



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELA OLIVEIRA COSTA

**SÍNTESE DE NANOFLORES HÍBRIDAS DAS LIPASES DE *Candida antarctica*
(CALB) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL)**

FORTALEZA
2022

ISABELA OLIVEIRA COSTA

**SÍNTESE DE NANOFLORES HÍBRIDAS DAS LIPASES DE *Candida antarctica*
(CALB) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL)**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientação: Profa. Dra. Nathalia Saraiva Rios.

FORTALEZA

2022

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

C872s Costa, Isabela Oliveira.
Síntese de nanoflores híbridas das lipases de *Candida antarctica* (CALB) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL) / Isabela Oliveira Costa. – 2022.
75 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
Coorientação: Profa. Dra. Nathalia Saraiva Rios.

1. Nanoflores. 2. Lipases. 3. Glutaraldeído. 4. Nanopartículas. 5. CuSO₄. I. Título.

CDD 661

ISABELA OLIVEIRA COSTA

SÍNTESE DE NANOFLORES HÍBRIDAS DAS LIPASES DE *Candida antarctica* (CALB) e
Thermomyces lanuginosus (TLL)

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 03/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nathalia Saraiva Rios (Orientadora)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neila e José Erbi, por todo apoio e incentivo, por sempre investir na melhor educação que eu poderia receber e não medir esforços em me fazer feliz e se sentir amada.

Aos meus irmãos, Matheus e Moisés, pelo companheirismo em todos momentos, pelos momentos de diversão e por sempre acreditarem no meu potencial.

À minha madrinha Maria Eleusa, pelo acolhimento, pelas orações e pelo carinho em todos os momentos.

À minha orientadora, Professora Luciana Rocha Barros Gonçalves pela confiança, atenção e toda sua competência. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos valiosos, experiências e por todo suporte dado desde que começamos esta jornada. Seu entusiasmo pela ciência é inspirador.

À Professora Nathalia Saraiva Rios, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela disponibilidade todas as vezes que precisei de ajuda.

À professora Kyria Santiago do Nascimento pela disponibilidade em aceitar o convite de participar da banca examinadora, obrigada pelo tempo dispensado. Também agradeço a professora Denise Hissa por aceitar o convite em ser suplente da banca.

À minha supervisora dos Estágios Supervisionados, Paula Jessyca Morais Lima pela parceria criada nesse período de estágio. Obrigada pelas companhias diárias e todo suporte no laboratório.

Aos meus queridos amigos do grupo “Bolabos”, Ana Maria, Cleber, Daniel, João Matheus, Lara, Liandra, Lucas, Melissa, Nicole, Natália e Pedro, sou muito feliz e grata pela nossa amizade. Muito obrigada por estarem sempre presentes, por todas as aventuras e momentos compartilhados. Com certeza minha experiência na graduação foi única pela presença de vocês, formamos um grupo muito especial.

As amigas Ana Clara, Lorena, Nathália e Yasmim, por sempre estarem na torcida e pela oportunidade de compartilhar os momentos especiais com vocês mesmo que a distância.

A todos alunos da turma oito do curso de Biotecnologia pela companhia, alegrias e dificuldades compartilhadas nesses cinco anos de curso, é um prazer fazer parte de uma turma unida e amiga como a nossa.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio), Paula, Carlos, Carla, Edvan, Layanne, Kimberle e Ravena, que sempre foram prestativos para esclarecer dúvidas em relação aos procedimentos experimentais

e para discutir resultados. Como também a Renata Kelly e a Marylane Sousa que me acolheram inicialmente ao grupo e fizeram parte da minha iniciação científica no laboratório.

Ao Grupo de Pesquisa em Termodinâmica Aplicada (GPTA) por autorizar a utilização do Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Agradecimentos a coordenação do curso de bacharelado em Biotecnologia e todos os professores presentes durante minha graduação. Agradeço também aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

“Precisamos, entretanto, dar sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”

(Érico Veríssimo, Olhai os lírios do campo, 1938)

RESUMO

As lipases estão entre as enzimas mais utilizadas na biocatálise. Para aprimorar a aplicação destas enzimas é utilizada a estratégia de imobilização enzimática que possibilita a reutilização dos catalisadores e aumenta a sua estabilidade frente às condições de reação. Tradicionalmente a imobilização é realizada utilizando suportes, entretanto, em alguns casos ocorre uma diminuição na atividade das enzimas devido à conformação desfavorável e problemas difusionais. A imobilização de enzimas através de estruturas como as nanoflores é um método inovador, simples e de baixo custo quando comparado a outras técnicas. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi sintetizar nanoestruturas biocatalíticas híbridas, semelhantes a flores, das lipases de *Candida antarctica* tipo B (CALB) e de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). A produção das nanoflores ocorreu por precipitação das lipases com os sais Cloreto de Cobre (CuCl_2) e Sulfato de Cobre (CuSO_4). Após a síntese foram testadas duas condições: nanoflores entrecruzadas com glutaraldeído e nanoflores com nanopartículas entrecruzadas com glutaraldeído. Utilizou-se o glutaraldeído e as nanopartículas a fim de aumentar a estabilidade das nanoflores. A aplicação de um método de quantificação proteica foi investigada utilizando Bradford e absorção no ultravioleta. A atividade enzimática foi quantificada por hidrólise de p-nitrofenil butirato (pNPB). As nanoestruturas catalíticas foram avaliadas quanto à atividade catalítica, à estabilidade térmica e operacional e caracterizadas por corrida em gel de eletroforese e por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O melhor resultado foi das nanoflores com nanopartículas entrecruzadas com glutaraldeído, por precipitação de CuSO_4 . Estes imobilizados mostraram tempo de meia-vida de aproximadamente 3 horas e 50 minutos e mantiveram 70% da atividade por 10 ciclos e 60% em 5 ciclos com CALB e TLL, respectivamente. Por meio de eletroforese, observou-se a ligação da nanoestrutura com o glutaraldeído por diferença no padrão de bandas da enzima livre e das nanoflores. A imobilização também foi analisada através do FTIR, buscando detectar a presença das lipases e do agente reticulante nas nanoflores entrecruzadas. Este trabalho mostrou que é possível a produção de nanoflores das lipases mais estáveis e eficientes utilizando protocolos aprimorados, prevendo uma possível aplicação em diversas reações.

Palavras-chave: Nanoflores; Lipases; Glutaraldeído; Nanopartículas; CuSO_4 ; CuCl_2 .

ABSTRACT

Lipases are among the most used enzymes in biocatalysis. To improve the application of these enzymes, the strategy of enzymatic immobilization is used, which enables the reuse of the catalysts and increases their stability under the reaction conditions. Traditionally, immobilization is performed using supports, however, in some cases there is a decrease in enzyme activity due to unfavorable conformation and diffusion problems. Immobilization of enzymes through structures such as nanoflowers is an innovative, simple and low-cost method when compared to other techniques. In this context, the main objective of this work was to synthesize hybrid biocatalytic nanostructures, similar to flowers, of lipases from *Candida antarctica* type B (CALB) and from *Thermomyces lanuginosus* (TLL). The production of nanoflowers occurred by precipitation of lipases with Copper Chloride (CuCl₂) and Copper Sulfate (CuSO₄) salts. After the synthesis, two conditions were tested: nanoflowers cross-linked with glutaraldehyde and nanoflowers with nanoparticles cross-linked with glutaraldehyde. Glutaraldehyde and nanoparticles were used in order to increase the stability of nanoflowers. The application of a protein quantification method was investigated using Bradford and ultraviolet absorption. Enzyme activity was quantified by hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate (pNPB). The catalytic nanostructures were evaluated for catalytic activity, thermal and operational stability under the tested synthesis conditions and characterized by electrophoresis and Fourier- -transform infrared spectroscopy (FTIR). The best result was obtained by producing nanoflowers cross-linked with nanoparticles by CuSO₄ precipitation that showed a half-life time of approximately 3 hours and 50 minutes and maintained 70% of activity for 10 cycles and 60% for 5 cycles with CALB and TLL, respectively. By means of electrophoresis, the binding of the nanostructure with glutaraldehyde was observed by difference in the pattern of bands of the free enzyme and the obtained nanoflowers. The immobilization was also analyzed using the FTIR, detecting the presence of the functional groups of the enzymes and the cross-linking agent in the immobilized derivatives. This work showed that it is possible to produce more stable and efficient nanoflowers of lipases using improved protocols, predicting a possible application in several reactions.

Keywords: Nanoflowers; Lipases; Glutaraldehyde; nanoparticles; CuSO₄; CuCl₂.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) simulando o movimento de abertura da tampa	18
Figura 2	- Estrutura da Lipase de B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	19
Figura 3	- Esquema representando estratégias de imobilização	21
Figura 4	- Mecanismo de formação de nanoflores	24
Figura 5	- Esquema da síntese das nanoflores com inserção da etapa de reticulação ..	27
Figura 6-	- Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) e os resíduos Lisina	28
Figura 7	- Estrutura da Lipase de B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) e os resíduos Lisina	28
Figura 8	- Fluxograma dos processos de imobilização e caracterização dos nanocatalisadores formados	31
Figura 9	- Metodologia esquematizada da síntese das nanoflores	32
Figura 10	- Metodologia esquematizada do entrecruzamento das nanoflores	34
Figura 11	- Metodologia esquematizada das nanoflores e nanopartículas entrecruzadas com glutaraldeído	35
Figura 12	- Metodologia esquematizada da imobilização de enzimas solúveis em nanopartículas	36
Figura 13	- Precipitados azuis de nanoflores	44
Figura 14	- Efeito do glutaraldeído nas nanoflores	46
Figura 15	- Nanoflores com nanopartículas precipitadas por aproximação magnética ..	47
Figura 16	- Enzima glicose oxidase imobilizada em nanoflores com nanopartículas, entrecruzadas por glutaraldeído	47

Figura 17 – Estabilidade térmica a 60 °C das nanoflores sintetizadas a partir da lipase TLL	50
Figura 18 – Estabilidade térmica a 60 °C das nanoflores sintetizadas a partir da lipase CALB	51
Figura 19 – Estabilidade térmica a 60 °C dos imobilizados sem a formação de nanoflores	53
Figura 20 – Estabilidade operacional das nanoflores NF-MNP-GA-CuSO ₄	55
Figura 21 – Eletroforese das nanoflores de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	57
Figura 22 – Eletroforese das nanoflores de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	58
Figura 23 – FTIR das nanoflores (NF-C e NF-C-GA) de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	60
Figura 24 – FTIR das nanoflores (NF-T e NF-T-GA) de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	61
Figura 25 – Espectros entre o intervalo de 1800 e 1600 cm ⁻¹	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Quantificação dos resíduos lisina nas lipases de <i>Thermomyces lanuginosa</i> (TLL) e <i>Candida antarctica</i> (CALB)	27
Tabela 2	- Quantificação proteica das lipases pelo método de Bradford	39
Tabela 3	- Quantificação proteica da lipase TLL por absorção no UV	40
Tabela 4	- Atividade hidrolítica da lipase TLL	41
Tabela 5	- Quantificação proteica da lipase CALB por absorção no UV	41
Tabela 6	- Atividade hidrolítica da lipase CALB	42
Tabela 7	- Comparação da quantificação proteica usando soluções de mesma concentração em diferentes volumes	43
Tabela 8	- Parâmetros de imobilização e atividade das nanoflores	44
Tabela 9	- Parâmetros de imobilização e atividade das nanoflores antes e após entrecruzamento com o glutaraldeído	45
Tabela 10	- Parâmetros de imobilização e atividade das nanoflores e nanopartículas entrecruzadas por glutaraldeído	48
Tabela 11	- Parâmetros de imobilização e atividade sem a formação de nanoflores ...	49
Tabela 12	- Tempo de meia-vida a 60 °C dos biocatalisadores produzidos com as lipases TLL e CALB	54
Tabela 13	- Parâmetros de desativação térmica dos biocatalisadores produzidos com as lipases TLL e CALB	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato de cobre (II)
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
CuCl_2	Cloreto de cobre
CuSO_4	Sulfato de cobre
PDB	Protein Data Bank
UCSF	Universidade da Califórnia, São Francisco
GOx	Glicose oxidase
HRP	Enzima Horseradish peroxidase
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
GA	Glutaraldeído
pNPB	p-nitrofenil butirato
APTES	3-aminopropiltriétoxisilano
RPM	Rotação por minuto
FeCl_2	Cloreto Ferroso
FeCl_3	Cloreto Férrico
NH_4OH	Hidróxido de amônio
Fe_3O_4	Óxido de ferro (II, III)
BSA	Albumina do Soro Bovino
pNP	p-nitrofenol
HCl	Ácido clorídrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	NN,N-tetrametiletlenodiamina
NaBH_4	Borohidreto de sódio
LMW	Marcador molecular padrão de baixo peso
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GPTA	Laboratório do Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada

UFC	Universidade Federal do Ceará
NF-T-CuCl ₂	Nanoflor de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) com Cloreto de Cobre
NF-T-SO ₄	Nanoflor de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) com Sulfato de Cobre
NF-T-GA-CuCl ₂	Nanoflor de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) entrecruzada com glutaraldeído, com Cloreto de Cobre
NF-T-GA-CuSO ₄	Nanoflor de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) entrecruzada com glutaraldeído, com Sulfato de Cobre
NF-T-MNP-GA-CuCl ₂	Nanoflor de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) e nanopartículas magnéticas entrecruzadas com glutaraldeído, com Cloreto de Cobre
NF-T-MNP-GA-CuSO ₄	Nanoflor de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) e nanopartículas magnéticas entrecruzadas com glutaraldeído, com Sulfato de Cobre
T-MNP-GA	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) imobilizada em nanopartículas
NF-C-CuCl ₂	Nanoflor de <i>Candida antarctica</i> (CALB) com Cloreto de Cobre
NF-C-SO ₄	Nanoflor de <i>Candida antarctica</i> (CALB) com Sulfato de Cobre
NF-C-GA-CuCl ₂	Nanoflor de <i>Candida antarctica</i> (CALB) entrecruzada com glutaraldeído, com Cloreto de Cobre
NF-C-GA-CuSO ₄	Nanoflor de <i>Candida antarctica</i> (CALB) entrecruzada com glutaraldeído, com Sulfato de Cobre
NF-C-MNP-GA-CuCl ₂	Nanoflor de <i>Candida antarctica</i> (CALB) e nanopartículas magnéticas entrecruzadas com glutaraldeído, com Cloreto de Cobre
NF-C-MNP-GA-CuSO ₄	Nanoflor de <i>Candida antarctica</i> (CALB) e nanopartículas magnéticas entrecruzadas com glutaraldeído, com Sulfato de Cobre
C-MNP-GA	<i>Candida antarctica</i> (CALB) imobilizada em nanopartículas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Enzimas	16
2.2	Lipases	17
2.3	Estrutura das lipases	20
2.4	Imobilização enzimática	20
2.5	Imobilização de lipases	22
2.6	Nanoflores	23
2.7	Nanoflores de lipases	25
2.8	Glutaraldeído	26
2.9	Nanopartículas	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Materiais	31
4.2	Métodos	31
4.2.1	Síntese das nanoflores	32
4.2.2	Síntese das nanopartículas	32
4.2.3	Funcionalização das nanopartículas	32
4.2.4	Determinação da atividade hidrolítica	33
4.2.5	Quantificação das proteica	33
4.3	Preparação dos biocatalisadores	34
4.3.1	Nanoflores reticuladas	34
4.3.2	Nanoflores e nanopartículas reticuladas com glutaraldeído	35
4.3.4	Imobilização das enzimas solúveis em nanopartículas	35
4.4	Caracterização dos biocatalisadores	36

4.4.1	Estabilidade térmica	36
4.4.2	Estabilidade operacional	36
4.4.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
4.4.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	37
4.5	Parâmetros de imobilização	38
4.5.1	Rendimento de imobilização	38
4.5.2	Atividade recuperada	38
4.5.3	Retenção de atividade	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Quantificação proteica	39
5.2	Obtenção das nanoflores	43
5.3	Nanoflores entrecruzadas com glutaraldeído	45
5.4	Nanoflores e nanopartículas entrecruzadas com glutaraldeído	46
5.5	Imobilização das enzimas solúveis em nanopartículas	48
5.6	Caracterização das nanoflores	49
5.6.1	Inativação térmica	49
5.6.2	Estabilidade operacional	55
5.6.3	Eletroforese	56
5.6.4	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ...	59
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A demanda por catalisadores ecológicos cresce continuamente ao longo dos anos. As enzimas são catalisadores naturais, versáteis e sustentáveis (RAI *et al.*, 2018). Quando imobilizadas com um protocolo eficiente e apropriado, biocatalisadores com alta eficiência e performance são produzidos e aplicados em diversas áreas e reações.

A imobilização por precipitação em nanoflores híbridas têm atraído grande atenção devido às funcionalidades combinadas dos materiais orgânicos e inorgânicos, bem como sua preparação breve e ecológica (LIU *et al.*, 2018). A estrutura fornece uma grande superfície, o que aumenta amplamente a atividade catalítica. O constituinte inorgânico atua formando uma estrutura protetora para a composição orgânica, proporcionando às nanoflores alta estabilidade (LI *et al.*, 2020). Graças ao seu excelente desempenho, as nanoflores apresentam aplicação prática generalizada em diversas áreas biotecnológicas, incluindo biocatálise industrial, análises químicas e biológicas, síntese de produtos químicos, tratamento ambiental, fabricação de bioenergia, aplicação na bioquímica e na ciência farmacêutica com os biossensores (WEI *et al.*, 2016; SOMTUR *et al.*, 2016).

Um exemplo de aplicação destas nanoestruturas é na fabricação de bioenergia. Para esta finalidade, a lipase tem sido comumente empregada na produção de biodiesel, pois a síntese baseada em lipase é comparativamente simples, barata e limpa (JIANG, *et al.*, 2018). YU *et al.* (2018) fabricou biodiesel de óleo de girassol com eficiência de conversão de 96,5% com a lipase de pâncreas suína em nanoflores de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. A imobilização em nanoflor aumentou amplamente a reciclabilidade da lipase, mantendo 72,5% de atividade após 5 ciclos de reação.

As nanoflores, nanoestruturas híbridas orgânica-inorgânica, mostram excelentes oportunidades para incrementar significativamente as funções catalíticas das enzimas imobilizadas. Com isto, o presente trabalho tem como objetivo realizar a síntese de nanoflores híbridas das lipases de *Candida antarctica* tipo B (CALB) e de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) pelo método de co-precipitação com os sais inorgânicos Cloreto de Cobre (CuCl_2) e Sulfato de Cobre (CuSO_4) por meio de três metodologias, visando analisar a eficiência e particularidades destes métodos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos e desempenham as funções de acelerar e facilitar a ocorrência das reações. Os catalisadores atuam em quantidades mínimas, ditas catalíticas, criando um novo “caminho” de reação, para o qual uma menor energia de ativação, barreira que separa os reagentes dos produtos, é requerida (BORZANI *et al.*, 2001).

Além de reduzirem significativamente a energia de ativação, as enzimas apresentam elevada especificidade (SANTOS *et al.*, 2015). Outras características são: atuam em condições brandas de reação em relação a pH e temperatura, apresentam alta seletividade e especificidade (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2010). Todos esses atributos contribuem com o incremento da eficiência catalítica, com a redução do consumo energético do processo e a não formação de subprodutos indesejáveis (MATEO *et al.*, 2017).

A estrutura molecular enzimática é majoritariamente composta por uma parte proteica, podendo estar associada a outras moléculas como carboidratos e lipídeos (LEHNINGER, 2014). Nas enzimas o número de aminoácidos componentes de sua cadeia peptídica e a ordem em que eles se encontram, determinam a sua estrutura e conseqüentemente a forma de interação no meio reativo (JOÃO; ZANELLA, 2000). E graças à sua estrutura complexa, elas podem apresentar um alto grau de especificidade permitindo a seleção das reações que poderão ocorrer, ainda que milhares de compostos diferentes estejam presentes no meio reacional (BORZANI *et al.*, 2001).

As enzimas têm grande importância na área de biotecnologia. A utilização desses biocatalisadores como método alternativo aos métodos químicos em indústrias leva a uma tecnologia mais limpa, consumindo menos energia e provocando um menor impacto ambiental (MONTEIRO *et al.*, 2009). O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 10,69 bilhões em 2020 com projeção de crescimento anual de 6,5% de 2021 a 2028, sendo enzimas industriais responsáveis por uma participação nas receitas de mais de 55,0% em 2020 (RESEARCH AND MARKETS, 2021).

Exemplos da aplicação enzimática são encontrados nas indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica e de papel e celulose, por exemplo (MONTEIRO *et al.*, 2009). Devido a essa demanda e aplicabilidade, as enzimas representam um instrumento poderoso para que pesquisadores e indústrias encontrem soluções de tantos problemas vividos hoje pela sociedade.

2.2 Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, destacando-se entre as enzimas mais estudadas e com vasto potencial de aplicação industrial (BATISDA *et al.*, 1998).

No campo da biotecnologia, as lipases estão entre os biocatalisadores mais valorizados e sua importância foi estabelecida em indústrias de alimentos, detergentes, têxteis, farmacêuticos, energia e cosméticos (BHARATHI *et al.*, 2019; MARTÍNEZ-RUIZ *et al.*, 2018; NAVVABI *et al.*, 2018). A necessidade constante de lipase nos processos industriais a torna o terceiro maior grupo de enzimas com base no valor de mercado, depois das proteases e carboidrases (BASHEER *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-RUIZ *et al.*, 2018).

As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de cofatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato; iv) exibem uma alta enantiosseletividade; v) apresentarem grande disponibilidade e vi) são atuantes em um faixa de pH relativamente grande, entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a temperatura ambiente até 70°C (JAEGER, 1998; CASTRO *et al.*, 2004).

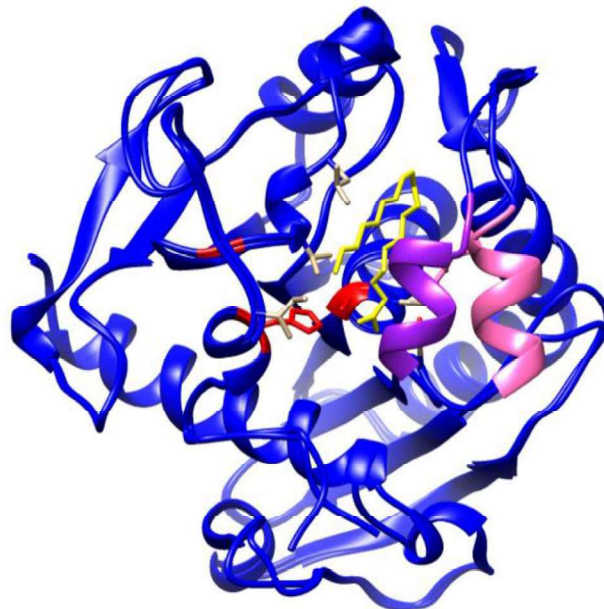
As enzimas selecionadas para este trabalho foram a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e a lipase B de *Candida antarctica* (CALB). As lipases foram as escolhidas dentre as enzimas existentes por apresentar o diferencial de ser a única das enzimas testadas, para a síntese de nanoflores, que não é uma metaloenzima mas que mostrou resultados eficientes de imobilização. Outra justificativa de escolha foi pelo fato dessas duas lipases serem alvo de estudo do grupo de pesquisa no qual este trabalho foi realizado, tendo assim bastante conhecimento sobre seu modo de ação.

A Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) é uma enzima basofílica e termoestável, possui massa molar de 31,7 kDa e 269 aminoácidos compõem sua estrutura (JHA *et al.*, 1999). Além da aplicação na indústria de alimentos prevista inicialmente, a enzima também encontrou aplicações na produção de biodiesel e em processos mais específicos da química fina (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2010). Sua estrutura primária foi depositada no banco de dados UniProt e pode ser encontrada por meio do código “O59952 (LIP_THELA)”. A estrutura primária de uma proteína corresponde a sua sequência de aminoácidos, a qual pode fornecer informações sobre as funções dessa proteína e como ela interage com outros componentes.

Como na maioria das lipases, a TLL possui uma cadeia peptídica chamada de tampa que recobre o sítio ativo, e de acordo com estudos cristalográficos de raios-X, essa tampa também é altamente móvel nos cristais, conseguindo assim, imagens da estrutura com tampa

aberta e fechada. O movimento da tampa é relatado na literatura como mecanismo de ativação interfacial, quando na presença de uma superfície hidrofóbica ocorre o movimento da tampa promovendo acesso do substrato ao sítio catalítico da lipase (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2010). A estrutura da Figura 1 mostra o alinhamento entre as estruturas aberta e fechada (em azul) da Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) por meio do software de visualização Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004). É possível ver o movimento da tampa da forma fechada, em roxo, para a forma aberta, em rosa. O sítio ativo aparece em vermelho e o ligante em amarelo.

Figura 1- Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) simulando o movimento de abertura da tampa.

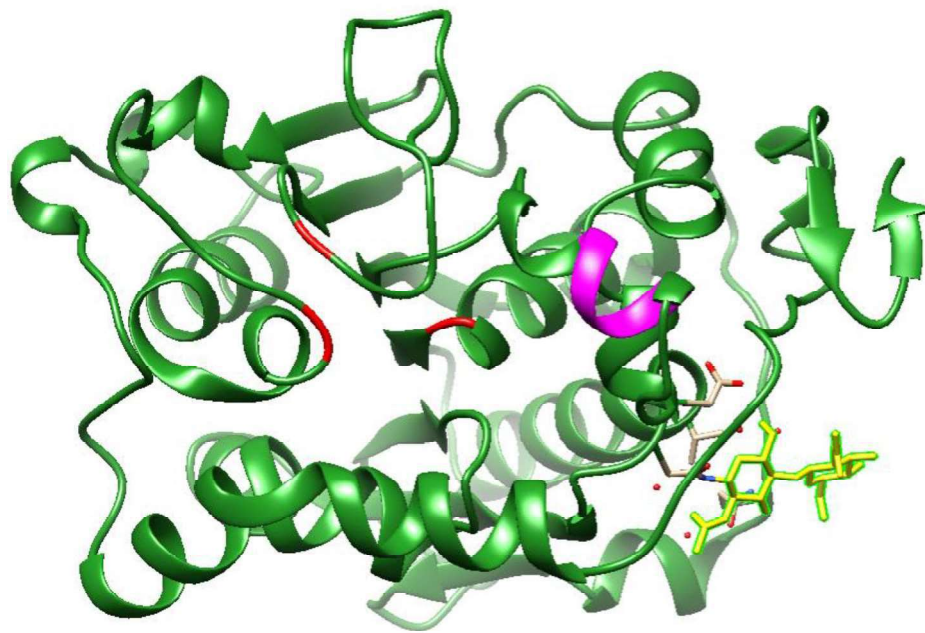


Fonte: Elaborada pela autora. Estrutura obtida a partir do Protein Data Bank (BERMAN *et al.*, 2000) utilizando o software Chimera UCSF. O código PDB para a TLL com tampa aberta 1GT6 (BRZOZOWSKI, 2000) é e com a tampa fechada é 1DT3 (YAPOUDJIAN *et al.*, 2002). Sítio ativo (vermelho); Ligante (amarelo); Tampa aberta (rosa); Tampa fechada (roxo). O código da sequência primária dessa estrutura no UniProt: O59952 (LIP_THELA).

Candida sp. é o microrganismo produtor de lipase mais proeminente entre as leveduras relatado na literatura (KUNDYS, 2017). A espécie *C. antarctica* produz duas lipases diferentes: lipase A e B. A Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é considerada uma das principais enzimas em biotecnologia devido a sua alta atividade catalítica na síntese orgânica e polimérica

e também tem sido bastante estudada quanto às estratégias de imobilização visando resultados ainda melhores nesses processos (LU, 2019). A estrutura tridimensional da lipase CALB foi relatada em 1994 por meio de cristalografia de raio-X, possui peso molecular de 33 kDa e é constituída por 317 aminoácidos (UPPENBERG *et al.*, 1994). Esta estrutura pode ser vista na Figura 2. A estrutura primária também foi depositada no UniProt com o código “P41365 (LIPB_PSEA2)”.

Figura 2 - Estrutura da Lipase de B de *Candida antarctica* (CALB).



Fonte: Elaborada pela autora. Estrutura obtida a partir do Protein Data Bank utilizando o software Chimera UCSF. O código PDB para a CALB é 1TCA (UPPENBERG *et al.*, 1994). Sítio ativo (vermelho); Ligante (amarelo); Tampa (rosa). O código da sequência primária dessa estrutura no UniProt: P41365 (LIPB_PSEA2).

A CALB apresenta uma tampa pequena e simples, que não isola totalmente o centro ativo do meio reacional (GALVIS *et al.*, 2012), sendo considerada inexistente para alguns autores, os quais também indicam que o mecanismo de ativação interfacial não ocorra com esta enzima.

Em relação a escolha das lipases CALB e TLL está relacionada justamente a essa diferença em sua morfologia. A diferença da presença e da ausência da tampa serviu como modo de observar como cada lipase iria se adaptar a formação das nanoflores.

2.3 Estrutura das lipases

A conformação e a estabilização da estrutura molecular das enzimas são asseguradas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes dissulfeto, ligações iônicas e forças de Van der Waals (LIMA *et al.*, 2001). A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima, depende da sua estrutura tridimensional, visto que esta pode ser afetada por condições ambientais como pH, temperatura, força iônica do meio (LIMA *et al.*, 2001). Um melhor entendimento da sequência de proteínas, de sua estrutura e das relações de função, permite uma melhor performance da enzima sem que ocorra interferências no processo de aplicação por características e funções naturais da enzima.

A determinação da estrutura da lipase através de técnicas de cristalografia revelou características como o sítio catalítico ser formado pela tríade catalítica Serina-Histidina-Aspartato/Glutamato e por esta tríade ser frequentemente protegida na molécula por uma "tampa" hidrofóbica. (BRADY *et al.*, 1990; REIS *et al.*, 2009).

De acordo com LIMA *et al.* (2001), apenas alguns resíduos aminoácidos participam diretamente da ação catalítica, embora cadeias de aminoácidos situadas próximas ao sítio catalítico tenham importante função de fixação e posicionamento da molécula de substrato. Outras sequências de aminoácidos têm importante papel de estabilização da estrutura tridimensional enzimática (LIMA *et al.*, 2001).

Um exemplo de resíduos relevantes na estrutura da enzima são os lisina. Segundo AHMAD *et al.* (2020), os resíduos de lisina são aminoácidos básicos carregados positivamente e frequentemente encontrados em superfícies de proteínas. Eles participam da estabilidade das proteínas por meio de várias interações, incluindo as formações de ligações de hidrogênio, interações iônicas e interação com moléculas de água (AHMAD *et al.*, 2020). Esses grupos são comumente utilizados para imobilizar a enzima em suportes.

2.4 Imobilização enzimática

Enzimas são estruturas frágeis, facilmente inativadas em condições extremas de pH e temperatura (MOHAMAD *et al.*, 2015; DATTA *et al.*, 2016). Além disso, para tornar o processo economicamente viável significa que, em muitos casos, elas devem ser reutilizadas, mas por serem solúveis e estarem em baixa concentração no meio reacional, a recuperação é inviável.

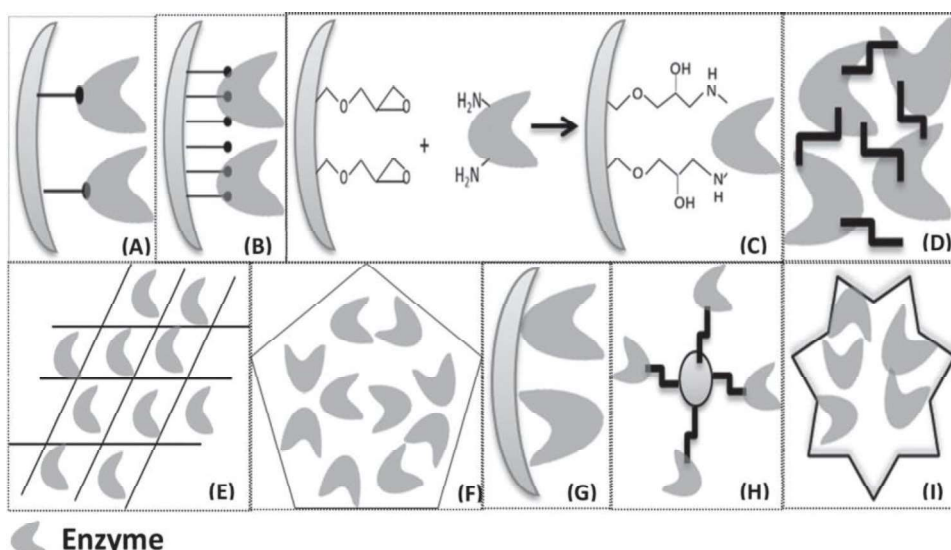
Esses inconvenientes podem ser contornados ou pelo menos minimizados com a imobilização enzimática. A imobilização enzimática tornou-se uma ferramenta poderosa na produção de biocatalisadores e tem sido aplicado na biotecnologia industrial com o objetivo de melhorar a economia dos processos (ALTINKATNAK *et al.*, 2016). Enzimas imobilizadas são

normalmente mais estáveis frente a temperatura e pH, podem ser facilmente recuperadas, conseguem ser reutilizadas em reações consecutivas e permitem fácil controle do processo pois há menos formação de subprodutos. (ZANIN *et al.*, 2004).

O principal objetivo do processo de imobilização é obter um biocatalisador estável que pode ser reutilizado várias vezes com uma perda mínima de atividade inicial (MATEO *et al.*, 2007). Para estabelecer um protocolo de imobilização adequado devem ser considerados os seguintes fatores: estabilidade da enzima; técnicas de imobilização; simplicidade do processo; custo; carga enzimática que será utilizada e as propriedades do grupo ativo utilizado para imobilizar a enzima e o da molécula da enzima (BOUDRANT *et al.*, 2019). Somente uma seleção adequada desses aspectos permite a elaboração de um protocolo de imobilização eficiente e com máximo proveito.

Os métodos de imobilização podem ser divididos em duas classes principais por meio do tipo de interação que será estabelecida com a enzima: métodos químicos e físicos (SOUZA *et al.*, 2017). Os métodos físicos mostram, normalmente, o confinamento físico de uma enzima dentro do suporte ou interações fracas e não covalentes entre a enzima e o suporte, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligação iônica. Os métodos químicos envolvem a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, como ligações éter, amida ou carbamato. A Figura 03 resume esquematicamente os métodos de imobilização existentes.

Figura 03 – Esquema representando estratégias de imobilização.



Fonte: REIS, 2019. (A) ligação covalente; (B) ligação covalente multiponto; (C) ligação covalente multiponto de uma enzima a um suporte funcionalizado; (D) imobilização de enzimas por reticulação; (E) aprisionamento em matriz; (F) encapsulamento; (G) imobilização por

adsorção; (H) formação de híbridos com nanopartículas magnéticas; (I) imobilização da enzima via mecanismo de formação de nanoflores híbridas.

Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações. Cada enzima possui suas características, os substratos também possuem diferentes propriedades, além das diversas aplicações dos produtos obtidos. Sendo assim existem algumas limitações que podem ser enfrentadas nos métodos de imobilização, como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que levem para uma forma inativa; perda da atividade catalítica e dessorção de moléculas de enzima do suporte; efeitos difusionais em decorrência de limitações do acesso de moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima e o custo da imobilização não ser compensado pela vida útil do biocatalisador (SOUZA *et al.*, 2017).

2.5 Imobilização de lipases

Em um trabalho publicado por PEREIRA *et al.* (2018), os termos “imobilização” e “lipase” estão entre os mais frequentemente (primeiro e quarto lugares, respectivamente) utilizados como palavras-chave para descrever estudos de imobilização enzimática nos entre os anos 1991-2017. Já em 2019, FACIN *et al.* (2019), em uma revisão da literatura entre os anos 1998-2018, relatou a existência de quase 5.000 trabalhos relatados pela Web of Science relacionados às lipases imobilizadas por diferentes métodos e suportes e esse número está continua aumentando.

Lipases podem ser imobilizadas pelos vários métodos já citados, não há um método único para as lipases. No entanto, algumas propriedades devem ser consideradas na busca de um método ou suporte ideal, por exemplo, hidrofobicidade, disponibilidade de grupo funcional reativo, inércia em relação às enzimas, biocompatibilidade, resistência ao ataque microbiano e alta estabilidade mecânica e química (MOHAMAD *et al.*, 2015).

Devido ao seu mecanismo de ativação interfacial, as lipases são mais comumente imobilizadas sobre superfícies hidrofóbicas (BASTIDA *et al.*, 1998; PALOMO *et al.*, 2002). A adsorção interfacial envolve regiões hidrofóbicas que circundam o sítio ativo da enzima e a face interna da "tampa", promovendo a adsorção da enzima em superfícies hidrofóbicas na sua conformação ativa (VERGER., 1997).

A imobilização em suportes hidrofóbicos tem a vantagem de ser uma técnica simples e eficaz pois não há a necessidade de realizar modificações químicas na lipase. A grande limitação dessa técnica é a reversibilidade das enzimas imobilizadas pela frágil interação com o suporte,

podendo ser facilmente liberada do suporte dependendo das condições de reação (MOHAMAD *et al.*, 2015; REHM *et al.*, 2016; HANEFELD *et al.*, 2009).

2.6 Nanoflores

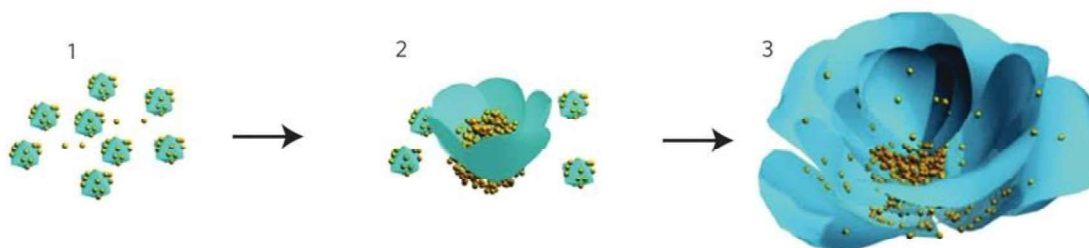
Um rápido crescimento na área de nanotecnologia ofereceu uma série de oportunidades para aplicação de materiais nanoestruturados. Alguns exemplos da aplicação dessa tecnologia são os materiais nanoestruturados híbridos com incorporação de proteína, promovendo regulação e melhora das funções biológicas das proteínas (WANG *et al.*, 2013). As aplicações potenciais em materiais funcionais para proteínas envolvem, por exemplo, catálise enzimática, tecnologia de “drug delivery”, biossensores e dispositivos bioanalíticos (MEENA *et al.*, 2021).

O nanomaterial fornece maior área de superfície, fácil adaptação do grupo funcional de superfície, limitação de transferência de massa reduzida e ajuste de características de tamanho e forma (MEENA *et al.*, 2021). Com isso, diferentes variações morfológicas desses materiais de suporte nanoestruturados, como partículas, fibras, tubos, membranas, fios, flores entre outros, têm sido formuladas para obter uma imobilização enzimática de alta eficiência e estabilidade (WANG *et al.*, 2013).

Na imobilização de enzimas, as nanoflores híbridas têm se tornado atrativas por sua simplicidade e eficiência. (GE *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2015; SOMTURK *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016). GE *et al.* (2012) mostrou que as proteínas podem ser incorporadas como parte de nanoestruturas orgânicas-inorgânicas. As nanoflores híbridas orgânico-inorgânicas foram descobertas por acidente quando CuSO_4 (120 mM) foi adicionado a uma solução tampão contendo 0,1 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) em pH 7,4 e 25 °C (GE *et al.*, 2012). Após três dias, foi obtido um precipitado azul com estruturas porosas semelhantes a flores, sendo nomeada nanoflores. Após esse trabalho, diferentes combinações de materiais de origem orgânica e inorgânica têm sido usadas para criar suportes híbridos ou compostos (MEENA *et al.*, 2021).

A formação das nanoflores acontece por meio de três etapas: nucleação, crescimento e conclusão, mostrado na Figura 04. No estágio inicial, o íon Cu^{2+} reage com grupos fosfato da solução tampão para formar cristais primários de fosfato de cobre. Em seguida, os cristais se ligam a grupos amina existentes no esqueleto da proteína para promover a nucleação de cristais primários.

Figura 04- Mecanismo de formação de nanoflores.



Fonte: GE *et al.* (2012). A formação compreende três etapas: (1) nucleação e formação de cristais primários; (2) crescimento de cristais; (3) formação de nanoflores. Esferas amarelas indicam moléculas de proteína.

A coordenação entre a proteína e o Cu^{2+} é a principal força motriz para a formação das nanoflores. Os átomos de nitrogênio dos grupos amida na estrutura da proteína e alguns resíduos de aminoácidos, como a histidina, podem formar complexos com Cu^{2+} .

No segundo estágio, o crescimento dos cristais é iniciado nos sítios de ligação do Cu^{2+} presente na superfície das proteínas. O crescimento ocorre continuamente por meio da combinação de agregados de cristais resultando na formação de nanopétalas (GE *et al.*, 2012). No estágio final, a formação é concluída por meio do crescimento anisotrópico, termo usado para materiais que possuem arranjos atômicos com propriedades físicas que variam ao longo das diferentes direções dentro do material, quase todos os cristais são considerados anisotrópicos (SUNAGAWA *et al.*, 2001). A proteína atua como uma estrutura para a formação dos cristais e das nanopétalas, como também age como uma "cola" para combinar as nanopétalas na formação de grandes aglomerados de proteína e dar origem as nanoflores (ALTINKATNAK *et al.*, 2016).

O funcionamento dessa metodologia pode ser compreendido pela existência de uma afinidade natural das enzimas com íons metálicos como cofatores além de, geralmente, mostrarem uma forte estabilidade quando são imobilizados na superfície do metal (DATTA *et al.*, 2012; JIA *et al.*, 2013).

As nanoflores apresentam características como: área de superfície aumentada, que alivia as limitações de transferência de massa, promove conformação enzimática favorável, enzimas localizadas na superfície das pétalas das nanoflores têm maior probabilidade de reagir com o substrato (ALTINKAYNAK *et al.*, 2016; CUI *et al.*, 2017). Essas vantagens são comumente apresentadas como limitações dos métodos tradicionais de imobilização.

GE *et al.* (2012) realizou a preparação de nanoflores α -lactalbumina, lacase, anidrase carbônica e lipase. As nanoflores obtidas revelaram maiores atividade catalítica e estabilidade comparadas a das enzimas livres e enzimas imobilizadas convencionalmente, apenas a atividade hidrolítica da lipase mostrou quase a mesma atividade (~95%) após a incorporação em nanoflores. As enzimas geralmente têm maior estabilidade após a imobilização, mas exibem atividades mais baixas em comparação com as enzimas livres, principalmente devido à perda de atividade durante o procedimento de imobilização e às limitações dos métodos de imobilização já apresentados.

O comportamento da lipase pode ser explicado por ser a única das enzimas citadas que não se classifica como metaloenzima, ou seja, que possui um íon metálico em sua estrutura, podendo ser um cofator no sítio ativo ou estar ligado a componentes não protéicos das enzimas (grupos prostéticos) (HOPPERT *et al.*, 2011). Contudo, o sucesso na obtenção de nanoflores de lipases revela que o método não se restringe apenas a metaloenzimas.

Outros grupos de pesquisa estudaram a preparação e caracterização de nanoflores híbridas usando diferentes enzimas e íons metálicos para diferentes fins. SOMTURK *et al.* (2015) utilizaram íons cloreto (Cl^-) e a enzima Horseradish peroxidase (HRP), analisando a morfologia e o desempenho da atividade das nanoflores sintetizadas.

As nanoflores de proteína têm aplicações promissoras em biossensores (MEENA *et al.*, 2021). A lacase é capaz de oxidar catecolaminas, hormônios de interesse farmacêutico e exames laboratoriais, em produtos do tipo coloridos detectáveis por métodos colorimétricos ou fluorescentes. Nanoflores com lacase alcançam oxidação por completo em 10 minutos, enquanto a reação demora cerca de 30 minutos com a enzima livre (GE *et al.*, 2012).

SUN *et al.* (2014). síntese de nanoflores duplas com o uso das enzimas: glicose oxidase (GOx) e Horseradish Peroxidase (HRP). A nanoflor dupla permitiu a reação em cascata em uma única etapa, sendo utilizados como sensores colorimétricos de alta sensibilidade para a detecção de glicose. SOMTURK *et al.* (2015) utilizou $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ e a enzima Horseradish Peroxidase (HRP) como um sensor para a detecção de dopamina, teste interessante para a indústria farmacêutica.

2.7 Nanoflores de lipases

As lipases também são utilizadas para preparação de nanoflores híbridas, sendo a síntese mais comum realizada em combinação com íons de cobre (LI *et al.*, 2020). Ajustando a fonte e dosagem de lipase, o solvente, o método de preparação, diversos trabalhos de nanoflores com

lipases foram relatados após o estudo inicial divulgado em 2012. (LEE *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; PAPADOPOULOU *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2014).

Nanoflores híbridas lipase pancreática suína contendo CuSO₄ foram relatados como um biocatalisador para a produção de biodiesel, um método econômico por serem reutilizáveis e altamente eficientes na conversão de óleo de girassol em biodiesel (JIANG *et al.*, 2018). Um outro registro da utilização de lipases para síntese de nanoflores foi a lipase ZC12, uma lipase adaptada ao frio derivada de *Psicrobacteres* sp., que quando incorporada a uma nanoflor de Ca²⁺ mostrou atividade de síntese de laurato de frutose duplicada (57,39%) em comparação com a forma livre da enzima (ZHANG *et al.*, 2020). HUA *et al.* (2016) relatou uma incorporação de 62% da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em nanoflores de CuSO₄, retendo 92% de sua atividade catalítica em comparação com a da lipase nativa e quase 100% de conversão de ácido oleico foi obtida pela catálise de nanoflores de lipase em tolueno a 50 ° C durante 0,5 h.

O palmitato de clindamicina é uma droga antibacteriana amplamente utilizada e comumente sintetizada por meio de métodos químicos que agridem o meio ambiente devido ao uso de solventes tóxicos. O palmitato de clindamicina foi eficientemente obtido com as nanoflores TLL-CaCl₂, com rendimento de reação de 70,0% a 30 °C e de 52,6% em alta temperatura (80 °C), na qual nenhum produto foi detectado ao usar lipase livre (WANG *et al.*, 2020). LI *et al.*, (2020) relataram uma boa estabilidade de armazenamento e capacidade de reutilização com as nanoflores da lipase *Aspergillus oryzae*. Todos esses trabalhos relatam o sucesso de obtenção e aplicabilidade das nanoflores incorporadas com lipase e foram utilizados como fonte de embasamento para o desenvolvimento deste estudo.

2.8 Glutaraldeído

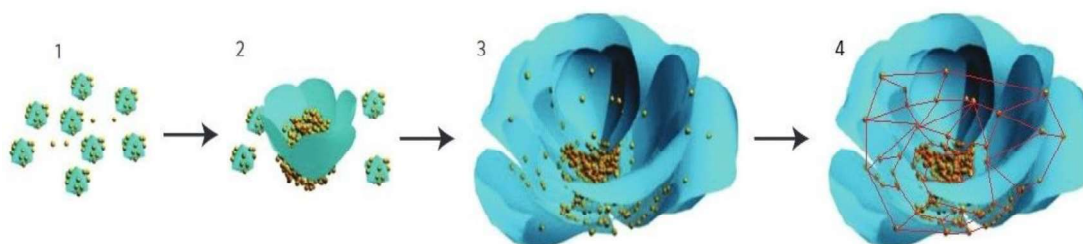
Embora as nanoflores híbridas enzimáticas inorgânicas apresentem atividade enzimática e estabilidade aprimoradas, geralmente não são aptas a uma reutilização eficiente, limitando a aplicação prática desse imobilizado.

A baixa capacidade de reciclagem das nanoflores tem sido atribuída principalmente à sua morfologia que pode ser fragilizada durante as etapas de centrifugação do processo de reciclagem (LEE *et al.*, 2017). Com isso, estratégias têm sido estudadas e aplicadas para reforçar as interações entre suas pétalas e promover o estabelecimento de uma estrutura mais resistente.

Na imobilização enzimática um bom exemplo de reagente utilizado para reticulação de proteínas é o glutaraldeído. A reticulação de proteínas, geralmente envolve o grupo ε-amino de resíduos lisina (WEETALL, 1974). A maioria das proteínas contém muitos resíduos de lisina,

geralmente localizados na superfície da proteína devido à polaridade do grupo amina. Além disso, os resíduos de lisina geralmente não estão envolvidos no sítio catalítico (AVRAMEAS, 1969), não afetando, assim, a ação catalítica. Desse modo, o glutaraldeído atuaria como uma cola de reforço, ligando firmemente as pétalas e, portanto, aprimorando a capacidade de reutilização por meio da preservação da conformação da proteína e de sua atividade biológica, ver Figura 05.

Figura 05- Esquema da síntese das nanoflores com inserção da etapa de reticulação.



Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de GE *et al.* (2012). As linhas vermelhas na etapa 4 simulam o entrecruzamento pelo glutaraldeído.

No entanto, as lipases não são enzimas ricas nesses resíduos, relatado na Tabela 01. Os grupos lisina correspondem a apenas aproximadamente 3% do total de aminoácidos presentes na sequência das lipases TLL e CALB. Por isso, em alguns casos, há uma ativação prévia por reagentes químicos para aumentar os pontos de interação possíveis.

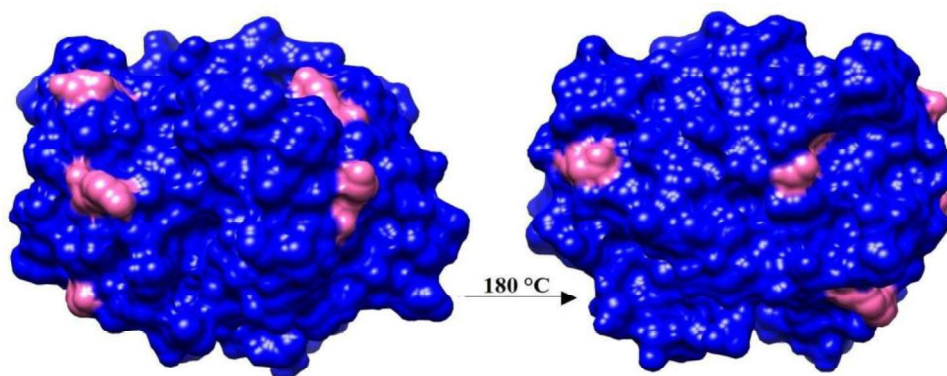
Tabela 01- Quantificação dos resíduos lisina nas lipases de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) e *Candida antarctica* (CALB).

Enzimas	Quantidade total de resíduos Lisina	% da composição total de aminoácidos
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i> (TLL)	8 aminoácidos	3 %
Lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	9 aminoácidos	2,8 %

Fonte: Elaborada pela autora com base em FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2010 para TLL e UPPENBERG *et al.*, 1994 para CALB. A porcentagem foi calculada por uma razão entre o número de grupos lisina e o número total de aminoácidos.

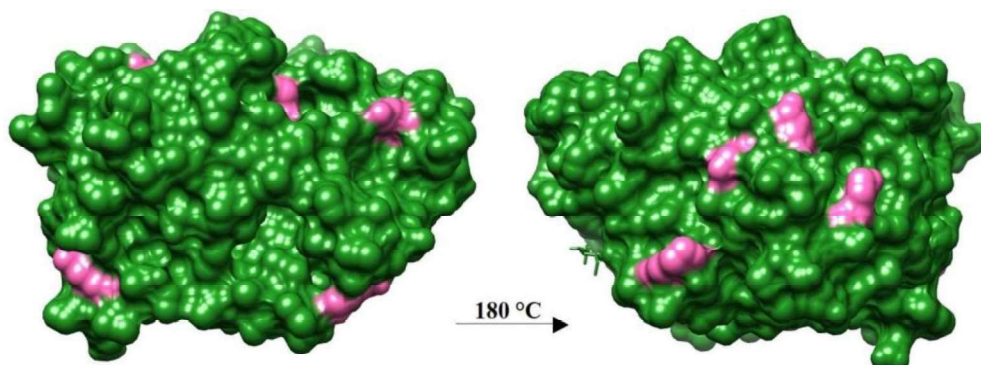
Apesar da baixa quantidade, esses grupos estão distribuídos na superfície das estruturas enzimáticas, facilitando o acesso desse alvo de ligação. Nas Figuras 06 e 07 utilizou-se o método de visualização de superfícies pelo software Chimera permitindo a observação do arranjo dos grupos Lisina na TLL e na CALB.

Figura 06 - Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e os resíduos lisina.



Fonte: Elaborada pela autora. Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em azul e os resíduos Lisina marcados em rosa. Estrutura obtida a partir do Protein Data Bank utilizando o software Chimera. Código PDB: 1DT3. TLL (azul); Lisina (rosa).

Figura 07 - Estrutura da Lipase de B de *Candida antarctica* (CALB) e os resíduos lisina.



Fonte: Elaborada pela autora. Estrutura da Lipase de B de *Candida antarctica* (CALB) em verde e os resíduos Lisina marcados em rosa. Estrutura obtida a partir do Protein Data Bank utilizando o software Chimera UCSF. Código PDB: 1TCA. CALB (verde); Lisina (rosa).

2.9 Nanopartículas

Outro aspecto limitante das nanoflores é a dificuldade em separação do sistema de reação reacional. A fragilidade das nanoflores híbridas e seu tamanho limita sua aplicação em umas reações contínuas, podendo ser destruída durante o processo de catálise e separação, além

de requerer consumo de energia extra, pois geralmente a separação ocorre por centrifugação (MICHELIN *et al.*, 2015).

A introdução de materiais magnéticos pode resolver o problema de separação, e a enzima imobilizada pode ser facilmente removida do fluido de reação pelo campo magnético externo sem danificar o material nanocatalítico composto (REN *et al.*, 2019).

As nanopartículas possuem características específicas como alta área de superfície, faixa de tamanho ajustável, fácil dispersão em meio aquoso com difusão mínima, portanto, são consideradas materiais de suporte eficientes para imobilização de enzimas (MEENA *et al.*, 2021). A magnetita (Fe_3O_4) é atualmente a mais comumente usada entre os vários nano-óxidos que exibem propriedades magnéticas (MAGDALENA *et al.*, 2018). Este material tem baixa citotoxicidade, boa biocompatibilidade e estabilidade em uma variedade de condições fisiológicas, sendo assim uma ótima alternativa para criar um sistema biocatalítico de matriz enzimática estável (KLAPISZEWSKI *et al.*, 2017).

Além de uma área de superfície maior, as nanopartículas magnéticas fornecem o benefício da abundância de grupos hidroxila em sua superfície, permitindo fácil modificação da superfície e ligação covalente (GALVÃO *et al.*, 2015). Amino silanos como (3-aminopropiltriétoxissilano - APTES) são os reagentes amino funcionais mais amplamente utilizados para a modificação de superfície das nanopartículas (LI *et al.*, 2010).

Na presença de um reagente bifuncional como o glutaraldeído (GA), as proteínas podem ser covalentemente ligadas ao grupo amino do nanocarreador para desenvolver um nanobiocatalisador magnético (SHAW *et al.*, 2006). O glutaraldeído reage com o grupo amino de APTES na superfície da nanopartícula, formando ligações do tipo imina. Com isso, os grupos aldeídos ficam livres para reagir com o grupo amino da enzima. (REBELO *et al.*, 2010). Além disso, de acordo com REBELO *et al.* (2010) as nanopartículas tratadas com glutaraldeído mostram maior capacidade de reutilização.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi a produção nanoestruturas biocatalíticas híbridas, semelhantes a flores, das lipases de *Candida antarctica* tipo B (CALB) e de *Thermomyces lanuginosus* (TLL).

3.1 Objetivos específicos

- Investigar a utilização de um método alternativo de quantificação proteica para acompanhar a imobilização das enzimas;
- Comparar três condições de síntese de nanoflores em relação a atividade catalítica;
- Avaliar as nanoflores obtidas quanto a estabilidade térmica e estabilidade operacional;
- Caracterizar os imobilizados em relação às alterações promovidas pela imobilização por meio da Eletroforese e Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

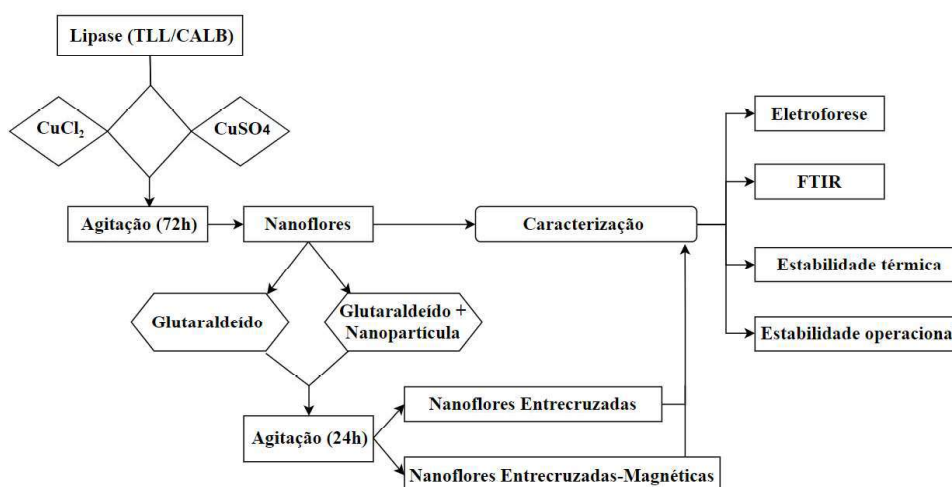
4.1 Materiais

A lipase solúvel de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (6,7 mg de proteína/mL) foi comercializada pela Sigma-Aldrich e a Lipase solúvel de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (15,83 mg de proteína/mL) adquirida junto à Novozymes (Espanha). O glutaraldeído, aplicado como agente de entrecruzamento, o butirato de paranitrofenil (pNPB), utilizado como substrato para determinação da atividade hidrolítica e o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), empregado na funcionalização das nanopartículas, foram comercializados pela Sigma-Aldrich. marcador de baixo peso molecular adquirido por GE Healthcare. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Métodos

As nanoflores são produzidas seguindo a metodologia descoberta por GE *et al.* (2012) com algumas alterações. Inicialmente, a solução de lipase com os sais inorgânicos é incubada por 72h. Em seguida as nanoflores são obtidas por precipitação. Para as demais condições, as nanoflores são incubadas por mais 24h em contato com glutaraldeído e/ou nanopartículas. A partir dessas nanoflores foi feita avaliação através do poder catalítico, como também uma caracterização. Todos esses processos estão reunidos na Figura 8 e serão detalhados nos próximos tópicos.

Figura 8- Fluxograma dos processos de imobilização e caracterização dos nanocatalisadores formados.

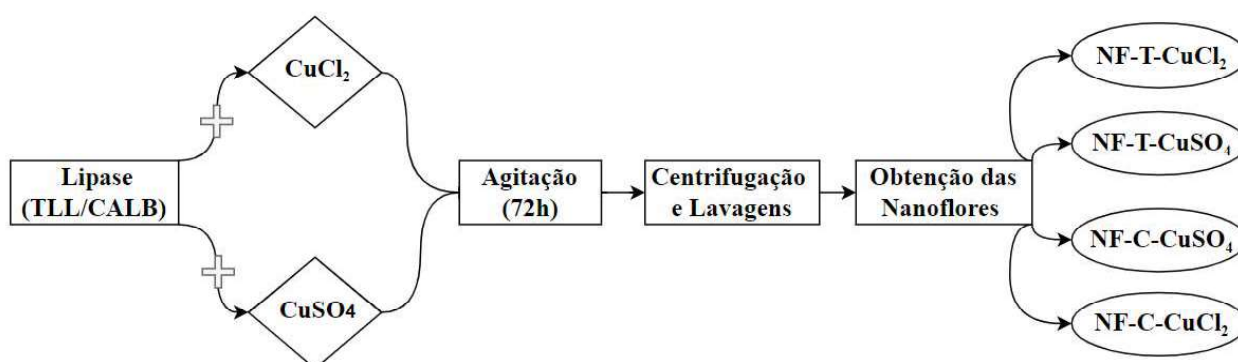


Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1 Síntese das nanoflores

A síntese de nanoflores foi conduzida de acordo com metodologia descrita na literatura (GE *et al.*, 2012), com modificações, ver Figura 9. 20 μL de soluções aquosas de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (120 mM) foram adicionados a 3 mL de solução enzimática (tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,4), contendo 1,5 mg / mL da lipase (CALB ou TLL). A mistura foi incubada em agitação a 25 ° C durante 72 horas. Após esse período realizou-se centrifugação (3500 rpm por 15 min) para a recuperação do precipitado formado.

Figura 09 - Metodologia esquematizada da síntese das nanoflores.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Síntese das nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas pelo método da co-precipitação, assistida por ultrassom (GALVÃO *et al.*, 2014). Cloreto Ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e Cloreto Férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 50 mL de água Milli-Q previamente ajustada para pH ácido. A mistura permaneceu sob vigorosa agitação de ultrassom por 9 minutos enquanto 10 mL de uma solução de Hidróxido de Amônio (NH_4OH) foram adicionados gota a gota para formação do precipitado de nanopartículas de Óxido de Ferro (Magnetita- Fe_3O_4). O precipitado foi lavado várias vezes com água ultrapura até que a solução residual atingisse o pH neutro, seguido pela secagem das nanopartículas em um dessecador.

4.2.3 Funcionalização das nanopartículas

Após a secagem, as nanopartículas de magnetita sofreram modificação de sua superfície pelo polímero APTES (3-aminopropiltriétoxissilano). Seguindo o procedimento de funcionalização de BEZERRA *et al.* (2017), 100 mg de magnetita foram suspensos em um béquer utilizando 20 mL de etanol, 20 mL de tolueno e 100 μL de APTES. Essa solução foi submetida a agitação ultrassônica vigorosa por 9 minutos para adsorção do APTES na

magnetita. Ao final da agitação, as nanopartículas funcionalizadas foram lavadas várias vezes com água ultrapura e armazenadas em um dessecador para secagem.

4.2.4 Determinação da atividade hidrolítica.

As atividades das enzimas solúveis e imobilizadas foram determinadas de acordo com a metodologia descrita na literatura por RIOS *et al.* (2016), com algumas alterações. O ensaio consistiu na quantificação espectrofotometricamente a 348 nm (ponto isobéstico de p-nitrofenol (pNP)), de p-nitrofenol (pNP), produto liberado na hidrólise do substrato p-nitrofenil butirato (pNPB) 50 mM em acetonitrila. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de solução de enzima à 50 µL de pNPB e 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7, sendo o fator da curva de calibração do pNPB de 0,1941 µmol/(mL.abs). Observou-se a quantidade de produto formado em 1,5 minutos, segundo a metodologia descrita por RIOS *et al.* (2013).

A atividade da lipase imobilizada contendo nanopartículas foi mensurada utilizando-se 0,25 mL de pNPB em contato com 10 mg do imobilizado em 12,75 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7 e 25 °C, mantido sob agitação mecânica durante por 12 minutos de acordo com a metodologia descrita por RIOS *et al.* (2013). com modificações. Realizou-se medidas pontuais do aumento da absorbância da solução durante o tempo de reação, de forma regular. Definiu-se 1 unidade de atividade catalítica da enzima como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de p-NPB por minuto.

A atividade do imobilizado (U/g ou U/mL) foi determinada pela inclinação da reta (α) em abs/minutos, fator da curva de calibração do pNPB (F) em µmol/mL.abs no valor de 0,1941, volume de reação (VR) em mL e a massa de nanopartículas (M) em g ou volume da amostra (VA) em mL, de acordo com a Equação 1:

$$(1) \text{Atv}_{Der.} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\alpha * F * VR}{VA}$$

$$\text{Atv}_{Der.} \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{\alpha * F * VR}{M}$$

4.2.5 Quantificação proteica

A concentração de proteína das enzimas solúveis e do sobrenadante foi medida usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A Albumina de Soro Bovino (BSA), na concentração de 0,1 mg/mL, foi usada como o padrão de proteína para a curva de calibração do microensaio. Para isso, 1 mL do reagente Bradford foi adicionado a 100 µL das amostras, deixando para reagir por 10 minutos na ausência de luz. Após esse período foram feitas as

leituras das amostras no comprimento de onda de 595 nm. O valor obtido na leitura em 595 nm foi usado para se obter a concentração e proteína de acordo com a Equação 2:

$$(2) y = 0,2199x + 0,0017$$

Também foi utilizado o método de quantificação pela absorção no ultravioleta. Este método é baseado na absorção das proteínas na região de 280 nm devido aos aminoácidos triptofano, tirosina e cisteína que possuem uma absorvidade molar significativa nessa faixa (GROVES, 1968; PACE 1995). Desse modo, também foi realizado a leitura das soluções enzimáticas e dos remanescentes no comprimento de onda de 280 nm, ver Equação 3:

$$(3) P = \frac{A_{280} * \text{Peso Molecular da proteína}}{\epsilon}$$

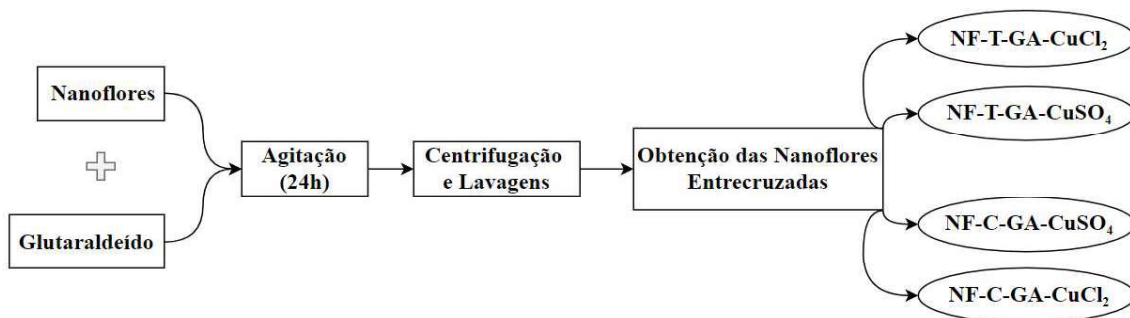
Sendo “ ϵ ” o coeficiente de absorvidade molar ($M^{-1} cm^{-1}$) da proteína. O valor desse coeficiente para a lipase CALB é de $41285 M^{-1} cm^{-1}$ (VAN TASSEL *et al.*, 2019) e para a TLL é de $43000 M^{-1} cm^{-1}$ (BARAUSKAS *et al.*, 2016). Em relação ao peso molecular de cada enzima, a CALB tem 33 kDa (UPPENBERG *et al.*, 1994) e a TLL 31,7 kDa (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2010).

4.3 Preparação de biocatalisadores

4.3.1 Nanoflores reticuladas

Os precipitados azuis obtidos na síntese de nanoflores foram ressuspensos (tampão fosfato de sódio 50 mM pH7) e nesta solução foi adicionado glutaraldeído (0,8% v/v). A mistura foi incubada em agitação a 25 °C durante 24 horas. Após esse período de tempo, realizou-se a centrifugação (3500 rpm por 15 min). O precipitado foi lavado (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) por centrifugação para retirar o glutaraldeído em excesso na solução. Logo após a lavagem o precipitado foi ressuspensado (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) para as medidas de atividade. Esse tópico foi representado na Figura 10.

Figura 10- Metodologia esquematizada de entrecruzamento das nanoflores.

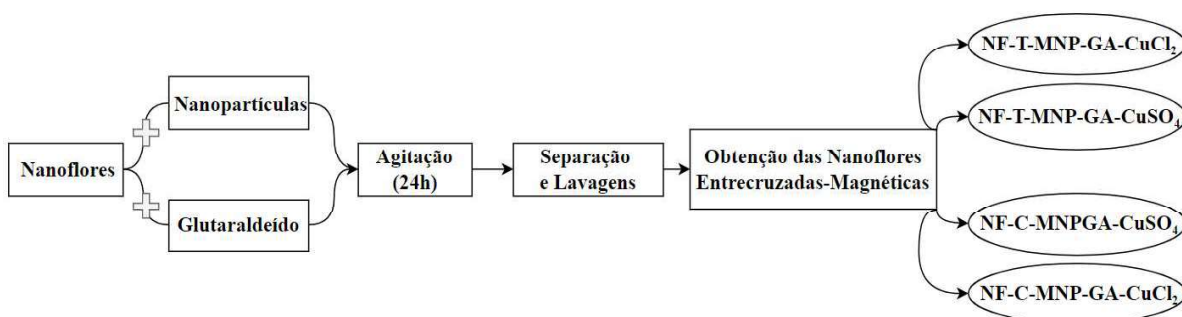


Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Nanoflores e nanopartículas reticuladas com glutaraldeído

Os precipitados azuis obtidos na síntese de nanoflores foram ressuspensos (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7) e nesta solução foi adicionado glutaraldeído (0,8% v/v) e 10 mg de nanopartículas (magnetita-Fe₃O₄-APTES). A mistura foi incubada sob agitação a 25 °C durante 24 horas. Em seguida, por campo magnético, o imobilizado (Figura 11) foi lavado (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) para remover o glutaraldeído em excesso na solução e, em seguida, ressuspensionado (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) para as medidas de atividade. Esse tópico foi esquematizado na Figura 11.

Figura 11- Metodologia esquematizada de entrecruzamento com nanopartículas.

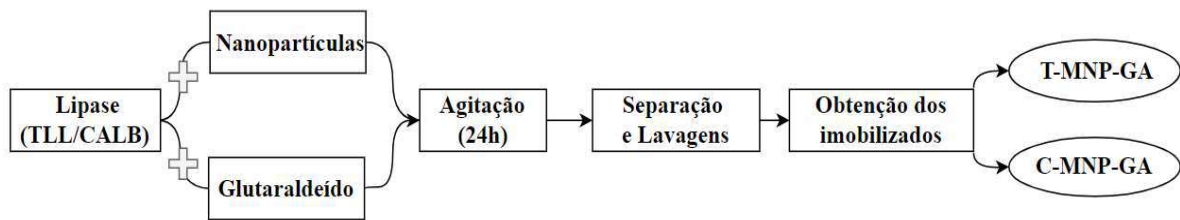


Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Imobilização das enzimas solúveis em nanopartículas

10 mg de nanopartículas (magnetita-Fe₃O₄-APTES) e glutaraldeído (0,8% v/v) foram adicionados a 3 mL de solução enzimática (tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,4), contendo 1,5 mg / mL da lipase (CALB ou TLL). A mistura foi incubada em agitação a 25 °C durante 24 horas. Em seguida, por campo magnético, o imobilizado obtido foi separado e lavado (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) para retirar o glutaraldeído em excesso na solução e ressuspensionado (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) para as medidas de atividade. Esse tópico foi esquematizado na Figura 12.

Figura 12 - Metodologia esquematizada da imobilização das enzimas solúveis em nanopartículas.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Caracterização dos biocatalisadores

4.4.1 Estabilidade térmica

A fim de comparar as estabilidades térmicas das nanoestruturas, os imobilizados foram suspensos em 3 mL (tampão Tris-HCl 25 mM em pH 7) na temperatura de 60°C para ambas lipases. Periodicamente, em intervalos de 1 hora, as atividades das amostras foram medidas usando p-NPB como substrato. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para cada imobilizado foi calculado de acordo com o modelo de SADANA; HENLEY, (1987) usando Microcal Origin versão 8.1. Para tanto, a atividade relativa (%) foi calculada tendo como 100% a atividade no ponto inicial (At_i), de acordo com a Equação 4.

$$(4) \text{Atv}_{Rel.} (\%) = \frac{Atr}{At_i} * 100$$

As curvas relacionando a atividade relativa ao tempo foram construídas no software Origin 8.5, utilizando um modelo de desativação enzimática de SADANA; HENLEY, (1987), segundo a Equação 5:

$$(5) y = 100 * ((1 - \alpha) * e^{-k*d*t}) + \alpha$$

Sendo “Kd” a constante de desativação térmica e “ α ” fração da enzima que perde atividade são parâmetros gerados pelo software, e as variáveis dependente e independente são a atividade relativa (Y) e o tempo (t), respectivamente. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado utilizando os parâmetros obtidos pelo software, através da Equação 6:

$$(6) t_{\frac{1}{2}} = \frac{-\ln \frac{(0,5 - \alpha)}{(1 - \alpha)}}{Kd}$$

4.4.2 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos biocatalisadores foi realizada por hidrólise de p-NPB (50 mM em acetonitrila) em tampão de fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0 e 25 ° C. Ciclos consecutivos de reação de hidrólise do p-NPB foram realizados com o mesmo biocatalisador e

recuperação foi realizada com o auxílio de um ímã. Entre os ciclos o imobilizado foi lavado (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) para retirar resquícios do substrato. Foi calculada a atividade relativa do biocatalisador em cada ciclo operacional, tomando como 100% a atividade do primeiro ciclo da reação de hidrólise.

4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os ensaios de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foram realizados de acordo com LAEMMLI, U.K. (1970). Os géis foram preparados na concentração de 12 % de poliacrilamida para o gel de separação e de 5% para o gel de concentração. O tampão de ruptura foi preparado e utilizado de acordo com a metodologia apresentada por GARCIA-GALAN *et al.* (2014) e adicionado às amostras, as quais foram aquecidas a 100°C durante 10 minutos. As amostras contendo glutaraldeído foram previamente reduzidas por uma solução 1 mg/mL de borohidreto de sódio (NaBH₄) para inativar a ação desse agente.

O marcador molecular padrão de baixo peso (LMW) foi utilizado como padrão no primeiro poço. O LMW é contido por misturas de fosforilase (97 KDa), albumina (66 KDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e lactoalbumina (14 KDa). Para análise de comparação, foi posto no segundo poço uma amostra contendo apenas a solução das lipases na concentração de 1,5 mg/mL. O gel foi submetido a uma voltagem constante de 110V em uma tetra-célula Miniprotean (Biorad) por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Após a corrida, foi feita a coloração com o reagente nitrato de prata no gel com TLL, conforme MORRISSEY (1981) e para CALB foi utilizado a coloração com o reagente Coomassie Blue.

4.4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Com a finalidade de investigar as mudanças provocadas com a formação das nanoflores, foram analisadas por espectroscopia no infravermelho todas as nanoestruturas catalíticas produzidas. Os dados de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um Perkin Elmer Spectrometer FTIR do Laboratório do Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada (GPTA) na Universidade Federal do Ceará (UFC). Para essas medidas, as amostras foram previamente suspendidas (tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,4), em seguida, os espectros foram coletados na faixa de 400 - 4000 cm⁻¹. Os gráficos foram gerados utilizando Microcal Origin versão 8.1.

4.5 Parâmetros de imobilização

4.5.1 Rendimento de imobilização

Determinou-se o rendimento de imobilização (%) pela diferença entre a atividade inicial da solução enzimática (At_i) e a atividade do remanescente ou sobrenadante (At_f), de acordo com a Equação 7. A atividade da enzima foi determinada a partir da descrição em 4.2.4.

$$(7) R (\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} * 100$$

O rendimento de imobilização (%) pela diferença entre a concentração proteica inicial da solução enzimática (P_i) e a concentração proteica do remanescente ou sobrenadante (P_s) pelo método de absorção no ultravioleta na região com comprimento de 280 nm, de acordo com a Equação 8:

$$(8) R (\%) = \frac{P_i - P_s}{P_i} * 100$$

4.5.2 Atividade recuperada

A atividade recuperada é a razão entre a atividade do imobilizado e a atividade teórica, sendo está a atividade total oferecida na solução de enzima subtraída da atividade encontrada no sobrenadante após a imobilização (Equação 9).

$$(9) Atv_{Teórica} (U) = Atv_{inicial} - Atv_{sobrenadante}$$

A atividade recuperada foi então calculada como uma porcentagem da atividade obtida em cada imobilizado em relação à atividade teórica, seguindo a Equação 10:

$$(10) Atv_{Rec.} (\%) = \frac{Atv_{Imobilizado}}{Atv_{teórica}} * 100$$

4.5.3 Retenção da atividade

A fim de comparar as condições de síntese de nanoflores foi estabelecida uma relação entre a atividade das nanoflores antes e após o tratamento com glutaraldeído e glutaraldeído com nanopartículas. O cálculo é uma razão entre a atividade do imobilizado que se quer comparar e a atividade das nanoflores, ver Equação 11:

$$(11) Retenção\ de\ atividade (\%) = \frac{Atv_{Imobilizado}}{Atv_{nanoflores}} * 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Quantificação proteica

Diversas publicações acompanham o curso de imobilização pela quantificação da proteína no sobrenadante (BOUDRANT *et al.*, 2019). A determinação de proteínas costuma ser realizada por métodos espectrofotométricos, estando o método de Bradford entre os mais utilizados (ZAIA *et al.*, 1988). Neste método, o corante Coomassie Blue interage com os aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas das proteínas, produzindo uma mudança na coloração do corante que é detectada no comprimento de onda de 595 nm (BRADFORD, 1976). Desse modo, realizou-se a quantificação proteica das soluções preparadas para síntese das nanoflores, sendo os resultados retratados na Tabela 2. A medição foi realizada em triplicata, correspondente a “Solução 1”, “Solução 2” e “Solução 3”.

Tabela 2 - Quantificação proteica das lipases pelo método de Bradford.

Amostras	Solução 1 (mg/ml)	Solução 2 (mg/ml)	Solução 3 (mg/ml)
NF-T-CuCl ₂	17,12	14,37	11,52
NF-T-CuSO ₄	16,24	20,09	14,04
NF-C-CuCl ₂	4,94	6,89	8,15
NF-C-CuSO ₄	8,48	4,28	7,16

Fonte: Elaborada pela autora. Análise realizada pelo método de microensaio, sendo as amostras de TLL diluídas 500 vezes e as de CALB 100 vezes (as diluições foram determinadas em um ensaio prévio).

Notou-se que através desse método ocorria uma grande instabilidade das absorbâncias obtidas após adição dos sais Cloreto de Cobre e Sulfato de Cobre. Um exemplo é a amostra NF-T-CuCl₂. As concentrações obtidas desta amostra foram bastantes discrepantes entre si, e o mesmo comportamento se repetiu para as demais amostras analisadas. Sendo assim, não foi possível estabelecer uma reprodutibilidade dos resultados com esse método.

Por este motivo, um novo método de determinação proteica foi testado. A absorção no ultravioleta foi escolhida como o método alternativo. Este método é baseado no fato de que as proteínas mostram absorção na região de 280 nm devido aos aminoácidos: fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina (ZAIA *et al.*, 1988). Essa técnica tem a vantagem de não ser destrutivo como o método de Bradford, além de não ser necessário o

preparo da amostra e nem tempo de reação, basta realizar a leitura em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm.

Ao fim da imobilização é esperado observar uma redução na quantidade de proteínas livres em solução, indicando que houve o aprisionamento das enzimas pela imobilização, considerando que o processo ocorreu nas condições ideais e não houve desativação da enzima (BOUDRANT *et al.*, 2019). Desse modo, foram realizados testes com as soluções das lipases preparadas para síntese das nanoflores.

A Tabela 3 relata os resultados de quantificação de amostras de TLL com os sais Sulfato de Cobre e Cloreto de Cobre pelo método de absorção no ultravioleta. Com a TLL foi possível notar uma queda na concentração de proteína do sobrenadante comparada à concentração inicial das soluções. Pela diferença da quantidade de proteína inicial e da proteína remanescente foi possível ter uma ideia de quanto das lipases foram precipitadas na forma de nanoflores. Na solução de TLL com CuCl_2 cerca de 70% foi imobilizado e na condição com CuSO_4 aproximadamente 66%.

Tabela 3 - Quantificação proteica da lipase TLL por absorção no UV.

Amostras	Concentração inicial (mg/mL)	Sobrenadante (mg/mL)	Rendimento (%)
NF-T-CuCl ₂	4,075 ± 0,145	1,185 ± 0,005	70,91%
NF-T-CuSO ₄	3,22 ± 0,06	1,155 ± 0,015	66,31%

Fonte: Elaborada pela autora. A medição ocorreu diretamente a partir da amostra, sem diluição ou adição de reagentes.

Além da medição da quantidade de proteínas totais, também foi quantificada a atividade enzimática dessas amostras, ver Tabela 4. Assim como na quantidade de proteínas, também é esperado que aconteça uma diminuição no valor da atividade, pois na solução sobrenadante restará apenas as enzimas não imobilizadas.

Como previsto, houve uma redução na atividade enzimática da solução remanescente comparada à solução inicial utilizada para imobilizar. A partir dessa diferença, também foi calculado um rendimento de imobilização através da atividade. A NF-T-CuCl₂ mostrou rendimento semelhante ao obtido por meio da quantidade de proteínas, e a NF-T-CuSO₄ apresentou rendimento superior, sendo este de 71,40%.

Tabela 4 - Atividade hidrolítica da lipase TLL.

Amostras	Atividade inicial (U/mL)	Sobrenadante (U/mL)	Rendimento (%)
NF-T-CuCl₂	619,45 ± 0,56	182,25 ± 0,76	70,58
NF-T-CuSO₄	543,73 ± 1,62	155,50 ± 1,5	71,40

Fonte: Elaborada pela autora. O pNPB (50 mM em acetonitrila) foi empregado como substrato para quantificação da atividade enzimática. A atividade da enzima foi determinada com a descrição em 4.2.4 e para medição da TLL a amostra foi diluída em 500 vezes.

Desse modo, um resultado estava confirmando o outro, indicando que este método poderia ser empregado em alternativa ao método de Bradford. E com isso os testes prosseguiram para a lipase CALB, sendo estes resultados expostos na Tabela 5.

Quando realizado a medição com a lipase CALB, também foi observado uma redução na concentração de proteínas comparando o início e o final do processo. Assim como para TLL, uma maior porcentagem de enzima foi imobilizada quando na presença de Cloreto de Cobre, com valor de 66,7 % para CuCl₂ e de aproximadamente 46% para CuSO₄.

Tabela 5 - Quantificação proteica da lipase CALB por absorção no UV.

Amostras	Concentração inicial (mg/mL)	Sobrenadante (mg/mL)	Rendimento (%)
NF-C-CuCl₂	1,246 ± 0,50	0,415 ± 0,046	66,7%
NF-C-CuSO₄	0,858 ± 0,01	0,464 ± 0,18	45,92%

Fonte: Elaborada pela autora. A medição ocorreu diretamente a partir da amostra, sem diluição ou adição de reagentes.

Contudo, quando foram realizadas as medidas de atividades destas mesmas soluções de CALB, foi observado que não houve mudanças comparado ao início do processo, mostrado na Tabela 6. Como não houve uma redução significativa na atividade mostra que a lipase em solução não formou as nanoflores.

Tabela 6 - Atividade hidrolítica da lipase CALB.

Amostras	Atividade inicial (U/mL)	Sobrenadante (U/mL)	Rendimento (%)
NF-C-CuCl₂	222,8 ± 0,3	221,2 ± 1,9	0,71
NF-C-CuSO₄	227,5 ± 2,3	223,5 ± 2,1	1,76

Fonte: Elaborada pela autora. O pNPB (50 mM em acetonitrila) foi empregado como substrato para quantificação da atividade enzimática. A atividade da enzima foi determinada com a descrição em 4.2.4 e para medição da CALB a amostra foi diluída em 100 vezes.

Enquanto houve uma redução na quantidade de proteínas, a atividade permaneceu a mesma ao final do processo, revelando uma contradição entre os resultados. A partir desta discordância, os resultados obtidos com a TLL perdem a confiabilidade, visto que a mudança na concentração de proteínas no processo de imobilização das nanoflores não necessariamente significou que a imobilização de fato aconteceu.

O método de absorção no UV, apesar de ser simples, rápido e fácil, tem a grande desvantagem de produzir “falsos” resultados, pois, qualquer substância presente na solução pode apresentar absorção na região de leitura, sendo assim um método muito sujeito a interferentes (ZAIA *et al.*, 1988). Por causa dessa desvantagem, esta metodologia é prioritariamente utilizada em processos de purificação de proteínas, na qual uma avaliação semi-quantitativa é suficiente, na maioria dos casos (ZAIA *et al.*, 1988).

Outro ponto observado foi a instabilidade dos resultados, exemplificado na Tabela 7. Esta tabela mostra os resultados de quantidade de proteínas de uma solução de mesma concentração, de proteína e de sal, variando apenas o volume total da solução. Mesmo mantendo a concentração, as soluções com maior volume da CALB mostraram resultados equivalentes a metade da concentração das soluções de menor volume. Os valores obtidos com a TLL não foram muito discrepantes, ao contrário dos observados com a CALB, nos quais com o aumento do volume há uma diferença considerável nos resultados obtidos.

Tabela 7 - Comparação da quantificação proteica usando soluções de mesma concentração em diferentes volumes.

Amostras	Volume 1,5 mL	Volume 6 mL/9mL
	Concentração (mg/mL)	Concentração (mg/mL)
NF-T-CuCl ₂	4,075 ± 0,145	3,181 ± 0,203
NF-T-CuSO ₄	3,22 ± 0,6	3,185 ± 0,7
NF-C-CuCl ₂	1,246 ± 0,5	0,622 ± 0,4
NF-C-CuSO ₄	0,858 ± 0,10	0,422 ± 0,5

Fonte: Elaborada pela autora. Os valores obtidos entre os volumes 6 mL e 9 mL foram aproximados, por isso foi calculado a média e o desvio padrão entre eles.

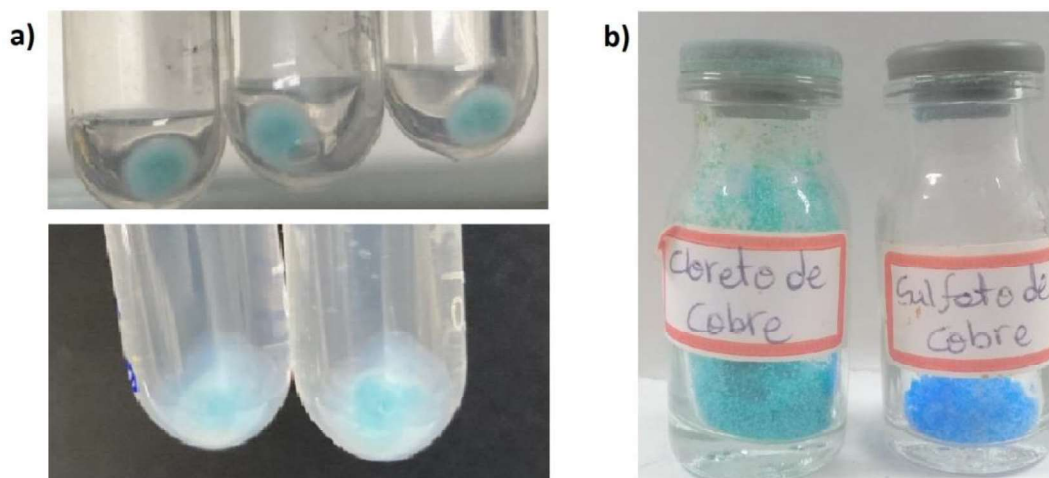
Por meio desses resultados é possível afirmar que o método de absorção em 280 nm também não é o método de quantificação proteico mais indicado para as nanoflores de CALB e TLL produzidas neste trabalho. Com isso, o curso da imobilização foi acompanhado e avaliado pela atividade catalítica das lipases. Segundo BOUDRANT *et al.* (2019), a medição das atividades do sobrenadante, da solução de referência e da solução imobilizada fornece uma realidade mais precisa do processo de imobilização. Nesse trabalho os autores apontam que apenas protocolos que garantem 100% de rendimento de imobilização podem ser acompanhados pela medida de proteínas, pois desse modo não há como o rendimento real da imobilização ser subestimado por algum interferente ou ocorra a imobilização outras proteínas que estejam no extrato que não seja a enzima de interesse (BOUDRANT *et al.*, 2019).

Desse modo, os próximos tópicos discutidos irão utilizar a atividade de hidrólise como parâmetro de avaliação dos catalisadores sintetizados.

5.2 Obtenção das nanoflores

Seguindo o protocolo de GE *et al.* (2012), as nanoflores foram obtidas e mensuradas quanto ao seu poder catalítico. As nanoflores são encontradas na forma de precipitados azuis devido a coloração dos sais utilizados na produção, mostrado na Figura 13.

Figura 13 - Precipitados azuis de nanoflores.



Fonte: Elaborada pela autora. a) Precipitados azuis obtidos ao fim da etapa de síntese das nanoflores. b) Reagentes utilizados, Cloreto de Cobre (CuCl_2) e Sulfato de Cobre (CuSO_4).

A Tabela 8 mostra os resultados dos parâmetros de imobilização para este ensaio. As nanoflores da Lipase CALB alcançaram maior rendimento de imobilização. Comparada à Lipase TLL, a CALB possui um grupamento lisina a mais disponível para a formação das nanoestruturas, relatado na seção Introdução, sendo este um fator que pode ter influenciado em uma melhor capacidade de hidrólise das nanoflores de CALB.

Tabela 8 - Parâmetros de imobilização e atividade das nanoflores

Biocatalisadores	Rendimento imobilização (%)	Atividade do Imobilizado (U)	Atividade recuperada (%)
NF-T- CuSO_4	56,98	$5,13 \pm 0,76$	11,86
NF-T- CuCl_2	52,78	$5,76 \pm 0,15$	14,74
NF-C- CuSO_4	79,70	$11,64 \pm 0,4$	7,52
NF-C- CuCl_2	72,39	$12,99 \pm 0,63$	8,70

Fonte: Elaborada pela autora. Atividade teórica (U) dos biocatalisadores: NF-T- CuSO_4 : 43,26; NF-T- CuCl_2 : 39,09; NF-C- CuSO_4 : 77,38; NF-C- CuCl_2 : 74,64. A imobilização foi realizada com 3 mL das amostras de concentração de 1,5 mg/mL das lipases misturadas à 20 μL das soluções de sais, as quais possuem concentração de 120 mM. O tampão fosfato de sódio pH 7,4, 100 mM foi utilizado no processo com duração de 72h a 25 °C, sob agitação constante.

A atividade recuperada estabelece uma relação entre a atividade aparente e a atividade real do imobilizado. Ou seja, a nanoflor de TLL precipitada com CuCl_2 , apresentou 14,74% de

enzima que foi imobilizada e que permaneceu ativa após o processo de imobilização, sendo esta a maior porcentagem entre as amostras.

5.3 Nanoflores entrecruzadas com glutaraldeído

Devido a sua morfologia delicada, têm-se estudado métodos de fortalecer a estrutura das nanoflores para que haja uma estabilidade da atividade imobilizada por mais tempo. Com isso, a Tabela 9 relata as atividades das nanoflores após o tratamento com glutaraldeído.

Em relação à atividade dos imobilizados, é possível observar uma diminuição da atividade após o glutaraldeído quando comparado com a atividade dos imobilizados que não passaram por esse tratamento. Essa comparação foi realizada por meio do parâmetro de retenção de atividade, que calculou o quanto de atividade dos imobilizados foi retida após esta etapa de entrecruzamento. Para os imobilizados da lipase TLL essa retenção foi em média de 60% para os dois imobilizados. A CALB apresentou melhor taxa de retenção da atividade após o glutaraldeído entrar em contato com as nanoflores. O melhor resultado foi obtido com as nanoflores de CALB precipitada CuCl_2 manteve 82,45% da atividade inicial da nanoflor obtida na primeira etapa.

Tabela 9 - Parâmetros de imobilização e atividade das nanoflores antes e após entrecruzamento com o glutaraldeído.

Biocatalisadores	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do Imobilizado (U)	Atividade recuperada (%)	Retenção de atividade (%)
NF-T-GA-CuSO₄	53,08	3,09 ± 0,38	7,300	60,23
NF-T-GA-CuCl₂	50,14	3,36 ± 0,65	8,566	58,33
NF-C-GA-CuSO₄	79,73	9,03 ± 0,82	8,194	77,57
NF-C-GA-CuCl₂	70,23	10,71 ± 0,21	9,856	82,45

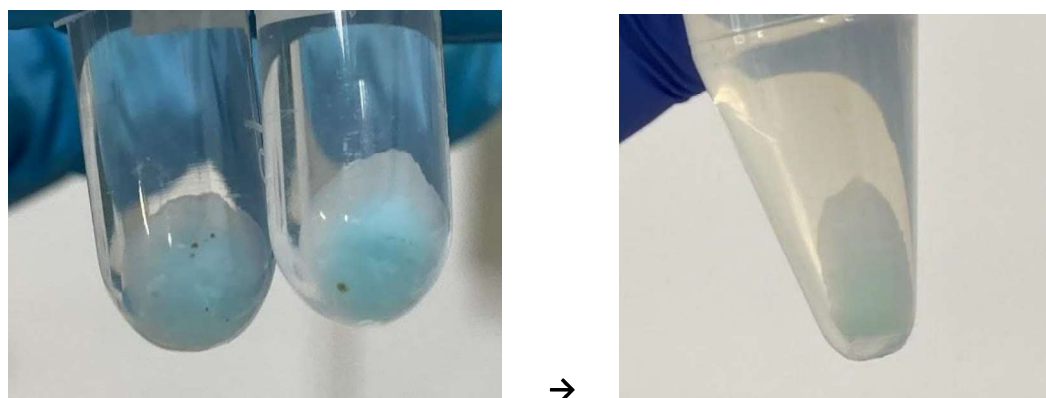
Fonte: Elaborada pela autora. Atividade teórica (U) dos biocatalisadores: NF-T-GA-CuSO₄: 42,33; NF-T-GA-CuCl₂: 39,225 ; NF-C-GA-CuSO₄: 110,205 ; NF-C-GA-CuCl₂: 108,66. A imobilização foi realizada adicionando glutaraldeído 0,8% v/v em 3 mL da solução de nanoflores. O tampão fosfato de sódio pH 7, 50 mM foi utilizado no processo com duração de 24h a 25 °C, sob agitação constante.

A redução da atividade inicial não significa um ponto negativo por completo. Segundo SHELDON (2010), a reticulação de moléculas enzimáticas geralmente leva a uma redução da atividade. A atividade será menor, no entanto, pode-se esperar que ela se mantenha mais estável (WANG *et al.*, 2014). Essa estabilização se dá pelas ligações que são estabelecidas entre as lipases confinadas nas nanoflores, que por promover uma interação mais forte, garante a manutenção da morfologia e da atividade alcançada por mais tempo (LEE *et al.*, 2017).

Contudo, por não ser um suporte sólido, as nanoflores ficam dissolvidas quando em solução, sendo necessário centrifugar todas as vezes que for realizada alguma aplicação. O precipitado tem características de massa gelatinosa e esse tipo de estado material pode dificultar a aplicação em processos reacionais. Além disto, as centrifugações constantes podem afetar a estrutura das nanoflores e refletir na diminuição ou perda total da atividade catalítica.

Um ponto observado após o período de 24 horas de incubação com glutaraldeído foi a diminuição da quantidade de massa e a diminuição da intensidade do tom azul dos precipitados, mostrados na Figura 14. A diminuição da massa é uma complicação, que ocorre inevitavelmente durante as lavagens por centrifugação e há perda de massa, um fator limitante que pode dificultar a aplicação prática.

Figura 14 - Efeito do glutaraldeído nas nanoflores.

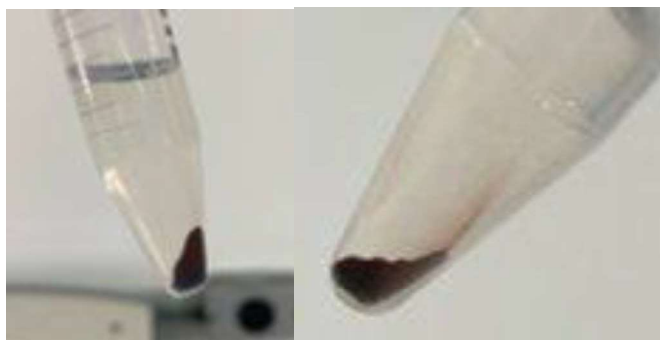


Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Nanoflores e nanopartículas entrecruzadas com glutaraldeído

As nanopartículas se inserem nas nanoflores promovendo maior facilidade no processo de separação do meio reacional, como também um aumento de massa facilitando a manipulação e aplicação desse imobilizado (LI *et al.*, 2016; SHAW *et al.*, 2006). A Figura 15 é uma representação dos imobilizados obtidos com nanopartículas e são facilmente separados do meio por campo magnético.

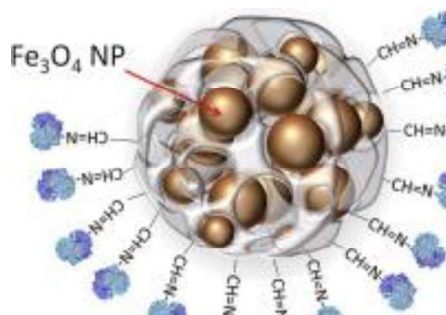
Figura 15 - Nanoflores e nanopartículas precipitadas por aproximação magnética.



Fonte: Elaborada pela autora.

Por meio da Figura 16 é possível ter um melhor entendimento de como ocorre a síntese desse imobilizado. Os grupos adicionados na superfície das nanopartículas de magnetita interagem com as lipases nas nanoflores e com o glutaraldeído, fazendo com que as nanopartículas sejam aderidas, e um novo imobilizado seja produzido.

Figura 16 - Enzima glicose oxidase imobilizada em nanoflores com nanopartículas, entrecruzadas por glutaraldeído.



Fonte: JAQUISH *et al.*, 2018. Em cobre a nanopartícula, o grupamento $-CH=N$ recobrindo a superfície por ação do APTES, enzima em azul.

Os resultados dos parâmetros dessa imobilização podem ser observados na Tabela 10. O rendimento de imobilização usando nanopartículas foi semelhante aos rendimentos da síntese de nanoflores e de nanoflores entrecruzadas com glutaraldeído, mantendo na faixa de 50% para a lipase TLL e 80% para a CALB.

Tabela 10 - Parâmetros de imobilização e atividade das nanoflores e nanopartículas entrecruzadas por glutaraldeído.

Biocatalisadores	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do Imobilizado (U)	Atividade recuperada (%)	Retenção de atividade (%)
NF-T-MNP-GA-CuSO₄	55,4	2,31 ± 0,44	5,35	32,12
NF-T-MNP--GA-CuCl₂	55,4	2,45 ± 0,56	4,74	31,00
NF-C-MNP-GA-CuSO₄	80	1,835 ± 0,32	1,41	15,76
NF-C-MNP-GA-CuCl₂	78,31	1,996 ± 0,77	1,57	15,37

Fonte: Elaborada pela autora. Atividade teórica (U) dos biocatalisadores: NF-T-MNP-GA-CuSO₄: 43,17; NF-T-MNP--GA-CuCl₂: 51,12 ; NF-C-MNP-GA-CuSO₄ 130,41 ; NF-C-MNP-GA-CuCl₂: 126,75. A imobilização foi realizada adicionando glutaraldeído 0,8% v/v e 10 mg de nanopartículas em 3 mL da solução de nanoflores. O tampão fosfato de sódio pH 7, 50 mM foi utilizado no processo com duração de 24h a 25 °C, sob agitação constante.

Apesar dos rendimentos de imobilização semelhantes, as nanoflores com nanopartículas não se mostram tão eficientes quanto a atividade dos imobilizados. Realizando a comparação por meio da retenção da atividade ao valor inicial de atividade das nanoflores, apenas uma média de 15% da atividade dos imobilizados com CALB se manteve do valor inicial das nanoflores. As nanoflores de TLL mostraram resultados melhores, de aproximadamente 30%, apesar de terem menor rendimento de imobilização que a CALB.

5.5 Imobilização das enzimas solúveis em nanopartículas

Buscando comprovar a contribuição das nanoflores no processo de imobilização e consequentemente, nas aplicações dos imobilizados, realizou-se uma imobilização sem a formação das nanoflores e os resultados foram comparados. Com isso, foi colocada a mesma solução enzimática utilizada para síntese das nanoflores, mas sem os sais, em contato com glutaraldeído e as nanopartículas por 24h. Após este período de tempo, foi medida a atividade do imobilizado e os parâmetros foram relatados na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros de imobilização e atividade sem a formação de nanoflores.

Biocatalisadores	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do Imobilizado (U)	Atividade recuperada (%)
T-MNP-GA	54,9	1,56	6,05
C-MNP-GA	66,97	1,15	2,98

Fonte: Elaborada pela autora. Atividade teórica (U) dos biocatalisadores: T-MNP-GA: 25,77. C-MNP-GA: 38,565. A imobilização foi realizada adicionando glutaraldeído 0,8% v/v e 10 mg de nanopartículas em 3 mL da solução enzimática. O tampão fosfato de sódio pH 7, 50 mM foi utilizado no processo com duração de 24h a 25 °C, sob agitação constante.

Apesar de ter apenas 24 horas de duração, essa imobilização apresentou rendimento similar ao rendimento de imobilização das produções de nanoflores. A TLL obteve 54,9% de rendimento, bem próximo da média de 50% alcançada pelas nanoflores, apenas a CALB que apresentou um resultado menor no valor de 66,97%, quando nas nanoflores esse valor é, geralmente, de 80%.

Embora a semelhança de rendimento, isto não refletiu na atividade. As atividades obtidas por esta imobilização foram inferiores a todas as atividades das nanoflores nas três condições testadas, dando destaque às condições de nanoflor e nanoflor após tratamento com glutaraldeído da lipase CALB, mostrados anteriormente nas Tabelas 8 e 9.

A nanoflor de CALB precipitada com CuSO_4 e CuCl_2 mostrou uma atividade 10 e 11 vezes maior, respectivamente, comparado à atividade do imobilizado de CALB obtido sem a formação das nanoflores. Relacionando com as nanoflores entrecruzadas com glutaraldeído, estas mostraram uma atividade 8 vezes maior comparada com a nanoflor com CuSO_4 e 9 vezes maior comparada com a de CuCl_2 . Estes resultados mostram que as nanoflores beneficiam a aplicação das enzimas, uma vez que promovem uma maior atividade catalítica.

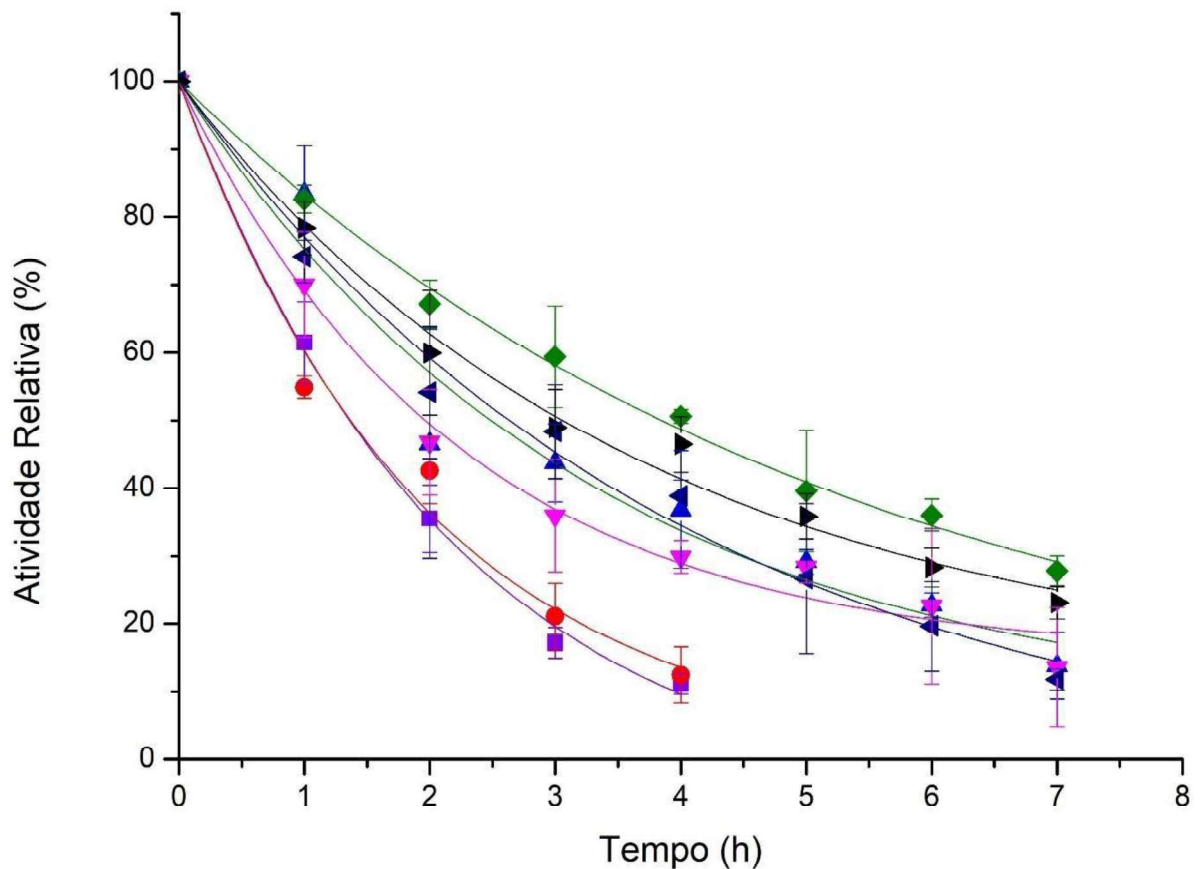
5.6 Caracterização das nanoflores

5.6.1 Inativação térmica

As nanoflores obtidas foram avaliadas quanto à estabilidade térmica a 60 ° C em comparação com a enzima livre quanto à estabilidade que a imobilização pode promover à enzima. O gráfico de decaimento da atividade enzimática da TLL e da CALB estão na Figura 17 e 18, respectivamente.

Os perfis de desativação entre as amostras de nanoflores e entre as amostras de nanoflores entrecruzadas com glutaraldeído da lipase TLL foram bastantes semelhantes, ver Figura 17. O tempo de meia-vida das nanoflores foi em média de 1 hora e 21 minutos, sem diferença de tempo considerável entre os sais CuSO_4 e CuCl_2 . Já entre os tempos de meia-vida das nanoflores após tratamento com glutaraldeído, há uma diferença de meia hora, sendo o imobilizado com o sal CuSO_4 o mais resistente aos efeitos da temperatura.

Figura 17 - Estabilidade térmica a 60 °C das nanoflores sintetizadas a partir da lipase TLL.



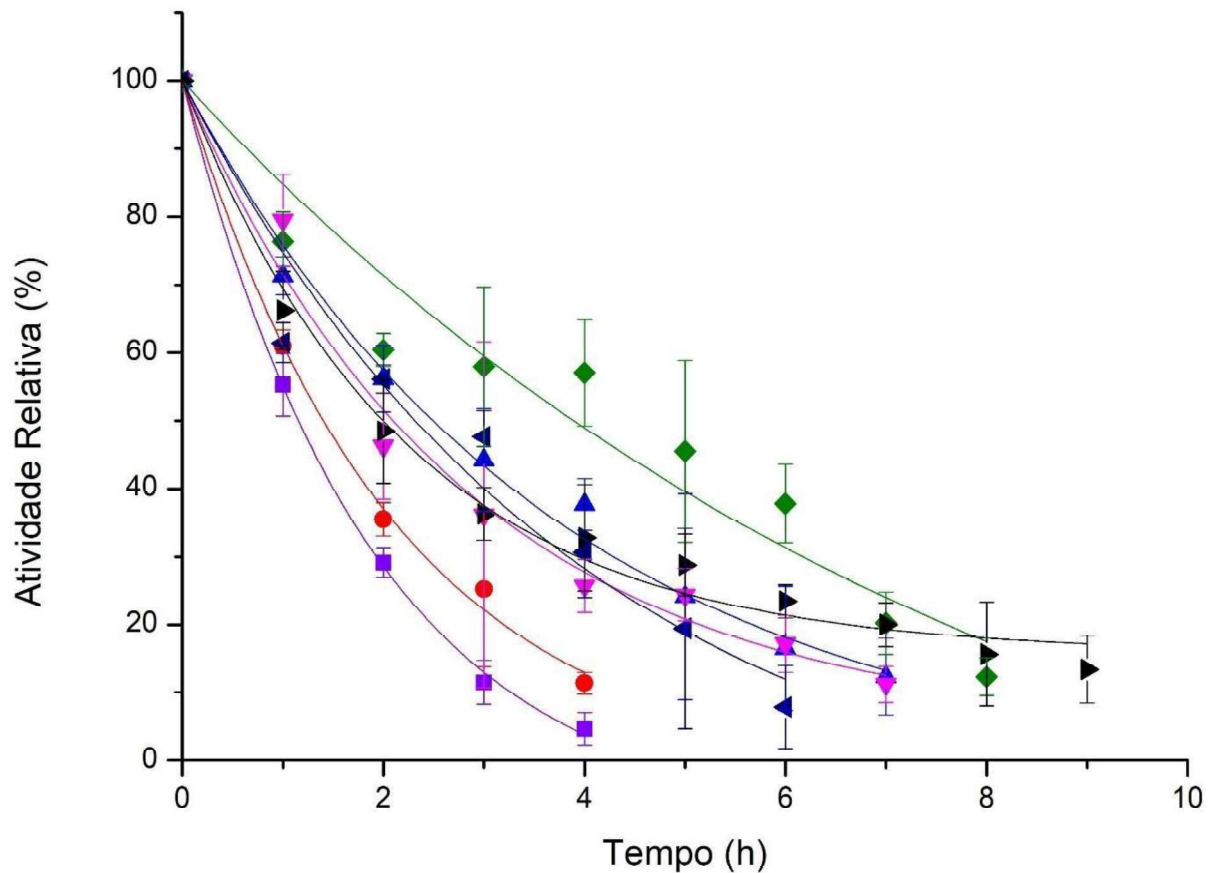
Fonte: Elaborada pela autora. ■ Violeta: NF-T- CuSO_4 ; ● Vermelho: NF-T- CuCl_2 ; ▲ Azul: N-T-GA- CuSO_4 ; ▼ Rosa: N-T-GA- CuCl_2 ; ◆ Verde: N-T-MNP-GA- CuSO_4 ; ► Azul escuro: N-T-MNP-GA- CuCl_2 ; ◄ Preto: Enzima livre. Neste ensaio os precipitados foram solubilizados em tampão tampão Tris-HCl 25 mM em pH 7 pré-aquecido a 60 °C. As amostras foram retiradas a cada uma hora, agitando antes de retirar a alíquota. Atividade inicial (U): NF-T- CuSO_4 : 5,95; NF-T- CuCl_2 : 5,66; N-T-GA- CuSO_4 : 3,5; N-T-GA- CuCl_2 : 3,65; N-T-MNP-GA- CuSO_4 : 2,31; N-T-MNP-GA- CuCl_2 : 2,45; Enzima livre: 12,37.

Contudo, é possível observar uma diferença significativa entre os as nanoflores com nanopartículas. Enquanto a nanoflor com CuCl_2 apresenta meia-vida de 2 horas e 37 minutos,

a com CuSO_4 supera o tempo de meia-vida da enzima solúvel alcançando um tempo de 3 horas e 53 minutos para decaimento de metade de sua atividade inicial.

Em relação aos imobilizados da Lipase CALB, também foi realizado ensaio de inativação térmica a $60\text{ }^\circ\text{C}$, ver Figura 18. Semelhante aos resultados obtidos com TLL, as nanoflores e as nanoflores entrecruzadas apresentaram perfis de desativação próximos, não sendo muito distante a diferença de tempo de meia-vida entre os sais CuSO_4 e CuCl_2 .

Figura 18 - Estabilidade térmica a $60\text{ }^\circ\text{C}$ das nanoflores sintetizadas a partir da lipase CALB.



Fonte: Elaborada pela autora. ■ Violeta: NF-C-CuSO₄; ● Vermelho: NF-C-CuCl₂; ▲ Azul: NF-C-GA-CuSO₄; ▼ Rosa: NF-C-GA-CuCl₂; ◆ Verde: NF-C-MNP-GA-CuSO₄; ▶ Azul escuro: NF-C-MNP-GA-CuCl₂; ◀ Preto: Enzima livre. Neste ensaio os precipitados foram solubilizados em tampão tampão Tris-HCl 25 mM em pH 7 pré-aquecido a $60\text{ }^\circ\text{C}$. As amostras foram retiradas a cada uma hora, agitando antes de retirar a alíquota. Atividade inicial (U): NF-C-CuSO₄: 14,90; NF-C-CuCl₂: 12,03; NF-C-GA-CuSO₄: 8,98; NF-C-GA-CuCl₂: 10,28; NF-C-MNP-GA-CuSO₄: 2,84; NF-C-MNP-GA-CuCl₂: 2,34; Enzima livre: 10,89.

A diferença na inativação térmica da CALB é que a enzima solúvel possui menor tempo de meia-vida comparado a TLL. Com isso as amostras de nanoflores entrecruzadas com glutaraldeído mostraram melhor estabilidade térmica que a enzima livre na condição testada, destacando a precipitada com CuSO_4 , que apresentou uma diferença de 38 minutos com o tempo de meia-vida da enzima solúvel.

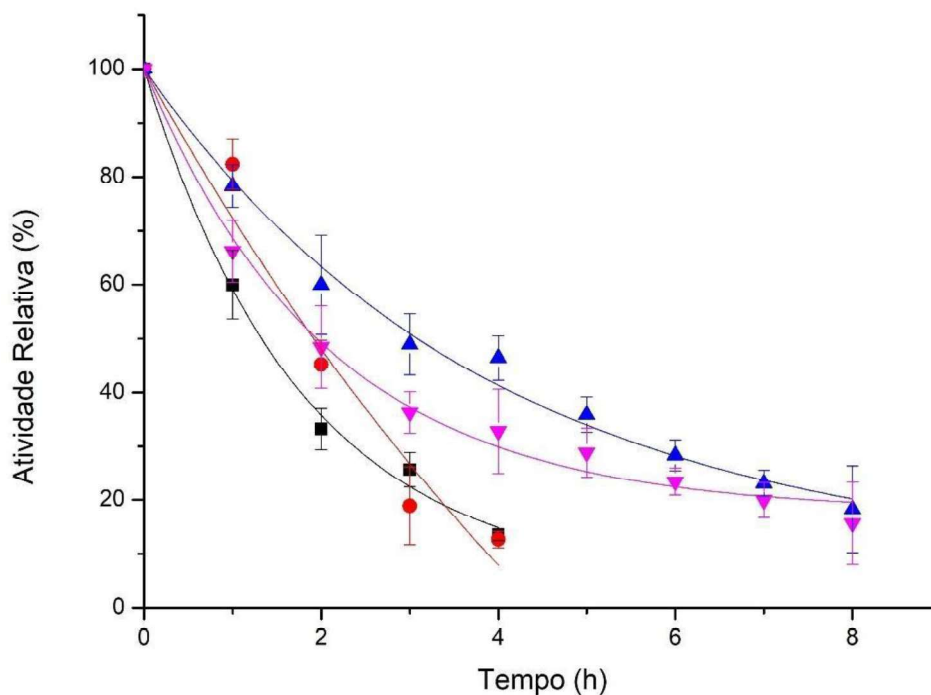
Um outro comportamento que se repetiu comparado ao ensaio da TLL foi das nanoflores entrecruzados com nanopartículas. Novamente, o imobilizado com CuSO_4 supera o tempo de meia-vida da enzima solúvel alcançando um tempo de 3 horas e 50 minutos para decaimento de metade de sua atividade inicial. A Figura 18 mostra o gráfico de inativação térmica dos imobilizados da Lipase CALB.

Os melhores resultados de estabilidade térmica com nanopartículas se justificam pela proteção que esse material fornece às enzimas. As nanopartículas funcionam como uma camada de proteção (LIU *et al.*, 2020), evitando que a enzima seja afetada mais lentamente pela temperatura. Com isso, a enzima mantém sua forma ativa por mais tempo e a desnaturação só ocorre após a inativação da enzima solúvel. A funcionalização dessas nanopartículas com o reagente APTES também contribui para maior estabilização, por meio do recobrimento que funciona como uma barreira contra a oxidação das nanopartículas pelo ar (REBELO *et al.*, 2010).

Porém, esse efeito ficou mais evidente apenas nas amostras com CuSO_4 . Há alguns trabalhos que relatam uma certa inibição da atividade da lipase na presença de CuCl_2 . Dong et al relatou uma redução drástica na atividade da lipase de *Bacillus sonorensis* (BSL) na presença de CuCl_2 , a redução foi de 13% da atividade da lipase de *Bacillus stearothermophilus L1* para KIM *et al.* (1988). A inibição da BSL pelo Cu^{++} , pode ser devido às mudanças trazidas pelo íon metálico na solubilidade e no comportamento das interfaces hidrofóbicas, afetando as propriedades catalíticas da enzima (DONG *et al.*, 1999). Com base nisso, algum efeito provocado pelo CuCl_2 pode estar afetando a atividade desse imobilizado mesmo com a proteção das nanopartículas.

Buscando, outra vez, comprovar a contribuição das nanoflores no processo de imobilização, também foi realizado o ensaio de estabilidade térmica da enzima imobilizada diretamente sob as nanopartículas, ver Figura 19.

Figura 19 - Estabilidade térmica a 60 °C dos imobilizados sem a formação de nanoflores



Fonte: Elaborada pela autora. ■ Preto: C-MNP-GA; ● Vermelho: T-MNP-GA; ▲ Azul: Enzima solúvel TLL; ▼ Rosa: Enzima CALB. Neste ensaio os precipitados azuis foram solubilizados em tampão Tris-HCl 25 mM em pH 7 pré-aquecido a 60 °C. As amostras foram retiradas a cada uma hora, agitando antes de retirar a alíquota. Atividade inicial (U): T-MNP-GA: 1,628; C-MNP-G: 1,42; Enzima livre (CALB): 10,89; Enzima livre (TLL): 12,37.

O imobilizado com TLL obteve tempo de meia-vida de 1 hora e 46 minutos e o da CALB de 1 hora e 20 minutos. Esses resultados só superam as amostras de nanoflores, sendo inferiores às amostras entrecruzadas e as com nanopartículas. Apesar do período de imobilização ser bem menor ao de síntese das nanoflores, essa maior resistência à inativação térmica das amostras sem a formação de nanopartículas pode ser devido a presença das nanopartículas que oferecem uma proteção extra as enzimas, resultado em uma maior resistência aos efeitos da temperatura.

A tabela 12 resume os tempos de meia-vida obtidos nos ensaios de inativação térmica dos imobilizados e das enzimas solúveis. A tabela 13 reúne os parâmetros calculados por meio do modelo de SADANA; HENLEY, (1987) para determinar o tempo de meia-vida dos biocatalisadores e da enzima livre na desativação térmica.

Tabela 12 - Tempo de meia-vida a 60 °C dos biocatalisadores produzidos com as lipases TLL e CALB.

Biocatalisadores	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)	
	TLL	CALB
Enzima livre	2h 57min.	1h 50 min.
NF-CuSO ₄	1h 20 min.	1h 10min.
NF-CuCl ₂	1h 22 min	1h 25 min
NF-GA-CuSO ₄	2h 31 min.	2h 28 min.
NF-GA-CuCl ₂	2h 02 min.	2h 03 min.
NF-MNP-GA-CuSO ₄	3h 53min.	3h 50 min.
NF-MNP-GA-CuCl ₂	2h 37 min.	2h 18 min.
MNP-GA	1h 46 min.	1h 20 min.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 13 - Parâmetros de desativação térmica dos biocatalisadores produzidos com as lipases TLL e CALB.

Biocatalisadores	TLL		CALB	
	Kd	α	Kd	α
Enzima livre	0,3006	0,1531	0,46529	0,16038
NF-CuSO ₄	0,4612	-0,07308	0,5296	-0,09304
NF-CuCl ₂	0,5149	0,01017	0,4809	-0,01907
NF-GA-CuSO ₄	0,2858	0,02657	0,2698	-0,02127
NF-GA-CuCl ₂	0,4009	0,10361	0,354	0,0457
NF-MNP-GA-CuSO ₄	0,1387	-0,19855	0,1213	-0,032785
NF-MNP-GA-CuCl ₂	0,2511	-0,03322	0,25332	-0,12642
MNP-GA	0,1287	-1,28725	0,04891	0,16038

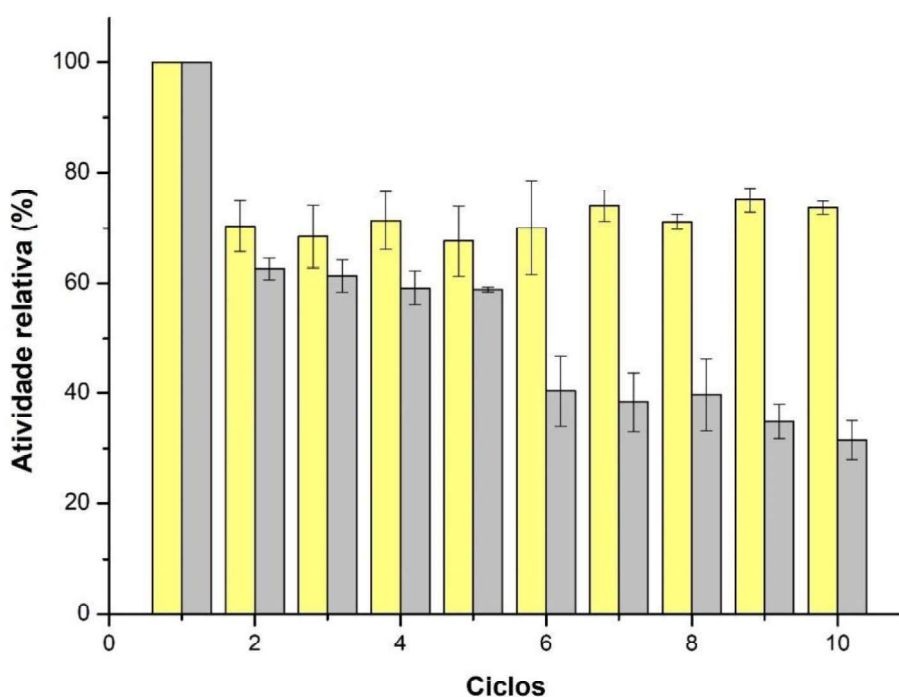
Fonte: Elaborada pela autora. Parâmetros do modelo de SADANA; HENLEY, (1987) para a desativação térmica dos biocatalisadores e da enzima livre.

5.6.2 Estabilidade operacional

Em razão do resultado obtido no ensaio de estabilização térmica com ambas as lipases nas nanoflores entrecruzadas com nanopartículas de CuSO_4 , esses imobilizados foram selecionados para realizar o ensaio de estabilidade operacional. Dessa forma, os imobilizados foram submetidos a reações consecutivas de hidrólise do substrato pNPB, com a expectativa de analisar o potencial de reutilização dessas nanoflores. O parâmetro utilizado foi o de atividade relativa, tendo como 100% a atividade no ponto inicial. Os resultados dos ciclos estão no gráfico da Figura 20.

A performance dos imobilizados com CALB se mostrou maior e mais consistente por um maior número de ciclos. Após o primeiro ciclo, houve uma queda de aproximadamente 30 % da atividade desse imobilizado, no entanto, a atividade restante se manteve constante até o final do 10º ciclo, finalizando com 73,57 % da atividade inicial. A amostra de TLL também teve redução na sua atividade após o primeiro ciclo, com uma queda mais acentuada de aproximadamente 40%. Após essa queda, a atividade se manteve até o 5º ciclo, este com 58,39% da atividade inicial. Depois desse ciclo, ocorreu uma queda de mais 20%, aproximadamente, mas novamente a atividade se manteve consideravelmente estável, terminando o 10º ciclo com 31,53% de sua atividade inicial.

Figura 20 - Estabilidade operacional das nanoflores NF-MNP-GA- CuSO_4



Fonte: Elaborada pela autora. Amarelo: NF-C-MNP-GA- CuSO_4 ; Cinza: NF-T-MNP-GA- CuSO_4 . O ensaio foi realizado por ciclo de hidrólise do substrato pNPB. Após cada ciclo era

realizada a lavagem do imobilizado com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, com a ajuda de um ímã, para remoção do substrato que esteve em contato com o imobilizado durante o ciclo. Atividade inicial (U): CALB: 2,32 e TLL: 1,68.

O ensaio de estabilidade operacional também foi testado com as demais nanoflores produzidas, no entanto não houve sucesso. Com as nanoflores, após o primeiro ciclo, ocorreu uma grande queda de atividade, de aproximadamente 50%, e perda significativa da massa após as lavagens por centrifugação. Com isso, no terceiro ciclo houve perda total da atividade. Em relação às nanoflores entrecruzadas, sua massa inicial reduzida torna inexecutável realizar os ciclos por causa da perda de massa que ocorre nas lavagens depois de cada ciclo para remoção do substrato.

Com esse resultado, as nanoflores com nanopartículas de CALB se tornam uma ótima candidata para aplicação nas mais diversas áreas de processos industriais que as enzimas se inserem. Mais estudos e análises desse imobilizado seria o ideal para que essas propriedades sejam confirmadas e ocorra de fato a aplicação prática.

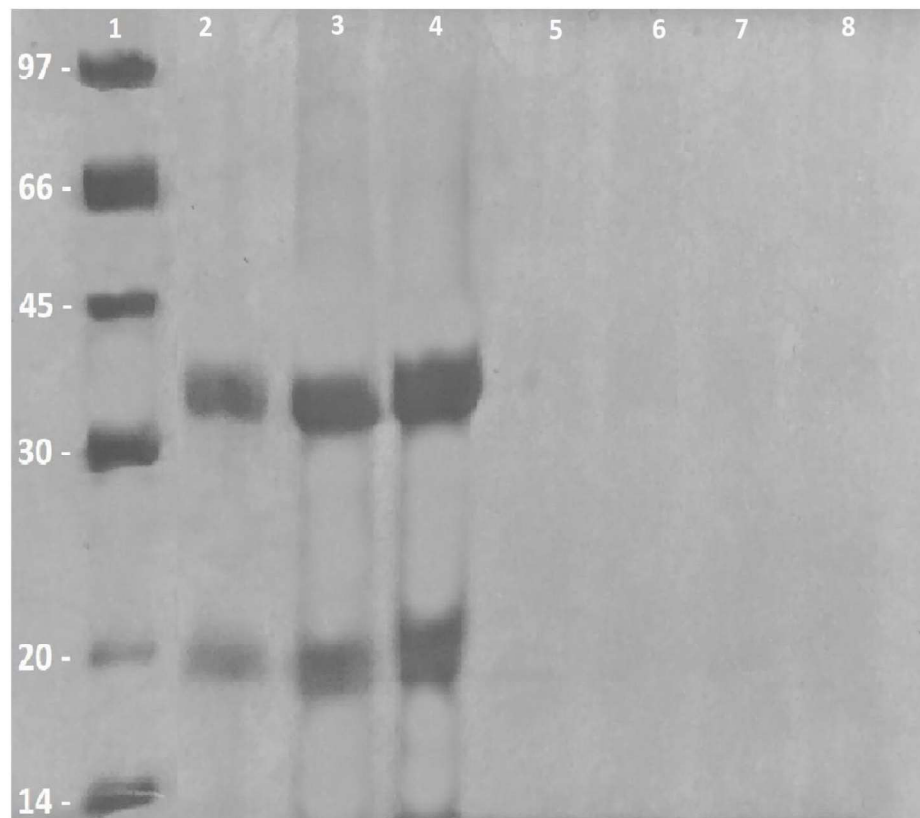
5.6.3 Eletroforese

Para realização da corrida em gel de eletroforese, as amostras de enzimas imobilizadas foram inativadas a 100 °C na presença de tampão de ruptura. Esta condição de inativação libera para o meio todas as lipases que estão interagindo por alguma ligação fraca, como interações hidrofóbicas e iônicas. Nas amostras em que há glutaraldeído envolvido na preparação, espera-se que ocorra formação de ligações de interação forte, como interação covalente (LEE *et al.*, 2017), que não são quebradas pelo tampão de ruptura. Esses comportamentos foram observados nos géis de ambas lipases, nas Figura 21 e 22.

A Figura 21 representa a eletroforese das nanoflores sintetizadas com a lipase CALB. Notoriamente há uma diferença no padrão de banda dos oitos poços. O poço de número 1 contém o marcador molecular, e pelo peso das lipases ser na faixa de 30 kDa, as bandas ficam localizadas próximo ao centro do gel. Como forma de controle, o segundo poço contém a solução de CALB utilizada para sintetizar as nanoflores. O intuito dessa amostra é comprovar que as bandas dos imobilizados correspondem a banda da enzima. O terceiro e quarto poço correspondem a nanoflor com Sulfato de Cobre e Cloreto de Cobre, respectivamente. Nessas amostras não há glutaraldeído e por este motivo as bandas aparecem bem nítidas e semelhantes a banda de controle. A aparição dessas bandas revela que as interações promovidas para formar os cristais de nanoflores são ligações fracas.

Diferentemente, nos quatro poços seguintes há amostras que passaram pelo tratamento com o glutaraldeído. Como resultado da ação desse agente há o estabelecimento de ligações que impedem a fácil liberação da enzima imobilizada. Desse modo, na região desses poços não é possível notar bandas nítidas, apenas uma leve indicação da presença de proteínas. Isto indica que o glutaraldeído conseguiu estabelecer as ligações covalentes, uma vez que, após contato com o tampão de ruptura a 100 °C, a enzima ficou mantida nas nanoflores.

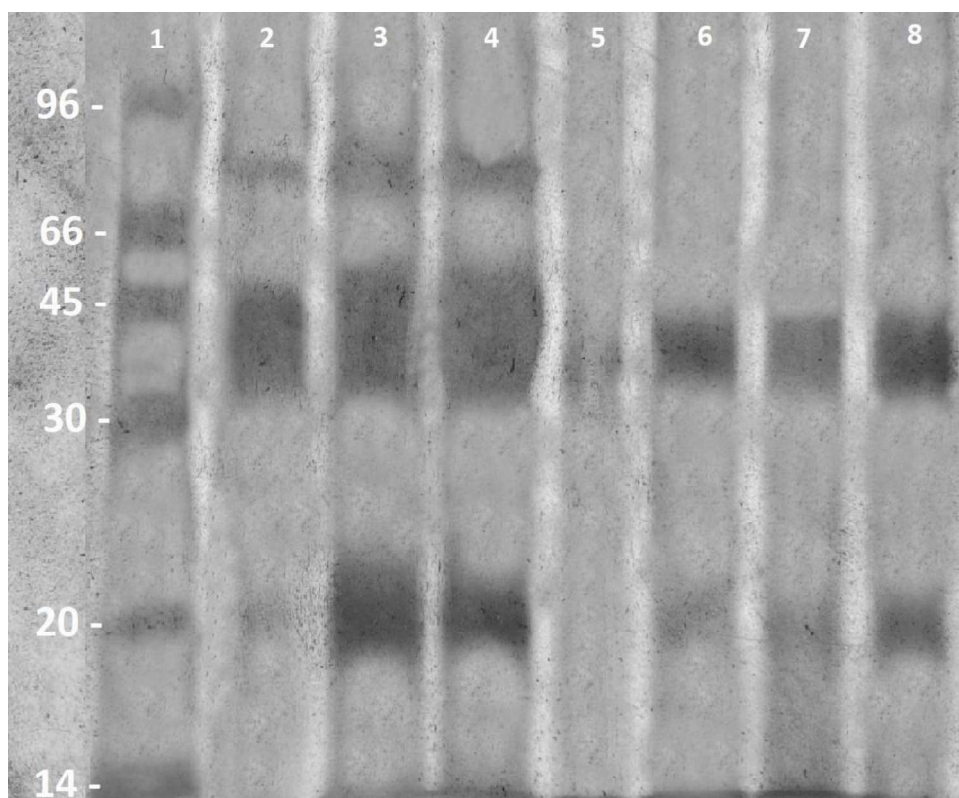
Figura 21 - Eletroforese das nanoflores de *Candida antarctica* (CALB).



Fonte: Elaborada pela autora. Bandas: 1- Marcador de baixo peso molecular (LMW); 2 - Solução de CALB; 3 - NF-C-CuSO₄; 4-NF-C-CuCl₂; 5-NF-C-GA-CuSO₄; 6- NF-C-GA-CuCl₂; 7-NF-C-MNP-GA-CuSO₄; 8-NF-C-MNP-GA-CuCl₂. Géis na concentração de 12 % de poliacrilamida para o gel de separação e de 5% para o gel de concentração. O tampão de ruptura foi adicionado às amostras, as quais foram aquecidas a 100°C durante 10 minutos. As amostras contendo glutaraldeído foram previamente reduzidas por uma solução 1 mg/mL de borohidreto de sódio (NaBH₄) para inativar a ação desse agente.

Ao contrário do resultado obtido com a CALB, no gel da TLL é mais nítido a presença de bandas na região de amostras após interação do glutaraldeído. A Figura 22 mostra a eletroforese da TLL e segue o mesmo padrão de amostras utilizados no gel da CALB. As amostras contendo apenas as nanoflores mostraram padrões semelhantes a banda da enzima solúvel e próximo ao marcador de 30 kDa.

Figura 22 - Eletroforese das nanoflores de *Thermomyces lanuginosus* (TLL).



Fonte: Elaborada pela autora. Bandas: 1- Marcador de baixo peso molecular (LMW) em kDa; 2 - Solução de TLL; 3 - NF-T-CuSO₄; 4-NF-T-CuCl₂; 5-NF-T-GA-CuSO₄; 6- NF-T-GA-CuCl₂; 7-NF-T-MNP-GA-CuSO₄; 8-NF-T-MNP-GA-CuCl₂. Géis na concentração de 12 % de poliacrilamida para o gel de separação e de 5% para o gel de concentração. O tampão de ruptura foi adicionado às amostras, as quais foram aquecidas a 100°C durante 10 minutos. As amostras contendo glutaraldeído foram previamente reduzidas por uma solução 1 mg/mL de borohidreto de sódio (NaBH₄) para inativar a ação desse agente.

O aparecimento das amostras com glutaraldeído, mesmo que em menor intensidade que as primeiras bandas, não significa que este não está presente ou não realizou seu papel. A interação pode não ter ocorrido de modo 100% eficiente e, por isso, algumas enzimas aparecem no gel. Outro motivo de aparecer mais nítido, é que o método de coloração utilizado foi diferente para cada gel. O método de coloração por nitrato de prata utilizado com a TLL é mais sensível que o método com Coomassie Blue utilizado com a CALB.

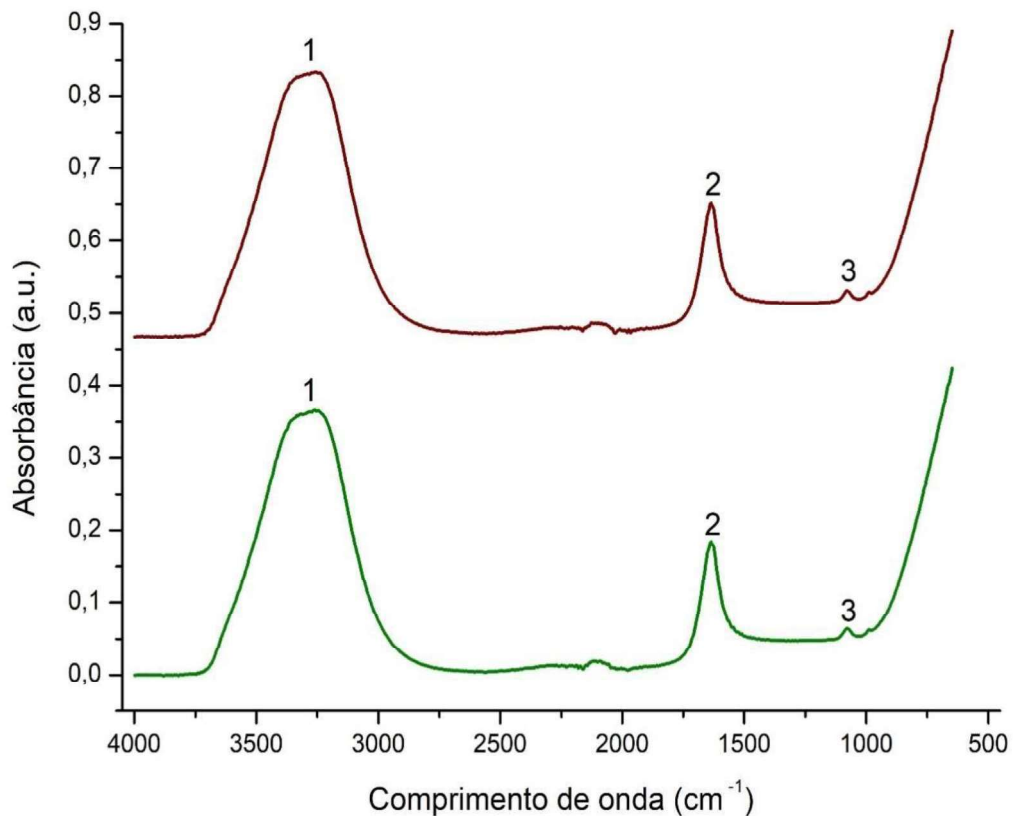
O resultado da eletroforese de TLL reflete no resultado obtido no ensaio de estabilidade operacional das nanoflores com TLL. Estas apresentaram um desempenho geral inferior as nanoflores de CALB, além de ter mais quedas na atividade durante os ciclos sucessivos. Comparando os resultados dos géis de eletroforese é possível observar uma maior liberação das lipases na amostra de TLL escolhida para realizar os ciclos, sendo assim condizente com o resultado inferior dos ciclos.

5.6.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os experimentos de FTIR foram realizados para verificar a presença das lipases nas nanoflores, como também a incorporação do glutaraldeído. A técnica de FTIR possibilita este estudo, uma vez que as proteínas absorvem comprimentos de onda infravermelhos devido às vibrações das ligações peptídicas (LIU *et al.*,2010). Com isso, utilizando amostras em solução das nanoflores e nanoflores entrecruzadas, foram obtidos os espectros observados na Figura 23 e 24.

A Figura 23 é um gráfico dos espectros dos imobilizados da Lipase CALB. A linha inferior corresponde a NF-C e a superior NF-CA-GA, sendo os picos mais evidentes enumerados. Não há diferença nos espectros entre os sais (CuCl_2 e CuSO_4) utilizados, e por isso não foi feita diferenciação.

Figura 23 - FTIR das nanoflores (NF-C e NF-C-GA) de *Candida antarctica* (CALB).



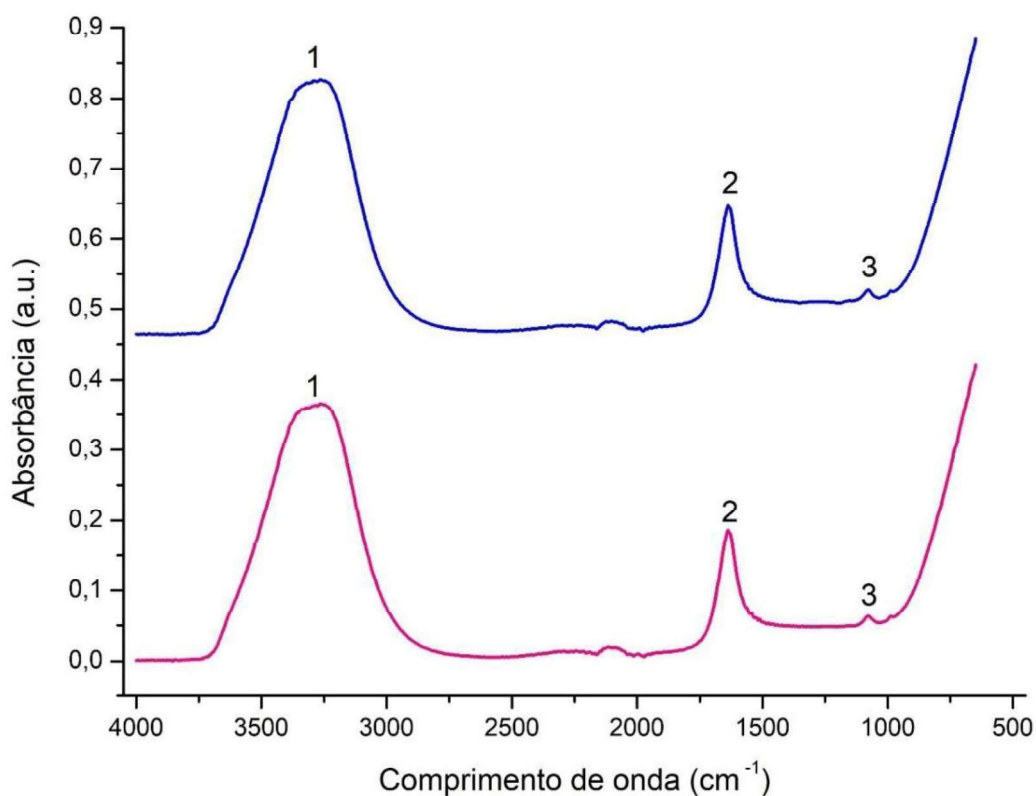
Fonte: Elaborada pela autora. Verde: NF-C; Marrom: NF-C-GA. Para realização do experimento, os precipitados foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio, 100 mM e pH 7,4 e dessa solução uma gota foi retirada com o auxílio de uma ponteira e adicionado sob o cristal do aparelho.

Como a análise foi realizada por meio dos precipitados ressuspensos em solução tampão, o pico de número “1” é atribuído à hidroxila da molécula de água (MCINTOSH *et al.*, 2017). Já a banda “2” é característica de proteínas, correspondente a amida I, em aproximadamente $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ (FORATO *et al.*, 1998). O terceiro e último pico mais evidente, de absorção em 1070 cm^{-1} , está relacionada à presença de grupos fosfato (CUI *et al.*, 2016). Esses grupos fosfatos podem estar relacionados ao tampão presente na amostra, como também aos cristais de nanoflores, visto que os cristais primários, na etapa de nucleação, são formados entre os íons Cu^{+2} dos sais e os grupos fosfato presente em solução.

Apesar de serem amostras diferentes, não há diferença visível entre os dois espectros. A Figura 24 também mostra nanoflores antes e após o entrecruzamento, mas da enzima da TLL. Com a TLL também não foi possível diferenciar as amostras pelo sal utilizado e também não

houve diferença quanto ao contato com o agente de ligação cruzada. Assim como no espectro da CALB, no gráfico da Figura 22 três bandas ficaram mais evidentes.

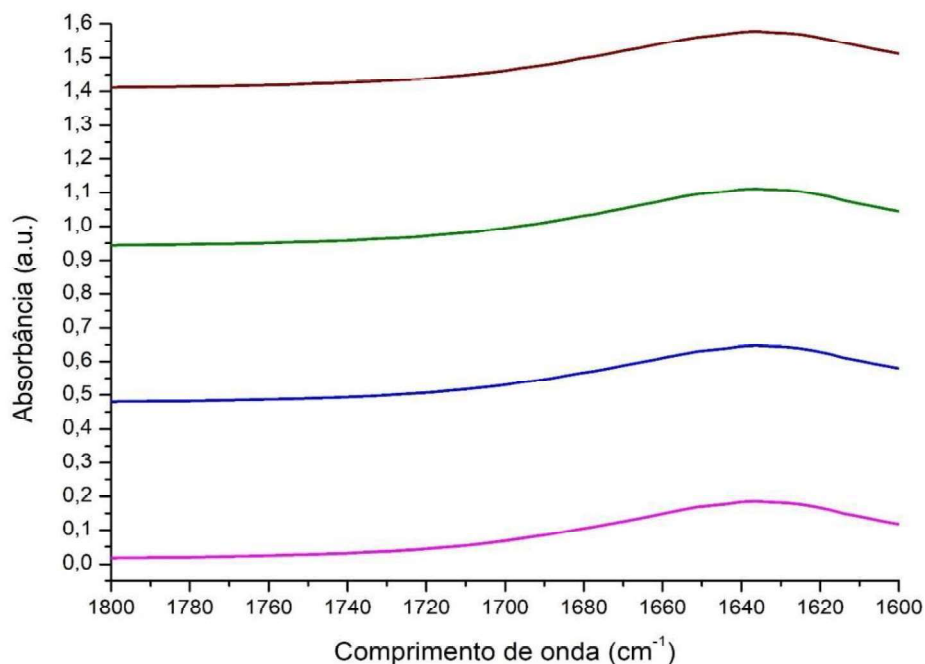
Figura 24 - FTIR das nanoflores (NF-T e NF-T-GA) de *Thermomyces lanuginosus* (TLL).



Fonte: Elaborada pela autora. Rosa: NF-T; Azul: NF-T-GA. Para realização do experimento, os precipitados foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio, 100 mM e pH 7,4 e dessa solução uma gota foi retirada com o auxílio de uma ponteira e adicionado sob o cristal do aparelho.

Para verificar alguma evidência da integração do glutaraldeído, foi selecionada uma faixa de comprimento de onda para uma observação mais detalhada, ver Figura 25. A região escolhida foi entre 1600 e 1800 cm⁻¹, pois a faixa do 1740 cm⁻¹ é atribuída a conformações que o glutaraldeído promove na estrutura da enzima quando realiza as interações, representando a vibração de estiramento do C=O da molécula de aldeído, que indica o processo de ativação com as moléculas de glutaraldeído (RIOS *et al.*, 2016).

Figura 25 - Espectros entre o intervalo de 1600 e 1800 cm^{-1} .



Fonte: Elaborada pela autora. Rosa: NF-T; Azul: NF-T-GA; Verde: NF-C; Marrom: NF-C-GA. Ajuste foi realizado no próprio software Origin 8.1.

Contudo, mesmo após aproximação dessa região, não houve nenhuma alteração no espectro que representa a interação do glutaraldeído. O experimento foi realizado quando se utilizava uma concentração inferior à 0,8% v/v, podendo ser esse um dos fatores que justifique a não aparição de um pico que representa a integração desse reagente.

Outro fator que deve ser considerado é o estado físico das amostras. Geralmente, para o estudo por FTIR as amostras de proteínas são previamente liofilizadas (COSTANTINO *et al.*, 1995). Por meio da liofilização, a água deixa de ser um interferente e outras características das amostras podem ser visualizadas, como informações sobre sua estrutura secundária (CUI *et al.*, 2016).

Experimentou-se realizar a remoção de água dos imobilizados utilizando um dessecador por um período de 1 semana. Porém, após esta semana, notou-se que o precipitado aderiu à parede dos tubos nos quais as amostras estavam armazenadas, e ficaram ressecados, semelhante a um plástico. Com isso, não foi possível realizar a análise, pois era necessário que as amostras estivessem em pó. Todos esses fatores recomendam que, em uma análise futura, a retirada do excesso de água seja realizada por meio do método de liofilização, para com isso obter amostras viáveis para a análise.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram testados dois métodos de quantificação de proteínas, revelando que ambos não são apropriados para a obtenção da concentração de proteínas das nanoflores sintetizadas neste estudo.

Realizou-se a síntese de nanoestruturas catalíticas no formato de flor por co-precipitação das lipases de *Candida antarctica* tipo B (CALB) e de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e dos sais Cloreto de Cobre (CuCl_2) e Sulfato de Cobre (CuSO_4) por meio de três metodologias. A terceira metodologia testada, nanoflores e nanopartículas entrecruzadas, recebeu maior destaque. Apesar da atividade dos imobilizados não revelarem a melhor atividade, essa metodologia foi capaz de agregar benefícios às nanoflores. Com a adição das nanopartículas o problema de redução de massa do precipitado após tratamento com glutaraldeído deixou de ser uma limitação, além de facilitar o processo de separação do meio de reação, que pode ser realizado por aproximação magnética. Uma outra vantagem foi a resistência à temperatura de 60 °C, observada nas nanoflores com nanopartículas de CuSO_4 de ambas as enzimas, obtendo melhor execução comparada às enzimas solúveis. Quando testado quanto à capacidade de reutilização, este imobilizado da CALB finalizou 10 ciclos com 73,57 % da atividade inicial e a TLL com 58,39% da atividade inicial no 5º ciclo. Por meio da eletroforese, foi possível comprovar a imobilização e a ação do glutaraldeído nos imobilizados, concordando com a análise do FTIR que indica que a imobilização das lipases em nanoflores.

Com isso, foram obtidos neste trabalho biocatalisadores aptos a serem implementados em várias áreas da catálise enzimática, devendo ser aprimorados com mais análises e estudos. Apesar do rápido desenvolvimento das nanoflores no meio científico, também existem alguns desafios a serem enfrentados, como a escolha dos íons metálicos ideais para cada enzima, o agente de ligação cruzada ideal para o processo, além das adversidades relatadas ao longo deste trabalho. Por meio de trabalhos como este, espera-se que os estudos e os campos de aplicação das nanoflores sejam ainda mais expandidos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N. N.; AHMAD KAMARUDIN, N. H.; LEOW, A.; RAHMAN, R. The Role of Surface Exposed Lysine in Conformational Stability and Functional Properties of Lipase from *Staphylococcus* Family. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25(17), p. 3858, 2020.

ALTINKAYNAK, C.; TAVLASOGLU, S.; YZDEMIR, N.; OCSOY, I. A New Generation Approach in Enzyme Immobilization: Organic-Inorganic Hybrid Nanoflowers with Enhanced Catalytic Activity and Stability. **Enzyme Microb. Technol**, v. 93–94, p. 105–112, 2016.

AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. **Immunochemistry**, v. 6(1), p. 43–52, 1969.

BARAUSKAS, J.; ANDERBERG, H.; SVENDSEN, A.; NYLANDER, T. Thermomyces lanuginosus lipase-catalyzed hydrolysis of the lipid cubic liquid crystalline nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 137, p. 50–59, 2016.

BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P. S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28(6), p. 627–638, 2011.

BASTIDA, A.; SABUQUILL, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J.M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology Bioengineering**, v. 58, p.486-493, 1998.

BEZERRA, R. M.; NETO, D. M. A.; GALVÃO, W. S.; RIOS, N. S.; CARVALHO, A. C. L. DE M.; CORREA, M. A.; GONÇALVES, L. R. B. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 104–115, 2017.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification. *Biocatal.* **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 2019

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial - Fundamentos (Vol 1)**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66-80, 2019.

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

BRADY, L.; BRZOZOWSKY, A. M.; DEREWENDA, Z. S., et al., “A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase”, **Nature**, v. 343, pp. 767-770, 1990

BRZOZOWSKI, A. M.; SAVAGE, H.; VERMA, C. S.; TURKENBURG, J. P.; LAWSON, D. M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase. **Biochemistry**, v. 39(49), p. 15071–15082, 2000.

CASTRO, H.; MENDES, A.; SANTOS, J.; AGUIAR, C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1 , p. 146-156, 2004.

COSTANTINO, H. R.; GRIEBENOW, K.; MISHRA, P.; LANGER, R.; KLIBANOV, A. M. Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of protein stability in the lyophilized form. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1253(1), p. 69–74, 1995.

CUI, J.; JIA, S. Organic–Inorganic Hybrid Nanoflowers: A Novel Host Platform for Immobilizing Biomolecules. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, p. 249–263, 2017.

CUI, J.; ZHAO, Y.; LIU, R.; ZHONG, C.; JIA, S. Surfactant-activated lipase hybrid nanoflowers with enhanced enzymatic performance. **Scientific Reports**, v. 6(1), 2016.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3(1), p. 1–9, 2012.

FACIN, B.; DE SOUZA M.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Driving Immobilized Lipases as Biocatalysts: 10 Years State of the Art and Future Prospects. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 58, 2019.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62(3-4), p. 197–212, 2010.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 146-150, 1988.

GALVÃO, W. S.; FREIRE, R. M.; RIBEIRO, T. S.; VASCONCELOS, I. F.; COSTA, L. S.; FREIRE, V. N.; FECHINE, P. B. A. Cubic superparamagnetic nanoparticles of NiFe₂O₄ via fast microwave heating. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 12, p. 2803, 2014.

GALVÃO, W. S.; NETO, D. M. A.; FREIRE, R. M.; FECHINE, P. B. A. Super-Paramagnetic Nanoparticles with Spinel Structure: A Review of Synthesis and Biomedical Applications. *Solid State Phenomena*, v. 241, p. 139–176, 2015.

GALVIS, M.; BARBOSA, O.; RUIZ, M.; CRUZ, J.; ORTIZ, C.; TORRES SÁEZ, R. Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2373-2378, 2012.

GARCIA-GALAN, C.; DOS SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; PEREIRA, E. B.; CORBERAN, V. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49(4), p. 604–616, 2014.

GE, J.; LEI, J.; ZARE, R. N. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. **Nature Nanotechnology**, v. 7(7), p. 428-32, 2012.

GROVES, W. E.; DAVIS, F. C.; SELLS, B. H. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. **Analytical Biochemistry**, v. 22(2), p. 195–210, 1968.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding Enzyme Immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 453–468, 2009.

HOPPERT, M. Metalloenzymes. Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series. **Springer**, Dordrecht, 2011.

HUA, X.; XING, Y.; ZHANG, X. Enhanced Promiscuity of Lipase-Inorganic Nanocrystal Composites in the Epoxidation of Fatty Acids in Organic Media. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8(25), p. 16257–16261, 2016.

HUANG, Y.; RAN, X.; LIN, Y.; REN, J.; QU, X. Self-assembly of an organic–inorganic hybrid nanoflower as an efficient biomimetic catalyst for self-activated tandem reactions. **Chemical Communications**, v. 51(21), p. 4386–4389, 2015.

JAEGER, K. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16(9), p. 396–403, 1998.

JAQUISH, R.; REILLY, A. K.; LAWSON, B. P.; GOLIKOVA, E.; SULMAN, A. M.; STEIN, B. D.; BRONSTEIN, L. M. Immobilized glucose oxidase on magnetic silica and alumina: Beyond magnetic separation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 896–905, 2018.

JHA, B. K.; SVENSSON, M.; KRONBERG, B.; HOLMBERG, K. Titration Microcalorimetry Studies of the Interaction between Humicola lanuginosa Lipase and Ionic Surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 213(1), p. 262–264, 1999.

JIA, F.; NARASIMHAN, B.; MALLAPRAGADA, S. Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111(2), p. 209–222, 2013.

JIANG, W.; WANG, X.; YANG, J.; HAN, H.; LI, Q.; TANG, J. Lipase-inorganic hybrid nanoflower constructed through biomimetic mineralization: A new support for biodiesel synthesis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 514, p. 102–107, 2018.

JOÃO, J. J.; ZANELLA, C. R. Utilização de enzimas em meio orgânico. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 16, p.32-36, 2000.

KIM, H.K.; PARK, S.Y.; LEE, J.K.; OH, T.K. Gene Cloning and Characterization of Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62(1), p. 66–71, 1988.

KLAPISZEWSKI, Ł.; ZDARTA, J.; ANTECKA, K.; SYNORADZKI, K.; SIWIŃSKA-STEFAŃSKA, K.; MOSZYŃSKI, D.; JESIONOWSKI, T. Magnetite nanoparticles conjugated with lignin: A physicochemical and magnetic study. **Applied Surface Science**, v. 422, p. 94–103, 2017.

KUNDYS, A.; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E.; FABISZEWSKA, A.; MAŁAJOWICZ, J. *Candida antarctica* Lipase B as Catalyst for Cyclic Esters Synthesis, Their Polymerization and Degradation of Aliphatic Polyesters. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26(1), p. 396–407, 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(5259), p. 680–685, 1970.

LEE, H. R.; CHUNG, M.; KIM, M. I.; HA, S. H. Preparation of glutaraldehyde-treated lipase-inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 105, p. 24–29, 2017.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed

LI, C.; ZHAO, J.; ZHANG, Z.; JIANG, Y.; BILAL, M.; JIANG, Y.; JIA, S. Self-assembly of activated lipase hybrid nanoflowers with superior activity and enhanced stability. **Biochemical Engineering Journal**. v. 158, 2020b.

LI, D.; TEOH, W. Y.; GOODING, J. J.; SELOMULYA, C.; AMAL, R. Functionalization Strategies for Protease Immobilization on Magnetic Nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 20(11), p. 1767–1777, 2010.

LI, Q.; CHEN, Y.; BAI, S.; SHAO, X.; JIANG, L.; LI, Q. Immobilized lipase in bio-based metal-organic frameworks constructed by biomimetic mineralization: A sustainable biocatalyst for biodiesel synthesis. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 188, 2020c.

LI, Y.; FEI, X.; LIANG, L.; TIAN, J.; XU, L.; WANG, X.; WANG, Y. The influence of synthesis conditions on enzymatic activity of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 92–97, 2016a.

LI, Y.; WU, H.; SU, Z. Enzyme-based hybrid nanoflowers with high performances for biocatalytic, biomedical, and environmental applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 416, 2020a.

LI, Z.; DING, Y.; WU, X.; GE, J.; OUYANG, P.; LIU, Z. An enzyme–copper nanoparticle hybrid catalyst prepared from disassembly of an enzyme–inorganic nanocrystal three-dimensional nanostructure. **RSC Advances**, v. 6(25), p. 20772–20776, 2016b.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: volume 3: Processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo-SP, 2001.

LIU, J.; MA, R.T.; SHI, Y.P. Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods”- A review. **Anal Chim Acta**, 2020.

LIU, Y.; WANG, B.; JI, X.; HE, Z. Self-assembled protein-enzyme nanoflower-based fluorescent sensing for protein biomarker. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, 2018.

LIU, Y.; ZHANG, X.; TAN, H.; YAN, Y.; HAMEED, B. H. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Process Biochemistry**, v. 45(7), p. 1176–1180, 2010.

LU, Y.; LV, Q.; LIU, B.; LIU, J. Immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed synthesis of biodegradable polymers for biomedical applications. **Biomaterials Science**, v. 7(12), p. 4963–4983, 2019.

MAGDALENA, A.; SILVA, I.M.B.; MARQUES, R.F.C.; PIPI, A. R. F; LISBOA-FILHO, P.; MIGUEL, J. EDTA-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 113, p. 5-10, 2017.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; TOVAR-CASTRO, L.; GARCÍA, H. S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Continuous ethyl oleate synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 52–58, 2018.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. **Enzyme Microb. Technol**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MCINTOSH, I.; NICHOLS, A.; TANI, K.; LLEWELLIN, ED. Accounting for the species-dependence of the 3500 cm⁻¹ H₂O infrared molar absorptivity coefficient: Implications for hydrated volcanic glasses. **American Mineralogist**, v. 102, p. 1677-1689, 2017.

MEENA, J.; GUPTA, A.; AHUJA, R.; SINGH, M.; PANDA, A. K. Recent advances in nano-engineered approaches used for enzyme immobilization with enhanced activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 338, 2021.

MICHELIN, S.; PENHA, F. M.; SYCHOSKI, M. M.; SCHERER, R. P.; TREICHEL, H.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. **Renewable Energy**, v. 76, p. 388–393, 2015.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. **Biotechnol. Biotechnol. Equip**, v. 29, p. 205–220, 2015.

MONTEIRO, V.; SILVA, R. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p.9-23, 2009.

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal Biochem**, v. 1172, p. 307-10, 1981.

NAVVABI, A.; RAZZAGHI, M.; FERNANDES, P.; KARAMI, L.; HOMAEI, A. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 61–70, 2018.

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4(11), p. 2411–2423, 1995.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 279–286, 2002.

PAPADOPOULOU, A. A.; TZANI, A.; POLYDERA, A. C.; KATAPODIS, P.; VOUTSAS, E.; DETSI, A.; STAMATIS, H. Green biotransformations catalysed by enzyme-inorganic hybrid nanoflowers in environmentally friendly ionic solvents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 26707–26714, 2017.

PEREIRA, M. C. G.; KIECKBUSCH, T. G.; FIRMANI PERNA, R.; TOMIÊ FUJIMOTO, J.; ANDRES VILLALBA MORALES, S.; ROMANELLI, J. P. Research On The Enzyme Immobilization Based On Bibliometric Analysis. **Process Biochemistry**, 2018.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH G.S.; GREENBLATT D.M.; MENG E.C.; FERRIN, T.E. UCSF chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

RAI, S. K.; NARNOLIYA, L. K.; SANGWAN, R. S.; YADAV, S. K. Self-Assembled Hybrid Nanoflowers of Manganese Phosphate and l-Arabinose Isomerase: A Stable and Recyclable Nanobiocatalyst for Equilibrium Level Conversion of d-Galactose to d-Tagatose. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6(5), p. 6296–6304, 2018.

RIOS, N. S. Avaliação de suportes nanoestruturados para a imobilização da Lipase de *Yarrowia lipolytica* visando a produção de biodiesel. Universidade Federal do Ceará, 2013.

RIOS, N.S.; PINHEIRO, M.P.; DOS SANTOS, J.C.S.; DE S. FONSECA, T.; LIMA, L.D.; DE MATTOS, M.C.; FREIRE, D.M.G.; DA SILVA, I.J.; RODRÍGUEZ-AGUADO, E.; GONÇALVES, L.R.B. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (*R,S*)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 246–258, 2016.

REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Enzymatic kinetic resolution of (*RS*)-1-(Phenyl)ethanols by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on magnetic nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21(8), p. 1537–1542, 2010.

REHM, F.; CHEN, S.; REHM, B. Enzyme Engineering for In Situ Immobilization. **Molecules**, v. 21, p. 1370, 2016.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147-148, p.237-250, 2009.

REN, W.; LI, Y.; WANG, J.; LI, L.; XU, L.; WU, Y.; TIAN, J. Synthesis of magnetic nanoflower immobilized lipase and its continuous catalytic application. **New J. Chem.**, v. 43, p.11082-11090, 2019.

RESEARCH AND MARKETS, 2021. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrase, Proteases), By Source (Microorganisms, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2028.

SADANA, A.; HENLEY, J.P. .Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes., **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 501, p.73-79, 1987.

SANTOS, J. C. S.; DOS, BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7(16), p. 2413–2432, 2015.

SHAW, S.Y.; CHEN, Y.-J.; OU, J.-J.; HO, L. Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39(5), p. 1089–1095, 2006.

SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. **Pharmaceutical Process Chemistry**, p. 159–181, 2010.

SOMTURK, B.; HANCER, M., OCSOY, I.; ÖZDEMİR, N. Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. **Dalton Transactions**, v. 44(31), p. 13845–13852, 2015.

SOMTURK, B.,;YILMAZ, I.; ALTINKAYNAK, C.; KARATEPE, A.; ÖZDEMİR, N.; OCSOY, I. Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 86, p. 134–142, 2016.

SOUZA, L. T. DE A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.

SUN, J., GE, J., LIU, W., LAN, M., ZHANG, H., WANG, P., NIU, Z. Multi-enzyme co-embedded organic–inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. **Nanoscale**, v. 6(1), p. 255–262, 2014.

SUNAGAWA, I. Crystal growth—Its significance for modern science and technology and its possible future applications. **Advances in Crystal Growth Research**, p.1-17, 2001.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2(4), p. 293–308, 1994.

VAN TASSEL, L.; MOILANEN, A.; RUDDOCK, L. Efficient production of wild-type lipase B from *Candida antarctica* in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 165, 2019.

VERGER R. 'Interfacial activation of lipase': facts and artifacts. **TIBTECH Trends in Biotechnology**, v.15, p.32-38, 1997.

WANG, A.; CHEN, X.; YU, J.; LI, N.; LI, H.; YIN, Y.; WU, S. G. Green preparation of lipase@Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers using bone waste from food production for efficient synthesis of clindamycin palmitate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 89, p. 383-391, 2020.

WANG, M.; SHI, H.; WU, D.; HAN, H.; ZHANG, J.; XING, Z; LI, Q. Glutaraldehyde Cross-Linking of Immobilized Thermophilic Esterase on Hydrophobic Macroporous Resin for Application in Poly(ϵ -caprolactone). **Synthesis. Molecules**, v. 19(7), p. 9838–9849, 2014.

WANG, R.; ZHANG, Y.; LU, D.; GE, J.; LIU, Z.; ZARE, R. N. Functional protein-organic/inorganic hybrid nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 5(4), p. 320–328, 2013.

WEETALL, H.H. Immobilized enzymes: analytical applications. **Anal. Chem.** v. 46, p. 602A–604A, 1974.

WEI, T.; DU, D.; ZHU, M.-J.; LIN, Y.; DAI, Z. An Improved Ultrasensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Hydrangea-Like Antibody–Enzyme–Inorganic Three-in-One Nanocomposites. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8(10), p. 6329–6335, 2016.

WU, Z.; LI, X.; LI, F.; YUE, H.; HE, C.; XIE, F.; WANG, Z. Enantioselective transesterification of (R,S)-2-pentanol catalyzed by a new flower-like nanobioreactor. **RSC Adv.**, v. 4(64), p. 33998–34002, 2014.

YAPOUDJIAN, S.; IVANOVA, M.G.; BRZOZOWSKI, A.M.; PATKAR, S.A.; VIND, J.; SVENDSEN, A.; VERGER, R. Binding of *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* lipase to the mixed micelles of cis-parinaric acid/NaTDC. **Eur J Biochem**, v. 269: p. 1613-1621, 2002.

YU, J., CHEN, X., JIANG, M., WANG, A., YANG, L., PEI, X., WU, S. G. Efficient promiscuous Knoevenagel condensation catalyzed by papain confined in Cu₃(PO₄)₂ nanoflowers. **RSC Advances**, 8(5), 2357–2364, 2018.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1988.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; Enzimas imobilizadas in: **Enzimas como agentes biotecnológicos**, SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R., Ed. Legis Summa.

ZHANG Y.; SUN W.; ELFEKY N.M.; WANG Y.; ZHAO D.; ZHOU H.; WANG J.; BAO Y. Self-assembly of lipase hybrid nanoflowers with bifunctional Ca²⁺ for improved activity and stability. **Enzym. Microb. Technol**, v. 132, 2020.