



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 - Fax: (35) 3299-1063



ISABELLA FERNANDES SOUZA AVERSA

**Imobilização de tripsina suína em nanopartículas magnéticas:
atividade e estabilidade enzimática**

Orientador: Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso
Coorientadora: Prof. Dra. Olga Luisa Tavano

ISABELLA FERNANDES SOUZA AVERSA

Imobilização de tripsina suína em nanopartículas magnéticas: atividade e estabilidade enzimática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química Orientador: Dr. Luciano Sindra Virtuoso Coorientadora: Prof. Dra. Olga Luisa Tavano

Alfenas
2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Aversa, Isabella Fernandes Souza.

Imobilização de tripsina suína em nanopartículas magnéticas: :
atividade e estabilidade enzimática / Isabella Fernandes Souza Aversa. -
Alfenas, MG, 2022.

63 f. : il. -

Orientador(a): Luciano Sindra Virtuoso.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,
Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Imobilização de enzimas. 2. Tripsina. 3. nanopartículas
superparamagnética. 4. Nanobiocatalisador. 5. Atividade enzimática. I.
Virtuoso, Luciano Sindra, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

ISABELLA FERNANDES SOUZA AVERSA

**Imobilização de tripsina suína em nanopartículas magnéticas:
atividade e estabilidade enzimática**

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

Aprovada em: 29 de julho de 2022

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Prof. Dr. Leonardo Ramos Paes de Lima
Instituição: Centro Universitário Católica do Leste de Minas Gerais (UNILESTE)

Dra. Poliana Aparecida Lopes Machado
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Documento assinado eletronicamente por **Luciano Sindra Virtuoso, Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2022, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Ramos Paes de Lima, Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Poliana Aparecida Lopes Machado, Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0783721** e o código CRC **B47A519D**.

Com todo o meu amor, a minha mãe Rosimeire, ao meu pai Marco Aurélio e ao meu irmão João Antônio pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu namorado Gabriel pelo amor, companheirismo e incentivo durante toda fase final. Sem seu apoio nada disso teria sido possível, amo você.

Aos professores Luciano Sindra Virtuoso e Olga Luisa Tavano por não me deixarem desistir e sempre me incentivarem a seguir em frente e alcançar meus objetivos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me abençoar e guiar sempre durante toda a minha vida.

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós Graduação em Química e ao Instituto de Química pela oportunidade e infraestrutura usada no desenvolvimento deste trabalho e por permitir a minha formação.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Química de Coloides por toda a ajuda e companheirismo durante esses anos. Em especial, agradeço a ajuda e dedicação do Thalles que colaborou com o desenvolvimento do meu trabalho, ao Maurício na ajuda de formatação de figuras, ao Marcello que também me ajudou com dicas e assessoria com experimentos. Agradeço também ao Prof. Luiz Fernando Gorup que ajudou com as caracterizações de microscopia eletrônica e tratamento das imagens de micrografia, e ao Prof. Teodorico e o Dr. Alexandre pela realização da parte computacional.

A minha coorientadora professora Dra. Olga Luisa Tavano pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, professor Dr. Luciano Sindra Virtuoso por acreditar em mim, me apoiar e me fazer acreditar que seria capaz de finalizar essa etapa da minha vida e finalmente ser Mestre em Química.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” e a da “Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financiamento 01.

RESUMO

A obtenção de um nanobiocatalisador baseado na interação direta entre nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) e tripsina suína foi investigada no presente trabalho. Especificamente, a adsorção física de nanopartículas magnéticas com tripsina foi estudada a partir da modulação das cargas superficiais pelo controle do pH tanto da enzima quanto do nanomaterial de suporte. A interação nanopartícula-enzima foi avaliada por medidas experimentais de fluorescência e modelagem teórica. Os resultados obtidos mostraram que o material imobilizado, sob diferentes condições de pH, apresentou 66,2, 67,1 e 75,4% de adsorção enzimática ao suporte em pH 4,0, 7,0 e 8,0, respectivamente. A atividade enzimática recuperada em cada caso foi de 31,84, 27,56 e 32,28%, respectivamente, em relação à atividade inicial de tripsina livre. A eficiência catalítica foi medida através da reação envolvendo a conversão do substrato N- α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilina no produto p-nitroanilina monitorada por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 410 nm. Os estudos de dessorção mostraram pelas técnicas analisadas que após 5 ciclos de lavagem não foi possível determinar a taxa de dessorção devido aos valores obtidos serem inferiores aos limites de detecção de fluorescência (0,4 mg.mL⁻¹). A reutilização da Tripsina imobilizada foi testada ao longo de vários ciclos em processos catalíticos utilizando BapNA como substrato. O processo ocorreu com uma eficiência de aproximadamente 88% até o segundo ciclo, e a enzima imobilizada reteve uma eficiência em torno de 40% até o quarto ciclo. Além disso, a interação tripsina-nanopartículas também foi avaliada em pH 4,0 por espectroscopia de fluorescência e os valores dos parâmetros termodinâmicos $\Delta G^\circ = -31,50 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H^\circ = 15,31 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\circ = 32,99 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, foram encontrados, o que é consistente com a ocorrência de interações predominantemente iônicas. A imobilização da tripsina suína na superfície das SPIONs também foi avaliada computacionalmente. O perfil de energia potencial para a adsorção da tripsina suína sobre a superfície do material foi calculado e mostrou que a enzima protonada em pH 8,0 pode ser mais fortemente adsorvida sobre a superfície das nanopartículas. Foi possível constatar também, que a taxa de adsorção da enzima aumentou significativamente em pH 8,0, e neste mesmo pH, o perfil de energia de adsorção é mais favorável e estável em distâncias menores da superfície, indicando que uma maior quantidade de enzima pode ser adsorvido sobre as SPIONs.

Palavras-chave: imobilização de enzimas, tripsina, nanopartículas superparamagnéticas, nanobiocatalisador, atividade enzimática.

ABSTRACT

Obtaining a nanobiocatalyst based on the direct interaction between superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and porcine trypsin was investigated in the present work. Specifically, the physical adsorption of magnetic nanoparticles with trypsin was studied from the modulation of surface charges by controlling the pH of both the enzyme and the supporting nanomaterial. Nanoparticle-enzyme interaction was evaluated by experimental measurements of fluorescence and theoretical modeling. The results obtained showed that the immobilized material, under different pH conditions, showed 66.2, 67.1, and 75.4% of enzyme adsorption to the support at pH 4.0, 7.0, and 8.0, respectively. The enzyme activity recovered in each case was 31.84, 27.56, and 32.28%, respectively, in relation to the initial free trypsin activity. The catalytic efficiency was measured through the reaction involving the conversion of the substrate N- α -Benzoyl-DL-arginine-4-nitroaniline into the product *p*-nitroaniline monitored by UV-Vis spectrophotometry at a wavelength of 410 nm. The desorption studies showed by the analyzed techniques that after 5 washing cycles it was not possible to determine the desorption rate due to the values obtained being lower than the fluorescence detection limits (0.4 mg.mL⁻¹). The reuse of immobilized Trypsin was tested over several cycles in catalytic processes using BapNA as substrate. The catalysis process occurred with an efficiency of approximately 88% until the second cycle, and the immobilized enzyme retained an efficiency of around 40% until the fourth cycle. In addition, the trypsin-nanoparticle interaction was also evaluated by fluorescence spectroscopy and the values of the thermodynamic parameters $\Delta G^\circ = -31.5 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H^\circ = 15.31 \text{ kJ mol}^{-1}$, and $T\Delta S^\circ = 32.99 \text{ kJ mol}^{-1}K^{-1}$ were found, which is consistent with the occurrence of predominantly ionic interactions. Immobilization of porcine trypsin on the surface of SPIONs was also computationally evaluated. The potential energy profile for the adsorption of porcine trypsin on the surface of the material was calculated and showed that the enzyme protonated at pH 8.0 can be more strongly adsorbed on the surface of the nanoparticles. It was also possible to verify that the enzyme adsorption rate increased significantly at pH 8.0, and at this same pH, the adsorption energy profile is more favorable and stable at smaller distances from the surface, indicating that a greater amount of enzyme can be adsorbed over SPIONs.

Keywords: enzyme immobilization, trypsin, superparamagnetic nanoparticles, nanobiocatalyst, enzymatic activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1	Nanopartículas Magnéticas e suas propriedades	9
2.2	Enzimas.....	13
2.2.1	Tripsina	15
2.2.2	Imobilização de enzimas	19
2.2.3	Imobilização de Tripsina	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Materiais.....	26
3.2	Síntese das SPIONs.....	27
3.3	Imobilização da tripsina suína.....	27
3.4	Atividade enzimática da tripsina livre e imobilizada	28
3.4.1	Análise do efeito do pH sobre a atividade da Tripsina livre	29
3.5	Estudos de dessorção.....	29
3.6	Interação enzima-nanopartícula	29
3.6.1	Experimentos de fluorescência	29
3.6.2	Protocolo de modelagem molecular	30
3.6.2.1	<i>Preparação da enzima</i>	30
3.6.2.2	<i>Cálculos teóricos</i>	30
3.7	Técnicas de Caracterização	31
3.7.1	Potencial Zeta (PZ)	31
3.7.2	Microscopia eletrônica de varredura	32
3.7.3	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	33
3.7.4	Medidas magnéticas	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Síntese e caracterização das SPIONs e SPION@Tri	33
4.2	Caracterização da Imobilização Enzimática	42
4.2.1	Estudos interacionais Tripsina-SPION	45
4.2.2	Modelagem	47
4.2.3	Avaliação dos ciclos de reuso da SPION@Tri	49
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês Atomic Force Microscopy)
CSD	Banco de dados estrutural de Cambridge (do inglês Cambridge Crystallographic Database)
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês Dynamic Light Scattering)
DRX	Difração de raios-X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
NPM	Nanopartículas Magnéticas
SPION	Nanopartículas Superparamagnética de Óxido de Ferro (do inglês, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles)
SPION@Tri	SPIONs imobilizadas com Tripsina Suína
PDB	Banco de dados de Proteínas (do inglês Protein Data Bank)
TEM	Microscopia eletrônica de Transmissão (do inglês Transmission Electronic Microscopy)
SEM	Microscopia eletrônica de Varredura (do inglês Scanning Electronic Microscopy)
BapNA	N- α – Benzoil – DL – arginina – 4-nitroanilina
PZ	Potencial Zeta
pH	Potencial Hidrogeniônico
Tri	Tripsina Suína

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são um catalisador com alto potencial de aplicação em processos biotecnológicos por serem biocatalisadores altamente seletivos (AMALIA, *et al.*, 2021). Nas últimas décadas a enzima proteolítica que vem sendo amplamente utilizada como biocatalisador em processos industriais, é a tripsina, devido a sua alta seletividade, além do uso de condições brandas, reduzindo a produção de reações secundárias indesejáveis (TAPDIGOV, 2021).

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma serino endopeptidase, também conhecida como serino protease, e seu alto potencial proteolítico vem sendo aplicado nas últimas décadas nas indústrias de alimentos e bebidas para melhorar e facilitar o processo, aumentando a maciez das carnes e a qualidade das massas, na estabilização a frio da cerveja, além da produção de hidrolisados proteicos (LACERDA, 2014). Embora a tripsina tenha um alto potencial biotecnológico, elas não são quimicamente estáveis e perdem rapidamente sua atividade biológica. Devido à impossibilidade de sua reutilização na forma solúvel (livre) e aos altos custos, a aplicação de enzimas solúveis em larga escala é muito limitada (LI; HU; LIU, 2004). Uma solução para superar esses inconvenientes tem sido a imobilização dessas enzimas em suportes sólidos.

A imobilização de enzimas em materiais de suporte tem sido uma estratégia muito comum para a maioria das aplicações, sendo um método que mantém as moléculas de proteínas confinadas ou localizadas em uma determinada região definida do espaço, com a proteção de suas atividades catalíticas (ROMASKEVIC *et al.*, 2006). Em que as enzimas podem ser imobilizadas por ligação covalente ou aprisionamento físico em uma variedade de suportes sólidos, como matrizes poliméricas (BILAL *et al.*, 2018), materiais porosos, nanotubos de carbono (COSTA *et al.*, 2018), membranas (YANG *et al.*, 2018) e materiais magnéticos (WU *et al.*, 2019).

Dentre os diversos tipos de suportes que têm sido empregados na imobilização de enzimas (ALI *et al.*, 2021), o uso de nanomateriais, principalmente aqueles com propriedades magnéticas, ganhou destaque recentemente. Em particular, a aplicação de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4) como suporte para imobilização enzimática tem sido de grande interesse, devido à sua baixa toxicidade, grande área de superfície disponível, baixo custo e suas propriedades superparamagnéticas (WAN *et al.*, 2022).

Nanopartículas magnéticas abaixo de um certo tamanho crítico podem apresentar comportamento superparamagnético. O tamanho crítico das partículas de Fe_3O_4 , que resulta em uma transição de uma estrutura de domínio de múltiplo para uma estrutura de domínio único, necessário para atingir o superparamagnetismo, mas foi amplamente estimado em menos de 20nm (JUN *et al.*, 2004). O superóxido confere às nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs) grande simplicidade de isolamento de meios multifásicos externos pela aplicação de um campo magnético e fácil dispersão após a remoção do campo externo (TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012). Resistência a um recurso separado de um campo magnético, diluição de separação e separação de etapas, como recurso separado de um campo magnético, diluição durante a separação e separação de etapas, como recurso de separação da resistência, como a necessidade de centrifugação da e perda de centrifugação. Como a separação magnética é rápida e eficiente, há também uma economia de tempo (ALI *et al.*, 2021).

A tripsina é uma enzima que já possui vasta literatura relacionada a sua importância em diversas áreas e a sua atividade enzimática. Entretanto, o estudo dessa enzima suportada em diferentes materiais, e particularmente em nanopartículas magnéticas, ainda não foi suficientemente avaliado e aspectos sobre a caracterização da enzima imobilizada são ainda precariamente relatadas na literatura.

Neste trabalho, o nanobiocatalisador formado pela adsorção de tripsina suína com SPIONs foi preparado, amplamente caracterizado, e sua atividade catalítica foi avaliada. A interação SPION-tripsina foi caracterizada termodinamicamente com o objetivo de contribuir para o entendimento de eventos na interface nanopartícula-enzima. As condições de controle de pH, propriedades de carga de superfície de ambas tripsina e SPIONs no processo de imobilização foram investigadas. Foi demonstrado que a enzima imobilizada pode ser separada do meio reacional com facilidade, rapidez e eficiência por um campo magnético externo. As propriedades enzimáticas da enzima imobilizada foram então investigadas em termos da atividade proteolítica recuperada após o processo de imobilização, a quantidade de enzima efetivamente imobilizada na superfície do suporte, a taxa de dessorção da enzima e a taxa de estabilidade operacional de vários ciclos de reutilização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nessa seção são apresentados os levantamentos bibliográficos realizados sobre os objetos de estudo centrais deste trabalho. Primeiramente, é apresentado uma revisão bibliográfica sobre aspectos gerais e de aplicação das chamadas SPIONs com foco nas suas propriedades, em seguida a revisão avança para uma abordagem sobre o atual uso de enzimas em processos industriais, em particular, sobre a tripsina e sobre o estado da arte dos processos de imobilização enzimática.

2.1 Nanopartículas Magnéticas e suas propriedades

Na última década, aumentaram as investigações efetuadas das chamadas nanopartículas magnéticas envolvendo vários tipos de óxidos de ferro e de cobalto mas, principalmente da magnetita (Fe_3O_4) na ordem de 5-20 nm (MAMANI, 2009). Frenkel e Dorfman foram os primeiros a prever que uma partícula de material ferromagnético, abaixo de uma dimensão crítica ($< 15\text{nm}$ para os materiais comuns), constituem um monodomínio magnético, isto é, uma partícula que está em um estado de magnetização uniforme em qualquer campo.

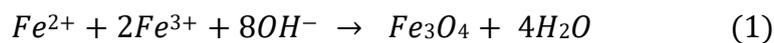
Com a diminuição do tamanho médio da partícula, ocorre um aumento da área superficial por volume. Por exemplo, se a área superficial de um cubo com aresta de 1 cm é de 6 cm^2 para um volume de 1 cm^3 . Ao restringir a aresta do cubo para 1 mm, para um volume total de 1 cm^3 , são encontrados 1000 cubos cuja área superficial totaliza 60 cm^2 . Em escala nanométrica, admitindo que cada cubo seja composto por arestas de 1 nm, há 1021 cubos por 1 cm^3 de volume total, e a área superficial daí resultante é agora de $60.000.000\text{ cm}^2$ (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Nesse sentido, uma nanopartícula magnética com diâmetro de 30 nm, possui 5% dos seus átomos na superfície, enquanto que, a mesma nanopartícula com diâmetro de 10 nm possui 20% dos átomos na superfície e chegando a ter 50% dos átomos na superfície em diâmetros de 3 nm. Esse aumento de átomos na superfície das nanopartículas é responsável pelas diversas propriedades e empregabilidade desses materiais (MARTINS; TRINDADE, 2012).

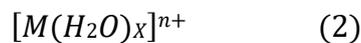
As nanopartículas magnéticas são geralmente constituídas por óxidos de ferro, entretanto, nanopartículas obtidas a partir dos elementos níquel e cobalto, também possuem essa mesma nomenclatura. Na natureza existem diversos tipos de óxidos de

ferro, sendo os principais: a ferrihidrita (Fe_5HO_8); a hematita ($\alpha\text{-}Fe_2O_3$), a maguemita ($\gamma\text{-}Fe_2O_3$); e a magnetita (Fe_3O_4). Essas espécies possuem propriedades magnéticas, elétricas, morfológicas e físico-químicas interessantes para a aplicação tecnológica. Contudo, somente a magnetita e em alguns processos a maguemita, possui momento magnético suficientemente alto, baixa toxicidade, processo de obtenção economicamente viável e estabilidade química para ser aplicada em sistemas biológicos (FIGUEROLA *et al.*, 2010).

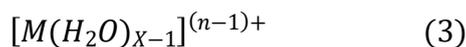
A magnetita é um óxido misto com fórmula molecular $FeO\cdot Fe_2O_3$, onde estão presentes na estrutura os cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} numa proporção estequiométrica de 1:2, podendo ser sintetizada através do método de coprecipitação de uma mistura de sais contendo Fe^{2+} e Fe^{3+} em ambiente aquoso seguido de precipitação com hidróxido e em atmosfera inerte, conforme a Equação 1. Nesse método, pode ocorrer uma grande variação no tamanho. O controle de tamanho, forma e composição das partículas depende da razão estequiométrica entre os cátions, do pH, da velocidade de agitação do sistema e da velocidade de adição do agente redutor.



Na síntese da magnetita, primeiramente ocorre à coordenação das moléculas de água pelos cátions metálicos (M), formando espécies do tipo (Equação 2):



as quais sofrem hidrólise e formam compostos do tipo (Equação 3):

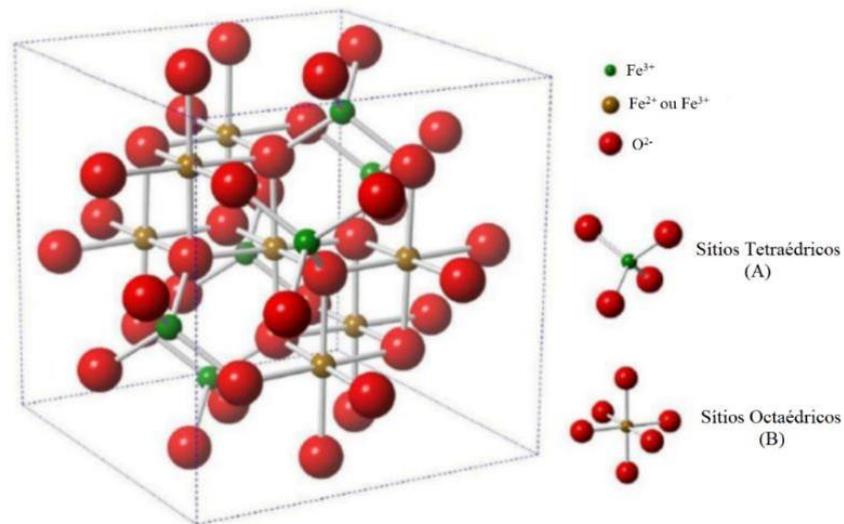


Esses compostos dimerizam com a liberação de água, obrigando os oxigênios dos grupos OH^- formarem ligações de hidrogênio entre os monômeros. Posteriormente, as espécies hidrolisadas continuam se associando e condensando-se através de ligações de hidrogênio em regiões ausentes de prótons, dando origem às características estruturais específicas da nanopartícula (SOUZA, 2011).

A magnetita forma uma estrutura do tipo espinélio invertido, AB_2O_4 , em que os íons O^{2-} formam um arranjo cúbico de face centrada, gerando dois tipos de sítios de coordenação, o primeiro tetraédrico, no qual, o cátion se encontra no centro do tetraedro interagindo com quatro íons oxigênio, e o segundo, octaédrico, onde uma proporção de cátions divalentes e trivalentes ocupam o centro do octaedro formado interações com seis íons oxigênio (figura 1) (SOUZA, 2011; VERWEY, 1939). Essa disposição resulta em 24 átomos de Fe (16 íons Fe^{3+} e 8 íons Fe^{2+}) e 128 átomos de oxigênio arranjados em uma única célula unitária.

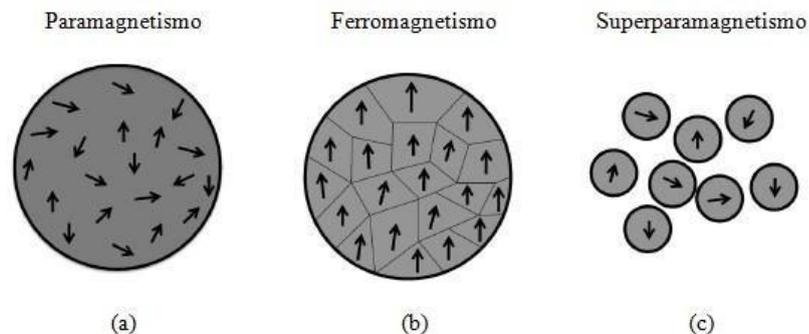
Os momentos magnéticos das nanopartículas magnéticas obtidas a partir da magnetita reagem ao efeito da aplicação de um campo magnético externo, podendo ser classificados em relação ao tipo de interação, atrativa ou repulsiva, quando esses formam um dipolo magnético. Um material diamagnético, como por exemplo, a água, não possui dipolo magnético quando exposto a um campo magnético externo devido a sua magnetização ocorrer em sentido oposto ao campo, resultando em uma força de repulsão. Já os materiais paramagnéticos apresentam dipolos magnéticos orientados aleatoriamente, podendo ser alinhados por ação de um campo magnético externo (figura 2a) e subdivididos em materiais ferromagnéticos; em materiais ferrimagnéticos; e em materiais antiferromagnéticos.

Figura 1 - Célula unitária da estrutura cristalina de espinélio do tipo AB_2O_4 .



Fonte: Adaptado de GALVÃO *et al.*, 2016

Figura 2 – Orientação de Dipolos Magnéticos em materiais (a) Paramagnéticos, (b) Ferromagnéticos e (c) Superparamagnéticos.



Fonte: Adaptado de MARTINS; TRINDADE, 2012

Em um material ferromagnético (figura 2b), os dipolos magnéticos existem

mesmo na ausência de um campo magnético externo e exercem um efeito de longo alcance, exibindo um momento magnético permanente. No material ferrimagnético existem sempre dipolos magnéticos mais fracos alinhados antiparalelamente com os dipolos magnéticos mais fortes adjacentes, na ausência de campo magnético externo. Exemplos de materiais ferrimagnéticos, são os óxidos de ferro: magnetita, Fe_3O_4 , maguemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e as ferritas MFe_2O_3 em que $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Mn}$, etc. Para um material antiferromagnético, os dipolos adjacentes são antiparalelos, na ausência de um campo externo, cancelando-se mutuamente. Os óxidos metálicos MnO , CoO e NiO são exemplos de materiais antiferromagnéticos. Em geral, os materiais apelidados trivialmente de magnéticos são aqueles que apresentam características de ferro ou ferrimagnetismo (JEONG *et al.*, 2007; MARTINS; TRINDADE, 2012). Com a diminuição do tamanho de partícula abaixo de certo valor crítico, em um sólido ferromagnético, os elétrons desemparelhados se comunicam fortemente um com o outro e se alinham (mesmo com a ausência de um campo magnético) em regiões largas chamadas domínios magnéticos. Nessa situação, a formação de domínios torna-se energeticamente desfavorável e a redução de volume do material faz com que as nanopartículas magnéticas se comportem como um único átomo em um monodomínio (figura 2c) aumentando drasticamente o seu momento magnético. Este comportamento é chamado de superparamagnetismo e é a principal propriedade de interesse para aplicação desse tipo de material em processos de separação (MARTINS; TRINDADE, 2012).

A estabilidade desses materiais está diretamente relacionada ao equilíbrio das interações atrativas e repulsivas entre as nanopartículas. As principais medidas usadas para garantir esse equilíbrio é o controle das cargas de superfície (repulsão eletrostática) e a utilização de moléculas de cadeias longas (repulsão estérica).

Na síntese de nanopartículas, os fenômenos de agregação e crescimento das partículas resultam na diminuição de sua área de superfície. Além disso, quando dispersas, apresentam movimento contínuo e aleatório que favorece sua agregação e precipitação. Esse movimento leva a um maior número de colisões entre partículas, o conteúdo energético se torna suficiente para promover a atração entre si, dando origem a partículas mais susceptíveis a força gravitacional, enfatizando o processo de agregação. Ao utilizar um recobrimento adequado, além de possibilitar um aumento na estabilidade coloidal, é possível conciliar a presença de grupos funcionais livres na superfície das nanopartículas (SILVA, 2017).

Recentemente o uso de nanopartículas como suporte para a imobilização de

enzimas tem recebido bastante atenção da comunidade científica. Devido à suas dimensões reduzidas e características únicas elas tem o potencial de revolucionar os processos biotecnológicos relacionados à imobilização de enzimas.

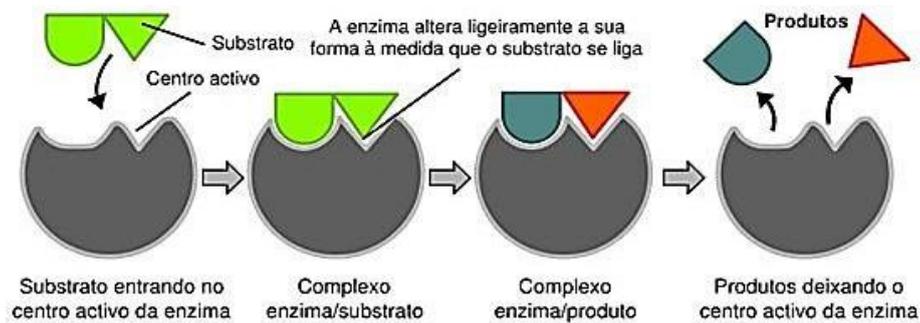
2.2 Enzimas

Proteínas podem ser definidas como uma, ou mais, cadeias poliméricas lineares formadas por resíduos de aminoácidos que se unem por ligações peptídicas. São moléculas compostas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, com estrutura tridimensional, responsável pelas suas atividades biológicas. A estrutura básica desses resíduos de aminoácidos é constituída de um carbono assimétrico (carbono α) com seus ligantes: um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino primário (-NH₂), um átomo de hidrogênio (-H), uma cadeia lateral (radical, R) variável entre os resíduos e são responsáveis pelas características estruturais e funcionais das moléculas proteicas (PINEDO; ELARD; ROJAS, 2010). O grupo lateral é diferente para cada aminoácido e define as características físico-químicas das moléculas, como a ionização em solução aquosa e o grau de polaridade. Os grupos funcionais de R reagem entre si ou com outros compostos proteicos, ou se acomodam quimicamente em regiões polares (carregadas ou não), ou apolares das estruturas. Essas interações, predeterminadas em um contexto funcional, dão sustentação e estabilidade à estrutura nativa de uma proteína (PINEDO; ELARD; ROJAS, 2010).

As enzimas são catalizadores biológicos que aceleram as reações químicas em ambos os sentidos de um processo reversível sem se alterar e estão envolvidas em todos os processos naturais. A partir da ação dessa classe especial de proteínas, as condições de reação se tornam energeticamente mais favoráveis, visto que, as enzimas atuam em condições de temperaturas abaixo de 100 °C, em valores de pH próximo a neutralidade e à pressão atmosférica. O entendimento da atuação desses biocatalisadores durante o processo de catálise foi estabelecido a partir do conceito de sítio ativo ou sítio catalítico, devido a sua especificidade em relação aos substratos que podem interagir. Este é definido como uma região tridimensional da enzima que permite a interação específica com o substrato e onde ocorre a reação química (SILVA, 2017). A especificidade da ligação do substrato depende do arranjo dos átomos no centro catalítico que é descrito a partir do modelo de chave e fechadura, elaborado por E. Fischer em 1890 (figura 3). Esse modelo se baseia na especificidade da ação enzimática e pressupõe que o substrato e o centro

catalítico terão formas complementares, existindo, portanto, um encaixe perfeito. Contudo, outro modelo complementar, chamado de teoria do encaixe induzido foi desenvolvido por Koshland em 1958. Nessa concepção, os substratos ao interagir, provocam uma mudança conformacional no sítio catalítico e também podendo ocorrer no restante da estrutura da enzima (PEREIRA, 2010). E assim, a conversão dos reagentes em produtos numa reação enzimática é quantificada com base nesses modelos a partir da atividade enzimática apresentada pelo sistema.

Figura 3 - Modelo de complementaridade estrutural entre enzima e substrato.



Fonte: <https://www.sobiologia.com.br>. Acesso em: 30 de junho de 2022

As enzimas são ativas em uma faixa estreita de pH e na maioria dos casos existe um pH ótimo, em que a sua atividade enzimática é máxima. Sua eficiência catalítica é influenciada pela ionização dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico e depende de uma conformação tridimensional específica dessa mesma região. Esses grupos ionizáveis atuam normalmente como nucleófilos em reações enzimáticas, sendo que, uma pequena alteração de pH pode impedir esses grupos de permanecerem carregados, logo dificultando a formação do complexo enzima/substrato e consequentemente, impedindo que a reação catalítica aconteça. Portanto, quando é usado valores de pH próximo do ótimo é verificado uma diminuição na atividade enzimática, porém reversível, e quando são usados valores extremos, podem ocorrer perdas totais de atividade em decorrência do desovelamento irreversível (desnaturação) da enzima (SILVA, 2012).

O controle da temperatura também é importante durante esses processos, pois é o fornecimento de energia na forma de calor que irá aumentar a probabilidade de colisão entre as moléculas promovendo um aumento da energia de ativação até a quantidade suficiente para realização da reação química. Porém, esse efeito também é responsável pelo processo de desnaturação, sendo que esses dois efeitos combinados dão origem a temperatura ótima da enzima. Assim, essa corresponde a temperatura máxima, na qual, a

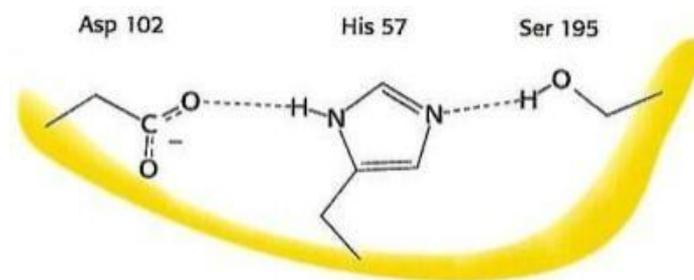
enzima possui atividade catalítica máxima por um período de tempo determinado (CABRAL; GAMA; AIRES-BARROS, 2003).

Por último, a estabilidade estrutural das enzimas é determinada a partir das forças físicas de interações, que ocorrem dependendo da disposição e orientação dos grupos funcionais da molécula. A conservação das ligações covalentes, e as forças de Van der Waals são indispensáveis para a manutenção da estrutura terciária de uma enzima. O elevado número de interações dipolo-dipolo, que embora apresentem uma energia associada relativamente baixa, apresenta um papel importante na estabilidade enzimática. E as ligações de hidrogênio intermoleculares são responsáveis pela estrutura tridimensional das enzimas, portanto contribuem para a sua estabilidade (SILVA, 2012).

2.2.1 Tripsina

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma serino endopeptidase, também conhecida como serino protease, secretada juntamente com o suco gástrico pela mucosa estomacal e seguindo sua secreção no intestino, classificada como pertencente ao clã PA e à subfamília S1, sendo altamente expressa em organismos eucariotos, procariotos e vírus (ALMEIDA, 2011). O termo tripsina foi criado em 1876 por W.F. Kune para nomear a substância responsável pela atividade proteolítica das secreções pancreáticas, e posteriormente, com o desenvolvimento dos processos de purificação e caracterização das proteínas, passou a ser associado às enzimas que clivam ligações peptídicas na porção C-terminal dos resíduos de aminoácidos arginina e lisina (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). A serinos endopeptidases, ou serino proteases, (Figura 4) possuem um resíduo de aminoácido serina em seu sítio catalítico, em seu sítio catalítico, além de dois outros resíduos de aminoácidos, que formam a tríade catalítica (Asp102/His57/Ser195, numeração de acordo com a quimotripsina bovina) (BERG, 2013).

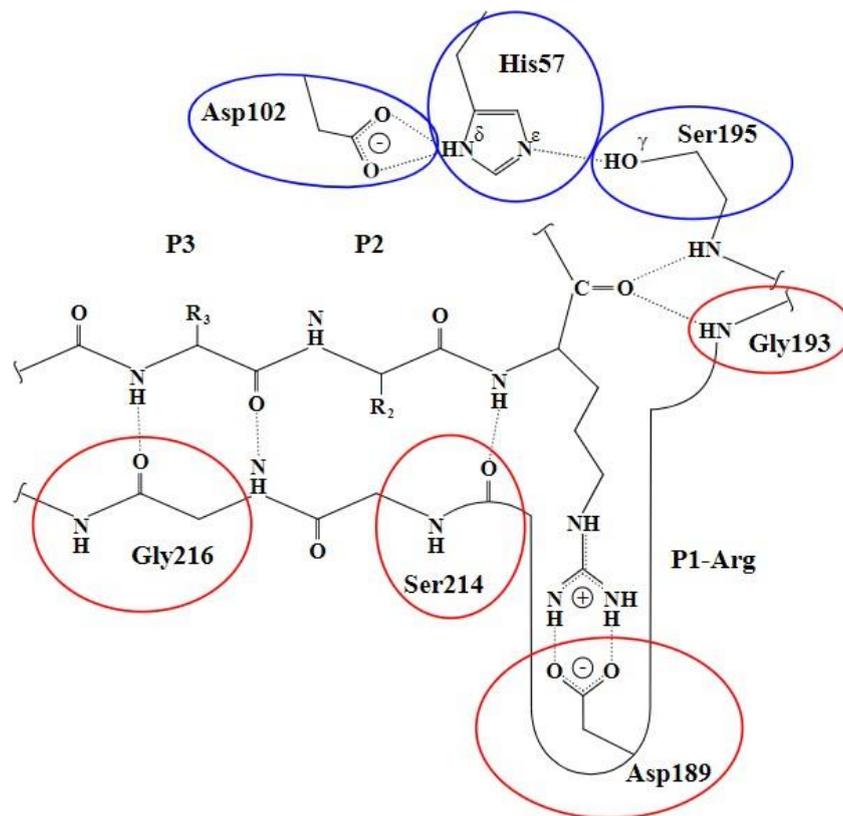
Figura 4 – Aminoácidos que compõem a tríade catalítica do sítio ativo das serinos peptidases.



Fonte: BERG, 2013.

Nas tripsinas, próximo ao sítio catalítico, encontra-se o sítio de ligação para o substrato (Asp189/Gly193/Ser214/Gly216), essa região não participa ativamente da hidrólise mas que auxilia o reconhecimento do substrato pela enzima conferindo-lhe especificidade (Figura 5) (PERONA; CRAIK, 1995). O resíduo de aminoácido Asp189 faz com que a tripsina possua especificidade por peptídeos que contenham aminoácidos com cadeias laterais longas e carregadas positivamente na posição P1 (OLSEN; ONG; MANN, 2004). Dessa forma, esta enzima cliva apenas ligações peptídicas na porção C-terminal dos aminoácidos arginina e lisina (OLSEN; ONG; MANN, 2004; PERONA; CRAIK, 1995) Para os substratos contendo a arginina em P1 há uma interação direta entre o grupo guanidina da arginina e o grupo carboxila do Asp189, já para substratos contendo lisina, a interação ocorre por intermédio de uma molécula água.(CHEN *et al.*, 2003).

Figura 5 – Representação esquemática da interação dos aminoácidos P1 a P3 de um oligopeptídeo como sítio ativo da tripsina. Os círculos pretos indicam os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico, e os círculos vermelhos indicam os resíduos de aminoácido que compõem o sítio de ligação ao substrato.



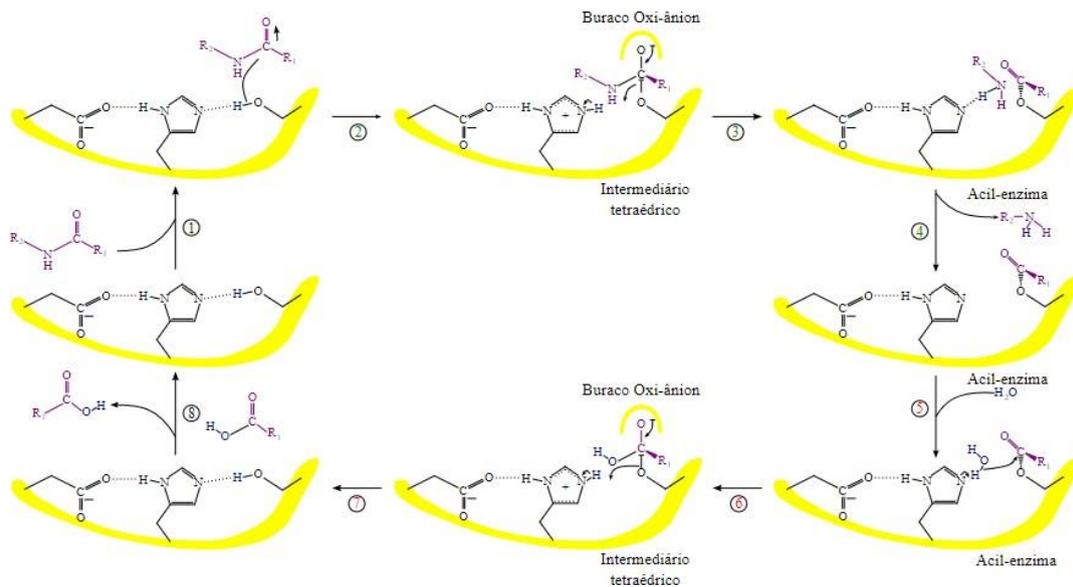
Fonte: Adaptado de PERONA; CRAIK, 1995

Conforme já foi dito, anteriormente, as enzimas são catalisadoras, ou seja, elas facilitam apenas as reações que sejam termodinamicamente favoráveis. Dessa forma, aptidão atua como indutor da reação de hidrólise, sem adicionar produtos e voltando a

sua forma original ao final da reação. Em linhas gerais, a hidrólise da ligação peptídica se inicia com a perturbação da ressonância entre a amida e a carboxila da ligação peptídica alvo, terminando com a adição de uma molécula de água para que o produto final seja liberado (HEDSTROM, 2002).

Em relação ao mecanismo de ação da tripsina, representado na figura 6, ele se inicia com acoplamento do substrato no sítio ativo. O complexo enzima-substrato é formado a partir de um ataque nucleofílico da serina 195 da enzima à carbonila da ligação peptídica. Esta atração nucleofílica só é possível por conta da histidina 57 e do aspartato 102 adjacentes. O aspartato 102 atrai um hidrogênio do anel imidazol da histidina 57, que por sua vez captura o hidrogênio da hidroxila da serina 195, induzindo assim uma carga negativa ao oxigênio da última, que pode então atacar o carbono do substrato (KASSERRA; LAIDLER, 1969).

Figura 6 – Mecanismo de hidrólise das serino endopeptidases.

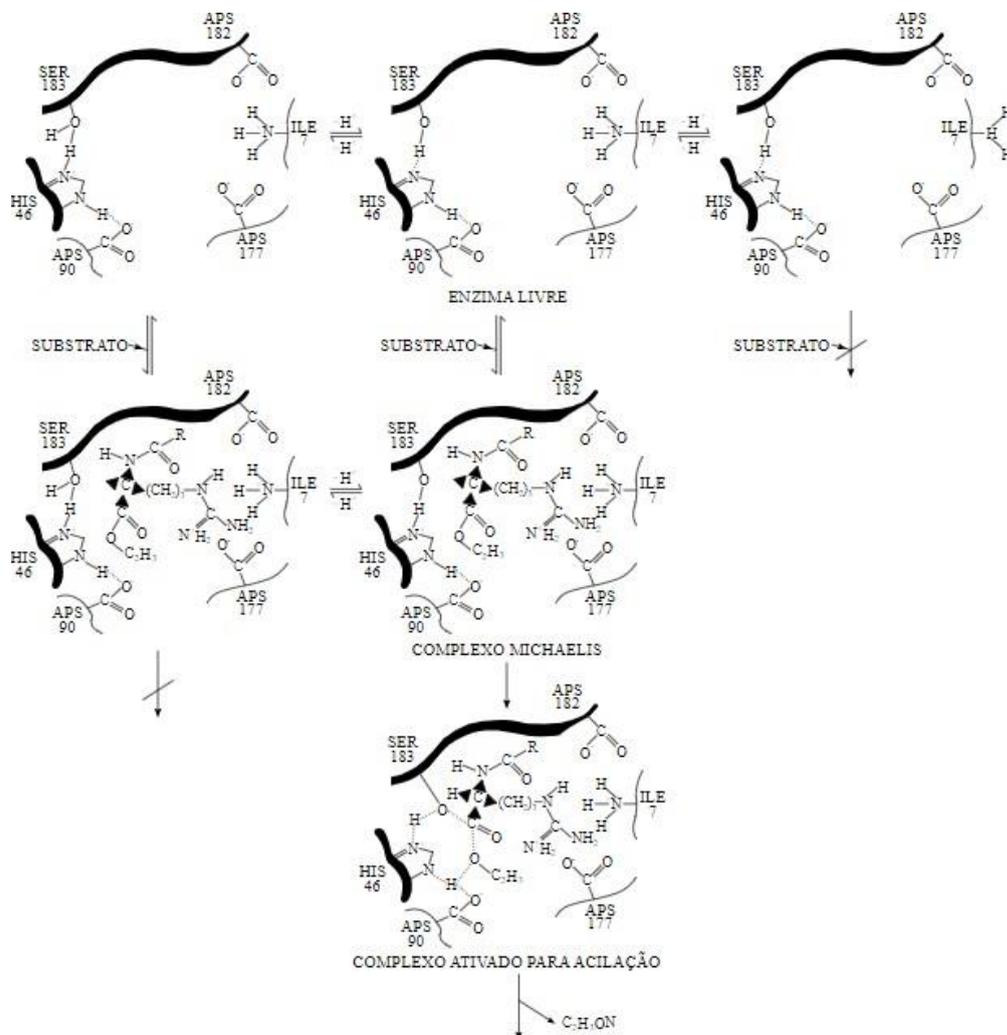


Fonte: (BERG, 2013)

Após o ataque Nucleofílico da serina, a transferência de próton leva a formação de um complexo Acil-enzima e a dissociação do primeiro produto de hidrólise a reação de desacetilação para liberar a segunda parte do peptídeo formado na hidrólise ocorre por via de um segundo ataque nucleofílico, sendo este realizado por uma molécula de água. Este mecanismo acelera quebra deste tipo de ligação peptídica em 10^9 , se comparado a reação não catalisada pela enzima. Através deste mecanismo a tripsina também pode hidrolisar outros compostos orgânicos como amidas, anilidas, ésteres e tioesters (HEDSTROM, 2002).

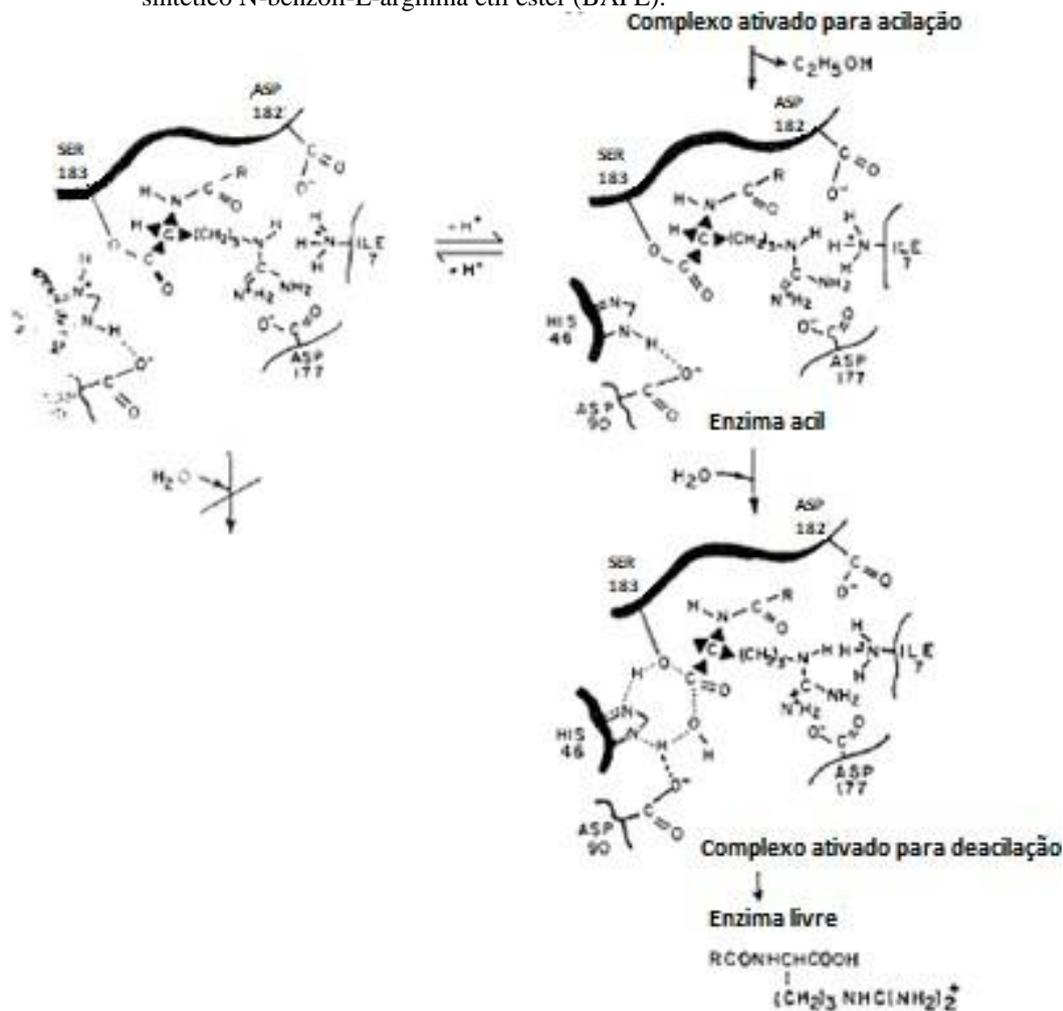
Não há dúvida de que o pH influencia na atividade das enzimas. No caso das tripsinas, imprescindível que haja uma histidina não protonada no seu sítio ativo. Sabendo-se que o pK_a do anel imidazol da histidina situa-se em torno de 6,0 apenas em pH de neutro a alcalino o anel estará não protonado e será capaz de capturar o próton da serina, tornando-a reativa (KASSERRA; LAIDLER, 1969). Por essa razão que, em pH ácido a tripsina se torna inativa e em pH alcalino a reação pode prosseguir normalmente. Contudo em pH extremamente alcalino o aminoácido N-terminal isoleucina apresenta a sua amina desprotonada, o que perturba o sítio de ligação ao substrato tripsina, dificultando a ligação do substrato à enzima (Figura 7).

Figura 7a – Desenho esquemático do mecanismo de ação da tripsina sobre o substrato sintético N-benzoil-L-arginina etil éster (BAFE). No centro, o esquema mostra a reação em pH em torno de 8. À esquerda numa situação de pH extremamente ácido e à direita de pH extremamente básico. Apenas a reação central se completa com êxito.



Fonte: KASSERRA; LAIDLER, 1969.

Figura 7b – Continuação Desenho esquemático do mecanismo de ação da tripsina sobre o substrato sintético N-benzoil-L-arginina etil éster (BAFE).



Fonte: KASSERRA; LAIDLER, 1969.

2.2.2 Imobilização de enzimas

A imobilização enzimática teve início com Nelson e Griffin, (1916) quando adsorveram a enzima invertase em carvão. Em 1940, foi iniciada a aplicação de enzimas em processos industriais de forma limitada devido a escassa disponibilidade e alto custo dos biocatalisadores. Logo a comunidade científica começou a pesquisar diferentes formas de processos de produção de enzimas e métodos de imobilização que possibilitassem posterior reutilização.

Em 1953, Grubhofer e Schleith imobilizaram a amilase, pepsina e outras enzimas em poliacrilamida mostrando que elas mantinham a sua atividade. Posteriormente, em 1955, pesquisas foram direcionadas para a descoberta de polímeros que pudessem ser utilizados como suporte para imobilização de proteínas biologicamente ativas.

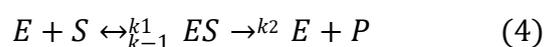
A intensificação dos estudos de imobilização ocorreu em 1960 com Bar-Eli e Katchalski (1960) que imobilizaram a enzima tripsina em anidrido de n-carboxitirosina

por adsorção e mantendo 20% da sua atividade, em relação a forma livre da tripsina. Dessa forma, método apresentava um aumento na estabilidade, possibilitando um período maior de estocagem do biocatalisador. Em 1968, algumas enzimas como a quimiotripsina, a papaína e a tripsina começaram a ser comercializadas em suportes poliméricos. Logo, ocorreram as duas primeiras aplicações industriais de enzimas imobilizadas: a isomerização de glicose em frutose por glicose isomerase e a resolução óptica de aminoácidos com aminoácidos acilase (CHIBATA; TOSA, 1976).

Em 1990, foi iniciado o uso da técnica de reticulação via reação com glutaraldeído por entrecruzamento de grupos aminos em estudos com cristais de termolisina para a produção de aspartame, e, subsequentemente foi demonstrado que o desenvolvimento desses métodos pode ser aplicado a diversas enzimas. Dessa forma, um grande número de novas metodologias de imobilização enzimática utilizando os mais variados tipos de suportes tem sido relatado na literatura, indicando a importância dessa linha de pesquisa (BASÍLIO, 1994; COSTA *et al.*, 2012).

Atualmente cerca de 200 enzimas são comercializadas, desse total, aproximadamente 75% são enzimas hidrolíticas usadas em processos industriais. O mercado global de vendas de enzimas era de apenas alguns milhões de dólares por ano na década de 1960. Com o melhor entendimento dos processos de obtenção, os avanços nos métodos de uso e a crescente demanda da indústria por novos biocatalisadores, esse mercado vem alcançando a cifras na ordem de US\$ 5,0 bilhões em 2015 e 2016, com crescimento estimado para US\$ 7,0 bilhões em 2023, de US\$ 5,5 bilhões em 2018, a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 4,9% para o período 2018 a 2023 (BCC RESEARCH, 2018).

As enzimas, de forma geral, desempenham um papel fundamental na cinética de reações bioquímicas. O mecanismo de cinética de Michaelis–Menten é frequentemente usado para explicar as atividades catalíticas de várias enzimas. De acordo com o mecanismo de formação de um produto simples, o substrato (S) se liga reversivelmente a uma enzima (E) para formar um complexo intermediário (ES). Em seguida, ES sofre uma decomposição unimolecular para formar um produto (P), e (E) é regenerado para o próximo ciclo (YI; LIU, 2010). A Equação 4 descreve esse comportamento cinético.



A taxa de velocidade de formação do produto $[dp]/dt$ apresenta uma dependência hiperbólica com a concentração do substrato $[S]$. De acordo com a Equação 5 de velocidade (v) temos:

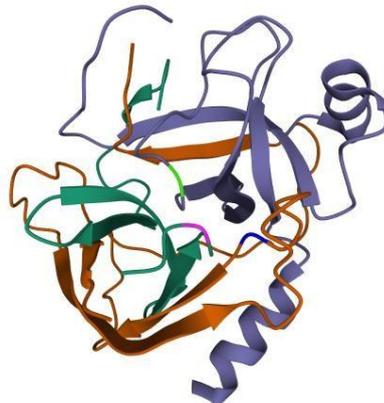
$$v = \frac{[dp]}{dt} = k_2 \frac{[E_T][S]}{k_M + [S]} \quad (5)$$

Onde $[E_T]$ refere-se à concentração total da enzima e $k_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ representa a constante de Michaelis-Menten, sendo k_1 , k_{-1} e k_2 as constantes de velocidade direta e inversa da primeira etapa e de decomposição unimolecular da segunda etapa, respectivamente. Ao longo dos anos, esse teorema tem representado um dos pilares da enzimologia e tem encontrado aplicações em diferentes sistemas de reações enzimáticas (CALDER; SIEGEL, 2008; YI; LIU, 2010).

A relação entre a velocidade de reação de formação do produto e a concentração do substrato pode ser descrita através de parâmetros cinéticos obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten. Devido ao importante papel das enzimas na cinética de reações bioquímicas, essa equação é uma ferramenta frequentemente usada para o entendimento da atividade catalítica das mesmas (VIVIAN; POLLI, 2014).

Especificamente, as serino proteases, no qual a tripsina faz parte, empregam a catálise ácido-base geral e a catálise covalente, onde o mecanismo catalítico se inicia na tríade catalítica característica; para a tripsina, His57, Asp102 e Ser195 (figura 4) (PEREIRA, 2015).

Figura 8 - Representação da estrutura da tripsina, destacando-se seu sítio ativo. Os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica estão representados em modo de bastão Ser195 (verde), His57 (lilás) e Asp102 (azul).



Fonte: <https://www.rcsb.org/3d-view/1EPT/1>. Acesso em: 05 de julho de 2022.

Na literatura é possível encontrar relatos de vários suportes como opções para a imobilização de enzimas nos mais diversos métodos. Entretanto, a escolha do suporte para uma determinada aplicação é delicada, pois deve considerar a sua área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência mecânica, custo, entre outros (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Esses podem ser classificados em orgânicos (naturais e

sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados). Dentre os orgânicos são geralmente usados a celulose, ágar, agarose, quitosana, quitina, poliestireno, poliacrilatos e polivinílicos, enquanto que, dos suportes inorgânicos são usados vidro, cerâmica, aluminossilicatos e, principalmente a sílica de porosidade controlada e óxidos inorgânicos em geral (PINTO, 2013)

Os métodos disponíveis para imobilização de enzimas são divididos em quatro grandes classes gerais, segundo Powell (*et al.*, 1990): adsorção; enclausuramento em uma matriz semipermeável ou no interior de polímeros; reações cruzadas, através do uso de reagentes bifuncionais ou multifuncionais; e ligação covalente a suportes poliméricos, viagrupamentos químicos.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos divide-se em duas categorias: a ligação na superfície e a oclusão de matrizes porosas. No primeiro caso, o biocatalizador é retido à superfície sólida através de interações estabelecidas entre a matriz e o biocatalizador. Sendo que essas interações abrangem desde forças de Van der Waals a ligações covalentes (CAVALCANTE, 2005).

O método por adsorção tem sido considerado um dos mais simples e econômicos para a imobilização de enzimas. Além disso, a imobilização de uma enzima por adsorção oferece uma faixa enorme de aplicabilidade em virtude de haver um mínimo de perturbação na estrutura nativa da enzima (KUMAR *et al.*, 2009). Por outro lado, a literatura relata inúmeros problemas associados à estabilidade da enzima no suporte, que em virtude de diferentes condições do meio (pH), temperatura e força iônica, o processo de dessorção ocorre desordenadamente, provocando uma diminuição na eficiência catalítica do sistema (suporte-enzima), sendo necessário, portanto o uso de ligações mais fortes entre o suporte e a enzima, por exemplo: ligação covalente (ROLLETT *et al.*, 2010). No método químico ocorre a formação de ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos da proteína e grupos reativos do suporte. O grande número de processos existentes visando à ativação da superfície e a formação de ligações covalentes permite a sua aplicação a uma vasta gama de sistemas sem a remoção da enzima imobilizada.

Na imobilização por oclusão, a solidificação de uma dispersão contendo a enzima pode ser induzida por meios químicos ou físicos. A partir deste processo é obtido um gel insolúvel em água, no interior do qual fica retido o biocatalizador numa forma ativa. A formação do gel pode ser provocada pela presença de cátions multivalentes, por ação da temperatura, por polimerização devida a reações químicas ou por precipitação (CAVALCANTE, 2005).

Para ser efetivo na imobilização o suporte deve propiciar a acessibilidade da

enzima ao substrato mantendo a sua atividade por um longo período e permitir que o conjugado enzima/suporte seja recuperado sem perda de atividade no final do processo (MATEO *et al.*, 2007).

São reportados na literatura diversos trabalhos que utilizam os mais diversificados tipos de suporte: magnéticos, poliméricos, quitosana, grafeno entre outros (CIPOLATTI *et al.*, 2014; TAN; FENG; JI, 2012; TANG; QIAN; SHI, 2007; VERMA *et al.*, 2013) na imobilização de tripsina para serem aplicados como catalisadores. Utilizando a expressão “trypsin immobilization” na base de dados Science Direct, foi observado um número alto de publicações relacionadas a imobilização de tripsinas durante os últimos 10 anos. Em 2012 foram reportadas aproximadamente 1244 publicações, enquanto que em 2018 foram publicados 1352 artigos e em 2021, mais de 1600 trabalhos já foram descritos na literatura, demonstrando o esforço científico em melhorar a eficiência dos processos industriais relacionados a aplicação desse tipo de enzima, com a criação e modificação de metodologias para aumentar a eficiência e ao mesmo tempo, baratear os processos.

2.2.3 Imobilização de Tripsina

Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos que tratam especificamente a imobilização de tripsina em superfícies de nanopartículas magnética para aplicação em diversas áreas na indústria. Atacan e Özacar (2015) utilizaram em seu trabalho, ácido tânico para a funcionalização das nanopartículas magnéticas e posterior imobilização da tripsina na superfície. De acordo com os resultados, a atividade de tripsina imobilizada foi preservada 55% a 45°C após 2 h e 90% após 120 dias de armazenamento. Além disso, a atividade da tripsina imobilizada manteve 40% da sua atividade inicial após oito reutilizações sucessiva. Entretanto, não é mencionado os parâmetros de comparação usados para obtenção de tais porcentagens. Hu (*et al.*, 2014) descrevem uma funcionalização das nanopartículas magnéticas com APTMS (3-Aminopropil) trimetoxissilano e posterior reação com glutaraldeído para depois a imobilização da tripsina na superfície, no intuito de estudar a digestão enzimática da proteína corona e identificação de seus componentes proteicos. Outros trabalhos de Atacan, Çakiroğlu e Özacar (2016) descrevem o tratamento das nanopartículas magnéticas com ácido gálico para depois imobilizar a tripsina na superfície, determinando a atividade enzimática pelo método de Bradford utilizando BApNA como catalisador da hidrólise. No trabalho relata-

se que a tripsina imobilizada foi mais estável que a enzima livre e demonstrou uma maior atividade a elevadas temperaturas (45-55°C) e em meio básico. A enzima imobilizada manteve 92% de sua atividade inicial após 120 dias de armazenamento a 4°C em tampão fosfato de sódio (pH=7,5), enquanto que tripsina livre manteve cerca de 64% da sua atividade inicial. Além disso, a atividade da tripsina imobilizada preservou 54,5% de sua atividade inicial após oito reutilizações sucessiva. Atacan, Çakiroğlu e Özacar (2017) funcionalizaram novamente as nanopartículas magnéticas com ácido gálico e imobilizaram covalentemente a tripsina na superfície utilizando Benzamidina.

No trabalho de Siddiqui e Husain (2019), a Tripsina imobilizada em nanopartícula de polidopamina revestida com prata por ligação covalente com o objetivo de melhorar sua atividade, estabilidade e reutilização para indústria. Segundo os autores, a Tripsina conjugada foi mais estável em pH e temperaturas extremas se comparada a tripsina normal, conservando 91% da atividade depois de 60 dias armazenada a 4°C enquanto a tripsina normal conservou 41%. A enzima conjugada conservou 83% de sua atividade mesmo depois de ser utilizada repetidas vezes.

Em Santos (2020), a tripsina foi associada a nanopartículas de ouro, esse trabalho reporta duas rotas de Sínteses de Nanopartículas de ouro associadas a enzima Tripsina. A metodologia das Sínteses foi embasada no método tradicional de Turkevich seguida de adaptações. Os resultados mostraram que as duas metodologias foram eficientes, uma vez que biosistema Nanopartícula de ouro e Tripsina se mostrou estável durante o período de 30 dias. Esse sistema parece promissor para o entendimento de futuras aplicações que envolvem o processo de interação entre a enzima e seu respectivo substrato. No trabalho de Amália (*et al.*, 2021) a Tripsina foi imobilizada em monólito poroso à base de metacrilato para digestão de proteínas de fluxo contínuo, apresentando uma boa estabilidade e, também, mostrou potencial para fluxo contínuo e digestão de proteínas de alta velocidade para análise proteômica.

Nanopartículas magnéticas foram usadas como precursor inorgânico para a preparação de novos suportes híbridos de magnetita-lignina e magnetita-quitina para imobilização por ligação covalente de Tripsina no trabalho de Zdarta (*et al.*,2018). Os sistemas de magnetita-lignina + tripsina e magnetita-quitina + tripsina apresentaram boa estabilidade e reutilização no armazenamento. Após 20 dias eles mantiveram mais de 75% e 90%, respectivamente, de sua atividade inicial e, após 10 ciclos biocatalíticos consecutivos retiveram mais de 60% e 80%, respectivamente, de sua atividade inicial. A eficiência da digestão por tripsina imobilizada foi investigada usando amostras biológicas

reais e os resultados dos testes de digestão peptídica confirmaram a alta atividade proteolítica dos sistemas biocatalíticos magnéticos à base de tripsina.

Atacan, Çakiroğlu e Özacar (2017) avaliaram a eficiência de digestão de proteínas usando a Tripsina imobilizadas com nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) modificadas com Tanino. As NPMs foram sintetizadas por método solvotérmico e funcionalizadas com Tanino, a tripsina foi imobilizada por ligação covalente através da formação de uma reação *Schiff-base* ou por *adição de Michael* entre os grupos quinona das nanopartículas modificadas com tanino, que resultam do aumento do pH, e os grupos amino da tripsina. A aplicabilidade geral da tripsina imobilizada para estudos proteômicos foi confirmada por digestão enzimática de albumina sérica bovina (BSA). A tripsina imobilizada foi investigada por condução da digestão triptica da BSA dentro de 1 min, 5 min e 15 min. Além disso, assistido por micro-ondas, a digestão foi realizada por 15s.

Sun (*et al.*, 2017) funcionalizaram NPMs com carboximetil quitosana (CM-CTS), imobilizando covalentemente a Tripsina em seguida. A imobilização foi realizada com sucesso considerando que a atividade biocatalítica significativa da enzima imobilizada foi mantida para ser aplicada como reagente de digestão de proteínas na produção de alimentos e medicamentos.

No trabalho de Peiman, Baharfar e Maleki (2021), m novo biocatalisador de tripsina ($\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@D\text{-NHCS-Tr}$) foi preparado com base no dendrímero PAMAM, imobilizado na superfície de nanopartículas magnéticas. Em seguida, o desempenho do catalisador foi avaliado pela síntese verde de derivados de espirooxindol-pirano pela primeira vez. Resumidamente, este catalisador se mostrou fácil de separar, reciclar e reutilizável e apresentou excelente desempenho em reações químicas em termos de tempo e eficiência em água.

Sahin e Ozmen (2020), revestiram NPMs com álcool polivinílico e ativadas com glutaraldeído para imobilização de tripsina. A tripsina livre e imobilizada, apresentaram atividade ótima em pH 6,0, 30 °C e pH 7,0, 40 °C, respectivamente. A tripsina imobilizada foi mais estável do que a enzima livre a 40 °C. Após a imobilização, o k_m da tripsina imobilizada aumentou, porém, o valor V_{max} foi quase o mesmo com a tripsina livre. De acordo com os resultados, a tripsina imobilizada reteve 50% de sua atividade inicial, enquanto a tripsina livre reteve 19% de sua atividade inicial após 12 dias a 4 °C.

Wan (*et al.*, 2022) apresentaram uma série de enzimas imobilizadas (tripsina, pectinase e lacase imobilizada) construídas através da interação eletrostática entre o carreador enzimático imobilizado ($\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2\text{-NH}_2$) e a enzima livre. Esses

biocatalizadores foram usados para desidratação de lodo e as enzimas imobilizadas apresentaram alta eficiência e desempenho estável de desidratação de lodo em uma ampla faixa de pH.

A utilização de nanopartículas magnéticas (NPM) como suportes para a imobilização de enzimas, geralmente é realizada mediante uma modificação química ou física de sua estrutura, etapa conhecida como funcionalização da NPM. Esta modificação pode ser realizada inserindo grupos funcionais em sua superfície como aminas, hidroxilas e carboxilas, aumentando a afinidade das nanopartículas com as enzimas. As moléculas mais utilizadas para a funcionalização das NPM são os carboxilatos (como ácido cítrico, citrato de sódio e ácido oleico), os polímeros sintéticos (como PEG, PVA, PEO e triton X-100) e os polissacarídeos naturais (como dextrano e quitosana) (LIN; CHEN; LIU, 2016). Com a funcionalização, as atividades enzimáticas e as estabilidades são significativamente melhoradas, permitindo maior resistência destas em contato com o ar, estabilidade ao pH, estabilidade coloidal e a ligação com agentes externos (GUO; SUN, 2004; HOLA *et al.*, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

De forma geral, o trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foram realizadas as sínteses e caracterização das nanopartículas magnéticas candidatas a suporte para imobilização da Tripsina, e na segunda etapa foram avaliados a estabilidade da Tripsina na superfície das nanopartículas sintetizadas, assim como a manutenção da atividade enzimática e a estabilidade do conjugado enzima – nanopartícula.

3.1 Materiais

Os materiais utilizados foram: sulfato de ferro (II) heptahidratado (99%, Sigma Aldrich), cloreto de ferro (III) anidro (99%, Vetec), hidróxido de sódio (99%, Sigma Aldrich). Na síntese das SPIONs, gás nitrogênio (N₂) (99%, White Martins) foi usado. Para imobilização e avaliação da atividade enzimática, tripsina do pâncreas bovino (EC 3.4.21.4), (Sigma Aldrich), N-Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida (L-BApNA), Dimetilsulfóxido (DMSO), Ácido acético (99%, Sigma Aldrich), Tris Base (Sigma Aldrich), Ácido clorídrico (37%, Sigma Aldrich) e Acetato de sódio (99%, Sigma Aldrich). Água deionizada obtida a partir de um sistema de purificação de água MILLI-Q (resistividade de 18,2 M Ω cm, Millipore, Bedford, EUA). Foi usada como solvente em todo o processo.

3.2 Síntese das SPIONs

As SPIONs foram obtidas de acordo com o método de coprecipitação (CAVALVANTI *et al.*, 2022) com algumas modificações. Para tal, uma solução de FeSO₄.7H₂O_(s) foi preparada dissolvendo 3,5 g do reagente em 50 mL de água deionizada. Uma segunda solução foi preparada, dissolvendo 4,0 g de FeCl_{3(s)} anidro também em 50 mL de água deionizada. As duas soluções foram misturadas em um balão de três vias, de fundo redondo (250 mL), e colocadas sob agitação de 150 rpm em atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, uma solução de 20 mL de NaOH 10 mol.L⁻¹, foi gotejada no balão de síntese a partir de uma bomba peristáltica para obter um controle de fluxo de 4 a 6 gotas por minuto. O processo todo, desde o começo do gotejamento de hidróxido de sódio, durou aproximadamente 3 horas. As SPIONs obtidas foram separadas do líquido reacional pela ação de um campo magnético aplicado e foram submetidas a sucessivas lavagens com água deionizada até que o pH da água de lavagem se tornasse neutro. O

produto foi então, mantido em estufa à 60°C, sob vácuo, por 24h para secagem e, depois, caracterizado e usado para o processo de imobilização.

3.3 Imobilização da tripsina suína

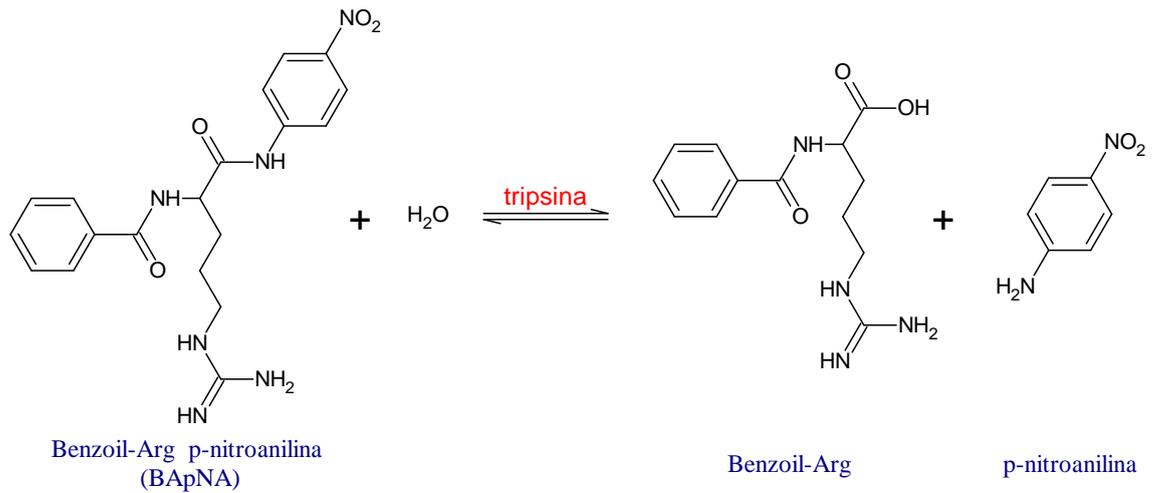
A imobilização enzimática foi realizada em diferentes condições de controle de pH (4,0, 7,0 e 8,0). Essas condições foram previamente selecionadas baseadas nos resultados de potencial zeta das SPIONs e da tripsina em cada pH. Em geral, a imobilização em cada pH fixo (tampão acetato de sódio 0.005 mol.L⁻¹ para pH 4.0; tampão fosfato de sódio 0.100 mol.L⁻¹ para pH 7.0; e tampão Tris-HCl 0.010 mol.L⁻¹ para pH 8.0) ocorreu a partir da adição de 0.0025g de tripsina suína em 10 mL de solução tampão. Então, 1.0 g das SPIONs foi adicionada a mistura, que foi misturada por 24 horas a temperatura ambiente. Após esse período, o produto final obtido, SPION@Tri, foi separado do sobrenadante com o auxílio de um ímã, sendo submetido a 3 lavagens com água deionizada e tampão. O material então foi colocado sobre um papel de filtro para total absorção do restante de água e armazenado em temperatura de cerca de 8 °C para as demais análises (ATACAN; ÇAKIROĞLU; ÖZACAR, 2017).

A quantidade de tripsina imobilizada na superfície das SPIONs foi determinada pela diferença entre a quantidade total de tripsina usada inicialmente e a tripsina contida no sobrenadante no final do processo de imobilização. A enzima contida foi determinada por fluorescência usando Cary Eclipse Spectro (Varian) fluorímetro. Em geral, as amostras do sobrenadante foram preparadas com 2 mL de água deionizada e 50 µL do sobrenadante. Então, elas foram excitadas a 279 nm e a fluorescência foi analisada no comprimento de onda entre 300 e 450 nm, com intensidade máxima em 340 nm. A partir de uma curva de calibração previamente construída, a concentração da tripsina pôde ser determinada. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.4 Atividade enzimática da tripsina livre e imobilizada

A atividade enzimática da tripsina livre e imobilizada foi analisada usando o substrato N- α - Benzoil - DL - arginina - 4 nitroanilina (BApNA) (PESSATO T. B.; TAVANO, O.L., 2015) que gera a *p*-nitroanilina como produto, podendo ser monitorado por espectrofotometria de UV-Vis em 410 nm.

Figura 9- Mecanismo de hidrólise do N- α – Benzoil – DL – arginina – 4 nitroanilina(BApNA).



Fonte: PESSATO T.B. A4 - TAVANO, O.L., 2015

Primeiro, uma solução de BApNA (0.04 g de BApNA, 1 mL de DMSO) foi preparada. Posteriormente, adicionou-se aos poucos 100 mL de solução tampão Tris-HCl 0.01 mol.L⁻¹ pH=8,0, e a mistura foi mantida em banho a 37.0 °C. Finalmente, 2 mL de uma solução de substrato foi colocado em uma cubeta de plástico, juntamente com 0.2 mL da enzima, no qual a mistura reacional foi incubada por 10 min em banho termostático (Quimis, Q214-SC) a 37.0 °C. Após o tempo de incubação, foram adicionados 0.5 mL de solução de Ácido Acético 30%, e realizada a leitura no espectrofotômetro. Uma unidade de atividade é arbitrariamente definida como um aumento de 0.01 Abs/min.

3.4.1 Análise do efeito do pH sobre a atividade da Tripsina livre

Para a análise do efeito do pH sobre a atividade proteolítica foram realizados ensaios em triplicata, com tampões de pH variando de 4 a 9, onde, nas faixas de 4 a 5 foi utilizado tampão Acetato, de 6 a 7 tampão Fosfato, e de 7,5 a 9 Tris-HCl. Após 10 minutos de incubação da amostra (100 μ L) com 1 mL da solução de tampão e BApNA, as absorbâncias foram determinadas a 410nm.

3.5 Estudos de dessorção

O estudo de dessorção foi realizado ressuspensando 20 mg da enzima imobilizada em pH 4,0; 7,0; e 8,0 em 2,0 mL de água deionizada. A dispersão foi agitada por 5 minutos em lavadora ultrasônica, e então o nanocatalizador foi magneticamente separado da

solução. Esse processo foi repetido 5 vezes para cada valor de pH. A tripsina contida no sobrenadante foi determinada por espectroscopia de fluorescência, conforme procedimento descrito no final da seção 3.3.

3.6 Interação enzima-nanopartícula

3.6.1 Experimentos de fluorescência

Inicialmente, foi preparada uma dispersão de SPIONs na concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ em pH 4,0 utilizando tampão acetato (5 mM) que foi colocada em banho ultrassônico por 2 min (QC, Walker Electronics Limited, 49 kHz). Em seguida, 20 µL da solução de Tripsina (17,5 mg.mL⁻¹) foi colocada na cubeta contendo 2,0 mL do tampão acetato pH 4,0. O espectro de fluorescência foi obtido utilizando o espectrofotômetro Cary Eclipse Spectro (Varian) e o controle de temperatura realizado por um banho ultratermostático (Quimis, Q214-SC) com recirculação de água. Adicionou-se repetitivamente 5 µL da dispersão de SPIONs (2,0 mg.mL⁻¹), a solução de enzima e tampão já existentes na cubeta, até completar 50 µL. Após cada adição das nanopartículas, uma nova leitura de fluorescência foi realizada. Todo o experimento foi conduzido em quintuplicata nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.

A partir desses dados, utilizou-se a equação de Stern-Volmer (Equação 6) para determinar a constante de associação e a Energia livre de Gibbs da interação entre as SPIONs e a Tripsina.

$$\frac{F_0}{F} = k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + k_{sv} \cdot [Q] \quad (6)$$

Na Equação 6, F_0 e F representam a intensidade de fluorescência da enzima pura e imobilizada, respectivamente, $[Q]$ representa a concentração do ligante, k_q é a constante da interação biomolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do ligante e Stern-Volmer é a constante de Stern-Volmer. Nos experimentos de interação entre ligantes e macromoléculas, os valores de k_{sv} é geralmente considerada a constante de ligação do complexo, também representado por K_b .

Utilizando as equações 7 e 8 abaixo, obteve-se os parâmetros termodinâmicos ΔH^o , ΔS^o e ΔG^o , que são relacionados a interação entre a enzima e as SPIONs.

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H^o}{RT} + \frac{\Delta S^o}{R} \quad (7)$$

$$\Delta G^o = -RT \ln K_b \quad (8)$$

Nas equações, K_b é a constante de ligação, R é a constante de gás (8.314 J mol⁻¹

K^{-1}), e T é a temperatura absoluta.

3.6.2 Protocolo de modelagem molecular

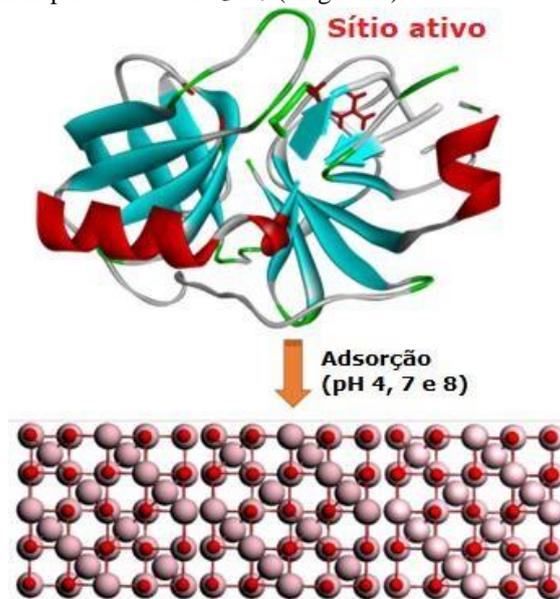
3.6.2.1 Preparação da enzima

A estrutura cristalográfica da tripsina suína foi obtida a partir do banco do PDB dados de proteínas (do inglês Protein Data Bank), com código ID: 2A31 e resolução: 1.25 Å (TRANSUE *et al.*, 2006). No protocolo de preparação da enzima, as moléculas de água foram removidas e a tripsina suína foi protonada em diferentes pHs (4.0, 7.0 e 8.0) através do servidor PDB2PQR. As cargas parciais eletrostáticas também foram calculadas para todos os átomos de tripsina suína em diferentes pHs.

3.6.2.2 Cálculos teóricos

O método semi-empírico baseado no formalismo Hartree-Fock com várias aproximações pela obtenção de alguns parâmetros de dados empíricos foi utilizado para avaliar a interação SPION-tripsina em nível molecular. Essa categoria de técnicas torna possível a abordagem de grandes sistemas com muitos átomos. Propriedades como entalpia de formação, momento dipolar, potencial de ionização, ângulos, diedros e comprimentos de ligação foram considerados na modelagem. O perfil de energia potencial para adsorção de tripsina suína sobre Fe_3O_4 foi calculado através de cálculos de PM6, juntamente com a elucidação das superfícies eletrostáticas sobre a enzima em diferentes pHs. A imobilização da enzima sobre a superfície do material é ilustrada na Figura 10, (MORGON; COUTINHO, 2007).

Figura 10. Representação esquemática da modelagem do processo de imobilização da tripsina suína na superfície de nanopartículas de Fe₃O₄ (magnetita).



Fonte: da autora.

3.7 Técnicas de Caracterização

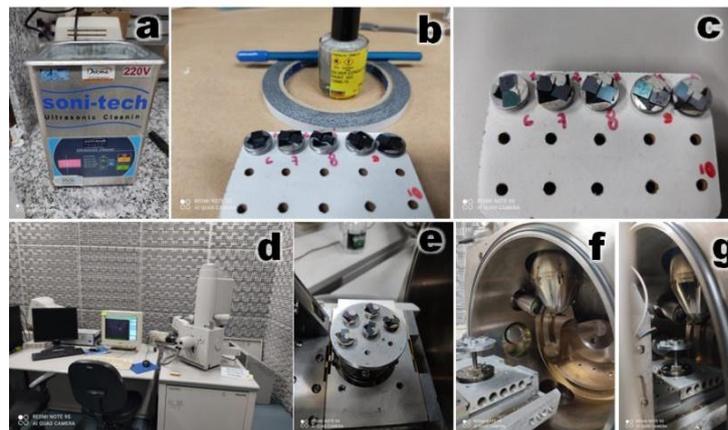
3.7.1 Potencial Zeta (PZ)

O potencial zeta das SPIONs preparadas por síntese e da tripsina suína obtida comercialmente foram determinados no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern (Malvern Instruments). Para determinar o PZ desses materiais, dispersões de SPIONs foram preparadas com concentração de 0.07 mg.mL^{-1} , e as soluções de tripsina suína em concentração de 1 mg.mL^{-1} , em água deionizada com os pHs previamente ajustados na faixa de 3 a 13, pela simples adição de ácido ou base. Um pHmetro digital (modelo mPA-210), contendo um eletrodo de pH blindado semissólido e líquidos da Sensoglass[®], Modelo SC06 N/S: 00829-15, foi usado para controle de pH. Essas dispersões de SPIONs e as soluções de tripsina foram sonificadas por 15 min e filtradas com Millipore $0.22 \mu\text{m}$, Millex LCR 25 mm. Para as medições de potencial zeta, o equipamento foi configurado considerando a água como dispersante, viscosidade de 0.8872 cP , índice de refração de 1.330 , condutividade elétrica de 78.5 , e a temperatura foi controlada em 25°C durante as análises.

3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As morfologias das amostras de SPION e de SPION@Tri foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Para essas análises, utilizou-se um microscópio Philips XL-30 FEG com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM), trabalhando a 10 a 25 keV, spot 4 e distância 5 mm. O preparado das amostras foi conduzido da seguinte forma, primeiramente uma pequena quantidade de pó (SPION ou SPION@Tri) foi adicionada em um eppendorf juntamente com 2mL de isopropanol. A mistura foi então colocada no banho de ultrassom por 10 minutos com a finalidade de propiciar a desagregação/dispersão das partículas. Em seguida, uma pequena gota contendo a dispersão das partículas foi adicionada, com o auxílio de uma micropipeta, sobre uma plataforma de silício de área 5mm x 5mm colada no stube através de uma fita dupla face de carbono. Então, as amostras foram secadas em estufa a 40 °C por 12 horas (Fig. 11). Este procedimento permitiu que as partículas ficassem dispersas sobre o substrato de silício para melhor visualização dos detalhes morfológicos das nanopartículas.

Figura 11 – a) eppendorf com 2mL de isopropanol que foram colocadas no banho de ultrassom por 10 minutos para dispersar as nanopartículas; b) gota com a dispersão das nanopartículas sobre o substrato de silício fixado no stube; c) Amostras secadas em estufa a 40 °C por 12 horas; c) foto do microscópio Philips XL-30 FEG; e) Suporte com os stubes contendo as amostras; f-g) Câmara do microscópio Philips XL-30 FEG.



Fonte: da autora.

3.7.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

O espectro infravermelho das SPIONs e das amostras SPION@Tri foram obtidas usando um espectrofotômetro IR (Thermo Scientific Nicolet, model IS 50 FT-IR) com acessório de refletância total atenuada horizontal. Medidas foram realizadas usando um

crystal de seleneto de zinco (ZnSe). Os espectros das amostras foram obtidos, sem qualquer preparação prévia, no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} com resolução espectral de 4cm^{-1} e 32 varreduras.

3.7.4 Medidas magnéticas

As medições magnéticas de amostras de SPIONs foram realizadas usando uma opção de magnetômetro de amostra vibratória (VSM) em um Quantum Design - Sistema de medição de propriedades físicas (PPMS) 9 - Evercool II. A magnetização versus campo magnético aplicado $M(H)$ foi medida na faixa de campo de +/- 1T a temperaturas de 5 K e 300 K. A dependência da temperatura da magnetização $M(T)$ foi tomada usando o campo zero refrigerado (ZFC) e protocolos refrigerados em campo (FC), na faixa de temperatura de 5 a 300 K, e com campo magnético aplicado de 0,1 T. Todos os dados foram normalizados em relação à massa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização das SPIONs e SPION@Tri

No presente trabalho, o método tradicional de coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio aquoso pela adição de uma base (PARK, 2011) foi utilizado para a preparação de nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 . Esse método possibilita a obtenção de SPIONs em condições ambientais ou com baixa elevação de temperatura, produzindo partículas pequenas, de alta pureza, com formato definido e pequenas variações de tamanho.

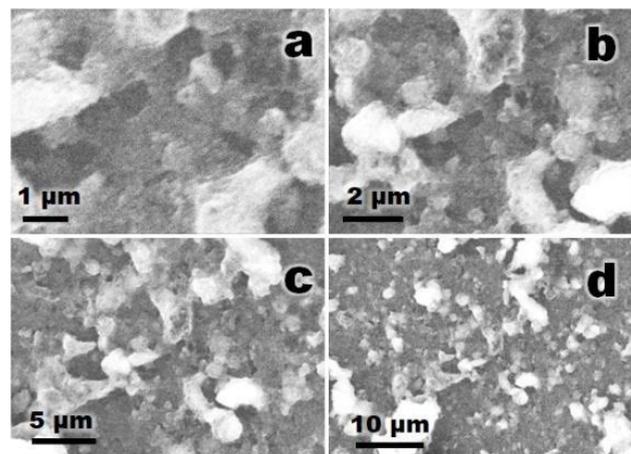
O ajuste do tamanho e forma das nanopartículas depende do estabelecimento de condições de controle, como concentração de íons, relação estequiométrica; pH da solução, tempo de síntese, concentração do agente redutor; velocidade de agitação, temperatura, entre outros (KIM; KIM; LEE, 2003). No entanto, nesta metodologia, há uma dificuldade na obtenção de materiais monodispersos, pois dois processos ocorrem simultaneamente e precisam ser controlados para obter tamanhos mais homogêneos. O primeiro processo a ser considerado é a nucleação, que consiste na formação de clusters atômicos de forma homogênea e o segundo processo envolve o fenômeno de crescimento, que remete a agregação dos núcleos atômicos para formação das nanopartículas. Em geral, uma dispersão reduzida é obtida quando a nucleação ocorre rapidamente em um curto período de tempo seguido de uma etapa de crescimento lenta sem que ocorra nucleação significativa (SOUZA, 2011). Dessa forma, o modo como o agente redutor (base) é adicionado à solução contendo os íons Fe^{+2} e Fe^{+3} é fundamental na tentativa de se obter nanopartículas homogêneas em tamanho e forma. Por isso, o método de síntese para obtenção de SPIONs utilizado no presente trabalho envolveu um lento gotejamento da solução de hidróxido de sódio sobre a mistura reacional, afim de obter melhor controle sobre os fenômenos de nucleação e crescimento das partículas. Como nanopartículas de Fe_3O_4 são sensíveis à ação oxidativa da atmosfera, a síntese também foi conduzida sobre atmosfera inerte de N_2 .

Na Figura 12 são apresentadas as micrografias SEM das SPIONs preparadas, nas amostras não foi possível identificar o tamanho das nanopartículas, o que é indicativo de que as partículas possuem dimensões abaixo do limite de resolução previsto para esse tipo de microscopia. O método prevê tamanhos de partículas na ordem entre 5 à 20 nm (MAMANI, 2009), o que torna necessário a caracterização morfológica pela técnica de HRTEM.

Nas Figuras 13,14 e 15 são apresentadas as micrografias SEM de SPION@Tri preparadas nos pH 4, 7 e 8. Nessas imagens, é possível identificar o compósito formado por SPIONs mais tripsina formando estruturas de tamanho com baixa polidispersidade e morfologia próxima a uma esfera em diferentes escalas (figuras a, b, c e d).

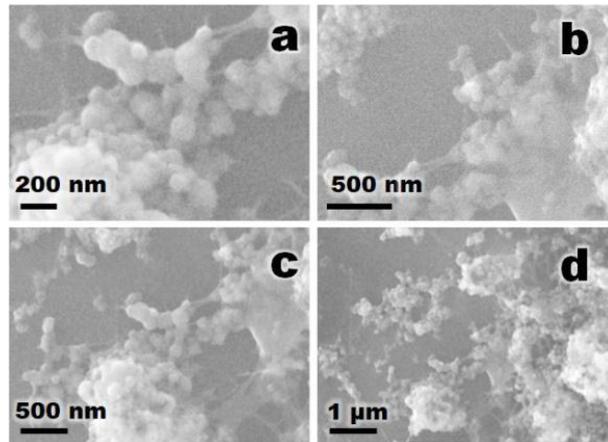
O histograma obtido a partir das imagens de SEM mostram que o diâmetro médio do compósito são de 87, 19 e 22 nm, SPION com tripsina preparadas nos pH 4, 7 e 8, respectivamente. As partículas formadas nas amostras de SPION@Tri são muitas vezes maiores que as partículas de SPION porque é resultado da aglomeração de algumas partículas de SPION e tripsina. Essa formação é comum, como mostrado no trabalho de Hamzian (*et al.* 2017), que obteve um aumento de 7,0 nm das SPIONs para 180,0 nm no conjugado de SPION-poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Além disso, Shevtsov (*et al.* 2014) obtiveram resultados onde o tamanho inicial das SPIONs foi de 33,7 nm e o compósito formado Fator de crescimento epidérmico (EGF)-SPION, mostrou um tamanho de 47,6 nm.

Figura 12 - Micrografias SEM de SPION em diferentes magnificações



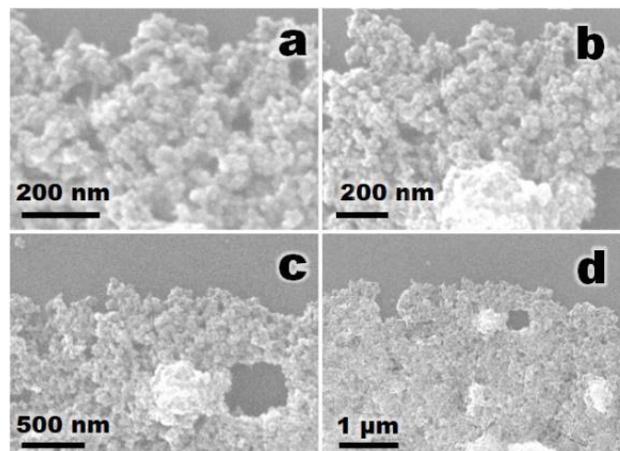
Fonte: da autora.

Figura 13 - Micrografias SEM de SPIONs preparadas pelo método de coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio aquoso recobertos por SPION@Tri pH4 em diferentes magnificações.



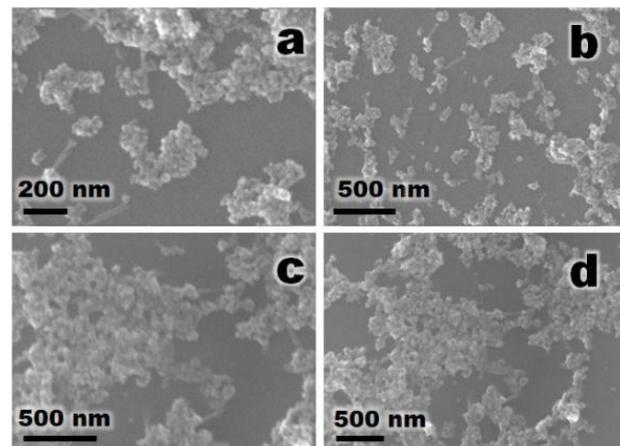
Fonte: da autora.

Figura 14 - Micrografias SEM de SPIONs preparadas pelo método de coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio aquoso recobertos por SPION@Tri pH7 em diferentes magnificações.



Fonte: da autora.

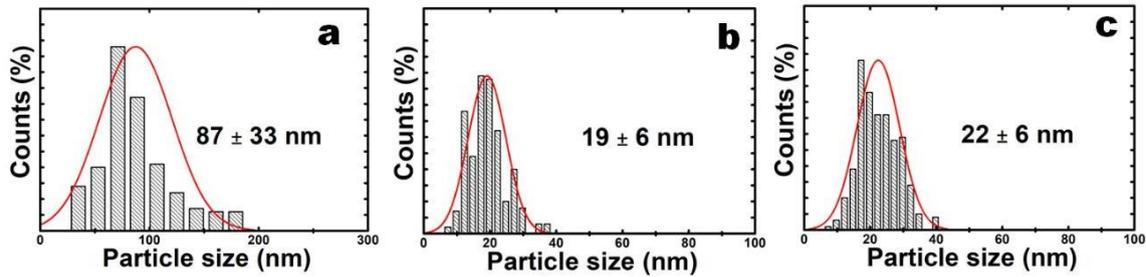
Figura 15 - Micrografias SEM de SPIONs preparadas pelo método de coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio aquoso recobertos por SPION@Tri pH8 em diferentes magnificações.



Fonte: da autora

Figura 16 – Histograma com tamanho médio das partículas de SPIONs recobertos por tripsina em diferentes pH obtidos a partir da contagem de partículas das imagens de SEM.

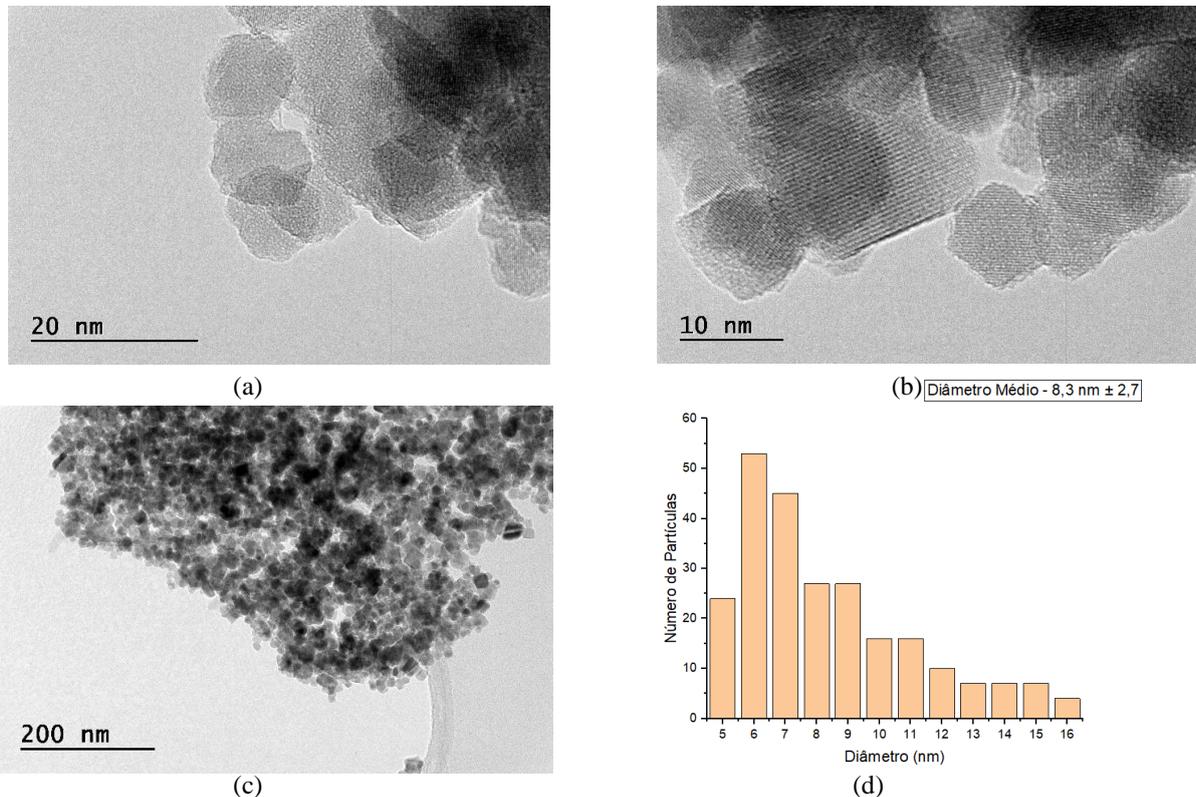
a) SPION@Tri pH4; b) SPION@Tri pH7; c) SPION@Tri pH8.



Fonte: da autora.

Nas micrografias de TEM é possível identificar NPM com baixa polidispersidade e morfologia próxima a uma esfera em diferentes escalas (figuras a, b e c). Já o tamanho das partículas foi obtido a partir de um histograma de distribuição de tamanho medindo-se o diâmetro de nanopartículas contidas nas imagens de TEM, utilizando o software ImageJ. Considerando que as nanopartículas possuem um formato esférico, o histograma foi obtido a partir da contagem de 240 nanopartículas, fornecendo um diâmetro médio na ordem de $8,3 \text{ nm} \pm 2,7$ (Figura 17d). Entretanto, é observado que uma parcela considerável das nanopartículas contabilizadas, aproximadamente 40%, possuem tamanhos entre 6 e 7 nm.

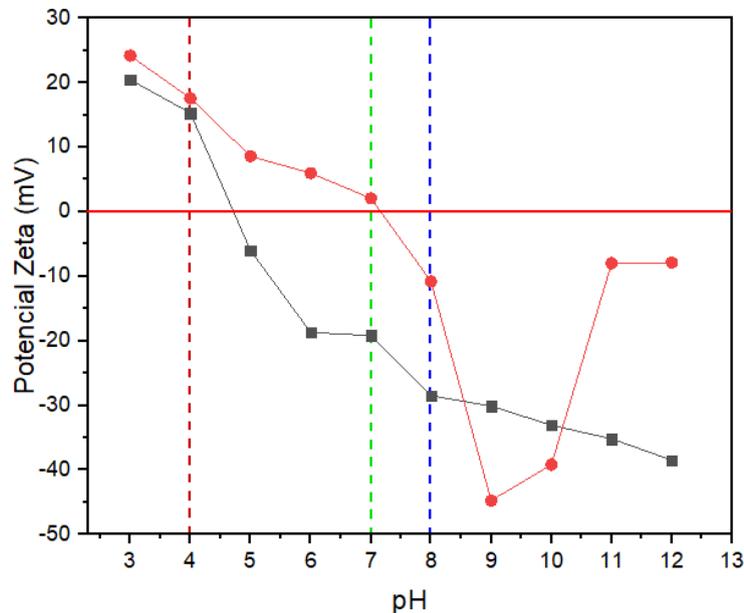
Figura 17 -Caracterização das nanopartículas magnéticas por TEM. Em (a), (b), (c) e (d) micrografias das NPM em diferentes escalas; em (d) histograma de distribuição apresentando o tamanho médio das NPM.



Fonte: da autora

A dependência do potencial zeta das SPIONs preparadas por síntese e da tripsina suína obtida comercialmente também foi determinada em função do pH do meio (Figura 18).

Figura 18: Comparação do potencial zeta em função do pH para: (-●-) tripsina suína comercial e (-■-) SPIONs.

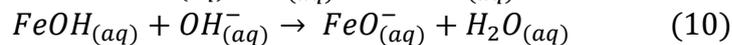
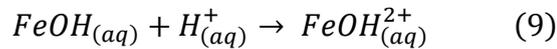


Fonte: da autora.

A análise dos resultados obtidos para as medidas do potencial zeta em função do pH do meio para dispersões aquosas de SPIONs e soluções comerciais de tripsina revelou, em geral, três regiões com diferentes potenciais promissores em proporcionar diferentes interações entre SPION e tripsina. Nesse sentido, para os estudos de imobilização, foram escolhidos valores de pH de 4,0, onde as SPIONs são encontradas com valores de PZ de + 15,3 mV e a Tripsina + 17,6 mV; em pH 7,0 () onde os valores de PZ foram +19,2 mV e -2,0 mV; e por fim, em pH 8,0 () com valores de PZ de -28,5 mV e -10,0 mV, para SPIONs e tripsina, respectivamente. Além disso, a faixa ótima de pH da tripsina, entre 7,0 e 8,0, foi considerada no processo de imobilização para avaliar a quantidade de enzima imobilizada e a atividade enzimática recuperada.

O potencial zeta das SPIONs mostra que em valores de pH menores que 4,5 essas apresentaram um potencial de superfície positivo, o que pode ser atribuído a presença de íons H^+ provenientes do ácido clorídrico presente no meio que adsorve na superfície das nanopartículas. Após esse valor, é observado o ponto isoelétrico das SPIONs em pH 4,75 e em valores de pH maiores elas se apresentam um potencial negativo. Esses dados estão próximos à outros relatados na literatura, por exemplo, segundo Erdemoğlu e Sarikaya,

(2006) o ponto isoelétrico de nanopartículas magnéticas se encontra em pH próximo a 5. O valor experimental verificado para o ponto isoelétrico em 4,75 é um pouco menor do que o relatado na literatura constituindo evidência que a superfície das SPIONs preparadas no presente trabalho apresentam um potencial de superfície mais negativo provavelmente em função da presença de grupos hidroxilas residuais resultantes do processo de síntese. Essa superfície com potencial mais baixo requer um aumento da concentração de H^+ , ou um abaixamento no pH para que ocorra a neutralização da superfície, ocasionando uma pequena variação no ponto isoelétrico do material. As espécies formadas na superfície das nanopartículas quando reagem com ácidos e bases são $FeOH$, $FeOH^{2+}$ e FeO^- , conforme as equações 9 e 10. Em solução, essas alterações fazem com que as superfícies do óxido de ferro (Fe_3O_4) formem OH^{2+} e O^- , modificando assim a carga de superfície das partículas (ALEXANDRINO *et al.*, 2016).

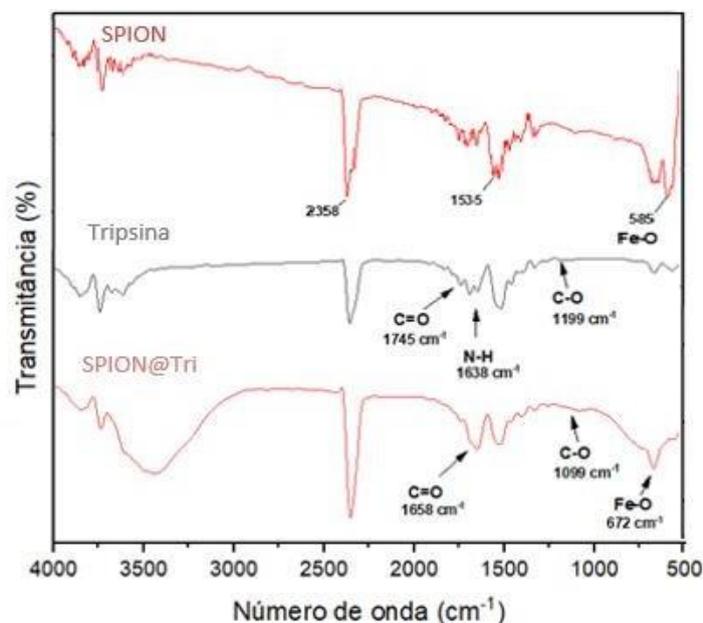


Por fim, destaca-se que os valores de potencial zeta também podem ajudar a inferir na estabilidade eletrostática do sistema coloidal. Nesse caso, magnitudes elevadas do PZ, seja positivo ou negativo, em geral indicam uma maior estabilidade da dispersão. Quando as partículas têm altos valores (positivo ou negativo) de potencial zeta elas tendem a repelir umas às outras e neste sistema reduzindo a tendência de aglomeração. Normalmente dispersões com valores de potencial zeta maiores que 30 mV ou menores que -30mV são consideradas estáveis (FERREIRA, 2009). Neste caso, pode-se observar uma diminuição do valor do potencial das nanopartículas revestidas em relação às puras, o que não é um bom resultado para o propósito deste trabalho pois buscamos nanopartículas estáveis para imobilização enzimática.

A espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) foi empregada para avaliar as características de grupos funcionais presentes na superfície das SPIONs preparadas por síntese e também do nanobiocatalizador (SPION@Tri) o que permite comparar mudanças observáveis na superfície após a imobilização da tripsina. Ou seja, a caracterização por espectroscopia no infravermelho dos materiais de interesse no presente trabalho foi realizada para determinar os tipos de ligações presentes nas nanopartículas, seja as SPIONs puras ou o nanobiocatalizador SPION@Tri, e também na tripsina suína pura obtida comercialmente. A Figura 19 apresenta, portanto, 3 espectros cuja sobreposição possibilita uma melhor comparação das mudanças observáveis ao imobilizar a tripsina sobre as nanopartículas. Além disso, a tabela 1 resume algumas das principais bandas de absorção no infravermelho observadas para essas amostras. O espectro no infravermelho

mostrado na parte superior da figura 19 (linha vermelha) refere-se às SPIONs. Nesse espectro é possível verificar, bandas na região entre 1600 e 1200 cm^{-1} , que originam-se de vibrações de alongamento e deformação de grupos hidroxila conectados à superfície das nanopartículas, (INDOLIYA *et al.*, 2021). Já a banda em 571 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de grupamentos Fe-O, característicos dos sítios octaédricos e tetraédricos do óxido de ferro na forma de magnetita (SILVA, 2017). Na região de aproximadamente 2350 cm^{-1} , para todos os 3 espectros mostrados na Figura 19, aparecem bandas referentes ao CO_2 atmosférico provavelmente devido a uma exposição prolongada da amostra ao ar durante a realização da aquisição dos espectros.

Figura 19: Espectros de FTIR para a SPION (linha vermelha), Tripsina (linha cinza) e SPION@Tri (linha rosa).



Fonte: da autora.

Além do espectro no infravermelho para a SPION, a Figura 19 apresenta outros dois espectros, para a Tripsina (curva em cinza) e para o sistema bioconjugado SPION@Tri (curva em rosa). É possível observar em ambos os espectros os principais modos vibracionais que caracterizam a Tripsina. Os picos em 1745 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} e 1199 cm^{-1} que podem ser atribuídos, respectivamente ao estiramento C=O, deformação N-H e estiramento C-O, na Tripsina livre. Entretanto, para o nanobioconjugado preparado SPION@Tri esses modos vibracionais de C=O e C-O deslocam-se, respectivamente, para 1658 cm^{-1} e 1099 cm^{-1} . Não foi possível observar a deformação N-H para a enzima imobilizada, provavelmente devido a presença de deformações de grupos Hidroxila em torno de 1535 cm^{-1} , que podem ser atribuídas a umidade na amostra ou no

sistema. A banda apresentada em 672 cm^{-1} no bioconjugado enzima-NP, indica um estiramento de grupamentos Fe-O, conforme já observado no espectro da SPION pura. Todos esses estiramentos encontram-se sumarizados na Tabela 1. Tais deslocamentos são indicativos de uma interação de natureza eletrostática entre a enzima Tripsina e a superfície do material, conforme também foi observado por Sun (*et al.*, 2012), Chanphai e Tajmir-Riahi (2016) e Santos (2020) em outros estudos.

Tabela 1 - Principais picos apresentados no espectro de FTIR.

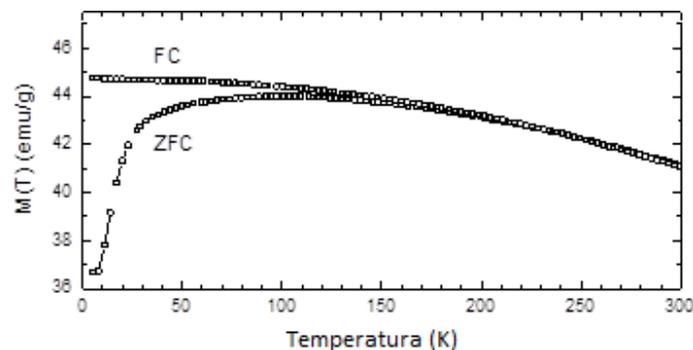
Vibração	Tripsina	MNP-Tri	Referência*
δ N-H	1638 cm^{-1}	---	1640 cm^{-1}
ν C=O	1745 cm^{-1}	1658 cm^{-1}	$1540\text{-}1870\text{ cm}^{-1}$
ν C-O	1199 cm^{-1}	1099 cm^{-1}	$1000\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$

Fonte: da autora.

*COMPARATO, 2016; FORATO *et al.*, 2010

Por fim, a caracterização magnética das SPIONs foi realizada e os resultados são apresentados na Figura 20 que mostra as curvas de magnetização refrigeradas a zero (ZFC) e refrigeradas a campo (FC) para essas amostras com campo magnético aplicado de 1000 Oe. O FC e ZFC obtido para a amostra de SPION apresentam uma irreversibilidade, com temperatura de partida (T_{irr}) próxima ao máximo amplo observado nas curvas ZFC. Este máximo pode ser atribuído à temperatura de bloqueio (T_B), que está relacionada ao processo de bloqueio das reorientações termicamente ativadas das partículas magnéticas. Tais características são consistentes com o comportamento superparamagnético (SPM) observado na literatura para SPIONs com diâmetro externo variando de 5 a 150 nm. (GOYA; BERQUÓ; FONSECA, 2003)

Figura 20 - Dependência da temperatura de magnetização e Magnetização versus campomagnético tomado a 5 K e 300 K de SPIONs.



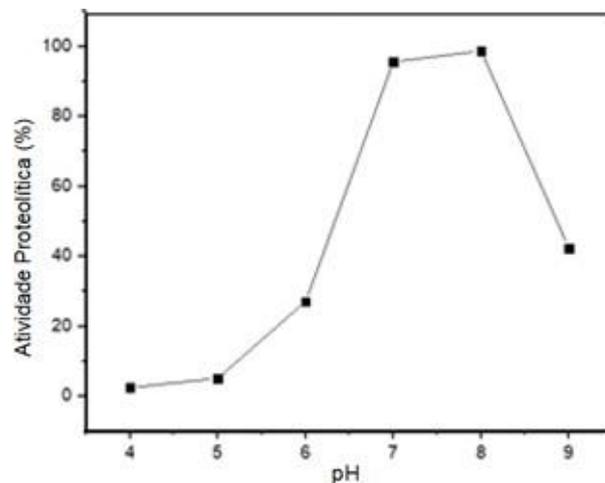
Fonte: da autora.

4.2 Caracterização da Imobilização Enzimática

As Tripsinas são proteases alcalinas, ou seja, exercem sua atividade em pH alcalino, essa característica das Tripsinas é o que permite sua utilização em processos industriais que muitas vezes acontecem em extremos valores de pH (HADDAR *et al.*, 2009)

A atividade proteolítica máxima para tripsina suína foi observada em pH 8,0 utilizando solução Tampão de Tris-HCl 0,01M por 1h a 40°C. Os resultados podem ser visualizados na Figura 21. Estes resultados são comuns para a atividade de enzimas digestivas, que normalmente possuem seu pH ótimo na faixa de 7,0-8,0. (CAVALCANTE, 2005).

Figura 21 - Variação de atividade da Tripsina Suína pura em relação a diferentes valores de pH.



Fonte: da autora.

Com o intuito de avaliar a efetividade do processo de adsorção entre a tripsina suína e a superfície da SPION, a imobilização da enzima nesse suporte foi conduzida em diferentes condições de controle de pH. O interesse aqui foi o de verificar como a alteração das cargas de superfície da tripsina e da SPION afetam a adsorção. Dessa forma, a metodologia de imobilização por adsorção física foi estabelecida a partir da comparação do potencial zeta obtido para a Tripsina pura e as SPION em diferentes valores de pH. A partir dessas informações, foram escolhidas 3 diferentes condições de controle de pH em que as espécies envolvidas no processo de adsorção apresentassem diferenças significativas nos seus potenciais de superfície (ver Figura 21). Aqui é importante destacar que valores de potencial zeta para materiais complexos como uma enzima, dão informação apenas de potenciais médios de superfície, ou seja, na superfície da enzima

existem diversos grupamentos (resíduos de aminoácidos) que sob determinada conformação da enzima num dado pH ficarão mais ou menos expostos na superfície. De tal forma, que existirão diferentes áreas em que cargas negativas, positivas ou ambientes hidrofóbicos dominam na superfície da enzima. O valor do potencial zeta reflete apenas a distribuição média de cargas na superfície, ou ainda, a magnitude média de forças que atuam entre partículas na dispersão. Essas áreas da superfície da enzima com diferentes resíduos de aminoácidos eletricamente carregados poderão se alterar de tamanho ou mesmo desaparecer devido à mudanças conformacionais da estrutura terciária da enzima provocadas pela alteração do pH do meio que expõe ou internalizam esses resíduos de aminoácidos. Por outro lado, nanopartículas como a SPION, apresentará um potencial de superfície aproximadamente homogêneo ao longo de toda sua superfície, o que reflete numa densidade de carga superficial também homogênea e mudanças no pH provocarão mudanças homogêneas em toda a superfície.

Após a realização do processo de imobilização por simples contato entre a tripsina suína e as SPIONS em meio aquoso com controle de pH, as nanopartículas foram separadas do sobrenadante e a atividade das SPION@Tri produzidas por esse método, nos diferentes valores de pH de controle, foram usados para avaliar a eficiência da adsorção enzimática na superfície das SPIONs. Na tabela 2, são apresentados os valores de atividade do material imobilizado e do seu sobrenadante nos diferentes pHs estudados.

Tabela 2: Atividade enzimática das SPION@Tri produzidas em diferentes pHs.

Amostra	Atividade Recuperada (%)
SPION@Tri – pH 4,0	31,84
S. SPION@Tri – pH 4,0	83,52
SPION@ Tri – pH 7,0	27,56
S. SPION@ Tri – pH 7,0	76,94
SPION@ Tri – pH 8,0	32,28
S. SPION@ Tri – pH 8,0	79,75

*S. SPION@Tri, remete ao sobrenadante do material imobilizado (atividade residual).

Fonte: da autora.

Os resultados revelaram que em todos os processos adsortivos estudados ocorreu a imobilização da tripsina suína na superfície da SPION, entretanto, a imobilização em pH 8,0 forneceu uma maior recuperação do valor de atividade quando comparado com o valor de atividade da enzima na sua forma livre. Também foi verificado que os sobrenadantes das amostras apresentaram uma alta porcentagem de atividade, mostrando

que ainda uma grande quantidade de enzima permaneceu no meio reacional. Em pH 7,0 é observado a recuperação de 76,94 % da atividade hidrolítica no sobrenadante, indicando a presença de uma menor quantidade de enzima no meio reacional, mesmo que a porcentagem de atividade da enzima imobilizada tenha sido menor, com 27,56%.

Para tentar explicar os comportamentos acima descritos, é necessário entender que as interações que são estabelecidas em processos de adsorção ocorrem em toda a sua superfície do suporte, por isso, são ditas não especificamente dirigidas (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Essa consideração nos faz compreender a dificuldade de definir e controlar qual região da enzima estará interagindo com a superfície do suporte e quais são os grupos residuais dos aminoácidos que formam a cadeia peptídica que regem essas ligações.

Para determinar a quantidade de enzima adsorvida na superfície das nanopartículas foi utilizado o método por espectroscopia de fluorescência, que é baseado na fluorescência intrínseca das macromoléculas biológicas.

Os resultados referentes ao teor de proteína no sobrenadante do material imobilizado são apresentados na tabela 3. A partir da técnica de fluorescência foi observado que uma quantidade de enzima se manteve presente nos sobrenadantes, mostrando que no processo de imobilização 66,18 % da tripsina foi adsorvida na superfície das SPIONs em pH 4,0, 67,1 % em pH 7,0 e 75,4% em pH 8,0. Nos três casos, portanto, o processo de imobilização foi satisfatório.

Tabela 3 - Análise do teor de proteína no sobrenadante do processo de imobilização.

Amostra	[Tripsina] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Tripsina pura	4,60 (100%)
S. SPION@Tri pH 4,0	1,55 (33,8 %)
S. SPION@Tri pH 7,0	1,516 (32,9 %)
S. SPION@Tri pH 8,0	1,13 (24,6 %)

*S. SPION@Tri, remete ao sobrenadante do material imobilizado.

Fonte: da autora.

Como a interação entre enzima e suporte pode ocorrer através de interações mais fracas que favorecem a dessorção da enzima imobilizada na superfície das nanopartículas, foi analisado o processo de dessorção mecânica do material sintetizado quando exposto a uma lavadora ultrassônica por 5 ciclos de 5 minutos cada e monitoradas por espectroscopia de fluorescência. Os resultados obtidos para os estudos dessortivos mostraram, pelas técnicas analisadas, que após 5 ciclos de lavagem não foi possível

determinar a taxa de dessorção, devido aos valores de dessorção obtidos serem inferiores aos limites de detecção da curva de calibração da fluorescência ($0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$). A baixa taxa de dessorção observada experimentalmente pode ser atribuída à ocorrência de interações SPION-Tripsina mais fortes, provavelmente de caráter iônico. As adsorções iônicas ocorrem da mesma maneira que a adsorção física, entretanto, são interações mais energéticas do que aquelas que envolvem primordialmente forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas que as ligações covalentes que caracterizam a adsorção química. Dado o caráter iônico e as condições amenas de imobilização, nesse tipo de adsorção ocorrem pequenas modificações conformacionais na enzima, propiciando a obtenção de biocatalisadores com atividades enzimáticas comparáveis a outros biocatalisadores obtidos por ligações covalentes (VIEIRA, 2009).

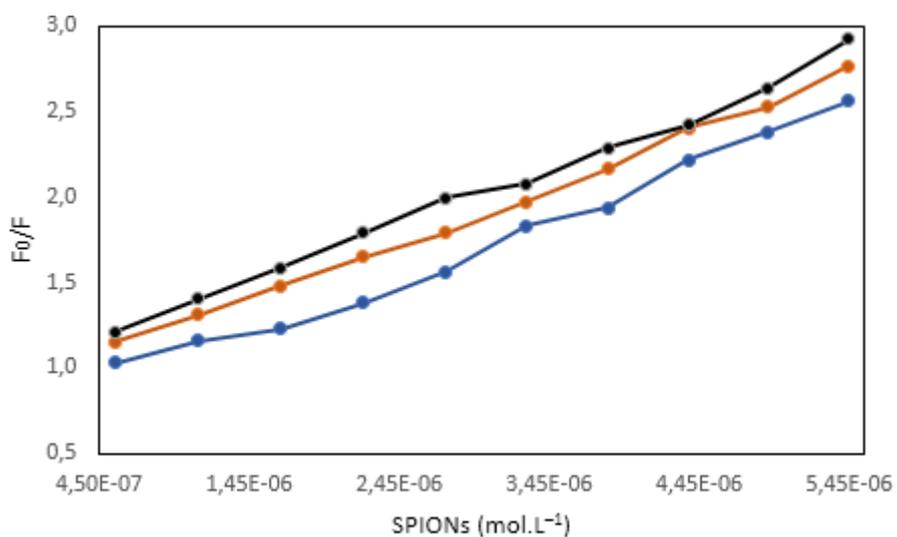
4.2.1 Estudos interacionais Tripsina-SPION

A partir dos estudos de fluorescência em diferentes temperaturas realizados para avaliar a interação enzima-suporte foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre a tripsina e a SPION. Na seção 3.6.1 o procedimento para a realização do experimento de fluorescência é detalhado e a partir da Equação de Stern–Volmer (Equação 6), foi avaliada a interação ligante-macromolécula, onde o valor de (K_{sv}) é considerado como constante de ligação (K_b). O valor K_b foi determinado por regressão, usando um gráfico de F_0/F versus $[Q]$, onde F e F_0 são, respectivamente, a intensidade de fluorescência da tripsina na presença de diferentes concentrações de nanopartículas e a intensidade de fluorescência da enzima pura, e $[Q]$ é a concentração das SPIONs. O valor de K_b foi determinado a partir da inclinação, conforme mostrado na figura 22. Os dados obtidos foram tratados via a Equação 7 (Equação de van't Hoff). Observe que os coeficientes angular e linear, $-\frac{\Delta H}{R}$ e o $\frac{\Delta S}{R}$ da equação 7, podem ser obtidos a partir de simples ajustes e assim determinar os parâmetros termodinâmicos relacionados ao processo de interação tripsina-SPION. A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) relacionada à interação tripsina-SPION foi calculada a partir da equação 8.

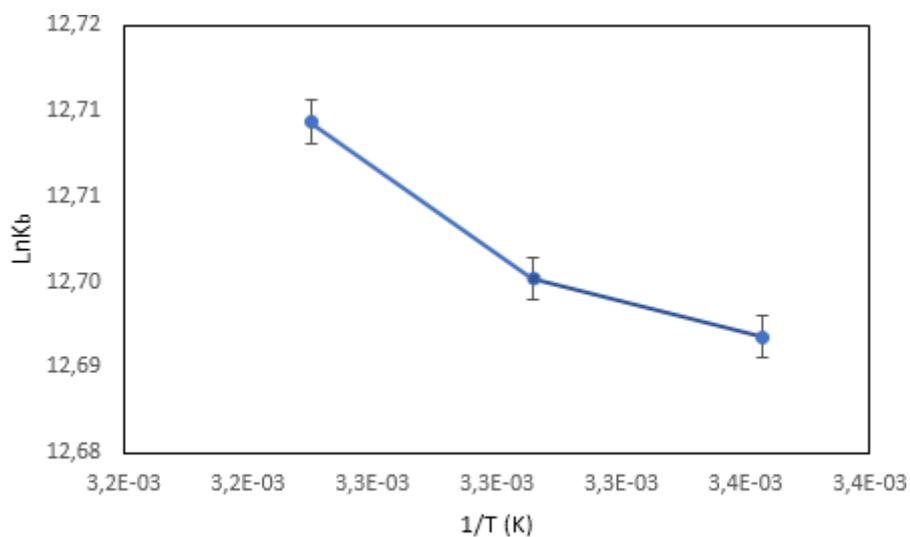
Os parâmetros termodinâmicos calculados estão apresentados na Tabela 4. Ross e Subramanian (1981) afirmam que um valor positivo de ΔS indica uma mudança parcial na estrutura do solvente devido à exclusão de moléculas de água próximas à região de ligação da enzima. O valor de ΔH de $+15.31 \text{ kJ mol}^{-1}$ indica que a interação entre a SPION e a tripsina é entropicamente direcionada porque o termo $T\Delta S$ domina e faz com

que a energia de Gibbs ΔG esteja em torno de -31 kJ mol^{-1} , sendo assim uma interação espontânea, principalmente como resultado da desolvatação polar. Além disso, valores de ΔG desta magnitude são indicativos de interações de caráter iônico.

Figura 22- (a) Gráficos de Stern-Volmer mostrando a dependência da supressão de fluorescência de Try sobre a concentração de SPIONs em diferentes temperaturas: (■) 298,15; (■) 303,15 e (■) 308,15 K; (b) gráfico de van't Hoff da dependência da constante de ligação (K_b) na temperatura.



(a)



(b)

Fonte: da autora

Tabela 4 – Parâmetros termodinâmicos.

Temperature (K)	$\ln K_b$	ΔG (kJ.mol ⁻¹)
298.15	12,69	-31,5
303.15	12,70	- 32,0
308.15	12,71	- 32,5
ΔH (kJ.mol ⁻¹)		15,31
$T\Delta S$ (kJ.mol ⁻¹)*		32,99

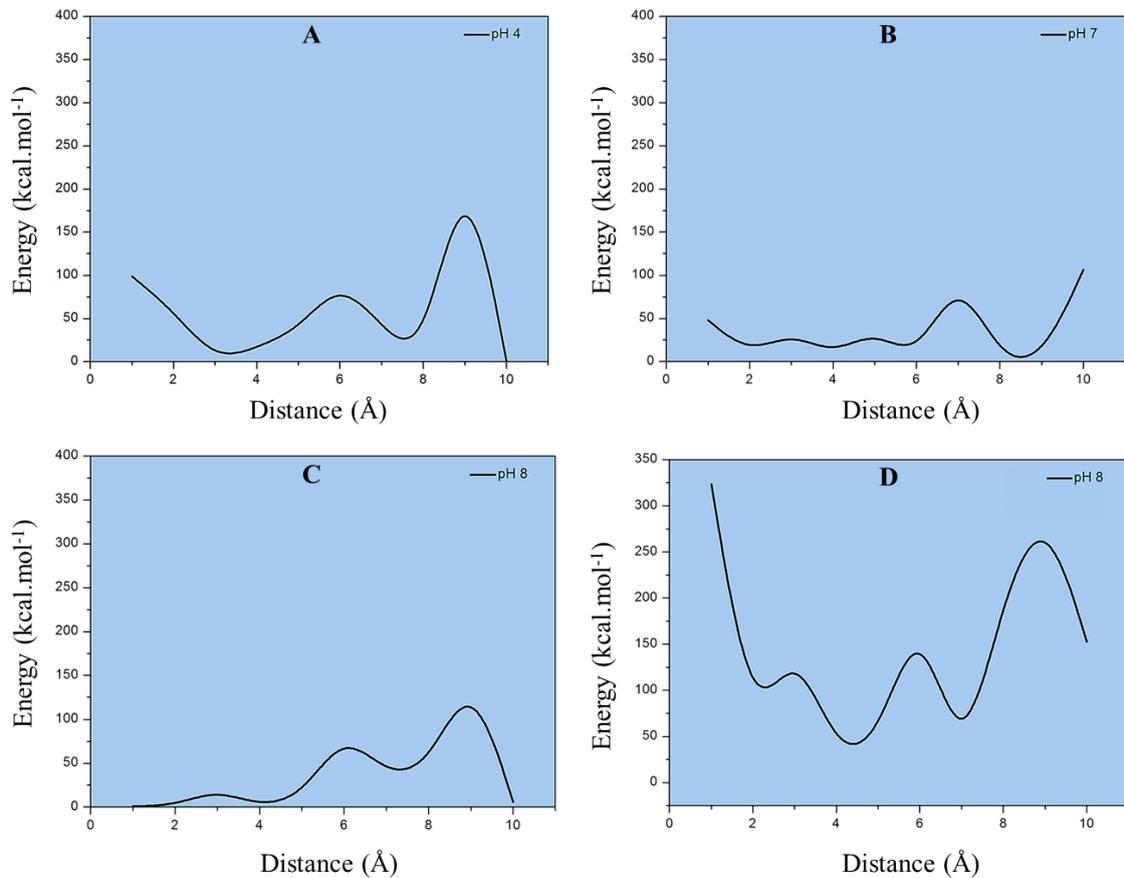
*Os termos ΔH e ΔS foram determinados pelo ajuste linear da Equação 7 aos dados. O termo de energia $T\Delta S$ refere-se ao valor calculado para a temperatura de 298,15 K.

Fonte: da autora

4.2.2 Modelagem

Na parte teórica deste trabalho, investigamos computacionalmente a imobilização da tripsina suína na superfície da Fe₃O₄ (magnetita). O perfil de energia potencial para a adsorção da tripsina suína sobre a superfície do material foi então calculado através de cálculos de PM6. A Figura 23 mostra os gráficos para cada perfil de energia de adsorção em diferentes pHs.

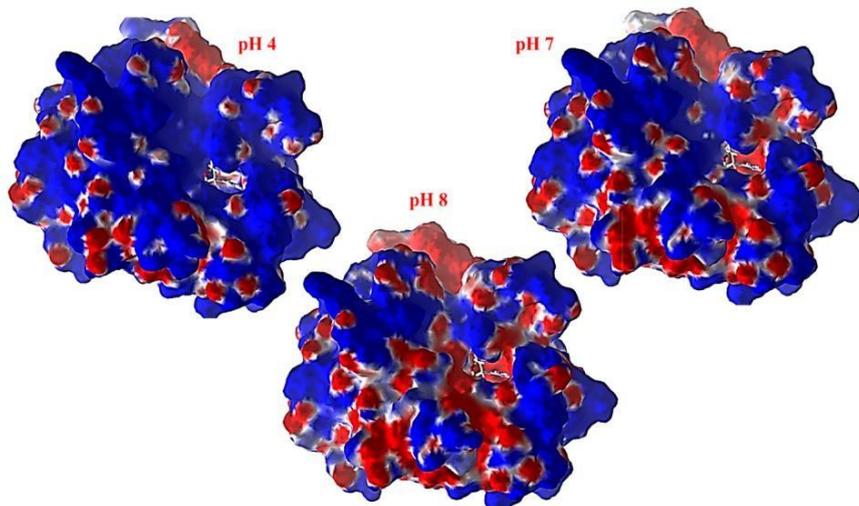
Figura 23 - Perfis de energia da adsorção de tripsina suína em Fe₃O₄ através da aproximação da enzima pelo lado oposto ao sítio ativo em pH 4 (A), pH 7 (B) e pH 8 (C), e pelo mesmo lado do sítio ativo em pH 8 (D)



Fonte: da autora.

De acordo com a Figura 23 (A, B e C), temos os perfis de energia para adsorção do Fe_3O_4 através da aproximação da enzima pelo lado oposto ao sítio ativo. A Figura 23A mostra o perfil de energia de adsorção simulado em pH 4. A partir deste resultado, observa-se que o perfil de energia apresenta grandes variações de energia, a partir da distância de 10\AA . Os valores mínimos de energia são encontrados a uma distância de 3\AA , com a energia subindo rapidamente em distâncias inferiores a 3\AA . Este resultado sugere que o processo de adsorção e imobilização da tripsina suína em Fe_3O_4 são instáveis, ou seja, menos favoráveis em comparação com os valores de pH 7 e 8, respectivamente. Por outro lado, para o pH 7 (Figura 21B), a energia oscila a grandes distâncias, mas tende a se manter mais constante em valores de baixa energia (abaixo de 50 kcal mol^{-1}) em distâncias menores que 6\AA . Neste caso, a energia começa a subir novamente a distâncias inferiores a 2\AA . Esses resultados sugerem que a adsorção em pH 7 é muito mais favorável do que em pH 4 e, portanto, a enzima deve estar mais fortemente ligada a superfície do material. Além disso, a mesma simulação foi realizada em pH 8 (Figura 21C), o que forneceu os melhores resultados para a interação tripsina- Fe_3O_4 nas simulações computacionais realizadas. Para este pH, da mesma forma, foram observadas grandes variações de energia ao longo de grandes distâncias. No entanto, a energia diminui e permanece estável em valores de energia muito baixos (distâncias inferiores a 4\AA), sugerindo que o processo de adsorção e imobilização enzimática são muito mais favoráveis e estáveis, em comparação com os valores obtidos nos pHs 4 e 7. Assim, a enzima protonada em pH 8 pode ser mais fortemente adsorvida sobre a superfície do material. A Figura 24 mostra as superfícies eletrostáticas ao longo da enzima tripsina suína em diferentes pHs.

Figura 24 - Superfícies eletrostáticas para a enzima tripsina suína em diferentes valores de controle de pH. Vermelho significa regiões mais hidrofóbicas e azul refere-se a regiões menos hidrofóbicas.



Fonte: da autora.

De acordo com a Figura 24, é possível observar que as superfícies eletrostáticas mudam de acordo com o estado de protonação em diferentes pHs. Em pH 4, as regiões menos hidrofóbicas (azul) predominam em torno do sítio ativo, e regiões mais hidrofóbicas (vermelho) começam a surgir em pH 7. Deve-se ter em mente que em pH 8, as regiões predominantes em torno do sítio ativo são hidrofóbicas. A partir dessas análises, podemos concluir que o surgimento de regiões eletrostáticas contribui para a interação e adsorção da enzima sobre a superfície do material. Os resultados experimentais mostraram que o material imobilizado, sob diferentes condições de pH, apresentou 66,2, 67,1 e 75,4% de adsorção enzimática ao suporte em pH 4,0, 7,0 e 8,0, respectivamente. Esses resultados corroboram com os dados teóricos aqui obtidos, ou seja, a taxa de adsorção da enzima aumentou significativamente em pH 8, e neste mesmo pH, o perfil de energia de adsorção é mais favorável e estável em distâncias menores da superfície, indicando que uma maior quantidade de enzima pode ser adsorvido sobre a magnetita.

4.2.3 Avaliação dos ciclos de reuso da SPION@Tri

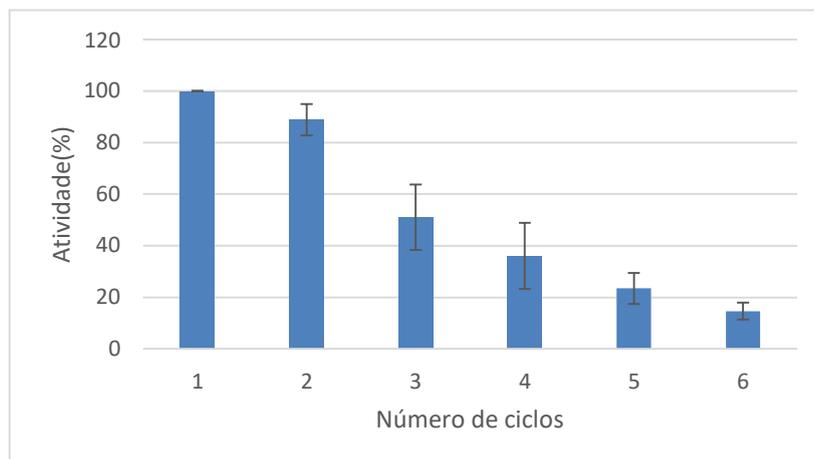
A possibilidade de reutilizar a enzima é uma das grandes vantagens de imobilização e, portanto, avaliar sua capacidade de reuso é de extrema importância. A reutilização da Tripsina imobilizada foi testada ao longo de vários ciclos em processos catalíticos utilizando BapNA como substrato. Em cada etapa, a estabilidade do nanobiocatalisador foi verificada a partir da sua atividade recuperada. De acordo com os resultados apresentados na Figura 25 o processo de catálise ocorreu com uma eficiência de aproximadamente 88% até o segundo ciclo, e a enzima imobilizada reteve uma eficiência em torno de 40% até o quarto ciclo. Esse resultado mostra que o nanobiocatalisador manteve sua atividade após ciclos de uso, mesmo que tenha sofrido uma perda catalítica durante o processo. Essa diminuição da atividade após alguns ciclos de reuso pode-se dar pela própria movimentação da enzima em sua interação com o substrato, sendo que a cada adaptação realizada pode ocorrer uma desestruturação de sua cadeia proteica.

Os resultados obtidos confirmam que é possível imobilizar a tripsina suína por simples processo de adsorção em etapa única e sob controle de pH na superfície de SPION. A obtenção de um nanobiocatalisador ativo demonstra isso. Embora a atividade catalítica não se manteve estável ao longo de 6 ciclos de reuso, conforme demonstrado, é

possível com esses resultados inferir que a interação SPION-Tripsina não propicia garantias na rigidez conformacional da desta enzima. Provavelmente, já que os processos dessortivos não foram significativos, conforme anteriormente demonstrado, alterações conformacionais significativas e irreversíveis na tripsina é que estão levando a perda da atividade observada. Nesse sentido, pode-se pensar para futuros estudos, em possíveis modificações na metodologia de imobilização, seja na superfície do suporte seja acrescentando ligações cruzadas entre as enzimas imobilizadas na superfície das SPIONs, de forma a conferir maior rigidez conformacional à estrutura da tripsina e avaliar se isso levaria à manutenção da atividade catalítica por um maior número de ciclos de reuso

A partir dessa avaliação é possível afirmar também o uso promissor de biocatalisadores preparados com suportes magnéticos devido à sua facilidade de separação da mistura reacional e reutilização após sucessivos ciclos.

Figura 25: Ensaio de ciclos reuso do nanobiocatalisador SPIONs@tri



Fonte: da autora.

Esses resultados podem ser comparados com os de outros estudos similares, como por exemplo, Souza (*et al.*, 2020) avaliou o efeito do método de imobilização da Tripsina em biocarvão na hidrólise de caseína de diferentes fontes, obtendo, na imobilização por adsorção, a possibilidade de reaproveitamento do uso do biocatalisador por 4 ciclos. Sendo que a atividade do biocatalisador na hidrólise da Caseína Bovina caiu de 70% no segundo ciclo para 40% no quarto ciclo de uso. Aggarwal e IkramZinc (2022) imobilizou tripsina suína na superfície de um nanocompósito de ZnO/Quitosana ativado por glutaraldeído(GA) e afirmou que o sistema sustentou quase 50% da atividade catalítica até o 9º ciclo reutilização. Baharfar (*et al.* 2021) avaliou o uso da tripsina suína ligada ao suporte $Fe_3O_4@SiO_2@D-NHCS$ e afirmou que o catalisador obteve uma estabilidade por 5 ciclos. Aslani (*et al.*, 2018) utilizou a tripsina em $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ que reteve sua atividade inicial em torno de 85% por 6 ciclos. No

entanto, em todos esses estudos foram realizados pelo menos uma etapa intermediária de tratamento nas superfícies das nanopartículas, o que aumenta o tempo de preparação do nanobiocatalisador e o custo do processo, além de sua complexibilidade.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho a tripsina suína foi imobilizada na superfície de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) previamente sintetizadas e caracterizadas. A imobilização ocorreu com sucesso e foi baseada em um processo de adsorção em etapa única conduzido com controle de pH. Na caracterização termodinâmica da interação SPION-Tri observou-se a ocorrência de interações iônicas em função da diferença de carga entre os SPIONs e a tripsina e os parâmetros termodinâmicos encontrados foram: $\Delta G^\circ = -31,50 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H^\circ = 15,31 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\circ = 32,99 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$. O processo de adsorção mostrou-se mais eficaz em pH 8,0, onde 75,4% da tripsina foi imobilizada nesta condição com a atividade catalítica recuperada de 32,28%. O perfil de energia potencial para a adsorção da tripsina suína sobre a superfície do material foi calculado computacionalmente e mostrou que a enzima protonada em pH 8,0 é mais fortemente adsorvida sobre a superfície das nanopartículas. Foi possível constatar também, que a taxa de adsorção da enzima aumentou significativamente em pH 8,0, e neste mesmo pH, o perfil de energia de adsorção é mais favorável e estável em distâncias menores da superfície. Estudos de dessorção conduzidos demonstraram que a enzima se encontra fortemente ligada à superfície das SPIONs. E ainda, a reutilização da Tripsina imobilizada foi testada ao longo de vários ciclos em processos catalíticos utilizando BapNA como substrato. O processo de catálise ocorreu com uma eficiência de aproximadamente 88% até o segundo ciclo, e a enzima imobilizada reteve uma eficiência em torno de 40% até o quarto ciclo. Uma possível continuidade para o presente trabalho seria o de avaliar como mudanças na superfície das SPIONs podem afetar o processo de adsorção visto que ainda são poucos os trabalhos científicos que investigam sob a perspectiva da físico-química esse fenômeno.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, J. S. *et al.* Dispersion degree and zeta potential of hematite. **Revista Escola de Minas**, v. 69, n. 2, p. 193–198, 2016.
- ALI, A. *et al.* Review on recent progress in magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, and diverse applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 629054, 2021.
- ALMEIDA, V. M. G. de. **Hydropace**: uma metodologia para análise de inibição cruzada em serino proteases através de centroides de regiões hidrofóbicas. [s.l: s.n., 2001.
- AMALIA, S. *et al.* Immobilization of trypsin onto porous methacrylate-based monolith for flow-through protein digestion and its potential application to chiral separation using liquid chromatography. **Heliyon**, v. 7, n. 8, p. e07707, 2021.
- ASLANI, E.; ABRI, A.; PAZHANG, M. Immobilization of trypsin onto Fe₃O₄@ SiO₂-NH₂ and study of its activity and stability. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, v. 170, p. 553-562, 2018.
- ATACAN, K.; ÖZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 227–236, 2015.
- ATACAN, K.; ÇAKIROĞLU, B.; ÖZACAR, M. Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 148–155, 2017.
- ATACAN, K.; ÇAKIROĞLU, B.; ÖZACAR, M. Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk. **Food Chemistry**, v. 212, p. 460–468, 2016.
- BAHARFAR, R.; PEIMAN, S.; MALEKI, B. Fe₃O₄@ SiO₂@ D- NHCS- Tr as an efficient and reusable catalyst for the synthesis of indol- 3- yl- 4 H- chromene via a multi- component reaction under solvent- free conditions. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 1302-1310, 2021
- BERG, J. M. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Reverté, 2014.
- BILAL, M. *et al.* Agarose-chitosan hydrogel-immobilized horseradish peroxidase with sustainable bio-catalytic and dye degradation properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 742-749, 2019.
- CALDER, M. S.; SIEGEL, D. Properties of the Michaelis-Menten mechanism in phase space. **Journal of Mathematical Analysis and Applications**, v. 339, n. 2, p. 1044–1064, 2008.

- CAVALCANTI, M. H. *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 431, p. 134128, 2022.
- CHANPHAI, P.; TAJMIR-RIAHI, H. A. Trypsin and trypsin inhibitor bind PAMAM nanoparticles: Effect of hydrophobicity on protein-polymer conjugation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 419–424, 2016.
- CHEN, J. M. *et al.* Evolution of trypsinogen activation peptides. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 11, p. 1767–1777, 2003.
- CIPOLATTI, E. P. *et al.* Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 2014.
- COMPARATO O. *et al.* Influência da concentração de oligonucleotídeos no efeito de aglomeração de nanopartículas na presença de solução salina. **Journal of Colloid and Interface Science** p. 126–132, 2016.
- COSTA J. B. *et al.* Enhanced biocatalytic sustainability of laccase by immobilization on functionalized carbon nanotubes/polysulfone membranes. **Chemical Engineering Journal**, v. 355, p. 974–985, 2019.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química nova**, v. 27, p. 623–630, 2004.
- ERDEMOĞLU, M.; SARIKAYA, M. Effects of heavy metals and oxalate on the zeta potential of magnetite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 300, n. 2, p. 795–804, 2006.
- FERREIRA, R. V. Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Núcleo Magnético de Magnetita **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**. 2009.
- FIGUEROLA, A. *et al.* From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 126–143, 2009.
- FORATO, L. A. *et al.* A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. Embrapa Instrumentação **Agropecuária**, p. 1–16, 2010.
- GALVÃO, W. S. *et al.* Super-paramagnetic nanoparticles with spinel structure: A review of synthesis and biomedical applications. **Solid State Phenomena**, v. 241, p. 139–176, 2016.
- GUO, Z.; SUN, Y. Characteristics of immobilized lipase on hydrophobic superparamagnetic microspheres to catalyze esterification. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 2, p. 500–506, 2004.
- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HMIDET, N. *et al.* Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1-3, p. 71-79, 2009.

HOLA, K. *et al.* Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1162–1176, 2015.

HU, Z. *et al.* The on-bead digestion of protein corona on nanoparticles by trypsin immobilized on the magnetic nanoparticle. **Journal of Chromatography A**, v. 1334, p. 55–63, 2014.

INDOLIYA, A. *et al.* Polymerically modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a multi-model molecular probe for functionalized optical coherence tomography. **Optics & Laser Technology**, v. 141, p. 107108, 2021.

JEONG, U. *et al.* Superparamagnetic colloids: Controlled synthesis and niche applications. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 33–60, 2007.

JUN, Y. *et al.* Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 16, p. 5732-5733, 2005.

JÚNIOR, E. C. S. *et al.* Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: Effect of immobilization method. **Journal of Chromatography B**, v. 1146, p. 122124, 2020.

KASSERRA, H. P.; LAIDLER, K. J. Mechanisms of action of trypsin and chymotrypsin. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 47, n. 21, p. 4031–4039, 1969.

KIM, Y. IL; KIM, D.; LEE, C. S. Synthesis and characterization of CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. **Physica B: Condensed Matter**, v. 337, n. 1–4, p. 42–51, 2003.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

KUMAR, A. G. *et al.* Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 185–190, 2009.

LACERDA, C. D. **Caracterização físico-química da isoforma γ -tripsina bovina**. 2014. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

LIN, Y.; CHEN, Z.; LIU, X. Y. Using Inorganic Nanomaterials to Endow Biocatalytic Systems with Unique Features. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 303–315, 2016.

MAMANI, J. B. **Estrutura e Propriedades de Nanopartículas Preparadas via Sol-Gel**. Universidade de São Paulo - USP, p. 200, 2009.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

NASCIMENTO, A. R. **Síntese e caracterização de materiais mesoporosos para a captura de CO₂: influência do óxido de níquel.** 2014. 149f. Dissertação - (Mestrado em Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

OLSEN, J. V.; ONG, S. E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, n. 6, p. 608–614, 2004.

PARK, H. J. *et al.* Synthesis and characterization of enzyme-magnetic nanoparticle complexes: Effect of size on activity and recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 2, p. 198–203, 2011.

PEIMAN, S.; BAHARFAR, R.; MALEKI, B. Immobilization of trypsin onto polyamidoamine dendrimer functionalized iron oxide nanoparticles and its catalytic behavior towards spirooxindole-pyran derivatives in aqueous media. **Materials Today Communications**, v. 26, p. 101759, 2021.

PEREIRA, E. V. Determinação da atividade e da estabilidade termodinâmica da isoforma atripsina bovina em meios aquo-orgânicos. . **Química Nova**. [s.l: s.n.].2000.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 337–360, 1995.

PESSATO T. B; TAVANO, O. L. Hydrolysis of casein and β - lactoglobulin by immobilized papain after pre-treatment with immobilized trypsin. **Acta alimentaria**,. v. 44, n. 4, p. 570-577, 2015.

PINEDO, A. A.; ELARD, E.; ROJAS, G. Orbignya martiana. **Materials Letters**. v. 6, p. 1–11, 2010.

POWELL, J. *et al.* Structures of three compounds involving lithium- ion encapsulation by group 6 carbonyl phosphinite crown ether complexes. **Acta Crystallographica Section B**, v. 46, n. 6, p. 753–762, 1990.

ROLLETT, A. *et al.* Covalent immobilisation of protease and laccase substrates onto siloxanes. **Chemosphere**, v. 80, n. 8, p. 922–928, 2010.

SAHIN, S.; OZMEN, I. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 184, p. 113195, 2020.

SANTOS, L. A. Estudo da interação da enzima tripsina com nanopartículas de ouro. **Química Nova**, v. 45, n. 9, p. 125–134, 2020.

SIDDIQUI, I.; HUSAIN, Q. Stabilization of polydopamine modified silver nanoparticles bound trypsin: Insights on protein hydrolysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.173, p. 733–741, Sept. 2019.

SILVA, M. F. da. Estudo de estabilidade coloidal de sistemas de nanopartículas magnéticas recobertas visando aplicação em biomedicina. **Química Nova**, v. 75, n. 7. 2017.

SILVA, T. Estudo da estabilidade da enzima Bromelina extraída do Curauá (*Ananas erectifolius*). **Química Nova**, v. 89, n. 8, 2012.

SOUZA, A. T. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa). **Aleph**, 111 f. 2011.

SUN, J. *et al.* Improved preparation of immobilized trypsin on superparamagnetic nanoparticles decorated with metal ions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 414, p. 190–197, 2012.

SUN, J. *et al.* Stability and activity of immobilized trypsin on carboxymethyl chitosan-functionalized magnetic nanoparticles cross-linked with carbodiimide and glutaraldehyde. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1054, p. 57–63, 2017.

TANG, Z. X.; QIAN, J. Q.; SHI, L. E. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. **Materials Letters**, v. 61, n. 1, p. 37–40, 2007.

TAN, H.; FENG, W.; JI, P. Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 172–176, 2012.

TAPDIGOV, S. Z. The bonding nature of the chemical interaction between trypsin and chitosan based carriers in immobilization process depend on entrapped method: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1676-1696, 2021.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 16-23, 2012.

VERWEY, E. J. W. Electronic conduction of magnetite (Fe_3O_4) and its transition point at low temperatures [5]. **Nature**, v. 144, n. 3642, p. 327–328, 1939.

VIEIRA, D. C. Imobilização da enzima xilanase em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V.89 p. 96, 2009.

VIVIAN, D.; POLLI, J. E. Mechanistic interpretation of conventional Michaelis-Menten parameters in a transporter system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, p. 44–52, 2014.

WAN, J. *et al.* Enzyme immobilization on amino-functionalized Fe₃O₄@ SiO₂ via electrostatic interaction with enhancing biocatalysis in sludge dewatering. **Chemical Engineering Journal**, v. 427, p. 131976, 2022.

WU, C. *et al.* Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 953–959, 2012.

WU, E. *et al.* Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. **Chemosphere**, v. 233, p. 327-335, 2019.

YANG, J. S. *et al.* Online proteolysis and glycopeptide enrichment with thermoresponsive porous polymer membrane reactors for nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 5, p. 3124- 3131, 2018.

YI, M.; LIU, Q. Michaelis-Menten mechanism for single-enzyme and multi-enzyme system under stochastic noise and spatial diffusion. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 389, n. 18, p. 3791–3803, 2010.

ZDARTA, J. *et al.* Biopolymers conjugated with magnetite as support materials for trypsin immobilization and protein digestion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 118–125, 2018.