



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

STEPHANIE FERNANDA FULAZ SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM NANOMATERIAL SOB MEDIDA PARA
CAPTURA E REMOÇÃO DA SACAROSE**

CAMPINAS

2019

STEPHANIE FERNANDA FULAZ SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM NANOMATERIAL SOB MEDIDA PARA CAPTURA
E REMOÇÃO DA SACAROSE**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Química na área de Química
Orgânica.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ljubica Tasic

**O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela
aluna Stephanie Fernanda Fulaz Silva, e orientada pela Prof^a. Dr^a. Ljubica
Tasic.**

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Si38d Silva, Stephanie Fernanda Fulaz, 1991-
Desenvolvimento de um nanomaterial sob medida para captura e remoção da sacarose / Stephanie Fernanda Fulaz Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ljubica Tasic.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanomateriais. 2. Diabetes. 3. Nanopartículas - Propriedades magnéticas. 4. Sacarose. 5. Invertase. I. Tasic, Ljubica, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Design of a tailored nanomaterial for sucrose capture and removal

Palavras-chave em inglês:

Nanomaterials

Diabetes

Nanoparticles - Magnetic properties

Sucrose

Invertase

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Ljubica Tasic [Orientador]

Italo Odoni Mazali

Jorg Kobarg

Data de defesa: 19-09-2019

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0152-2754>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2483292300857849>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ljubica Tasic (Orientadora)

Prof. Dr. Italo Odoni Mazali (IQ/UNICAMP)

Prof. Dr. Jorg Kobarg (FCF/UNICAMP)

A ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna Stephanie Fernanda Fulaz Silva, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de setembro de 2019.

Dedico este trabalho à minha família por todo amor e apoio que me ofereceram.

O dedico, também, à Professora Angelina Borghetti que despertou em mim a curiosidade pelo mundo e o desejo de me tornar cientista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e todas as oportunidades que Ele me ofereceu.

Agradeço imensamente minha mãe Sandra, que me apoiou em todos os momentos e em todas as decisões. Que me ofereceu todas as condições necessárias para chegar até aqui, mesmo que com muita dificuldade. Agradeço por ter me ensinado a fazer o meu melhor sempre, e por todo o amparo quando as expectativas não foram alcançadas. Sou grata a toda a minha família, minha avó Ivanilda e meu avô Mário (ambos in memoriam) e meus irmãos Erick e Henrique por me auxiliarem em tudo que podiam.

Agradeço ao meu esposo Leonardo, que me acompanhou em cada dia dessa jornada desde a graduação. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma e por me incentivar a seguir sempre em frente. Sou grata também aos seus pais Marcia e Jamil que torceram pelos meus sonhos e me ajudaram a concretizá-los.

Sou imensamente grata à minha orientadora Ljubica que me acolheu em seu grupo, que acreditou no meu potencial e muitas vezes me desafiou a transpor barreiras e me fez crescer como profissional. Obrigada por toda paciência e todos os ensinamentos científicos e não científicos que levarei comigo.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Química Biológica por fazerem parte dessa caminhada e por todas as conversas, todos os cafés e toda ajuda que me ofereceram nesses anos. Um agradecimento especial ao Caio, Guilherme e Tássia que tornaram os dias mais leves e divertidos. Agradeço também todos os alunos que trabalharam comigo Laura, Diego, Guilherme, Carolina, Gabriela e Giovanni, vocês me desafiaram a trabalhar simultaneamente com assuntos ou abordagens diferentes e me alegraram sempre com sua energia. Agradeço ao Professor Nelson por suas contribuições valiosas e nossas conversas sobre o mundo.

Agradeço a Profª. Drª. Regina Buffon por permitir que a síntese do nanomaterial magnético fosse realizado em seu laboratório. Agradeço Andrei Alaferdov e Raluca Savu pelas análises de XPS.

À todos os funcionários do IQ meu agradecimento e admiração. Um agradecimento especial à Cláudia Martelli sempre tão pronta em ajudar. Obrigada a todos os técnicos, funcionários da limpeza, manutenção, vidraria, biblioteca e secretarias que foram fundamentais para a execução de todo o trabalho.

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

Por fim, agradeço à agência de fomento CNPq pela bolsa de mestrado que usufrui, processo nº 130957/2016-0.

RESUMO

O diabetes é uma doença metabólica crônica que leva a elevados níveis de glicose no sangue, com consequências sérias para a saúde humana. Devido ao apelo mundial pela redução do consumo de calorias, propõe-se o desenvolvimento de um nanomaterial capaz de capturar a sacarose em soluções, que possa posteriormente ser avaliado para a remoção da sacarose naturalmente presente em alimentos como suco de laranja, disponibilizando, assim, alimentos de baixo teor calórico para consumo da população. Uma nanopartícula magnética (NPM-Fe₃O₄) revestida com material inerte (SiO₂) e com uma enzima imobilizada (invertase), foi desenvolvida para reconhecer e capturar a sacarose. A síntese das NPM foi realizada pelo método de coprecipitação, ao passo que o recobrimento foi feito pelo método de Stöber. Obteve-se NPM com potencial zeta (ζ) de $+28,7 \pm 0,7$ mV. A microscopia eletrônica de transmissão permitiu a identificação das NPM como uma população mista de esferas (27 ± 6 nm) e bastões (88 ± 22 nm x 14 ± 4 nm). A estrutura de espinélio do núcleo de magnetita foi confirmada pela difração de raios X. Por outro lado, a invertase extraída de fermento biológico seco e purificada por precipitação diferencial e etapas cromatográficas foi imobilizada nas NPM. Cerca de $13,5$ mmol L⁻¹ de sacarose foi removida por grama de nanomaterial por ciclo. A sacarose removida foi recuperada na forma de açúcar invertido, um subproduto com maior valor agregado. As NPM foram reutilizadas 5 vezes sem perda de atividade. A tecnologia desenvolvida permite a comercialização de alimentos com baixo valor calórico, oferecendo opções mais saudáveis para a população e ajudando a combater o crescimento da obesidade e do diabetes. Do ponto de vista econômico, ele abre novos mercados e oportunidades para a indústria de alimentos e agronegócios brasileira, maior exportadora de suco de laranja do mundo.

ABSTRACT

Diabetes is a chronic metabolic disease which leads to high glucose levels in the blood, with grave consequences to human health. Due to the worldwide appeal for reducing calorie intake, it is proposed the design of a nanomaterial capable to capture sucrose from solutions, which could be employed in the removal of naturally occurring sucrose from food, such as orange juice, producing a low-calorie juice. Magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 NPs) coated with an inert material (SiO_2), with an immobilized enzyme (invertase) capable to recognize and capture the sucrose from a solution were designed to optimize the separation step. The nanoparticles were obtained by the co-precipitation method, whereas the coating was done by the Stöber method. Fe_3O_4 NPs with a zeta potential of $+28.7 \pm 0.7$ mV were obtained. Transmission Electron Microscopy allowed the identification of a mixed population of spheres (27 ± 6 nm) and rods (88 ± 22 nm \times 14 ± 4 nm). The structure of the magnetite, inverted spinel, was confirmed by X-ray diffraction. Furthermore, invertase extracted from baker's yeast and purified by differential precipitation and chromatography and was immobilized onto Fe_3O_4 surface. Approximately 13.5 mmol L^{-1} of sucrose was removed per gram of nanomaterial per cycle. Sucrose was recovered in the form of inverted sugar, a side product with higher market value. The nanomaterial was reused 5 times without any activity loss. The developed technology allows the commercialization of low-calorie food, offering healthier options to consumption and helping to fight diabetes and obesity. From an economical point of view, it opens new markets and opportunities to the Brazilian food and agribusiness industries, the biggest exporter of orange juice in the world.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação das diferenças entre a diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2. (adaptado de MD Genetic Pro, 2019).....19
- Figura 2.** Representação dos níveis de organização das proteínas nas quatro estruturas. (adaptado de Lumen, 2019).....22
- Figura 3.** Representação do dogma central da biologia, que consiste na replicação do DNA, transcrição do DNA em mRNA e posterior tradução deste para proteína. (extraída de Zamora, 2013).....23
- Figura 4.** Representação da reação enzimática da hidrólise da sacarose em uma mistura equimolar de glicose e frutose.....25
- Figura 5.** Representação do mecanismo de ação da invertase de *Arabidopsis thaliana* (retirado de Lammens, *et al.* 2008).....25
- Figura 6.** Representação do espaço periplasmático de uma célula de levedura. (Adaptado de Yeastsite, 2016).....27
- Figura 7.** (a) Representação da estrutura de uma cadeia da invertase de *S. cerevisiae*, uma molécula de sacarose é representada no sítio catalítico, as cinco palhetas da hélice- β estão numeradas de I à V e a estrutura do sanduíche- β representada em cinza. (b) Representação da estrutura quaternária da invertase de *S. cerevisiae*, um octâmero. (Extraído de (Sainz-Polo, *et al.*, 2013)).....28
- Figura 8.** Representação da influência da força iônica (concentração de sal) na solubilidade de proteínas, indicando que a presença de íons leva primeiramente a uma maior solubilização da proteína, blindando as interações proteína-proteína, e, posteriormente, com concentração crescente de sais ocorre a aglomeração das proteínas, seguida pela sua precipitação (adaptado de Bio-Resource, 2011).....30
- Figura 9.** Representação de um processo de cromatografia de filtração em gel analítica ilustrando que as proteínas maiores são incapazes de penetrar os

poros da resina e são eluídas primeiramente e que as proteínas menores são retardadas na coluna e eluídas posteriormente (extraído de La Neurotox, 2019).....31

Figura 10. Representação das etapas de cromatografia de troca iônica indicando que as proteínas negativamente carregadas seriam atraídas ao trocador aniônico, ao passo que as proteínas positivamente carregadas seriam atraídas por um trocador catiônico. As moléculas de mesma carga da fase estacionária não interagem e são eluídas, ao passo que as proteínas interagindo com a fase estacionária podem ser eluídas com a adição de sal, que blinda as cargas da coluna, quebrando a interação proteína-fase estacionária (adaptado de Cummins *et al.*, 2017).....33

Figura 11. Representação das propriedades magnéticas de nanopartículas de magnetita individuais, mostrando o comportamento da coercividade (H_c) em função do diâmetro da partícula (extraído de Koo *et al.*, 2019).....35

Figura 12. Diagrama esquemático das curvas de histerese para superparamagnetismo e ferrimagnetismo (extraído de Koo *et al.*, 2019).....36

Figura 13. Esquema do uso de nanopartículas magnéticas na separação de enzimas (adaptado de Cao, *et al.*, 2012).....43

Figura 14. Representação do esquema de captura da sacarose em solução.....55

Figura 15. Fotografias do nanomaterial sintetizado na ausência e na presença de um ímã.....56

Figura 16. Micrografias de TEM das amostras do nanomaterial: (a) Fe_3O_4 , (b) $Fe_3O_4@SiO_2$, (c) $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ e (d) $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2-Inv$ (verde).....60

Figura 17. a) Difractogramas de raios X de pó dos nanomateriais sintetizados: Fe_3O_4 (preto), $Fe_3O_4@SiO_2$ (vermelho), $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ (azul) e

Fe₃O₄@SiO₂-NH₂-Inv (verde), b) Representação da estrutura de espinélio invertido.....61

Figura 18. Espectros de ATR-FTIR das amostras sólidas de nanopartículas: Fe₃O₄ (preto), Fe₃O₄@SiO₂ (vermelho), Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ (azul) e Fe₃O₄@SiO₂-NH₂-Inv (verde).....63

Figura 19. Espectro de XPS do nanomaterial sintetizado: Fe₃O₄ (preto) e Fe₃O₄@SiO₂-NH₂-Inv (verde).....64

Figura 20. TGA das amostras sólidas do nanomaterial: Fe₃O₄ (preto), Fe₃O₄@SiO₂ (vermelho), Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ (azul) e Fe₃O₄@SiO₂-NH₂-Inv (verde).....65

Figura 21. Cromatograma de Filtração em Gel da invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018) observando a absorção em 280 nm.....68

Figura 22. Isomerização catalisada por base da D-frutose (cetoexose não redutora) para D-glicose (aldooxose redutora) em projeção de Fisher..... 69

Figura 23. (a) Representação da reação redox entre a D-glicose e o ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzóico e (b) Fotografia de um teste de atividade de frações de purificação, sendo o primeiro tubo o branco (sem adição da enzima) e os demais tubos contendo amostras de diferentes frações.....69

Figura 24. Cromatogramas de troca iônica da invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018) observando a absorção em 280 nm. a) Troca aniônica com matriz DEAE-cellulose, as frações ativas estão assinaladas pelo quadro amarelo. b) Troca catiônica com matriz CM-sepharose, as frações ativas 4-19 correspondem à banda mais intensa.....71

Figura 25. Gel SDS-PAGE da invertase nas diferentes etapas da purificação, onde M é o marcador de massa molecular Full-range Amersham Rainbow Marker – GE, 1 é a invertase extraída e resuspendida em tampão fosfato de sódio, 2 é o eluato da Superdex 200, 3 o eluato da DEAE-celulose e 4 e 5 os

eluatos da CM-sepharose. A invertase deve ser vista como uma mancha entre 100 e 200 kDa.....73

Figura 26. Espectro de Fluorescência da invertase 0,15 mg mL⁻¹ em tampão acetato 40 mmol L⁻¹ ($\lambda_{exc} = 280$ nm; $\lambda_{máx} = 338$ nm).....74

Figura 27. Espectro de Dicroísmo Circular da invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018), purificada. Em vermelho a amostra contendo 0,15 mg mL⁻¹ e em preto 0,03 mg mL⁻¹ de invertase ambas em tampão acetato 40 mmol L⁻¹ (vermelho) e 8 mmol L⁻¹ (preto).....75

Figura 28. Acompanhamento da rotação angular de uma solução de sacarose (20 mg mL⁻¹) incubada com invertase (0,15 mg mL⁻¹) extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018) e purificada.....76

Figura 29. Determinação da temperatura ótima para máxima atividade enzimática.....77

Figura 30. Espectros de Fluorescência da invertase ($\lambda_{exc} = 280$ nm) em diferentes pH.....78

Figura 31. Curva da atividade da invertase frente à uma solução de sacarose 10 mmol L⁻¹ em diferentes pH. A atividade foi medida pelo teste com DNS acompanhando-se a absorbância das soluções em 540 nm e utilizando-se a curva de calibração feita com glicose e frutose $C_{gli+fru} = \frac{Abs (0,047 \pm 0,03)}{(0,00493 \pm 0,00005)}$, $R^2 = 0,9996$78

Figura 32. Curva da concentração de sacarose removida a cada ciclo de captura (azul) e concentração de sacarose removida de maneira cumulativa (vermelho). A concentração de sacarose foi medida na forma de glicose formada pelo teste com DNS acompanhando-se a absorbância das soluções em 540 nm e utilizando-se a curva de calibração feita com glicose e frutose: $C_{gli+fru} = \frac{Abs (0,047 \pm 0,03)}{(0,00493 \pm 0,00005)}$, $R^2 = 0,9996$80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação das técnicas de purificação empregadas de acordo com as propriedades da proteína de interesse.....	29
Tabela 2. Comparação de diferentes métodos de síntese das nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ (adaptado de Koo <i>et al.</i> , 2019).....	37
Tabela 3. Resumo dos parâmetros que influenciam o método de síntese de Fe ₃ O ₄ por coprecipitação (adaptado de Koo <i>et al.</i> , 2019).....	38
Tabela 4. Técnicas de caracterização das propriedades físico-químicas das nanopartículas de Fe ₃ O ₄ (adaptado de Koo <i>et al.</i> , 2019).....	39
Tabela 5. Descrição das principais aplicações de nanopartículas magnéticas em diferentes áreas (adaptado de Ali, <i>et al.</i> , 2016).....	41
Tabela 6. Tamanho das NPM estimado por NTA, DLS e DRX e Potencial Zeta.....	58
Tabela 7. Análise elementar das amostras de NPM antes e após cada etapa de recobrimento.....	59
Tabela 8. Estimativa do conteúdo de estrutura secundária na invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018), usando a deconvolução dos dados experimentais pelo <i>software</i> K2D3 e predição pela sequência pelo <i>software</i> APSSP2.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHN: Análise elementar

DLS: Espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering*)

XRD: Difração de raios X (*X-ray Diffraction*)

E: Enzima

ES: Complexo enzima-substrato

Fe₃O₄: Magnetita

Fe₃O₄@SiO₂: Magnetita recoberta por sílica

Fe₃O₄@SiO₂-NH₂: Magnetita recoberta por sílica e funcionalizada com grupos amino

Fe₃O₄@SiO₂-NH₂-Inv: Magnetita recoberta por sílica e funcionalizada com Invertase

FT-IR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)

NPM: Nanopartícula magnética

NTA: Análise de rastreamento de partículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*)

PDB: Banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*)

S: Substrato

TEM: Microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission electron microscopy*)

TGA: Análise Termogravimétrica (*Thermogravimetric analysis*)

XPS: Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (*X-ray photoelectron spectroscopy*)

SUMÁRIO

1 Introdução.....	19
1.1 Motivação: Diabetes.....	19
1.2 Alvo: Bebidas adoçadas.....	20
1.3 Proteínas: Enzimas.....	21
1.3.1 Conceitos básicos de proteínas.....	21
1.3.2 Cinética enzimática.....	23
1.3.3 Invertase.....	24
1.3.3.1 Invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1.3.4 Purificação de proteínas.....	28
1.3.4.1 Precipitação diferencial.....	29
1.3.4.2 Cromatografia de filtração em gel analítica.....	31
1.3.4.3 Cromatografia de troca iônica.....	32
1.4 Nanopartículas magnéticas.....	34
1.4.1 Síntese das nanopartículas magnéticas.....	36
1.4.2 Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	39
1.5 Estado da arte.....	41
2 Objetivos.....	45
3 Metodologia.....	46
3.1 Síntese das nanopartículas magnéticas (NPM).....	46
3.2 Recobrimento das NPM com tetraetil ortosilicato (TEOS).....	46

3.3 Modificação da superfície das NPM com (3-aminopropil)trioxissilano (APTES).....	47
3.4 Caracterização das NPM.....	47
3.4.1 Tamanho.....	47
3.4.2 Potencial Zeta.....	48
3.4.3 Espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR).....	48
3.4.4 Difratomia de raios X (XRD).....	48
3.4.5 Composição elementar (CHN).....	48
3.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	48
3.4.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).....	49
3.4.8. Análise termogravimétrica (TGA).....	49
3.5 Extração da invertase de fermento biológico.....	49
3.6 Purificação invertase.....	50
3.6.1 Cromatografia de filtração em gel analítica.....	50
3.6.2 Cromatografia de troca aniônica (DEAE Celulose).....	50
3.6.3 Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose).....	51
3.7 Liofilização das amostras.....	51
3.8 Caracterização da invertase.....	52
3.8.1 Eletroforese em gel SDS-PAGE.....	52
3.8.2 Determinação da concentração de proteínas.....	52
3.8.3 Teste de atividade da invertase.....	53
3.8.4 Fluorescência.....	53

3.8.5 Polarimetria da invertase.....	53
3.8.6 Dicroísmo Circular.....	54
3.9 Imobilização da invertase na superfície das NPM.....	54
3.10 Teste de captura e remoção da sacarose.....	54
4 Resultados e Discussões.....	56
4.1 Síntese das nanopartículas magnéticas (NPM).....	56
4.2 Caracterização das nanopartículas magnéticas (NPM).....	57
4.3 Extração e purificação da invertase.....	66
4.3.1 Precipitação diferencial.....	67
4.3.2 Cromatografia de filtração em gel.....	67
4.3.6 Teste de atividade da invertase.....	68
4.3.7 Cromatografia de troca iônica.....	70
4.3.8 Caracterização da invertase.....	72
4.4 Teste de pesca da sacarose.....	79
5. Conclusões.....	81
6. Perspectivas.....	82
7. Referências.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivação: Diabetes

A diabetes é uma doença metabólica crônica que leva a elevados níveis de glicose no sangue, com consequências sérias para a saúde humana (World Health Organization, 2019). É a doença que mais cresce no mundo e o maior desafio para a saúde deste século (Jaacks *et al*, 2016), sendo uma das principais causas de morte (World Health Organization, 2019). Somente no Brasil, 13 milhões de pessoas têm a doença, ou seja, 6,9% da população brasileira (Diabetes, 2018), sendo o quarto país com o maior número de diabéticos do mundo (Borielo, 2018). Cerca de 9% da população adulta mundial tem a doença (World Health Organization, 2019), sendo 90% destes diabetes tipo 2 (IDF Diabetes Atlas, 2017). Na diabetes, as células-beta do pâncreas apresentam dificuldade em produzir insulina suficiente para auxiliar na regulação dos níveis de açúcar no sangue. Ela acontece em dois tipos distintos, a diabetes tipo 1 é causada por uma reação autoimune que geralmente ocorre no pâncreas; com o ataque as células-beta, o corpo não consegue mais produzir insulina. Na diabetes tipo 2, o corpo desenvolve resistência à insulina, que pode não ser reconhecida pelo receptores, ou ainda se ligar aos receptores mas ter o sinal não enviado à célula, com isso a célula não captura a glicose, resultando em acumulação desse açúcar no sangue. Isto pode resultar em perda de células-beta e conseqüentemente na diminuição da produção de insulina. Ambos os tipos são crônicos e incuráveis (MD Genetic Pro, 2019). A diferença entre diabetes tipo 1 e 2 está ilustrada na Figura 1.

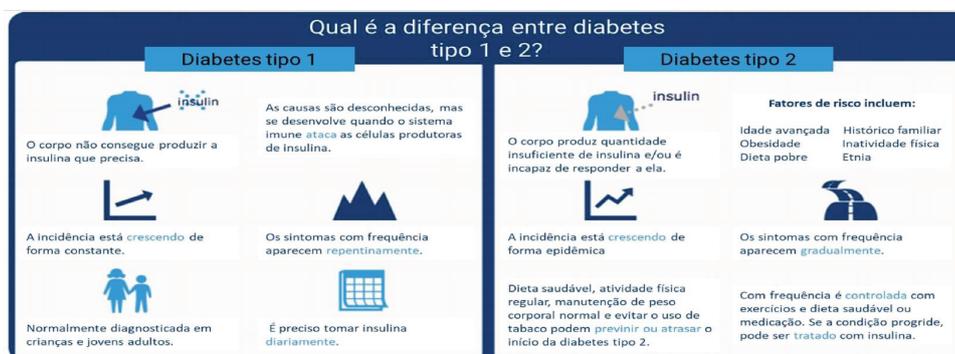


Figura 1. Representação das diferenças entre a diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2. (adaptado de (MD Genetic Pro, 2019)).

Olhando para esse cenário alarmante a Federação Internacional do Diabetes advoga 12 ações para o combate à diabetes. Este projeto se enquadra em 2 dessas ações (IDF Framework for Action on Sugar, 2015):

a. Revisão de diretrizes para reduzir o consumo de alimentos com conteúdo naturalmente elevado de açúcar (por exemplo, certas frutas e sucos de frutas).

b. Regulamentação para reformulação de alimentos processados para reduzir o teor de açúcar.

1.2 Alvo: Bebidas adoçadas

Estudos recentes mostram que o consumo de bebidas adoçadas está associado ao aumento do risco de contrair a diabetes (IDF Framework for Action on Sugar, 2015). Existe um tratado mundial para barrar o crescimento da diabetes e obesidade no mundo até 2025 (World Health Organization, 2019). Neste âmbito, o Reino Unido (Triggle, 2016), seguido pelo México, França, Noruega e África do Sul, encontraram no aumento dos impostos sobre bebidas adoçadas uma maneira de impactar o comportamento do consumidor e diminuir a ingestão destes produtos. No México, a compra de bebidas adoçadas artificialmente diminuiu 6% em 2014 enquanto produtos não taxados tiveram crescimento de 4%. De acordo com a *International Diabetes Federation* (IDF), a Inglaterra dedica parte dos impostos sobre refrigerantes (20 milhões de libras ao ano) para financiar a prática de esportes em escolas primárias no combate ao sedentarismo (Treasury & Osborne 2016).

A fim de lutar contra a obesidade e o diabetes, surge a necessidade de disponibilizar alimentos de baixo teor calórico para consumo da população. Uma possibilidade seria a redução do teor natural de sacarose de sucos naturais como o suco de laranja. O Brasil é responsável por 61% da produção mundial de suco de laranja (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017). São produzidas anualmente 18 milhões de toneladas de laranja, cerca de 30% da safra mundial da fruta (EuroFresh, 2019). O Departamento Americano de Agricultura estimou em 570 000 toneladas o consumo de suco de laranja nos Estados Unidos em 2017 (Neves, 2018). Os sucos

de fruta não adoçados poderiam ser uma alternativa mais saudável a população se tivessem valor calórico reduzido. Estima-se que em um copo (240 mL) de suco de laranja, tem-se 25,8 g de açúcar e 112 calorias (Lehman, 2019). Devido ao apelo mundial pela redução da ingestão de calorias, surge a necessidade de reduzir o valor calórico do suco de laranja pronto para o consumo. O suco de laranja apresenta diferentes moléculas de açúcar, das quais a sacarose corresponde à 61%, a frutose 21% e a glicose 18% (Damayanti, *et al.* 2012).

A remoção da sacarose de uma solução aquosa pode ser realizada por diferentes métodos. Um exemplo seria a destilação da água, obtendo-se a separação entre água e a sacarose. Outra maneira seria a precipitação da sacarose utilizando sais, solventes como etanol ou acetona, ou ainda ácido sulfúrico (Young, 1898). Entretanto, nenhum desses métodos seria adequado para a remoção da sacarose presente naturalmente em sucos de frutas.

O projeto visa desenvolver um nanomaterial capaz de remover sacarose de soluções, diminuindo sua concentração e que no futuro possa ser empregado na redução do teor de sacarose presente naturalmente em sucos de frutas como o suco de laranja. Para este fim, propõe-se o desenvolvimento de um nanomaterial sob medida para captura e remoção da sacarose. Tendo em mente a especificidade das enzimas frente aos seus substratos, a invertase foi escolhida para capturar seletivamente a sacarose dentro de uma mistura complexa como o suco de laranja. A invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida por extração da proteína de fermento biológico seco.

1.3 Proteínas: Enzimas

1.3.1 Conceitos básicos de proteínas

As proteínas são uma classe de biomoléculas formadas por cadeias de aminoácidos que desempenham variadas funções nos organismos. A sua sequência de aminoácidos é ditada pelo gene, ou seja, sequência de nucleotídeos presente no DNA e que codifica para proteína. A estrutura de uma proteína é descrita em 4 níveis (Figura 2) (Nelson & Cox, 2017):

1. Estrutura primária: a sequência de aminoácidos.
2. Estrutura secundária: estrutura local formada pelo arranjo de ligações de hidrogênio da cadeia principal (grupos amida). As mais comuns são as α -hélices e as folhas- β .
3. Estrutura terciária: forma global de uma cadeia da proteína, geralmente estabilizada por interações não locais, como a formação de interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas (*salt bridges*), ligações de hidrogênio, ligações dissulfeto e modificações pós-traducionais. Essa é a estrutura que normalmente rege a função da proteína.
4. Estrutura quaternária: a estrutura formada quando várias cadeias de proteínas se combinam para formar um complexo proteico, ou quando a proteína possui um grupo prostético em formação de uma holoproteína.

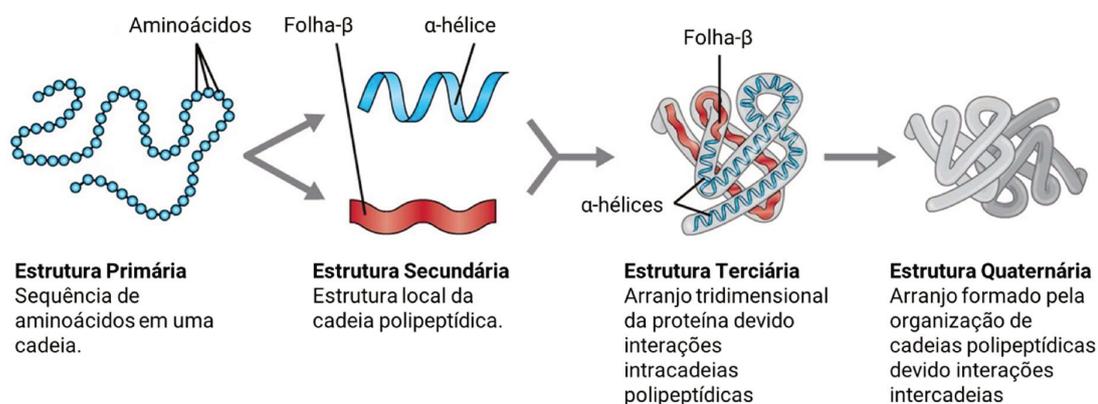


Figura 2. Representação dos níveis de organização das proteínas nas quatro estruturas. (adaptado de Lumen, 2019).

As proteínas são sintetizadas no ribossomo num processo chamado de tradução, no qual a informação contida no RNA mensageiro, produzido previamente pela transcrição do DNA, é traduzida em aminoácidos, que vão sendo sequencialmente adicionados e unidos um ao outro por ligações peptídicas. Esse processo faz parte do dogma central da biologia que pode ser representado como mostrado na Figura 3. Em procaríotos os processos de transcrição e tradução são acoplados e ocorrem simultaneamente. Já nos eucariotos existe uma separação

espacial, e os processos ocorrem então sequencialmente, sendo que a transcrição ocorre no núcleo, onde o mRNA é processado, e o mRNA maduro é transportado ao citoplasma onde a tradução ocorre. Os nucleotídeos no DNA se organizam em trincas, e essas trincas codificam os 20 aminoácidos existentes (Nelson & Cox, 2017; ThermoFisher Scientific, 2019).

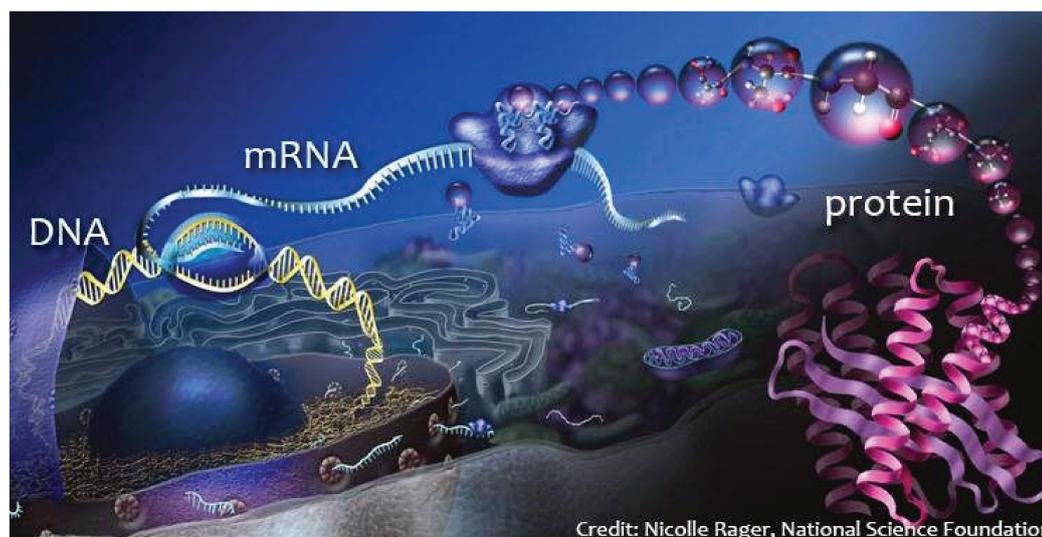


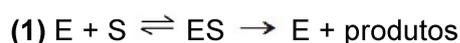
Figura 3. Representação do dogma central da biologia, que consiste na replicação do DNA, transcrição do DNA em mRNA e posterior tradução deste para proteína. (extraída de Zamora, 2013).

1.3.2 Cinética enzimática

Praticamente todos os processos químicos que ocorrem em sistemas biológicos são catalisados por enzimas, e na ausência dessas proteínas, essas reações seriam lentas, e a vida na forma que as conhecemos seria impossível (Laidler, 1997).

A enzima base para o desenvolvimento da cinética enzimática foi a invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O químico Adrian John Brown descobriu em 1892 que a taxa de fermentação da sacarose na presença de *S. cerevisiae* era independente da quantidade de sacarose presente, diferente do encontrado nos estudos de cinética química (Brown, 1892). Em 1902 ele sugeriu que o resultado poderia ser explicado pela formação de um complexo entre a invertase e

a sacarose (Brown, 1902). Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten descobriram que o efeito observado por Brown só era observado em elevadas concentrações de substrato (sacarose). Em concentrações baixas, a velocidade era proporcional a concentração do substrato. Com isso, eles consideraram a formação do complexo enzima-substrato e representaram as reações enzimáticas como mostrado na Equação 1.



Eles propuseram a ocorrência de um equilíbrio entre enzima (E), substrato (S) e complexo enzima-substrato (ES), e que o passo lento seria o rompimento do complexo ES (Michaelis & Menten, 1913). Também estabeleceram uma constante conhecida como a constante de Michaelis (K_M), na qual valores altos indicam ligação fraca entre enzima e substrato e valores baixos indicam ligação forte entre enzima e substrato. A equação de Michaelis e Menten relacionando a velocidade de reação (v) com a concentração de substrato $[S]$ está representada na Equação 2.

$$(2) \quad v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{(K_M + [S])}$$

1.3.3 Invertase

A invertase ou β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) é a enzima responsável pela hidrólise do terminal não redutor de β -frutofuranosídeos, ou seja, ela converte a sacarose em glicose e frutose (Romero-Gómez, *et al.*, 2000) como representado na Figura 4. Ela é classificada dentro da família 32 das hidrolases de glicosídeos (GH32) que hidrolisam polissacarídeos que contenham frutose (Cantarel, *et al.*, 2009). Essa família de enzimas atua por um mecanismo de retenção da configuração.

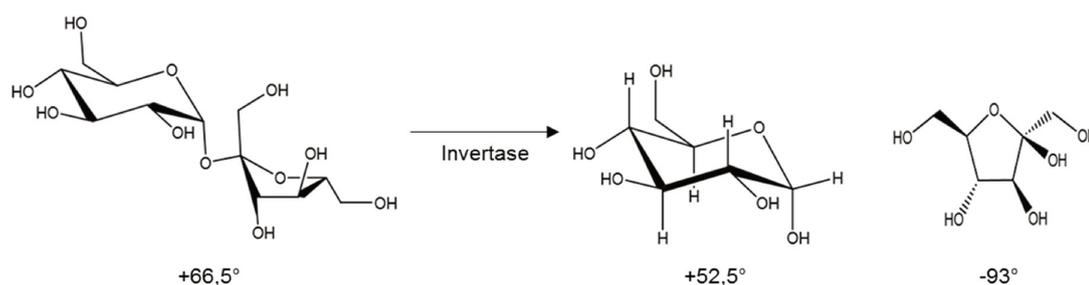


Figura 4. Representação da reação enzimática da hidrólise da sacarose em uma mistura equimolar de glicose e frutose.

A enzima recebeu este nome devido a inversão da rotação da luz polarizada, de positiva para a sacarose ($+66,5^\circ$) para negativa para a mistura D-glicose ($+52,5^\circ$) e D-frutose (-93°) (Barnett, 2003; Ward, 2012). A invertase é amplamente utilizada na indústria química e de alimentos, principalmente na produção de açúcar invertido, um xarope não cristalizável resultante da mistura de frutose e glicose e caracterizado pelo maior potencial de dulçor devido à frutose (Andjelkovic, *et al.*, 2015). O mecanismo de ação da invertase, mostrado na Figura 5, pode ser descrito como a protonação do oxigênio da ligação glicosídica por uma reação ácido base com o resíduo de ácido glutâmico. Em seguida, o oxigênio negativamente carregado do aspartato realiza um ataque nucleofílico no carbono-1 anomérico da frutose, resultando na formação do complexo enzima-substrato. A glicose é liberada seguida pela hidrólise da ligação entre o carbono-1 da frutose e o resíduo de ácido aspártico, levando à liberação da frutose e reconstituição da invertase (Reddy & Maley, 1996).

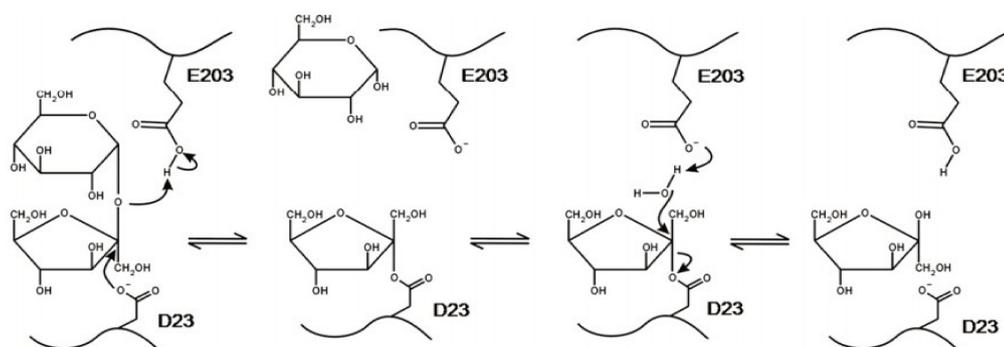


Figura 5. Representação do mecanismo de ação da invertase de *Arabidopsis thaliana* (retirado de Lammens, *et al.*, 2008).

1.3.3.1 Invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são empregadas no preparo de alimentos e bebidas desde que o homem desenvolveu o pão e bebidas alcoólicas há mais de 5000 anos (History of yeast, 2018). Os primeiros estudos da fermentação alcoólica foram executados por Antoine Lavoisier (Lavoisier, 1789). Mas somente após o surgimento do microscópio e dos trabalhos de Louis Pasteur na segunda metade do século XIX (Pasteur, 1857; Pasteur, 1858) que as leveduras foram identificadas como os microorganismos responsáveis pela fermentação alcoólica e fermentação do pão.

A levedura *S. cerevisiae* é amplamente empregada e conhecida popularmente como fermento biológico ou levedo de cerveja (Moyad, 2008). Ela é um organismo eucariótico unicelular que pertence ao reino fungi. Foi o primeiro organismo a ter seu genoma completamente sequenciado (Goffeau, *et al.*, 1996). Por ser um organismo utilizado a muito tempo pelo homem, ter seu genoma sequenciado e ser relativamente fácil de manipular geneticamente é um dos organismos modelos mais empregados em pesquisa no mundo (Botstein, *et al.*, 1997).

Em 1842, Mitscherlich descreveu a presença de uma substância capaz de inverter o açúcar de cana dextrorrotatório para um açúcar levorotatório (Mitscherlich, 1842), identificado em 1847 como a mistura de glicose e frutose por Dubrunfaut (Dubrunfaut, 1847). A invertase de *S. cerevisiae* foi isolada pela primeira vez em 1860 por Berthelot (Berthelot, 1860). Embora no início acreditava-se que a invertase era uma enzima intracelular, de la Fuente e Sols mostraram que a invertase é secretada pelas células de *S. cerevisiae* e que a hidrólise do açúcar é extracelular (de la Fuente & Sols, 1962). Assim, descobriram os dois tipos de invertase produzidos pela *S. cerevisiae*, uma forma não glicosilada e intracelular, e uma forma altamente glicosilada e secretada (Gascón, *et al.*, 1968). A forma extracelular fica localizada no espaço periplasmático, o espaço que existe entre a membrana plasmática e a parede celular, mostrado na Figura 6. A invertase intracelular é codificada pelo mesmo gene (SUC2) que a invertase secretada e suas estruturas secundárias e terciárias são virtualmente idênticas de acordo com análises de dicroísmo circular (Williams, *et al.*, 1985).

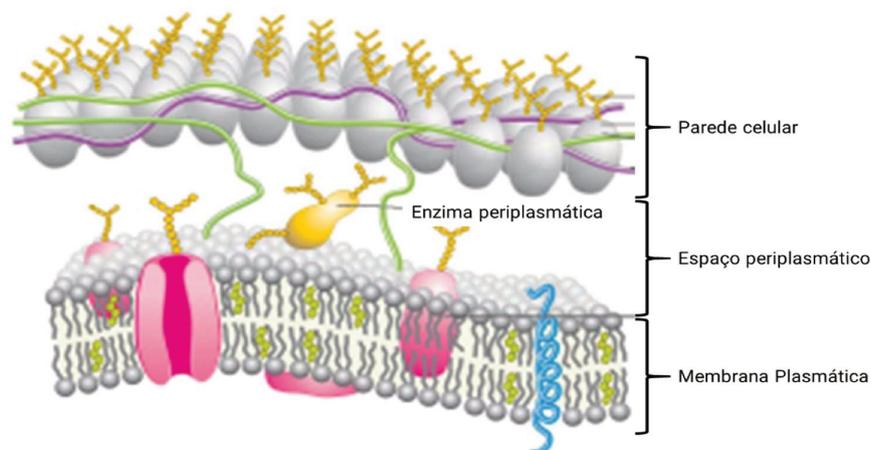


Figura 6. Representação do espaço periplasmático de uma célula de levedura. (Adaptado de Yeastsite, 2016).

A invertase tem a importante função de hidrolisar a sacarose do meio extracelular em monossacarídeos que possam ser transportados para o citoplasma da célula, e posteriormente metabolizados. A enzima possui atividade máxima em pH 4,8 e 40 °C com K_M de 5 mmol L⁻¹ (Timerman, 2012). Além da produção de biomassa (fonte de carbono) e fonte de energia, o açúcar pode ser usado na produção de etanol, uma substância antisséptica que evita a proliferação de outros microorganismos que competiriam com a *S. cerevisiae* (Sainz-Polo, *et al.*, 2013). A biossíntese e secreção de proteínas por eucariotos é um processo complexo, no qual a passagem do polipeptídeo através do retículo endoplasmático é acoplada a glicosilação e enovelamento da proteína. A hiperglicosilação ocorre posteriormente no aparelho de Golgi e não afeta o enovelamento ou atividade catalítica da proteína (Conde, *et al.*, 2004). A estrutura da invertase de *S. cerevisiae* consiste em uma hélice- β , o domínio catalítico, e um sanduíche- β , domínio característico das enzimas da família GH32, mas de função desconhecida (Figura 7a). Cada uma das cadeias se organiza em um dímero e posteriormente em octâmeros (Figura 7b).

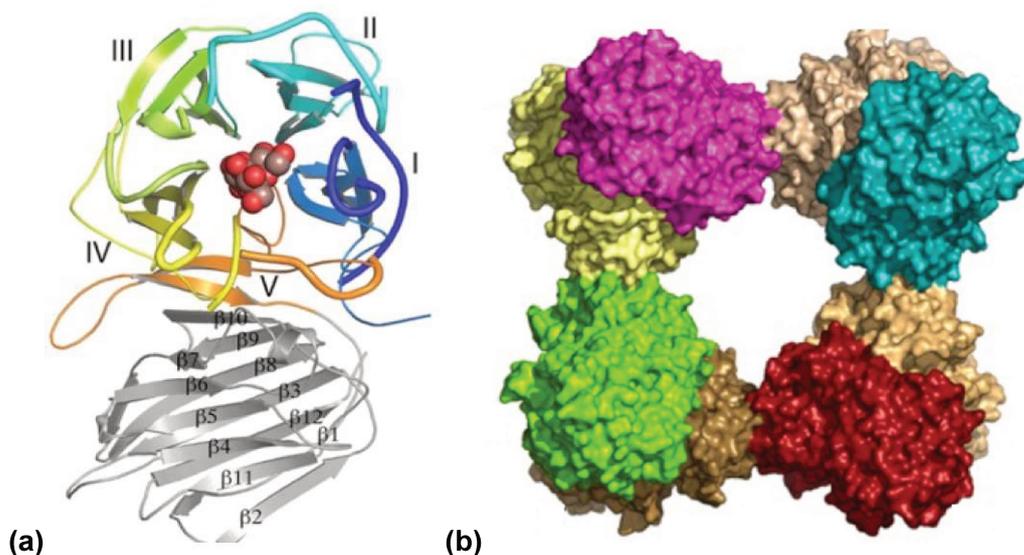


Figura 7. (a) Representação da estrutura de uma cadeia da invertase de *S. cerevisiae*, uma molécula de sacarose é representada no sítio catalítico, as cinco palhetas da hélice- β estão numeradas de I à V e a estrutura do sanduíche- β representada em cinza. (b) Representação da estrutura quaternária da invertase de *S. cerevisiae*, um octâmero. (Extraído de Sainz-Polo, *et al.*, 2013).

A dimerização das cadeias apresenta um papel importante na especificidade em relação ao substrato, impedindo a ligação de moléculas de açúcar maiores (Sainz-Polo, *et al.*, 2013). O sítio catalítico fica numa região com uma cavidade (*pocket*) que abriga os resíduos catalíticos, um aspartato (Asp) e um glutamato (Glu) que conferem uma carga negativa ao sítio catalítico. O Asp-23 atua como o nucleófilo enquanto o Glu-204 atua como ácido/base durante a catálise (Reddy, *et al.*, 1990).

1.3.4 Purificação de proteínas

O primeiro passo da purificação é a clarificação do lisado da célula, para remover material particulado, detritos celulares, DNA e lipídios. Para isso o lisado é centrifugado, e a fração solúvel, contendo a proteína de interesse pode ser submetida a novas etapas de purificação (EMBL, 2019). A purificação de proteínas se baseia nas propriedades que a proteína de interesse possui. Essas propriedades

permitem o emprego de diferentes técnicas de purificação, como exemplificado na tabela abaixo.

Tabela 1. Representação das técnicas de purificação empregadas de acordo com as propriedades da proteína de interesse

Propriedade da proteína	Técnica empregada
Solubilidade	Precipitação diferencial
Tamanho	Cromatografia de filtração em gel analítica
Carga	Cromatografia de troca iônica
Hidrofobicidade	HPLC de fase reversa
Atividade biológica	Cromatografia de afinidade

As técnicas de precipitação diferencial, cromatografia de filtração em gel analítica e cromatografia de troca iônica empregadas na purificação da invertase serão apresentadas a seguir.

1.3.4.1 Precipitação diferencial

A precipitação é o fenômeno que leva à formação de um sólido durante uma reação química. A precipitação de proteínas é uma técnica amplamente empregada durante as etapas de purificação e concentração. Ela se dá pela alteração do potencial de solvatação do solvente em relação à proteína de interesse pela adição de um produto químico capaz de diminuir a solubilidade da proteína. A solubilidade de uma proteína se baseia no número e distribuição de resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos na sua superfície. Os resíduos hidrofóbicos são normalmente encontrados no interior da estrutura da proteína, entretanto alguns deles se localizam na superfície. Quanto maior o número de resíduos hidrofóbicos na superfície, menor a solubilidade da proteína em meio aquoso. Os resíduos polares e carregados interagem com grupos iônicos do solvente e aumentam sua solubilidade em água. Durante a solubilização das proteínas uma camada de solvatação é formada ao seu redor por moléculas de água e íons presentes na solução. Essa solvatação diminui as forças atrativas proteína-proteína. Logo, a redução da camada de

solvatação leva à maior interação proteína-proteína, sua aglomeração e conseqüentemente à sua precipitação. O método mais comum de precipitação de proteínas é conhecido como *salting out* (Figura 8). Ele consiste na adição de um sal, geralmente o sulfato de amônio, à solução contendo a proteína de interesse. Com o aumento da concentração do sal, as interações das cargas na superfície da proteína são substituídas do solvente para os íons do sal adicionado, levando a exposição dos resíduos hidrofóbicos, aglomeração e precipitação da proteína. Outro método bastante difundido é a precipitação por solventes miscíveis, como etanol ou metanol. O solvente orgânico adicionado passa a substituir moléculas de água da camada de solvatação, levando a redução desta e diminuição da constante dielétrica da água, ocasionando a aglomeração seguida da precipitação de proteínas (Zellner, *et al.*, 2005; Harrison, *et al.*, 2003; Ladish, 2001).

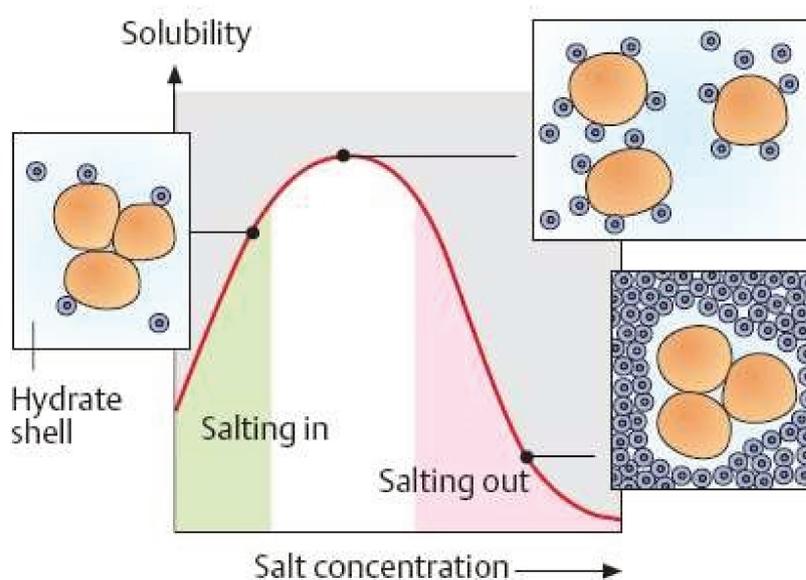


Figura 8. Representação da influência da força iônica (concentração de sal) na solubilidade de proteínas, indicando que a presença de íons leva primeiramente a uma maior solubilização da proteína, blindando as interações proteína-proteína, e, posteriormente, com concentração crescente de sais ocorre a aglomeração das proteínas, seguida pela sua precipitação (adaptado de Bio-Resource, 2011).

1.3.4.2 Cromatografia de filtração em gel analítica

Na cromatografia de filtração em gel analítica a separação de moléculas se baseia no seu tamanho e forma. A fase estacionária é formada por uma matriz polimérica porosa, geralmente dextrana, agarose ou poliacrilamida, que atua como uma peneira. As proteínas que são maiores que os poros não conseguem penetrá-los e passam pelo exterior dos *beads* percorrendo um caminho menor e sendo eluídas primeiro. As proteínas menores que os poros passam por dentro dos *beads* e, portanto, percorrem um caminho maior dentro da coluna e são eluídas posteriormente, como mostrado na Figura 9. Tem-se assim que o volume de tampão em que uma proteína é eluída é proporcional ao logaritmo da sua massa molecular, caso as proteínas possuam forma globular. Existem fases estacionárias com diferentes tamanhos de poros, adequados para a purificação de moléculas de diferentes tamanhos (Nelson & Cox, 2017). Essa técnica permite uma boa separação de grandes e pequenas proteínas, enquanto preserva a sua atividade biológica.

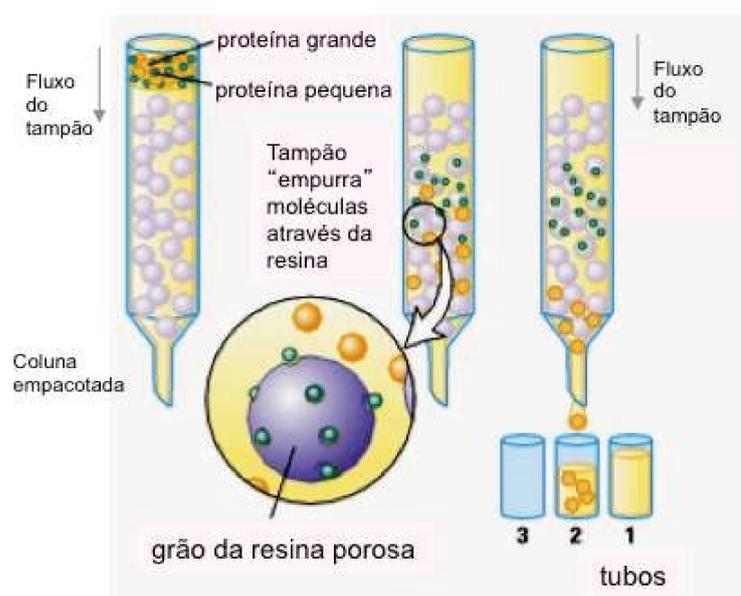


Figura 9. Representação de um processo de Cromatografia de Filtração em gel analítica ilustrando que as proteínas maiores são incapazes de penetrar os poros da resina e são eluídas primeiramente e que as proteínas menores são retardadas na coluna e eluídas posteriormente (extraído de La Neurotox, 2019).

1.3.4.3 Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica permite a separação de íons e moléculas polares de acordo com a sua afinidade pelo trocador iônico. Existem dois tipos de cromatografia de troca iônica: troca aniônica e troca catiônica representadas na Figura 10. A cromatografia de troca aniônica é realizada quando a proteína de interesse possui carga negativa, ou seja, a purificação é realizada em pH maior que o pI da proteína. Já a cromatografia de troca catiônica é empregada quando a proteína de interesse é positivamente carregada, ou seja, a cromatografia é realizada em pH menor que o pI da proteína de interesse. Nesse tipo de cromatografia a fase estacionária é carregada negativamente para atrair as moléculas de carga oposta. Depois da adsorção da proteína por interações eletrostáticas com a fase estacionária, a proteína pode ser eluída pela adição gradual de sal (íons) ou pela mudança de pH (Ninfa, *et al.*, 2010; Cummins, *et al.*, 2017).

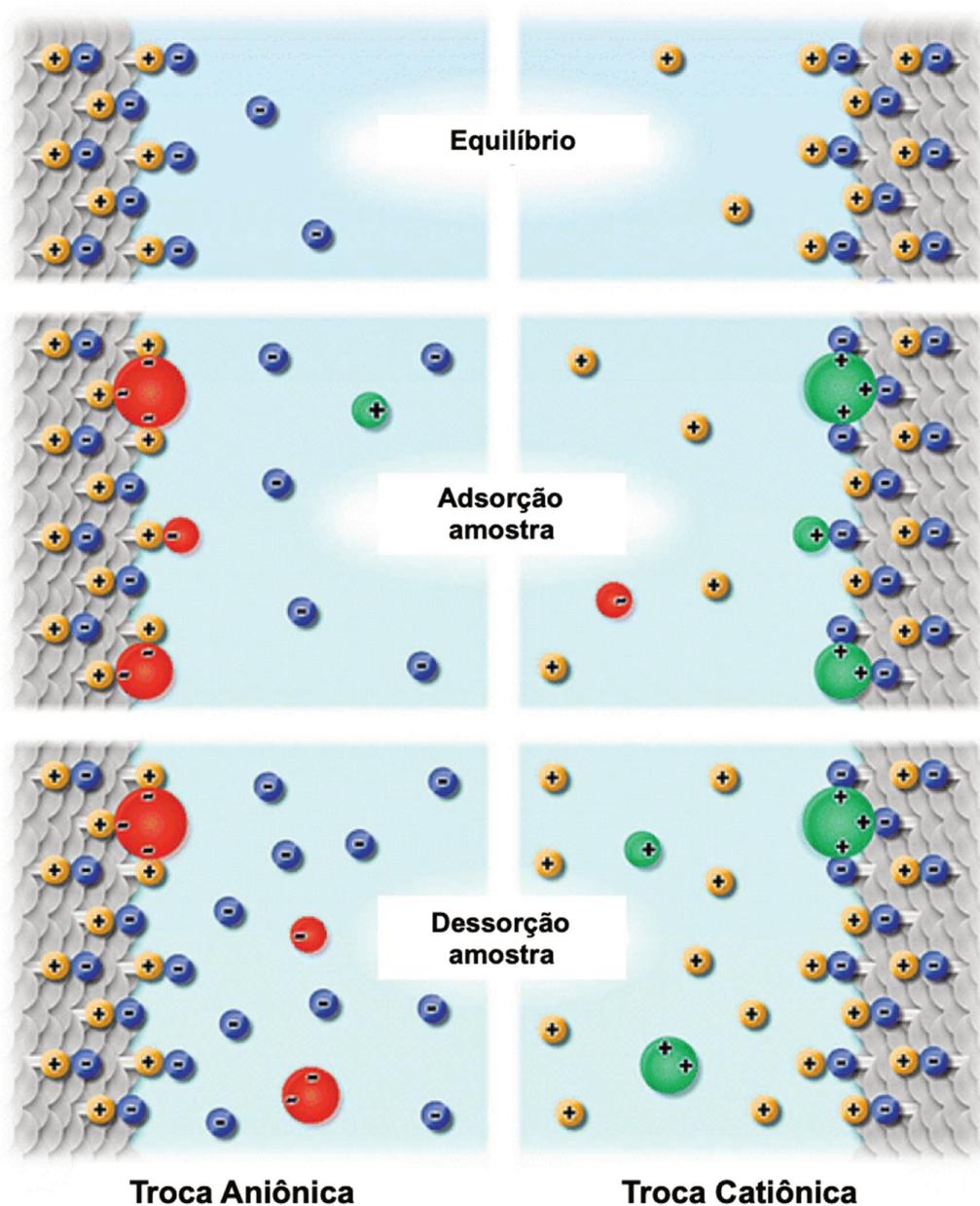


Figura 10. Representação das etapas de cromatografia de troca iônica indicando que as proteínas negativamente carregadas seriam atraídas ao trocador aniônico, ao passo que as proteínas positivamente carregadas seriam atraídas por um trocador catiônico. As moléculas de mesma carga da fase estacionária não interagem e são eluídas, ao passo que as proteínas interagindo com a fase estacionária podem ser eluídas com a adição de sal, que blinda as cargas da coluna, quebrando a interação proteína-fase estacionária (adaptado de Cummins, *et al.*, 2017).

1.4 Nanopartículas magnéticas

A nanotecnologia tem oferecido novos caminhos para solucionar antigos e novos problemas da humanidade. Suas incontáveis aplicações vão desde a ciência de materiais (Hussain, 2019; Wood & Stevens, 2016; Faivre & Bennet, 2016), energia (Jun, *et al.*, 2019), *drug delivery* (Esim, *et al.*, 2019; Lu, *et al.*, 2017), dispositivos bioeletrônicos (Lee, *et al.*, 2018; Zhang, *et al.*, 2017), biosensores (Goud, 2019; Zhu, *et al.*, 2017; Wang, *et al.*, 2017), detectores (Liu, *et al.*, 2017) e imunoenaios (Liu, *et al.*, 2019; Lai, *et al.*, 2017).

As nanopartículas magnéticas (NPM) têm se destacado devido às suas distintas propriedades, dentre elas o seu comportamento magnético, biocompatibilidade e a possibilidade de modificação da superfície (Li, *et al.*, 2011; Singh, *et al.*, 2016). Devido a suas propriedades magnéticas intrínsecas e outras propriedades como baixa toxicidade, alta razão área superficial-volume e método simples de separação, as nanopartículas de Fe_3O_4 têm inúmeras aplicações, dentre elas: área ambiental como remediação de poluição (Singh, *et al.*, 2019) e tratamento de esgoto (Domingos, *et al.*, 2019), aplicações biomédicas como ressonância magnética de imagem (Nguyen, *et al.*, 2018), bioseparação, biosensores (Zuo, *et al.*, 2018) e *drug-delivery* (Anastasova, *et al.*, 2018). Dentre as variadas aplicações das nanopartículas magnéticas encontra-se a imobilização de enzimas, otimizando a etapa de separação e oferecendo uma oportunidade de redução do tempo e custo do processo e possibilidade de reuso (Liu, *et al.*, 2017).

A magnetita é um dos óxidos de ferro encontrados na natureza e também, pode ser obtida e sintetizada em laboratório. Em geral as nanopartículas de Fe_3O_4 , também descritas como $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$, possuem propriedades ferrimagnéticas com elevada saturação de magnetização (M_s) de aproximadamente 92 emu g^{-1} (Wu, *et al.*, 2015). Suas propriedades magnéticas dependem do tamanho da nanopartícula, e elas passam a ter propriedades superparamagnéticas quando as nanopartículas são suficientemente pequenas (Ghazanfari, *et al.*, 2016). Com a redução do tamanho das nanopartículas o magnetismo multidomínio é transformado em magnetismo de único domínio, passando então de ferrimagnético para superparamagnético, como é representado na Figura 11. A redução no tamanho da partícula leva a um aumento da coercividade (H_c) até um valor máximo em um tamanho específico denominado

diâmetro crítico (D_s). Nesse ponto, todos os spins magnéticos apontam na mesma direção, e as nanopartículas passam a serem difíceis de desmagnetizar devido à alta coercividade (Koo, *et al.*, 2019). Entretanto, se o tamanho for reduzido ainda mais, a coercividade será reduzida rapidamente até atingir um valor zero e as nanopartículas atingem o estado de superparamagnéticas. Geralmente, Fe_3O_4 nanopartículas com um diâmetro inferior a 20 nm exibem propriedades superparamagnéticas (Sun, *et al.*, 2014; Hasany, *et al.*, 2013).

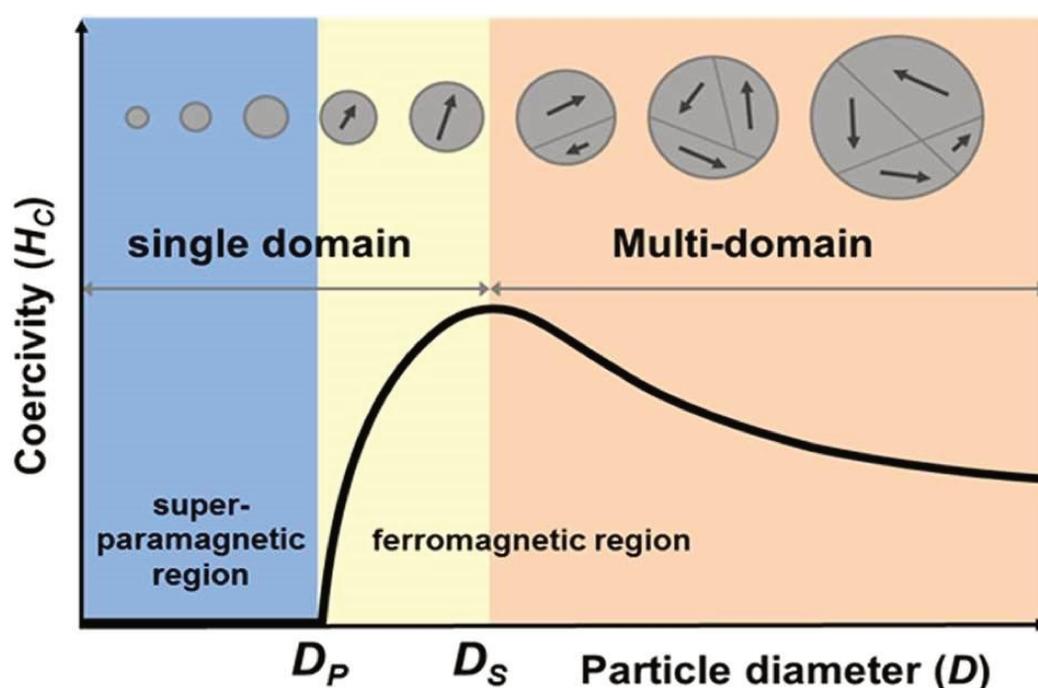


Figura 11. Representação das propriedades magnéticas de nanopartículas de magnetita individuais, mostrando o comportamento da coercividade (H_c) em função do diâmetro da partícula (extraído de Koo, *et al.*, 2019).

As nanopartículas superparamagnéticas não possuem força coerciva ou *loop* de histerese devido ao seu magnetismo de único domínio (Figura 12). Elas só são magnetizadas na presença de um campo magnético externo, o qual pode facilmente controlar as nanopartículas (Ghazanfari, *et al.*, 2016; Ma & Chen, 2016). Elas também apresentam resposta magnética mais forte e mais rápida ao campo magnético externo (Wahadjuddin, 2012).

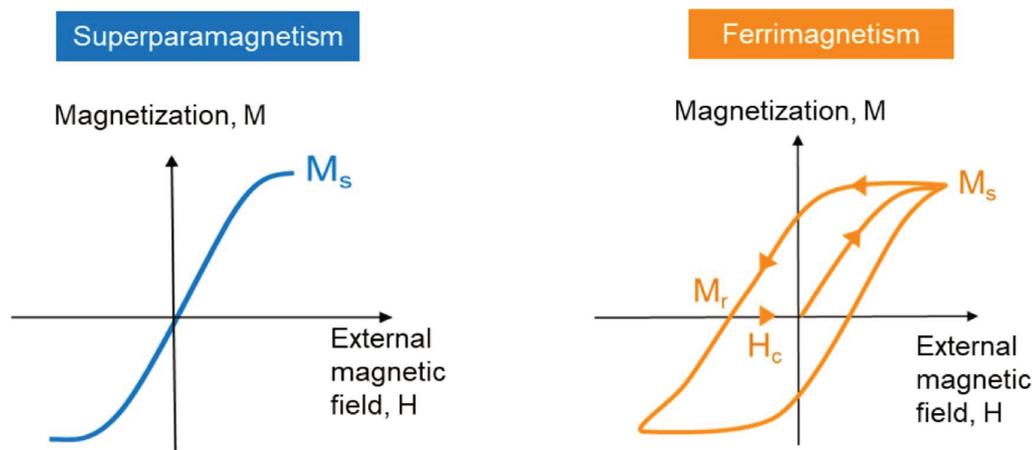


Figura 12. Diagrama esquemático das curvas de histerese para superparamagnetismo e ferrimagnetismo (extraído de Koo, *et al.*, 2019).

1.4.1 Síntese das nanopartículas magnéticas

A síntese de nanopartículas é uma das etapas mais desafiadoras do processo, pois determina o formato, tamanho da partícula e a composição da superfície, definindo então suas propriedades magnéticas (Sjorgren, *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2016). A síntese de magnetita pode ser obtida por três diferentes rotas: química, física e biológica. Um resumo das principais rotas químicas pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação de diferentes métodos de síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (adaptado de Koo, *et al.*, 2019).

	Método		
	Co-precipitação	Síntese sol-gel	Decomposição térmica
Reação	Simples	Complicada	Complicada
Condições Reacionais	Atmosfera inerte	Ambiente	Atmosfera inerte
Temperatura /°C	25 - 70	25 - 80	100 - 350
Tempo	Horas	Horas - dias	Horas
Distribuição de tamanho	Relativamente estreita	Estreita	Muito estreita
Controle do formato	Não bom	Bom	Muito bom
Rendimento	Alto	Médio	Alto
Vantagens	Simples e eficiente	Possibilita a obtenção de materiais com estrutura predeterminada	Facilidade de controlar tamanho e formato das partículas
	Requer produtos químicos menos perigosos	Bom controle da microestrutura e da homogeneidade dos produtos da reação	Produção de partículas com alta cristalinidade
	Possibilidade de produção em escala industrial	Controle preciso de tamanho, formato, proporção e estrutura interna	
Desvantagens	Não adequado para a preparação de fase estequiométrica exata	Libera altas quantidades de álcool durante o processo de calcinação	Requer alta temperatura de reação
	Utilização de base forte	Requer tratamento posterior com alta temperatura e vácuo	Requer precursores organometálicos relativamente caros
	Ampla distribuição de tamanho	Ligação fraca, baixa resistência e alta permeabilidade	O produto é solúvel em solvente apolar

A rota química é normalmente preferida pela sua simplicidade, eficiência e reprodutibilidade (Ali, *et al.*, 2016). Dentre as rotas químicas o método da co-precipitação é o mais comum. Em geral, ele emprega uma solução alcalina, na qual os íons metálicos são precipitados em uma solução aquosa em atmosfera inerte em temperatura ambiente ou em alta temperatura (Chu & Hou, 2017). Existem dois métodos principais de coprecipitação. O primeiro método conta com a oxidação parcial de uma suspensão de hidróxido ferroso seguido então pela coprecipitação (Sugimoto & Matijevic, 1980). O outro método envolve o envelhecimento de uma mistura estequiométrica de hidróxidos ferroso e férrico numa razão 1:2 em solução aquosa, como descrito a seguir (Massart & Cabuil, 1987; Gorski & Scherer, 2010). Nessa

reação, pelo controle do pH e força iônica é possível controlar o tamanho das nanopartículas (Tartaj, *et al.*, 2003).



A concentração e tamanho das nanopartículas magnéticas nesse método é dependente do tipo de sais de ferro empregados (cloretos, nitratos e sulfatos), razão de íons férrico e ferroso, pH, temperatura e tempo da reação, força iônica do meio, velocidade de agitação e velocidade de adição da solução alcalina (Chu & Hou, 2017; Majidi, *et al.*, 2014). Além disso, é essencial que a reação aconteça em atmosfera inerte, o que protege as nanopartículas de Fe_3O_4 de sofrerem oxidação, como também reduz o tamanho das partículas (Laurent, *et al.*, 2008). A Tabela 3 resume os parâmetros do método de co-precipitação que controlam as etapas de nucleação e crescimento das Fe_3O_4 nanopartículas, e portanto, afetam as propriedades das partículas, como tamanho e magnetização (Mascolo, *et al.*, 2013; Mahdavi, *et al.*, 2013).

Tabela 3. Resumo dos parâmetros que influenciam o método de síntese de Fe_3O_4 por coprecipitação (adaptado de Koo, *et al.*, 2019)

Parâmetro	Base	Condições de reação		Condições de envelhecimento		pH	Tamanho das nanopartículas / nm	Observação	Referência	
		Velocidade de agitação / rpm	Temperatura / °C	Tempo	Temperatura / °C					
pH	NH ₄ OH	800	45	1 h	80	8	11,8	Menor partícula produzida em pH 11	(Mahdavi et al. 2013)	
						9	9			
						10	7,8			
	NaOH	500	r.t.	3 h	r.t.	10,3	11,5	menor tamanho de partícula com maior pH	(Mascolo et al. 2013)	
						11,9	11,2			
						12,1	11			
Temperatura reação	NaOH	600	25	30 min	25	12	7,5	maior tamanho de partícula com maior temperatura de reação	(Khan et al. 2011)	
				60	30 min	60	10,3			
				80	30 min	80	11,6			
	NH ₄ OH	800	25	1 h	85	11	-	menor tamanho de partícula com maior temperatura	(Mahdavi et al. 2013)	
				45	1 h	85	11			8,3
				85	1 h	85	11			13,2
Velocidade de agitação	NaOH	600	80	30 min	80	12	11,6	menor tamanho de partícula com maior velocidade de agitação	(Khan et al. 2011)	
				1100	30 min	80	12			8
				NH ₄ OH	400	45	1 h			80
	600	1 h	80				11	8,3		
	800	1 h	80				11	7,8		
	Tipo de base	NaOH	-	r.t.	2 h	r.t.	11	8,6	Alcanolaminas são melhores no controle do tamanho de partícula	Pereira et al. 2012)
MIPA		-	r.t.	2 h	r.t.	11	6,3			
DIPA		-	r.t.	2 h	r.t.	11	4,9			
Abreviações	r.t.: temperatura ambiente, MIPA: isopropanolamina, DIPA: diisopropanolamina									

1.4.2 Caracterização das nanopartículas magnéticas

Para uma melhor compreensão das propriedades das nanopartículas, diversas técnicas de caracterização são empregadas para estudar morfologia, tamanhos e distribuição de tamanho das nanopartículas, composição e propriedades magnéticas.

A Tabela 4 resume as vantagens e limitações das técnicas de caracterização geralmente aplicadas às nanopartículas magnéticas.

Tabela 4. Técnicas de caracterização das propriedades físico-químicas das nanopartículas de Fe_3O_4 (adaptado de Koo, *et al.*, 2019)

Técnica	Propriedades físicas e químicas analisadas	Vantagens	Limitações	Referências
FTIR	Ligação química e grupos funcionais	Medida rápida e barata Adequado para amostras de gás, líquido, sólido e filmes finos	Sensibilidade baixa para análises em nanoescala	(Barrios et al. 2012; Gaffney et al. 2002)
EDX	Elementos químicos, proporção química estimada e mapeamento global	Um espectro elementar completo pode ser obtido rapidamente Pode ser usado em modo semi-quantitativo para determinar composição química Pode ser empregado junto à outras técnicas como SEM e TEM	Não consegue detectar elementos mais leves Menos usado para análise química Longo tempo de análise	(Joshi et al. 2008)
XRD	Formato, tamanho e estrutura	Modalidades bem organizadas Alta resolução espacial em nível atômico	Somente para materiais cristalinos Somente uma ligação ou conformação é analisada Menor acessibilidade comparado a difração eletrônica	(Felici, 2002; Sharma et al. 2012)
SEM	Formato, tamanho e dispersão	Imagem obtida por SEM mostra a estrutura da superfície da amostra	Requer amostra condutora ou recobrimento desta com material condutor Somente para amostras secas	(Cornell & Schwertmann 2000; Leonard et al. 2012)
TEM	Formato, tamanho e dispersão	Maior resolução espacial que SEM Medida direta de tamanho e formato de nanopartículas Imagem de TEM mostra a estrutura interna da amostra	Amostra ultrafinas são necessárias Amostras requeridas em estado não fisiológico Equipamento caro	(Cornell & Schwertmann 2000; Hurley et al. 2015; Leonard et al. 2012)
DLS	Tamanho, distribuição de tamanho e aglomeração baseada na hidrodinâmica	Forma construtiva para medida rápida e consistente Gastos moderados com equipamento	Determinação restrita de tamanho Incapaz de distinguir entre nanopartículas com pequenas diferenças em diâmetro Incapaz de resolver precisamente amostras polidispersas	(Ali et al. 2016; Fissan et al. 2014)
VSM	Propriedades magnéticas	Alta sensibilidade Completamente automatizado Adequado para amostras líquidas ou sólidas, pós, nanopartículas e filmes finos	Requer correção para desmagnetização do campo Adequado para pequenas amostras	(Grossinger, 2008)
SQUID	Propriedades magnéticas	Alta sensibilidade Equipamento mais sensível em análise de propriedades magnéticas Adequado para amostras com fracas propriedades magnéticas Aplicável em faixa de temperatura de até 400 K	Sensível ao ruído Complexo manuseio Laborioso	(Grossinger, 2008; Hurley et al. 2015)

1.5 Estado da arte

Nanopartículas de magnetita tem sido amplamente utilizadas em diferentes aplicações tecnológicas devido à suas propriedades magnéticas únicas que as conferem facilidade nas etapas de separação (Cao, *et al.*, 2012). Dentre elas destacam-se o uso em ressonância magnética de imagem, na forma de ferrofluidos para autofalantes, gravação magnética de media, entrega de drogas direcionada por um ímã e em tratamento de água (Laurent, *et al.*, 2008). Algumas aplicações de nanopartículas magnéticas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Descrição das principais aplicações de nanopartículas magnéticas em diferentes áreas (adaptado de Ali, *et al.*, 2016).

Área	Aplicações	Referências
Biomédica	Entrega controlada de fármacos, tratamento de câncer (hipotermia magnética), contraste para ressonância magnética de imagem, separação magnética, terapia celular, reparo de tecido, separação e manuseio de células, purificação de células	Gupta <i>et al.</i> , 2005, Soenen <i>et al.</i> , 2009, Soenen <i>et al.</i> , 2011, Estelrich <i>et al.</i> , 2015
Saúde	Quimioterapia, biosensores, implantes, carregadores para vacinas e fármacos, antimicrobianos	Gupta <i>et al.</i> , 2005, Auffan <i>et al.</i> , 2009, Soenen <i>et al.</i> , 2010, Mohapatra <i>et al.</i> , 2010, Nel, <i>et al.</i> , 2009
Agricultura e indústria alimentícia	Nanofertilizantes, nanofungicidas, nanopesticidas, tratamento das sementes, transferência de genes, nanosensores, nanorecobrimento, embalagem de alimentos	Siddiqui <i>et al.</i> , 2013, Srivastava, 2014, Aslani <i>et al.</i> , 2014, Servin <i>et al.</i> , 2015
Remediação ambiental	Prevenção da poluição (detecção, monitoramento e remediação), tratamento de água e esgoto, mudanças climáticas (captura de carbono), membranas	Auffan <i>et al.</i> , 2009, Xu <i>et al.</i> , 2012, Mahmoudi <i>et al.</i> , 2011, Zhang, 2003, Bystrzejewska-Piotrowska <i>et al.</i> , 2009
Energia	Filmes fotovoltaicos, melhoria na produção e consumo de combustíveis, baterias, materiais termoelétricos, painéis solares	Laurent <i>et al.</i> , 2008, Zhang <i>et al.</i> , 2009, Wang <i>et al.</i> , 2010

O uso de nanopartículas de magnetita na captura de espécies químicas em solução tem se destacado em sistemas de tratamento de água. Yantasee *et al.* (2007)

utilizou Fe_3O_4 recoberto com ácido dimercaptosuccínico (DMSA) para a remoção de metais, como Hg(II), Ag(I), Pb(II), Cd(II), e Tl(I), os íons metálicos se ligaram ao DMSA na superfície das NP e com a ajuda de um imã de 1,2 T puderam ser separados da solução. Singh *et al.* (2011) utilizou nanopartículas de magnetita recobertas com etilenodiamina, ácido succínico ou ácido 2,3-dimercaptosuccínico para a remoção de metais tóxicos (Cr(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II), Pb(II) e As(III)) e de bactérias patogênicas (*Escherichia coli*) da água.

Na indústria alimentícia, o emprego dessas nanopartículas se destaca principalmente na purificação de proteínas, imobilização de enzimas e análise de alimentos. Por exemplo, na purificação de proteínas, a separação magnética oferece inúmeras vantagens quando comparada aos métodos tradicionais (cromatografia, ultrafiltração, diálise e precipitação), como ser escalonável, requerer menos tempo, ser facilmente automatizável e a possibilidade de uso direto no extrato bruto (Cao, *et al.*, 2012). Na Figura 13 está representado o processo em que se baseia a separação magnética de proteínas. As nanopartículas magnéticas contendo um ligante seletivo para a proteína de interesse são adicionadas ao extrato bruto de proteínas. Nesta etapa ocorre a formação do complexo entre a enzima e o ligante. Com a ajuda de um campo magnético, a nanopartícula com a enzima é removida do extrato e através de etapas de lavagem a proteína purificada pode ser obtida e a nanopartícula recuperada. Esse método se baseia na afinidade entre o ligante imobilizado na superfície das nanopartículas e a proteína alvo. Os métodos de eluição geralmente consistem em mudanças na força iônica do meio ou do pH (Cao, *et al.*, 2012).

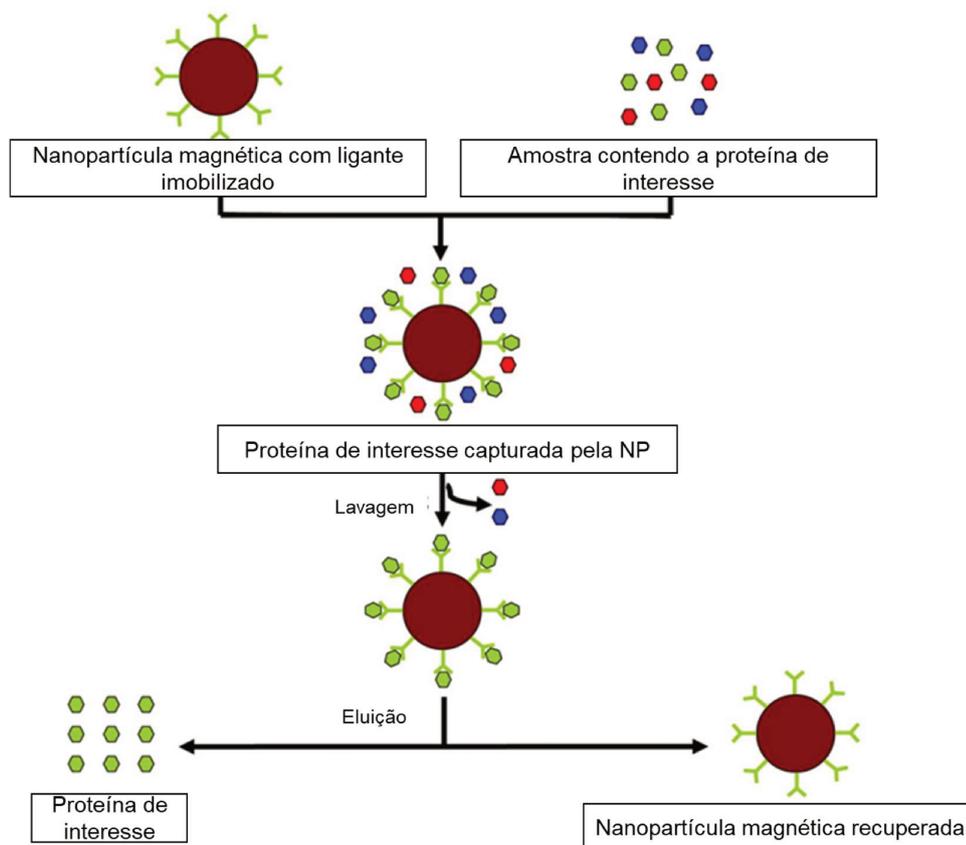


Figura 13. Esquema do uso de nanopartículas magnéticas na separação de enzimas (adaptado de Cao, *et al.*, 2012).

A tecnologia desenvolvida nesse projeto se baseia no uso de nanopartículas magnéticas capazes de reconhecer a molécula de sacarose em uma solução complexa, devido ao emprego de uma enzima, invertase. A interação entre a invertase e a sacarose foi realizada em pH 3, uma vez que nesse pH a invertase ainda se encontra em sua estrutura nativa, porém a catálise não ocorre, já que ambos os resíduos catalíticos (ácidos glutâmico e aspártico) se apresentam em sua forma protonada ($\text{pH} < \text{pK}_a$). Além disso, esse é o pH natural do suco de laranja, sistema no qual se baseou o desenvolvimento do projeto. Após a interação enzima-substrato (invertase-sacarose), o complexo é recuperado com a ajuda de um ímã. A recuperação da sacarose é realizada na forma de açúcar invertido, um material de maior valor agregado e que pode ser comercializado para a indústria de alimentos.

A importância de se utilizar uma nanopartícula magnética em vez de uma coluna contendo a enzima imobilizada em sua fase estacionária, se deve a características do sistema escolhido, o suco de laranja, uma mistura complexa com diversas partículas em suspensão, como as fibras e os próprios gomos da laranja. No sistema proposto, o nanomaterial ficaria em suspensão no suco, e somente sob a ação de um ímã, pode ser decantado e removido.

Pensando em sua aplicação na indústria alimentícia, foi importante desenvolver um material adequado à essa aplicação. O nanomaterial proposto é baseado em uma partícula com núcleo de magnetita, um óxido de ferro, e um recobrimento de sílica. Ambos são considerados não tóxicos. Além disso, caso parte do nanomaterial seja encontrado no produto final, ele poderia ser considerado como um incremento no teor de ferro do alimento.

2 OBJETIVOS

O projeto visou reduzir o teor de sacarose de soluções aquosas. Para isto foi proposto o desenvolvimento de um nanomaterial sob medida, para captura e remoção da sacarose em soluções ácidas. Os objetivos específicos foram:

- Síntese de nanopartículas magnéticas (NPM) de Fe_3O_4 e envolvimento destas nanopartículas com um material inerte e estável em pH ácido e não tóxico, como a sílica.
- Extração, purificação e caracterização da invertase de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) a fim de estudar o comportamento da invertase e a viabilidade de sua imobilização em nanopartículas magnéticas.
- Modificação do sítio ativo da invertase visando a inativação de sua atividade catalítica.
- Imobilização da invertase na superfície das NPM. Estudo da captura e remoção da sacarose de soluções aquosas. Estudo da liberação da sacarose e reuso das NPM.

3 METODOLOGIA

3.1 Síntese das nanopartículas magnéticas (NPM)

A síntese das NPM foi adaptada da reportada por Mascolo e colaboradores (2013) e executada no laboratório de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Regina Buffon. Aproximadamente 250 mL de água MilliQ foram postos sob refluxo em atmosfera de argônio durante 4 h e, em seguida, a solução foi deixada em repouso até atingir temperatura ambiente, também, sob fluxo de argônio. À um schlenk previamente desoxigenado por 3 ciclos de vácuo e argônio adicionou-se, 0,02 mol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5,4 g | MM = 270,30 g mol⁻¹) e 100 mL da água refluxada anteriormente. Com agitação vigorosa aguardou-se a completa dissolução do sal. Posteriormente adicionou-se 0,01 mol de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,92 g | MM = 392,14 g mol⁻¹), mantendo-se o sistema fechado e sob fluxo de argônio.

Em outro schlenk antecipadamente desoxigenado, colocou-se 0,08 mol de NaOH (3,2 g | MM = 40 g mol⁻¹) e 100 mL de água refluxada. Com o auxílio de uma cânula, transferiu-se esta solução ao funil de adição acoplado ao schlenk contendo os sais de Fe(II) e Fe(III), em banho de água à 25 °C. A solução de NaOH foi gotejada vagarosamente na solução de ferro, cerca de 1 mL min⁻¹, sob agitação vigorosa. Observou-se a mudança de coloração da solução de alaranjado para preto devido a formação de magnetita. A agitação foi continuada por 3 h à 25 °C. Após esse período, deixou-se a magnetita decantar, removeu-se o sobrenadante com uma seringa e mediu-se o pH da solução. O pH 11,0 obtido logo após a adição da solução de NaOH atinge aproximadamente 7,0 ao final da reação. As nanopartículas foram, então, lavadas 3-4 vezes com a água MilliQ refluxada, ainda sob o fluxo de argônio. Foram secas sob vácuo e mantidas em dessecador evacuado até a próxima etapa.

3.2 Recobrimento das NPM com tetraetil ortosilicato (TEOS)

O recobrimento foi realizado de acordo com o proposto por Khatiria e colaboradores (2012). 1 g de Fe_3O_4 foi adicionado a um schlenk previamente desoxigenado. Com uma seringa, 20 mL de água refluxada sob argônio (4 h) e 80 mL de etanol desoxigenado anteriormente com argônio (30 min) foram adicionados à

magnetita. A suspensão foi dispersa com auxílio de banho de ultrassom por 30 min. Adicionou-se solução contendo 2 g tetraetil ortosilicato (TEOS), 50 mL de etanol e 6 mL de amônia (NH_3 , 25% v/v). Manteve-se agitação vigorosa em banho de água à 25 °C por 4 h. Após esse período, o sólido foi decantado, o sobrenadante removido, e as $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ foram lavadas com água MilliQ 3-4 vezes, 2 vezes com etanol e secas sob vácuo à temperatura ambiente.

3.3 Modificação da superfície das NPM com (3-aminopropil)trioxisilano (APTES)

A funcionalização da superfície foi adaptada de Khatiria e colaboradores (2012). 150 mg das $\text{NPM}@\text{SiO}_2$ foram suspensas em 30 mL de água deionizada contendo 0,6 mL de APTES. A suspensão foi mantida a 70 °C por 16 h sob agitação vigorosa. O sobrenadante foi descartado e as $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ foram lavadas com água MilliQ 3 vezes, 2 vezes com etanol e secas sob vácuo.

3.4 Caracterização das NPM

3.4.1 Tamanho

Uma suspensão de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de NPM em água MilliQ foi empregada para estimar o tamanho destas por duas técnicas distintas. Por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) utilizando o NanoSight LM 10 e o programa Nanoparticle Analysis System & NTA 1.5 Analytical Software determinou-se o tamanho das partículas de acordo com a sua velocidade na solução. Utilizando *Dynamic Light Scattering* (DLS) com o equipamento Zetasizer Nano ZS Malvern determinou-se o perfil da distribuição de tamanho de partículas em solução baseando-se no espalhamento da luz. As medições foram feitas em triplicata com 15 corridas cada à 25 °C, utilizando-se cubeta DST1070.

3.4.2 Potencial Zeta

Utilizando novamente o Zetasizer Nano ZS Malvern o potencial zeta das partículas foi determinado em cada etapa em uma suspensão de 0,01 mg mL⁻¹ de água MilliQ. As medições foram feitas em triplicata com 15 corridas cada à 25 °C, utilizando-se cubeta DST1070.

3.4.3 Espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR)

Utilizou-se o Espectrômetro Agilent Cary 630 com acessório de refletância total atenuada (ATR) para obter os espectros de ATR-FTIR das amostras de NPM em cada etapa experimental. As amostras sólidas foram depositadas diretamente no cristal. Os espectros foram obtidos de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ e 64 *scans*.

3.4.4 Difractometria de raios X (XRD)

Amostras com cerca de 50 mg de pó foram analisadas utilizando o Difractômetro de Raios X Shimadzu XRD7000 operando com Cu-K α ($\lambda = 0,154060$ nm) em modo de escaneamento contínuo com passos de 0,02° e velocidade de 2° min⁻¹ no intervalo de 20 – 80°.

3.4.5 Composição elementar (CHN)

A composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras sólidas foi determinada pelo Analisador Elementar (CHN) Perkin Elmer CHN2400. Cada amostra foi analisada em duplicata.

3.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As imagens de TEM foram adquiridas em um microscópio eletrônico de transmissão da Carl Zeiss CEM-902 de 80 KeV, com as amostras (0,01 mg mL⁻¹) depositadas em um porta-amostra de cobre (copper grids-Ted Pella) recoberto com filme de parlódio. O tamanho das partículas foi obtido através de medição manual pelo programa Fiji (ImageJ).

3.4.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

A análise detalhada dos elementos químicos foi realizada usando espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS). Os experimentos XPS foram realizados no laboratório do CCS Nano (Centro de Componentes Semicondutores, Unicamp) em um sistema SPECS (SPECS GmbH) equipado com fonte de raios X XR-50 com radiação Al K α ($h\nu = 1486,6$ eV) e analisador de energia hemisférica Phoibos 100 com detector MCD-9. O anodo de raios X foi operado a 100 W e a alta voltagem foi mantida a 10,0 kV com o ângulo polar normal de amostra de 20°. A energia de passagem foi fixada em 20,0 eV para garantir sensibilidade suficiente. A pressão da base da câmara do analisador foi de cerca de 5×10^{-10} mbar.

3.4.8. Análise Termogravimétrica (TGA)

Análises termogravimétricas das amostras sólidas foram realizadas em um equipamento STD q600 (TA Instruments), utilizando rampa de temperatura de 10,0 °C por minuto no intervalo de temperatura ambiente a 800,0 °C em atmosfera de nitrogênio.

3.5 Extração da invertase de fermento biológico

Três diferentes amostras de 125 g de fermento biológico seco instantâneo foram utilizadas: Fleishmann (lote 04 04:51 | validade 01/05/15) e (lote 04 21:27 | validade 16/04/18) e Dr. Oetker (lote 02 | validade 05/18) para extração da invertase como descrito por Timerman (2012). Cada amostra de 125 g de fermento foi suspensa em 440 mL de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, 0,1 mol L⁻¹), dividida em recipientes com tampa e mantida em estufa a 35 °C por 16 h.

No dia seguinte, a suspensão foi centrifugada a 15000 rpm durante 30 min à 4 °C em centrífuga Allegra X-22R Centrifuge – Beckman Coulter. O sólido foi descartado e o sobrenadante seguiu para precipitação diferencial.

Primeiro, adicionou-se etanol até obter uma solução com 29% v/v etanol. Incubou-se no gelo por 15 min e centrifugou-se a 15000 rpm, 30 min, 4 °C. O sólido contendo os contaminantes foi descartado e o sobrenadante recebeu mais etanol até

atingir 40% v/v. Incubou-se na geladeira por 7 dias, centrifugou-se a 15000 rpm, 30 min, 4 °C descartando dessa vez o sobrenadante. O sólido contendo a invertase foi solubilizado em tampão fosfato de sódio (5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 5 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7,00) e mantido em geladeira até as etapas de purificação.

3.6 Purificação da invertase

A purificação da invertase foi feita em uma sequência de etapas baseadas nos trabalhos de Timerman (2012) e Rahman e colaboradores (2004).

3.6.1 Cromatografia de filtração em gel analítica

A solução da enzima em tampão fosfato de sódio foi clarificada por ultracentrifugação e depois filtrada em filtro de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm para remover qualquer particulado. Esta solução (aproximadamente 30 mL por vez) foi aplicada utilizando o SuperLoop em uma coluna Superdex 200 empacotada manualmente (16 x 250 mm) e operada via ÄKTA Purifier 10 - GE com programa Unicorn 5.2. A coluna foi equilibrada e a purificação foi feita utilizando o tampão fosfato de sódio (5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 5 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7,00) filtrado em membrana nitrocelulose (NC) de 0,22 µm e deaerado em banho de ultrassom por 30 min. O eluato foi coletado pelo Frac 920 em frações de 5 mL.

A corrida foi acompanhada pela absorvância do eluato a 280 nm. As frações que apresentaram absorvância nesse comprimento de onda foram avaliadas para a presença de invertase com base no teste de atividade descrito no item 3.8.3. As frações que continham invertase foram reunidas e armazenadas na geladeira até a próxima etapa de purificação.

3.6.2 Cromatografia de troca aniônica (DEAE Cellulose)

A invertase pré-purificada na Superdex 200 foi injetada em coluna de celulose modificada com DEAE (dietilaminoetil) empacotada manualmente (16 x 350 mm). Nessa coluna utilizou-se como fase móvel o tampão A (5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 5 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7,00) e um gradiente linear de NaCl promovido pelo tampão B (5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 5 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ e 500 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,00) que

foi progressivamente adicionado (0-100% de B) pelo ÄKTA Purifier. O eluato, coletado em frações de 5 mL, foi acompanhado pela absorbância em 280 nm e pela atividade (teste descrito na seção 3.8.3). Todas as frações ativas frente à sacarose foram reunidas em uma membrana de diálise Fisherbrand com *molecular weight cut-off* (MWCO) de 6000-8000 Da. Essas frações foram dialisadas contra o tampão A em 3 etapas 1:15 (v/v) de 4 h cada e 2 etapas 1:50 (v/v) de 16 h todas em temperatura ambiente com agitação suave.

3.6.3 Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose)

As frações dialisadas foram, então, aplicadas em coluna de agarose modificada com grupos carboximetil (CM). Empregou-se novamente como fase móvel o tampão A (5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 5 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄, pH 7) e o tampão B (5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 5 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ e 500 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7) que foi gradualmente adicionado pelo ÄKTA Purifier. As frações de 5 mL eluídas foram novamente acompanhadas pela absorbância em 280 nm e pela atividade (teste descrito na seção 3.8.3). As frações ativas foram dialisadas conforme descrito anteriormente.

3.7 Liofilização das amostras

A invertase obtida após todas as etapas de purificação apresentou baixa concentração para sua caracterização biofísica. A solução contendo invertase foi dividida em porções de 20 mL em tubos falcon de 50 mL, que foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas até secagem completa em Liofilizador Liotop K202.

Posteriormente, foram suspensas em água MilliQ e dialisadas contra tampão acetato de sódio 40 mmol L⁻¹ pH 4,8, para serem caracterizadas.

3.8 Caracterização da invertase

3.8.1 Eletroforese em gel (SDS-PAGE)

As amostras de cada etapa da purificação foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 12% utilizando o MiniVE Vertical Electrophoresis System – GE. 20 μL de cada amostra recebeu 20 μL de tampão de amostra (25% Tris-HCl pH 6,8, 30% glicerol, 20% de solução de SDS 20%, 20% solução de azul de bromofenol 0,1%, 4% β -mercaptoetanol, H_2O q.s.p. 100%) e foi fervida em banho seco à 95 °C por 5 min. As amostras foram aplicadas no gel e o contato elétrico foi formado pelo tampão de corrida (25 mmol L^{-1} Tris 192 mmol L^{-1} glicina e 0,1% SDS, pH 8,3). Aplicou-se diferença de potencial de 180 V. Após a corrida, o gel foi incubado em solução fixadora (50% etanol, 10% ácido acético, 40% água) por 30 s em micro-ondas com potência média, posteriormente, 30 s no micro-ondas com solução para coloração (125 mg de azul de Comassie R-250, 15 mL de etanol, 5 mL de ácido acético, água q.s.p. 50 mL) e descorado com solução descorante (50% etanol, 50% ácido acético) em mesa agitadora até as bandas de proteínas ficarem nítidas.

3.8.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford como descrito na literatura (Bradford, 1976). Uma curva de calibração utilizando a albumina do soro bovino (BSA) com concentrações entre 2 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi construída. 800 μL de cada uma dessas soluções foi misturado com 200 μL do reagente de Bradford, aguardou-se 5 min e mediu-se a absorbância em 595 nm em espectrofotômetro (Femto Cirrus 80MB). Cada concentração foi medida em triplicata. As amostras de invertase foram medidas da mesma maneira, fazendo-se diluições quando necessário para que a absorbância estivesse dentro da curva analítica.

3.8.3 Teste de atividade da invertase

A atividade foi acompanhada utilizando-se o teste colorimétrico com ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzóico (DNS) (Miller, 1959). 25 μL da solução contendo a enzima foi incubada a 50 °C por 5 min em banho seco. Após esse período adicionou-se 200 μL de solução de sacarose 10 mmol L^{-1} e aguardou-se 5 min para ocorrência da reação. Acrescentou-se em seguida 300 μL da solução de DNS (0,2 mol L^{-1} NaOH, 23 mmol L^{-1} de ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzóico e 0,53 mol L^{-1} tartarato de sódio e potássio). Deixou-se a mistura por 5-7 min em banho-maria em ebulição para converter a frutose em glicose e reduzir o ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzóico (amarelo) ao ácido 3-amino-5-nitro-2-hidroxibenzóico (laranja escuro ou marrom). Acrescentou-se 2 mL de água destilada e mediu-se a absorvância em 540 nm.

3.8.4 Fluorescência

O espectro de fluorescência da solução de invertase 0,15 mg mL^{-1} em tampão acetato de sódio 40 mmol L^{-1} , pH 4,8 foi obtido em um Espectrofluorímetro (Perkin Elmer, modelo LS 55). Para obter os espectros de fluorescência em diferentes pHs um tampão fosfato de sódio – ácido cítrico 50 mmol L^{-1} com (pH 2,5 – 7,5) foi utilizado.

3.8.5 Polarimetria da invertase

Uma solução de sacarose de 20 mg mL^{-1} (610 μL) preparada em tampão acetato de sódio 40 mmol L^{-1} , pH 4,8 foi incubada com 100 μL de invertase 0,15 mg mL^{-1} . A rotação observada da luz polarizada foi acompanhada em um Polarímetro (Perkin Elmer, modelo 341) em intervalos de tempo de 30 s (0-10 min), 1 min (11-15 min), 2 min (15-25 min), 3 min (25-70 min) e 5 min (70-145 min).

3.8.6 Dicroísmo Circular

Para a obtenção do espectro de dicroísmo circular soluções de diferentes concentrações de invertase foram usadas, 0,15 mg mL⁻¹ em tampão acetato de sódio 40 mmol L⁻¹, pH 4,8 e 0,03 mg mL⁻¹ em tampão acetato de sódio 8 mmol L⁻¹, pH 4,8. As medidas foram realizadas em Espectropolarímetro (Jasco, modelo J720). A deconvolução dos espectros foi realizada pelo *software* K2D3 (Louis-Jeune, *et al.*, 2012).

3.9 Imobilização da invertase na superfície das NPM

A imobilização da invertase na superfície das NPM foi adaptada do procedimento descrito por Abraham, e colaboradores (2014). Brevemente, uma suspensão das NPM em água MilliQ foi sonicada por 1 h. Depois, adicionou-se solução de glutaraldeído até concentração final de 1 mol L⁻¹ e agitou-se em mesa agitadora por 1h. Após esse período, as NPM foram lavadas com água MilliQ três vezes e uma vez com o tampão acetato de sódio 40 mmol L⁻¹, pH 4,8. Em seguida foram suspensas em solução contendo a invertase no mesmo tampão e mantidas sob agitação por 2 h. Após esse período foram lavadas com tampão para remover enzima não ligada e armazenadas em tampão acetato de sódio na geladeira.

3.10 Teste de captura e remoção da sacarose

Uma alíquota de 200 µL das NPM com invertase ligada covalentemente (30 mg mL⁻¹) foram lavadas com tampão fosfato de sódio e ácido cítrico 50 mmol L⁻¹ pH 3,0 por 3 vezes com o auxílio de um ímã e mantidas em banho seco à 50°C por 5 min. 500 µL de uma solução de sacarose 0,01 mol L⁻¹ preparada em tampão fosfato de sódio e ácido cítrico 50 mmol L⁻¹ pH 3,0, também à 50°C, foram adicionados às NPM. Após 1 min, com auxílio de um ímã, o sobrenadante foi removido e armazenado em outro tubo, e 200 µL de tampão acetato de sódio 40 mmol L⁻¹ pH 4,8 foram adicionados às NPM, que foram mantidas por 5 min à 5°C. O sobrenadante foi removido e adicionado à 300 µL de solução de DNS, que foi posteriormente fervido, recebeu 2 mL de água MilliQ e teve absorbância medida à 540 nm para quantificar a sacarose

removida. As NPM foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato de sódio e ácido cítrico 50 mmol L⁻¹ pH 3,0 e o ciclo foi repetido utilizando-se a solução de sacarose previamente guardada. O processo de captura da sacarose está representado na Figura 14.

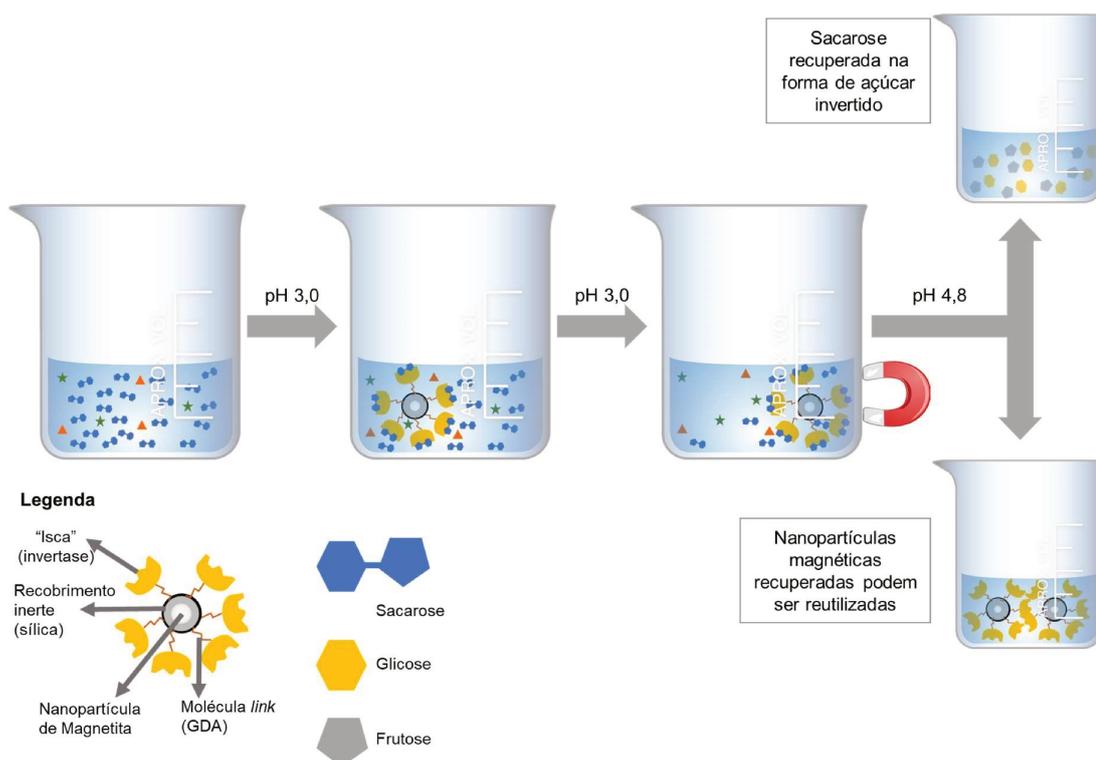


Figura 14. Representação do esquema de captura da sacarose em solução.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

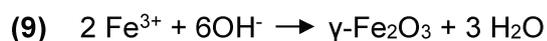
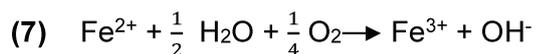
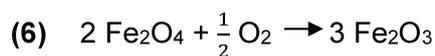
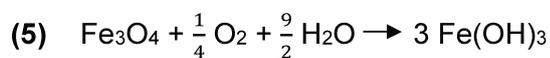
4.1 Síntese das nanopartículas magnéticas (NPM)

A síntese das NPM foi realizada em água utilizando o método de coprecipitação como exemplificado na reação (4). O produto obtido pode ser visto na Figura 15.



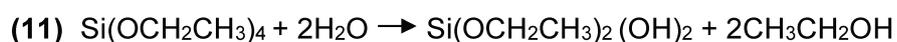
Figura 15. Fotografias do nanomaterial sintetizado na ausência e na presença de um ímã.

A magnetita, Fe_3O_4 , é sensível ao oxigênio, e na presença de ar sofre oxidação a $\text{Fe}(\text{OH})_3$ como demonstrado na reação (5) (Kim, *et al.*, 2001) ou a magnemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) como mostrado na reação (6). Além disso, o Fe^{2+} em solução pode ser oxidado a Fe^{3+} facilmente pelo O_2 dissolvido na água, reação (7), favorecendo a formação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, reações (8) e (9) (Yamaura, *et al.*, 2004).

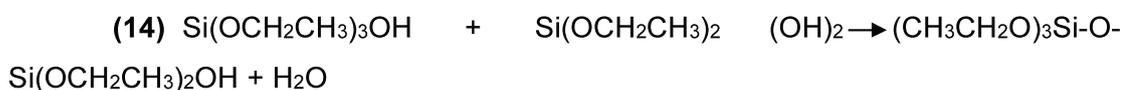
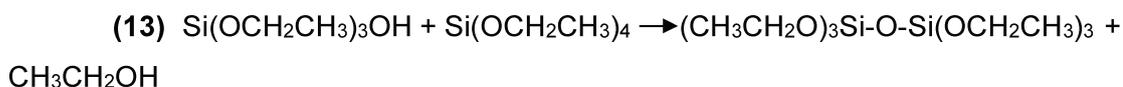
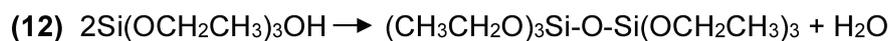


Logo, o manuseio adequado em atmosfera inerte dos reagentes ao produto recoberto se fez necessário. A formação da magnetita como descrito pela reação (4) era evidenciado pela formação de um sólido preto, denso e magnético.

O recobrimento da Fe_3O_4 foi feito pelo método de Stöber (Stöber & Fink, 1968), no qual tetraetilortosilicato (TEOS) é hidrolisado em solução alcoólica de metanol ou etanol, na presença de amônia como catalisador, reações (10) e (11).



A reação produz etanol e uma mistura de etoxisilanóis, como $\text{Si(OEt)}_3\text{OH}$, $\text{Si(OEt)}_2(\text{OH})_2$ ou até Si(OH)_4 , que podem condensar com TEOS ou outro silanol com perda de etanol ou água formando os grupos siloxano (Si-O-Si), reações (12), (13) e (14).



A hidrólise dos grupos etóxi e a condensação leva ao ligamento entrecruzado. O polímero formado se associa aos cristalitos de magnetita formando ligação covalente com grupos OH da superfície.

A funcionalização da superfície com APTES ocorre de maneira similar ao descrito anteriormente para TEOS. Brevemente, ocorre a hidrólise do APTES e a sua condensação formando o silano polimérico que, posteriormente, forma ligações covalentes com os grupos OH da superfície das $Fe_3O_4@SiO_2$ (Yamaura, *et al.*, 2004).

4.2 Caracterização das nanopartículas magnéticas (NPM)

Utilizando a velocidade das partículas em solução aquosa, estimou-se seu diâmetro por NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*). O tamanho também foi medido por DLS (*Dynamic Light Scattering*), como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Tamanho das NPM estimado por NTA, DLS e DRX e Potencial Zeta

Amostras	Diâmetro médio / nm		Tamanho cristalito / nm	Potencial Zeta / mV
	DLS	NTA	XRD	
Fe ₃ O ₄	642 ± 81	140 ± 89	18,9	+19.7 ± 0.3
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	642 ± 21	122 ± 58	21,8	-36.4 ± 0.7
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂	351 ± 7	264 ± 99	19,8	+26 ± 1
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ - NH ₂ -inv	340 ± 9	-	22,7	+28.7 ± 0.7

O NTA fornece um tamanho médio das partículas medido com base na medida da velocidade de cada partícula na solução, e, também indica a porcentagem de partículas que apresentam um tamanho menor do que o estipulado, por exemplo 100 nm. Para a magnetita recém-sintetizada observamos que 50% das partículas têm menos de 170 nm e 100% menos de 470 nm. Após 20 dias, o perfil observado foi de 50% menos de 130 nm e 100% menos de 450 nm, o que indica estabilidade das partículas mantidas em dessecador evacuado e sob argônio. Por DLS, encontramos o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas com base no espalhamento da luz, observando uma distribuição normal (Gaussiana). Notou-se, também, ao avaliar o tamanho das partículas que o recobrimento da superfície leva a uma maior estabilização destas prevenindo a sua aglomeração. Como visto na Figura 16, o nanomaterial consiste em uma combinação de esferas e bastões, o que justifica o valor elevado para o seu diâmetro encontrado pelo DLS.

O Potencial Zeta (ζ) é o potencial eletrocinético em dispersões coloidais. Pode ser entendido como o potencial elétrico na interface da dupla camada, ou seja, a diferença de potencial entre o meio e a camada de fluido ao redor da partícula (IUPAC, 2014). Quanto maior o módulo do potencial zeta, maior a estabilidade da dispersão, uma vez que a repulsão elétrica evita a coalescência. O potencial medido para as nanopartículas nas etapas de síntese e recobrimento está indicado na Tabela 5. Observamos que a mudança do revestimento muda o potencial zeta, auxiliando o acompanhamento das etapas de recobrimento. Nota-se também, que o módulo do

potencial zeta em todas as etapas indica uma estabilização das partículas por repulsão eletrostática.

A porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CNH) foi determinada por análise elementar a fim de auxiliar na identificação da eficiência das etapas de recobrimento. O resultado do CHN está indicado na Tabela 7.

Tabela 7. Análise elementar das amostras de NPM antes e após cada etapa de recobrimento

Amostra	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
Fe ₃ O ₄	0,27	0,53	0,09
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	0,26	0,87	0,25
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂	1,46	0,98	0,51

Embora as porcentagens de C, H e N observadas sejam muito pequenas, observa-se que a porcentagem em massa desses elementos aumenta com as etapas de recobrimento. Para a magnetita (Fe₃O₄), acredita-se que a matéria orgânica encontrada se deva a contaminação pelo ambiente, uma vez que todas as amostras foram analisadas no mesmo dia, e as de magnetita ficaram mais tempo expostas. O baixo teor de matéria orgânica se justifica pela característica da amostra, ou seja, um núcleo de magnetita apenas recoberto com uma fina camada orgânica.

Nas caracterizações mostradas a seguir, uma amostra com a enzima imobilizada é incluída para avaliar se a imobilização da invertase alterou de alguma maneira as propriedades das nanopartículas.

Para observar o tamanho e morfologia das partículas utilizou-se TEM como mostrado na Figura 16.

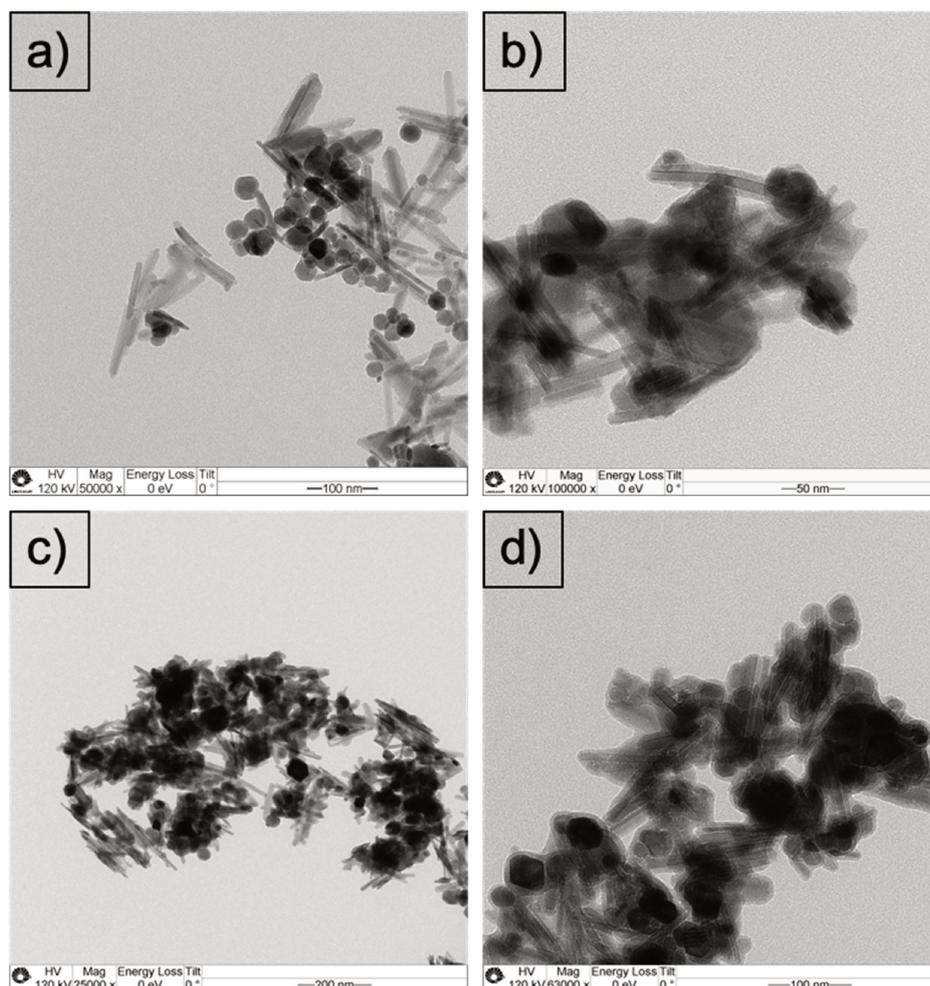


Figura 16. Micrografias de TEM das amostras do nanomaterial: (a) Fe₃O₄, (b) Fe₃O₄@SiO₂, (c) Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ e (d) Fe₃O₄@SiO₂-NH₂-Inv.

Nas imagens obtidas, foi visto que o nanomaterial obtido consiste em uma população mista de partículas em formato de esferas e bastões. O tamanho das partículas foi estimado utilizando o software Fiji (ImageJ), indicando a presença de bastões com 88 ± 22 nm de comprimento e 14 ± 4 nm de largura e esferas com diâmetro ao redor de 27 ± 6 nm. A funcionalização resultou na deposição de uma camada de aproximadamente 6 ± 2 nm ao redor do nanomaterial.

A estrutura cristalina das partículas magnéticas foi determinada por Difração de raios X, como ilustrado na Figura 17.

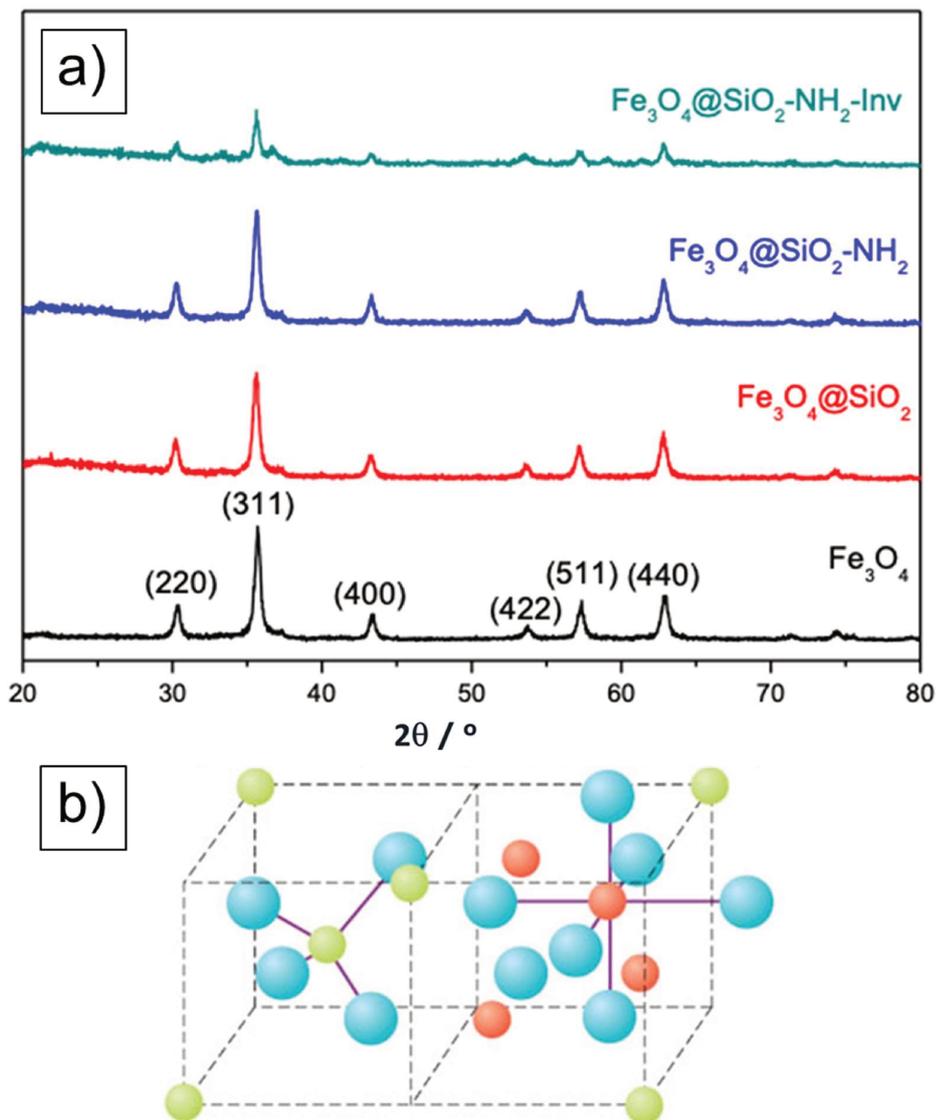


Figura 17. a) Difractogramas de raios X de pó dos nanomateriais sintetizados: Fe_3O_4 (preto), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (vermelho), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (azul) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Inv}$ (verde). **b)** Representação da estrutura de espinélio invertido.

A magnetita ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$) é conhecida por cristalizar com a estrutura cúbica do espinélio invertido, no qual os átomos de oxigênio formam a estrutura cúbica de face centrada e o ferro ocupa as posições intersticiais, com sítios tetraédricos ocupados somente por íons Fe^{3+} e os sítios octaédricos ocupados por Fe^{2+} e Fe^{3+} em temperaturas superiores a 120 K (Jeng & Guo, 2002; Cornell & Schwertmann, 2004). A atribuição dos planos foi feita comparando-se com o descrito na literatura (Iyengar, *et al.*, 2014). De acordo com Yamaura *et al.* (2004) a ausência de picos em $21,22^\circ$ e

33,15° indica que goetita e hematita não se formaram, além disso, o pico referente à $\text{Fe}(\text{OH})_3$ em 26,38° também está ausente. Isso demonstra que a magnetita foi formada com êxito. Nota-se também que as etapas de recobrimento das NPM não interferem em sua estrutura cristalina. Quanto às suas propriedades magnéticas, a magnetita é um exemplo conhecido de material magnético, no qual os íons têm dipolos magnéticos de diferentes intensidades, levando a existência de um momento magnético resultante (Cornell & Schwertmann, 2004).

O tamanho dos cristalitos, pode ser calculado com os resultados do DRX (Tabela 5), utilizando a Equação de Debye-Scherrer, como descrito na equação 15 (Scherrer, 1918; Patterson, 1939).

$$(15) \quad D = \frac{K\lambda}{B \cos \theta}$$

onde λ é o comprimento de onda do raio X (0,15406 nm), K é o parâmetro de forma, 0,9 para esferas, B é a largura a meia altura do pico. Para o cálculo, se utilizou o pico (311) de maior intensidade $2\theta = 35,62^\circ$ (Figura 15). Com isso, podemos ver que uma nanopartícula pode ser formada por vários cristalitos de aproximadamente 20 nm cada.

Os espectros de ATR-FTIR para as amostras de nanopartículas em todas as etapas da funcionalização são mostrados na Figura 18.

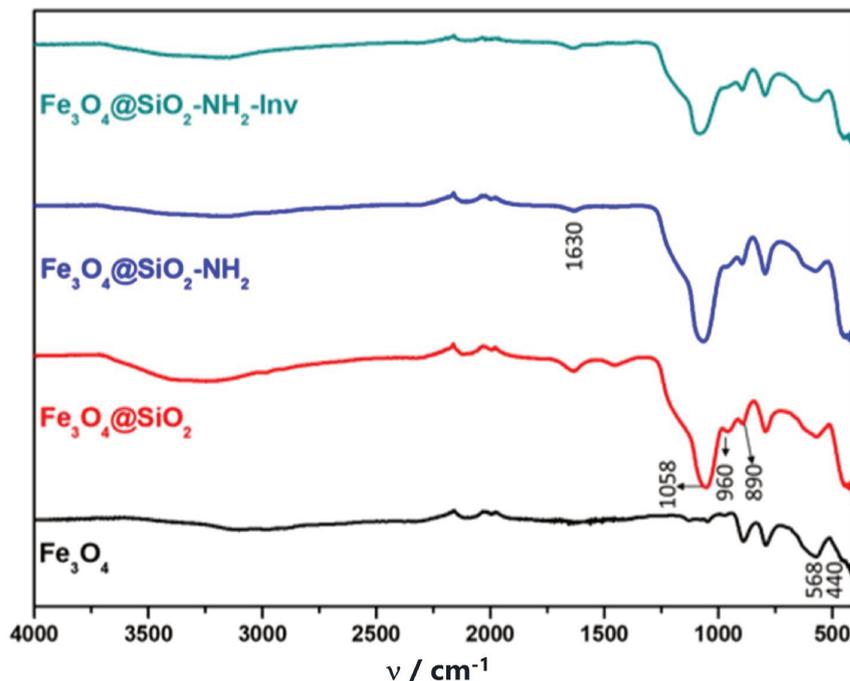


Figura 18. Espectros de ATR-FTIR das amostras sólidas do nanomaterial: Fe_3O_4 (preto), $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ (vermelho), $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$ (azul) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2-Inv$ (verde).

A banda em 568 cm^{-1} indica a ν_1 Fe-O e em 440 cm^{-1} observou-se a ν_2 confirmando a formação do Fe_3O_4 . A ligação Fe-O-Si foi observada em 584 cm^{-1} . As bandas em 1058 e 960 cm^{-1} correspondem aos grupos SiO-H e Si-O-Si, enquanto a banda em 890 cm^{-1} e a banda sobreposta em 920 cm^{-1} apontam para estiramentos Si-O-H. As bandas em 1630 e 3407 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento N-H e torção do NH_2 . Os silanóis com ligações de hidrogênio também apresentaram banda entre 3200 e 3470 cm^{-1} , motivo do alargamento da banda nessa região (Yamaura, *et al.*, 2004; Mazario, *et al.*, 2014).

Como o recobrimento é apenas uma pequena porção do material, cuja principal parte é o núcleo de magnetita, as bandas referentes ao recobrimento são difíceis de serem observadas.

Para avaliar novamente a funcionalização do nanomaterial com a invertase, obteve-se o espectro de XPS, como mostrado na Figura 19.

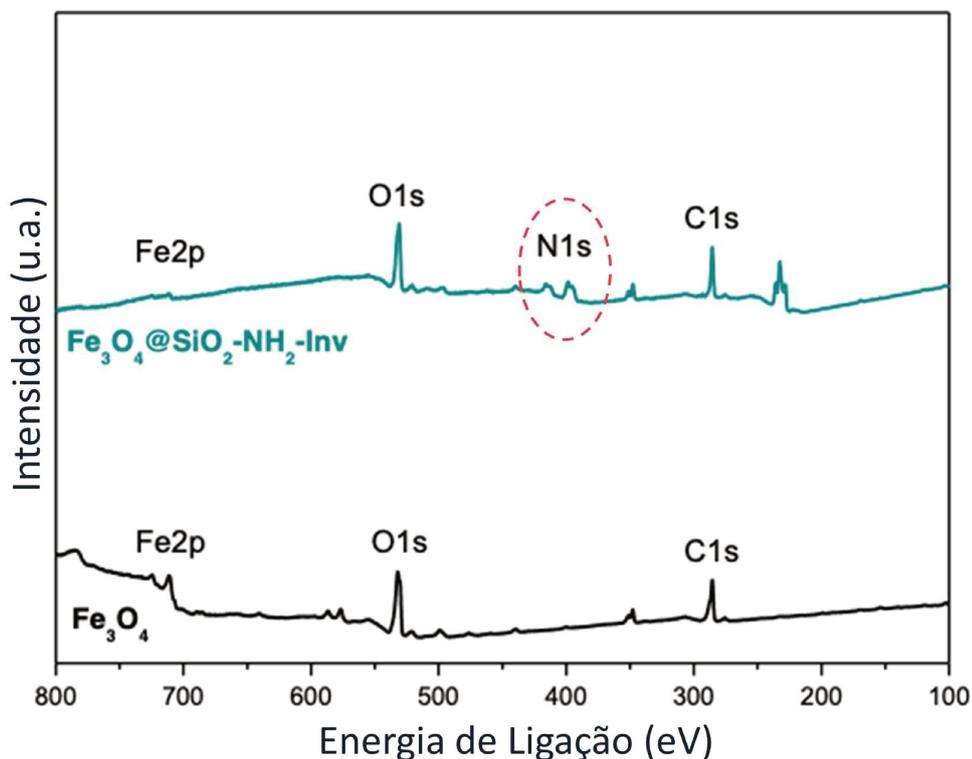


Figura 19. Espectro de XPS do nanomaterial sintetizado: Fe_3O_4 (preto) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Inv}$ (verde).

O Espectro de XPS obtido mostra a presença de sinais dos principais elementos, com picos correspondentes ao Fe2p (710 eV para o Fe(III) e 724 eV para Fe(II)) e O1s (529,7 eV) para Fe_3O_4 e N1s (399 eV, amida) para a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Inv}$. O pico de Fe2p aparece menor em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Inv}$ que em Fe_3O_4 , o que pode ter sido causado pelo efeito de blindagem da casca externa, composta por sílica e enzima, que envolve o caroço de magnetita. Também deve-se levar em conta que o XPS é uma técnica que avalia a superfície do material, corroborando o fato de se ver um menor sinal para o Fe2p na $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Inv}$. O sinal de C1s (285 eV) na magnetita é uma impureza comumente encontrada em análises de XPS e o mesmo é normalmente utilizado para calibrar as medidas.

A análise de TGA (Figura 20) foi realizada para confirmar a existência da camada externa e para permitir uma análise quantitativa da porcentagem em massa que corresponde à invertase imobilizada na superfície em relação a massa total de amostra.

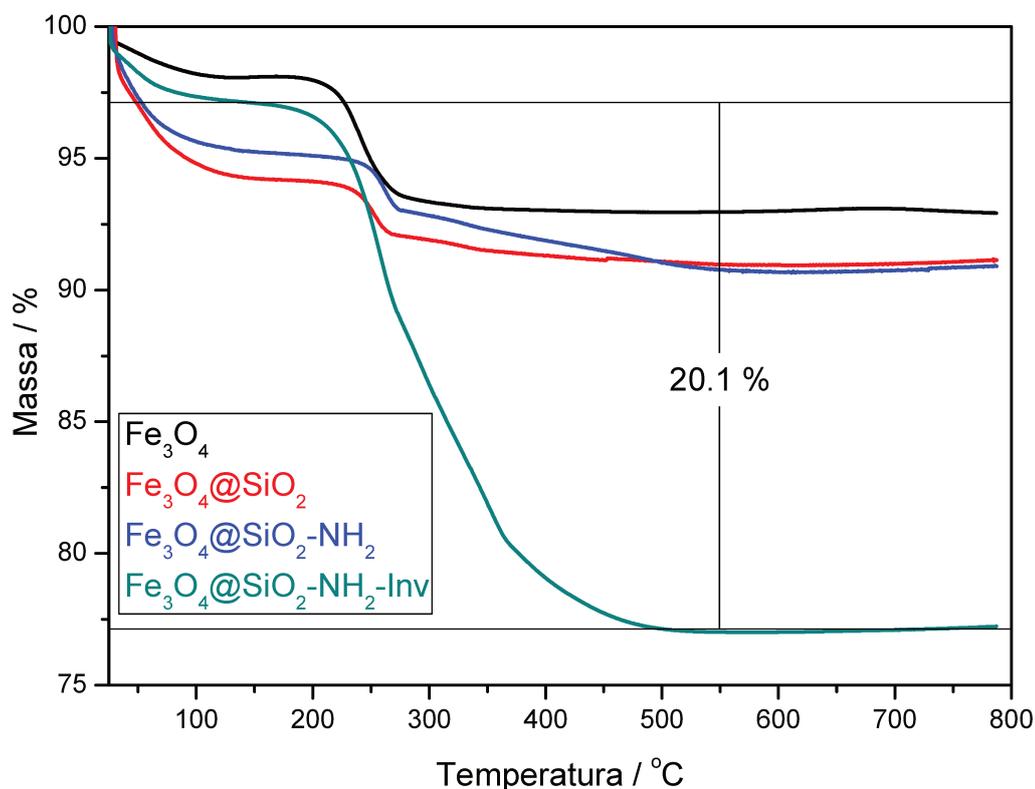


Figura 20. TGA das amostras sólidas do nanomaterial: Fe₃O₄ (preto), Fe₃O₄@SiO₂ (vermelho), Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ (azul) e Fe₃O₄@SiO₂-NH₂-Inv (verde).

Para a magnetita (Fe₃O₄) observamos uma perda de massa relativa à água adsorvida de aproximadamente 2% e outros 4,6% que podem ser atribuídos à matéria orgânica adsorvida, como visto pela presença da banda de C1s no espectro de XPS da Fe₃O₄ (Figura 17). Essa perda entre 200-270 °C, também pode estar associada à perda de resíduo de goetita, material formado durante a produção de bastões de magnetita. Após o recobrimento com sílica (Fe₃O₄@SiO₂) observamos uma perda associada à água adsorvida de 5,2% e 3% relativo à matéria orgânica. Para Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ um comportamento similar foi observado com 4,4% de perda relacionada à água adsorvida e 2,8% de matéria orgânica. Entretanto, após a imobilização da invertase observamos uma situação bem diferente, com 2,7% de perda de água e um total de 20,1% de diminuição da massa devido à decomposição da matéria orgânica. Considerando a matéria orgânica proveniente das etapas de funcionalização, podemos estimar que cerca de 15,1% da massa da amostra analisada (6,676 mg) consistia em invertase, ou seja 1,34 mg. Levando em conta a

massa molecular da invertase (58544 g mol^{-1}), temos $17 \times 10^{-9} \text{ mol}$ de invertase na amostra ou $2,6 \times 10^{-6} \text{ mol}$ de invertase por g de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-invertase}$.

4.3 Extração e purificação da invertase

A β -frutofuranosidase, ou invertase, em leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, é normalmente encontrada como uma glicoproteína extracelular localizada no espaço periplasmático, ou seja, o espaço entre a membrana plasmática e a parede celular da levedura. Sua principal função é clivar a sacarose fora da célula e permitir o transporte dos monossacarídeos para o citoplasma. A forma extracelular tem pH ótimo de 4,8 e temperatura ótima de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, com K_M de 5 mmol L^{-1} para a sacarose (Timerman, 2012). A enzima é observada como duas grandes subunidades glicosiladas de 135 kDa cada (Neumann & Lampen, 1967). As glicosilações são as principais modificações pós-traducionais de proteínas extracelulares, o que justifica o fato de aproximadamente 50% em massa da invertase periplasmática consistir em cadeias de oligossacarídeos (Lampen, 1971). De acordo com a estrutura depositada no *Protein Data Bank*, sob PDB ID 4EQV, a unidade biológica é constituída por 8 cadeias com 512 aminoácidos cada, 58544 Da e pI teórico de 4,58, obtidos pela ferramenta ProtParam (Gasteiger, 2005; Sainz-Polo, *et al.*, 2013). A extração da invertase pode ser realizada a partir de condições brandas que seletivamente rompem a parede celular, sem romper a membrana plasmática. As cadeias de oligossacarídeos podem prevenir a agregação ou precipitação da proteína e reduzir sua suscetibilidade ao ataque de proteases (Schulke & Schmid, 1988). Entretanto, o açúcar faz com que a proteína migre como uma mancha larga no gel de SDS-PAGE, e não como uma banda estreita. Além disso, a elevada concentração de açúcar reduz sua habilidade de se ligar ao *Comassie brilliant blue*, dificultando a observação da banda no gel e também nas quantificações por Bradford. Timerman (2012) relata que soluções 1 mg mL^{-1} da enzima pura comercial apresentam concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ quando comparada à proteína BSA.

4.3.4 Precipitação diferencial

A fonte escolhida foi o fermento biológico seco instantâneo de duas marcas Fleishmann e Dr. Oetker. Após 15 h à 35 °C em solução de NaHCO_3 0,1 mol L⁻¹, o extrato foi resfriado em gelo por 30 min e as impurezas sólidas foram removidas por centrifugação. O próximo passo consistia na precipitação seletiva da invertase em detrimento das outras proteínas presentes no extrato, o que poderia ser feito a partir de mudanças na camada de hidratação da proteína. Esse processo se deu com a adição de solvente orgânico, etanol, que diminui a polaridade da solução, visto que solventes orgânicos são agentes mais eficientes na precipitação de proteínas com resíduos polares e hidrofílicos na superfície. Como a invertase possui inúmeras cadeias de carboidratos em sua superfície, escolheu-se a precipitação em duas etapas com etanol como sugerido por Timerman (2012). Na primeira etapa ocorreu a precipitação de complexos lipídicos, detritos celulares e proteínas contaminantes. Na segunda etapa aconteceu a precipitação da invertase, ainda com algumas impurezas. O sólido contendo invertase foi solubilizado em um pequeno volume do tampão fosfato de sódio (5 mmol L⁻¹) utilizado nas próximas etapas de purificação.

4.3.5 Cromatografia de filtração em gel

A etapa subsequente de purificação consistiu na filtração em gel analítica, na qual as proteínas foram separadas com base em seu raio de Stokes. Um dos cromatogramas obtidos nessa etapa pode ser visto na Figura 21.

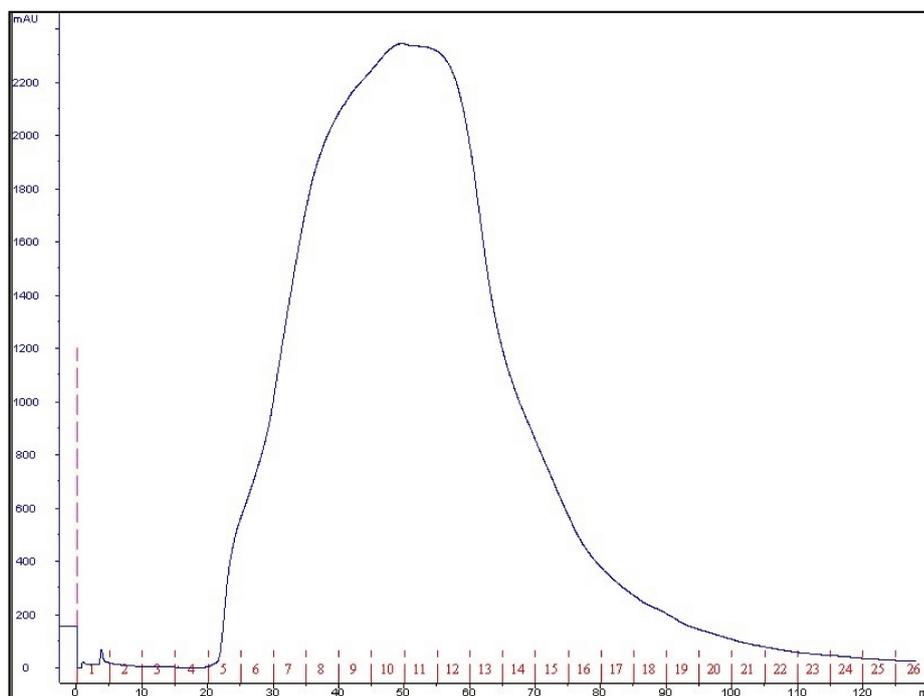


Figura 21. Cromatograma de Filtração em Gel da invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018) observando a absorção em 280 nm.

As frações 4 a 25 eluídas da Superdex 200 foram testadas quanto a sua atividade frente à sacarose. As frações 5 a 20 apresentaram atividade e foram reunidas em um frasco para a próxima etapa da purificação.

4.3.6 Teste de atividade da invertase

A presença da invertase nas frações coletadas foi avaliada pelo teste de atividade feito espectroscopicamente utilizando a detecção em 540 nm. Uma vez que a sacarose é um açúcar não redutor, sendo que os carbonos anoméricos fazem parte da ligação glicosídica, nada acontece nos tubos que não contém a invertase. Quando a enzima está presente, ela reduz a sacarose a uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose. Nas condições experimentais, a D-frutose isomeriza rapidamente para D-glicose, e assim, toda a D-glicose formada reduz o reagente colorido, como pode ser visto nas Figuras 22 e 23.

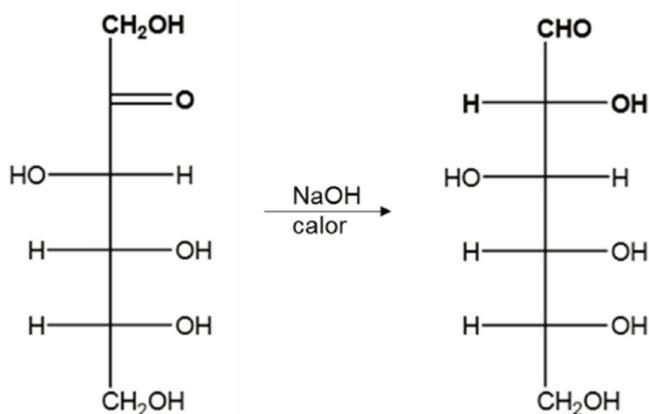


Figura 22. Isomerização catalisada por base da D-frutose (ceto-hexose não redutora) para D-glicose (aldohexose redutora) em projeção de Fisher.

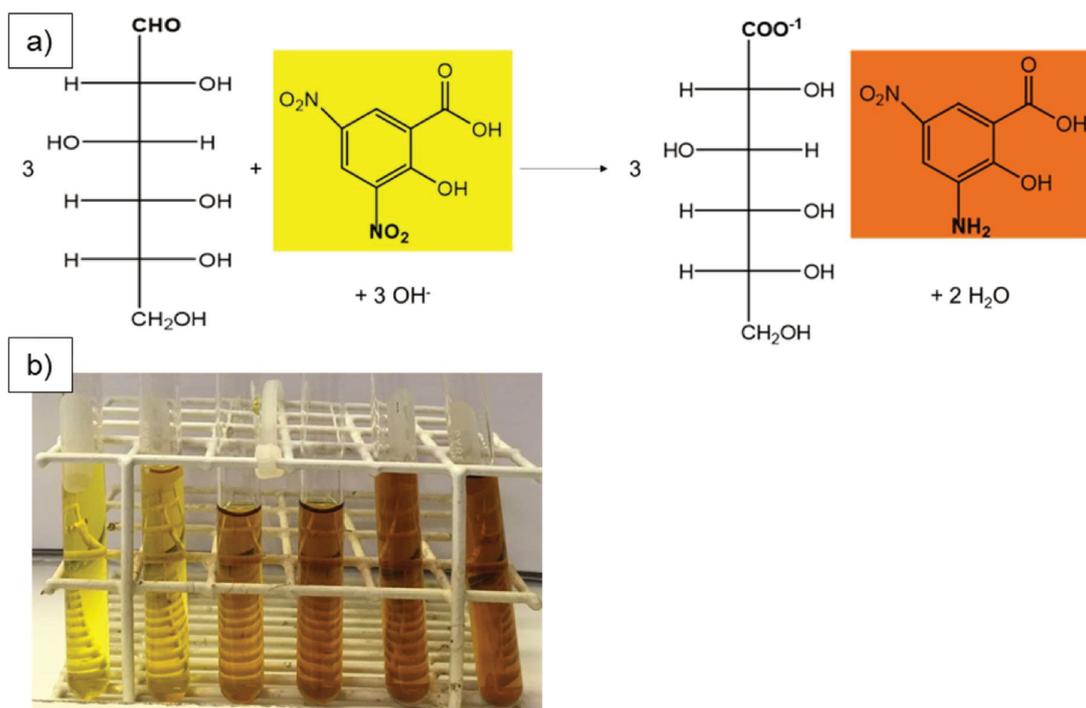


Figura 23. (a) Representação da reação redox entre a D-glicose e o ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico e (b) Fotografia de um teste de atividade de frações de purificação, sendo o primeiro tubo o branco (sem adição da enzima) e os demais tubos contendo amostras de diferentes frações.

4.3.7 Cromatografia de troca iônica

As próximas etapas de purificação, adaptadas de Rahman *et al.* (2004), consistiram em duas cromatografias de troca iônica, que podem ser divididas entre troca aniônica e troca catiônica. No caso da invertase, que possui 62 resíduos carregados negativamente (Asp e Glu) e 38 resíduos carregados positivamente (Arg e Lys) por cadeia, a proteína tem uma carga líquida negativa, ficando adsorvida via interações eletrostáticas, a uma fase estacionária carregada positivamente. Trocadores aniônicos comuns são matrizes de celulose conjugadas a uma amina quaternária, como a dietilaminoetil celulose (DEAE-cellulose), ao passo que trocadores catiônicos são formados pela imobilização de grupos negativamente carregados como carboxilatos à matrix, por exemplo a carboximetil-sepharose (CM-sepharose), na qual os grupos carboximetil estão ligados à agarose. A eluição da proteína nesses casos foi feita aumentando-se a concentração de sal, NaCl, na fase móvel. No caso da troca aniônica a concentração de sal foi aumentada até que os íons Cl^- deslocassem as proteínas, substituindo as interações eletrostáticas entre resina e proteína. Desse modo, as proteínas foram eluídas em ordem crescente de afinidade pela resina, o que é uma função da densidade de carga na superfície da proteína.

Quando se observa o cromatograma de troca aniônica, Figura 24(a), vê-se a presença de várias bandas de proteínas, sendo que apenas uma delas apresentou atividade frente à sacarose.

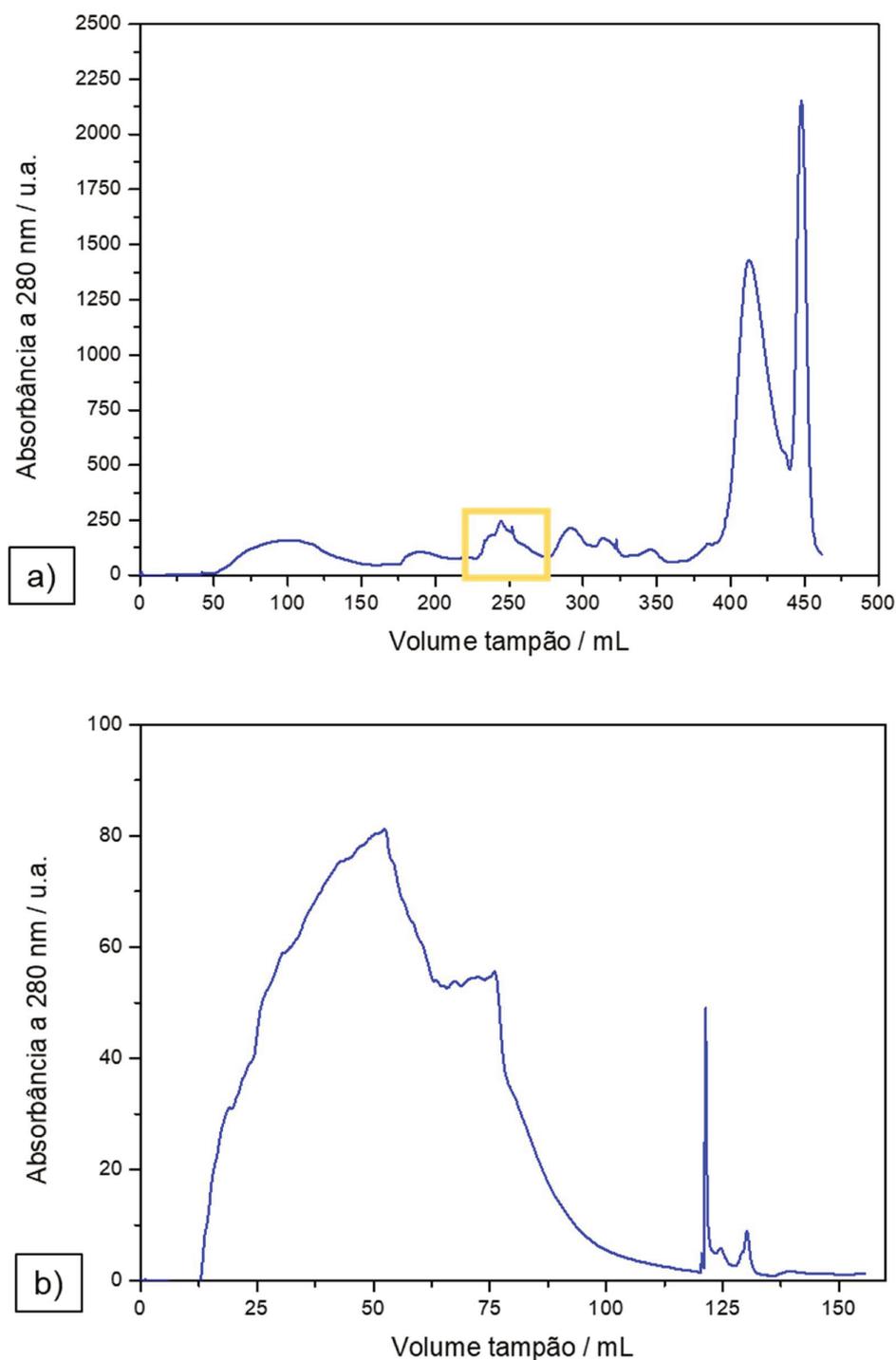


Figura 24. Cromatogramas de troca iônica da invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018) observando a absorção em 280 nm. a) Troca aniônica com matriz DEAE-celulose, as frações ativas estão assinaladas pelo quadro amarelo. b) Troca catiônica com matriz CM-sepharose, as frações ativas 4-19 correspondem à banda mais intensa.

Comparando-se os cromatogramas de filtração em gel e troca aniônica, observa-se que a intensidade de absorção em 280 nm diminuiu consideravelmente, e que neste último novas bandas de proteínas com cargas diferentes foram separadas. Novamente as frações ativas foram reunidas em um frasco e utilizadas na última etapa de purificação. Antes de ser novamente purificada, a proteína foi dialisada contra tampão fosfato de sódio (5 mmol L⁻¹) para remover o sal. Na cromatografia de troca catiônica (Figura 24(b)), a invertase negativamente carregada passou direto pela coluna, enquanto impurezas carregadas positivamente interagiram com a coluna e ficaram retidas.

4.3.8 Caracterização da invertase

Após a purificação, a concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford, levando em consideração que as cadeias glicosídicas interferem na habilidade da invertase de interagir com o Comassie, e que a concentração observada pode ser 10 vezes menor do que o real. Para estimar a concentração pelo método de Bradford construiu-se uma curva de calibração utilizando-se a albumina do soro bovino (BSA), a equação da reta obtida foi $C_{\text{proteína}} = \frac{\text{Abs} - (0,02 \pm 0,01)}{0,027 + 0,002}$, $R^2 = 0,994$. A amostra de invertase purificada foi diluída e teve sua absorbância medida pelo ensaio de Bradford, obtendo-se $151,3 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$. A eficiência das etapas de purificação da invertase foi avaliada por SDS-PAGE, Figura 25.

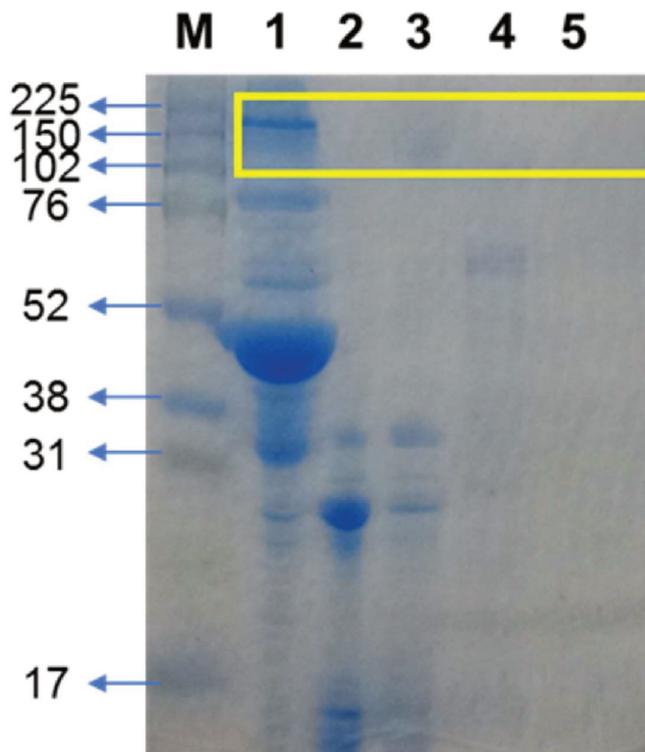


Figura 25. Gel SDS-PAGE da invertase nas diferentes etapas da purificação, onde M é o marcador de massa molecular Full-range Amersham Rainbow Marker – GE, 1 é a invertase extraída e resuspendida em tampão fosfato de sódio, 2 é o eluato da Superdex 200, 3 o eluato da DEAE-celulose e 4 e 5 os eluatos da CM-sepharose. A invertase deve ser vista como uma mancha entre 100 e 200 kDa.

A invertase não é bem corada pelo Comassie, mas podemos observar que as bandas de proteínas contaminantes foram reduzidas a cada etapa de purificação, até que todos os contaminantes fossem removidos e se obteve a invertase purificada.

A fluorescência intrínseca de proteínas, conferida pelos três resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), levando em conta que o triptofano é o fluoróforo intrínseco dominante, oferece a possibilidade de avaliação do nanoambiente que envolve estes resíduos na estrutura terciária e/ou quaternária da proteína (Lakowicz, 2006). O espectro de fluorescência obtido está representado na Figura 26.

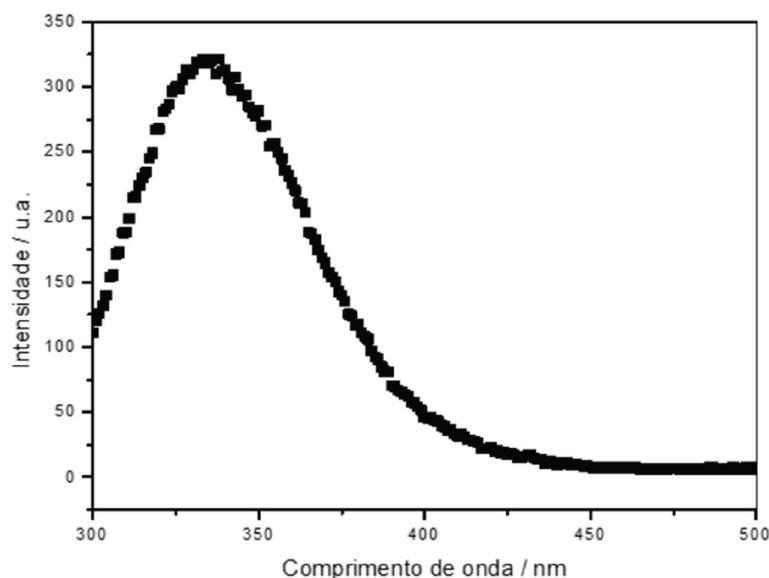


Figura 26. Espectro de fluorescência da invertase 0,15 mg mL⁻¹ em tampão acetato 40 mmol L⁻¹ (λ_{exc} = 280 nm; $\lambda_{máx}$ = 338 nm).

A invertase de *S. cerevisiae* apresenta 16 resíduos de Trp por cadeia, 39 Tyr e 36 Phe, o que justifica esse espectro de emissão de fluorescência mesmo para soluções diluídas da enzima, aproximadamente 0,15 mg mL⁻¹.

No dicroísmo circular (CD) observamos a absorção diferencial da luz circularmente polarizada por moléculas quirais, como por exemplo os aminoácidos biológicos que são levorrotatórios. As proteínas apresentam diferenças nos espectros de CD devido a interação de estruturas secundárias regulares com a luz incidente (Greenfield, 2006). A porcentagem de cada estrutura secundária pode ser estimada com base na sequência primária da proteína pelo *software* APSSP2 (Raghava, 2002) e pela deconvolução do espectro de CD obtido pelo *software* K2D3 (Louis-Jeune, *et al.*, 2012) como pode ser visto na Figura 27 e na Tabela 8.

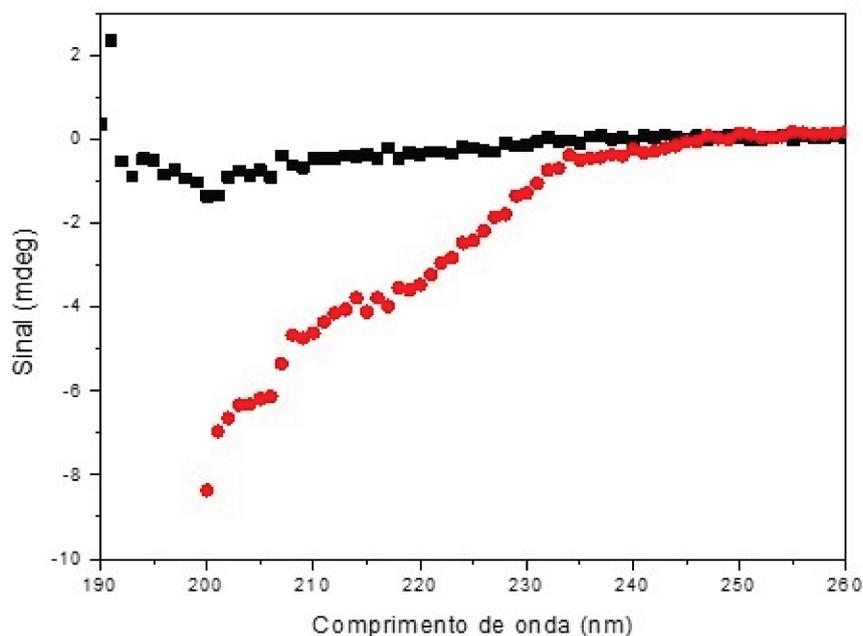


Figura 27. Espectro de Dicroísmo Circular da invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018) e purificada. Em vermelho a amostra contendo $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ e em preto $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ de invertase ambas em tampão acetato 40 mmol L^{-1} (vermelho) e 8 mmol L^{-1} (preto).

Tabela 8. Estimativa do conteúdo de estrutura secundária na invertase extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018), usando a deconvolução dos dados experimentais pelo *software* K2D3 e predição pela sequência de aminoácidos pelo *software* APSSP2:

Estrutura secundária	Deconvolução	Predição
	K2D3	APSSP2
α hélice / %	2,37	2,55
folha β / %	35,29	38,82
aleatória / %	62,34	58,63

Embora o espectro de dicroísmo circular não pareça apresentar os máximos e mínimos relevantes para estruturas de folha β e α hélice, o tratamento matemático aponta que a invertase obtida apresenta estrutura secundária muito próxima ao esperado pela sua sequência. Na estrutura depositada no *Protein Data*

Bank (PDB, 4EQV) encontra-se 2% de α hélice e 47 % de folha β , valores próximos aos obtidos pela deconvolução do espectro de CD.

Para confirmar a atividade da invertase, acompanhou-se a inversão da rotação da luz polarizada de uma solução de sacarose (20 mg mL^{-1}) incubada com a enzima purificada ($0,15 \text{ mg mL}^{-1}$). O resultado do ensaio da polarimetria pode ser observado na Figura 28, na qual pode-se confirmar que a invertase extraída do fermento biológico se encontrava ativa.

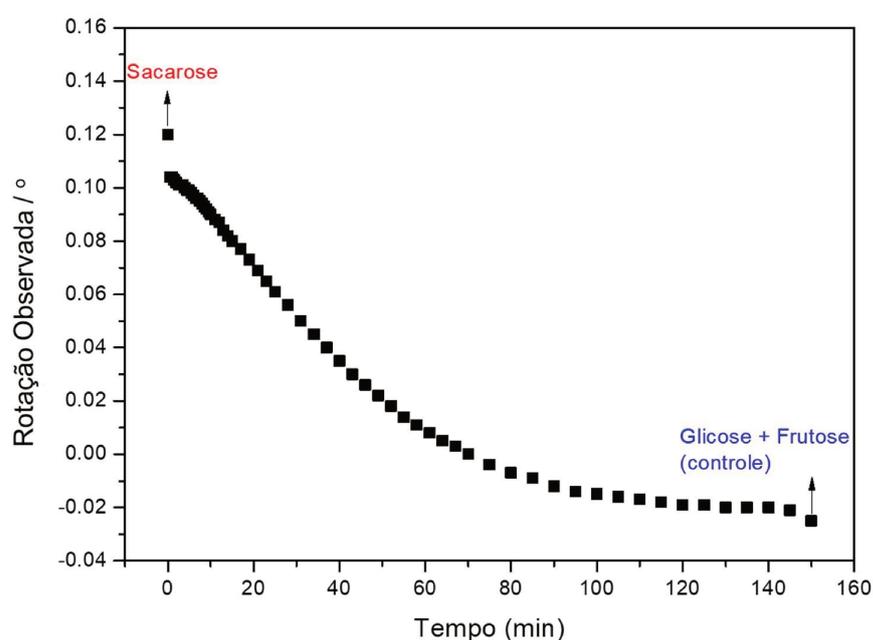


Figura 28. Acompanhamento da rotação angular de uma solução de sacarose (20 mg mL^{-1}) incubada com invertase ($0,15 \text{ mg mL}^{-1}$) extraída do fermento biológico seco instantâneo Dr. Oetker (Lote 02, validade 05/2018) e purificada.

A temperatura ótima para realização dos ensaios foi determinada realizando-se o teste de atividade em diferentes temperaturas e pode ser vista na Figura 29.

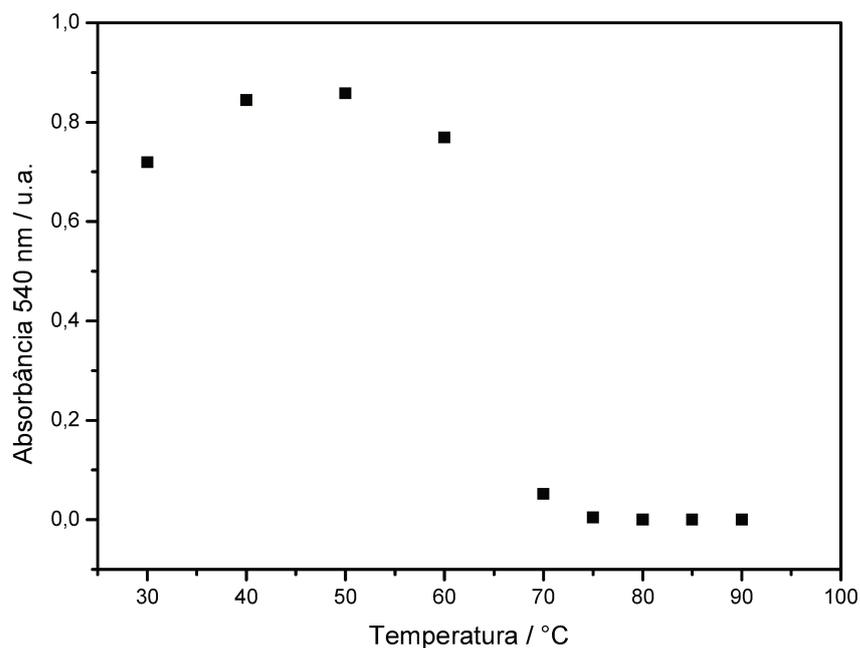


Figura 29. Determinação da temperatura ótima para máxima atividade enzimática.

Nota-se que a temperatura ótima para a ocorrência da catálise pela invertase é de 50 °C, valor próximo ao reportado na literatura, 40 °C (Timerman 2012) e do reportado para seu uso industrial, 60 °C (Schiweck, *et al.*, 2007).

Observando o mecanismo pelo qual a catálise ocorre (Figura 6), notou-se que o resíduo de ácido glutâmico deve estar protonado e o resíduo de aspartato deve estar desprotonado para que a catálise possa ocorrer. Assim, decidiu-se investigar o comportamento da invertase em diferentes pH, utilizando um tampão fosfato de sódio e ácido cítrico 50 mmol L⁻¹. As curvas de fluorescência estão mostradas na Figura 30 e a atividade enzimática medida pelo teste colorimétrico com DNS na Figura 31.

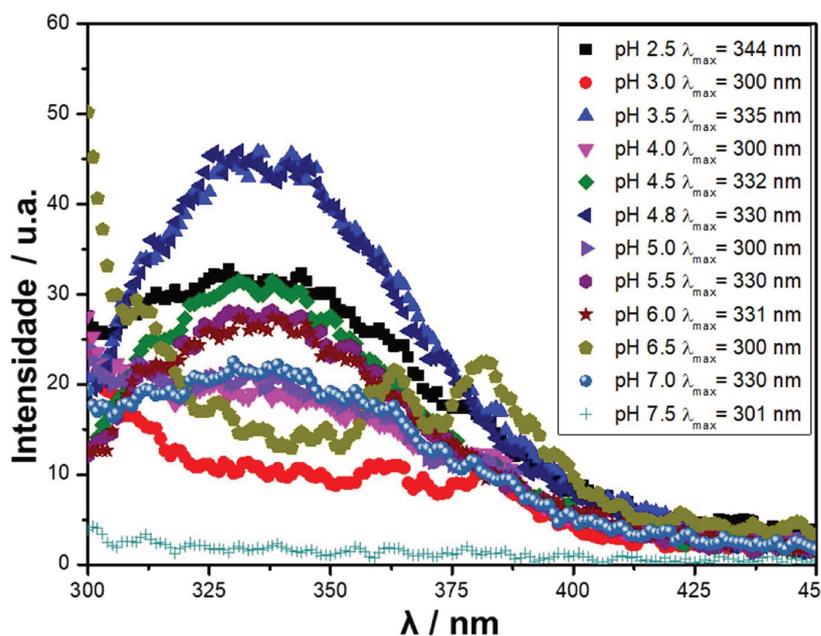


Figura 30. Espectros de fluorescência da invertase ($\lambda_{exc} = 280$ nm) em diferentes pH.

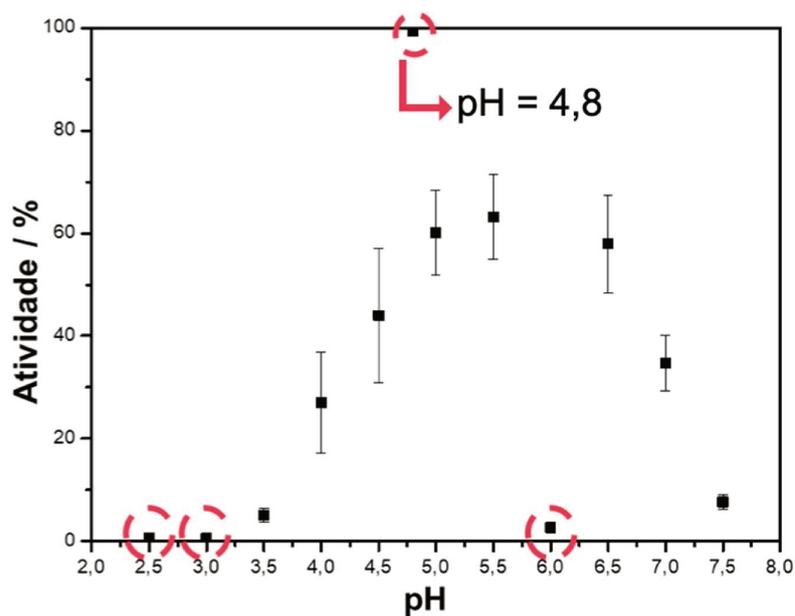


Figura 31. Curva da atividade da invertase frente a uma solução de sacarose 10 mmol L^{-1} em diferentes pHs. A atividade foi medida pelo teste com DNS acompanhando-se a absorbância das soluções em 540 nm e utilizando-se a curva de calibração feita com glicose e frutose $C_{\text{gli+fru}} = \frac{\text{Abs} + (0,047 \pm 0,03)}{(0,00493 \pm 0,00005)}$, $R^2 = 0,9996$.

4.4 Teste de pesca da sacarose

Como pode-se observar pelos espectros de fluorescência, o enovelamento apropriado da proteína depende do pH do tampão em que ela está armazenada. Nota-se que em seu pH ótimo, 4,8, a enzima apresenta maior intensidade de fluorescência com $\lambda_{\text{máx}} = 338 \text{ nm}$, ao passo que em pH 7,5 ela precipitou completamente e não apresentou fluorescência quando excitada em 280 nm. Olhando para a curva de atividade, observamos que o pH 4,8 apresenta o maior nível de atividade da invertase frente ao seu substrato, sacarose. Nos pHs 2,5; 3,0 e 6,0 a enzima não apresentou atividade. Em pHs baixos, nos quais $\text{pH} < \text{pK}_a$ dos resíduos catalíticos, ambos estão protonados e a reação não ocorre, enquanto em pH mais elevados, $\text{pH} > \text{pK}_a$ dos dois resíduos, ambos estarão desprotonados e mais uma vez a reação não é observada. Desse modo escolheu-se o pH 3,0 para o teste de captura da sacarose das soluções. Além disso, o pH 3,0 foi escolhido por estar dentro da faixa de pH naturalmente encontrado no suco de laranja (Bridges, *et al.*, 1939).

Utilizando-se uma suspensão de NPM ambientadas em pH 3,0 realizou-se a captura de sacarose de uma solução de sacarose 5 mmol L^{-1} preparada em tampão fosfato de sódio e ácido cítrico 50 mmol L^{-1} pH 3,0. Os resultados dos ciclos de captura e remoção da sacarose estão representados na Figura 32.

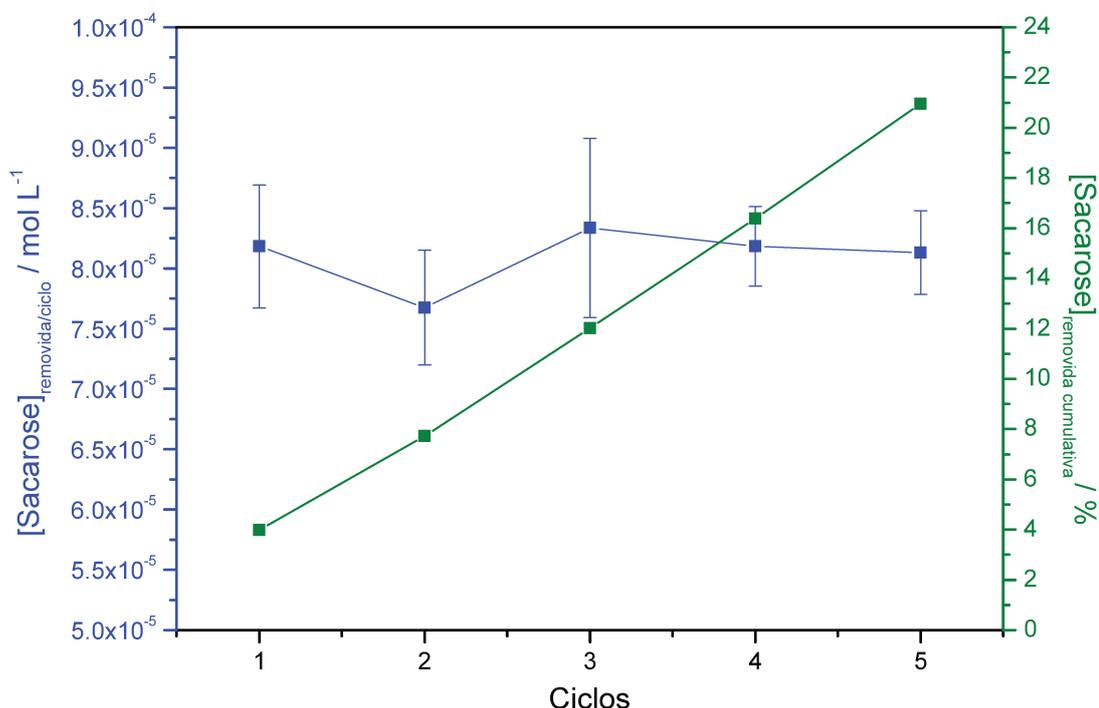


Figura 32. Curva da concentração de sacarose removida a cada ciclo de captura (azul) e concentração de sacarose removida de maneira cumulativa (verde). A concentração de sacarose foi medida na forma de glicose formada pelo teste com DNS acompanhando-se a absorvância das soluções em 540 nm e utilizando-se a curva de calibração feita com glicose e frutose: $C_{\text{gli+fru}} = \frac{\text{Abs} + (0,047 \pm 0,03)}{(0,00493 \pm 0,00005)}$, $R^2 = 0,9996$.

A sacarose removida foi recuperada na forma de açúcar invertido, e quantificada na forma de glicose, o processo de captura está representado na Figura 15. A curva representada em azul (Figura 32) demonstra que o nanomaterial formado por um núcleo magnético e com a invertase imobilizada foi estável frente à captura de sacarose de uma solução em pH ácido (pH 3,0), e que não perde sua habilidade de captura após repetição de seu uso, podendo ser utilizada 5 vezes sem perda de sua atividade. Observa-se também que cada ciclo de 1 min, utilizando-se aproximadamente 6 mg das NPM, foi capaz de remover cerca de 4% ($81 \mu\text{mol L}^{-1}$) de sacarose da solução contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ do açúcar, ou seja aproximadamente $13,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ($4,62 \text{ g}$) de sacarose por grama de nanomaterial por ciclo. Repetindo-se os ciclos de captura de sacarose de uma mesma solução, podemos observar um efeito cumulativo da remoção de sacarose, com 20,95% (67 mmol L^{-1}) da sacarose removida ao final de 5 ciclos por 6 mg de nanomaterial.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento do nanomaterial para captura da sacarose envolveu duas etapas distintas: a produção de NPM e a extração e purificação da invertase. A etapa seguinte consistiu na imobilização da enzima na superfície das NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$. As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, e o recobrimento foi realizado pelo método de Stöber. A enzima foi imobilizada na superfície das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ por meio de ligação covalente, o que não inativou a enzima. As NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ -invertase permitiram a captura e remoção de aproximadamente $13,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de sacarose por grama de nanomaterial por ciclo) preparada em tampão fosfato de sódio e ácido cítrico (50 mmol L^{-1} pH 3,00). As $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ -Invertase puderam ser utilizadas 5 vezes sem perder a habilidade de capturar a sacarose.

A tecnologia desenvolvida oferece enorme potencial do ponto de vista científico e econômico. O uso da nanotecnologia para produção de alimentos com menor teor calórico pode ser uma solução para a crise de obesidade e diabetes no mundo. Do ponto de vista econômico, o estado de São Paulo é o maior produtor mundial do suco de laranja, e a possibilidade de comercialização de um suco com teor calórico reduzido abre inúmeras oportunidades de mercado. Além disso, o sacarose removida é recuperada na forma de açúcar invertido, também conhecido como mel artificial. Esse subproduto apresenta maior valor agregado e pode ser vendido para a indústria alimentícia. Com isso, tem-se um produto capaz de melhorar a qualidade de vida das pessoas e oferecer retorno econômico para a agroindústria e indústria de alimentos brasileiras.

PERSPECTIVAS

A possibilidade de usar nanotecnologia para capturar seletivamente moléculas previamente selecionadas pode ter inúmeras aplicações. Propõe-se o estudo desse material para capturar sacarose de sucos de frutas, diminuindo assim seu valor calórico e tornando possível seu consumo de maneira segura por uma maior parte da população, incluindo aqueles que possuem dietas com restrição ao consumo de açúcar como pessoas que possuem diabetes ou com obesidade.

Novas etapas nesse processo poderiam ser a investigação do uso de proteínas, como as lecitinas, para realizar a captura da sacarose dos alimentos. Uma vez que as enzimas podem ter sua atividade catalítica reduzida após a repetição de seu uso.

Sugere-se também a avaliação da possibilidade de converter parte da sacarose não removida em sucralose (450-600 vezes mais doce que a sacarose), conservando-se assim o dulçor dos alimentos.

Além disso, essa mesma abordagem pode ser aplicada para outras moléculas. Um exemplo seria a remoção da lactose, utilizando uma estratégia similar. Uma grande parte da população hoje possui algum tipo de intolerância à lactose, e produzir alimentos com teor reduzido desse açúcar seria uma alternativa saudável para garantir que essa parte da população possa consumir leite e derivados.

REFERÊNCIAS

- Abraham, R., Verma, M., Barrow, C., Puri, M. (2014). Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. *Biotechnol Biofuels*, 7, 90-101.
- Ali, A., Zafar, H., Zia, M., Ul Haq, I., Phull, A., Ali, J., Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl*, 9, 49-67.
- Anastasova, E. I., Prilepskii, A. Y., Fakhardo, A. F., Drozdov, A. S., Vinogradov, V. V. (2018). Magnetite nanocontainers: toward injectable highly magnetic materials for target drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 10, 30040-30044.
- Andjelkovic, U., Milutinovic-Nikolic, A., Jovic-Jovicic, N., Bankovic, P., Bajt, T., Mojovic, Z., Vujčić Z., Jovanovic, D. (2015). Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellite nanoclays. *Food Chem*, 168, 262-269.
- Aslani, F., Bagheri, S., Muhd-Julkapli, N., Juraimi, A. S., Hashemi, F. S., Baghdadi A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. *Sci World J*, 2014, 641759.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*, 4, 634–641.
- Barnett, J. (2003). Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*, 149, 557-567.
- Barrios, V. A. E., Méndez, J. R. R., Aguilar, N. V. P., Espinosa, G. A., Rodríguez, J. L. D. (2012). FTIR - an essential characterization technique for polymeric materials, infrared spectroscopy. Em Theophile, P. T. *Materials Science, Engineering and Technology*. London: IntechOpen Limited.

Berthelot, P. (1860). Sur la fermentation glucosique du sucre de canne. *Compt Rend*, 50, 980-984.

Bio-Resource (25/11/2011). Principle behind the use of salts in hydrophobic interaction chromatography. Fonte: Bio-Resource: <http://technologyinscience.blogspot.com/2011/11/principle-behind-use-of-salts-in.html#.XWQCXehKjcs> (acessado em 26/08/2019).

Boriello, G. (14/11/2018). Brasil é o quarto país com o maior número de diabéticos do mundo. Fonte: R7: <https://noticias.r7.com/saude/brasil-e-o-quarto-pais-com-o-maior-numero-de-diabeticos-do-mundo-14112018> (acessado em 26/08/2019).

Botstein, D., Chervitz, S., Cherry, J. (1997). Yeast as a model organism. *Science*, 277, 1259-1260.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

Bridges, M. A., Mattice, M.R. (1939). Over two thousand estimations of the pH of representative foods. *Am J Dig Dis*, 9, 440-449.

Brown, A. (1892). Influence of oxygen and concentration on alcohol fermentation. *J Chem Soc*, 61, 369-385.

Brown, A. (1902). Enzyme action. *J Chem Soc*, 81, 373-386.

Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., Urban, P. L. (2009). Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manag*, 29, 2587–2595.

Cantarel, B., Coutinho, P., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37, D233-D238.

Chu, X., Hou, Y. (2017). Magnetic nanomaterials: fundamentals, synthesis and applications. Em Hou, Y., Sellmeyer, D. *Overview of synthesis of magnetic nanomaterials*. United States: Wiley. 83-120.

Conde, R., Cueva, R., Pablo, G., Polaina, J., Larriba, G. (2004). A search for hyperglycosylation signals in yeast glycoproteins. *J Biol Chem*, 279, 43789-43798.

Cornell, R., Schwertmann, U. (2004). The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses (2^a ed.). Weinheim: Wiley-VHC.

Cummins, P. M., Rochfort, K. D., O'Connor, B. (2017). Ion-exchange chromatography: basic principles and application. Em Walls, D., Loughran, S. *Protein chromatography. Methods in molecular biology*. New York: Humana Press. 209-223.

Damayanti, S., Permana, B., Weng, C. C. (2012). Determination of sugar content in fruit juices using high performance liquid chromatography. *Acta Pharma Indonesia*, 37, 139-145.

de la Fuente, G., Sols, A. (1962). Transport of sugars in yeasts. II. Mechanisms of utilization of disaccharides and related glycosides. *Biochim Biophys Acta*, 56, 49-62.

Diabetes. (01/03/2018). *O que é diabetes?* Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes: <http://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/oque-e-diabetes> (acessado em 26/07/2019).

Domingos, D. G., Henriques, R. O., Xavier, J. A., Junior, N. L., Costa, R. H. R. (2019). Increasing activated sludge aggregation by magnetite nanoparticles addition. *Water Sci Technol*, 79, 993-999.

Dubrunfaut, A. (1847). Sur une propriété analytique des fermentations alcoolique et lactique, et sur leur application à l'étude des sucres. *Ann Chim Phys*, 21, 169-178.

EMBL. (2019). Protein purification - extraction and clarification. Fonte: European molecular biology laboratory: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/index.html (acessado em 26/07/2019).

Esim, O., Kurbanoglu, S., Savaser, A., Ozkan, S. A., Ozkan, Y. (2019). Nanomaterials for drug delivery systems. Em: Ozkan, S. A. & Shah, A. *New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis*. Academic Press. 273-301.

Estelrich, J., Sánchez-Martín, M. J., Busquets, M. A. (2015). Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int J Nanomedicine*, 10, 1727–1741.

EuroFresh. (04/03/2019). Global orange production up 9% in 2018/19. Fonte: EuroFresh distribution: <https://www.eurofresh-distribution.com/news/global-orange-production-9-201819> (acessado em 26/08/2019).

Faivre, D., Bennet, M. (2016). Materials science: magnetic nanoparticles line up. *Nature*, 535, 235-236.

Felici, R. (2002). Surface X-ray diffraction characterization of materials. United States: John Wiley & Sons, Inc.

Fissan, H., Ristig, S., Kaminski, H., Asbach, C., Epple, M. (2014). Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. *Anal Methods*, 6, 7324-7334.

Fundo de Defesa da Citricultura. (04/09/2017). Citricultura brasileira é a maior do mundo. Fonte: G1: <https://g1.globo.com/sp/sao-carlos-regiao/especial-publicitario/fundo-de-defesa-da-citricultura/unidos-contra-o-greening/noticia/citricultura-brasileira-e-a-maior-do-mundo.ghtml>. (acessado em 26/08/2019).

Gaffney, J. S., Marley, N. A., Jones, D. E. (2002). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy characterization of materials. United States: John Wiley & Sons, Inc.

Gascón, S., Neumann, N., Lampen, J. (1968). Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J Biol Chem*, 243, 1573-1577.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Em: Walker, J. M. *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607.

Ghazanfari, M., Kashefi, M., Shams, S., Jaafari, M. (2016). Perspective of Fe₃O₄ nanoparticles in biomedical applications. *Biochem Res Int*, 2016, ID 7840161, 1-32.

Goffeau, A., Barrell, B., Bussey, H., Davis, R., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274, 563-567.

Gorski, C., Scherer, M. (2010). Determination of nanoparticulate magnetite stoichiometry by Mossbauer spectroscopy, acidic dissolution, and powder X-ray diffraction: a critical review. *Am Mineral*, 95, 1017-1026.

Goud, K. Y., Satyanarayana, M., Hayat, A., Gobi, K. V., Marty, J. L. (2019). Nanomaterial-based electrochemical sensors in pharmaceutical applications. Em: Grumezescu, A. M. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*. William Andrew. 195-216.

Greenfield, N. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 1, 2876-2890.

Grössinger, R. (2008). Characterisation of hard magnetic materials. *J Electr Eng*, 59, 15-20.

Gupta, A. K., Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 3995–4021.

Harrison, R., Todd, P., Rudge, S., Petrides, D. (2003). *Bioseparations science and engineering*. New York: Oxford University Press.

Hasany, S. F., Ahmed, I., Rehman, A. (2013). Systematic review of the preparation techniques of iron oxide magnetic nanoparticles. *Nanosci Nanotechnol*, 2, 148-158.

History of yeast. (2018). Fonte: Dakota yeast: http://www.dakotayeast.com/yeast_history.html (acessado em 26/07/2019).

Hurley, K. R., Ring, H. L., Kang, H., Klein, N. D., Haynes, C. L. (2015). Characterization of magnetic nanoparticles in biological matrices. *Anal Chem*, 87 (23), 11611–11619.

Hussain C.M., Palit S. (2019) Nanomaterials, ecomaterials, and wide vision of material science. In: Martínez L., Kharissova O., Kharisov B. (eds) *Handbook of Ecomaterials*. Springer, Cham.

IDF Diabetes Atlas. (2017). International Diabetes Federation. (8ed. ed.) Fonte: <http://www.diabetesatlas.org/> (acessado em 26/07/2019).

IDF Framework for Action on Sugar. (2015). International Diabetes Federation. Fonte: <http://www.idf.org/sugar> (acessado em 26/07/2019).

International Union of Pure and Applied Chemistry. (2014). *Compendium of chemical terminology gold book*. IUPAC.

Iyengar, S., Joy, M., Ghosh, C., Dey, S., Kotnala, R., Ghosh, S. (2014). Magnetic, X-ray and Mössbauer studies on magnetite/maghemite core-shell nanostructures fabricated through an aqueous route. *RSC Adv*, 4, 64919.

Jaacks, L. M., Siegel, K. R., Gujral, U.P., Narayan, K. M. (2016). Type 2 diabetes: a 21st century epidemic. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 30, 331-343.

Jeng, H., Guo, G. (2002). First-principles investigations of the electronic structure and magnetocrystalline anisotropy in strained magnetite. *Phys Rev B Condens Matter Mater Phys*, 65, 094429, 1-9.

Joshi, M., Bhattacharyya, A., Ali, S. W. (2008). Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. *Indian J Fiber Tex Res*, 33, 304-317.

Jun, B. M., Kim, S., Heo, J., Park, C. M., Her, N., Jang, M., Huang, Y., Han, J. (2019). Review of MXenes as new nanomaterials for energy storage/delivery and selected environmental applications. *Nano Res*, 12, 471-487.

Khan, U. S., Khattak, N. S., Rahman, A., Khan, F. (2011). Optimal method for preparation of magnetite nanoparticles. *J Chem Soc Pak*, 33, 628 - 633.

Khatiria, R., Reyhanic, A., Mortazavid, S., Hossainlipoura, M. (2012). Preparation and characterization of Fe₃O₄/SiO₂/APTES core-shell nanoparticles. *Proc 4th Int Conf Nanostructures, ICNS4*, 1456-1458.

Kim, D., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K., Muhammed, M. (2001). Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater*, 225, 30-36.

Koo, K., Ismail, A., Othman, M., Rahman, M., Sheng, T. (2019). Preparation and characterization of superparamagnetic magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles: a short review. *Mal J Fund Appl Sci*, 15, 23-31.

La Neurotox. (2019). *Filtração em gel analítica*. Fonte: La Neurotox: <https://laneurotox.net.br/?como-subcategoria=gel-filtracao> (acessado em 26/07/2019).

Ladish, M. (2001). *Bioseparations engineering*. New York: John Wiley & Sons.

Lai, W., Wei, Q., Xu, M., Zhuang, J., Tang, D. (2017). Enzyme-controlled dissolution of MnO₂ nanoflakes with enzyme cascade amplification for colorimetric immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 89, 45-651.

Laidler, K. (1997). A brief history of enzyme kinetics. Em Cornish-Bowden, A. *New Beer in an Old Bottle. Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge*. Valência: Universitat de València. 127-133.

Lakowicz, J. R. (2006). Protein fluorescence. Em Lakowicz, J. *Principles of fluorescence spectroscopy* (3^a ed.). New York: Springer US. 529-575.

Lammens, W., Roy, K., Laere, A., Rabijns, A., Ende, V. (2008). Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. *J Mol Biol*, 377, 378-385.

Lampen, J. (1971). Yeast and neurospora invertases. Em Boyer, P. *The enzymes*. New York: Academic Press. 291-305.

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. V., Muller, R. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterization and biological applications. *Chem Rev*, 108, 2064-2110.

Lavoisier, A. (1789). *Traité élémentaire de chimie*. (R. Kerr, Trad.) Paris: Cuchet.

Lee, Y., Kim, J., Koo, J. H., Kim, T.H., Kim, D. H. (2018). Nanomaterials for bioelectronics and integrated medical systems. *Korean J Chem Eng*, 35, 1-11.

Lehman, S. (17/07/2019). Orange juice nutrition facts. Fonte: Very well fit: <https://www.verywellfit.com/orange-juice-nutrition-facts-calories-and-health-benefits-4113143>. (acessado em 26/08/2019).

Leonard, D. N., Chandler, G. W., Seraphin, S. (2012). Scanning electron microscopy characterization of materials. United States: John Wiley & Sons, Inc.

Li, X., Xu, H., Chen, Z., Chen, G. (2011). Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J Nanomater*, 2011, 270974, 1-16.

Liu, C., Lai, H., Wu, W. (2017). Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles for nattokinase isolation. *Food Bioprod Process*, 102, 260-267.

Liu, L., Hao, Y., Deng, D., Xia, N. (2019). Nanomaterials-based colorimetric immunoassays. *Nanomaterials*, 9, 316, 1-32.

Liu, Z., Xue, Q., Guo, Y. (2017). Sensitive electrochemical detection of rutin and isoquercitrin based on SH-beta-cyclodextrin functionalized graphene-palladium nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 89, 444-452.

Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M., Perez-Iratxeta, C. (2012). Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins*, 80, 374-381.

Lu, X., Yang, X., Meng, Y., Li, S. (2017). Temperature and pH dually-responsive poly(beta-amino ester) nanoparticles for drug delivery. *Chinese J Polym Sci*, 35, 534-546.

Lumen. (2019). *Proteins*. Fonte: Lumen Learning: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/proteins/> (acessado em 26/07/2019).

Ma, J., Chen, K. (2016). Discovery of superparamagnetism in sub-millimeter-sized magnetite porous single crystals. *Physics Letters A*, 380, 3313-3318.

Mahadavi, M., Ahmad, M., Haron, M., Namvar, F., Nadi, B., Rahman, M., Amin, J. (2013). Synthesis, surface modification and characterization of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*, 18, 7533-7548.

Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 24–46.

Majidi, S., Sehrig, F., Farkhani, S., Goloujeh, M., Akbarzadeh, A. (2014). Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 44, 722-734.

Mascolo, M., Pei, Y., Ring, T. (2013). Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. *Materials*, 6, 5549-5567.

Massart, R., Cabuil, V. (1987). Effect of some parameters on the formation of colloidal magnetite in alkaline-medium-yield and particle size control. *J Chem Phys*, 84, 967-973.

Mazario, E., Sánchez-Marcos, J., Menéndez, N., Herrasti, P., García-Hernández, M., Muñoz-Bonilla, A. (2014). One-pot electrochemical synthesis of polydopamine coated magnetite nanoparticles. *RSC Adv*, 4, 48353-48361.

MD Genetic Pro. (2019). Difference between type 1 and type 2 diabetes. Fonte: Premier Medical, Inc: <http://premedinc.com/difference-between-type-1-and-type-2-diabetes/> (acessado em 26/07/2019).

Cao, M., Li, Z., Wang, J., Ge, W., Yue, T., Li, R., Colvin, V. L., Yu, W. W. (2012). Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends Food Sci Technol*, 27, 47-56.

Michaelis, L., Menten, M. (1913). Kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*, 49, 333-369.

Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31, 426–428.

Mitscherlich, E. (1842). Ueber die chemische zersetzung und verbindung mittelst contactsubstanzen. *Ann Phys Chem*, 55, 209-229.

Mohapatra, M., Anand, S. (2010). Synthesis and applications of nanostructured iron oxides/hydroxides—a review. *Int J Eng Sci Technol*, 2, 127–146.

Moyad, M. (2008). Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: Part II. *Urol Nurs*, 28, 73-75.

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessiq, F., Castranova, V., Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater*, 8, 543–557.

Nelson, D., Cox, M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*. 7th ed. New York: W.H.Freeman and Company.

Neumann, N., Lampen, J. (1967). Purifications and properties of yeast invertase. *Biochem*, 6, 468-475.

Neves, M. F. (03/10/2018). World orange juice consumption falls again. Fonte: Citrus Industry News: <http://citrusindustry.net/2018/10/03/world-orange-juice-consumption-falls-again/>. (acessado em 26/08/2019).

Nguyen, T. L., Nizamov, T. R., Abakumov, M. A., Shchetinin, I. V., Savchenko, A. G., Majouga, A. G. (2018). Effect of magnetite nanoparticle morphology on the parameters of MRI relaxivity. *Bull Russ Acad Sci Phys*, 82, 1214-1221.

Ninfa, A., Ballou, D., Benore, M. (2010). Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology. Hoboken: John Wiley & Sons.

Pasteur, L. (1857). Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Comptes Rendus Acad. Sci*, 45, 1032-1036.

Pasteur, L. (1858). Nouveaux faits concernant l'histoire de la fermentation alcoolique. *Comptes Rendus Acad Sci*, 47, 1011-1013.

Patterson, A. (1939). The scherrer formula for X-ray particle size determination. *Phys Rev*, 56, 978-982.

Pereira, C., Pereira, A. M., Fernandes, C., Rocha, M., Mendes, R., FernándezGarcía, M. P., Guedes, A., Tavares, P. B., Greneche, J. M., Araujo, J. P., Freire, C. (2012). Superparamagnetic MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles: tuning the particle size and magnetic properties through a novel one-step coprecipitation route. *Chem Mater*, 24, 1496-1504.

- Raghava, G. (2002). APSSP2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning. *CASP5, A*, 132.
- Rahman, S., Sen, P., Hasan, M., Miah, M., Rahman, M. (2004). Purification and characterization of invertase enzyme from sugarcane. *Pak J Biol Sci*, 7, 340-345.
- Reddy, A., Maley, F. (1996). Studies on identifying the catalytic role of glu-204 in the active site of yeast invertase. *J Biol Chem*, 271, 13953-13958.
- Reddy, A., MacColl, R., Maley, F. (1990). Effect of oligosaccharides and chloride on the oligomeric structures of external, internal, and deglycosylated invertase. *Biochemistry*, 29, 2482–2487.
- Romero-Gómez, S., Augur, C., Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol Lett*, 22, 1255-1258.
- Sainz-Polo, M., Ramirez-Escudero, M., Lafraya, A., Gonzalez, B., Marin-Navarro, J., Sanzs-Aparicio, J. (2013). Three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase: role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. *J Biol Chem*, 288, 9755-9766.
- Scherrer, P. (1918). Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Mathematisch-Physikalische Klasse*, 1918, 98-100.
- Schiweck, H., Clarke, M., Pollach, G. (2007). Sugar. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH.
- Schulke, N., Schmid, F. (1988). The stability of yeast invertase is not significantly influenced by glycosylation. *J Biol Chem*, 263, 8827-8831.
- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., Torre-Roche, R. D., Hamdi, H., White, J. C., Bindraban, P., Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *J Nanopart Res*, 17, 1–21.
- Sharma, R., Bisen, D. P., Shukla, U., Sharma, B. G. (2012). X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Res Sci Technol*, 4, 77-79.

Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Sakran, A. M., Ali, H. M., Basalah, M. O., Faisal, M., Alatar, A., Al-Amri, A. A. (2013). Calcium-induced amelioration of boron toxicity in radish. *J Plant Growth Regul*, 32, 61–71.

Singh, S., Barick, K. C., Bahadur, D. (2011). Surface engineered magnetic nanoparticles for removal of toxic metal ions and bacterial pathogens. *J. Hazard Mater*, 192, 1539-1547.

Singh, P., Kim, Y., Zhang, D., Yang, D. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends Biotechnol*, 34, 588-599.

Singh, R., Behera, M., Kumar, S. (2019). Nano-bioremediation: an innovative remediation technology for treatment and management of contaminated sites. Em: Bharagava, R., Saxena, G. *Bioremediation of industrial waste for environmental safety*. Springer, Singapore. 165-182.

Sjorgren, C., Johansson, C., Naevestad, A., Sontum, P., Briley-Saebo, K., Fahlvik, A. (1997). Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magn Reson Imaging*, 15, 55-67.

Só Biologia. (2019). *Código genético*. Fonte: Só Biologia: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/AcNucleico6.php> (acessado em 26/07/2019).

Soenen, S. J., Brisson, A. R., De Cuyper, M. (2009). Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials*, 30, 3691–3701.

Soenen, S. J., Himmelreich, U., Nuytten, N., Pisanic, T. R., Ferrari, A., De Cuyper, M. (2010). Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small*, 6, 2136–2145.

Soenen, S. J., Himmelreich, U., Nuytten, N., De Cuyper, M. (2011). Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, 32, 195–205.

Srivastava, N. (2014). Iron nanoparticles induced toxicity in *Sesbania cannabina*: a morphological aspect. *Adv Sci Focus*, 2, 135–139.

Stöber, W., Fink, A. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci*, 26, 62-69.

Sugimoto, T., Matijevic, E. (1980). Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *J Colloid Interface Sci*, 74, 227-243.

Sun, S. N., Wei, C., Zhu, Z. Z., Hou, Y. L., Venkatraman, S. S., Xu, Z. C. (2014). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chin Phy B*, 23, 037503, 1-19.

Tartaj, P., Morales, M., Verdaguer, S., Carreno, T., Serna, C. (2003). The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*, 36, R182-R197.

ThermoFisher Scientific. (2019). *Overview of Protein Expression*. Fonte: ThermoFisher: <https://www.thermofisher.com/ie/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-expression-systems.html> (acessado em 26/07/2019).

Timerman, A. (2012). The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An introduction to protein purification strategies. Em Ahmad, R. *Protein Purification*. Rijeka: Intech. 29-52.

Treasury, H. M., Osborne, T. R. H. G. (16/03/2016). *Budget 2016: some of the things we've announced*. Fonte: Gov.UK: <https://www.gov.uk/government/news/budget-2016-some-of-the-things-weve-announced> (acessado em 26/07/2019).

Triggle, N. (16/03/016). *Sugar tax: How will it work?* Fonte: BBC News: <http://www.bbc.com/news/health-35824071> (acessado em 26/07/2019).

Wahadjuddin, A. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplateforms as drug carriers. *Int J Nanomed*, 7, 3445-3471.

Wang, L., Xiong, Q., Xiao, F., Duan, H. (2017). 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis . *Biosens Bioelectron*, 89, 136-151.

Wang, D., Kou, R., Choi, D., Yang, Z., Nie, Z., Li, J., Saraf, L. V., Hu, D., Zhang, J., Graff, G. L., Liu, J., Pope, M. A., Aksay, I. A. (2010). Ternary self-assembly of ordered metal oxide–graphene nanocomposites for electrochemical energy storage. *ACS Nano*, 4, 1587–1595.

Ward, W. (2012). The art of protein purification. Em Ahmad, R. *Protein Purification*. Rijeka, Croatia: InTech. 1-28.

Williams, R., Trumbly, R., MacColl, R., Trimble, R., Maley, F. (1985). Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast SUC2 gene. *J Biol Chem*, 260, 13334-13341.

Wood, C., Stevens, M. (2016). Materials science: improving the image of nanoparticles. *Nature*, 539, 505-506.

World Health Organization. (2019). Fonte: <http://www.who.int/health-topics/diabetes/> (acessado em 26/07/2019).

Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., Kim, W. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mat*, 16, 023501, 1-43.

Xu, P., Zeng, G. M., Huang, D. L., Feng, C. L., Hu, S., Zhao, M. H., Lai, C., Wei, Z., Huang, C., Xie, G. X., Liu, Z. F. (2012). Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Sci Total Environ*, 424, 1–10.

Yamaura, M., Camilo, R., Sampaio, L., Macêdo, M., Nakamura, M., Toma, H. (2004). Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater*, 279, 210-217.

Yantasee, W., Warner, C. L., Sangvanich, T., Addleman, R. S., Carter, T. G., Wiacek, R. J., Fryxell, G. E., Timchalk, C., Warner, M. G. (2007). Removal of heavy metals from aqueous systems with thiol functionalized superparamagnetic nanoparticles. *Environ Sci Technol*, 41, 5114-5119.

Yeastsite (**24/02/2016**). Yeast cell walls. Fonte:

<https://yeastsite.wordpress.com/2016/02/24/gas-exchange/> (acessado em 26/08/2019).

Young, R. A. (**1898**). The precipitation of carbohydrates by neutral salts, *J Physiol*, 22, 401–422.

Zamora, M. C. (**2013**). Central dogma of molecular biology. Fonte: Bioinformatics at your fingertips:

http://biologia.uab.cat/genetica_tfg/bioinformaticaabast/Central_dogma.html (acessado em 26/08/2019).

Zellner, M., Winkler, W., Hayden, H., Diestinger, M., Eliassen, M., Gesslbauer, B., Miller, I., Chang, M., Kungl, A., Roth, E., Oehler, R. (**2005**). Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*, 26, 2481-2489.

Zhang, W-X. (**2003**). Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. *J Nanopart Res*, 5, 323–332.

Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., Crittenden, J. (**2009**). Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Res*, 43, 4249–4257.

Zhang, T., Liu, J., Wang, C., Leng, X., Xiao, Y., Fu, L. (**2017**). Synthesis of graphene and related two-dimensional materials for bioelectronics devices. *Biosens Bioelectron*, 89, 28-42.

Zhou, Y. T., Nie, H. L., Branford-White, C., He, Z. Y., Zhu, L. M. (**2009**). Removal of Cu^{2+} from aqueous solution by chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with α -ketoglutaric acid. *J Colloid Interf Sci*, 330, 29-37.

Zhu, C. Z., Du, D., Lin, Y. H. (**2017**). Graphene-like 2D nanomaterial-based biointerfaces for biosensing applications. *Biosens Bioelectron*, 89, 43-55.

Zuo, L., Qu, Q., Li, L., Ran, X., Gui, J., Wang, Q., Cui, X., Jiang, C. (**2018**). Electrochemical DNA biosensor based on magnetite/multiwalled carbon

nanotubes/chitosan nanocomposite for *Bacillus cereus* detection of potential marker for gold prospecting. *Electroanalysis*, 30, 910-920.