



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

GABRIEL RODRIGUES MARTOS

**ENZIMAS INVERTASES TERMOESTÁVEIS ENGENHEIRADAS E SUA
APLICAÇÃO NA REDUÇÃO DO TEOR DE SACAROSE EM MISTURAS
COMPLEXAS**

CAMPINAS

2024

GABRIEL RODRIGUES MARTOS

**ENZIMAS INVERTASES TERMOESTÁVEIS ENGENHEIRADAS E SUA
APLICAÇÃO NA REDUÇÃO DO TEOR DE SACAROSE EM MISTURAS
COMPLEXAS**

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

Profa. Dra. Ljubica Tasic

**O arquivo digital corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno
Gabriel Rodrigues Martos, e orientada pela Profa. Dra. Ljubica Tasic.**

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

M367e Martos, Gabriel Rodrigues, 1999-
Enzimas invertases termoestáveis engenheiradas e sua aplicação na
redução do teor de sacarose em misturas complexas / Gabriel Rodrigues
Martos. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

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

1. Invertase. 2. Biotecnologia. 3. Nanotecnologia. I. Tasic, Ljubica, 1970-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Engineered thermostable invertases and their application in
reducing sucrose contents in complex mixtures

Palavras-chave em inglês:

Invertase

Biotechnology

Nanotechnology

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Ljubica Tasic [Orientador]

Priscila Oliveira de Giuseppe

Diego Pereira dos Santos

Data de defesa: 02-02-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0009-8489-8762>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1414445690599896>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ljubica Tasic (Orientadora)

Profa. Dra. Priscila Oliveira de Giuseppe (Unicamp/CNPEM)

Prof. Dr. Diego Pereira dos Santos (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 pelo aluno Gabriel Rodrigues Martos, aprovada pela Comissão Julgadora em 02 de Fevereiro de 2024.

Dedicatória

Dedico este trabalho à todos os que são, já foram ou ainda serão especiais em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao suporte que me foi dado ao longo dos últimos meses pelos meus amigos, colegas e alguns familiares. Sem eles eu provavelmente não teria chegado até aqui.

Gostaria de agradecer também à Professora Dra. Ljubica Tasic pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pelas orientações, lições e exemplos durante essa trajetória.

Deixo também meus agradecimentos aos professores Dr. Renato Sousa Lima, do LNNano; Hamilton Varela, do IQSC; e Douglas Galante, da USP; pelas orientações em projetos passados, pelo apoio em minhas decisões profissionais e por servirem de exemplo para minha vida profissional e acadêmica.

Agradeço especialmente a meus amigos de laboratório Gonzalo García Delgado e Thyerre Santana pelo apoio, ajuda, auxílio e suporte emocional durante a execução deste projeto.

Agradeço a Dra. Vivian Andrade pelo auxílio nas medidas de magnetização e difração de raios X das nanopartículas.

Agradeço também a meus amigos Gabriel Santana das Virgens e Matheus Barbosa por estarem comigo em todos os momentos, bons ou ruins, e por me ajudarem a não desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais, agradeço pelo suporte desde sempre e pela oportunidade de poder perseguir meus sonhos.

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

Meus agradecimentos também à Unicamp e ao Instituto de Química.

Por fim, agradeço a todos aqueles que estiveram presentes, de alguma forma, em alguma parte desta trajetória.

“Happiness can be found even in the darkest of times if one only remembers to turn on the light”

J. K. Rowling

RESUMO

A diabetes é uma das doenças de crescimento mais acelerado no mundo e, uma vez que seu desenvolvimento está diretamente relacionado ao consumo exacerbado de açúcar, estratégias para reduzir o consumo diário de açúcar são essenciais. O projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um nanomaterial baseado em enzimas invertases imobilizadas em nanopartículas de magnetita e sua aplicação na remoção seletiva e recuperação de sacarose de misturas complexas. A invertase do microrganismo *Thermotoga maritima* (*T. maritima*) foi escolhida por suas propriedades termoestáveis e a engenharia de proteínas foi aplicada para inativar a enzima nativa de forma a obter três clones distintos que mantenham a capacidade de reconhecer e ligar-se a sacarose. As nanopartículas casca-caroço de magnetita e sílica foram sintetizadas e funcionalizadas de forma a permitir a imobilização de proteínas em sua superfície e foram devidamente caracterizadas. As quatro invertases disponíveis foram expressas em *Escherichia coli*, purificadas e caracterizadas quanto sua capacidade de interagir e clivar a sacarose. As proteínas foram então imobilizadas no suporte magnético e aplicadas em ensaios para remoção de sacarose de amostras de suco de laranja industrializado e amostras de sacarose concentrada. O nanomaterial desenvolvido foi capaz de remover a sacarose em ambos os casos, para soluções concentradas de sacarose e para o suco de laranja, evidenciando sua capacidade de aplicação para captura seletiva do alvo em amostras complexas sob condições de alta temperatura e sua reutilização em mais de 15 ciclos de captura. Estima-se que apenas 1 grama do nanomaterial desenvolvido, baseado na invertase nativa do *T. maritima* imobilizada nos nanomagnetos seja capaz de remover 0,1 mg de sacarose por ciclo.

ABSTRACT

Diabetes is one of the fastest-growing diseases worldwide, and since its development is directly related to the excessive consumption of sugar, strategies to reduce daily sugar intake are essential. This project aims to develop a nanomaterial based on immobilized invertase enzymes on magnetite nanoparticles and its application in the selective removal and recovery of sucrose from complex mixtures. The invertase from the *Thermotoga maritima* (*T. maritima*) microorganism was chosen for its thermostable properties and protein engineering was applied to inactivate the native enzyme in order to obtain three distinct clones that maintain the ability to recognize and bind to sucrose. Core-shell magnetite and silica nanoparticles were synthesized and functionalized to allow the immobilization of proteins on their surface and were characterized. The four available invertases were expressed in *Escherichia coli*, purified, and characterized regarding their ability to interact with and cleave sucrose. The proteins were then immobilized on the magnetic support and applied in assays for sucrose removal from industrialized orange juice samples and concentrated sucrose samples. The developed nanomaterial was capable of removing sucrose in both cases, for concentrated sucrose solutions and for orange juice, demonstrating its capacity for selective capture of the target in complex samples under high-temperature conditions and its reuse in over 15 capture cycles. It is estimated that only 1 gram of the developed nanomaterial, based on native *T. maritima* invertase immobilized on the nanomagnets, is capable of removing 0.1 mg of sucrose per cycle.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Legenda	Página
Figura 1.	Representação da estrutura de compostos glicosídeos. Estrutura de um radical glicosil (A) . Estrutura de compostos C-glicosídeos (Bi) , N-glicosídeos (Bii) , O-glicosídeos (Biii) e S-glicosídeos (Biv) .	20
Figura 2.	Fórmula estrutural da sacarose, evidenciando a ligação glicosídica entre os monômeros de glicose e frutose.	21
Figura 3.	Mecanismo de clivagem da ligação glicosídica da sacarose pela enzima invertase.	22
Figura 4.	Representação em <i>cartoon</i> da estrutura da enzima invertase do <i>T. maritima</i> . (A) Visualização do conteúdo de folhas beta, em azul, e hélices alfa, em vermelho, na estrutura da proteína. (B) Visualização dos domínios que compõem a estrutura da enzima; (I) Modelo de um módulo beta propulsor. (II) Modelo de um módulo sanduíche beta. (III) Estrutura da enzima invertase destacando os módulos sanduíche beta, em vermelho, e o módulo propulsor beta, com cores distintas para cada uma de suas 5 lâminas.	24
Figura 5.	(A) Representação da superfície da enzima invertase <i>T. maritima</i> e (B) da superfície sobreposta ao esqueleto da proteína. (C) Visualização do potencial eletrostático de superfície da enzima; a cor vermelha indicando valores de potencial negativo e a cor azul valores de potencial positivo. (D) Destaque do sítio ativo da enzima, com os resíduos que fazem parte do sítio em verde, e os resíduos catalíticos Asp-17 em azul e Glu-190 em vermelho.	25
Figura 6.	Detalhe do sítio ativo da invertase do <i>T. maritima</i> evidenciando as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes. Os átomos de carbono são representados em branco, oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul.	26

- Figura 7.** (A) Modelagem da molécula de sacarose no sítio ativo da enzima invertase do *T. maritima*. Detalhes da numeração e nomenclatura adotada para as posições na molécula de sacarose (B) e de aminoácidos (C). 26
- Figura 8.** Representação esquemática da definição de engenharia de proteínas. 28
- Figura 9.** Célula unitária da magnetita (Fe_3O_4). Em vermelho íons O^{-2} ; em cinza claro os sítios tetraédricos, ocupados por íons Fe^{+3} e, em cinza escuro, os sítios octaédricos ocupados por íons Fe^{+3} e Fe^{+2} . 31
- Figura 10.** Processo de síntese das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. (I) Representação do sistema de síntese. (II) Adição das soluções no balão e no gotejador. (III) Adição da solução de íons ferro lentamente à solução básica sob agitação. (IV) Agitação do sistema por 5 min. (V) Decantação magnética das nanopartículas obtidas. 36
- Figura 11.** Esquematização do processo de funcionalização e imobilização de proteínas na superfície das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. A primeira etapa consiste na inserção de grupos amina ($-\text{NH}_2$) na superfície das nanopartículas. Em seguida, insere-se grupos carboxila à superfície por meio da reação do agrupamento amina com o glutaraldeído. Por fim, a proteína desejada é imobilizada na superfície das nanopartículas por meio da ligação covalente formada entre o grupo $-\text{CHO}$ na superfície das nanopartículas e agrupamentos $-\text{NH}-$ da estrutura da proteína. 37
- Figura 12.** Informações referentes aos clones da enzima invertase do *T. maritima*. (A) Sequência de aminoácidos da invertase nativa, sem mutações. (B) Mapa do vetor pET-28a(+), utilizado como vetor para a clonagem do gene da invertase. (C) Ilustração dos plasmídeos disponíveis, cada um com a sequência correspondente à uma das 40

enzimas invertase, nativa e mutantes.

- Figura 13.** Esquema para ilustrar o processo de transformação dos clones, expressão e purificação das proteínas invertase. **42**
- Figura 14.** Esquema do procedimento para quantificação de sacarose pelo método de DNS. **46**
- Figura 15.** Esquema do protocolo adotado para os testes de remoção e recuperação de sacarose utilizando o nanomaterial. **47**
- Figura 16.** Nanopartículas de magnetita sob a influência de um ímã de neodímio. (A) Tempo 0 s e (B) 90 s. **48**
- Figura 17.** Espectros no infravermelho das nanopartículas de magnetita recobertas e funcionalizadas. **49**
- Figura 18.** Quantidades relativas de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras de nanopartículas. **50**
- Figura 19.** Curvas de TG e DTG obtidas para as amostras de nanopartículas recobertas com sílica, funcionalizadas e com a BSA imobilizada. **52**
- Figura 20.** Curvas de TG (A) e DTG (B) para as amostras de nanopartículas analisadas. **53**
- Figura 21.** Distribuição de tamanho das nanopartículas recobertas e funcionalizadas. **54**
- Figura 22.** Microscopia obtida por STEM das amostras de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-BSA}$ e histograma obtido através da medida de tamanho das partículas na imagem. **55**

- Figura 23.** Microscopia obtida por AFM das amostras de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. **(A)** Região exploratória mapeada de $10 \times 5 \mu\text{m}^2$ na busca de pontos com partículas isoladas. **(B)** Região $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ evidenciando duas partículas isoladas na superfície da mica. **56**
- Figura 24.** Difractogramas de raios X obtidos para as nanopartículas nuas, funcionalizadas e com BSA imobilizado. **57**
- Figura 25.** Curvas de magnetização das amostras de nanopartículas de magnetita nuas funcionalizadas e com BSA imobilizado, obtidas à temperatura ambiente (300K). **58**
- Figura 26.** Resultados obtidos para a análise das frações obtidas na expressão e purificação das proteínas invertases. Géis SDS-PAGE 12% para as invertases 1 **(A)**, 2 **(B)**, 3 **(C)** e 4 **(D)**. Nos géis, as linhas L1 e L10 correspondem ao marcador de massa molecular, L2 à fração total após lise das células, L3 à fração insolúvel do lisado, L4 à fração solúvel do lisado, L5 ao *Flow Trough* da coluna, L6 à primeira lavagem da coluna, L7 à invertase eluída, L8 à segunda lavagem da coluna e L9 à fração obtida após o *desalting* da fração eluída. **59**
- Figura 27.** Gel SDS-PAGE 12% obtido para as frações contendo as enzimas invertases purificadas após o *desalting*. Nos géis, as linhas L1 e L6 correspondem ao marcador de massa molecular e, L2, L3, L4 e L5 às invertases 1, 2, 3 e 4 respectivamente. **60**
- Figura 28.** Curva analítica para quantificação de proteínas pelo método de Bradford. **61**
- Figura 29.** Aumento nas quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio para as amostras de proteínas invertase imobilizadas em relação às nanopartículas funcionalizadas com glutaraldeído ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$). **62**

- Figura 30.** Desvios da luz polarizada medidos para soluções de sacarose 0,1 mol L⁻¹ após incubação com as enzimas invertase 1, 2, 3 e 4 livres e imobilizadas. **63**
- Figura 31.** Espectros de fluorescência das invertases 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) em soluções com concentração crescente de sacarose. **65**
- Figura 32.** Curva analítica para a quantificação de sacarose. Curva obtida a partir do método de DNS para o intervalo de concentração de 0,1 a 1,0 mmol.L⁻¹ de sacarose. **66**
- Figura 33.** Concentrações de sacarose recuperadas à cada ciclo de aplicação das nanopartículas MNP@Inv1 e massa total de sacarose removida acumulada para os testes realizados com solução de sacarose concentrada (A) e com suco de laranja (B). **68**

Lista de tabelas

Tabela	Legenda	Página
Tabela 1.	Ligações de hidrogênio e contatos próximos entre a molécula de sacarose modelada e o sítio ativo da enzima invertase do <i>T. maritima</i> .	27
Tabela 2.	Atribuição das bandas presentes nos espectros de infravermelho das amostras de nanopartículas analisadas.	49
Tabela 3.	Tamanho, PDI e potencial zeta medidos para as nanopartículas recobertas e funcionalizadas.	54
Tabela 4.	Atribuição dos picos de difração obtidos para as amostras de nanopartículas.	57
Tabela 5.	Concentrações de proteína determinada para as alíquotas obtidas após o processo de <i>desalting</i> das invertases.	61
Tabela 6.	Dados obtidos a partir da imobilização das enzimas invertase nas nanopartículas.	61
Tabela 7.	Resultados obtidos para os testes de remoção de sacarose de solução de sacarose 0,1 mol.L ⁻¹ e suco de laranja industrializado realizados com a Fe ₃ O ₄ @Inv1.	67

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. A diabetes como epidemia.....	18
1.2. Enzimas invertase.....	19
1.3. Invertase do <i>Thermotoga maritima</i>.....	23
1.4. Engenharia de proteínas.....	28
1.5. Nanotecnologia.....	30
1.6. Nanopartículas magnéticas.....	30
1.7. Recobrimento de nanopartículas de magnetita.....	32
1.8. Imobilização de proteínas em nanopartículas.....	33
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivos específicos.....	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. Síntese de nanopartículas <i>core-shell</i> de magnetita e sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$).....	36
3.2. Funcionalização das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ com APTES.....	37
3.3. Funcionalização das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ com glutaraldeído....	37
3.4. Teste de imobilização de BSA nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COH}$.....	38
3.5. Caracterização das nanopartículas.....	38
3.5.1. Espectroscopia no infravermelho.....	38
3.5.2. Determinação de tamanho e potencial zeta.....	38
3.5.3. Análise elementar.....	38
3.5.4. Termogravimetria (TGA).....	39
3.5.5. Difração de raios X.....	39
3.5.6. Microscopia eletrônica de varredura por transmissão.....	39
3.5.7. Microscopia de força atômica (AFM).....	39

3.5.8. <i>Medidas de magnetização</i>	39
3.6. Informações sobre os clones.....	40
3.7. Transformação dos clones.....	41
3.8. Expressão e purificação das Invertases.....	43
3.9. Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford.....	44
3.10. Imobilização das Invertases.....	44
3.11. Teste de atividade das enzimas livres e imobilizadas.....	44
3.12. Espectroscopia de fluorescência.....	45
3.13. Quantificação de sacarose pelo método de DNS.....	45
3.14. Testes de remoção de sacarose.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5. CONCLUSÃO.....	70
6. PERSPECTIVAS.....	71
Referências.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Diabetes como uma epidemia

A diabetes é uma das doenças com o crescimento mais rápido no mundo com projeções de afetar cerca de 700 milhões de indivíduos adultos até o ano de 2045.¹ É hoje uma das maiores causas de mortalidade, estando dentre as 10 maiores causas de morte no mundo.² Dessa forma, é de extrema importância que se busquem soluções para controlar o avanço a doença e suas complicações.^{3,4}

A diabetes não é considerada uma única doença, mas sim, um conjunto de condições que são caracterizadas pela hiperglicemia devido a deficiência ou resistência do organismo a ação da insulina, hormônio responsável pelo controle da glicemia no organismo promovendo a entrada de glicose no meio intracelular. É uma desordem metabólica do sistema endócrino que leva aos altos níveis de glicose no sangue, causando complicações nos sistemas macro e microvasculares do organismo. A condição pode acarretar na diminuição da qualidade de vida dos indivíduos assim como aumentar o risco de mortalidade, levar a perda de visão, falha renal, problemas neurológicos, dentre outras várias complicações, além de elevar os custos de tratamento para os sistemas de saúde.^{1,5,6}

A condição pode ser ainda dividida entre dois tipos, a diabetes tipo 1 (DT1) e a diabetes tipo 2 (DT2). Em ambos os casos, a desordem leva à mesma condição, o alto nível persistente de glicose no sangue. Os dois tipos se diferenciam, portanto, na causa da origem da doença.

A DT1 é uma doença crônica autoimune na qual o sistema imune do indivíduo ataca e destrói as células β do pâncreas, responsáveis pela produção e secreção de insulina, levando à deficiência total de insulina no organismo, culminando na hiperglicemia. Este tipo da doença possui um componente genético, sendo hereditária, embora o mecanismo que desencadeia a condição ainda não seja totalmente compreendido. Há também casos nos quais a destruição das células pancreáticas não possui uma causa aparente, como a resposta autoimune, sendo a causa do desenvolvimento da DT1 desconhecida.^{7,8}

Por outro lado, a DT2 está mais associada à danos causados às células β do pâncreas por fatores ambientais, possuindo também fatores genéticos associados.⁹ O desenvolvimento da condição está relacionado à fatores como a obesidade, alimentação ou exposição a toxinas.^{1,3,9,10} A exposição a toxinas pode causar a danos às células pancreáticas levando a perda total ou parcial de sua capacidade de produzir insulina, levando a

hiperglicemia. O desenvolvimento da doença pode também estar associado ao consumo elevado de açúcares, levando à altos níveis de hiperglicemia por longos períodos de tempo, sobrecarregando as células β , que a longo prazo perdem a capacidade de secretar insulina, ou levar ao desenvolvimento de uma resistência do organismo à ação da proteína.^{9,11}

A insulina é um hormônio peptídeo que possui diferentes funções no que se refere à homeostase da glicose no organismo. Como o hormônio atua de diferentes formas, em diferentes tecidos e em diferentes vias metabólicas, seus mecanismos de ação e sinalização são complexos e não completamente compreendidos. Contudo, uma das funções da insulina é promover a entrada de moléculas de glicose no meio intracelular, permitindo que a glicose atravesse a membrana celular. Por isso, disfunções no organismo que levem a deficiência do hormônio ou resistência à sua ação levam a hiperglicemia, uma vez que a regulação da concentração de glicose no sangue perde eficiência.¹²

A DT2 é o tipo predominante de casos de diabetes, correspondendo à até 95% dos casos.^{3,13} Nesse cenário e tendo em vista que o consumo exagerado de açúcar está associado ao risco do desenvolvimento de DT2, a Federação Internacional do Diabetes (IDF) propõe 12 medidas visando a redução do consumo de açúcar pela população. Este trabalho relaciona-se diretamente com duas das medidas, sendo elas:¹⁴

- i. Revisão de diretrizes para uma alimentação saudável visando a redução do consumo de alimentos naturalmente com um alto teor de açúcar;
- ii. Regulamentação para a reformulação de alimentos processados a fim de reduzir seu teor de açúcar.

Dessa maneira, o projeto visa o desenvolvimento de um nanomaterial capaz de remover seletivamente a sacarose de soluções complexas, que possa ser aplicado para reduzir o teor de sacarose em produtos alimentícios, como sucos de fruta e outras bebidas.

1.2. Enzimas invertase

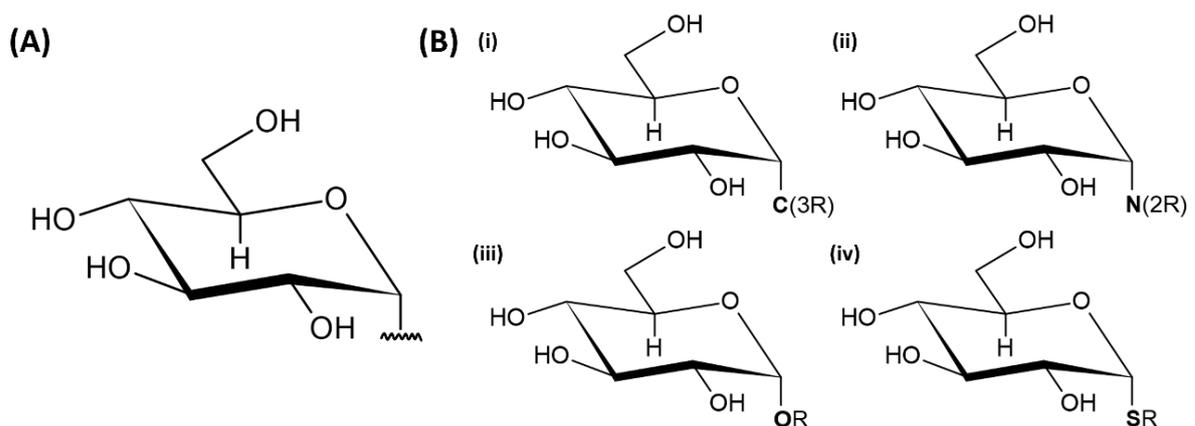
Considerando-se o objetivo da remoção seletiva da sacarose de misturas complexas, escolheu-se a enzima invertase como agente sequestrador de sacarose. Deseja-se utilizar da alta especificidade existente entre a enzima e o substrato para alcançar a captura da sacarose.

As enzimas invertase (EC 3.2.1.26) podem também ser chamadas de beta-fructofuranosidase ou ainda beta-fructosidase. São proteínas globulares que catalisam a reação de hidrólise da sacarose, amplamente distribuídas entre diferentes organismos na biosfera.^{15,16}

No que se refere à sua classificação, as invertases compõem a classe das enzimas Hidrolases (EC 3), que catalisam a quebra de ligações químicas por meio por meio de uma reação de hidrólise utilizando uma molécula de água. São inseridas na subclasse das Glicosilases (EC 3.2), sendo chamadas de glicosil hidrolases (GH), responsáveis por catalisar a hidrólise de compostos glicosídeos, que podem ser definidos como moléculas que possuem um grupo glicosil ligado à sua estrutura.

Um grupo glicosil é um radical derivado de um monossacarídeo que perde a hidroxila do grupo hemiacetal (-CH(OH)O-) por onde liga-se ao restante da estrutura por meio de uma ligação glicosídica (**Figura 1A**). Os compostos glicosídeos podem ser classificados como C-glicosídeos (**Figura 1Bi**), N-glicosídeos (**Figura 1Bii**), O-glicosídeos (**Figura 1Biii**) e S-glicosídeos (**Figura 1Biv**) de acordo com o átomo que forma a ligação glicosídica com o grupo glicosil.^{17,18}

Figura 1: Representação da estrutura de compostos glicosídeos. Estrutura de um radical glicosil (**A**). Estrutura de compostos C-glicosídeos (**Bi**), N-glicosídeos (**Bii**), O-glicosídeos (**Biii**) e S-glicosídeos (**Biv**).

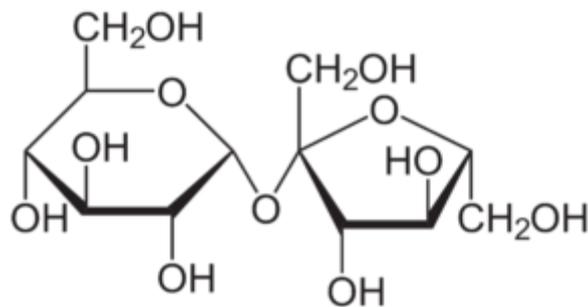


As enzimas pertencentes à família das GH podem ser divididas ainda em 2 grupos, o primeiro compreendendo as que catalisam a hidrólise de compostos S- e O-

glicosídeos (3.2.1) e o segundo as que hidrolisam compostos N-glicosídeos (3.2.2). As enzimas invertases fazem parte do primeiro grupo.

Assim, as enzimas invertase fazem parte do grupo das Glicosil Hidrolases (GH), que são um amplo grupo de enzimas que apresentam a característica comum de terem dois resíduos de aminoácidos que agem como resíduos catalíticos e catalisam a hidrólise da ligação glicosídica $\text{Glc}(\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta)\text{Fru}$ entre a d-glicose e d-frutose na molécula de sacarose (Figura 2).¹⁵ Em invertases provenientes de leveduras, a literatura reporta que estes dois resíduos são, invariavelmente, um aspartato localizado próximo do terminal N (Asp-23), que age como um nucleófilo, e uma glutamina (Glu-204), que age como doador de prótons numa reação ácido/base.²⁰

Figura 2: Fórmula estrutural da sacarose, evidenciando a ligação glicosídica entre os monômeros de glicose e frutose.

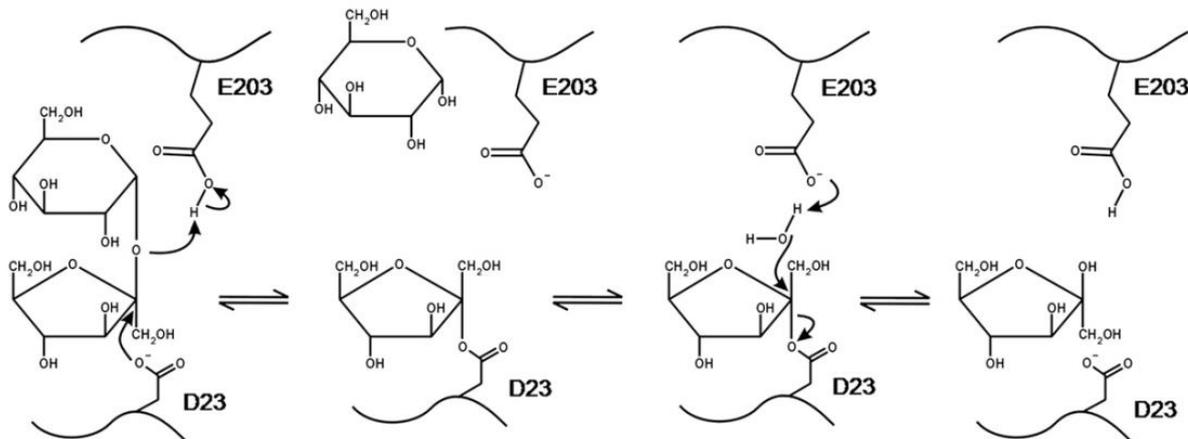


O nome invertase deriva de uma das aplicações mais usuais dessas enzimas, a produção de açúcar invertido, uma mistura de glicose e frutose utilizada na indústria de alimentos como adoçante e estabilizante, a partir da hidrólise enzimática da sacarose. Contudo, apesar do nome, a enzima não altera a estereoquímica dos monômeros que compõe a sacarose, que mantém sua configuração após a catálise enzimática, fornecendo uma mistura de d-frutose e d-glicose.¹⁹

O mecanismo de hidrólise da sacarose pela invertase está esquematizado na Figura 3. Na primeira etapa ocorre a protonação do oxigênio da ligação glicosídica da sacarose pelo resíduo de ácido glutâmico e, em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio negativamente carregado do aspartato ao carbono-2 da frutose, resultando na formação do complexo enzima-substrato. Então, a ligação glicosídica é rompida e a glicose é

liberada. Por fim, ocorre a hidrólise da ligação formada entre o carbono-2 da frutose e o aspartato, ocorrendo a liberação da frutose e da reconstituição do sítio ativo da enzima.^{21,22}

Figura 3: Mecanismo de clivagem da ligação glicosídica da sacarose pela enzima invertase.



Fonte: Lammens *et al.* 2008.²¹

No que se refere à sua estrutura, as enzimas invertases possuem grande parte de sua estrutura secundária composta de folhas beta e *loops*. Ainda, a literatura aponta que enzimas da família GH32, incluindo a invertase, possuem dois domínios, um domínio catalítico beta-propulsor no N-terminal ligado à um domínio sanduíche beta no C-terminal da sequência.¹⁵

Invertases podem ainda existir em duas formas, extracelular e intracelular. As invertases extracelulares são glicoproteínas, ou seja, contém carboidratos ligados à estrutura adicionados por meio de modificações pós-traducionais. Já as invertases intracelulares, não sofrem modificações e, portanto, não possuem cadeias de carboidratos na estrutura.¹⁶ Em relação à sua atividade existe ampla variedade de invertases, que variam entre sua faixa de pH e temperatura ideais de funcionamento.¹⁵

As enzimas invertases são de grande importância industrial, sendo utilizadas pelo setor há muito tempo e possuem aplicações em diversos segmentos, como na indústria alimentícia, farmacêutica, biocombustíveis e até no desenvolvimento de biosensores.^{15,23} Contudo, a aplicação de invertases de uso comum na indústria em processos que ocorrem sob alta temperatura não é possível devido a degradação e perda de atividade dessas enzimas.

Nesse cenário, enzimas produzidas por microrganismos termófilos são de interesse econômico devido à sua atividade e estabilidade sob condições de alta temperatura, possibilitando sua aplicação em processos industriais realizados sob condições mais extremas.²⁴

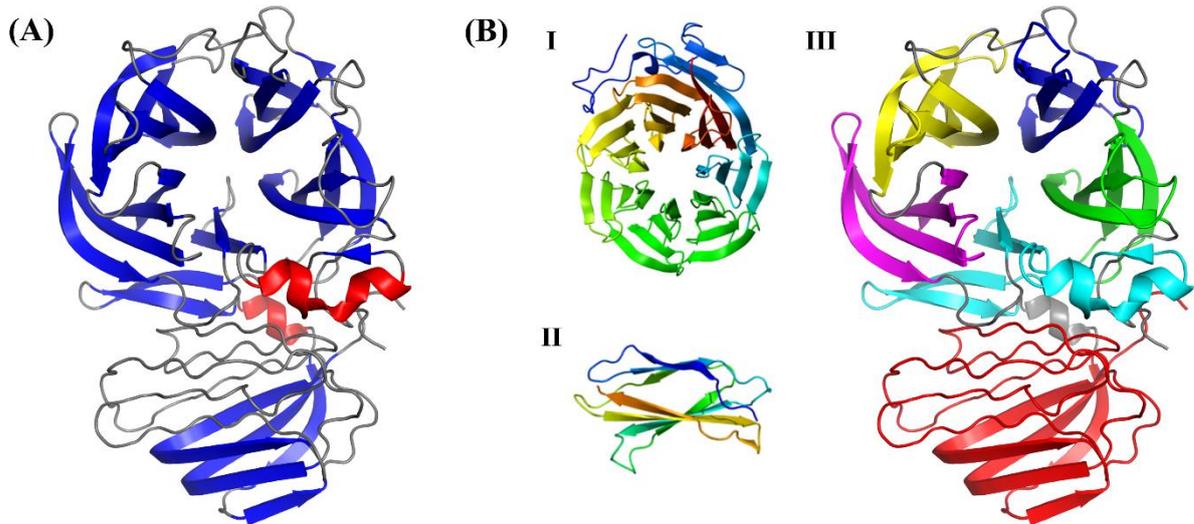
1.3. Invertase do *Thermotoga maritima*

A enzima invertase derivada do organismo *Thermotoga maritima* (EC 3.2.1.26-O33833; PDB 1UYP) foi reportada pela primeira vez na literatura por Liebl e colaboradores em 1998.²⁵ *T. maritima* é uma espécie de bactéria termófila anaeróbica com crescimento máximo em temperaturas de cerca de 90 °C. A invertase produzida pelo organismo, cuja biossíntese é codificada pelo gene *bfrA* da cepa MSB8 da bactéria, é uma enzima termoestável formada por 432 resíduos de aminoácidos, com massa ao redor de 49,8 kDa. A proteína é capaz de realizar a hidrólise de sacarose e de alguns outros poucos substratos devido à sua promiscuidade.²⁵

Liebl reporta que a enzima possui temperatura ótima de funcionamento entre 90 e 95 °C, pH ótimo de 5,5 e k_{cat}/k_m de cerca de $4,1 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a hidrólise de sacarose. Além disso, a invertase do *T. maritima* apresenta alta resistência à inativação térmica, mantendo grande parte de sua atividade mesmo após longos períodos de exposição a elevadas temperaturas.²⁵ De acordo com a literatura, a invertase do *T. maritima* é ainda hoje a melhor fonte de invertase termoestável para uso industrial.²⁶

A estrutura da invertase do *T. maritima* foi reportada na literatura alguns anos depois por Alberto e colaboradores. A Figura 4, apresentada a seguir, discute características da estrutura conforme dados depositados no *Protein Data Bank* (PDB). A proteína tem cerca de 49,3% de seu conteúdo em folhas beta e cerca de 3,5% de hélices alfa, conforme evidenciado na Figura 4A. A estrutura, consiste em dois módulos distintos, um domínio beta propulsor e um domínio sanduíche beta ligados por um linker de 10 resíduos.^{19,27} Um módulo beta propulsor (Figura 4B-I) consiste num arranjo de folhas beta organizadas ao redor de um eixo formando uma estrutura semelhante à um funil, geralmente formando uma cavidade em cada uma das extremidades da estrutura. Já um módulo sanduíche beta (Figura 4B-II), consiste em duas ou mais folhas betas, empilhadas umas sobre as outras formando a estrutura que se assemelha à um sanduíche.

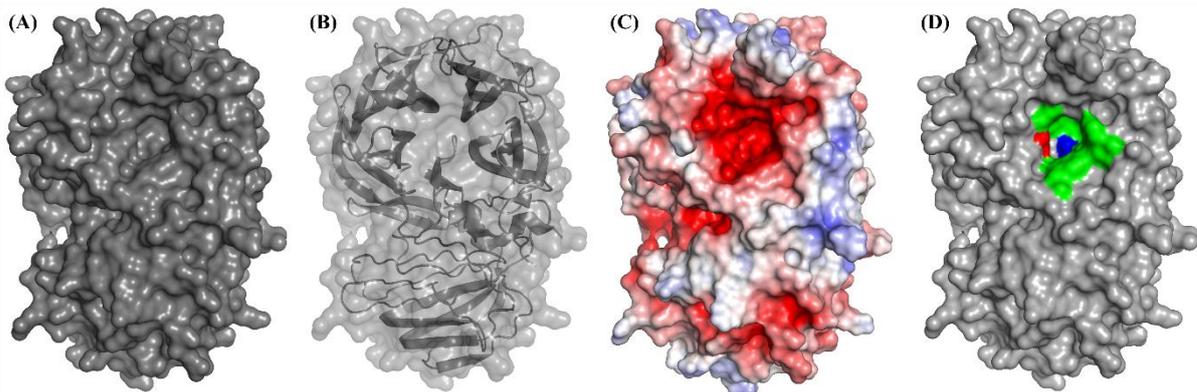
Figura 4: Representação em *cartoon* da estrutura da enzima invertase do *T. maritima*. **(A)** Visualização do conteúdo de folhas beta, em azul, e hélices alfa, em vermelho, na estrutura da proteína. **(B)** Visualização dos domínios que compõem a estrutura da enzima; **(I)** Modelo de um módulo beta propulsor. **(II)** Modelo de um módulo sanduíche beta. **(III)** Estrutura da enzima invertase destacando os módulos sanduíche beta, em vermelho, e o módulo propulsor beta, com cores distintas para cada uma de suas 5 lâminas.



A Figura 4B-III apresenta uma visualização da enzima invertase do *T. maritima* destacando os domínios que a compõem. O módulo sanduíche beta, representado em vermelho, está localizado no C-terminal da proteína, correspondendo aos resíduos 306 a 432, sua função para enzima é, até o momento, desconhecida. O módulo beta propulsor, está representado em cores distintas para cada uma das lâminas que o compõem e correspondente aos resíduos de 1 a 295, localizado no N-terminal da estrutura; o domínio possui a função catalítica da, compreendendo o sítio ativo de clivagem.

A Figura 5 apresenta a visualização da superfície da enzima invertase do *T. maritima*. O sítio catalítico da enzima está localizado na cavidade do módulo beta propulsor da proteína conforme pode ser observado na figura. O sítio ativo possui carga negativa derivada principalmente de três grupos carboxílicos que apontam para o centro da cavidade, estes, são pertencentes aos resíduos de Asp-17, Asp-138 e Glu-190, o que pode ser mais facilmente visualizado na Figura 5C, que apresenta o potencial eletrostático de superfície da proteína.

Figura 5: (A) Representação da superfície da enzima invertase *T. maritima* e (B) da superfície sobreposta ao esqueleto da proteína. (C) Visualização do potencial eletrostático de superfície da enzima; a cor vermelha indicando valores de potencial negativo e a cor azul valores de potencial positivo. (D) Destaque do sítio ativo da enzima, com os resíduos que fazem parte do sítio em verde, e os resíduos catalíticos Asp-17 em azul e Glu-190 em vermelho.



O sítio ativo da enzima é destacado na Figura 5D, que apresenta todos os resíduos que fazem parte do sítio destacados. Para a invertase do *T. maritima*, os resíduos catalíticos são o Asp-17, que age como nucleófilo, e o Glu-190, que age como ácido/base na reação de hidrólise da ligação glicosídica da sacarose. Os demais resíduos no sítio catalítico atuam no reconhecimento e ligação substrato à enzima e na estabilização da sacarose durante a catálise, sendo eles: Asn-17, Gln-33, Trp-41, Ser-75, Arg-137, Asp-138, Tyr-240 e Trp-260.^{15,19,27}

A Figura 6 apresenta uma representação do sítio catalítico mais detalhada. A figura evidencia as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que compõem a cavidade da proteína e participam do processo de hidrólise da sacarose.

Alberto e colaboradores reportam a modelagem de uma molécula de sacarose no sítio ativo da enzima (Figura 7A). As distâncias entre os resíduos que compõem o sítio da molécula de sacarose modelada são descritas na Tabela 1. A numeração dos átomos na molécula de sacarose é feita conforme a Figura 7B e os sufixos identificando os resíduos de aminoácidos na tabela correspondem à posição na estrutura dos respectivos aminoácidos de acordo com o exemplo da Figura 7C.¹⁹

Figura 6: Detalhe do sítio ativo da invertase do *T. maritima* evidenciando as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes. Os átomos de carbono são representados em branco, oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul.

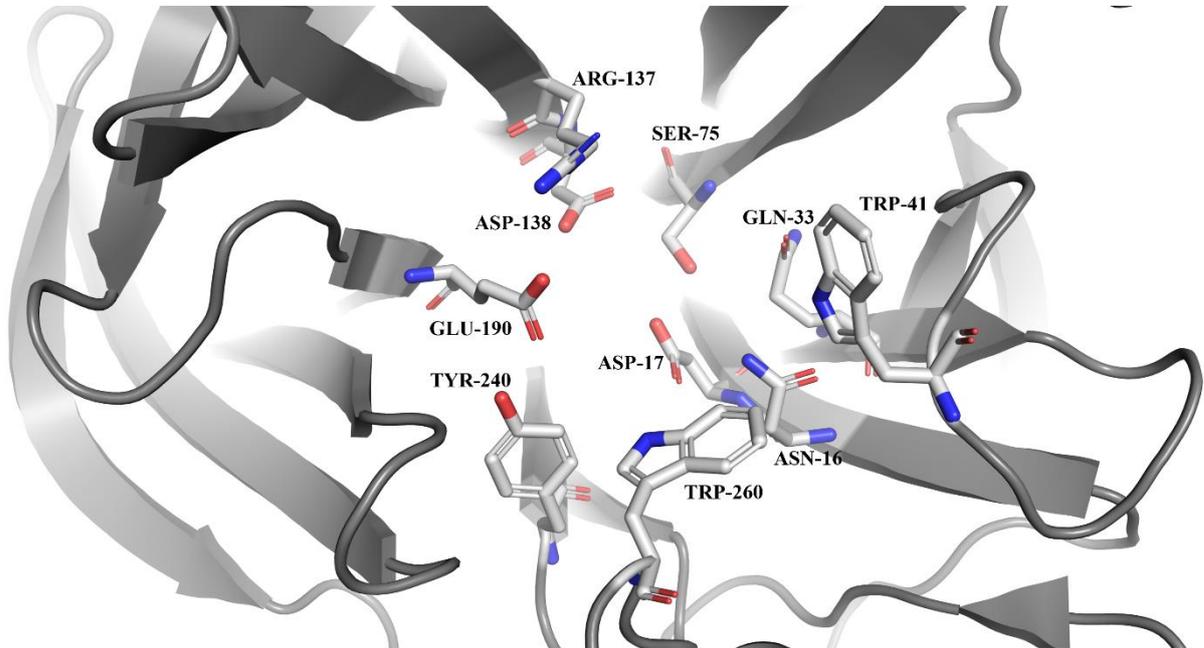
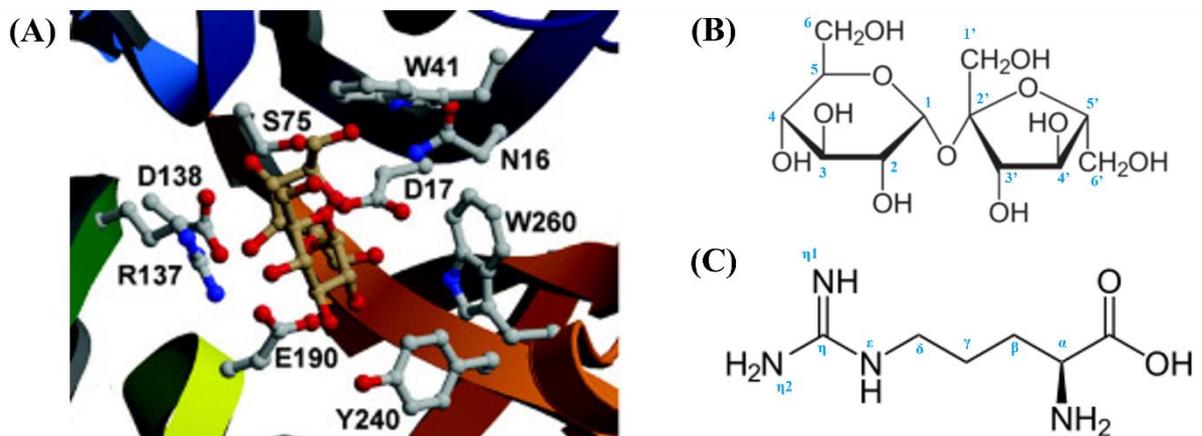


Figura 7: (A) Modelagem da molécula de sacarose no sítio ativo da enzima invertase do *T. maritima*. Detalhes da numeração e nomenclatura adotada para as posições na molécula de sacarose (B) e de aminoácidos (C).



Fonte: (A) Alberto, F. *et al.*¹⁹

Tabela 1: Ligações de hidrogênio e contatos próximos entre a molécula de sacarose modelada e o sítio ativo da enzima invertase do *T. maritima*

Posição na Sacarose		Resíduo da Invertase	Distância (Å)
Frutose	O1'	Asp17-O- δ 1	2,9
		Asp17-O- δ 2	3,4
		Glu190-O- ϵ 1	3,4
		Trp260-N- ϵ 1	3,4
	O2'	Asp17-O- δ 2	3,4
		Asn16-N- δ 2	3,5
	O3'	Glu190-O- ϵ 2	2,9
		Glu190-O- ϵ 1	3,6
		Arg137-N- ϵ	2,9
		Asp138-O- δ 1	3,3
		Asp138-O- δ 2	2,5
	O4'	Asp138-O- δ 1	2,6
		Ser75-N	3
		Ser75-O- γ	3,4
	C6'	Phe74-C- γ	3,9
	O6'	Asn16-N- ϵ 2	3,3
		Gln33-O- ϵ 1	3,3
		Trp41-N- ϵ 1	2,6
	C2'	Asp17-O- δ 2	3,6
Glicose	O1	Glu190-O- ϵ 1	3,1
		Glu190-O- ϵ 2	3
	O2	Glu190-O- ϵ 1	2,7
		Tyr240-N- η	4
	O4	Arg137-N- η 1	3
		Arg137-N- η 2	3,8

Fonte: Adaptado de Alberto, F. *et al.*¹⁹

Em trabalhos subsequentes, os autores reportam a estrutura da enzima invertase do *T. maritima* inativada em complexo com uma molécula de rafinose. A estrutura determinada corrobora os dados apresentados anteriormente para a modelagem da sacarose no sítio ativo.²⁷ Contudo, a literatura não apresenta ainda dados estruturais para a enzima ligada à sacarose.

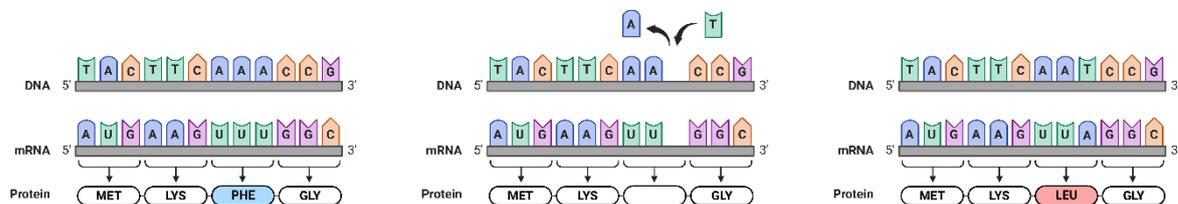
1.4. Engenharia de proteínas

Uma vez que a proposta do projeto é a remoção de sacarose de misturas complexas e sua recuperação na forma não hidrolisada, propõe-se a utilização de enzimas invertase engenheiradas. Por meio da substituição de resíduos chave para sua atividade catalítica, deseja-se que as enzimas mutadas mantenham sua capacidade de reconhecer e ligar-se a sacarose, mas percam sua atividade catalítica, possibilitando a recuperação da sacarose sem que ocorra sua hidrólise formando glicose e frutose.

Enzimas nativas, sem mutações, possuem determinadas limitações quanto à sua aplicação em processos industriais como biocatalisadores.²⁸ Baixa eficiência ou falta de estabilidade sob condições não fisiológicas são problemas frequentes na aplicação destes compostos em processos industriais. Existem exceções, como a invertase do *T. marítima*, que possui alta estabilidade térmica, porém esses casos não são comuns. Neste contexto, a engenharia de proteínas é uma ferramenta útil para a obtenção de enzimas com propriedades melhoradas para estas aplicações.²⁹

Define-se engenharia de proteínas como qualquer alteração na sequência de uma proteína nativa visando a obtenção de proteínas com novas ou melhores características ou propriedades, conforme desejado (Figura 8).³⁰ A área de maior aplicação da engenharia de proteínas é a área de aperfeiçoamento de enzimas.³¹

Figura 8: Representação esquemática da definição de engenharia de proteínas.



No que se refere a enzimas, essas melhorias podem ser o aumento de sua eficiência catalítica, da estabilidade térmica, da estabilidade em valores de pH não fisiológicos ou em solventes orgânicos. Outras propriedades que podem ser alteradas podem ser a especificidade da enzima com algum substrato ou até mesmo seu mecanismo de catálise para a formação de produtos distintos dos gerados pela enzima nativa.^{30,31} Neste trabalho, busca-se a perda da

atividade catalítica da invertase do *T. maritima* mantendo sua capacidade de reconhecer e ligar-se a sacarose.

O amplo entendimento sobre a estrutura e função de proteínas é essencial para o sucesso da engenharia de proteínas, uma vez que sua função está diretamente relacionada à sua estrutura. Esta última, por sua vez, estando intimamente atrelada à sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica.³⁰

A modificação da sequência de aminoácidos de uma proteína é feita por meio da mutação genética da sequência de DNA, ou RNA, que codifica sua biossíntese, por meio de técnicas de engenharia genética. As duas abordagens mais utilizadas na engenharia de proteínas são a evolução dirigida e a mutação sítio-dirigida.³²

De maneira simplificada, a evolução dirigida de proteínas consiste em mutações randômicas realizadas em determinada região do genoma de um organismo, dando origem a uma biblioteca de mutantes distintos. Esses mutantes passam então por etapas de triagem a fim de selecionar aqueles que produzem proteínas com as propriedades desejadas. Como vantagem, a aplicação desse método não requer conhecimentos prévios em relação à estrutura, função ou sequência da proteína que se deseja melhorar. No entanto, uma vez que as mutações são randômicas, a maior desvantagem do método pode ser o esforço exaustivo durante a etapa de triagem dos mutantes obtidos.^{29,30,33}

Por outro lado, a técnica de mutação sítio dirigida consiste na substituição de um ou múltiplos resíduos de aminoácidos específicos na sequência de uma proteína. As substituições podem ter como alvo os resíduos catalíticos ou outros resíduos que compõem o sítio ativo da enzima na tentativa de alterar sua atividade catalítica. Resíduos que compõem a superfície de uma proteína também podem ser alvo da substituição caso se deseje melhorar sua estabilidade em algum meio específico ou direcionar a imobilização da proteína em algum suporte por meio de um resíduo específico. É possível também ter como alvo resíduos chave para o enovelamento da proteína buscando a alteração de sua estrutura terciária de forma a melhorar suas propriedades. Uma vez que nessa abordagem as mutações são específicas, não randômicas, um conhecimento prévio sobre a estrutura e a função da proteína alvo é essencial para se determinar os alvos da substituição de forma precisa para atingir a melhoria das propriedades desejadas.^{30,32}

1.5. Nanotecnologia

Nanomateriais são uma classe de materiais que possuem ao menos uma de suas dimensões na escala nanométrica. Tais materiais apresentam propriedades únicas e distintas da matéria em macro escala, o que os torna de grande interesse em diversas áreas de aplicação. Dentre as propriedades únicas desses materiais pode-se destacar sua grande área superficial, comparada com materiais em maior escala, sua atividade catalítica, magnetismo, altas condutividades térmica e elétrica, atividade antimicrobiana e até a possibilidade de servirem de suporte para catalisadores ou medicamentos.³⁴

Nanopartículas podem ser obtidas por meio de diversos métodos, que podem ser divididos em dois conjuntos: métodos *top-down* ('cima à baixo', traduzido do inglês), que contempla métodos de síntese baseados na divisão de materiais em maior escala até a obtenção de partículas em nanoescala e; métodos *bottom-up* ('baixo à cima', traduzido do inglês), que agrupa métodos de síntese a partir da escala molecular ou atômica formando partículas maiores. Ainda, os métodos de síntese podem ser físicos, como moagem, ablação a laser e pirólise; químicos, como o método sol-gel, microemulsão; eletroquímicos; ou biológicos baseados em microrganismos ou plantas.³⁵

Embora relativamente novos, esses materiais já possuem aplicações em uma ampla variedade de áreas. Podendo ser utilizados como catalisadores, no desenvolvimento de sensores, novos materiais, em tratamentos nas áreas médicas e farmacêutica, diagnósticos de doenças, remediação ambiental, produção de energia, entre outros.^{34,36,37}

1.6. Nanopartículas magnéticas

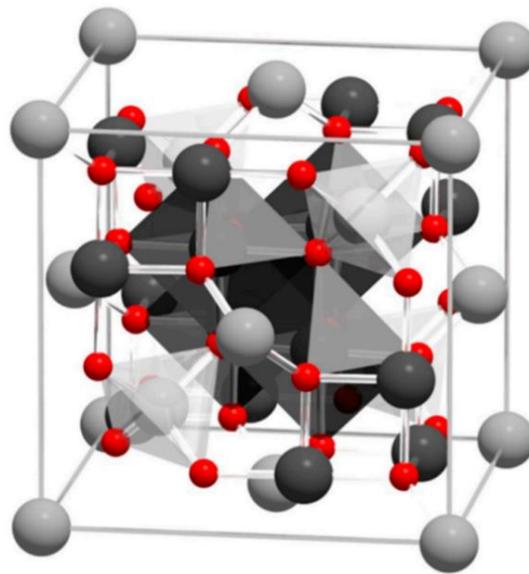
Dentre os nanomateriais, as nanopartículas magnéticas são de interesse devido a suas ótimas propriedades magnéticas. Ao longo dos últimos anos, o desenvolvimento de métodos para a síntese e aplicação de nanopartículas magnéticas recebeu uma grande atenção, especialmente as nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4).³⁵ A popularidade das nanopartículas de magnetita se deve à facilidade do processo de síntese, sua versatilidade, o baixo custo associado à sua obtenção e sua alta biocompatibilidade.³⁸

A magnetita é um minério de ocorrência natural em sistemas geológicos e biológicos, sendo uma das formas mais comuns de óxido de ferro encontrada na natureza.³⁹ A magnetita possui a estrutura de espinélio invertido, que consiste numa estrutura cúbica de face

centrada com sítios octaédricos e tetraédricos ocupados por átomos de ferro e com íons O^{2-} ocupando os interstícios da estrutura. No interior das células, os sítios tetraédricos são ocupados exclusivamente por íons férricos (Fe^{3+}); enquanto que metade dos sítios octaédricos são ocupados por íons ferrosos (Fe^{2+}) e a outra metade por íons Fe^{3+} . Assim, a proporção de íons é de $1Fe^{2+}:2Fe^{3+}$ na estrutura da magnetita (Figura 9).^{35,40-42}

Fatores como o tamanho e morfologia tem um grande impacto nas propriedades químicas e físicas das nanopartículas de magnetita. Nanopartículas com tamanho inferior à 20 nm, apresentam superparamagnetismo à temperatura ambiente, o que confere às partículas excelentes propriedades magnéticas.^{38,39}

Figura 9: Célula unitária da magnetita (Fe_3O_4). Em vermelho íons O^{2-} ; em cinza claro os sítios tetraédricos, ocupados por íons Fe^{3+} e, em cinza escuro, os sítios octaédricos ocupados por íons Fe^{3+} e Fe^{2+} .

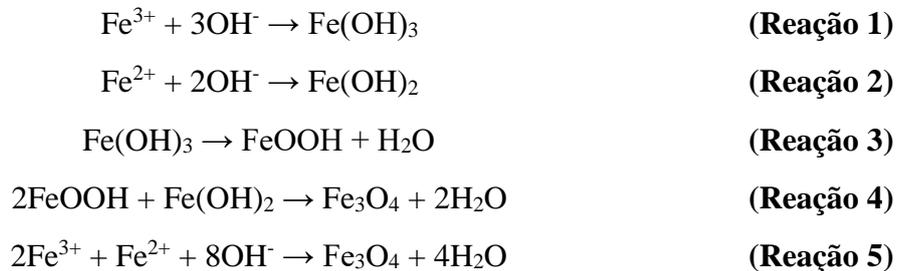


Fonte: Dudchenko, N. *et al.*³⁵

Um dos métodos mais simples para a obtenção de nanopartículas de magnetita é o método da coprecipitação. O método consiste basicamente na precipitação simultânea de sais de íons férrico e ferrosos em um meio básico. Brevemente, a síntese é feita utilizando uma solução contendo íons Fe^{2+} e Fe^{3+} numa proporção predefinida e uma solução básica, que são

misturadas lentamente sob agitação vigorosa. A elevação do pH do meio promove a precipitação dos sais de ferro formando as nanopartículas de magnetita.^{35,38,43}

No processo de coprecipitação, a formação das nanopartículas pode ser explicada de acordo com o mecanismo simplificado representado pela sequência de reações apresentada a seguir. Primeiramente, ocorre a precipitação de hidróxido férrico e hidróxido ferroso na solução (Reação 1 e 2), em seguida o hidróxido férrico é decomposto em FeOOH (Reação 3) que, por fim, reage com o hidróxido ferroso formando a magnetita (Reação 4). O processo pode ser descrito pela equação global apresentada na Reação 5.³⁵



A ampla utilização dessa abordagem na síntese de nanomateriais magnéticos é devido à grande simplicidade, rapidez, rendimento e reprodutibilidade, uma vez que se tenham definidas as condições de síntese. As propriedades das partículas podem ser controladas ajustando as condições de síntese como o tipo e a concentração inicial dos sais de ferro, temperatura, agitação, pH ou o meio reacional.^{38,43}

Uma desvantagem do método é que as partículas obtidas possuem uma distribuição larga de tamanho e morfologia variável.³⁸ No entanto, para a aplicação proposta, não será necessário um controle rigoroso dessas propriedades e, sendo assim, a simplicidade e reprodutibilidade do método o tornam o mais favorável para aplicação.

1.7. Recobrimento de nanopartículas de magnetita

Apesar das ótimas propriedades destacadas desses nanomateriais, nanopartículas de magnetita são instáveis e certas estratégias são necessárias para torná-las viáveis para aplicações.⁴⁴ Nanopartículas de magnetita tem uma alta tendência a agregação logo após sua síntese, devido à alta energia associada à grande área superficial desses materiais, sendo

difícil mantê-las em uma suspensão estável e evitar precipitação.⁴³ Ainda, a magnetita é facilmente oxidada quando exposta à oxigênio, formando maghemita (Fe_2O_3); uma vez que ambos os minerais são magnéticos, essa conversão não é um problema como um todo, mas ainda se faz necessário a determinação de qual das fases compõem as nanopartículas.³⁸

Uma forma de proteger esses materiais não apenas contra a oxidação e aglomeração é o recobrimento de sua superfície com camadas protetoras que tornam essas partículas mais estáveis. Além de tornar as nanopartículas mais estáveis, essas camadas protetoras podem servir também como suporte para funcionalização das partículas, sendo possível imobilizar compostos de interesse em sua superfície.^{43,45}

O recobrimento das nanopartículas com camadas de sílica é um processo comum e bem estabelecido na literatura. O recobrimento torna as nanopartículas mais estáveis e inertes além de também proteger o núcleo magnético de interações indesejáveis de espécies diretamente com a superfície da magnetita. Além disso, a camada de sílica tem apenas um efeito pequeno na magnetização das partículas, melhora a hidrofobicidade, a biocompatibilidade e ainda pode ser facilmente funcionalizada de acordo com a necessidade.⁴⁶⁻⁴⁸

A literatura apresenta diversos métodos para o recobrimento das nanopartículas de magnetita com uma camada de sílica, sendo o método de Stöber o mais comum. No geral, esses métodos fazem a utilização de compostos que possuem grupos silano em sua estrutura ou sais de silicato, que se depositam na superfície das partículas em meio básico formando a camada protetora.^{45,49}

1.8. Imobilização de proteínas em nanopartículas

A fim de possibilitar a recuperação da invertase inativada aplicada para a remoção de sacarose, propõe-se a utilização de nanopartículas de magnetita como suporte para sua imobilização. As propriedades magnéticas das nanopartículas de magnetita possibilitam que a enzima e as proteínas imobilizadas sejam aplicadas, recuperadas e reutilizadas em vários ciclos no processo.

A imobilização de enzimas em suportes nanomagnéticos é uma área de grande crescimento devido ao interesse industrial nesses sistemas, uma vez que a imobilização de enzimas em suportes como nanopartículas melhora suas propriedades para aplicação em

processos industriais.⁵⁰ Vários desses materiais já foram desenvolvidos para diversas aplicações como a produção de biocombustíveis, tratamento de biomassa, sensores, medicina e indústria farmacêutica.⁵¹⁻⁵⁵

A imobilização pode aumentar a estabilidade e resistência térmica das enzimas, bem como permitir seu funcionamento em um maior intervalo de pH e permitir sua reciclagem.^{44,56} No caso da utilização de suportes magnéticos, a principal vantagem é a facilidade de se separar o nanomaterial do meio em relação a outros processos de separação convencionais, como centrifugação.^{55,57}

A imobilização das proteínas pode ser feita de diferentes formas como adsorção à superfície, *cross-linking*, aprisionamento por uma rede polimérica e por ligações covalentes.⁵⁰ O método mais utilizado é a formação de ligações covalentes entre a proteína e um suporte imobilizado na superfície da nanopartícula.⁴⁴ Nesse caso, a ligação covalente é formada entre um grupo funcional da cadeia lateral de algum resíduo de aminoácidos da superfície da enzima e um grupo funcional presente na superfície da nanopartícula. Esse método específico faz com que a ligação proteína-nanopartícula seja forte, evitando a separação da proteína do suporte magnético.⁵⁰

Assim, antes da imobilização da enzima, as nanopartículas de magnetita recobertas por sílica são geralmente funcionalizadas com 3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) para inserir grupos amina na superfície da partícula. Os grupos amina inseridos são os locais onde a proteína se ligará covalentemente à nanopartícula na etapa de imobilização com o auxílio do glutaraldeído, que mediará a interação entre a enzima e a nanopartícula.^{48,58}

Dessa forma, o nanomaterial proposto será constituído das enzimas invertase, nativa e inativadas, imobilizadas na superfície de nanopartículas de magnetita. As enzimas utilizadas serão invertases do *Thermotoga maritima* (*T. maritima*) em sua forma nativa e também com mutações em resíduos específicos de sua sequência de forma a melhorar suas propriedades para a aplicação proposta.

2. OBJETIVO

Desenvolver um nanomaterial magnético baseado em enzimas invertases termoestáveis imobilizadas em nanopartículas *core-shell* de magnetita e sílica para aplicação em processos de captura seletiva e recuperação de sacarose de misturas complexas.

2.1. Objetivos específicos

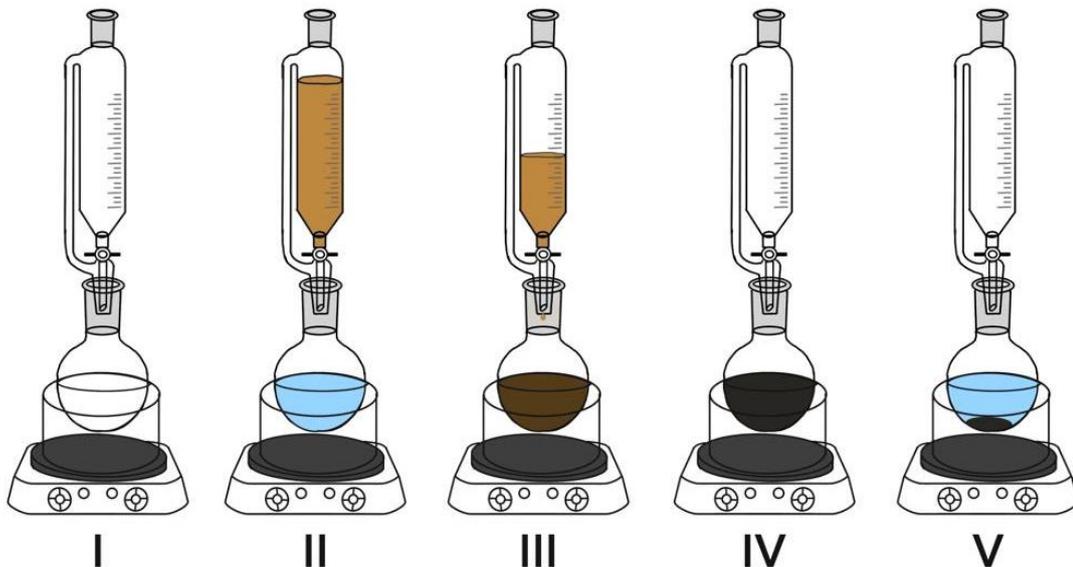
- Sintetizar e caracterizar nanopartículas *core-shell* de magnetita e sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) para aplicação como suporte para a imobilização de enzima invertase nativa e mutantes;
- Expressar e purificar proteínas alvo engenheiradas do *T. maritima*;
- Funcionalizar a superfície das nanopartículas e imobilizar as proteínas alvo no suporte nanomagnético;
- Aplicar o nanomaterial em processos para a captura seletiva e recuperação de sacarose de misturas complexas.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese de nanopartículas *core-shell* de magnetita e sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$)

A síntese das nanopartículas foi conduzida conforme adaptação do procedimento reportado por Kazemzadeh H. *et al.*⁴⁵ A Figura 10 ilustra o processo de síntese das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Primeiramente, 20 mL de uma solução aquosa contendo íons Fe^{3+} (1 mol L^{-1}) e Fe^{2+} ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) na proporção molar de 2:1 foi preparada utilizando os sais FeCl_3 e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e transferida para um gotejador. Então, adicionou-se, 20 mL de solução aquosa de NaOH 8 mol L^{-1} e 10 mL de solução aquosa de Na_2SiO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ a um balão de fundo redondo (II). Em seguida, sob agitação magnética vigorosa e a temperatura ambiente, adicionou-se a solução de íons ferro na solução básica gotejando lentamente (cerca de 1 mL por min) (III). Finalizada a adição da solução de ferro manteve-se a agitação do sistema por mais 5 min (IV). Por fim, as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ formadas foram decantadas com o auxílio de um ímã de neodímio, separadas do sobrenadante, lavadas três vezes com água Milli-Q, duas vezes com etanol anidro secas por liofilização e armazenadas (V).

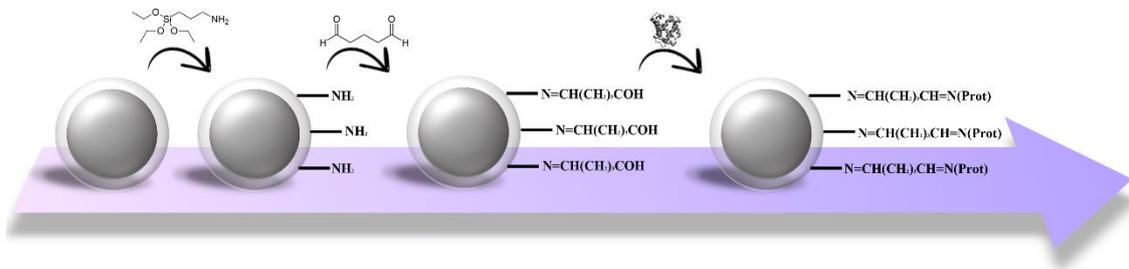
Figura 10: Processo de síntese das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. (I) Representação do sistema de síntese. (II) Adição das soluções no balão e no gotejador. (III) Adição da solução de íons ferro lentamente à solução básica sob agitação. (IV) Agitação do sistema por 5 min. (V) Decantação magnética das nanopartículas obtidas.



3.2. Funcionalização das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ com APTES

Foram pesados 250 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e ressuspendeu-se em 40 mL de etanol anidro com auxílio de banho ultrassônico por 30 min. Em seguida, adicionou-se 500 μL de APTES e deixou-se o sistema fechado, sob agitação magnética vigorosa (600 rpm) por um período de 24 h a temperatura ambiente. Por fim, as nanopartículas funcionalizadas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ obtidas foram separadas magneticamente do meio, lavadas com alíquotas de 10 mL de água Milli-Q, liofilizadas e armazenadas. A Figura 11 apresenta um esquema que ilustra o processo utilizado para a funcionalização e para a imobilização de proteínas na superfície das nanopartículas.

Figura 11: Esquemática do processo de funcionalização e imobilização de proteínas na superfície das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. A primeira etapa consiste na inserção de grupos amina ($-\text{NH}_2$) na superfície das nanopartículas. Em seguida, insere-se grupos carboxila à superfície por meio da reação do agrupamento amina com o glutaraldeído. Por fim, a proteína desejada é imobilizada na superfície das nanopartículas por meio da ligação covalente formada entre o grupo $-\text{CHO}$ na superfície das nanopartículas e agrupamentos $-\text{NH}-$ da estrutura da proteína.



3.3. Funcionalização das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ com glutaraldeído

Ressuspendeu-se 150 mg das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ funcionalizadas com APTES em 5 mL de água Milli-Q utilizando-se ultrassom por 30 min. Em seguida, adicionou-se 5 mL de solução aquosa 50% de glutaraldeído e deixou-se o sistema fechado, sob agitação magnética vigorosa (600 rpm) por um período de 24 h a temperatura ambiente. Por fim, as nanopartículas funcionalizadas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-COH}$ obtidas foram separadas magneticamente do meio, lavadas com alíquotas de 10 mL de água Milli-Q, liofilizadas e armazenadas (Figura 10).

3.4. Teste de imobilização de BSA nas Fe₃O₄@SiO₂-COH

Ressuspendeu-se 150 mg das nanopartículas Fe₃O₄@SiO₂-CHO funcionalizadas com glutaraldeído em 5 mL de tampão 50 mmol L⁻¹ acetato de sódio pH 5,5 com auxílio de banho ultrassônico por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de solução 2 mg mL⁻¹ de BSA no mesmo tampão e deixou-se o sistema sob agitação magnética vigorosa (600 rpm) por um período de 24 h a temperatura ambiente. Por fim, as nanopartículas Fe₃O₄@SiO₂-BSA, com a proteína imobilizadas, obtidas foram separadas magneticamente do meio, lavadas com alíquotas de 10 mL de água Milli-Q, liofilizadas e armazenadas (Figura 11).

3.5. Caracterização das nanopartículas

3.5.1. Espectroscopia no infravermelho

As análises em espectroscopia de infravermelho foram realizadas no equipamento *Cary 630 FTIR Spectrometer*, da Agilent, utilizando o módulo de transmissão. As amostras foram analisadas utilizando pastilhas de KBr preparadas com aproximadamente 10 mg de amostra liofilizada e 1 g de KBr. Os espectros foram obtidos na janela espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ e 64 scans.

3.5.2. Determinação de tamanho e potencial zeta

O tamanho das partículas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, *Dynamic Light Scattering*) e os valores de potencial zeta foram determinados utilizando o equipamento *Zetasizer Nano*, da Malvern Panalytical. As amostras foram analisadas em suspensão aquosa de aproximadamente 0,1 mg mL⁻¹ à temperatura ambiente em triplicata utilizando uma cubeta do modelo DST1070.

3.5.3. Análise elementar

A composição das amostras foi determinada por análise elementar utilizando o PerkinElmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyser, utilizando-se de 1,0 a 3,0 mg de amostra. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.5.4. Termogravimetria

As análises de termogravimetria foram realizadas utilizando-se o equipamento TG/DTA 6200 da Seiko, utilizando atmosfera inerte e uma rampa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ de 25 °C até 1000 °C.

3.5.5. Difração de raios X

As análises foram realizadas no equipamento D2-Phaser (Bruker). As condições de análise foram: tensão: 30 kV; corrente: 10 mA; radiação: Cu 1,54184; modo contínuo de varredura, tempo por passo: 0,5 s; faixa (2 theta): 5° - 80°; incremento de 0,02°; detector linear (LYNXEYETM).

3.5.6. Microscopia eletrônica de varredura por transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM, do inglês *Scanning Transmission Electron Microscopy*) foram obtidas utilizando o equipamento Quanta FEG 250. As amostras foram preparadas pela ressuspensão de 1 mg de nanopartículas em 10 mL de água Milli-Q. 10 uL da amostra foram adicionados sobre as grades de microscopia e deixou-se em fluxo de nitrogênio até a completa evaporação da água.

3.5.7. Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) foram obtidas utilizando o equipamento Nanosurf Easy Scan2 FlexAFM da Nanosurf. As amostras foram preparadas pela adição de 10 µL de suspensão de nanopartículas sobre uma superfície de mica e secagem sob fluxo de nitrogênio.

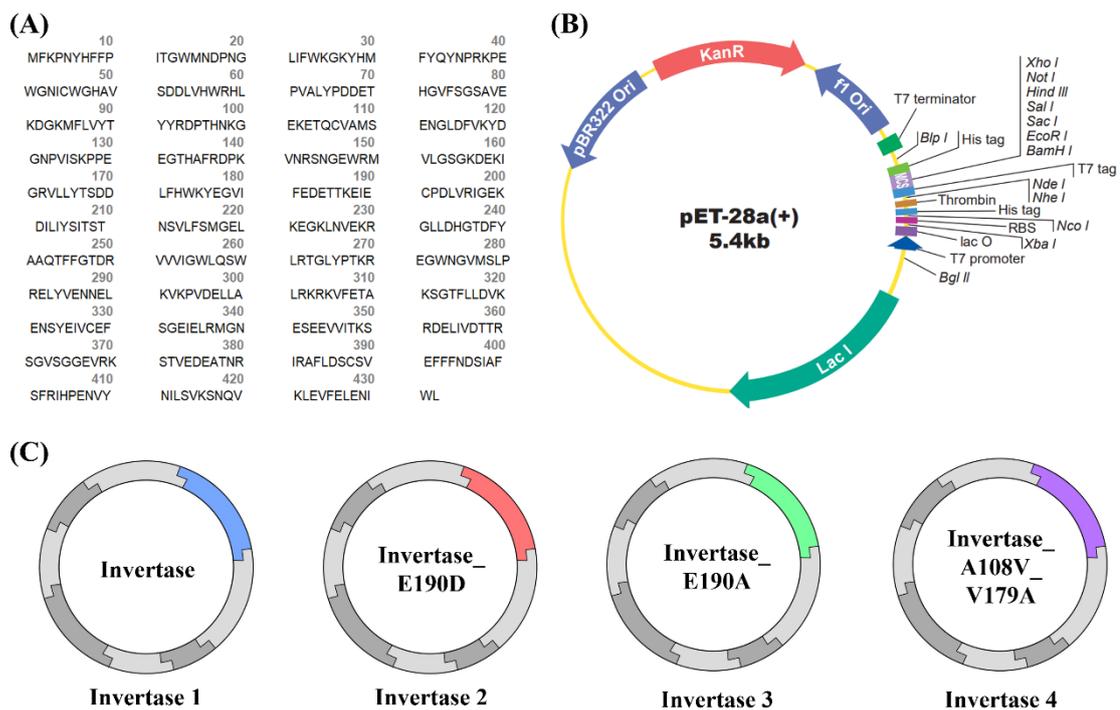
3.5.8. Medidas de magnetização

As medidas de magnetização das amostras de nanopartículas foram realizadas utilizando Physical Property Measurement System (ppms) da VersaLab, modelo 3 Tesla, com o módulo magnetômetro de amostra vibrante (VSM, do inglês *vibrating sample magnetometer*) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF, Rio de Janeiro).

3.6. Informações sobre os clones

A sequência do genoma do *T. maritima* que codifica a biossíntese da invertase foi acessada por meio do GenBank (AE000512.1), disponível para consulta no site da *National Library of Medicine* (NIH) e otimizada utilizando ferramentas de bioinformática para permitir a expressão da enzima em *E. coli*. A invertase é composta por 432 aminoácidos, cuja sequência é apresentada na Figura 12A, de uma massa de cerca de 49,84 kDa.

Figura 12: Informações referentes aos clones da enzima invertase do *T. maritima*. (A) Sequência de aminoácidos da invertase nativa, sem mutações. (B) Mapa do vetor pET-28a(+), utilizado como vetor para a clonagem do gene da invertase. (C) Ilustração dos plasmídeos disponíveis, cada um com a sequência correspondente à uma das enzimas invertase, nativa e mutantes.



O vetor de clonagem escolhido foi o pET28a(+), cujo mapa é apresentado na Figura 12B. O vetor possui uma sequência que codifica para seis histidinas no N-terminal da proteína, uma marca de resistência ao antibiótico canamicina e um sistema de expressão baseado na indução por adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ao meio. O

fragmento codificando para a síntese da invertase foi inserido nos sítios de clivagem das enzimas *NdeI* e *XhoI*.

A fim de evitar que a enzima realize a hidrólise da sacarose, mas mantenha a capacidade de reconhecer e se ligar ao substrato, foram realizadas mutações sítio dirigidas no gene codificando para a invertase para substituir resíduos chave para a atividade da enzima, buscando sua inativação, ou perda da capacidade de hidrolisar a sacarose, mas mantendo sua capacidade de reconhecer e se ligar ao substrato. Dessa forma, além do plasmídeo codificando a biossíntese da enzima nativa, foram construídos outros três, cada um codificando para uma mutante.

Assim, os quatro plasmídeos obtidos codificam a biossíntese das 4 invertases estudadas no projeto, conforme ilustrado na Figura 12C:

- **(Invertase 1) Invertase:** enzima nativa, sem modificações na sequência;
- **(Invertase 2) Invertase_E190D:** troca do resíduo Glutamato (E) 190 por Aspartato (D);
- **(Invertase 3) Invertase_E190A:** troca do resíduo Glutamato (E) 190 por Alanina (A);
- **(Invertase 4) Invertase_A108V_V179A:** troca do resíduo Alanina (A) 108 por Valina (V) e resíduo Valina (V) 179 por Alanina (A).

Uma vez que as invertases mutadas não possuem atividade enzimática, o termo invertase e o termo enzimas não mais aplicáveis. Contudo, para facilitar a discussão do projeto, utilizaremos os nomes invertase apenas como forma de nomear as proteínas mutantes derivadas da enzima nativa, a invertase 1.

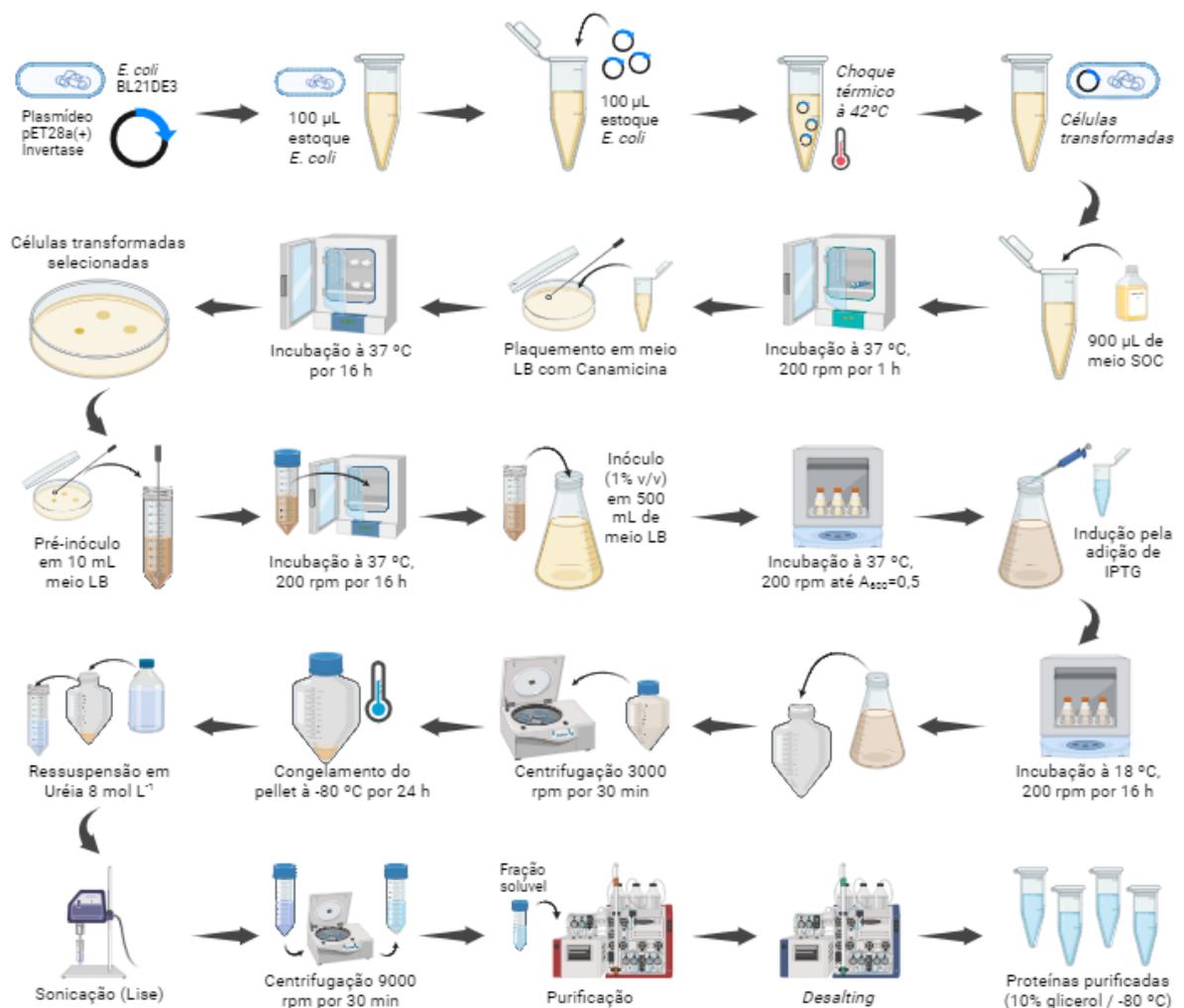
3.7. Transformação dos clones

A transformação dos clones foi realizada partindo-se de células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) da linhagem BL21(DE3). Brevemente, 100 µL do estoque de células competentes em glicerol foram transferidos para um tubo Eppendorf de 2 mL junto com 2 µL da solução contendo o plasmídeo e deixou-se o sistema em repouso por 30 min em banho de gelo. Em seguida, as células foram adicionadas em banho seco à 42 °C por 10 s e então retornadas ao banho de gelo por mais 5 min de forma a promover o choque térmico no sistema para permitir a incorporação do plasmídeo pelas células. Adicionou-se então 900 µL de meio SOC ao tubo e incubou-se sob agitação de 200 rpm à 37 °C por 1 h para promover a

recuperação das células. Por fim, 25 μL dessa suspensão foram estriados sobre uma placa de petri contendo meio Luria Bertani Ágar (LA) e canamicina ($0,03 \text{ mg mL}^{-1}$) e incubados à 37°C *overnight* (16 h). O crescimento de colônias isoladas sobre a superfície da placa indicou o sucesso do processo de transformação. Por fim, realizou-se o repique de uma das colônias isoladas obtidas para uma nova placa, a partir da qual todos os outros cultivos foram realizados.

A Figura 13 apresenta o processo de transformação dos clones, expressão e purificação das proteínas alvo de forma esquematizada para facilitar a compreensão.

Figura 13: Esquema para ilustrar o processo de transformação dos clones, expressão e purificação das proteínas invertase.



3.8. Expressão e purificação das Invertases

Partiu-se de uma colônia isolada dos clones transformados crescidas sobre placa de Petri. Inoculou-se uma colônia do clone em 10 mL de meio Luria Bertani (LB) suplementado com canamicina ($0,03 \text{ mg mL}^{-1}$) e incubou-se sob agitação de 200 rpm a 37°C , *overnight*. Após crescimento, adicionou-se 5 mL do pré inóculo (1% do volume total de inóculo) à 500 mL de meio LB suplementado com canamicina ($0,03 \text{ mg mL}^{-1}$) e incubou-se sob agitação de 200 rpm à 37°C até o inóculo atingir o valor de absorbância a 600 nm de 0,5 a 0,6. Em seguida, adicionou-se IPTG ao meio até uma concentração final de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e incubou-se novamente sob agitação de 200 rpm à 18°C por um período de 16 h para induzir a expressão das proteínas alvo.

Após o período de expressão, as células foram decantadas por centrifugação a 3000 rpm por 30 min para se obter um *pellet* de células. O *pellet* foi então armazenado em biofreezer a -80°C por 24 h para promover a lise das células.

Posteriormente, os *pellets* foram ressuspensos em solução de ureia 8 mol L^{-1} em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 5,5 e lisadas por sonicação com o auxílio de um sonicador operando em 5 ciclos de 30 s com intervalos de 1:30 min entre cada um. Em seguida, os lisados foram submetidos à centrifugação a 9000 rpm e as frações solúveis contendo as enzimas Invertase foram recuperadas e armazenadas à -20°C .

As enzimas foram purificadas por meio um sistema de cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC, do inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*) utilizando um método de afinidade e colunas HisTrapTM FF para retenção da proteína. Primeiramente, as frações solúveis do lisado foram injetadas na coluna lentamente para que as proteínas alvo interagissem com a fase estacionária. Em seguida, a coluna foi lavada pela passagem de 10 mL de buffer acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 5,5 para remoção das demais proteínas não retidas na coluna. As enzimas invertase foram então eluídas utilizando-se imidazol 400 mmol L^{-1} em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 5,5. Por fim, a coluna foi novamente lavada pela passagem de mais 10 mL mesmo tampão para remover quaisquer proteínas remanescentes.

Para a troca do tampão das frações eluídas fez-se o processo de *desalting* utilizando um sistema FPLC com uma coluna HiTrapTM Desalting. A fração eluída foi injetada na coluna em alíquotas de 1 mL e eluídas utilizando-se tampão buffer acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 5,5 contendo 10% de glicerol. As frações coletadas durante o *desalting* foram

concentradas utilizando filtros de centrifuga, divididas em alíquotas de 500 μL congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer à $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Conforme a necessidade específica de determinados experimentos, o processo de *desalting* foi repetido para eluir as proteínas num tampão mais adequado para o fim desejado.

As frações obtidas no processo de purificação das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12% para acompanhamento do processo e verificação da pureza das frações. As concentrações de proteína nas frações purificadas foram determinadas pelo método de Bradford.⁵⁹

3.9. Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford. Brevemente, construiu-se uma curva de calibração utilizando soluções padrões de BSA num intervalo de concentração de 0,1 à 1,0 mg mL^{-1} utilizando-se 10 μL de padrão e 250 μL do reagente de Bradford e registrando-se a absorbância em 595 nm em triplicata. A concentração das amostras foi determinada da mesma forma, interpolando os valores medidos de absorbância na curva analítica.

3.10. Imobilização das Invertases

Ressuspendeu-se 100 mg das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ funcionalizadas com glutaraldeído em 1,2 mL da suspensão estoque das enzimas invertase, de concentração conhecida, em tampão 50 mmol L^{-1} acetato de sódio pH 5,5. Deixou-se o sistema sob agitação magnética vigorosa (600 rpm) por um período de 24 h a temperatura ambiente. Por fim, as nanopartículas com as invertases imobilizadas, foram separadas magneticamente do meio, lavadas com o tampão e armazenadas em biofreezer à $-80\text{ }^\circ\text{C}$. A concentração de proteínas no sobrenadante da etapa de imobilização foi determinada pelo método de Bradford para estimar a quantidade de proteína imobilizada.

3.11. Teste de atividade das enzimas livres e imobilizadas

A atividade das invertases purificadas foi verificada por polarimetria. As quatro invertases foram incubadas em solução 0,1 mol L^{-1} de sacarose em tampão 50 mmol L^{-1}

acetato de sódio pH 5,5 à 55 °C por 1 h sob agitação de 1000 rpm. Em seguida, mediu-se o desvio da luz polarizada (Polarímetro Perkin Elmer 341) causado pela amostra utilizando-se uma solução de sacarose 0,1 mmol L⁻¹ em tampão como branco. A atividade das invertases imobilizadas foi feita da mesma maneira, utilizando uma massa de nanopartículas que fornecessem uma quantidade equivalente de invertase em relação aos ensaios conduzidos com as invertases livres. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.12. Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência das invertases foram obtidos na presença de concentrações crescentes de sacarose (de 0 a 10 mmol L⁻¹). As amostras foram preparadas em tampão acetato de sódio 10 mmol L⁻¹ pH 5,5 e a concentração de proteínas nos ensaios foi de 200 nmol L⁻¹.

As medidas foram conduzidas num espectrofotômetro UV-Vis Agilent Cary Eclipse e o comprimento de onda de excitação utilizado foi de 228 nm. Os espectros de emissão foram obtidos para a faixa espectral de 250 a 430 nm.

3.13. Quantificação de sacarose pelo método de DNS

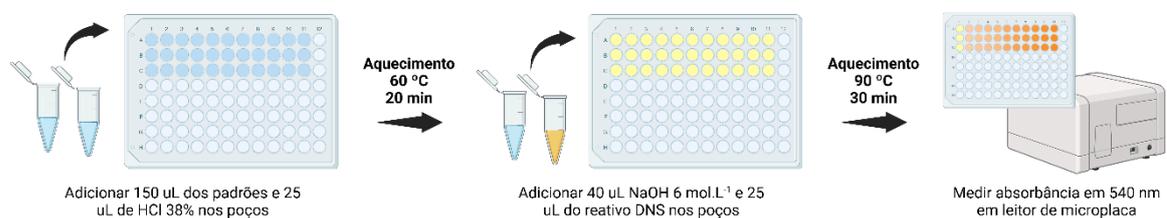
O método de DNS é um método colorimétrico capaz de quantificar açúcares redutores. Em meio alcalino, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reage com o carbono carbonílico dos açúcares redutores sendo reduzido ao ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que possui absorção na região visível do espectro em 540 nm.⁶⁰ O reativo DNS é composto por NaOH 200 mmol L⁻¹, DNS 23 mmol L⁻¹ e tartarato de sódio e potássio 530 mmol L⁻¹ em água Milli-Q.

Uma vez que o método detecta apenas açúcares redutores, a fim de quantificar sacarose, é necessário realizar, previamente à quantificação, uma etapa de hidrólise da sacarose, liberando glicose e frutose que podem ser detectados pelo método. Neste procedimento foi feita pela hidrólise ácida da sacarose pela adição de ácido clorídrico. Uma vez que a reação entre o DNS e os açúcares redutores ocorre em meio básico, é necessário também neutralizar a amostra antes da adição do reativo DNS.

Para a quantificação, adicionou-se 150 μL das amostras ou do branco aos poços correspondentes da microplaca de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 25 μL de ácido clorídrico (HCl) 38% aos poços, vedou-se os poços da microplaca com Parafilm e aqueceu-se o sistema em estufa à 60°C por 20 minutos para a hidrólise ácida da sacarose. Em seguida, adicionou-se 40 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 6 mol L⁻¹ e, então, 25 μL do reativo DNS aos poços. Vedou-se novamente os poços e o sistema foi levado à aquecimento em estufa à 90 °C por 30 min. Por fim, leu-se a absorbância das amostras em 540 nm em um leitor de placas. O método foi aplicado para quantificar a sacarose presente nas amostras por interpolação utilizando uma curva analítica construída para o intervalo de concentração de 0,1 à 1,0 mmol L⁻¹ de sacarose em tampão acetato de sódio 40 mmol L⁻¹ pH 4,8.

A Figura 14 à seguir apresenta o esquema simplificado do procedimento adotado para quantificação de sacarose nas amostras.

Figura 14: Esquema do procedimento para quantificação de sacarose pelo método de DNS.



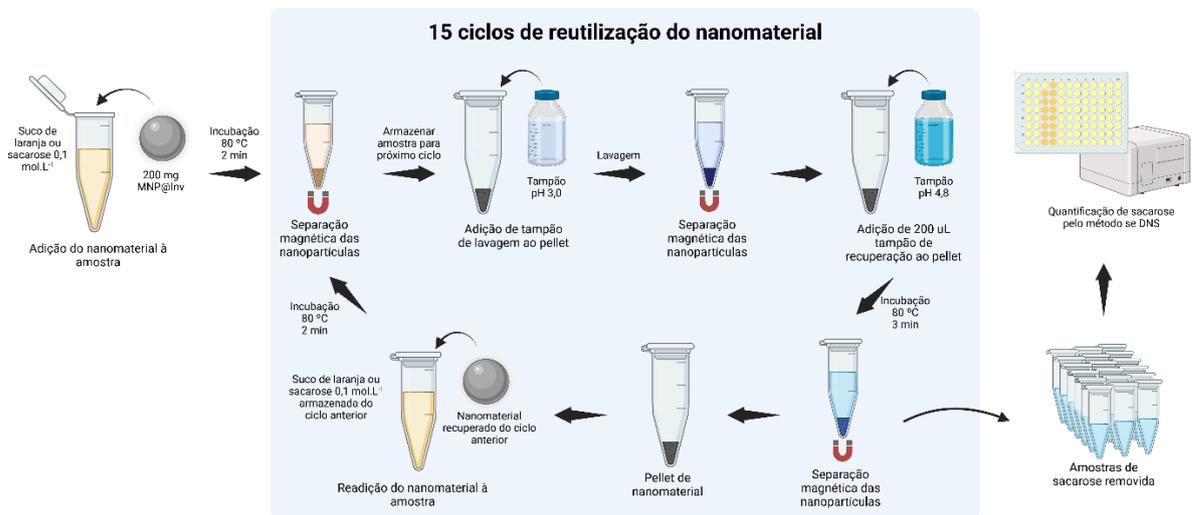
3.14. Testes de remoção de sacarose

Os testes de remoção de sacarose foram feitos para dois conjuntos de amostra. O primeiro sendo uma solução concentrada de sacarose 0,1 mol L⁻¹ em tampão citrato/fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 3,0 e o segundo sendo suco de laranja industrializado. Os testes de remoção foram conduzidos utilizando as 4 invertases imobilizadas no suporte nanomagnético e com as nanopartículas funcionalizadas sem enzimas imobilizadas (MNP@Glut), que serviram como controle. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata de acordo com o procedimento descrito a seguir e esquematizado na Figura 15.

Lavou-se 200 mg das nanopartículas utilizadas com 2 mL do Tampão A (citrato/fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 3,0) para remover impurezas presentes. As partículas e as amostras de sacarose 0,1 mol L⁻¹ e de suco de laranja foram incubadas em banho seco à 80 °C

para realização dos ensaios. Adicionou-se então as partículas nas amostras e incubou-se o sistema por 2 minutos sob agitação à 80 °C. Em seguida, as nanopartículas foram separadas do meio com o auxílio de um ímã de neodímio e as amostras no sobrenadante foram armazenadas. Posteriormente, lavou-se as partículas utilizando 1 mL do Tampão A para remover resquícios das amostras e a sacarose não especificamente capturada pelas nanopartículas. Adicionou-se então 0,2 mL do Tampão B (Acetato de sódio 40 mmol L⁻¹ pH 4,8) e incubou-se o sistema por 3 minutos sob agitação à 80 °C. Por fim, recupera-se as nanopartículas novamente com o auxílio de um ímã e armazena-se o sobrenadante contendo a sacarose liberada para posterior quantificação da sacarose removida de acordo com o procedimento descrito anteriormente para quantificação de sacarose pelo método de DNS. As nanopartículas recuperadas são adicionadas novamente às amostras reservadas para um novo ciclo de remoção. Foram feitos, no total, 15 ciclos de remoção para cada grupo de amostras.

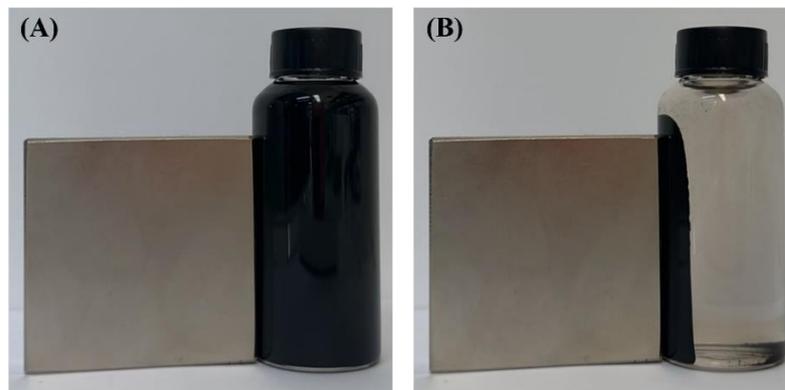
Figura 15: Esquema do protocolo adotado para os testes de remoção e recuperação de sacarose utilizando o nanomaterial.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 16 apresenta duas imagens, obtidas em diferentes tempos, para ilustrar as propriedades magnéticas das nanopartículas de magnetita recobertas com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) sintetizadas. As partículas obtidas são fortemente atraídas pelo campo magnético, sendo necessário poucos segundos para que se atinja a completa separação do nanomaterial e do sobrenadante.

Figura 16: Nanopartículas de magnetita sob a influência de um ímã de neodímio. (A) Tempo 0 s e (B) 90 s.



Os espectros de infravermelho foram obtidos para as amostras de forma de acompanhar o processo de síntese, recobrimento e funcionalização das nanopartículas através da presença de bandas características dos grupos presentes ou inseridos nas nanopartículas em cada etapa de funcionalização. A Figura 17 apresenta os espectros obtidos para as amostras de nanopartículas nuas, funcionalizadas e com a BSA imobilizada com as bandas assinaladas e a Tabela 2 apresenta a atribuição das bandas observadas conforme a literatura.

O espectro correspondente às partículas nuas (Fe_3O_4) foi utilizado para discretizar quais as bandas nos espectros correspondem apenas ao mineral. O espectro apresenta bandas características da magnetita em 430 cm^{-1} , 570 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} , as quais foram utilizadas para confirmar a presença do material nas demais amostras analisadas. A banda presente em 1635 cm^{-1} corresponde a vibrações da ligação O-H de moléculas de água incorporadas ao mineral, uma vez que a síntese em meio aquoso permite a incorporação de moléculas de água nos cristais. A banda em cerca de 3400 cm^{-1} , presente em todos os espectros, corresponde é

resultado da presença de moléculas de água adsorvidas nas nanopartículas não removidas durante o processo de secagem das amostras por liofilização. Para o espectro obtido para as nanopartículas recobertas com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), nota-se a presença de uma nova banda, em 950 cm^{-1} , característica da presença de sílica no material.

Figura 17: Espectros no infravermelho das nanopartículas de magnetita recobertas e funcionalizadas.

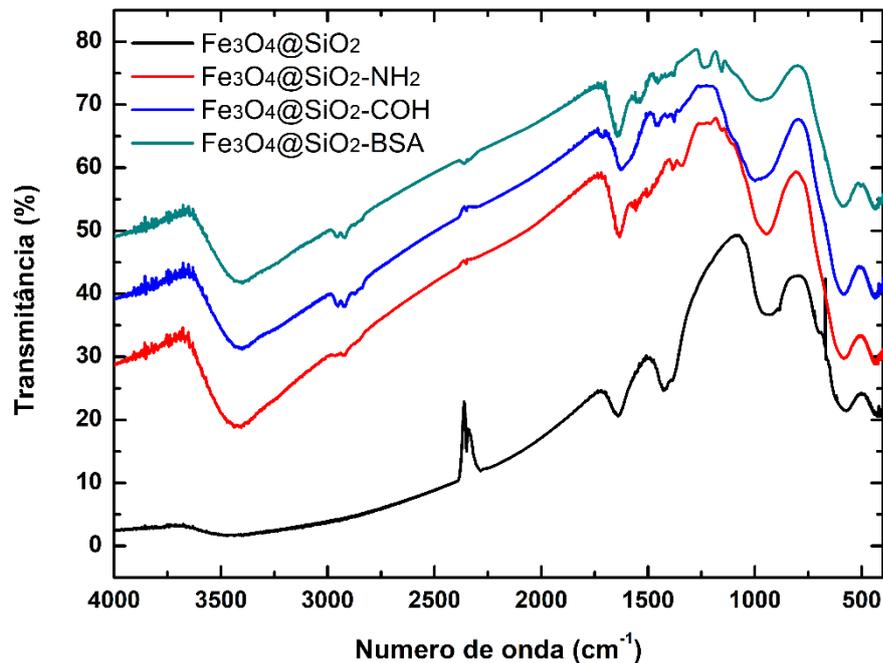


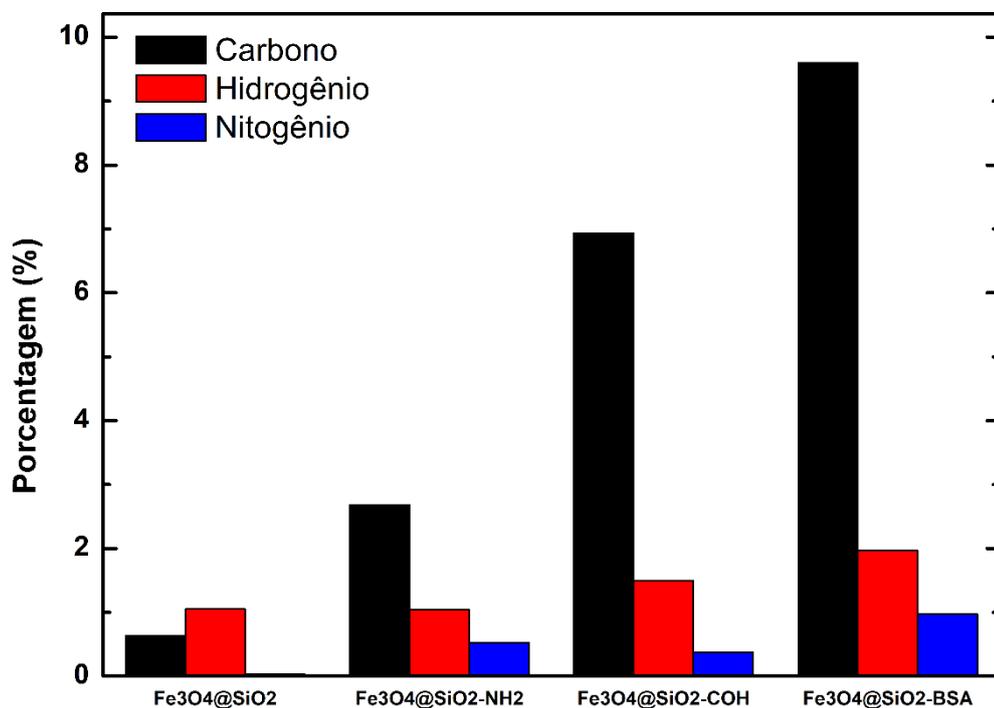
Tabela 2: Atribuição das bandas presentes nos espectros de infravermelho das amostras de nanopartículas analisadas

Banda (cm^{-1})	Atribuição
430	Vibrações de ligações Fe-O nos sítios tetraédricos da magnetita.
570	Vibrações de ligações Fe-O nos sítios octaédricos da magnetita.
950	Sobreposição de sinais em 900 cm^{-1} e 920 cm^{-1} atribuídos a estiramentos Si-OH e Si-O-Si, respectivamente.
1430	Banda característica da magnetita correspondente à grupos Fe-O.
1635	Dobramento O-H de moléculas de água incorporadas no cristal.
3400	Estiramentos O-H de moléculas de água adsorvidas.

Não foi possível, contudo, avaliar a eficiência da funcionalização da superfície das nanopartículas e imobilização do BSA a partir dos espectros de infravermelho, uma vez que não são observadas bandas características dos grupos funcionais inseridos em cada etapa de funcionalização, como aminas provenientes do APTES (-NH₂) ou carbonilas advindas do glutaraldeído (-C=O). Dessa forma, outra técnica deve ser aplicada como forma de monitorar o processo de funcionalização, capaz de determinar de forma confiável a presença ou ausência destes grupos na superfície das nanopartículas.

As nanopartículas, em cada etapa do processo de funcionalização e imobilização, foram analisadas por análise elementar de forma a confirmar o sucesso de cada etapa por meio das quantidades relativas de carbono, hidrogênio e nitrogênio em cada amostra. Os resultados obtidos pela análise podem ser vistos na Figura 18, apresentada a seguir.

Figura 18: Quantidades relativas de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras de nanopartículas.



Analisando os dados apresentados, observa-se que a amostra de Fe₃O₄@SiO₂ apresenta baixas quantidades de carbono e nitrogênio, o que condiz com o fato de que as partículas não funcionalizadas não possuem matéria orgânica em sua superfície. Uma vez que

se inicia a funcionalização das partículas, nota-se um aumento nas quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes na amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ indicando o sucesso da funcionalização com APTES, inserindo grupos amina ($-\text{NH}_2$) na superfície das partículas. A amostra seguinte, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$, apresentou novamente, um aumento nas quantidades medidas de carbono e hidrogênio, indicando o sucesso funcionalização das partículas com glutaraldeído; a diminuição observada na quantidade de nitrogênio está de acordo com o esperado, uma vez que imobilização de glutaraldeído, que não contém nitrogênio, na superfície diminui a quantidade relativa do elemento na amostra. Por fim, após a imobilização da BSA, é possível notar mais uma vez o aumento nas quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio na amostra, confirmando a imobilização da BSA na superfície do nanomaterial.

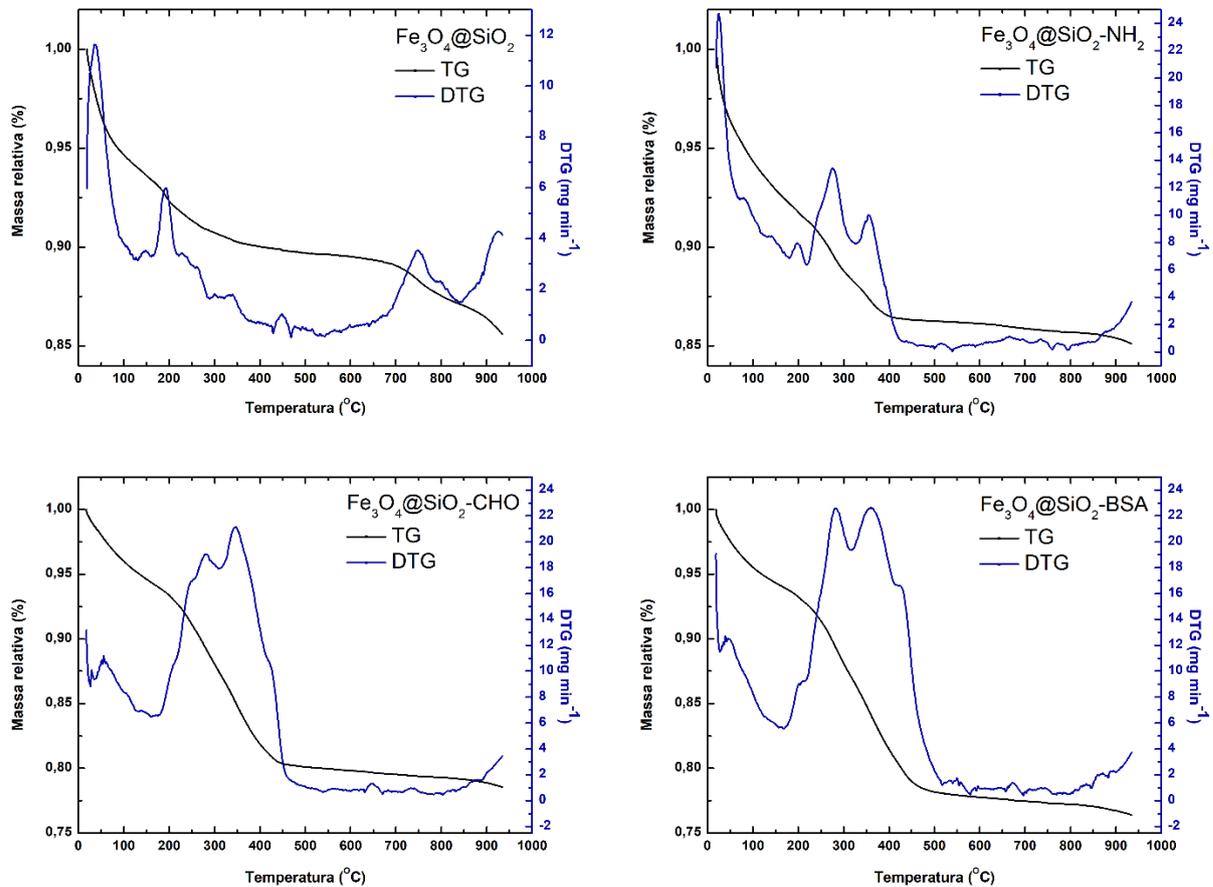
Os resultados obtidos pela análise elementar foram utilizados como uma forma rápida de acompanhar o sucesso dos processos de funcionalização de forma rápida. Análises mais detalhadas foram conduzidas utilizando Termogravimetria (TGA) a fim de verificar a quantidade de material orgânico depositado na superfície das partículas. A Figura 19 apresenta as curvas de termogravimetria (TG) e a primeira derivada da curva (DTG) obtidas para cada amostra analisada.

Pela análise das curvas de TG não foi possível definir eventos de perda de massa com precisão. Contudo, analisando as curvas DTG os eventos tornam-se mais evidentes, e é possível observar ainda, que os mesmos eventos estão presentes em todas as amostras.

O primeiro evento, anterior à $150\text{ }^\circ\text{C}$, se deve à perda de água adsorvida na superfície das nanopartículas. O segundo evento, que ocorre a cerca de $190\text{ }^\circ\text{C}$, é atribuído à desidroxilação dos grupos hidroxila ($-\text{OH}$) na superfície das partículas, processo que ocorre pela adição de um hidrogênio à um grupo hidroxila, liberando água e íons óxido ($2\text{OH}^- \rightarrow \text{O}^{2-} + \text{H}_2\text{O}$). Este evento em específico apresenta-se sobreposto aos eventos seguintes para as amostras de nanopartículas funcionalizadas.

Os eventos seguintes, compreendidos entre $200\text{ }^\circ\text{C}$ e $430\text{ }^\circ\text{C}$, são devidos à degradação da matéria orgânica presente nas amostras. O primeiro destes eventos, com um máximo de perda de massa registrado em $270\text{ }^\circ\text{C}$, é atribuído à oxidação da matéria orgânica pelo oxigênio gerado como produto no processo de desidroxilação, gerando CO_2 majoritariamente. O segundo, em $350\text{ }^\circ\text{C}$, corresponde à pirólise da matéria orgânica remanescente na ausência de oxigênio, formando um resíduo de carbono grafítico como produto.

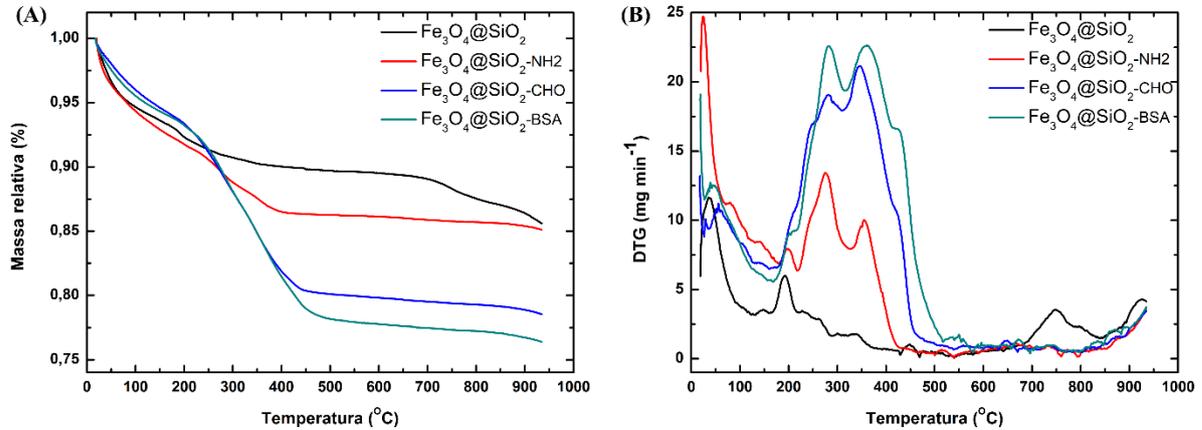
Figura 19: Curvas de TG e DTG obtidas para as amostras de nanopartículas recobertas com sílica, funcionalizadas e com a BSA imobilizada.



Após isso nota-se apenas a presença de mais um evento de perda massa, em cerca de 900 °C, que pode ser atribuído à perda da água incorporada no retículo cristalino da magnetita.

A fim de facilitar a comparação entre as amostras, a Figura 20 apresenta as curvas de TG e DTG plotadas em conjunto. Comparando as perdas de massas totais para cada amostra (Figura 20A), é possível observar um aumento conforme as etapas de funcionalização das partículas devido à maior quantidade de matéria orgânica presente ao final de cada processo. A amostra Fe₃O₄@SiO₂ apresentou uma perda de 14% de sua massa inicial, enquanto que, para as amostras Fe₃O₄@SiO₂-NH₂, Fe₃O₄@SiO₂-CO e Fe₃O₄@SiO₂-BSA, registraram-se perdas de 15%, 22% e 24% de suas massas iniciais, respectivamente. Essa diferença observada entre as amostras permite confirmar o sucesso dos processos de funcionalização das partículas e imobilização da BSA em sua superfície.

Figura 20: Curvas de TG (A) e DTG (B) para as amostras de nanopartículas analisadas.

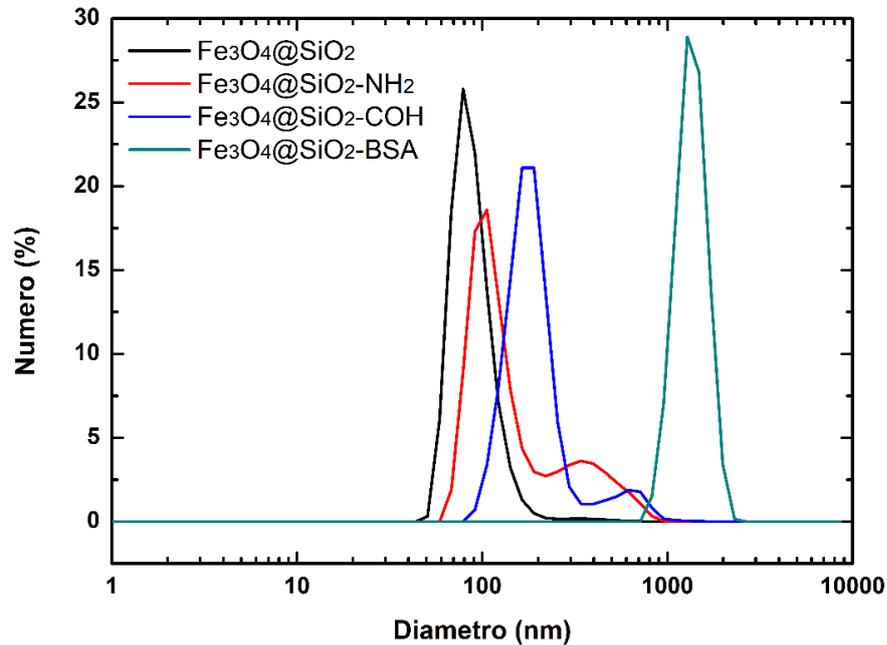


Ainda, comparando as curvas de TG (Figura 20A) e os gráficos de DTG (Figura 20B), é possível verificar que os eventos de maior perda de massa são os atribuídos à decomposição da matéria orgânica e que, para as amostras de nanopartículas funcionalizadas, esses eventos são mais significativos, devido a maior quantidade de matéria orgânica nas amostras, conforme o esperado.

O tamanho das nanopartículas foi estimado por análises em DLS e os gráficos de distribuição de tamanho obtidos para as nanopartículas nuas e funcionalizadas são apresentados na Figura 21. A Tabela 3 apresenta os valores medidos de tamanho, com o desvio padrão, coeficiente de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta medido para cada amostra.

Com a funcionalização das partículas, observou-se um aumento no tamanho das partículas, o que é mais evidente para as partículas com a BSA imobilizada. O aumento de tamanho observado está associado ao aumento do raio hidrodinâmico das partículas que compõem a amostra devido a inserção de grupos funcionais na superfície das partículas.

A estabilidade das partículas pode ser avaliada pelo valor do potencial zeta medido, uma vez que quanto maior o módulo do potencial das partículas, maior sua estabilidade devido a presença de mais cargas em sua superfície, que repelem as partículas, evitando sua aglomeração. Nota-se que o processo de funcionalização diminui o potencial zeta das partículas em relação ao potencial medido para as partículas não funcionalizadas, indicando perda de estabilidade, o que explica a presença de populações de maior diâmetro para essas amostras devido à agregação.

Figura 21: Distribuição de tamanho das nanopartículas recobertas e funcionalizadas.**Tabela 3:** Tamanho, PDI e potencial zeta medidos para as nanopartículas recobertas e funcionalizadas

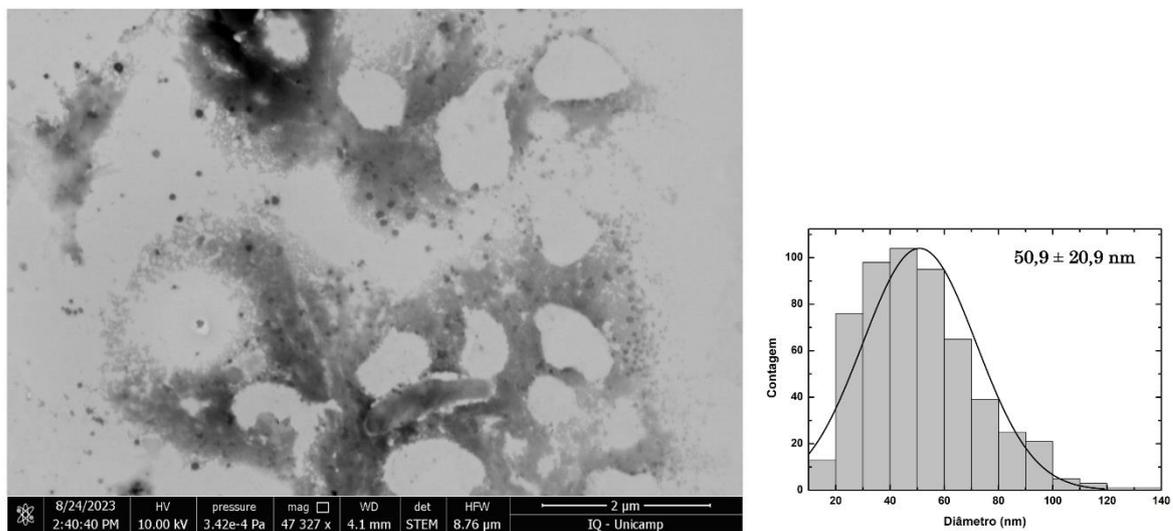
Amostra	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	65,3 ± 27,2	0,416	-46,2
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂	115,5 ± 34,1	0,575	-20,2
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -COH	182,0 ± 50,8	0,563	30,0
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -BSA	1360,0 ± 257,6	0,461	3,3

O tamanho das partículas medido para a amostra com a BSA imobilizada foi consideravelmente maior do que o das amostras anteriores. Esse perfil pode ser explicado pela agregação das nanopartículas com BSA, uma vez que o potencial zeta medido para a amostra foi muito baixo, indicando baixa estabilidade das partículas.

A fim de avaliar de forma mais precisa o tamanho, distribuição e morfologia das nanopartículas, foram obtidas microscopias por microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM) e microscopia de força atômica (AFM).

A Figura 22 apresenta a imagem obtida por STEM das nanopartículas de magnetita recobertas com sílica não funcionalizadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$). Analisando as imagens é possível observar pontos mais escuros, correspondentes às nanopartículas envoltas por uma nuvem de material menos denso, que poderia ser devido à presença de sílica ou de sais remanescentes cristalizados após o preparo da amostra.

Figura 22: Microscopia obtida por STEM das amostras de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -BSA e histograma obtido através da medida de tamanho das partículas na imagem.



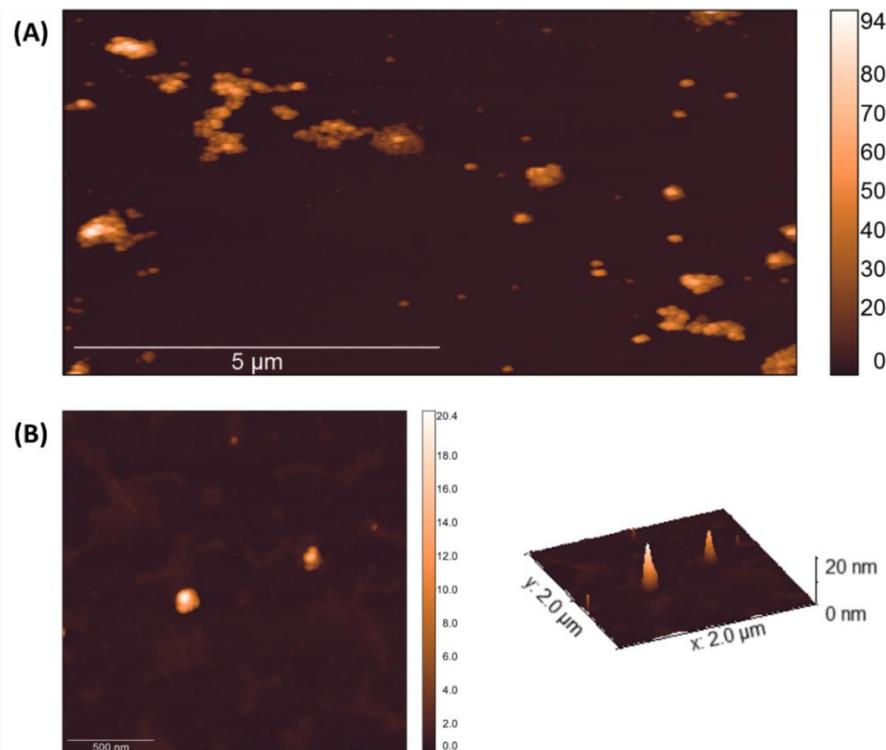
Avaliando as nanopartículas observadas é possível verificar que possuem formato esférico e uma distribuição de tamanho larga, com partículas de tamanho de cerca de 50,9 nm de diâmetro, valores muito menores do que os determinados inicialmente por DLS para a amostra.

A fim de determinar a forma com que a sílica está distribuída nas nanopartículas, se presente como uma camada externa ou incorporada ao núcleo magnético, seria necessário obter imagens por microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*), que possibilitaria a obtenção de imagens de maior magnificação e melhor contraste entre elementos leves e pesados.

A Figura 23 apresenta as imagens obtidas por AFM das partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. A Figura 23A apresenta a imagem obtida de forma exploratória com o mapeamento de uma área maior a fim de localizar partículas isoladas. Contudo, ainda assim é possível obter

informações relevantes pela análise da figura. Na imagem verifica-se a presença de partículas de menor diâmetro que aparentam estar isoladas embora a maior parte do material esteja presente na forma aglomerados de partículas, formados devido à tendência do material à formar agregados de partículas menores. Observa-se a presença de partículas esféricas de diâmetros pequenos, com cerca de 20 nm bem como de partículas maiores, aparentemente isoladas ou formando os agregados.

Figura 23: Microscopia obtida por AFM das amostras de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. **(A)** Região exploratória mapeada de $10 \times 5 \mu\text{m}^2$ na busca de pontos com partículas isoladas. **(B)** Região $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ evidenciando duas partículas isoladas na superfície da mica.

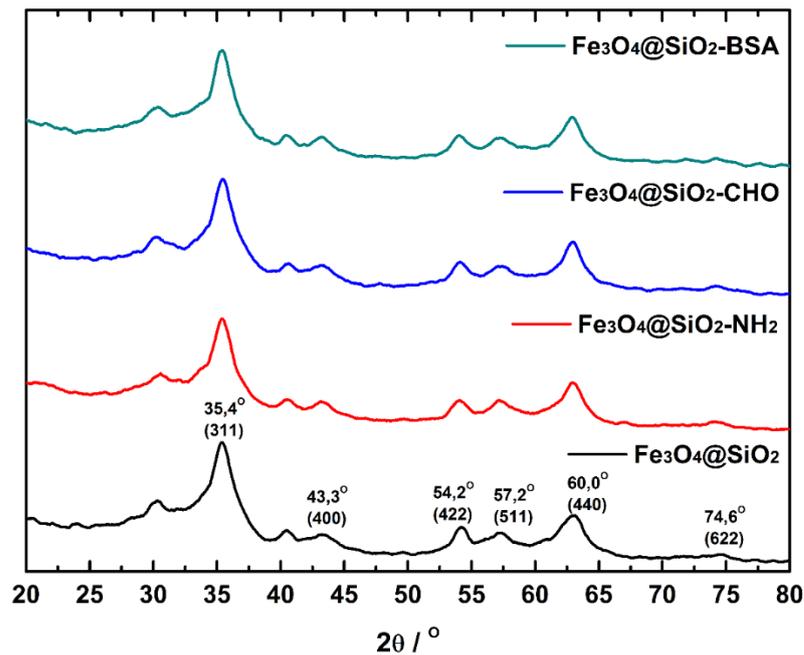


A Figura 23B, por sua vez, apresenta em maior detalhe uma região menor da Figura 23A, na qual encontrou-se partículas isoladas, bem como a topografia da região mapeada. Na figura, são observadas duas partículas, aparentemente isoladas, com cerca de 20 nm de diâmetro.

As análises de difração de raios X foram conduzidas com o objetivo de confirmar a formação e a presença de magnetita nas amostras de nanopartículas após a síntese e após o

processo de funcionalização. Foram obtidas análises para as nanopartículas recobertas com sílica e em cada etapa do processo de funcionalização para comparação dos difratogramas conforme apresentado na Figura 24.

Figura 24: Difratogramas de raios X obtidos para as nanopartículas nuas, funcionalizadas e com BSA imobilizado.



Os difratogramas das nanopartículas analisadas apresentam sinais característicos da magnetita, que são atribuídos a seus respectivos planos cristalinos de acordo com a Tabela 4. Apesar de os difratogramas não possuírem uma linha base muito bem definida e apresentarem sinais alargados, é possível assinalar alguns dos picos presentes. A redução na qualidade dos difratogramas observada para essas amostras é decorrente do efeito da sílica amorfa e também, da matéria, depositada sobre a superfície das nanopartículas, que reduzem a cristalinidade do material.

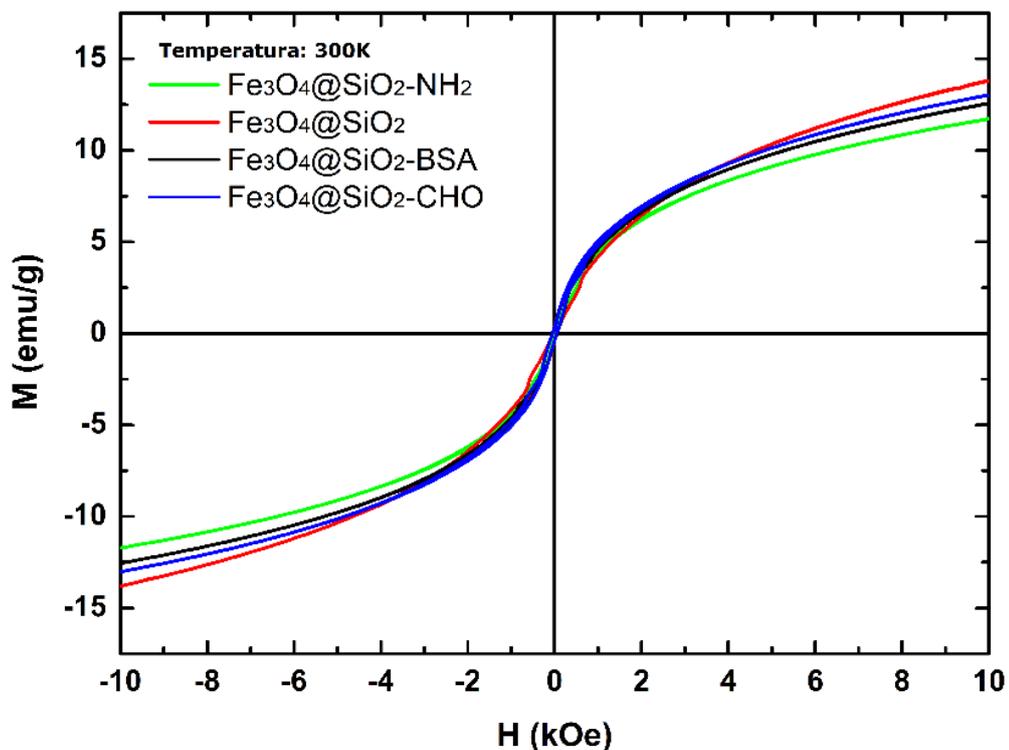
Tabela 4: Atribuição dos picos de difração obtidos para as amostras de nanopartículas

2θ (°)	35,4	43,3	54,2	57,2	60,0	74,6
Plano	(311)	(400)	(422)	(511)	(440)	(622)

Apesar disso, ainda é possível identificar alguns sinais característicos da magnetita, que podem ser utilizados para confirmar a formação do mineral e sua presença nas partículas mesmo após os processos de funcionalização de imobilização da proteína, indicando que a possível oxidação das partículas durante as etapas de funcionalização é inexistente ou negligenciável.

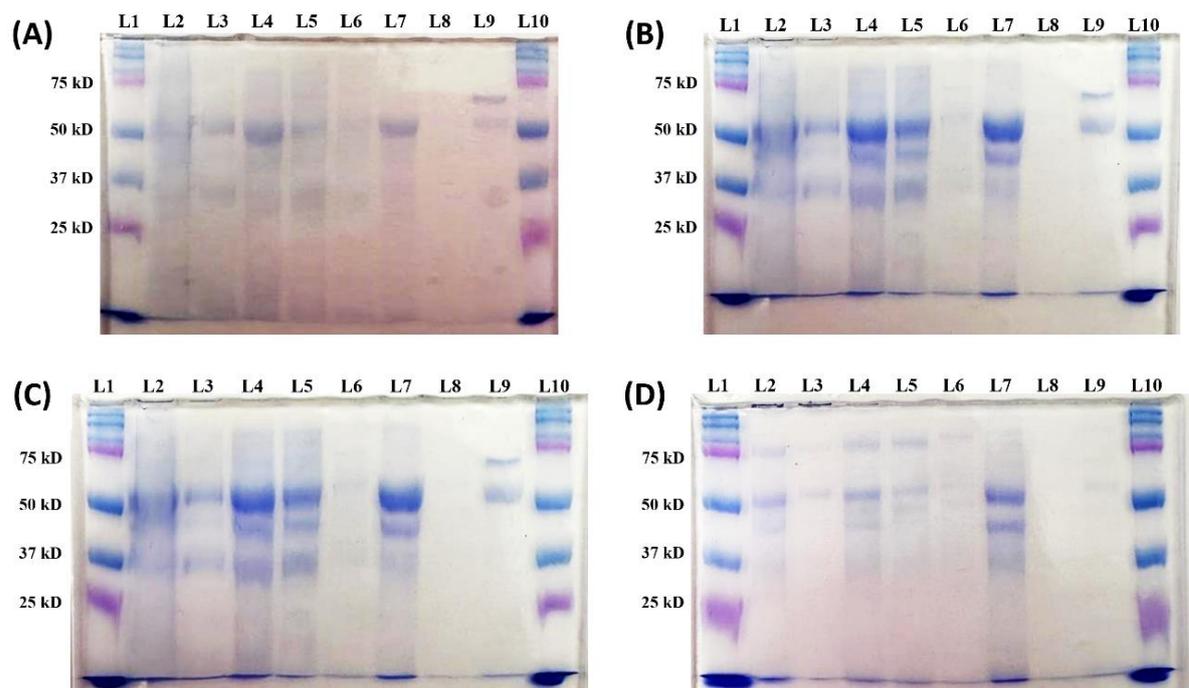
As curvas de histerese obtidas a partir das medidas de magnetização das nanopartículas são apresentadas na Figura 25. O gráfico apresenta as curvas de histerese obtidas para as amostras analisadas à temperatura ambiente, fornecendo a magnetização medida para as amostras em função do campo magnético aplicado. Pela análise das curvas nota-se que as amostras apresentaram comportamento superparamagnético, como esperado. Além disso, nota-se que as etapas de funcionalização e imobilização do BSA na superfície das nanopartículas não tem influência significativa na magnetização das amostras, que permanece quase idêntica à nanopartícula somente recoberta com sílica.

Figura 25: Curvas de magnetização das amostras de nanopartículas de magnetita nuas funcionalizadas e com BSA imobilizado, obtidas à temperatura ambiente (300K).



A purificação das enzimas invertase foi acompanhada por eletroforese em gel de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 12% e os géis obtidos para cada uma das proteínas é apresentado na Figura 26. Nos géis apresentados, é notável a presença de uma banda mais intensa na região correspondente a massa aproximada de 50 kDa, indicando a presença das enzimas invertase nas amostras. Nota-se que as enzimas expressas permanecem na fração solúvel (L4) após a lise das células em solução de uréia 8 mol L⁻¹. Há também uma banda larga no *Flow Through* (L5) da coluna, indicando a passagem de uma parte da invertase contida na amostra pela coluna sem a interação com a fase estacionária, o que pode ser devido à baixa capacidade da coluna utilizada frente a grande quantidade de enzima expressa. Apesar disso, foi possível obter as quatro proteínas com elevado grau de pureza após a eluição da coluna de afinidade (L7) e do processo de *dessalting* (L9).

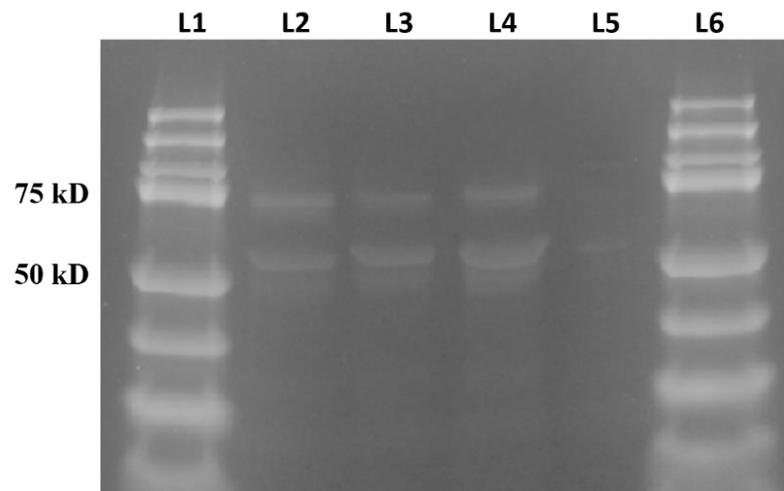
Figura 26: Resultados obtidos para a análise das frações obtidas na expressão e purificação das proteínas invertases. Géis SDS-PAGE 12% para as invertases 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D). Nos géis, as linhas L1 e L10 correspondem ao marcador de massa molecular, L2 à fração total após lise das células, L3 à fração insolúvel do lisado, L4 à fração solúvel do lisado, L5 ao *Flow Through* da coluna, L6 à primeira lavagem da coluna, L7 à invertase eluída, L8 à segunda lavagem da coluna e L9 à fração obtida após o *dessalting* da fração eluída.



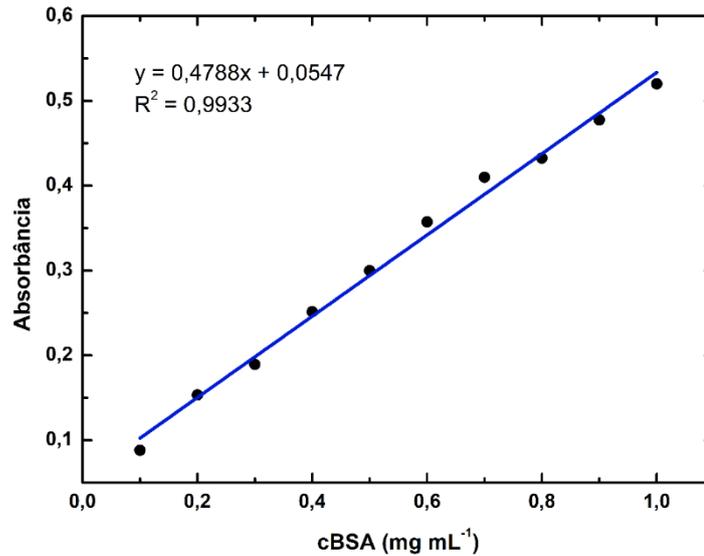
Ainda, observa-se duas bandas nas frações obtidas após o processo de *desalting* das proteínas (L9). A primeira banda, na região de 50 kDa correspondente à unidades isoladas das proteínas invertase e; a segunda banda, possivelmente devido a formação de dímeros da proteína nas condições de armazenamento, processo que está de acordo com informações presentes na literatura sobre a estrutura quaternária dessas enzimas. Nota-se ainda um aumento significativo na pureza das proteínas após o processo de *desalting*.

Obteve-se também um gel SDS-PAGE com as amostras das enzimas puras para evidenciar a eficácia do processo de purificação, conforme mostrado na Figura 27 a seguir. Pela análise do gel, fica claro a obtenção de frações de todas as enzimas com um elevado grau de pureza.

Figura 27: Gel SDS-PAGE 12% obtido para as frações contendo as enzimas invertases purificadas após o *desalting*. Nos géis, as linhas L1 e L6 correspondem ao marcador de massa molecular e, L2, L3, L4 e L5 às invertases 1, 2, 3 e 4 respectivamente.



A concentração de cada uma das invertases obtidas ao final do processo de purificação foi determinada pelo método de Bradford. A Figura 28 apresenta a curva de calibração construída utilizando soluções padrões de BSA. A concentração de invertases nas alíquotas obtidas no *desalting* são determinadas pela interpolação dos valores de absorvância medidos para as amostras na curva. Os valores determinados são apresentados na Tabela 5 apresentada a seguir.

Figura 28: Curva analítica para quantificação de proteínas pelo método de Bradford.**Tabela 5:** Concentrações de proteína determinada para as alíquotas obtidas após o processo de *desalting* das invertases

Amostra	Invertase 1	Invertase 2	Invertase 3	Invertase 4
Concentração (mg mL ⁻¹)	1,36	0,92	1,63	0,43

As quantidades de cada proteína invertase imobilizada nas nanopartículas foram calculadas a partir das concentrações de proteínas no sobrenadante antes e após o processo de imobilização. A Tabela 6 apresenta os dados obtidos e calculados para o procedimento.

Tabela 6: Dados obtidos a partir da imobilização das enzimas invertase nas nanopartículas

	Fe3O4@Inv1	Fe3O4@Inv2	Fe3O4@Inv3	Fe3O4@Inv4
c (mg/mL) Pré imobilização	1,36	0,92	1,63	0,43
c (mg/mL) Pós imobilização	0	0	0	0
Proteína imobilizada (mg)	1,63	1,1	1,96	0,52
Eficiência de imobilização (%)	100	100	100	100
mg Inv / mg MNP@Inv	0,016	0,011	0,019	0,005

Para todos os casos, a concentração de proteínas no sobrenadante após a imobilização foi de 0 mg mL⁻¹, o que indica que toda proteína presente inicialmente foi

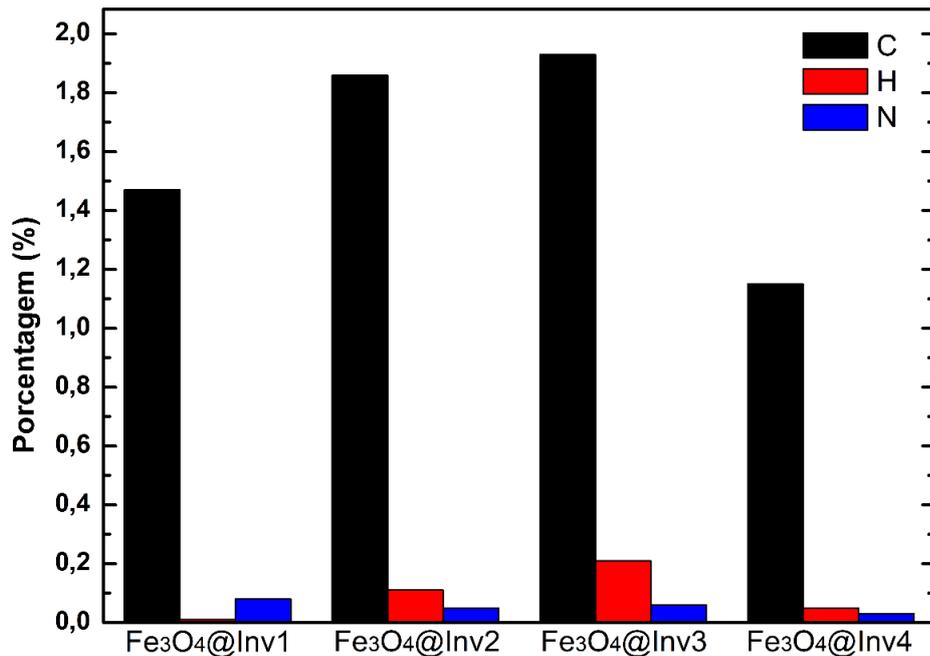
imobilizada. Sabendo-se que foram utilizados 1,2 mL das suspensões estoque das proteínas, calcula-se a massa total de proteína imobilizada nos nanomagnetos. A eficiência do processo de imobilização foi então calculada conforme a **Equação 1**, obtendo-se uma eficiência de 100% para todos os 4 processos.

$$\text{Eficiência de imobilização}(\%) = \frac{m \text{ proteína imobilizada}}{m \text{ proteína inicial}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Por fim, estima-se também a massa de proteínas imobilizadas para cada miligrama de nanomaterial obtido ao final do processo, de forma a ser possível determinar a quantidade de proteínas utilizadas nos ensaios utilizando o nanomaterial. Os valores calculados são apresentados também na **Tabela 6**.

Para confirmar a imobilização das proteínas nas nanopartículas, as amostras foram também analisadas por análise elementar a fim de determinar o aumento nas quantidades de matéria orgânica nas amostras em relação a amostra de nanopartículas funcionalizadas com glutaraldeído ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$). Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 29**.

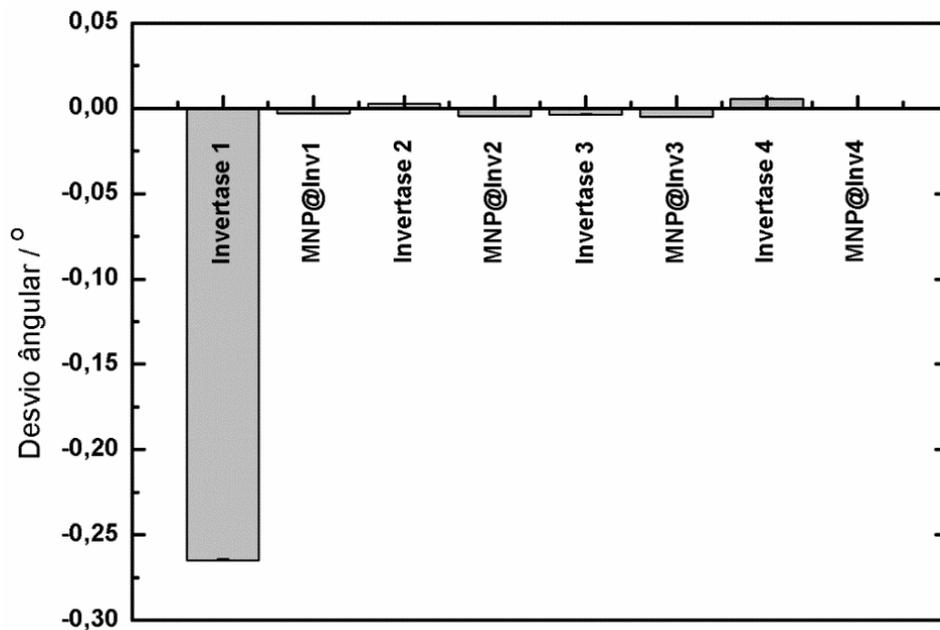
Figura 29: Aumento nas quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio para as amostras de proteínas invertase imobilizadas em relação às nanopartículas funcionalizadas com glutaraldeído ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$).



Para as amostras de nanopartículas com as invertases imobilizadas, observa-se um aumento nas quantidades medidas de carbono, hidrogênio e nitrogênio em relação às nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$. O aumento nas quantidades de matéria orgânica indica o sucesso do procedimento de imobilização das invertases na superfície das partículas.

Após a imobilização das enzimas nas nanopartículas funcionalizadas, fez-se um teste de atividade com todas as 4 enzimas, livres e imobilizadas, para determinar sua atividade catalítica frente à hidrólise da sacarose. O teste foi realizado por meio da incubação das enzimas livres e imobilizadas, em quantidades equivalentes, em solução de sacarose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 5,5 à $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h sob agitação de 1000 rpm. Uma vez que a hidrólise da sacarose causa o desvio da luz polarizada, um polarímetro foi utilizado para determinar a atividade das enzimas. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 30.

Figura 30: Desvios da luz polarizada medidos para soluções de sacarose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após incubação com as enzimas invertase 1, 2, 3 e 4 livres e imobilizadas.



Pela análise do gráfico observa-se que a Invertase 1, apresentou um grande desvio da luz polarizada para a valores negativos, o que indica tanto o consumo de sacarose (desvia a luz para valores positivos) quanto a formação de glicose e frutose (ambas desviam a luz para

valores negativos). Dessa forma, confirma-se que a enzima invertase 1, a enzima nativa, possui atividade frente à hidrólise da sacarose.

Contudo a invertase 1 perde sua capacidade de realizar a hidrólise da sacarose após a imobilização, resultado da possível alteração em sua conformação devido à ligação da enzima com a superfície da nanopartícula. Uma vez que o objetivo do trabalho é desenvolver um nanomaterial que possibilite a captura e recuperação da sacarose sem que ocorra sua hidrólise, esta perda de atividade não é um problema e a capacidade de a enzima se ligar à sacarose mesmo imobilizada será investigada.

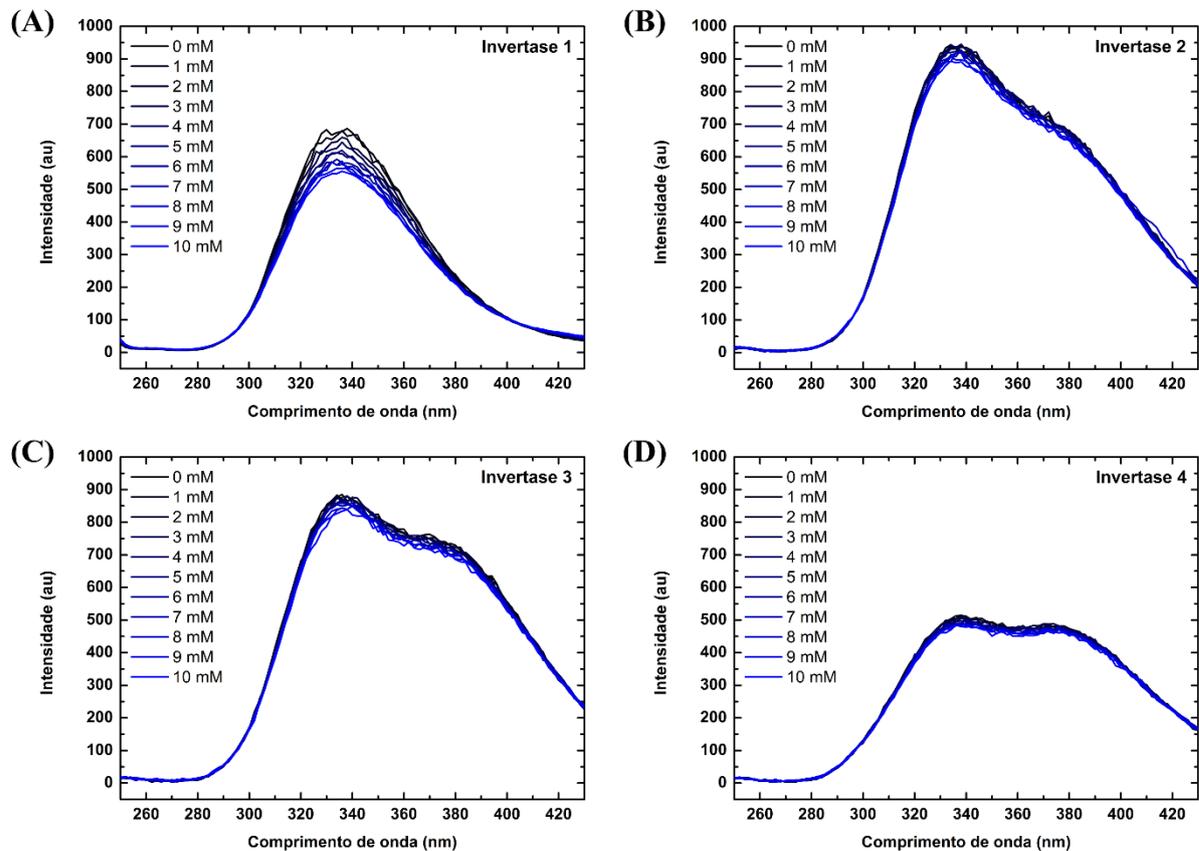
As demais invertases, como esperado, não apresentam atividade catalítica na forma livre nem na forma imobilizada. De maneira semelhante à invertase 1, este resultado está dentro do esperado e investigações sobre a capacidade destas proteínas de capturarem a sacarose foram conduzidas.

A interação entre as invertases em sua forma livre com a sacarose foi monitorada por meio dos ensaios de espectroscopia de fluorescência, por meio da observação das alterações nos espectros de emissão das proteínas na presença de sacarose. Os espectros de emissão obtidos para as invertases em diferentes concentrações de sacarose são apresentados na Figura 31.

Pela análise dos gráficos é possível concluir que apenas a invertase 1 apresenta uma mudança significativa no perfil dos espectros de emissão em função do aumento da concentração de sacarose no meio. Comparando as intensidades dos sinais em 330 nm para as concentrações de 0 e 10 mmol L⁻¹ de sacarose tem-se uma diminuição de cerca de 20,8% para a invertase 1, enquanto que para as invertases 2, 3 e 4 a diminuição é de apenas 3,9%, 7,3% e 4,9%, respectivamente. Este resultado indica que somente a invertase 1 possui algum tipo de interação específica com a sacarose enquanto que as demais proteínas não interagem com o substrato.

Uma vez que as invertases 2, 3 e 4 apresentam mutações cujo objetivo foi sua inativação, o desejado seria que estas proteínas perdessem sua atividade catalítica. Contudo, esperava-se que estas ainda fossem capazes de interagir com a sacarose formando o complexo proteína-substrato. Esta perda da afinidade entre a sacarose e as invertases 2 a 4 podem ser explicadas pela alteração das propriedades do sítio ativo das proteínas ou pela alteração de sua conformação espacial, ou estrutura terciária, como resultado das mutações.

Figura 31: Espectros de fluorescência das invertases 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) em soluções com concentração crescente de sacarose.



De acordo com o mecanismo de hidrólise da sacarose pelas enzimas invertases, apresentado na Figura 3, a formação do complexo enzimático e a hidrólise ocorre pela formação da ligação entre o resíduo de ácido aspártico (D17), desprotonado e a sacarose e a protonação da ligação glicosídica pelo resíduo de ácido glutâmico (E190). Uma vez que o valor de pKa do grupo carboxila da cadeia lateral do resíduo de ácido aspártico (3,86) é menor que o pKa do mesmo grupo do resíduo de ácido glutâmico (4,25), a substituição do glutamato 190 por uma aspartato na invertase 2 (Invertase_E190D) altera o ambiente químico no sítio ativo da enzima. Esta alteração poderia prejudicar o reconhecimento da sacarose no sítio ativo e atrapalhar a formação do complexo enzimático.

De maneira semelhante, a substituição do Glutamato 190 por uma Alanina na invertase 3 (Invertase_E190A) altera o ambiente químico do sítio ativo. A substituição tem como efeito a alteração na eletronegatividade do sítio ativo, uma vez que o Glutamato 190 tem grande influência na carga negativa do sítio ativo da enzima nativa. Além disso, a troca

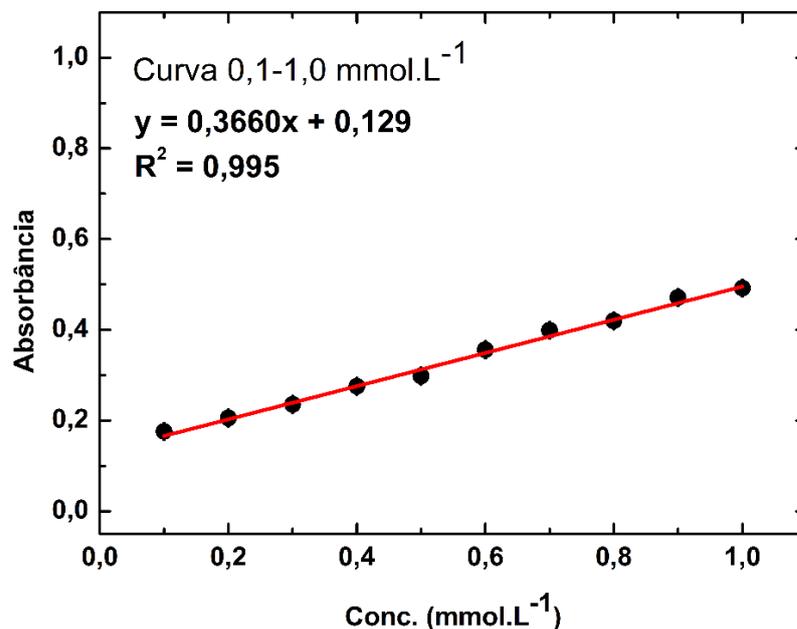
do resíduo original pela Alanina remove o grupo funcional carboxila responsável pela protonação da ligação glicosídica. Essas diferenças explicam a falta de interação observada entre a invertase 3 e a sacarose.

Por outro lado, a invertase 4 (Invertase_A108V_V179A) com suas duas mutações poderia assumir uma conformação distinta da estrutura terciária da enzima nativa. Essa alteração conformacional poderia influenciar na morfologia do sítio ativo da enzima, afetando sua capacidade de reconhecer o substrato.

Apesar disso, todas as quatro invertases foram avaliadas quanto sua capacidade de capturar e remover seletivamente a sacarose de misturas complexas uma vez imobilizadas no suporte nanomagnético. Os ensaios de captura foram realizados à temperatura de 80 °C para avaliar a aplicação dos nanomateriais em altas temperaturas e utilizando-se amostras de suco de laranja e solução de sacarose em tampão pH 3,0, para mimetizar o pH natural do suco de laranja.

A curva analítica para a quantificação e sacarose, construída a partir do método de DNS é apresentada na Figura 32. A curva obtida possui uma boa linearidade ($R^2 = 0,995$), o que a torna adequada para a quantificação de sacarose nas amostras.

Figura 32: Curva analítica para a quantificação de sacarose. Curva obtida a partir do método de DNS para o intervalo de concentração de 0,1 a 1,0 mmol L⁻¹ de sacarose.



Nos testes de remoção de sacarose somente a nanopartícula com a invertase 1 imobilizada foi capaz de capturar e recuperar a sacarose. As demais invertases imobilizadas e a nanopartícula sem proteína não foram capazes de capturar sacarose do meio. Este resultado foi obtido para ambos os testes realizados, para a solução de sacarose $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão pH 3,0 e a para o suco de laranja. A Figura 33 e a Tabela 7 apresentam os resultados obtidos.

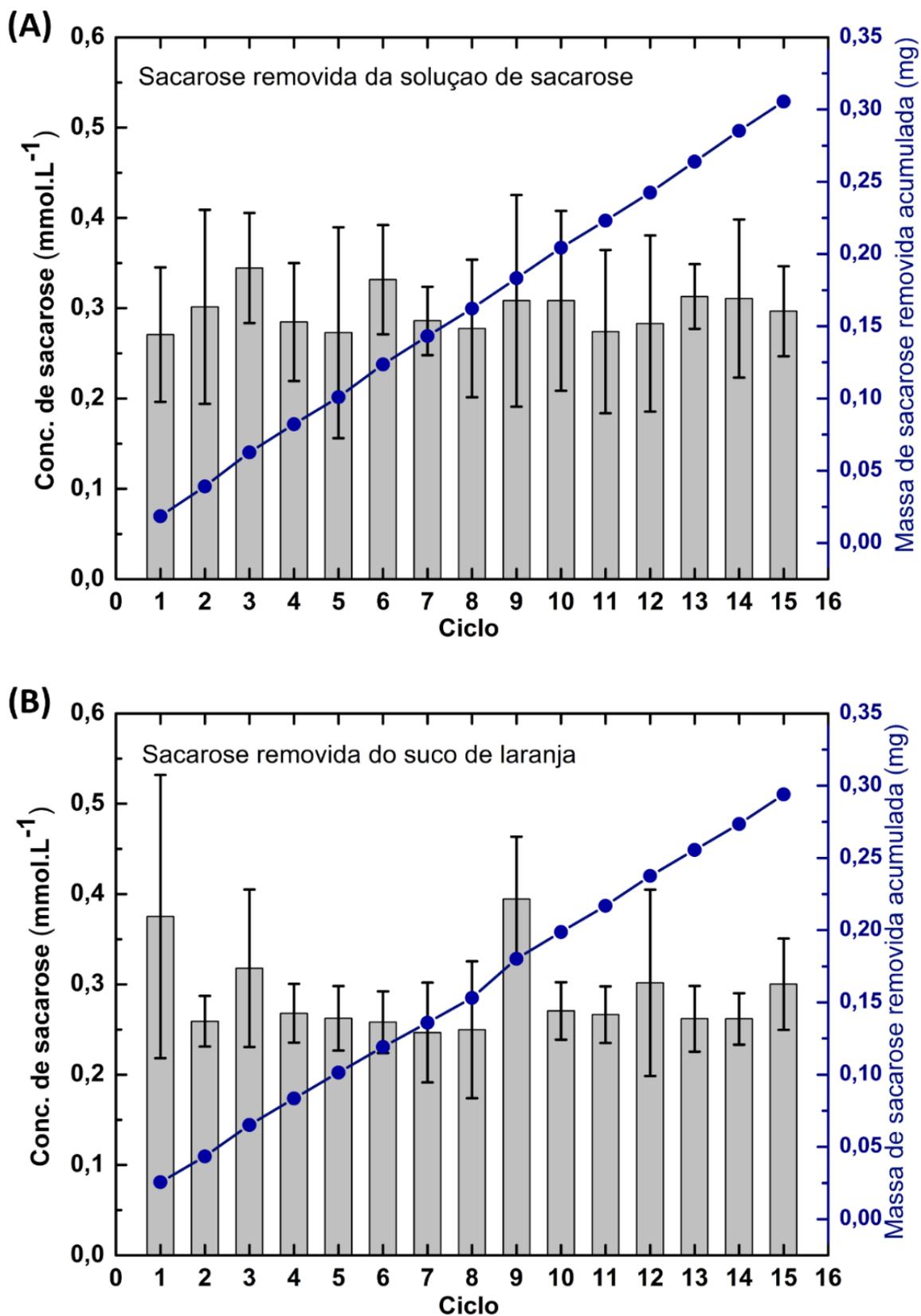
Tabela 7: Resultados obtidos para os testes de remoção de sacarose de solução de sacarose $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e suco de laranja industrializado realizados com a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Inv}1$

	Sacarose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	Suco de Laranja
Massa sacarose removida por ciclo (mg)	$0,02 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,003$
Massa sacarose removida total (mg)	0,305	0,294
Massa de sacarose removida em um ciclo à cada grama de nanomaterial (mg)	0,1	0,1

De acordo com os resultados dos ensaios, observa-se a remoção de cerca de 0,02 miligramas de sacarose a cada ciclo de aplicação do nanomaterial com um desvio padrão de cerca de 0,001 para a solução de sacarose e 0,003 para o suco laranja. O maior desvio observado para os testes com suco de laranja é atribuído ao fato de ser uma amostra muito mais complexa que a primeira. Para ambos os conjuntos de dados, um total de aproximadamente 30 miligramas de sacarose foram removidos ao final de 15 ciclos.

Dessa forma, pode-se concluir que o nanomaterial fabricado foi capaz de remover a sacarose de ambas as amostras com a mesma eficiência, assim demonstrando a eficiência do nanomaterial desenvolvido para a remoção seletiva da sacarose a partir de misturas complexas. Nota-se também que as nanopartículas $\text{MNP}@\text{Inv}1$ são capazes de remover uma quantidade de sacarose semelhante à cada ciclo de forma reprodutível. O mais notável deste resultado é o fato de que o nanomaterial não perde sua eficiência de captura mesmo após a reutilização em diversos ciclos. Ao final de 15 ciclos de remoção, a quantidade de sacarose removida é a mesma do primeiro. Este resultado demonstra a alta estabilidade do nanomaterial e evidencia sua capacidade de aplicação em diversos ciclos de remoção de sacarose sem a necessidade de descarte.

Figura 33: Concentrações de sacarose removida nas alíquotas recuperadas à cada ciclo de aplicação das nanopartículas MNP@Inv1 e massa total de sacarose removida acumulada para os testes realizados com solução de sacarose concentrada (A) e com suco de laranja (B).



Levando em consideração também o fato de que os ensaios foram realizados à temperatura de 80 °C demonstra-se também que o nanomaterial desenvolvido possui alta resistência térmica, mantendo sua atividade desejada mesmo quando exposto a condições mais extremas. Essa propriedade termoestável possibilita que o material seja aplicado em processos industriais para remoção de sacarose sob altas temperaturas.

Calcula-se também a capacidade de remoção de sacarose pelo nanomaterial por cada ciclo de aplicação. Com base nos resultados obtidos, estima-se que 1 g de nanomaterial seria capaz de remover 0,1 mg sacarose por ciclo de aplicação.

As propriedades magnéticas do nanomaterial não sofreram alteração após sua utilização nos ciclos de captura. Sua separação do meio com o auxílio de ímã de neodímio a cada ciclo ocorreu de forma semelhante sem dificuldades. Isso evidencia também a estabilidade das propriedades magnéticas do nanomaterial desenvolvido.

5. CONCLUSÃO

As nanopartículas de magnetita obtidas por meio da metodologia aplicada possuem propriedades físicas e magnéticas boas para a aplicação desejada. Além disso, o protocolo desenvolvido para sua síntese e funcionalização é simples, rápido, reprodutível e de baixo custo, podendo ser reproduzido para a obtenção de nanopartículas *core-shell* de magnetita e sílica para diversas aplicações.

A expressão e purificação das invertases, nativa e mutantes, foi bem sucedida, bem como as caracterizações iniciais sobre atividade enzimática dos clones frente à sacarose. O protocolo de expressão e purificação adotado também se mostrou reprodutível além de fornecer um alto rendimento.

A imobilização das proteínas invertase na superfície das nanopartículas funcionalizadas ocorreu com êxito. Em teoria, o protocolo de imobilização pode ser aplicado para imobilizar qualquer proteína na superfície das nanopartículas. Contudo, estudos mais cuidadosos sobre como controlar este processo e orientar a imobilização das proteínas na superfície são necessários, uma vez que, de forma inesperada, ocorreu a perda da atividade enzimática da invertase 1 após imobilização.

O objetivo do trabalho foi alcançado com sucesso, tendo sido possível a captura e recuperação de sacarose a partir de misturas complexas. O nanomaterial desenvolvido é capaz de remover seletivamente a sacarose de amostras de suco de laranja industrializado com a mesma eficiência observada para soluções concentradas de sacarose. As nanopartículas com a invertase 1 imobilizada mostraram-se capazes de remover cerca de 0,1 mg de sacarose para cada grama de nanomaterial por ciclo de reutilização.

Ainda, a capacidade do nanomaterial de capturar a sacarose das amostras ou suas propriedades magnéticas não foram prejudicadas mesmo após 15 ciclos de reutilização sob temperatura de 80 °C. Este resultado evidencia a alta estabilidade do nanomaterial desenvolvido.

6. PERSPECTIVAS

A aplicação de enzimas como agentes sequestrantes seletivos de seus substratos é uma abordagem muito mais simples que outros métodos de remoção seletiva reportados na literatura. Além disso, esse método possui diversas aplicações, uma vez que existem inúmeras enzimas para serem exploradas para este fim, cada uma com especificidade para substratos específicos. A utilização de nanopartículas magnéticas como suporte para essas enzimas traz ainda mais vantagens no que se refere a possibilidade de recuperação e reutilização destes biocatalisadores.

A aplicação dos protocolos utilizados neste trabalho para a síntese e funcionalização das nanopartículas de magnetita e a imobilização de proteínas em sua superfície poderia ser testada para outros alvos, como por exemplo a remoção de lactose de laticínios por meio da aplicação de enzimas lactase ao invés de invertase. As aplicações vão além da simples remoção de um alvo específico de uma mistura complexa, podendo ser utilizados também para remover compostos de interesse para controle qualidade de produtos ou para diagnósticos médicos se o alvo for um biomarcador de uma doença.

Sugere-se também um estudo mais aprofundado sobre a possibilidade de orientar de forma mais precisa a imobilização das proteínas na superfície das nanopartículas, de forma que estas consigam desempenhar sua atividade, se desejado, mesmo após a imobilização. Isso poderia ser feito por meio de um estudo cuidadoso da superfície das proteínas avaliando por meio de quais resíduos a ligação covalente com a superfície poderia se formar.

REFERÊNCIAS

- (1) Cole, J. B. Genetics of Diabetes Mellitus and Diabetes Complications. *Nat Rev Nephrol* **2020**. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>.
- (2) Lin, X. Global, Regional, and National Burden and Trend of Diabetes in 195 Countries and Territories: An Analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep* **2020**. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71908-9>.
- (3) Jaacks, L. M. Type 2 Diabetes: A 21st Century Epidemic. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.05.003>.
- (4) Tomic, D. The Burden and Risks of Emerging Complications of Diabetes Mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **2022**. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00690-7>.
- (5) Wan, G. Regulation of Endothelial Progenitor Cell Functions during Hyperglycemia: New Therapeutic Targets in Diabetic Wound Healing. *J Mol Med* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02172-1>.
- (6) Cho, N. H. IDF Diabetes Atlas: Global Estimates of Diabetes Prevalence for 2017 and Projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.
- (7) Daneman, D. Type 1 Diabetes. *The Lancet* **2006**. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68341-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68341-4).
- (8) Katsarou, A. Type 1 Diabetes Mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **2017**. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>.
- (9) DeFronzo, R. A. Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **2015**. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>.
- (10) Bellary, S. Type 2 Diabetes Mellitus in Older Adults: Clinical Considerations and Management. *Nat Rev Endocrinol* **2021**. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00512-2>.
- (11) Chatterjee, S. Type 2 Diabetes. *The Lancet* **2017**. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2).
- (12) Petersen, M. C. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* **2018**. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>.

- (13) Bellary, S. Type 2 Diabetes Mellitus in Older Adults: Clinical Considerations and Management. *Nat Rev Endocrinol* **2021**. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00512-2>.
- (14) International Diabetes Federation. *IDF Framework for Action on Sugar*. <https://www.idf.org/images/site1/content/Framework-for-Action-on-Sugar-010615.pdf> (accessed 2022-08-11).
- (15) Manoochehri, H. A Review on Invertase: Its Potentials and Applications. *Biocatal Agric Biotechnol* **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101599>.
- (16) Kulshrestha, S. Invertase and Its Applications – A Brief Review. *J Pharm Res* **2013**. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.07.014>.
- (17) Shen, Y. Research Progress and Application of Enzymatic Synthesis of Glycosyl Compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* **2023**. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12652-8>.
- (18) Jiang, Y. Diversification of Glycosyl Compounds via Glycosyl Radicals. *Angewandte Chemie International Edition* **2023**. <https://doi.org/10.1002/anie.202305138>.
- (19) Alberto, F. The Three-Dimensional Structure of Invertase (β -Fructosidase) from *Thermotoga Maritima* Reveals a Bimodular Arrangement and an Evolutionary Relationship between Retaining and Inverting Glycosidases. *Journal of Biological Chemistry* **2004**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313911200>.
- (20) Trujillo Toledo, L. E. Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries. In *Enzymes in Food Biotechnology*; Elsevier, **2019**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00026-8>.
- (21) Lammens, W. Crystal Structures of Arabidopsis Thaliana Cell-Wall Invertase Mutants in Complex with Sucrose. *J Mol Biol* **2008**. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.074>.
- (22) Reddy, A. Studies on Identifying the Catalytic Role of Glu-204 in the Active Site of Yeast Invertase. *Journal of Biological Chemistry* **1996**. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.13953>.
- (23) Osiebe, O. Intracellular Invertase Hyperproducing Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* Isolated from Abagboro Palm Wine. *Sci Rep* **2023**. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32289-x>.

- (24) Boyce, A. Expression and Characterisation of a Thermophilic Endo-1,4- β -Glucanase from *Sulfolobus Shibatae* of Potential Industrial Application. *Mol Biol Rep* **2018**. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4381-7>.
- (25) Liebl, W. Analysis of the Gene for β -Fructosidase (Invertase, Inulinase) of the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga Maritima*, and Characterisation of the Enzyme Expressed in *Escherichia Coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **1998**. <https://doi.org/10.1007/s002530051256>.
- (26) Martínez, D. Complete Sucrose Hydrolysis by Heat-Killed Recombinant *Pichia Pastoris* Cells Entrapped in Calcium Alginate. *Microb Cell Fact* **2014**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-87>.
- (27) Alberto, F. Crystal Structure of Inactivated *Thermotoga Maritima* Invertase in Complex with the Trisaccharide Substrate Raffinose. *Biochemical Journal* **2006**. <https://doi.org/10.1042/BJ20051936>.
- (28) Chowdhury, R. From Directed Evolution to Computational Enzyme Engineering—A Review. *AIChE Journal* **2020**. <https://doi.org/10.1002/aic.16847>.
- (29) BLOOM, J. Evolving Strategies for Enzyme Engineering. *Curr Opin Struct Biol* **2005**. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.06.004>.
- (30) Sharma, A. Enzyme Engineering: Current Trends and Future Perspectives. *Food Reviews International* **2021**. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695835>.
- (31) Victorino da Silva Amatto, I. Enzyme Engineering and Its Industrial Applications. *Biotechnol Appl Biochem* **2022**. <https://doi.org/10.1002/bab.2117>.
- (32) Ali, M. Enzyme Engineering: Reshaping the Biocatalytic Functions. *Biotechnol Bioeng* **2020**. <https://doi.org/10.1002/bit.27329>.
- (33) Otte, K. B. Enzyme Engineering in the Context of Novel Pathways and Products. *Curr Opin Biotechnol* **2015**. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.011>.
- (34) Baig, N. Nanomaterials: A Review of Synthesis Methods, Properties, Recent Progress, and Challenges. *Mater Adv* **2021**. <https://doi.org/10.1039/D0MA00807A>.
- (35) Dudchenko, N. Magnetite Nanoparticles: Synthesis and Applications in Optics and Nanophotonics. *Materials* **2022**. <https://doi.org/10.3390/ma15072601>.

- (36) Nicoliche, C. Y. N. *In Situ* Nanocoating on Porous Pyrolyzed Paper Enables Antibiofouling and Sensitive Electrochemical Analyses in Biological Fluids. *ACS Appl Mater Interfaces* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c18778>.
- (37) Malik, S. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules* **2023**. <https://doi.org/10.3390/molecules28020661>.
- (38) Niculescu, A.-G. Magnetite Nanoparticles: Synthesis Methods – A Comparative Review. *Methods* **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.018>.
- (39) Kristiansen, A. B. Investigation of Magnetite Particle Characteristics in Relation to Crystallization Pathways. *Powder Technol* **2023**. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2022.118145>.
- (40) Wu, W. Recent Progress on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications. *Sci Technol Adv Mater* **2015**. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>.
- (41) Nadoll, P. The Chemistry of Hydrothermal Magnetite: A Review. *Ore Geol Rev* **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2013.12.013>.
- (42) Mirabello, G. Bioinspired Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Chem Soc Rev* **2016**. <https://doi.org/10.1039/C6CS00432F>.
- (43) Lu, A.-H. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**. <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>.
- (44) Xu, J. Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization. *Molecules* **2014**. <https://doi.org/10.3390/molecules190811465>.
- (45) Kazemzadeh, H. In Situ Synthesis of Silica-Coated Magnetite Nanoparticles by Reverse Coprecipitation Method. *J Supercond Nov Magn* **2012**. <https://doi.org/10.1007/s10948-011-1270-x>.
- (46) de Mendonça, E. S. D. T. Effects of Silica Coating on the Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles. *Surfaces and Interfaces* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.11.005>.

- (47) Mahmed, N. The Magnetic and Oxidation Behavior of Bare and Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles Synthesized by Reverse Co-Precipitation of Ferrous Ion (Fe^{2+}) in Ambient Atmosphere. *J Magn Magn Mater* **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2013.10.012>.
- (48) Bilal, M. Magnetic Nanoparticles as Versatile Carriers for Enzymes Immobilization: A Review. *Int J Biol Macromol* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.025>.
- (49) de Mendonça, E. S. D. T. Effects of Silica Coating on the Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles. *Surfaces and Interfaces* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.11.005>.
- (50) Vaghari, H. Application of Magnetic Nanoparticles in Smart Enzyme Immobilization. *Biotechnol Lett* **2016**. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1977-z>.
- (51) Mollarasouli, F. Magnetic Nanoparticles in Developing Electrochemical Sensors for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Talanta* **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122108>.
- (52) Materón, E. M. Magnetic Nanoparticles in Biomedical Applications: A Review. *Applied Surface Science Advances* **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100163>.
- (53) Tang, W. Site-Specific and Covalent Immobilization of Lipase on Natural Polyphenol-Modified Magnetic Nanoparticles for Effective Biodiesel Production. *ACS Sustain Chem Eng* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c07881>.
- (54) Amruth Maroju, P. Biofuel Generation from Food Waste through Immobilized Enzymes on Magnetic Nanoparticles. *Mater Today Proc* **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.05.555>.
- (55) Zanuso, E. Magnetic Nanoparticles as Support for Cellulase Immobilization Strategy for Enzymatic Hydrolysis Using Hydrothermally Pretreated Corn Cob Biomass. *Bioenergy Res* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10384-z>.
- (56) Darwesh, O. M. Enzymes Immobilization onto Magnetic Nanoparticles to Improve Industrial and Environmental Applications; **2020**. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.11.006>.

- (57) Matveeva, V. G. Magnetic Nanoparticle-Containing Supports as Carriers of Immobilized Enzymes: Key Factors Influencing the Biocatalyst Performance. *Nanomaterials* **2021**. <https://doi.org/10.3390/nano11092257>.
- (58) Johnson, P. A. Enzyme Nanoparticle Fabrication: Magnetic Nanoparticle Synthesis and Enzyme Immobilization; **2011**. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-895-9_15.
- (59) Bradford, M. M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **1976**. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (60) Santos, A. A. Dosagem de Açúcares Redutores Com o Reativo DNS Em Microplaca. *Brazilian Journal of Food Technology* **2017**. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11315>.