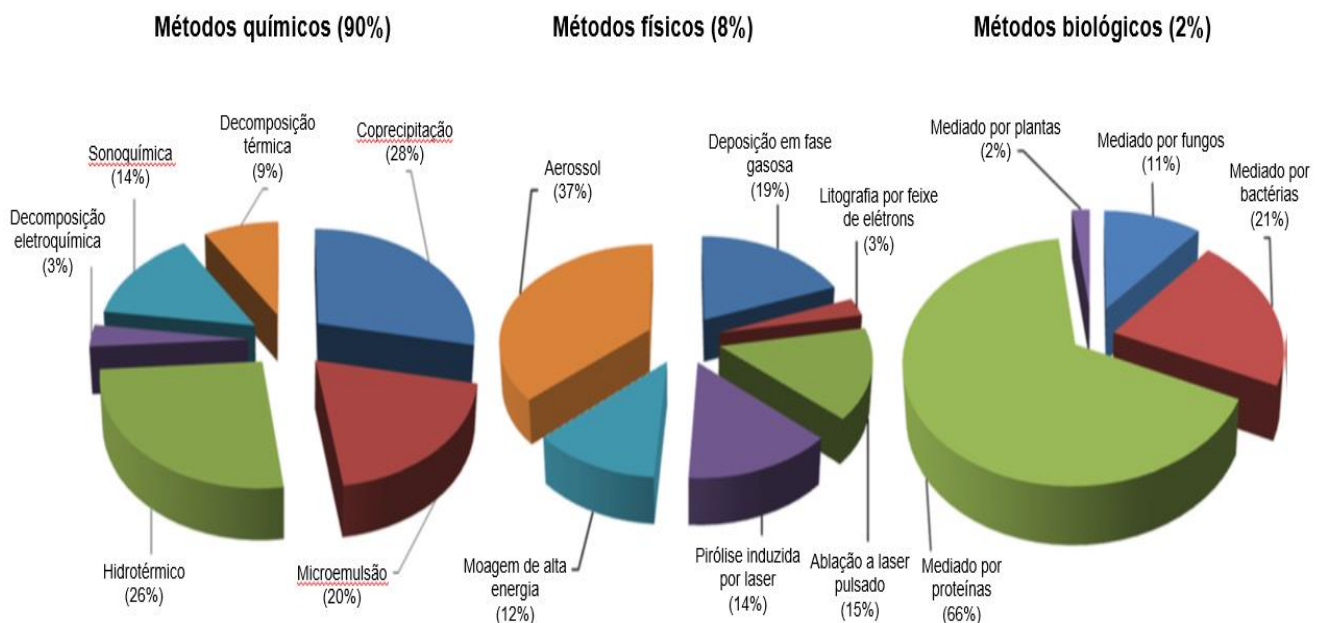
As NPFs podem ser sintetizadas, principalmente, através de três métodos (Figura 2):

**Métodos físicos:** são técnicas bastante elaboradas e que apresentam a desvantagem de não se poder controlar o tamanho das partículas na escala nanométrica (CUENYA, 2010).

**Métodos químicos:** esses métodos são simples, tratáveis e eficientes, nos quais se pode estabelecer o tamanho, a composição e o formato das NPFs (WU; HE; JIANG, 2008). Óxidos de ferro podem ser sintetizados através da coprecipitação de  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  pela adição de uma base (WU *et al.*, 2011). O tamanho, formato e composição das NPFs através de métodos químicos depende do tipo de sal utilizado, proporção entre  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , pH e força iônica (LAURENT *et al.*, 2008).

**Métodos biológicos:** apresentam baixo custo, reprodutibilidade e alto rendimento, porém são extremamente laboriosos (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

Figura 2: Comparação entre os métodos de síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPFs).



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

Cada método possui suas vantagens e desvantagens, as quais estão sintetizadas na Tabela 1. Dentre esses métodos, os químicos são os mais utilizados, devido ao seu baixo custo e alto rendimento (ALI *et al.*, 2016).

Tabela 1: Técnicas de síntese de NPFs e comparação em relação aos aspectos morfológicos, vantagens e desvantagens.

<b>Tipo de método</b>	<b>Técnica</b>	<b>Morfologia do produto</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Físico</b>	Deposição em fase gasosa	Esferas e esferas irregulares	Fácil de executar	Problemas no controle do tamanho de partícula
	Litografia por feixe de elétrons	Esferas e hastes	Espaço entre partículas bem controlado	Requer máquinas caras e complexas
	Aerossol	Monocristais mesoporosos, gaiolas octaédricas	Produção em larga escala	Requer temperaturas muito altas
<b>Químico</b>	Sol-gel	Esferas, esferas irregulares, esferas porosas e não-porosas ou formato de roca	Controle preciso de tamanho e estrutura interna	Alta permeabilidade, ligação fraca, baixa resistência ao desgaste
	Oxidativo	Esferas irregulares alongadas e pequenas	Distribuição de tamanho restrita e uniforme	Colóides de ferrita de tamanho pequeno
	Coprecipitação	Esferas	Simple e efetivo	Inapropriado para sínteses de fase estequiométrica precisa e não contaminada

Hidrotérmico	Esferas irregulares compactas, alongadas e de vários formatos	Tamanho de partícula e formato são facilmente controláveis	Alta pressão e temperatura de reação
Injeção de fluxo	Hastes pequenas, esferas irregulares, folhas ou formatos rômnicos	Procedimento com controle preciso, com grande mistura e homogeneidade, além de boa reprodutibilidade	Sob um regime de fluxo laminar em um reator capilar, requer uma mistura de reagentes segmentada ou contínua
Eletroquímico	Esferas, nanohastes, nanocristais hexagonais e facetas	Tamanho de partícula controlável	Dificuldade de reproduzir
Sonoquímico	Bipirâmides, esferas ou hastes truncadas	Distribuição de tamanho delimitado nas partículas	Mecanismo ainda não é bem compreendido
Fluido supercrítico	Nanocristais mesoporosos, nanotubos irregulares alongados	Não utiliza solvente orgânico e possui controle eficiente do tamanho de partícula	Requer altas temperaturas e pressão crítica
Nanorreatores	Nanopartículas ocas e esféricas	Possibilidade de controle específico do tamanho das nanopartículas	Condições complicadas



<b>Biológico</b>	Incubação microbiana	Esferas, esferas irregulares, do tipo haste, e formato de plaquetas	Boa reprodutibilidade, escalabilidade, alto rendimento e baixo custo	Lento laborioso e
------------------	----------------------	---	--	-------------------

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

A coprecipitação é um dos métodos mais utilizados, sendo a síntese de magnetita realizada pela mistura dos cloretos de  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  em meio aquoso, na proporção de 1:2, acrescido de uma solução básica e aquecimento (XU *et al.*, 2014). Foi demonstrado que o tamanho de partícula, bem como a polidispersividade de NPFe pode ser adaptado pela mudança de alguns fatores, tais como: razão entre  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , tipo de base utilizada (NaOH,  $NH_4OH$ ,  $CH_3NH_2$ , etc) e força iônica. Outros fatores também influenciam no tamanho de NPFe, como um aumento na proporção entre os reagentes, temperatura, uso de gás  $N_2$ , agitação e pH (WU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2007).

Para se obter produtos de composição homogênea e tamanho de partícula similar, alguns procedimentos de purificação podem ser necessários, como ultracentrifugação ou cromatografia de exclusão molecular (XU *et al.*, 2014).

### **2.1.2 Modificação de superfície de nanopartículas magnéticas**

Na preparação e armazenamento de NPFe, a manutenção da estabilidade é um fator de extrema importância. Essas partículas geralmente são instáveis em solução, o que limita a reutilização e o tempo de vida desses materiais. Além disso, a alta relação superfície/volume e a forte atração magnética entre as partículas pode levar a sua agregação, limitando a sua dispersão em solução aquosa e nas matrizes (WU; HE; JIANG, 2008; XU *et al.*, 2014). Adicionalmente, a fim de expandir as aplicações biológicas das NPFe, algumas biomoléculas também são utilizadas para melhorar a sua biocompatibilidade (WU; HE; JIANG, 2008).

Para superar essas limitações, várias abordagens são utilizadas para modificar a superfície através da adição de compostos químicos e/ou biológicos durante ou após o processo de síntese. Essas técnicas não apenas otimizam as propriedades de superfície das NPFe, tais como biocompatibilidade, dispersibilidade

e biodegradabilidade, como também permitem que nanopartículas hidrofóbicas possam ser utilizadas em sistemas hidrofílicos (ARIAS *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2014).

Os materiais utilizados no procedimento de funcionalização podem ser de origem sintética ou natural. Polietileno, polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG) e álcool polivinílico (PVA) são alguns materiais sintéticos artificiais típicos, enquanto os materiais macromoleculares naturais incluem dextranas, gelatinas, albumina, amido, quitosana, enzimas, lectinas, dentre outros (ASSA *et al.*, 2016).

O procedimento de silanização é, sem dúvida, uma das técnicas mais utilizadas para a introdução de grupos funcionais de superfície em nanopartículas magnéticas devido a algumas características, tais como: baixa toxicidade, alta estabilidade sob condições ácidas e facilidade de se realizar modificações químicas de superfície (COLOMBO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013) e. Além disso, a reação pode ser realizada em meio aquoso ou com solventes orgânicos em temperaturas moderadas, e não são necessárias condições específicas, nem equipamentos caros. O mecanismo consiste na formação da ligação Fe-O-Si entre as NPs e as moléculas de silano, sendo o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) um dos compostos mais utilizados para este fim (LIU *et al.*, 2013).

Protocolos de imobilização utilizando ligantes covalentes também têm sido bastante empregados, especialmente para a imobilização de proteínas nas nanopartículas magnéticas (BARBOSA *et al.*, 2013). Um dos agentes mais empregados para este fim é o glutaraldeído, o qual é utilizado para reticular proteínas nas NPs, devido a interação de seus grupos funcionais (grupo aldeído) que são capazes de interagir tanto com as NPs modificadas quanto com as proteínas de interesse. Essa técnica auxilia a proteína a se manter ancorada nas NPs e pode trazer melhorias na estabilidade da molécula (SAHIN; OZMEN, 2020).

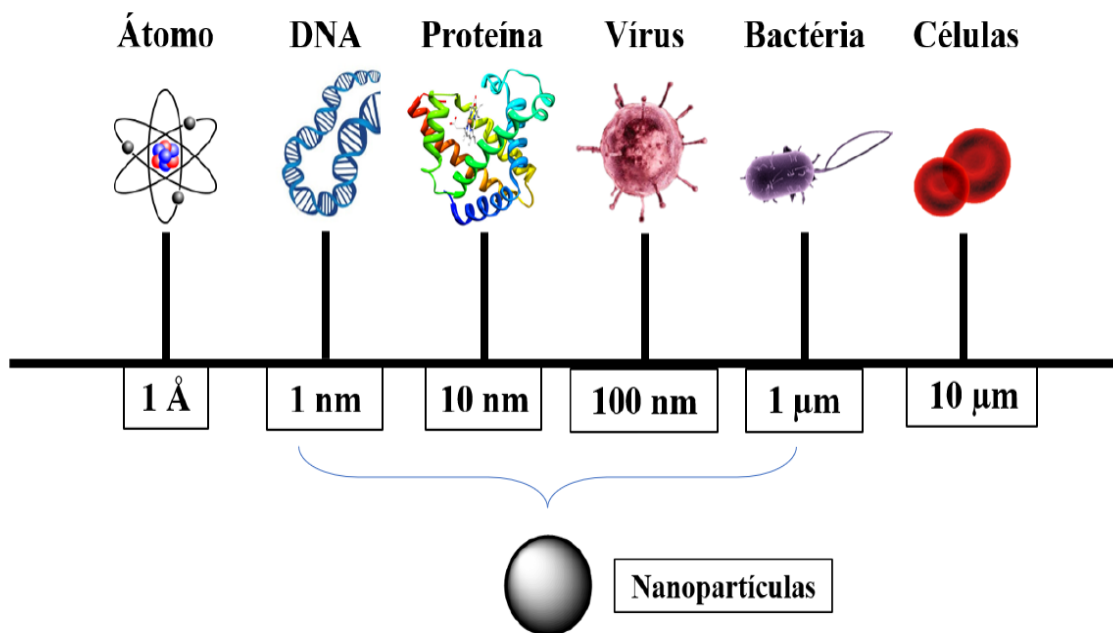
Como as características físicas e químicas possuem efeitos decisivos na aplicabilidade das nanopartículas magnéticas, a utilização de técnicas de caracterização de superfície é fundamental para uma melhor compreensão de propriedades como morfologia de superfície, composição química e distribuição espacial dos grupos funcionais. Algumas técnicas importantes nos estudos das NPs incluem: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão

(MET), microscopia de força atômica (MFA), difração de raios-X (DRX) e análise termogravimétrica (TGA) (ALI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2014).

### 2.1.3 Aplicações biotecnológicas das nanopartículas magnéticas

O interesse da biotecnologia pelas nanopartículas magnéticas em aplicações terapêuticas e diagnóstico tem se intensificado, visto que seu tamanho médio é menor ou comparável com o de vírus (20 a 450 nm), proteínas (5 a 50 nm) e genes (2 nm de largura e de 10 a 100 nm de comprimento) (Figura 3) (ASSA *et al.*, 2016; PANKHURST *et al.*, 2003). Além disso, a capacidade em potencial de serem manipuladas por um gradiente de campo magnético externo para transporte e imobilização *in vivo* de modo não-invasivo as tornam candidatas promissoras no desenvolvimento de novos produtos (COLOMBO *et al.*, 2012).

Figura 3: Representação da dimensão das nanopartículas em comparação ao tamanho de átomos e moléculas de seres vivos.



Fonte: (ABREU, 2019).

Nesse contexto, a biofuncionalização de NPs é primordial para conferir características apropriadas para aplicações biomédicas. Alguns exemplos de revestimentos e as vantagens de seus usos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Exemplos de diferentes biomoléculas e agentes de revestimentos usados na fabricação de biocompósitos magnéticos.

<b>Biomolécula/agente de revestimento</b>	<b>Vantagens/aplicações</b>
Vetores adenovirais	Ressonância magnética de imagem e <i>gene delivery</i> . Favorecem a liberação citosólica.
Anticorpos	Alta variedade de anticorpos que se ligam a proteínas específicas encontradas apenas em estruturas celulares específicas. Processos de reconhecimento, captura celular e separação imunomagnética. Detecção de atividade enzimática <i>in vivo</i> . Rastreamento de células marcadas. Entrega inteligente de medicamentos. Acumulação em tumores.
Aptâmeros	É possível criá-los artificialmente para alvos específicos. Menores que anticorpos. Processos de reconhecimento. Eles se ligam a moléculas-alvo específicas.
Dextrana	Agente estabilizante. Melhora a circulação sanguínea.

DNA ou RNA	Processos de reconhecimento. Entrega de medicamentos.
Doxorrubicina	Medicamento para o tratamento de câncer.
Enzimas ou proteínas	Biomarcadores de processos como câncer, apoptose, reações inflamatórias. Análise, detecção, purificação e separação de proteínas. Acumulação em tumores ( <i>drug delivery</i> e hipertermia)
Oligonucleotídeos	Sondas para detecção ou separação de DNA ou RNA. <i>Nanoswitches</i> .

Fonte: Adaptado de Colombo *et al.* (2012).

Diferentes abordagens biotecnológicas podem ser empregadas através da modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com biomoléculas. De um lado, a funcionalização da superfície com agentes biologicamente ativos como íons específicos, anticorpos, nucleotídeos, peptídeos, vitaminas, hormônios, antibióticos, polímeros, dentro outros atuam como guias no direcionamento desses materiais para células, órgãos ou tecidos, sendo úteis em estudos envolvendo *drug delivery*, exames de contraste, dentre outros (ASSA *et al.*, 2016).

Por outro lado, o uso desses materiais em processos de separação magnética tem várias vantagens em comparação com outras técnicas tradicionais, como cromatografia em coluna ou extração com solventes orgânicos tóxicos. O método de separação magnética oferece a possibilidade de um isolamento direto de amostras brutas que serve, também, como base para vários procedimentos automatizados de baixo a alto rendimento, os quais permitem economizar tempo e recursos (SOSA-ACOSTA *et al.*, 2018). Além disso, foi identificado que partículas magnéticas funcionalizadas com anticorpos direcionados a receptores de células cancerígenas isolam células tumorais usando gradientes de campo magnético (UNNI

*et al.*, 2020). O complexo formado entre as partículas e enzimas/proteínas apresenta vantagens industriais, por apresentar baixo custo, capacidade de recuperação e facilidade de separação através de um campo magnético externo, tendo grande potencial de empregabilidade.

Outra aplicação biotecnológica importante com as nanopartículas de ferro foi o desenvolvimento de novos e econômicos nanomateriais para remediação ambiental e detecção de poluição, pois, com a tendência crescente da industrialização, os metais pesados apresentam uma grande ameaça ao meio ambiente devido ao seu descarte em água e esgoto acima dos limites permitidos, o que provoca efeitos tóxicos no ser humano e no meio ambiente (LAKSHMANAN *et al.*, 2013). As nanopartículas de óxido de ferro são consideradas boas candidatas à adsorção e remoção de metais pesados como cromo, cobre, níquel e chumbo. As nanopartículas de ferro, em uma variedade de formas químicas e estruturais, já exibiram sua diversidade e potencial em muitas fronteiras da área ambiental (HUA *et al.*, 2012b; JIA *et al.*, 2017; SULMAN; MATVEEVA; BRONSTEIN, 2022).

Além dessas aplicações, existem abordagens relatadas também nas áreas de alimentos, tratamento de efluentes, biossensores, ressonância magnética, hipertermia, tratamento de feridas e outras (ARIAS *et al.*, 2018; ASSA *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2014), o que mostra a diversidade de empregos que as nanopartículas magnéticas possuem dentro das várias áreas da biotecnologia.

## **2.2 Lectinas Vegetais**

As lectinas são uma classe de proteínas que, de maneira geral, são capazes de reconhecer carboidratos de maneira reversível e com alta especificidade, diferindo das enzimas por não apresentarem atividade catalítica, e de anticorpos por não necessitarem de estimulação antigênica (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; SHARON, 2007).

Peumans e Van Damme (1995) apresentaram uma definição que considerava que o único pré-requisito para uma proteína ser classificada como lectina é que esta apresentasse, pelo menos, um domínio não catalítico capaz de ligar-se reversível e especificamente a carboidratos. Além dessa definição, Peumans e Van Damme propuseram uma classificação para as lectinas vegetais, levando-se em

consideração sua estrutura proteica. Elas foram divididas em merolectinas, hololectinas e quimerolectinas.

As merolectinas são proteínas que apresentam exclusivamente um único sítio ligante a carboidratos. Com isto, são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas são proteínas que também apresentam apenas um domínio de ligação a carboidratos, porém contém dois ou mais sítios de ligação (os quais podem ser iguais ou homólogos) para essas moléculas, estando aptas a aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas são proteínas que possuem, além do domínio ligante a carboidratos, outro domínio com atividade catalítica ou atividade biológica que age independentemente do domínio ligante de açúcar (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Alguns anos depois, (DAMME *et al.*, 1998) propuseram uma modificação nesta classificação, que foi ampliada com a inclusão de uma nova classe, as superlectinas. As superlectinas são um grupo especial de quimerolectinas, sendo proteínas de fusão, as quais são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos.

Quatro anos depois, foi sugerido por (MONTEIRO-MOREIRA, 2002) mais uma classe de lectinas, denominadas multilectinas, definidas como proteínas constituídas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos, que são idênticos ou homólogos, mas que reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados. Ou seja, são lectinas de especificidade múltipla.

A existência em abundância de lectinas em muitas plantas sugere a elas algumas funções específicas, como a defesa do vegetal contra vírus, bactérias, insetos, fungos e herbívoros; regulação de fitohormônios; e a associação do vegetal a simbioses (ARNAUD; AUDFRAY; IMBERTY, 2013; DAMME *et al.*, 1998; SHARON, 2007).

Apesar das lectinas de plantas serem amplamente exploradas, a presença de lectinas em fontes animais é observada (KILPATRICK, 2002). Os papéis das lectinas incluem endocitose e transporte intracelular (YAMAMOTO, 2009), a indução da apoptose em células tumorais (BAH *et al.*, 2011), o bloqueio da infecção por HIV (TANAKA *et al.*, 2009); regulação da adesão celular bacteriana e a migração (TANNE; NEYROLLES, 2010) e controle dos níveis de proteína no sangue (RYDZ *et al.*, 2013).

As lectinas são também conhecidas por desempenharem um papel importante no sistema imune, reconhecendo carboidratos que são encontrados exclusivamente no patógeno ou que são inacessíveis em células hospedeiras.

Existe um grande número de lectinas vegetais já isoladas, caracterizadas e disponíveis comercialmente. Por muito tempo, as lectinas de plantas foram as únicas estruturalmente caracterizadas e, especificamente, as lectinas de leguminosas têm sido consideradas modelos para o estudo de interações proteína-carboidrato (ARNAUD; AUDFRAY; IMBERTY, 2013). Devido a sua abundância, facilidade de isolamento e de manuseio, até mesmo a sua produção de forma recombinante, as lectinas vegetais se tornaram ferramentas bastante utilizadas em diversas áreas, dentre elas a medicina, a biologia celular, biologia molecular e a bioquímica. E essa aplicação pode ser exemplificada na purificação e caracterização de glicoconjugados de superfície celular, na análise dos mecanismos envolvidos na glicosilação, na tipagem sanguínea, no diagnóstico e terapia na pesquisa sobre as neoplasias e até mesmo na identificação de cepas de microrganismos (ARNAUD; AUDFRAY; IMBERTY, 2013; HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017; LOBO *et al.*, 2017; SHARON, 2007). Elas têm dado suporte a estudos moleculares, estruturais, genéticos, de patologia, de fisiologia vegetal, dentre outros, através do detalhamento das interações proteína-proteína e proteína-carboidrato.

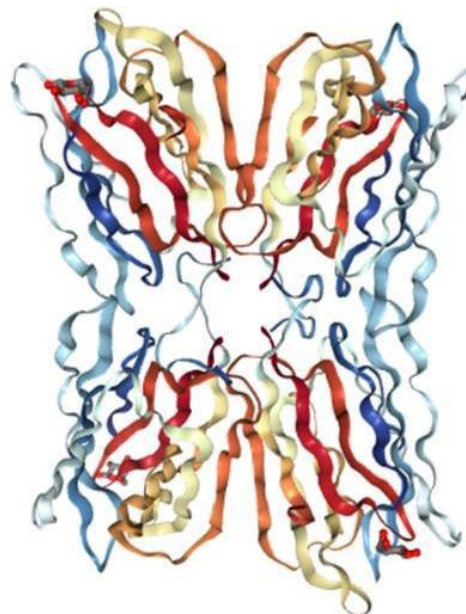
### **2.2.1 Frutalina**

A frutalina é uma lectina de especificidade múltipla, pertencente à família das lectinas relacionadas a jacalina (JRL), e é a lectina de maior abundância presente nas sementes de *Artocarpus incisa* L., popularmente conhecida como fruta-pão (MOREIRA *et al.*, 1998). A FTL foi isolada em 1998 por Moreira e colaboradores por meio de cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana reticulada de *Adenantha pavonina*. É uma glicoproteína  $\alpha$ -D-galactose ligante (podendo reconhecer epímeros de  $\alpha$ -D-manose), contendo 2,1% de carboidratos em sua estrutura. Apresenta elevados teores de aminoácidos ácidos, hidroxilados e hidrofóbicos e baixo teor de aminoácidos sulfurados e tem a capacidade de aglutinar hemácias de vários animais, aglutinando fortemente as hemácias humanas, porém não apresenta qualquer especificidade por antígenos do sistema ABO (MOREIRA *et al.*, 1998).



Em pH acima de 8,0, a FTL aparece na conformação de tetrâmero, enquanto em pHs mais baixos ela se apresenta mais comumente na forma de dímeros. O padrão da FTL em SDS-PAGE é semelhante a Jacalina: duas bandas entre 20 e 14 kDa que correspondem às frações glicosilada e não glicosilada, respectivamente, além de apresentar espectro de massa deconvoluído com diferentes massas dentro de 16,5 kDa, consistente com a presença de glico-isoformas de monômeros idênticos (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Sua estrutura tridimensional foi obtida através de cristalização e análises dos dados por difração de raios-X (MONTEIRO-MOREIRA *et al.*, 2015), mostrando que a FTL apresenta, em cada unidade monomérica, um  $\beta$  prisma simétrico, com três grupos de 4 folhas beta, cada (Figura 4). O sítio de reconhecimento a carboidratos é semelhante ao da Jacalina e envolve o N-terminal da cadeia  $\alpha$ , demonstrando, na região, um enovelamento característico da família Moraceae. O sítio de ligação da FTL consiste em uma cavidade próxima ao N-terminal da cadeia  $\alpha$ , formada por quatro resíduos-chave: Gly25, Tyr146, Trp147 e Asp149.

Figura 4: Estrutura tridimensional da Frutalina



Fonte: (MONTEIRO-MOREIRA *et al.*, 2015).

Alguns estudos comprovam que a frutalina pode desempenhar diferentes aplicações biomédicas, por ser capaz de induzir a migração de neutrófilos em ratos, ser uma molécula quimiotática potente para neutrófilos humanos e estimulador de linfócitos

humanos, além de apresentar efeitos citotóxicos sob células tumorais em cultura *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2009, 2011).

### 3 HIPÓTESE

Considerando os diversos relatos na literatura da obtenção e das aplicações das nanopartículas imobilizadas com proteínas, o presente trabalho visou confirmar a seguinte hipótese:

A funcionalização da frutalina em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) pode ser alcançada de maneira eficiente, de forma que o material obtido apresente boas características físico-químicas, não seja tóxico em testes *in vitro* nas concentrações usuais e de forma que a lectina mantenha sua estrutura ativa e funcional para o reconhecimento a carboidratos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Produzir uma matriz de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) funcionalizadas com frutalina com potencial aplicação biotecnológica.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar as nanopartículas de óxido de ferro;
- Purificar a frutalina a partir de sementes de *Artocarpus incisa* L.;
- Funcionalizar as NPs com FTL utilizando APTES e glutaraldeído como agentes intercalantes;
- Caracterizar as nanopartículas com e sem funcionalização;
- Demonstrar a atividade da lectina após a funcionalização através da atividade hemaglutinante e ensaio de interação ao carboidrato;
- Determinar a viabilidade celular das NPFTL.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Coleta, extração e purificação da frutalina

A coleta do material vegetal, frutos e sementes de *Artocarpus incisa* L., ocorreu na região serrana de Maranguape/Ceará.

As sementes de *A. incisa* foram destegumentadas, fatiadas e expostas à acetona para a realização do processo de desidratação. O procedimento ocorreu utilizando-se a proporção 1:2 (m/v) de acetona, com trocas a cada 6 h, durante 24 h. Ao término do processo, o material foi deixado para secagem ao ar livre. Em seguida, realizou-se a trituração das sementes com moinho de lâminas e o peneiramento para obtenção de farinha homogênea. Os procedimentos foram realizados de acordo com metodologia adaptada de Moreira et al. (1998).

A extração das proteínas foi realizada suspendendo-se a farinha em solução de NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v), e deixada em agitação contínua por 30 min à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 x g, por 30 min, a 4 °C em centrífuga refrigerada e o sobrenadante obtido foi filtrado e constituiu o extrato bruto.

Para o isolamento da frutalina, foi utilizada a cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-galactose. A coluna foi previamente equilibrada com NaCl 0,15 M e, em seguida, o extrato bruto foi aplicado a um fluxo de 0,5 mL/min. O material não retido (pico I) foi eluído com NaCl 0,15 M. A fração retida na coluna (pico II) foi eluída com solução de galactose 0,2 M em NaCl 0,15 M, que resultou na fração contendo frutalina. A eluição das proteínas foi acompanhada por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. A fração obtida do pico II foi dialisada utilizando-se o kit *Slide-A-Lyzer Dialysis Flask, 10K MWCO* da ThermoFisher®. A pureza da lectina foi analisada por sistema de eletroforese SDS-PAGE seguindo metodologia descrita por (LAEMMLI, 1970)

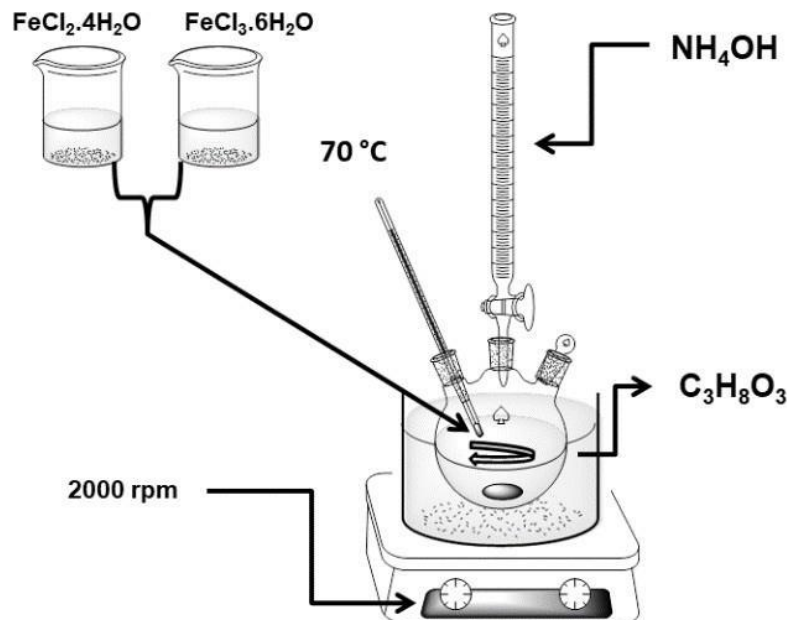
A lectina foi submetida ao ensaio hemaglutinante, realizado segundo a metodologia descrita por (MOREIRA; PERRONE, 1977), para verificação de sua atividade. Em resumo, uma diluição seriada foi obtida com solução de 1 mg/mL de frutalina em solução de NaCl 0,15 M, em placas de microtitulação de 96 poços com fundo V. Aos poços foram adicionados 50 µl de suspensão 2% de eritrócitos de sangue

de coelho, seguido de incubação a 37 °C por 1 h, além de 1 h em temperatura ambiente.

## 5.2 Síntese das nanopartículas de ferro (NPFe)

As nanopartículas de óxido de ferro magnético foram sintetizadas pelo método de coprecipitação alcalina de Fe (II) e Fe (III) (Figura 5). Os sais de ferro (1,34 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 3,40 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada. A solução foi mantida sob agitação a 2000 rpm em chapa aquecedora a 70 °C por 3 h. Nesse período, foi adicionada uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  4 M até que se atingisse o pH 11. A solução de amônio foi adicionada lentamente para a produção de nanopartículas de menor tamanho. Após desligar o aquecimento e atingir a temperatura ambiente, as NPs foram extensivamente lavadas com água deionizada, separadas por centrifugação a 3.000 rpm, 25 °C, por 10 min e secadas em estufa a 50 °C por 12 horas. Em seguida, as NPs foram armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente, para posterior utilização no processo de funcionalização. A metodologia foi adaptada de (Catalano & di Benedetto, 2017).

Figura 5: Esquema de síntese das NPFe pelo método de coprecipitação.



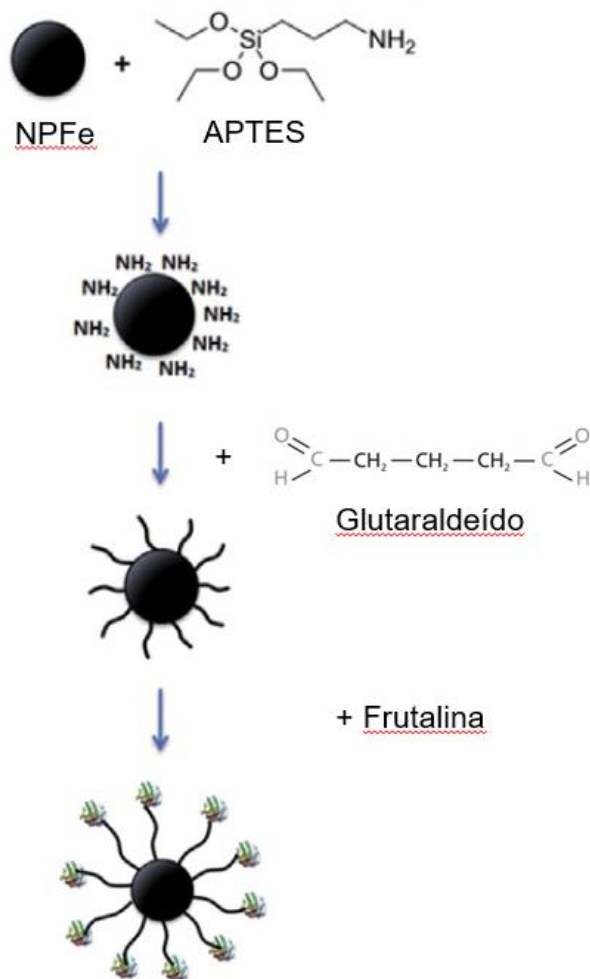
Fonte: (MENDES, 2020).

## 5.3 Funcionalização das nanopartículas de ferro com frutalina

Nanopartículas foram dispersas, na proporção de 1:1, em solução 10% de APTES (diluído em 1:1 água/etanol), sonicadas por 10 min e mantidas sob agitação *overnight*. As partículas modificadas foram coletadas, lavadas 3x com etanol P.A. e

colocadas na estufa a 60 °C por 1h30min. Em seguida, o material foi adicionado a uma solução 2,5% de glutaraldeído, sonificado por 10 min e mantido sob agitação em um shaker por 2 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e as nanopartículas foram lavadas 2x com água destilada e 1x com tampão PBS para retirada do glutaraldeído não reticulado. Posteriormente, o suporte ativado foi adicionado à solução de frutalina (13,7 mg de proteína por grama de suporte ativado) e o conjunto foi solubilizado em PBS. O material foi mantido sob agitação em shaker por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e armazenado para o teste de eficiência de imobilização. As nanopartículas funcionalizadas foram lavadas 3x com PBS para retirada da frutalina não funcionalizada e, em seguida, foram armazenadas para uso posterior (Figura 6). A metodologia utilizada foi adaptada de (KUMAR *et al.*, 2019a).

Figura 6: Representação esquemática do processo de funcionalização da frutalina nas NPFe.



## 5.4 Eficiência de imobilização

Para averiguar a eficiência de imobilização, realizou-se a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O cálculo foi realizado seguindo-se a equação:  $[(P_i - (P_w + P_s)) / P_i] \times 100$ , onde  $P_i$  é a concentração total de proteína antes do ensaio;  $P_w$  e  $P_s$  correspondem a concentração de proteína nas lavagens e no sobrenadante após a imobilização, respectivamente (VERMA *et al.*, 2012).

## 5.5 Caracterização das nanopartículas

### 5.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens para estudo da morfologia das amostras foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura com elétrons secundários. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio modelo Quanta 450 FEG, da Central Analítica da UFC. As amostras, na forma de pó, foram previamente fixadas em fita de carbono.

### 5.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

As medidas de tamanho de partícula foram realizadas por espalhamento dinâmico de luz pelo equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Inc, UK). As nanopartículas foram dispersas em água deionizada e aplicadas em ultrassom por 20 min. Parte da dispersão foi inserida em cubeta apropriada e posicionada no equipamento para realização das medidas. A análise foi realizada em triplicata. As medidas de potencial zeta, referentes à carga residual de cada amostra, foram realizadas no mesmo equipamento e utilizando a mesma cubeta.

### 5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Com o intuito de verificar a presença de grupos funcionais, as amostras foram analisadas através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Os dados de FTIR foram obtidos em espectrômetro modelo IRTracer-100 (Shimadzu, Japan). Foram utilizadas 2 mg das amostras (FTL, NP e NPFTL), as quais foram dispersas e analisadas em pastilha de KBr na faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 64 scans (CATALANO; DI BENEDETTO, 2017).

### 5.5.4 Difração de Raios-X

As amostras (NPFe e NPFe+FTL) foram submetidas a difração de raios-X (DRX) no difratômetro Rigaku DMAXB, do Laboratórios de Raios-X da UFC. Foi



utilizada a fonte de radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) a 30 kV e 30 mA, na faixa angular  $2\theta$  no intervalo de  $20^\circ - 70^\circ$ , com ciclo de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ .

### 5.5.5 *Análise termogravimétrica (TGA)*

Aproximadamente 10 mg das amostras de NPFe e NPFTL e 7 mg de FTL liofilizada foram analisadas em equipamento TA Instruments (TGA Q50 Shimadzu), no Laboratório de Termoanálise do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio sob fluxo de gás de 40 mL/min e taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  de 25 a  $700^\circ\text{C}$  (BADHE *et al.*, 2017).

### 5.5.6 *Análise da influência da temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) e tempo e contato (min) na estabilidade da magnetização das nanopartículas*

Foi traçado um delineamento fatorial completo. Temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) ( $X_1$ ) e Tempo de Contato (min) ( $X_2$ ) foram estabelecidas como variáveis independentes, estudadas em dois níveis em planejamento fatorial completo (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Os níveis de variação e as variáveis independentes estão apresentadas na Tabela 3.

O delineamento experimental foi realizado com onze experimentos, compostos por quatro pontos fatoriais, quatro axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Os limites foram estabelecidos de acordo com as análises termogravimétricas das partículas descritas na literatura. A Tabela 4 mostra o planejamento fatorial completo ( $2^2$ ) com pontos axiais e repetição nos pontos centrais, com valores reais e codificados.

Todos os tratamentos foram realizados na mufla, utilizando 1g de NPFe em cada análise, com auxílio de cadinho apropriado, seguindo os valores de temperatura e tempos de contato estabelecidos na Tabela 4.

Tabela 3: Variáveis independentes e valores codificados e reais dos níveis utilizados no planejamento experimental fatorial  $2^2$ .

Variáveis	Níveis das variáveis codificadas				
	-1,41	-1,0	0	+1,0	+1,41
Independentes	Níveis as variáveis reais				
Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	56,80	150	375	600	693,198
	19				1

Tempo de contato (min)	35,14	60	120	180	204,852
	72				8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4: Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> com valores reais e codificados para cada ensaio.

Tratamentos	Níveis de variáveis codificadas		Níveis de variáveis reais	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	Tempo de contato (min)
1	-1	-1	150	60
2	-1	+1	150	180
3	+1	-1	600	60
4	+1	+1	600	180
5	-1,41	0	56,8019	120
6	+1,41	0	693,1981	120
7	0	-1,41	375	35,1472
8	0	+1,41	375	204,8528
9 (C)	0	0	375	120
10 (C)	0	0	375	120
11 (C)	0	0	375	120

(C) = Ponto Central

Fonte: Elaborado pelo autor

## 5.6 Atividades biológicas

### 5.6.1 Atividade hemaglutinante das NPFTL

Para averiguação da atividade lectínica após o procedimento de funcionalização, as nanopartículas funcionalizadas com frutalina foram submetidas ao ensaio hemaglutinante realizado segundo a metodologia descrita por (MOREIRA; PERRONE, 1977), com adaptações. Em resumo, uma diluição seriada foi obtida com amostras de NP e NPFTL em solução de NaCl 0,15 M, em placas de microtitulação de 96 poços com fundo V. Aos poços foram adicionados 50 µl de suspensão 2% de eritrócitos de coelho seguido de incubação a 37 °C por 1 h, além de 1 h em temperatura ambiente.

### **5.6.2 Ensaio de interação ao carboidrato**

A fim de se averiguar a especificidade da lectina ao carboidrato após o processo de funcionalização, utilizou-se 5 mg de galactomanana purificada. A amostra foi solubilizada em solução salina (NaCl 0,15 M) contendo 20 mg de NPFTL. O material foi mantido sob agitação em shaker por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi colocada na presença de um ímã, o sobrenadante foi descartado, e as partículas foram lavadas extensivamente com solução salina. O material obtido foi secado em concentrador de amostras *SpeedVac* e, em seguida, submetido à análise de FTIR para verificação dos grupos funcionais que demonstrem a interação lectina-carboidrato.

### **5.6.3 Ensaio *in vitro* com fibroblastos**

Fibroblastos imortalizados de camundongo (L929), foram cultivadas em frascos próprios para cultura (Kasvi, 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL, Sigma). As células foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade e, periodicamente, observadas com auxílio do microscópio de inversão.

#### **5.6.3.1 Ensaio de viabilidade celular com as NPFTL**

Fibroblastos aderidos em frascos de cultura foram suspensos com tripsina-EDTA e plaqueados a  $3 \times 10^3$  (L929) células por poço em placas de 96 poços. Após adesão e recuperação por 12 h, as células foram expostas às NPFTL em um intervalo de concentrações de 0,0625 – 2 mg.mL<sup>-1</sup> preparadas em RPMI 1640 (10% SFB, 1% de penicilina – estreptomicina), 2 mM de glutamina. Células mantidas no meio sem NPFTL foram usadas como controle. Após tratamento por 24h a 37 °C em incubadora com atmosfera controlada e 5% de CO<sub>2</sub>, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o reagente PrestoBlue®, de acordo com instruções do fabricante. As fluorescências foram medidas em comprimento de onda de excitação a 530-560 nm e emissão em 590. A viabilidade celular (%) foi calculada pela seguinte fórmula

$$Viabilidade (\%) = \left( \frac{RFU \text{ tratado}}{RFU \text{ controle}} \right) \times 100$$

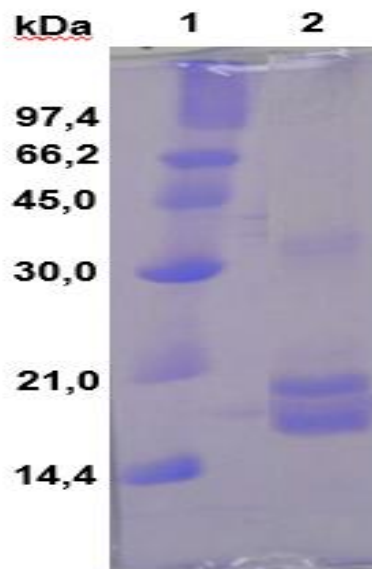
Onde  $RFU_{tratado}$  corresponde às unidades de fluorescência relativa dos poços tratados com as amostras e  $RFU_{controle}$  às unidades de fluorescência relativa aos dos poços não tratados (RISS *et al.*, 2016). As amostras foram testadas em diluição seriada, em octoplicata, e os resultados foram avaliados segundo a média erro padrão da média (E. P.M) da porcentagem de inibição do crescimento celular. Os dados foram analisados por one-way-ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism Versão 7.03.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Purificação da frutalina

A pureza da lectina foi confirmada através do perfil eletroforético obtido a partir de um gel SDS-PAGE 12,5%, como mostra a Figura 7. Na eletroforese, foi observado o perfil característico dessa proteína, com duas bandas de massa aparente, as quais se apresentam desta forma devido às diferenças de glicosilações (MOREIRA *et al.*, 1998).

Figura 7: SDS-PAGE referente à purificação da Frutalina. Poços: (1) Marcador LMW GE; (2) Frutalina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para verificar a atividade lectínica, foi realizado o ensaio da atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho, no qual foi possível observar aglutinação, o que nos permite afirmar que a FTL estava ativa.

### 6.2 Eficiência de imobilização

A quantidade de frutalina imobilizada foi calculada seguindo-se a equação descrita na metodologia, levando-se em conta a concentração de proteína nas lavagens e no sobrenadante após a imobilização. Obteve-se uma eficiência de imobilização de 72%, sendo obtido aproximadamente 10 mg de FTL/g de NPFe. Alguns trabalhos relatam diferentes graus de eficiência, como (YONG *et al.*, 2018) que

obtiveram um rendimento de 39% ao imobilizar concanavalina A (ConA) em NPs, enquanto (VERMA *et al.*, 2012) imobilizaram a enzima  $\beta$ -d-galactosidase com 87% de eficiência e (TOMITAKA *et al.*, 2015) relataram obter mais de 80% de funcionalização da lactoferrina em NPs.

Essas diferenças tem relação com o uso dos agentes de ancoramento. Nesse trabalho, o uso de APTES e glutaraldeído contribuiu para melhorar a eficiência de imobilização, pois eles atuam como “braços”, formando uma malha que permite que a proteína esteja interligada através de ligações covalentes, mantendo a lectina presa à superfície da nanopartícula de maneira mais eficaz.

### **6.3 Caracterização das nanopartículas**

#### **6.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Tamanho de Partícula**

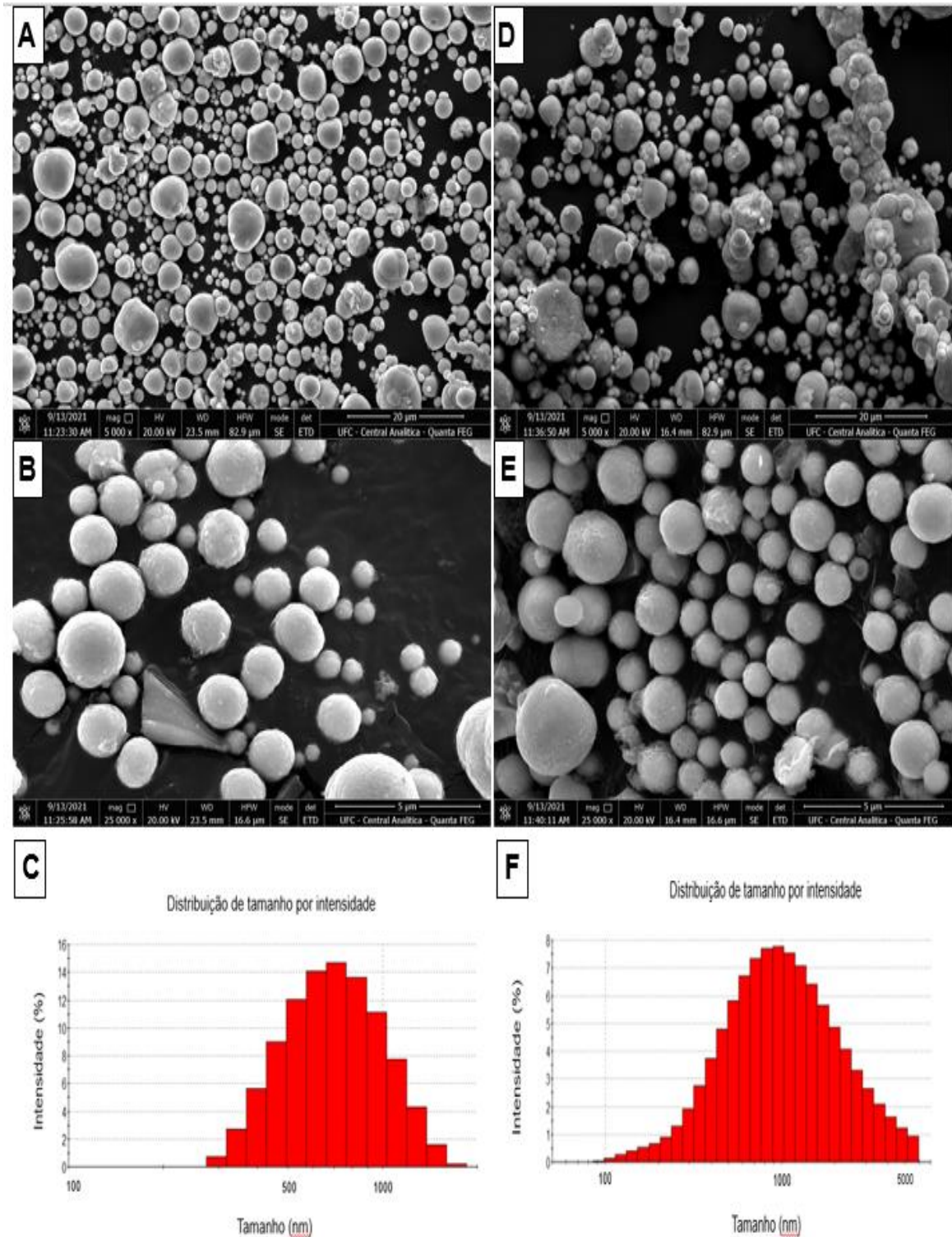
Após a síntese das NPs e do procedimento de funcionalização, os produtos obtidos foram caracterizados fazendo uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) com o intuito de avaliar a morfologia e distribuição do tamanho de partícula, como visto na Figura 8.

De acordo com as imagens, observa-se que as nanopartículas apresentam formato arredondado, superfície lisa, sem aspecto poroso e com grande variação de tamanhos, com algumas chegando a atingir a escala de micrômetros. Essa variedade de diâmetros pode ser explicada por alguns fatores: a limitação da técnica de coprecipitação em se estabelecer um tamanho exato para essas partículas; as ligações inter cruzadas que se estabelecem durante o procedimento de funcionalização; e a auto-agregação decorrente do magnetismo entre as nanopartículas (ROCA *et al.*, 2019). Tais fatores também são relatados por (YONG *et al.*, 2018) que estudaram métodos de funcionalização de NPs com multienzimas, utilizando glutaraldeído e a lectina ConA como agentes intercalantes. O procedimento executado por eles produziu nanopartículas que tiveram seu diâmetro aumentado de aproximadamente 100 nm para 900 nm.

Existe, na literatura, uma discussão acerca da definição exata do que seriam as nanopartículas, pois alguns autores consideram que sejam quaisquer partículas sólidas que estejam na faixa de 1 a 1000 nm (KOHANE, 2007; KREUTER,

1996), enquanto outros restringem essa definição para partículas na faixa de 1 a 100 nm, a depender da sua aplicabilidade (LÖVESTAM *et al.*, 2010).

Figura 8: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) referentes às amostras magnéticas sintetizadas com seus respectivos gráficos de distribuição de tamanho, obtidos por DLS. (A – C) Nanopartículas magnéticas (NPF<sub>e</sub>); (D – F) Nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).



Fonte: Elaborado pela autora

Neste trabalho, o termo nanopartículas está sendo utilizado levando-se em conta a definição ampla, pois as análises demonstraram que o tamanho médio das NPFe obtidas está na faixa dos 700 nm, com um certo aumento após a funcionalização, tendo as NPFTL uma média de 780 nm. É válido ressaltar, também, que as micrografias demonstram que as etapas de funcionalização, incluindo-se a adição de APTES, glutaraldeído e a lectina, não acarretaram em mudanças na morfologia das nanopartículas, o que é um fator importante a ser levado em consideração para posteriores aplicações biotecnológicas.

### 6.3.2 Potencial Zeta

A carga superficial das nanopartículas foi medida através do potencial zeta e os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 5. Observa-se que a carga superficial de NPFTL possui valores negativos quando comparada com a de NPFe, o que é um indicativo de que houve a complexação do material ocorreu de forma eficiente, pois a lectina também possui valores de carga negativa, por apresentar um elevado percentual de aminoácidos ácidos e hidroxilados em sua estrutura (MOREIRA *et al.*, 1998a). Um estudo realizado por (TOMITAKA *et al.*, 2015) também aponta o uso do potencial zeta como um indicativo da conjugação eficiente da proteína estudada com as nanopartículas, pois a carga superficial do material sofre alterações e isso tem influência no meio biológico que será empregado.

Tabela 5: Valores de potencial zeta das amostras de Frutalina (FTL); Nanopartículas de óxido de ferro (NPFe) e Nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).

Amostra	Potencial Zeta (mV)	Média	Desvio Padrão
FTL	-6,56	-6,69	0,192
	-6,91		
	-6,60		
NPFe	22,3	21,9	0,321
	21,8		
	21,7		
NPFTL	-18,1	-17,9	0,208



	-17,7		
	-18,0		

Fonte: Elaborado pela autora.

Além disso, os valores de potencial zeta obtidos para NPFTL também indicam que o complexo apresenta uma certa instabilidade em solução aquosa, o que explica a ocorrência de agregação das nanopartículas, visto que valores que se encontram na região entre -30 mV e +30 mV significam que atuam interações estéricas e eletrostáticas que afetam a estabilidade do complexo. Tal fato é relatado em estudo realizado por (JADHAV *et al.*, 2014), o qual mostrou uma maior estabilidade das nanopartículas de ferro funcionalizadas com 4% de PVA, quando comparadas com as NPs sozinhas em função do tempo durante 11 dias em tampão fosfato pH 7,2.

### 6.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

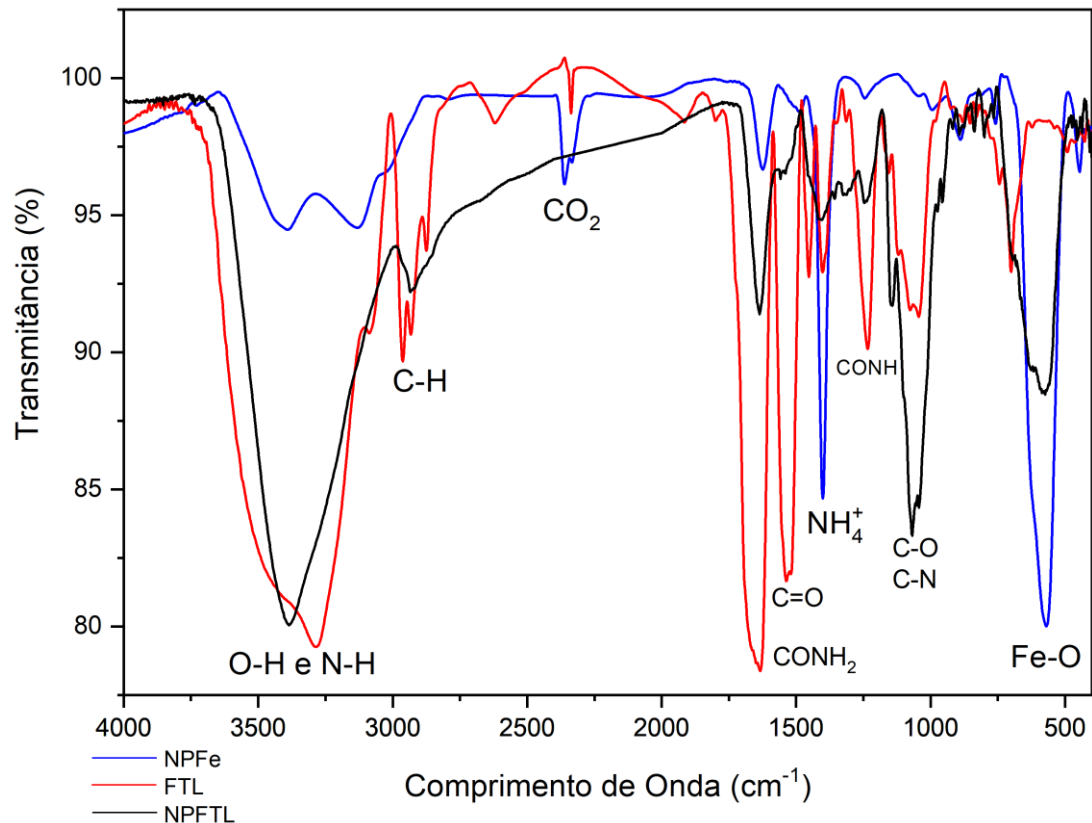
A análise por FTIR é uma ferramenta importante para determinação de estruturas de espécies orgânicas e inorgânicas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), sendo dividida em duas regiões: a primeira, de 4.000 a 1.400  $\text{cm}^{-1}$ , é a região de absorção da maioria dos grupos funcionais, enquanto a região de 1.400 a 600  $\text{cm}^{-1}$  é a banda de impressão digital, sendo muito útil na identificação de compostos, pois pequenas diferenças na estrutura e na constituição da molécula resultam em uma mudança significativa nos picos de absorção (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

A figura 9 apresenta os espectros de infravermelho das nanopartículas de ferro, da frutalina purificada e das nanopartículas de ferro revestidas com a frutalina.

A presença de estiramentos da ligação O-H em torno de 3400  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à presença de grupos O-H ou moléculas de água coordenadas com átomos de ferro na superfície. Além disso, as vibrações de estiramento de N-H se sobrepõem aos de O-H nessa região (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009). Uma banda de absorção próxima à 2900  $\text{cm}^{-1}$  ocorre devido às vibrações das ligações C-H presentes tanto em FTL quanto em NPFTL. As vibrações de estiramento C-O em torno de 2290  $\text{cm}^{-1}$  são devidas ao  $\text{CO}_2$  atmosférico. Os picos presentes em torno de 1635 e 1539  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento simétrico C=O (amida I) e ao estiramento simétrico N-C=O (amida II) (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER,

2009) e as vibrações de estiramento de C=O, presentes na região próxima de 1500  $\text{cm}^{-1}$ , correspondem aos grupos carbonílicos, todos característicos de proteínas (RÊGO *et al.*, 2014).

Figura 9: Espectros de FTIR das amostras de Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (NPFe), Frutalina (FTL) e Nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).



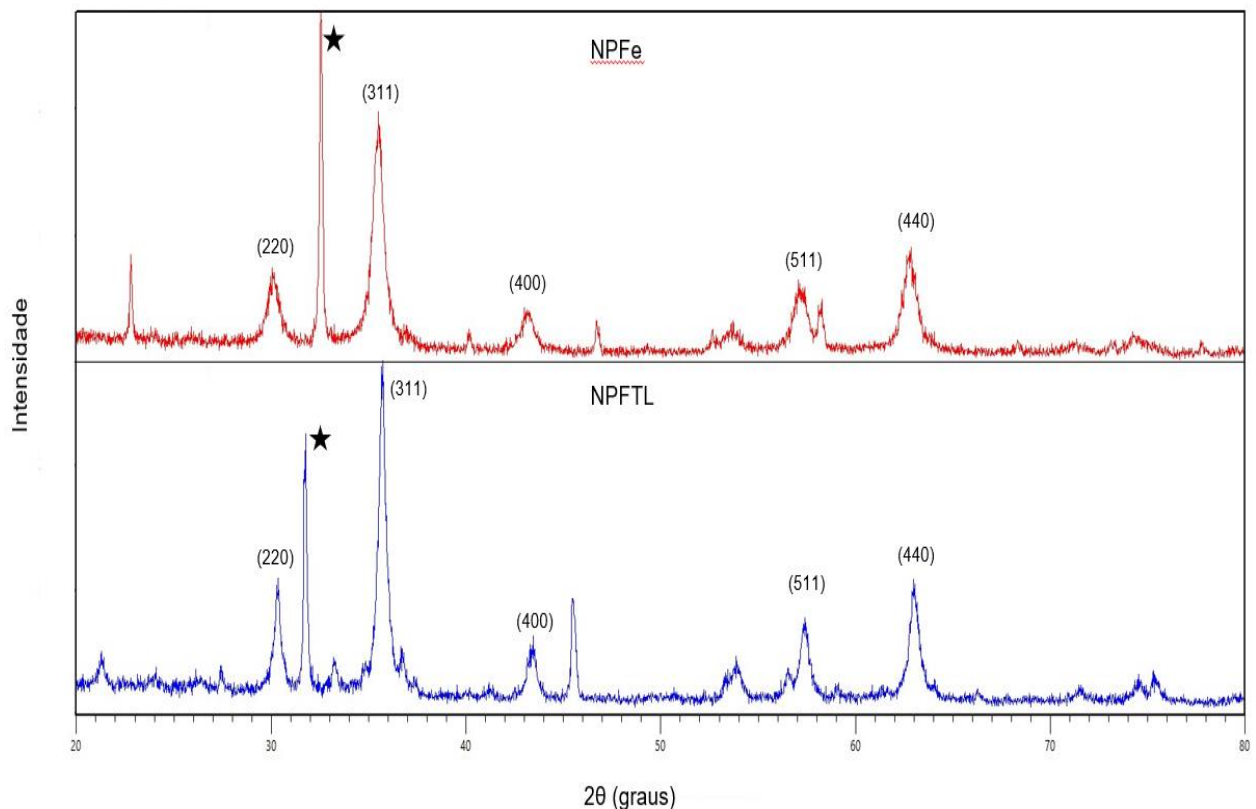
Fonte: Elaborado pela autora.

Uma banda de absorção encontrada nas NPFe, na zona próxima de 1300  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde ao resíduo de  $\text{NH}_4^+$  utilizado na produção das nanopartículas (ZHAO *et al.*, 2009). O pico de absorção na faixa de 1100  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído às ligações peptídicas C-O/C-N (ANDRADE *et al.*, 2019). As bandas de absorção na faixa de 630-500  $\text{cm}^{-1}$ , presentes nas NPFe e nas NPFTL, são atribuídas às vibrações de ligações de Fe-O nas estruturas tetraédricas e octaédricas dos cristais de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (EBRAHIMINEZHAD *et al.*, 2012). Portanto, o gráfico evidencia que o processo de funcionalização ocorreu de forma eficiente, pois ele demonstra que em NPFTL há a presença de grupamentos químicos encontrados apenas em NPFe (como a ligação Fe-O), bem como grupos funcionais presentes somente em FTL (como N-H).

### 6.3.4 Difração de Raios-X

A difração de raios-X é uma técnica importante na determinação das propriedades estruturais de muitos materiais orgânicos e inorgânicos. Os difratogramas experimentais permitem a identificação de compostos cristalinos, determinar os parâmetros de rede, tamanho do grão cristalino, orientação preferencial e grau de cristalinidade dos materiais (MOS *et al.*, 2018). Na figura 10, encontram-se os difratogramas obtidos para as amostras de NPFe e NPFTL.

Figura 10: Difratogramas de DRX das amostras de nanopartículas de óxido de ferro (NPFe) e de nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL). A estrela se refere a um pico que é um resíduo do processo de síntese das NPs.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao se comparar com a base de dados do equipamento, em ambos os materiais, observam-se picos referentes ao padrão cristalino característicos da mistura entre magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), sendo as regiões de (220), (311), (400), (511) e (440) as mais marcantes dos óxidos de ferro (LAI *et al.*, 2013). Isso indica que os materiais apresentam estrutura cristalina do tipo espinélio e

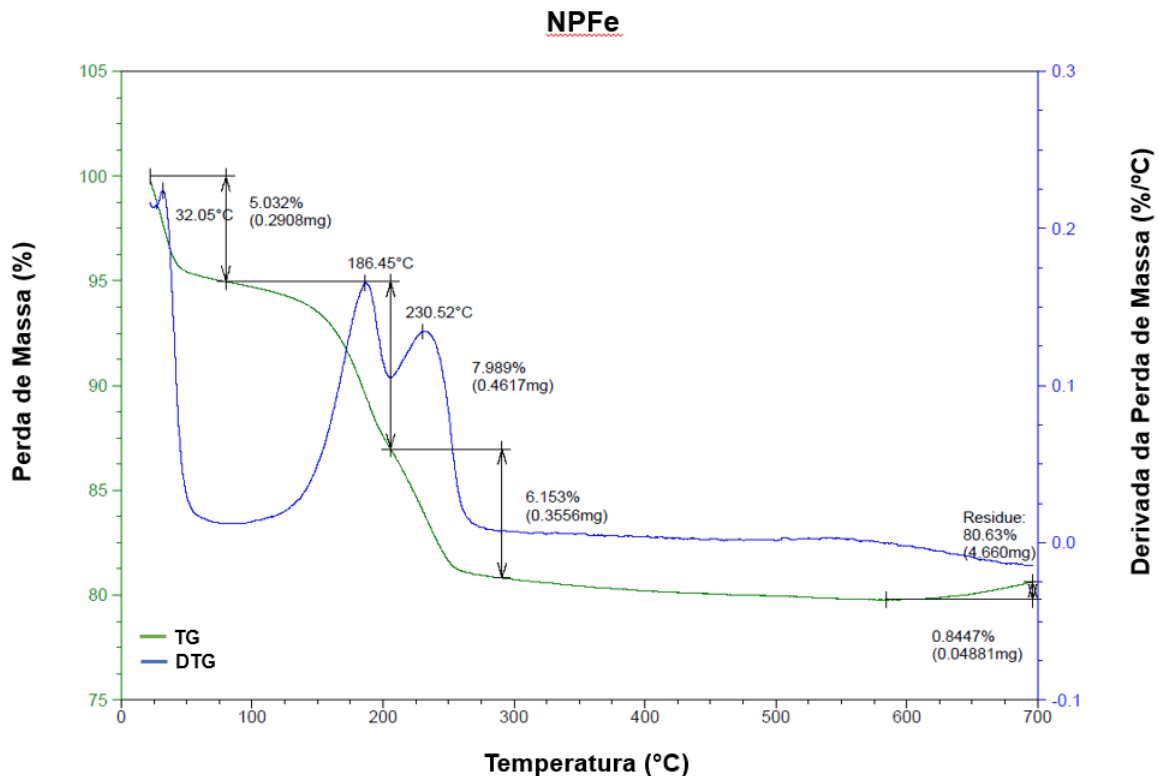
que o processo de síntese não causou mudança de fase do óxido de ferro. Cabe ressaltar que os gráficos apresentaram um pico referente à presença de cloreto de amônio, o qual está marcado com uma estrela. Isso é devido ao processo de síntese das nanopartículas e, apesar das sucessivas lavagens para retirada dos sais, resíduos ainda podem permanecer e ser detectados. Além disso, detectou-se também a presença de picos menores referentes à goetita, a qual corresponde a uma outra forma do óxido de ferro  $\text{FeO}(\text{OH})$ . A formação de diferentes espécies do óxido de ferro pode ocorrer devido tanto a oxidação decorrente do preparo quanto da forma de armazenamento das nanopartículas ao longo do tempo. Contudo, de modo geral, o material se apresenta com aspecto cristalino e sem mudança de fase aparente.

### **6.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica é uma técnica que permite monitorar a perda de massa de uma determinada amostra em função de tempo ou temperatura em uma atmosfera controlada. Essa técnica é utilizada para avaliar a estabilidade térmica do material em uma faixa de temperatura pré-determinada e monitorar as mudanças em percentual de massa que ocorrem em amostras durante o aquecimento (CAMPOS *et al.*, 2015). É importante que a curva de uma TGA seja analisada com o auxílio de uma curva obtida a partir de uma primeira derivada da curva do percentual de massa da análise (DTG). Assim, pode-se identificar o número de etapas envolvidas em cada processo de decomposição térmica.

Observou-se, em NPFe (Figura 11), a ocorrência da primeira perda de massa de 5,032%. O primeiro evento de degradação térmica ocorre com a temperatura máxima em 186,45 °C, com perda de massa de 7,989%, enquanto o segundo evento de degradação ocorre a 230,52 °C, com perda de massa de 6,153%. Esses eventos podem ser atribuídos a evaporação das moléculas de água retidas no material, bem como da decomposição de agentes de superfície. Após isso, a massa da amostra permanece praticamente constante, indicando estabilização térmica do material. Tal fato é corroborado por (MISHRA *et al.*, 2014) que observaram resultados semelhantes ao estudar a degradação térmica de nanopartículas de óxido de ferro.

Figura 11: Termograma da amostra de nanopartículas de óxido de ferro (NPFe).

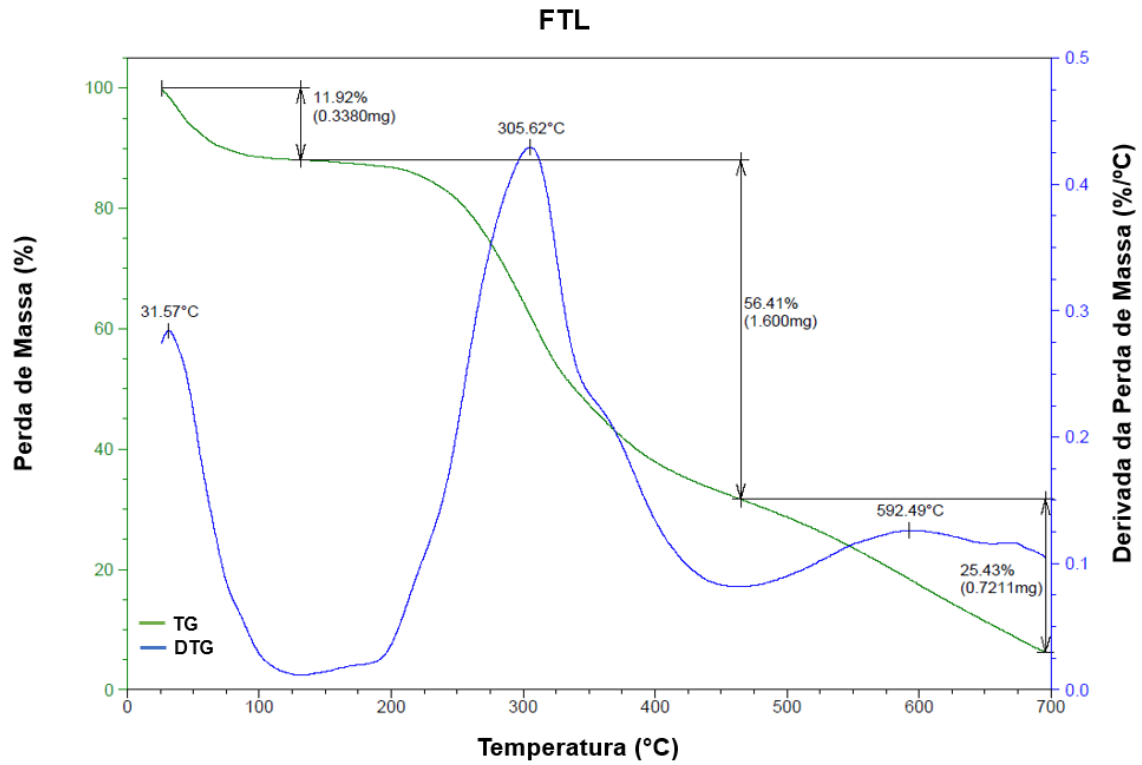


Fonte: Elaborada pela autora.

Para FTL (Figura 12), observou-se a primeira perda de massa de 11,92%, a qual pode ser atribuída à evaporação das moléculas de água adsorvidas no material. A primeira temperatura máxima de degradação térmica ocorreu em 305,62 °C, com perda de massa de 56,41%. Esse evento pode ser atribuído à quebra das ligações orgânicas e desintegração das cadeias peptídicas referentes à proteína. A segunda temperatura máxima ocorreu em 592,49 °C, com perda de massa de 25,43%, que pode estar relacionada com a evaporação dos compostos orgânicos remanescentes. A massa restante é residual.

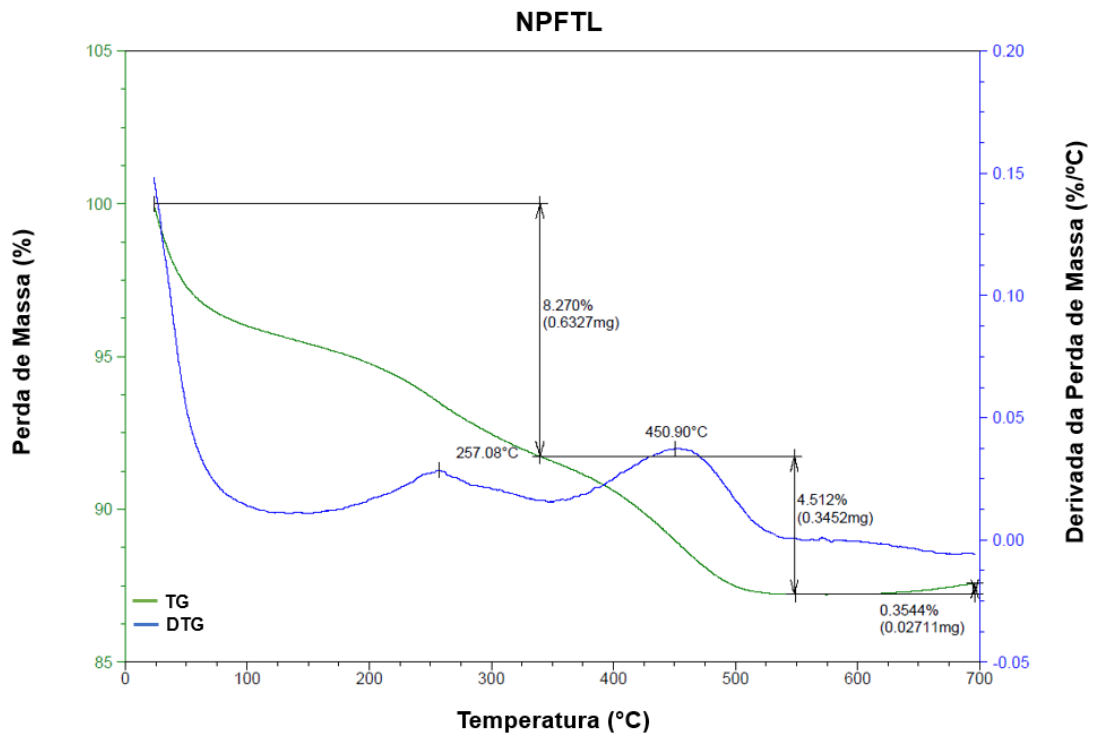
Para NPFTL (Figura 13), também se observou duas temperaturas máximas de degradação térmica, a primeira em 257,08 °C e a segunda em 450,90 °C, com perdas de massa de 8,270% e 4,512%, respectivamente. Pode-se inferir, através do gráfico de degradação, que a interação entre a FTL+glutaraldeído+APTES apresentou uma maior estabilização da amostra, tornando o evento completo de degradação mais lento, quando comparado com FTL.

Figura 12: Termograma da amostra de frutalina (FTL).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13: Termograma da amostra de nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL).



Fonte: Elaborada pela autora.

### 6.3.6 Análise da influência da temperatura (°C) e tempo e contato (min) na estabilidade da magnetização das nanopartículas

A análise da estabilidade da magnetização das nanopartículas é um dado importante para se conhecer a capacidade de reutilização desse material em novos procedimentos de funcionalização. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6: Presença ou ausência de magnetização das partículas após tratamentos

Tratamentos	Níveis de variáveis codificadas		Níveis de variáveis reais		Magnetização após tratamento
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	Tempo de contato (min)	
1	-1	-1	150	60	+
2	-1	+1	150	180	+
3	+1	-1	600	60	-
4	+1	+1	600	180	-
5	-1,41	0	56,8019	120	+
6	+1,41	0	693,1981	120	-
7	0	-1,41	375	35,1472	-
8	0	+1,41	375	204,8528	-
9	0	0	375	120	-
10	0	0	375	120	-
11	0	0	375	120	-

(+) presença de magnetismo

(-) ausência de magnetismo

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados mostram que as NPFe começam a perder seu magnetismo a partir de 375 °C se mantidas por tempo superior a 35 minutos na mufla. Comparando-se com os resultados obtidos por TGA na Figura 13, observa-se que a NPFTL apresenta a primeira temperatura máxima de degradação em 257 °C, enquanto a estabilização da sua degradação térmica ocorre na temperatura próxima de 500 °C.

Estudos realizados por (LI; CHURCH; WOODHEAD, 2012) através de análise termogravimétrica (TGA) demonstraram que os grupamentos orgânicos imobilizados em NPs apresentaram decomposição térmica na faixa de 230 a 380 °C, enquanto (YONG *et al.*, 2018) apresentaram perda de massa correspondente à lectina ConA na faixa de 250 a 400 °C, bem como (SOOZANIPOUR; TAHERI-KAFRANI; LANDARANI ISFAHANI, 2015) também relataram perda de frações orgânicas associadas à enzima xilanase na faixa de temperatura de 200 a 500 °C, também por TGA. Esses indicativos sugerem que um direcionamento possa ser realizado para novas análises em intervalos de temperatura mais restritos, na faixa de 250 a 375 °C, em diferentes tempos de contato, de forma que as nanopartículas não percam a sua capacidade magnética, mas que a matéria orgânica imobilizada possa ser retirada de tal maneira que as NPFe sejam regeneradas. As NPFe que não perderam a sua capacidade magnética passaram por nova etapa de funcionalização e a nova matriz formada manteve sua função normalmente.

## **6.4 Atividades biológicas**

### **6.4.1 Atividade hemaglutinante das NPFTL**

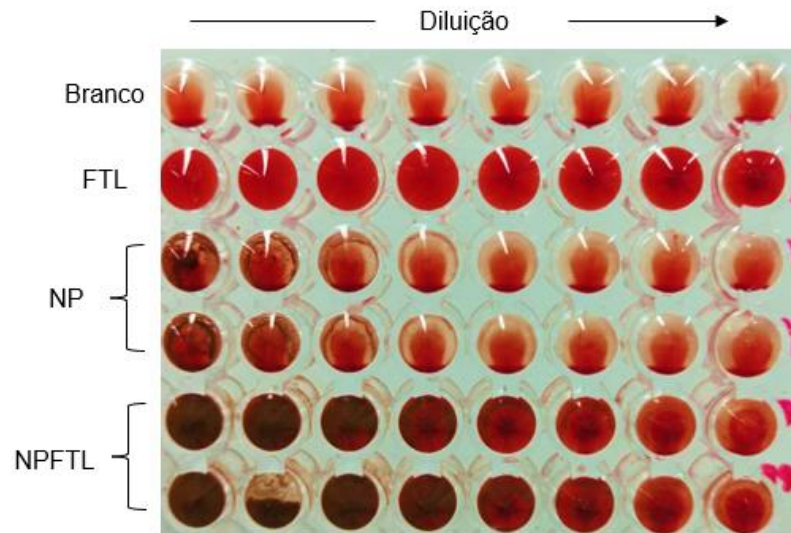
A atividade hemaglutinante é um ensaio bastante utilizado para se avaliar se a lectina está com os seus sítios de reconhecimento a carboidrato intactos e ativos. O resultado do teste realizado pode ser visualizado na Figura 14.

De acordo com a imagem, pode-se perceber que o procedimento de funcionalização não afetou a capacidade de aglutinação da frutalina, pois o sangue mostra-se aglutinado em seis dos oito poços.



Figura 14: Atividade hemaglutinante das amostras de NPs e NPFTL.

Concentração inicial: FTL: 1 mg/mL; NP: 2 mg/mL; NPFTL: 10 mg/mL



Fonte: Elaborado pela autora.

Para que uma lectina seja capaz de aglutinar hemácias, ela precisa ter pelo menos dois sítios de reconhecimento a carboidratos livres, bem como o sangue utilizado precisa apresentar na sua matriz extracelular os carboidratos aos quais a lectina seja capaz de se ligar (MOREIRA et al., 1998). Essa técnica é bastante útil por ser de fácil manuseio, ter um resultado rápido e visível. Contudo, esse ensaio também apresenta suas limitações, pois o fato de não aglutinar em concentrações menores também não significa que a proteína não esteja ativa, pois a frutalina, em sua forma tetramérica, apresenta quatro sítios de reconhecimento a carboidratos, os quais podem ter sido, de alguma forma, parcialmente comprometidos durante o procedimento de funcionalização, apresentando apenas um sítio exposto, por exemplo. Isso comprometeria a capacidade aglutinante, mas a sua aplicabilidade em técnicas de purificação ou reconhecimento celular seriam mantidas.

Trabalhos realizando a imobilização de lectinas em nanopartículas utilizam diferentes técnicas para demonstrar suas atividades, seja através de fluorescência (MARANGONI; PAINO; ZUCOLOTTO, 2013), interação ao carboidrato (YONG *et al.*, 2018), ou através de técnicas de purificação de glicoproteínas (DONG *et al.*, 2015).

Diversas abordagens podem ser aplicadas, tendo em vista as diferenças estruturais que as lectinas apresentam, bem como a aplicabilidade que se deseja empregar ao material.

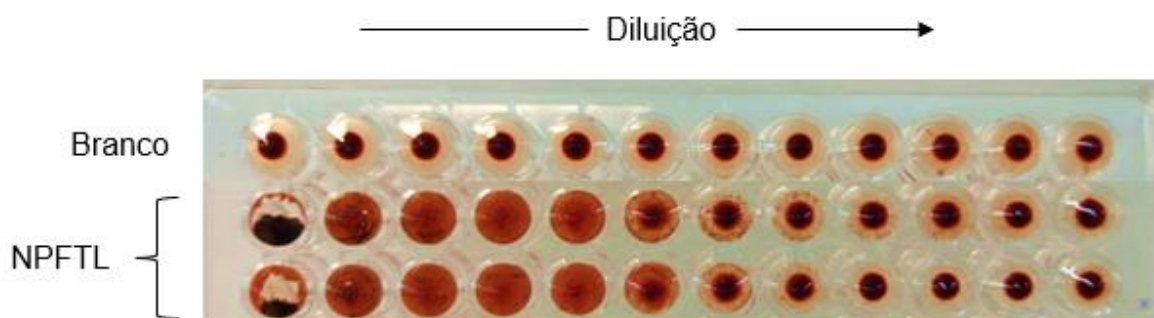
Cabe ressaltar na imagem, no segundo poço da última fileira, que as NPFTL estão decantadas e o poço está “limpo”, pois o sangue foi arrastado com o material. Aqui destaco que um outro experimento foi realizado nessa vertente, utilizando-se um ímã, para analisar o grau de interação do sangue com as NPFTL. Como resultado, o sangue de fato foi arrastado com as nanopartículas, seguindo o trajeto feito pelo ímã, o que é mais um fato que corrobora que a matriz formada entre as nanopartículas e a frutalina é funcional e apresenta atividade biológica.

Também foi realizado, durante o procedimento de funcionalização, um teste empregando-se galactose 0,2 M, para averiguar se o bloqueio dos sítios de interação da lectina com o carboidrato de alguma forma afetaria a atividade da molécula. Contudo, viu-se que não houve diferença na atividade hemaglutinante.

Além disso, também se averiguou, através do ensaio hemaglutinante, se a lectina imobilizada continuou mantendo sua atividade mesmo após 12 meses armazenada em geladeira, a qual está demonstrada na Figura 15:

Nota-se que a frutalina permaneceu ativa após esse período, sendo armazenada somente em solução salina. Provavelmente isso é devido a estabilidade causada entre as ligações químicas de NPFe + glutaraldeído + APTES + FTL, que tornam a molécula mais resistente.

Figura 15: Atividade hemaglutinante da amostra de NPFTL após 12 meses de armazenamento à 4 °C.



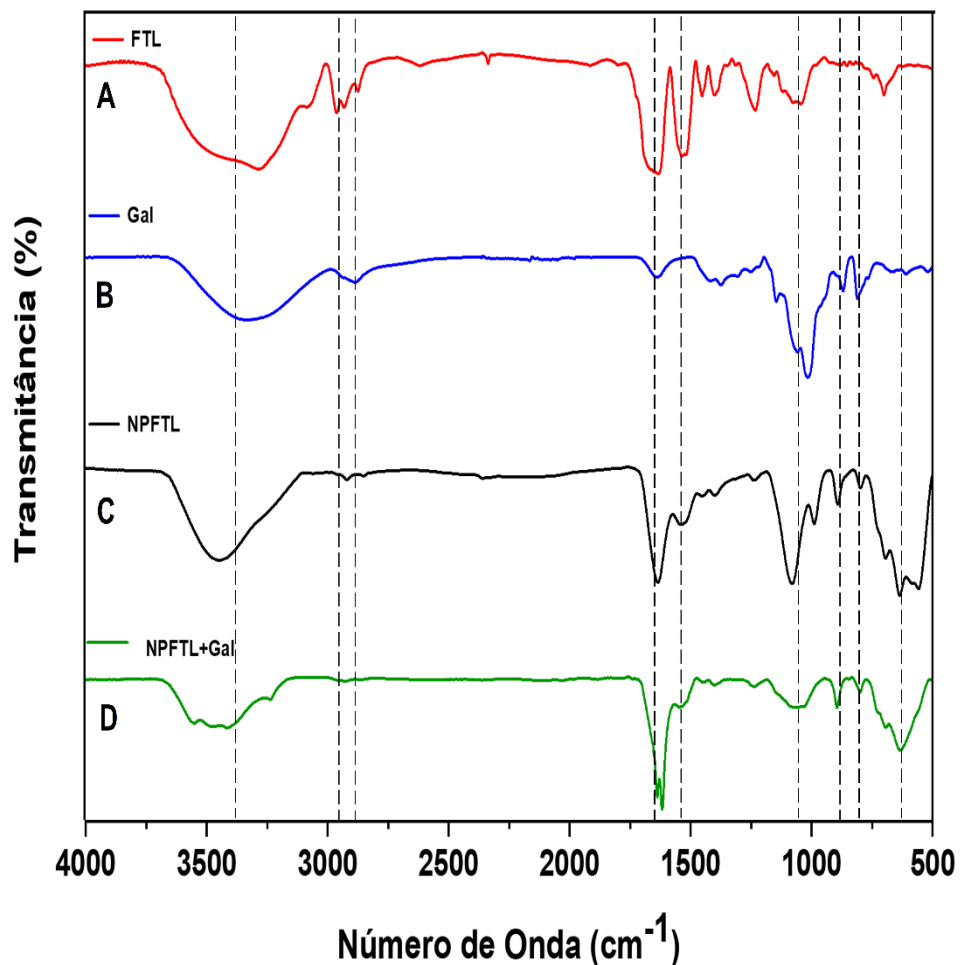
Fonte: Elaborado pela autora.

Estudos de (CHANG *et al.*, 2018) demonstraram que a hemaglutinina de influenza trimerizada (3HA), quando funcionalizada em nanopartículas, torna-se resistente à temperatura ambiente por mais de 3 meses e mantém a sua atividade hemaglutinante e imunogênica, o que apresenta potencial aplicação na distribuição de vacinas. Portanto, observa-se que é um dado relevante, pois maiores estudos podem ser aplicados a fim de se entender o grau de estabilidade que as nanopartículas são capazes de conferir à proteína.

#### 6.4.2 Ensaio de interação ao carboidrato

Os resultados obtidos após as interações entre as NPFTL e a galactomanana e as análises de FTIR estão demonstradas na Figura 16:

Figura 16: Espectros de FTIR das amostras: (A) frutalina (FTL), (B) galactomanana (Gal), (C) nanopartículas funcionalizadas com frutalina (NPFTL) e (D) nanopartículas funcionalizadas com frutalina interagindo com galactomanana (NPFTL+Gal).

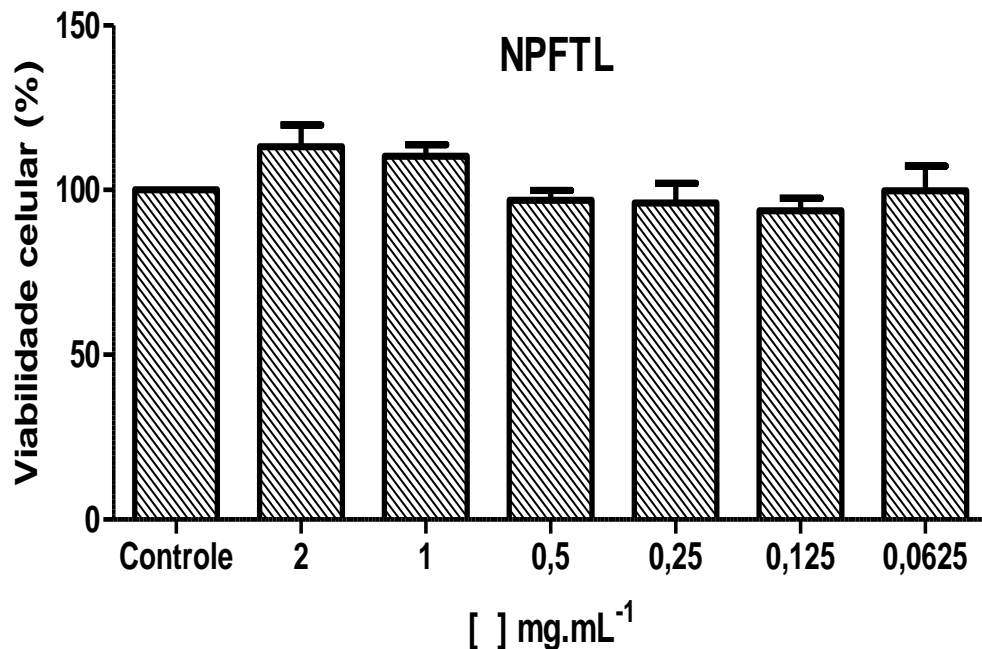


Observa-se, nos espectros de NPFTL e NPFTL+Gal, as bandas de absorção na faixa de 630-500  $\text{cm}^{-1}$ , as quais são atribuídas às vibrações de ligações de Fe-O, região característica das estruturas dos óxidos de ferro (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009). Os picos presentes em torno de 1635 e 1539  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento simétrico C=O (amida I) e ao estiramento simétrico N-C=O (amida II), respectivamente, para FTL e NPFTL, bem como na região de 1429  $\text{cm}^{-1}$  ocorre a formação angular da ligação de CH<sub>2</sub>, correspondente ao C6 das hexoses, para Gal. Foi observado banda na região de 1402  $\text{cm}^{-1}$ , a qual pode ser atribuída ao estiramento C-N. As bandas encontradas em 825 e 867  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas aos estiramentos C-H das unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose e de  $\beta$ -D-manopiranosose, respectivamente, nas amostras de Gal e NPFTL+Gal. As bandas em torno de 2.900 e 3.350  $\text{cm}^{-1}$  correspondem aos estiramentos dos grupos CH<sub>2</sub> e OH, respectivamente. Este último sofre um deslocamento na amostra NPFTL+Gal na região em torno de 3.500  $\text{cm}^{-1}$ . A lectina interage por pontes de hidrogênio com as hidroxilas presentes nas ramificações da cadeia de galactomanana, o que pode permitir o “deslizamento” das cadeias, reduzindo o contato galactomanana-galactomanana. Pelos resultados de infravermelho, é possível ver que há um deslocamento das bandas de 3350 para 3500 pela ligação da lectina aos grupos OH da galactomanana. Tais resultados são corroborados por (DE SOUSA *et al.*, 2019), que, ao estudar formulações de hidrogéis a base de galactomanana e frutalina, observaram que a interação desses materiais também causava um deslocamento no pico após análise no FTIR. As galactomananas são hemiceluloses encontradas em paredes celulares endospérmicas em muitas espécies de leguminosas. Consideradas polissacarídeos de reserva, elas são formadas por uma cadeia principal de manoses ligadas  $\beta$ -(1→4) com substituições de galactoses ligadas  $\alpha$ -(1→6) (BENTO *et al.*, 2013). A escolha desse carboidrato para esse ensaio foi devido ao fato da frutalina ser uma lectina galactose ligante, portanto isso mostra que a especificidade ao carboidrato, característica importante para a utilização da frutalina como ferramenta biotecnológica, permanece intacta.

#### **6.4.3 Ensaio de viabilidade celular das NPFTL**

O ensaio de viabilidade celular é importante para se entender se o material estudado apresenta alguma toxicidade às células. O resultado da análise pode ser observado na Figura 17:

Figura 17: Viabilidade das células L929 incubadas com NPFTL



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura mostra que as NPFTL não demonstraram toxicidade para a linhagem celular analisada (L929) mesmo na concentração mais alta, pois a viabilidade celular está acima de 50% na concentração de 2 mg/mL. O mesmo é válido para as NPFe, as quais foram testadas apenas na concentração de 2 mg/mL. Esse resultado é muito bom, pois mostra que o procedimento de funcionalização não apresentou nenhum efeito que fosse danoso às células e permite que o material possa ser aplicado futuramente em ensaios de migração celular ou de reconhecimento de células.

O grau de toxicidade das nanopartículas irá depender do tipo de material do qual elas foram produzidas e da linhagem celular estudada, e as partículas oriundas de óxido de ferro apresentam uma boa empregabilidade em estudos biológicos. Alguns autores demonstram trabalhos de viabilidade celular utilizando de 500 µg/mL até 1 mg/mL de NPFe, a depender do tipo celular (NAQVI *et al.*, 2010; REDDY *et al.*, 2012). Também já há estudo relatado por (DE SOUSA *et al.*, 2019) em que a frutalina não apresenta toxicidade celular numa concentração de até 1 mg/mL.

Considerando que a quantidade de frutalina imobilizada foi de 10 mg/g de NPFe, a quantidade da lectina que se encontrava no material analisado estava bem abaixo, portanto isso demonstra que não houve nenhum tipo de efeito sinérgico que pudesse causar alguma toxicidade às células.

## 7 CONCLUSÃO

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro produzidas pela técnica de coprecipitação estão em escala nanométrica, na faixa dos 780 nm. O procedimento de funcionalização da lectina utilizando APTES e glutaraldeído como agentes de ancoramento permitiu obter uma eficiência de imobilização acima de 70%. As micrografias eletrônicas mostraram que as partículas são esféricas e tendem a se aglomerar. A difração de raios-X mostrou que a funcionalização não alterou o padrão de cristalinidade característico do óxido de ferro. Os resultados obtidos pelo FTIR sugerem que ocorreu a funcionalização da frutalina, os quais mostraram picos nas regiões em torno de 1635 e 1539  $\text{cm}^{-1}$  e próximo de 1500  $\text{cm}^{-1}$ , sendo padrões de bandas que correspondem à proteína, bem como os valores de potencial zeta indo de 21,9 para -17,9 indicam que houve a formação de um complexo entre partículas e proteína. A análise termogravimétrica demonstrou que a funcionalização formou um complexo capaz de estabilizar termicamente a proteína por mais tempo na estrutura da nanopartícula. Além disso, pôde-se comprovar que a lectina não teve sua estrutura tridimensional comprometida com as etapas de funcionalização, através do ensaio hemaglutinante. A sua especificidade ao carboidrato do tipo  $\alpha$ -D-galactose também permaneceu inalterada, demonstrada pelo deslocamento das bandas de 3350 para 3500  $\text{cm}^{-1}$  no FTIR, além de permanecer estável mesmo após 12 meses de armazenamento. Por fim, a matriz produzida não apresentou toxicidade celular mesmo na concentração de 2 mg/mL. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho serviram para contribuir no desenvolvimento de uma matriz de nanopartículas funcionalizadas com frutalina que fosse eficiente e com boas características para ser utilizada, como perspectivas futuras, com potencial aplicação em processos de purificação de glicoconjugados e em etapas de reconhecimento diferencial de células cancerígenas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. K. D. S. O. **Nanopartículas magnéticas de FeCo. Caracterização e estudo de estabilidade após recobrimento com goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 7, 2012.
- ALI, A.; ZAFAR, H.; ZIA, M.; UL HAQ, I.; PHULL, A. R.; ALI, J. S.; HUSSAIN, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles **Nanotechnology, Science and Applications**. Dove Medical Press Ltd, 19 ago. 2016.
- ANDRADE, J.; PEREIRA, C. G.; ALMEIDA JUNIOR, J. C. de; VIANA, C. C. R.; NEVES, L. N. de O.; SILVA, P. H. F. da; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. de C. dos. FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. **LWT**, [s.l.], v. 99, p. 166–172, 1 jan. 2019. Acesso em: 8 jul. 2022.
- ARIAS, L. S.; PESSAN, J. P.; VIEIRA, A. P. M.; DE LIMA, T. M. T.; DELBEM, A. C. B.; MONTEIRO, D. R. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, 9 jun. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29890753>. Acesso em: 9 jul. 2022.
- ARNAUD, J.; AUDFRAY, A.; IMBERTY, A. Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 11, p. 4798–4813, 10 maio 2013. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/cs/c2cs35435g>. Acesso em: 11 jul. 2022.
- ASSA, F.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H.; AJAMEIN, H.; ANARJAN, N.; VAGHARI, H.; SAYYAR, Z.; BERENJIAN, A. A biotechnological perspective on the application of iron oxide nanoparticles. **Nano Research**, [s.l.], 2016.
- BABAY, S.; MHIRI, T.; TOUMI, M. Synthesis, structural and spectroscopic characterizations of maghemite  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> prepared by one-step coprecipitation route. **Journal of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1085, p. 286–293, 5 abr. 2015. Acesso em: 20 mar. 2022.
- BADHE, R. v.; KUMAR, P.; CHOONARA, Y. E.; MARIMUTHU, T.; AKILO, O. D.; KONDIAH, P. P. D.; DU TOIT, L. C.; PILLAY, V. Induction of creep crack morphology in iron oxide microparticles: An outcome of the common-ion effect. **Materials Letters**, [s.l.], v. 188, p. 417–422, 1 fev. 2017. Acesso em: 20 jul. 2022.
- BAH, C. S. F.; FANG, E. F.; NG, T. B.; MROS, S.; MCCONNELL, M.; EL-DIN AHMED BEKHIT, A. Purification and characterization of a rhamnose-binding chinook salmon roe lectin with antiproliferative activity toward tumor cells and nitric oxide-inducing activity toward murine macrophages. **Journal of agricultural and food**



**chemistry**, [s./], v. 59, n. 10, p. 5720–5728, 25 maio 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21456624/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, [s./], v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 12 ago. 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm400762h>. Acesso em: 29 nov. 2022.

BENTO, J. F.; MAZZARO, I.; DE ALMEIDA SILVA, L. M.; DE AZEVEDO MOREIRA, R.; FERREIRA, M. L. C.; REICHER, F.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. **Carbohydrate Polymers**, [s./], v. 92, n. 1, p. 192–199, 30 jan. 2013. Acesso em: 18 jul. 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [s./], v. 72, p. 248–254, 1976.

CAMPOS, E. A.; PINTO, D. V. B. S.; DE OLIVEIRA, J. I. S.; MATTOS, E. da C.; DUTRA, R. de C. L. Synthesis, characterization and applications of iron oxide nanoparticles - A short review. **Journal of Aerospace Technology and Management**, [s./], 1 jul. 2015.

CAO, M.; LI, Z.; WANG, J.; GE, W.; YUE, T.; LI, R.; COLVIN, V. L.; YU, W. W. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. **Trends in Food Science and Technology**, [s./], v. 27, n. 1, p. 47–56, set. 2012. Acesso em: 9 jul. 2022.

CATALANO, E.; DI BENEDETTO, A. Characterization of physicochemical and colloidal properties of hydrogel chitosan-coated iron-oxide nanoparticles for cancer therapy. **Journal of Physics: Conference Series**, [s./], v. 841, p. 012010, maio 2017. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/841/1/012010>.

CAVALCANTE, M. de S.; TORRES-ROMERO, J. C.; LOBO, M. D. P.; MORENO, F. B. M. B.; BEZERRA, L. P.; LIMA, D. S.; MATOS, J. C.; MOREIRA, R. de A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. de O. A panel of glycoproteins as candidate biomarkers for early diagnosis and treatment evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Biomarker Research**, [s./], v. 4, n. 1, p. 1–8, 27 jan. 2016. Disponível em: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-016-0055-6>. Acesso em: 9 jul. 2022.

CHANG, T. Z.; DENG, L.; WANG, B. Z.; CHAMPION, J. A. H7 Hemagglutinin nanoparticles retain immunogenicity after >3 months of 25°C storage. **PLoS ONE**, [s./], v. 13, n. 8, 1 ago. 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6084952/](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208495). Acesso em: 10 jul. 2022.

COLOMBO, M.; CARREGAL-ROMERO, S.; CASULA, M. F.; GUTIÉRREZ, L.; MORALES, M. P.; BÖHM, I. B.; HEVERHAGEN, J. T.; PROSPERI, D.; PARAK, W. J.

Biological applications of magnetic nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 11, p. 4306–4334, 15 maio 2012.

CUENYA, B. R. Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. **Thin Solid Films**, [s.l.], [s.n.] 2010.

DAMME, Els. J. M. van; PEUMANS, W. J.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Plant lectins: A social class of proteins. **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications**, [s.l.], p. 3–30, 1998. Disponível em: [https://books.google.com/books/about/Handbook\\_of\\_Plant\\_Lectins.html?hl=pt-BR&id=qfkkXlCtEO4YC](https://books.google.com/books/about/Handbook_of_Plant_Lectins.html?hl=pt-BR&id=qfkkXlCtEO4YC). Acesso em: 11 jul. 2022.

DE OLIVEIRA MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; D’MUNIZ PEREIRA, H.; VIEIRA NETO, A. E.; MENDES BATISTA MORENO, F. B.; DUARTE PINTO LOBO, M.; SOUSA, F. D. de; MOREIRA, R. D. A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of frutalin, an  $\alpha$ -d-galactose-specific lectin from *Artocarpus incisa* seeds. **Acta Crystallographica Section:F Structural Biology Communications**, [s.l.], v. 71, p. 1282–1285, 1 out. 2015. Acesso em: 12 jul. 2022.

DE SOUSA, F. D.; VASCONSELOS, P. D.; DA SILVA, A. F. B.; MOTA, E. F.; DA ROCHA TOMÉ, A.; MENDES, F. R. da S.; GOMES, A. M. M.; ABRAHAM, D. J.; SHIWEN, X.; OWEN, J. S.; LOURENZONI, M. R.; CAMPOS, A. R.; MOREIRA, R. de A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. de O. Hydrogel and membrane scaffold formulations of Frutalin (breadfruit lectin) within a polysaccharide galactomannan matrix have potential for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 121, p. 429–442, 1 jan. 2019. Acesso em: 10 jul. 2022.

D’ITRI, F. M. **Wastewater renovation and reuse: Proceedings of the International Conference on the Renovation and Reuse of Wastewater Through Aquatic and Terrestrial Systems (Pollution engineering and technology)**. [s.l.] M. Dekker, 1977. 705 p.

DONG, L.; FENG, S.; LI, S.; SONG, P.; WANG, J. Preparation of Concanavalin A-Chelating Magnetic Nanoparticles for Selective Enrichment of Glycoproteins. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 87, n. 13, p. 6849–6853, 7 jul. 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.5b01184>. Acesso em: 10 jul. 2022.

EBRAHIMINEZHAD, A.; GHASEMI, Y.; RASOUL-AMINI, S.; BARAR, J.; DAVARAN, S. Impact of Amino-Acid Coating on the Synthesis and Characteristics of Iron-Oxide Nanoparticles (IONs). **Bulletin of the Korean Chemical Society**, [s.l.], v. 33, n. 12, p. 3957–3962, 20 dez. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.12.3957>. Acesso em: 8 jul. 2022.

ESTELRICH, J.; ESCRIBANO, E.; QUERALT, J.; BUSQUETS, M. A. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 8070–8101, 10 abr. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25867479/>. Acesso em: 9 jul. 2022.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. S. Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, [s.l.], v. 2017, n. 9, 2017.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre (RS): Bookman, 2009.

HUA, M.; ZHANG, S.; PAN, B.; ZHANG, W.; LV, L.; ZHANG, Q. Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: A review. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 211–212, p. 317–331, 15 abr. 2012. Acesso em: 29 nov. 2022.

JADHAV, S. v.; NIKAM, D. S.; MALI, S. S.; HONG, C. K.; PAWAR, S. H. The influence of coating on the structural, magnetic and colloidal properties of LSMO manganite and the heating mechanism for magnetic fluid hyperthermia application. **New Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 38, n. 8, p. 3678–3687, 14 jul. 2014. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/nj/c4nj00334a>. Acesso em: 1 jul. 2022.

JIA, J.; ZHANG, W.; YANG, Z.; YANG, X.; WANG, N.; YU, X. Novel Magnetic Cross-Linked Cellulase Aggregates with a Potential Application in Lignocellulosic Biomass Bioconversion. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 2, 1 fev. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28208644/>. Acesso em: 29 nov. 2022.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et biophysica acta**, [s.l.], v. 1572, n. 2–3, p. 187–197, 19 set. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12223269/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

KOHANE, D. S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 96, n. 2, p. 203–209, 1 fev. 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.21301>. Acesso em: 30 jun. 2022.

KREUTER, J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. **Journal of Anatomy**, [s.l.], v. 189, n. Pt 3, p. 503, dez. 1996. Disponível em: </pmc/articles/PMC1167690/?report=abstract>. Acesso em: 30 jun. 2022.

KUMAR, S.; MORYA, V.; GADHAVI, J.; VISHNOI, A.; SINGH, J.; DATTA, B. Investigation of nanoparticle immobilized cellulase: nanoparticle identity, linker length and polyphenol hydrolysis. **Heliyon**, [s.l.], v. 5, n. 5, p. e01702, maio 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844019314835>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/227680a0>.

LAI, B. H.; CHANG, C. H.; YEH, C. C.; CHEN, D. H. Direct binding of Concanvalin A onto iron oxide nanoparticles for fast magnetic selective separation of lactoferrin. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], 2013.

LAKSHMANAN, R.; OKOLI, C.; BOUTONNET, M.; JÄRÅS, S.; RAJARAO, G. K. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles in surface water treatment: trace minerals and microbes. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 129, p. 612–615, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23337539/>. Acesso em: 9 jul. 2022.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 108, n. 6, 2008.

LI, Y. S.; CHURCH, J. S.; WOODHEAD, A. L. Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s.l.], v. 324, n. 8, p. 1543–1550, 1 abr. 2012. Acesso em: 13 jul. 2022.

LIU, Y.; LI, Y.; LI, X. M.; HE, T. Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (aptes) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Langmuir**, [s.l.], v. 29, n. 49, p. 15275–15282, 10 dez. 2013.

LOBO, M. D. P.; MORENO, F. B. M. B.; SOUZA, G. H. M. F.; VERDE, S. M. M. L.; MOREIRA, R. de A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. de O. Label-free proteome analysis of plasma from patients with breast cancer: Stage-specific protein expression. **Frontiers in Oncology**, [s.l.], v. 7, n. FEB, p. 14, 2 fev. 2017. Acesso em: 9 jul. 2022.

LÖVESTAM, G.; RAUSCHER, H.; ROEBBEN, G.; KLÜTTGEN, B. S.; GIBSON, N.; PUTAUD, J. P.; STAMM, H. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. **Joint Research Centre (JRC) Reference Reports**, [s.l.], v. 80, p. 00–41, 2010.

MACHALA, L.; TUČEK, J.; ZBOŘIL, R. Polymorphous transformations of nanometric iron(III) oxide: A review. **Chemistry of Materials**, [s.l.], American Chemical Society, 26 jul. 2011.

MARANGONI, V. S.; PAINO, I. M.; ZUCOLOTTO, V. Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugates as specific markers for cancer cells. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, [s.l.], v. 112, p. 380–386, 1 dez. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24028851/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

MENDES, F. R. da S. **Desenvolvimento de uma matriz de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> funcionalizadas com galactomanana para a purificação de lectina  $\alpha$ -d-galactose ligante**. 129 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2020.

MISHRA, D.; ARORA, R.; LAHIRI, S.; AMRITPHALE, S. S.; CHANDRA, N. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by solvothermal method. **Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, [s.l.], v. 50, n. 5, p. 628–631, 2014. Acesso em: 27 jul. 2022.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta pão (*Artocarpus incisa* L.)**. 151 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 7, p. 1183–1188, abr.

1998. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003194229700753X>.

MOREIRA, R. a.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 59, p. 783–7, 1977. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=543296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MOS, Y. M.; VERMEULEN, A. C.; BUISMAN, C. J. N.; WEIJMA, J. X-Ray Diffraction of Iron Containing Samples: The Importance of a Suitable Configuration.

**Geomicrobiology Journal**, [s.l.], v. 35, n. 6, p. 511–517, 3 jul. 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2017.1401183>. Acesso em: 8 jul. 2022.

NAQVI, S.; SAMIM, M.; ABDIN, M. Z.; AHMED, F. J.; MAITRA, A. N.; PRASHANT, C. K.; DINDA, A. K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. **International journal of nanomedicine**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 983–989, 2010. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21187917/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s.l.], 2010.

OLIVEIRA, C.; FELIX, W.; MOREIRA, R. A.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Expression of frutalin, an  $\alpha$ -d-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, [s.l.], v. 60, n. 2, p. 188–193, 1 ago. 2008. Acesso em: 12 jul. 2022.

OLIVEIRA, C.; NICOLAU, A.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s.l.], v. 2011, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22131813/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; SCHMITT, F.; DOMINGUES, L. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. **BMC Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 78, 9 set. 2009. Disponível em: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-9-78>. Acesso em: 9 jul. 2022.

OMIDINIA, E.; SHADJOU, N.; HASANZADEH, M. (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)-graphene oxide as a novel magnetic nanomaterial for non-enzymatic determination of phenylalanine. **Materials Science & engineering. C, Materials for Biological Applications**, [s.l.], v. 33, n. 8, p. 4624–4632, 24 jul. 2013. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/24094169>. Acesso em: 9 jul. 2022.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, [s.l.], 2003.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 109, n. 2, p. 347, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC157596/>. Acesso em: 9 jul. 2022.

PHILOSOF-MAZOR, L.; DAKWAR, G. R.; POPOV, M.; KOLUSHEVA, S.; SHAMES, A.; LINDER, C.; GREENBERG, S.; HELDMAN, E.; STEPENSKY, D.; JELINEK, R. Bolaamphiphilic vesicles encapsulating iron oxide nanoparticles: New vehicles for magnetically targeted drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 450, n. 1–2, 2013.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure Determination of Organic Compounds**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. 433 p.

REDDY, L. H.; ARIAS, J. L.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. **Chemical Reviews**. [s.l.], 2012.

RÊGO, M. J. B. M.; ALMEIDA, S. M.; BEZERRA, S. A.; CARVALHO, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Magnetic *Parkia pendula* seed gum as matrix for Concanavalin A lectin immobilization and its application in affinity purification. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 86, n. 3, p. 1351–1358, 1 set. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/aabc/a/bRwBLW9xnXqd8VfnLNsbnRw/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 8 jul. 2022.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, [s.l.], 1 jul. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

ROCA, A. G.; GUTIÉRREZ, L.; GAVILÁN, H.; FORTES BROLLO, M. E.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; MORALES, M. del P. Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 138, p. 68–104, 1 jan. 2019. Acesso em: 23 jun. 2022.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Estratégia experimental para fatoriais fracionados e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, [s.l.], p. 135–232, 2014. Acesso em: 15 jul. 2022.

RYDZ, N.; SWYSTUN, L. L.; NOTLEY, C.; PATERSON, A. D.; RICHES, J. J.; SPONAGLE, K.; BOONYAWAT, B.; MONTGOMERY, R. R.; JAMES, P. D.; LILLICRAP, D. The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. **Blood**, [s.l.], v. 121, n. 26, p. 5228–5237, 27 jun. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23529928/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

SAHIN, S.; OZMEN, I. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 184, p. 113195, 30 maio 2020. Acesso em: 29 nov. 2022.

SCHIRMER, W. Nanoparticles and Nanostructured Films, Preparation, Characterization and Applications. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, [s.l.], v. 213, n. 2, 1999.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17145746/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

SILVERSTEIN, R. M. (Robert M.); WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; ALENCASTRO, R. B. de. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. [s.l.], 2007. Acesso em: 8 jul. 2022.

SOOZANIPOUR, A.; TAHERI-KAFRANI, A.; LANDARANI ISFAHANI, A. Covalent attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 270, p. 235–243, 15 jun. 2015. Acesso em: 14 jul. 2022.

SOSA-ACOSTA, J. R.; SILVA, J. A.; FERNÁNDEZ-IZQUIERDO, L.; DÍAZ-CASTAÑÓN, S.; ORTIZ, M.; ZUAZNABAR-GARDONA, J. C.; DÍAZ-GARCÍA, A. M. Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) with potential applications in plasmid DNA isolation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 545, p. 167–178, 20 maio 2018. Acesso em: 10 jul. 2022.

SRIVASTAVA, M.; CHAUBEY, S.; OJHA, A. K. Investigation on size dependent structural and magnetic behavior of nickel ferrite nanoparticles prepared by sol-gel and hydrothermal methods. **Materials Chemistry and Physics**, [s.l.], v. 118, n. 1, p. 174–180, 15 nov. 2009.

SUBRAMANIYAN, S. B.; MEGARAJAN, S.; DHARSHINI, K. S.; VEERAPPAN, A. Artocarpus integrifolia seed lectin enhances membrane damage, oxidative stress and biofilm inhibition activity of silver nanoparticles against Staphylococcus aureus. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 624, p. 126842, 5 set. 2021. Acesso em: 12 jul. 2022.

SULMAN, A. M.; MATVEEVA, V. G.; BRONSTEIN, L. M. Cellulase Immobilization on Nanostructured Supports for Biomass Waste Processing. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 21, p. 3796, 27 out. 2022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36364572>. Acesso em: 29 nov. 2022.

TANAKA, H.; CHIBA, H.; INOKOSHI, J.; KUNO, A.; SUGAI, T.; TAKAHASHI, A.; ITO, Y.; TSUNODA, M.; SUZUKI, K.; TAKÉNAKA, A.; SEKIGUCHI, T.; UMEYAMA, H.; HIRABAYASHI, J.; OMURA, S. Mechanism by which the lectin actinohivin blocks HIV infection of target cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 106, n. 37, p. 15633–15638, 15 set. 2009. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0907572106>. Acesso em: 27 jul. 2022.

TANNE, A.; NEYROLLES, O. C-type lectins in immune defense against pathogens: the murine DC-SIGN homologue SIGNR3 confers early protection against

Mycobacterium tuberculosis infection. **Virulence**, [s.l.], v. 1, n. 4, p. 285–290, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21178456/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

TOMITAKA, A.; ARAMI, H.; GANDHI, S.; KRISHNAN, K. M. Lactoferrin conjugated iron oxide nanoparticles for targeting brain glioma cells in magnetic particle imaging. **Nanoscale**, [s.l.], v. 7, n. 40, p. 16890, 10 out. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4626448/>. Acesso em: 1 jul. 2022.

UNNI, M.; ZHANG, J.; GEORGE, T. J.; SEGAL, M. S.; FAN, Z. H.; RINALDI, C. Engineering magnetic nanoparticles and their integration with microfluidics for cell isolation. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 564, p. 204–215, 22 mar. 2020. Acesso em: 10 jul. 2022.

VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; KENNEDY, J. F.; PURI, M. Immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 50, n. 2, p. 432–437, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.029>.

WU, S.; SUN, A.; ZHAI, F.; WANG, J.; XU, W.; ZHANG, Q.; VOLINSKY, A. A. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation. **Materials Letters**, [s.l.], v. 65, n. 12, 2011.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 3, n. 11, p. 397–415, nov. 2008.

WU, W.; WU, Z.; YU, T.; JIANG, C.; KIM, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, [s.l.], 2015.

XU, J.; SUN, J.; WANG, Y.; SHENG, J.; WANG, F.; SUN, M. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. **Molecules**, [s.l.], 2014.

XU, J.; YANG, H.; FU, W.; DU, K.; SUI, Y.; CHEN, J.; ZENG, Y.; LI, M.; ZOU, G. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s.l.], v. 309, n. 2, 2007.

YAMAMOTO, K. Intracellular lectins involved in folding and transport in the endoplasmic reticulum. **Biological & pharmaceutical bulletin**, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 767–773, maio 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19420740/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

YONG, Y.; SU, R.; LIU, X.; XU, W.; ZHANG, Y.; WANG, R.; OUYANG, P.; WU, J.; GE, J.; LIU, Z. Lectin corona enhances enzymatic catalysis on the surface of magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 129, p. 26–32, 15 jan. 2018. Acesso em: 30 jun. 2022.

ZHAO, S.; WANG, C. Y.; CHEN, M. M.; SUN, J. H. Mechanism for the preparation of carbon spheres from potato starch treated by NH<sub>4</sub>Cl. **Carbon**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 331–333, jan. 2009. Acesso em: 8 jul. 2022.