

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARIANA SGARBI GASQUES MUNHOZ

Imobilização da α -amilase termamyl[®] em nanopartículas magnéticas e avaliação da atividade enzimática.

ALFENAS / MG

2025

MARIANA SGARBI GASQUES MUNHOZ

Imobilização da α -amilase termamyl[®] em nanopartículas magnéticas e avaliação da atividade enzimática.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof.^o Dr. Luciano Sindra Virtuoso
Coorientadora: Prof.^a Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti

ALFENAS / MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Munhoz, Mariana Sgarbi Gasques.

Imobilização da α -amilase termamyl® em nanopartículas magnéticas e avaliação da atividade enzimática. / Mariana Sgarbi Gasques Munhoz. - Alfenas, MG, 2025.

47 f. : il. -

Orientador(a): Luciano Sindra Virtuoso.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Imobilização de enzimas. 2. α -amilase. 3. Nanopartículas magnéticas. 4. Nanobiocatalisadores. 5. Atividade enzimática. I. Virtuoso, Luciano Sindra, orient. II. Título.

MARIANA SGARBI GASQUES MUNHOZ

**IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE TERMAMYL® EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS: ESTUDO DE ATIVIDADE E ESTABILIDADE OPERACIONAL.**

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do(a) Trabalho de Conclusão de Curso apresentado(a) como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 08 de dezembro de 2025.

Prof.^a Dr.^a Daniela Battaglia Hirata
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Dr.^o Benivaldo Nascimento dos Santos Junior
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof.^o Dr.^o Luciano Sindra Virtuoso
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO SINDRA VIRTUOSO
Data: 17/12/2025 16:28:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar e me dar forças durante toda a minha jornada acadêmica; por guiar meus passos, permitir a realização deste sonho e tornar real tudo aquilo que eu sequer imaginava alcançar.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), por se tornar minha segunda casa e ao Instituto de Química, pela oportunidade e pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho, fundamentais para a minha formação. Ao corpo técnico, pelo suporte essencial, com agradecimento especial ao Benivaldo e ao Denis. Aos laboratórios, que viabilizaram a realização deste estudo, em especial ao Laboratório de Bioprocessos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso, por ser um docente excepcional, um pesquisador inspirador e uma pessoa maravilhosa. Não haveria páginas suficientes para expressar o tamanho da minha gratidão por todo o apoio e dedicação concedidos a mim e aos meus colegas do grupo de pesquisa. Seu amor pelo ensino e pela formação de profissionais capacitados me causa grande admiração. Agradeço imensamente por todo o acolhimento durante esses anos de graduação e pelos ensinamentos transmitidos, que não se restringiram apenas à vida acadêmica, mas foram essenciais para o meu crescimento pessoal. Suas lições contribuíram decisivamente para a minha formação como química e como ser humano. Meu eterno agradecimento.

À minha coorientadora, Prof.^a Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti, por todo o tempo, carinho e paciência dedicados. Agradeço pela generosidade em compartilhar seu conhecimento e pela presença constante no laboratório durante tantas semanas, sempre transmitindo sua experiência de maneira leve e completa.

Aos meus pais, Cecília Sgarbi Gasques e Alexandre Munhoz; à minha madrastra, Bárbara Thais Machado Munhoz; e à minha avó, Ema Aparecida Sgarbi. Agradeço por acreditarem em mim e por não hesitarem em me apoiar quando decidi me tornar química e estudar a 400 km de casa. Obrigado por serem meu alicerce e meu porto seguro, mantendo-me firme, especialmente nesta fase em que tanto aprendi sobre a vida longe de casa. Vocês sempre me fizeram enxergar o meu potencial, mostrando que qualquer desafio poderia ser ultrapassado com dedicação e persistência. Tudo o que sou hoje, devo a vocês.

Agradeço especialmente à minha irmã, Bianca Sgarbi Gasques Munhoz, por ser a pessoa que sempre me apoia e torce incansavelmente pela minha felicidade. Obrigada por ser a minha pessoa neste mundo. Agradeço também a toda a minha família: meus avós, Maria da Conceição Munhoz e José Antônio Munhoz; meus tios, Manuel Genivaldo Sgarbi Leite e Elvira Aparecida

Sgarbi; e minha sogra, Lucineia Sebastião Fuzatto. Obrigado por serem a minha base e por sempre torcerem por mim.

Ao meu namorado, Gabriel Henrique Fuzatto, que não se cansa de ressaltar o meu potencial e de me lembrar, todos os dias, que sou capaz de conquistar o mundo. Agradeço por ter me acompanhado diversas vezes ao laboratório e por ter dedicado horas me ajudando a pensar e a interpretar resultados que nem sempre eram os esperados. Obrigada por toda a paciência e compreensão durante este período de graduação. Por ser a minha base e o meu apoio, tanto na vida acadêmica quanto na pessoal. Aprendi e cresci muito ao seu lado e jamais serei capaz de expressar tamanha gratidão por isso. Obrigado por acreditar em mim e por ser sempre o primeiro a me apoiar.

Aos meus amigos, que tornaram todo esse processo mais leve. Vocês choraram comigo quando precisei, me proporcionaram risadas, quando mais necessitava, e me ensinaram que a vida, de fato, não vale a pena ser vivida sozinha. Sem vocês, eu jamais seria quem sou hoje e não teria conseguido chegar até aqui. Um agradecimento mais que especial a Paola Sgarbiero, Maria Luiza Nunes Armelin e Salva Ashgar, que foram meu apoio e minha família em Alfenas. Minha gratidão eterna a vocês. E à Maria Eduarda Rezende Gomes, que, mesmo a 400 km de distância, se fez presente em cada conquista e em cada momento difícil.

Agradeço aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Química de Coloides (GPQC), pela convivência diária e pelos ensinamentos compartilhados. Obrigado por cada conversa, que, muitas vezes, amenizou os dias difíceis, e por tanta parceria e trabalho em equipe. Com vocês, me desenvolvi profissionalmente e aprendi a dinâmica e a conduta necessárias em um ambiente de pesquisa. Um agradecimento especial ao meu colega Marcello Henrique Cavalcanti, que durante parte da pesquisa esteve ao meu lado como coorientador, compartilhando conhecimentos, experiências e ensinamentos que levarei para além da vida acadêmica.

Por fim, agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo financiamento concedido a esta e a muitas outras pesquisas da universidade. O apoio foi fundamental para viabilizar o acesso aos insumos e equipamentos que tornaram este trabalho possível.

RESUMO

A demanda por processos alinhados aos princípios da química verde tem crescido no setor industrial, e, nesse contexto, a imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas surge como estratégia promissora por combinar sustentabilidade e possibilidade de reutilização. Neste trabalho, foi desenvolvido um nanobiocatalisador baseado na imobilização da enzima α -amilase Termamyl® (AM) em nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs), empregando o método de adsorção física. Inicialmente, as SPIONs foram obtidas por síntese coloidal e caracterizadas quanto às suas propriedades físico-químicas. Em seguida, foi determinada a atividade da α -amilase na forma livre pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS), obtendo-se atividade média da ordem de $1,6 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a solução estoque. O teor de enzima imobilizada foi avaliado por espectrofotometria no UV-Vis (Método de Bradford) e por medidas de atividade no sobrenadante pós-imobilização, indicando proteína e atividade residuais abaixo do limite de quantificação, o que é consistente com imobilização praticamente quantitativa ($\geq 99\%$). A atividade do nanobiocatalisador foi então determinada para 10 mg de SPIONs@AM, resultando em valores médios de aproximadamente 6,4 U, o que corresponde a cerca de 0,4% da atividade esperada para a mesma quantidade de enzima na forma livre. Ensaios de dessorção sob estresse mecânico em banho ultrassônico permitiram avaliar a resistência do sistema a tentativas de dessorção, fornecendo indícios sobre o seu potencial de reúso. Em conjunto, os resultados mostraram que, embora a imobilização da α -amilase nas SPIONs tenha sido altamente eficiente em termos de quantidade adsorvida, a atividade específica recuperada foi baixa, apontando para a necessidade de otimização das condições de imobilização e da engenharia de superfície do suporte.

Palavras-chave: Imobilização de enzimas; α -amilase; nanopartículas magnéticas; nanobiocatalisadores; atividade enzimática.

Agência financiadora: CNPq

ABSTRACT

The demand for processes aligned with green chemistry principles has been growing in the industrial sector, and in this context, enzyme immobilization onto magnetic nanoparticles emerges as a promising strategy by combining sustainability and reusability. In this work, a nanobiocatalyst was developed based on the immobilization of the enzyme α -amylase Termamyl® (AM) onto superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), employing the physical adsorption method. Initially, SPIONs were obtained via colloidal synthesis and characterized regarding their physicochemical properties. Subsequently, the activity of the free α -amylase was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method, yielding an average activity in the order of 1.6×10^5 U.mL⁻¹ for the stock solution. The immobilized enzyme content was evaluated by UV-Vis spectrophotometry (Bradford method) and by activity measurements in the post-immobilization supernatant, indicating residual protein and activity below the limit of quantification, which is consistent with practically quantitative immobilization (>99%). The activity of the nanobiocatalyst was then determined for 10 mg of SPIONs@AM, resulting in average values of approximately 6.4 U, corresponding to about 0.4% of the expected activity for the same amount of free enzyme. Desorption assays under mechanical stress in an ultrasonic bath allowed for the evaluation of the system's resistance to desorption attempts, providing indications regarding its reuse potential. Collectively, the results showed that although the immobilization of α -amylase onto SPIONs was highly efficient in terms of adsorbed quantity, the recovered specific activity was low, pointing to the need for optimization of the immobilization conditions and surface engineering of the support.

Key-words: Enzyme immobilization, α -amylase, magnetic nanoparticles, nanobiocatalysts, enzymatic activity.

Funding Agency: CNPq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da área superficial com a diminuição das dimensões de um cubo	13
Figura 2 – Métodos de imobilização de enzimas	14
Figura 3 – Classificação dos tipos de nanopartículas	15
Figura 4 – Diferentes tipos do comportamento magnético dos materiais	16
Figura 5 – Célula unitária da estrutura cristalina do tipo espinélio	17
Figura 6 – Estrutura básica dos aminoácidos	18
Figura 7 – Diminuição da energia de transição através da presença da enzima no meio	19
Figura 8 – Estrutura cristalina da α -amilase Termamyl®	20
Figura 9 – Mecanismo de ação da α -amilase Termamyl®	21
Figura 10 – Representação da interação iônica de uma enzima e seu suporte com diferentes distribuições de cargas na superfície	23
Figura 11 – Caracterização por FTIR conduzida nas SPIONs	29
Figura 12 – Difratoograma das SPIONs onde, em azul é apresentado o padrão de DRX para a magnetita e em preto o difratograma obtido para as SPIONs sintetizadas	30
Figura 13 – Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das SPIONs	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades encontradas nos nanobiocatalisadores A, B e C.....	35
Tabela 2 – Exemplos de imobilização de α -amilase (incluindo) Termamyl® e recuperação	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – α -amilase

BSA – Albumina Sérica Bovina

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CFC – Cúbico de Face Centrada

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico

DRX – Difração de Raios X

EGDMA – Dimetacrilato de etilenoglicol

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GPQC – Grupo de Pesquisa em Química de Coloides

ICDD – *International Centre for Diffraction Data*

IV – Infravermelho

LOQ – Limite de Quantificação

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NPs – Nanopartículas

pHEMA – Poli (hidroxietil metacrilato)

pH_{pzc} – Ponto de Carga Zero

pH – Potencial Hidrogeniônico

pI – Ponto Isoelétrico

SPIONs – Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Ferro

TGA – Análise Termogravimétrica

UNIFAL-MG – Universidade Federal de Alfenas

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

VSM – Magnetometria de Amostra Vibrante (Vibrating Sample Magnetometry)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivos Gerais	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Nanopartículas como suporte para imobilização de enzimas	15
2.2 Nanopartículas magnéticas.....	19
2.3 α -Amilase (AM).....	21
2.4 Imobilização da α -amilase	25
2.4.1 Adsorção Física, Química e Iônica.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Materiais.....	27
3.2 Síntese das nanopartículas de óxido de ferro e caracterização.....	28
3.3 Desenvolvimento do protocolo de imobilização.....	28
3.4 Determinação do teor de enzima imobilizada	29
3.5 Atividade enzimática livre e imobilizada.....	29
3.6 Estudo de dessorção	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Caracterização das nanopartículas de óxido de ferro.....	30
4.2 Teor de enzima imobilizada: Bradford e atividade residual do sobrenadante	33
4.3 Determinação da atividade da α -amilase na forma livre.....	35
4.4 Atividade da α -amilase imobilizada em SPIONs.....	36
4.5 Percentual de atividade enzimática recuperada.....	37
4.6 Estudo de dessorção	39
4.7 Comparação com outros sistemas de imobilização de α -amilase	40
5 CONCLUSÃO	41

6 REFERÊNCIAS.....	43
--------------------	----

1 INTRODUÇÃO

As exigências atuais por processos industriais mais eficientes, sustentáveis e alinhados aos princípios da química verde têm impulsionado o desenvolvimento de alternativas tecnológicas ao uso de catalisadores tradicionais. Entre esses processos, a imobilização de enzimas em nanopartículas surge como uma abordagem promissora, visto que os biocatalisadores exibem vantagens em comparação aos catalisadores químicos. As enzimas são catalisadores biológicos altamente seletivos e biodegradáveis, apresentando como principal limitação o alto custo no mercado; contudo, ao se viabilizar o reúso e a recuperação desse sistema, o processo torna-se economicamente mais viável. Além disso, a imobilização enzimática em suportes nanoestruturados pode promover melhorias nas propriedades catalíticas, como o aumento da estabilidade, da especificidade e da atividade enzimática (Souza et al., 2017).

Os nanomateriais, principalmente as nanopartículas magnéticas, vêm ganhando destaque devido às suas propriedades únicas. Elas apresentam características vantajosas para utilização como suporte em processos biológicos, tais como alta área superficial e comportamento superparamagnético, o que permite a fácil separação do meio reacional por meio da aplicação de um campo magnético externo (Papatola *et al.*, 2024). Ademais, a capacidade de recuperação e o baixo custo de síntese desses materiais tornam esses suportes ideais para tais aplicações (Ali *et al.*, 2021).

As α -amilases são enzimas hidrolíticas amplamente utilizadas na indústria por catalisarem a quebra de ligações α -1,4-glicosídicas do amido, formando produtos como maltose e dextrinas. Devido à sua alta eficiência e seletividade, são fundamentais nos setores alimentício, têxtil, farmacêutico e de biocombustíveis. Entretanto, as limitações da enzima livre, como baixa estabilidade, sensibilidade ao pH e dificuldade de recuperação, tornam a imobilização em suportes nanoestruturados uma alternativa estratégica, capaz de melhorar a estabilidade, permitir o reúso e reduzir custos operacionais (Cavalcanti, 2020).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo central desenvolver um nanobiocatalisador a partir da imobilização da α -amilase (AM) em nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs), explorando uma estratégia relevante para processos catalíticos sustentáveis. Para isso, as SPIONs foram inicialmente sintetizadas com controle de tamanho e forma, seguidas de uma caracterização abrangente para assegurar a qualidade estrutural e físico-química do suporte. Em seguida, a metodologia de imobilização da α -amilase foi avaliada em pH 6,0, permitindo estabelecer as condições de adsorção e,

posteriormente, comparar a atividade da enzima na forma livre e imobilizada. Dessa forma, o trabalho buscou não apenas otimizar a formação do biocatalisador, mas também compreender o impacto da imobilização sobre o desempenho catalítico da α -amilase, contribuindo para o avanço do uso de nanopartículas magnéticas em aplicações biotecnológicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver um nanobiocatalisador baseado na imobilização da enzima α -amilase Termamyl® em suportes constituídos por nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e funcionalizar as nanopartículas magnéticas com tamanho e forma controlados;
- Caracterizar as nanopartículas sintetizadas através de técnicas como: microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio x (DRX) e espectroscopia no infravermelho (IV);
- Realizar estudos sobre a imobilização da α -amilase Termamyl® na superfície das nanopartículas sintetizadas pelo método de adsorção física;
- Determinar a atividade da enzima imobilizada e livre, comparando a eficiência do processo sob as condições estudadas;
- Avaliar a estabilidade da ligação enzima-suporte por meio de testes de dessorção sob estresse mecânico, variações de pH e presença de aditivos;
- Determinar a capacidade de reutilização do nanobiocatalisador pela avaliação da atividade catalítica ao longo de ciclos operacionais de separação magnética.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

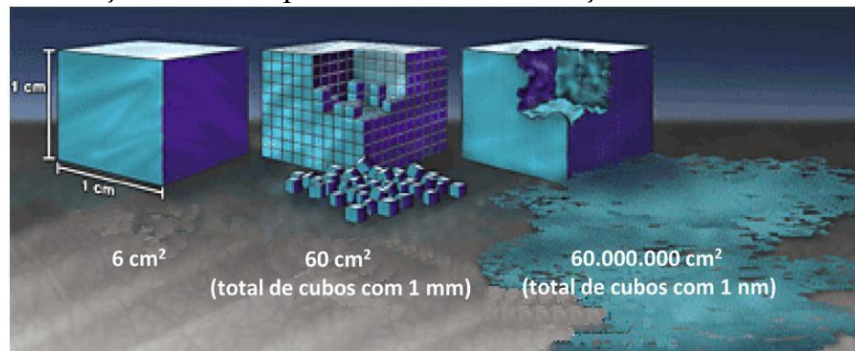
2.1 Nanopartículas como suporte para imobilização de enzimas

A nanotecnologia, ciência que opera em escala atômica e molecular, tem sido amplamente estudada devido às propriedades únicas e às diversas aplicações que os nanomateriais apresentam. Diferentemente de partículas macroscópicas, estruturas na faixa de 1 a 100 nm exibem comportamentos mecânicos, ópticos e magnéticos distintos, resultantes do

chamado efeito de tamanho e de superfície (Martins; Trindade, 2012). A redução do tamanho das partículas leva a um aumento expressivo da razão área superficial/volume, ampliando a área de contato disponível e tornando esses materiais atrativos para utilização como suportes (Cavalcanti, 2020).

Esse fenômeno pode ser ilustrado de maneira simples por meio de um exemplo geométrico. Considerando inicialmente um cubo de aresta igual a 1 cm, sua área superficial é de 6 cm² e seu volume é de 1 cm³. No entanto, ao dividir esse cubo em unidades menores com 1 mm de aresta (0,1 cm), o volume total do sistema permanece igual a 1 cm³, mas forma-se um conjunto de 1000 pequenos cubos. Como cada um deles possui área superficial de 0,06 cm², a área total torna-se 60 cm², dez vezes maior do que a do cubo inicial. Esse exemplo evidencia que, à medida que o tamanho das partículas diminui, a área superficial aumenta de forma significativa, mesmo com o volume global permanecendo constante (Cavalcanti, 2020; Martins; Trindade, 2012).

Figura 1: Evolução da área superficial com a diminuição das dimensões de um cubo



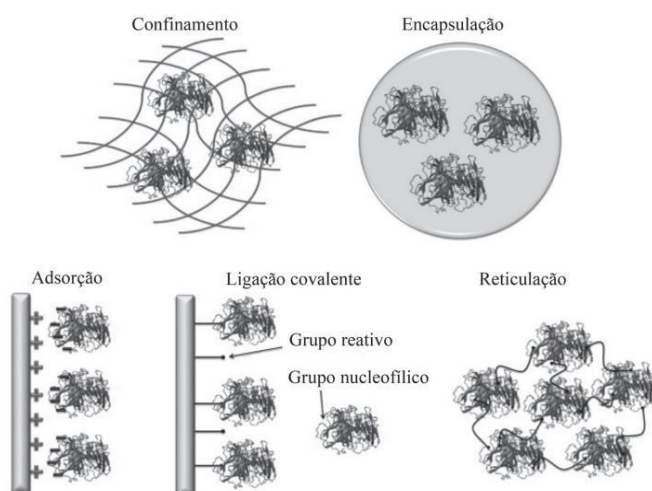
Fonte: (Martins; Trindade, 2012).

Além do aumento expressivo da área superficial, é importante destacar que a redução das dimensões das partículas também introduz desafios relacionados à estabilidade coloidal. Em escala nanométrica, as interações superficiais tornam-se dominantes, fazendo com que as nanopartículas apresentem forte tendência à aglomeração (Dulińska-litewka *et al.*, 2019). Ademais, quando não estabilizadas por agentes dispersantes ou por recobrimentos protetores, nanopartículas à base de óxidos metálicos podem sofrer processos de oxidação ou alterações químicas, o que impacta sua reatividade e funcionalidade ao longo do tempo (Quina, 2004). Por esse motivo, o controle das condições de síntese é fundamental, uma vez que parâmetros como pH, temperatura, força iônica, tipo de precursor e presença de estabilizantes influenciam diretamente o tamanho, a morfologia, a química de superfície e, conseqüentemente, as propriedades magnéticas e a estabilidade das nanopartículas (Abedanzadeh *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o uso de nanopartículas como suporte para imobilização enzimática tem sido aplicado em diversas áreas. A elevada razão área superficial/volume permite uma alta carga de imobilização por unidade de massa do suporte, o que favorece a mobilidade conformacional da enzima e minimiza interações laterais indesejadas (enzima-enzima). Isso contribui para a redução das barreiras de difusão dos substratos, resultando em melhor atividade enzimática (Morte, 2020).

Outrossim, o suporte utilizado exerce grande influência sobre o desempenho do biocatalisador, podendo aumentar a estabilidade da enzima, facilitar sua recuperação e possibilitar seu reuso em diferentes aplicações biotecnológicas e industriais (Morte, 2020). Existem diversos métodos de imobilização descritos na literatura, não havendo um procedimento universal aplicável a todas as enzimas. Entre as principais estratégias, destacam-se a encapsulação, o confinamento, a adsorção (física ou iônica), a ligação covalente e a reticulação (Souza *et al.*, 2017).

Figura 2: Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: (Fernández; Sanromán; Moldes, 2013).

Os tipos de nanomateriais utilizados como suporte distinguem-se de acordo com as características e objetivos de cada pesquisa. Dentre os mais comuns estão as nanopartículas inorgânicas (como as de ouro e as magnéticas), nanopartículas poliméricas (micelas, quitosana), nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanotubos de carbono e pontos quânticos (Faraji; Wipf, 2009).

Além do método de síntese, parâmetros estruturais como a forma e o tamanho das nanopartículas (NPs) influenciam diretamente sua estabilidade e desempenho. Dessa forma, a escolha da matéria-prima utilizada na produção dessas NPs torna-se uma variável crucial, uma

vez que determina não apenas suas propriedades físico-químicas, mas também o tipo de interação que poderão estabelecer com as biomoléculas (Eker *et al.*, 2024).

De maneira geral, as nanopartículas podem ser classificadas em três grandes categorias, conforme o material constitutivo: inorgânicas, à base de carbono e orgânicas, como ilustrado na Figura 3. Cada uma dessas classes subdivide-se em diferentes tipos: metálicas, cerâmicas, poliméricas ou lipídicas, que apresentam características estruturais, químicas e morfológicas distintas. Essas variações afetam diretamente o comportamento das NPs em suspensão, sua biocompatibilidade, suas propriedades magnéticas ou ópticas e, especialmente, sua capacidade de atuar como suporte eficiente para imobilização enzimática (Eker *et al.*, 2024; Faraji; Wipf, 2009).

Figura 3: Classificação dos tipos de nanopartículas



Fonte: Adaptado de (Eker *et al.*, 2024).

Entre os suportes mais estudados para imobilização enzimática, destacam-se as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs). Esse tipo de nanopartícula, composto majoritariamente de magnetita, apresenta comportamento superparamagnético, respondendo rapidamente a um campo magnético externo sem reter magnetização residual após sua remoção. Tal característica permite a separação do biocatalisador do meio reacional de forma simples, rápida e eficiente, apenas com o uso de um ímã, favorecendo etapas como recuperação, purificação e reúso do sistema (Cavalcanti, 2020). Vale ressaltar que a manipulação magnética elimina etapas potencialmente agressivas à estrutura enzimática, como centrifugação ou filtração vigorosa, reduzindo perdas de atividade e contribuindo para maior estabilidade operacional. Somadas à alta área superficial e ao baixo custo de síntese, essas propriedades tornam as SPIONs um suporte particularmente atrativo para a imobilização de enzimas (Souza *et al.*, 2017).

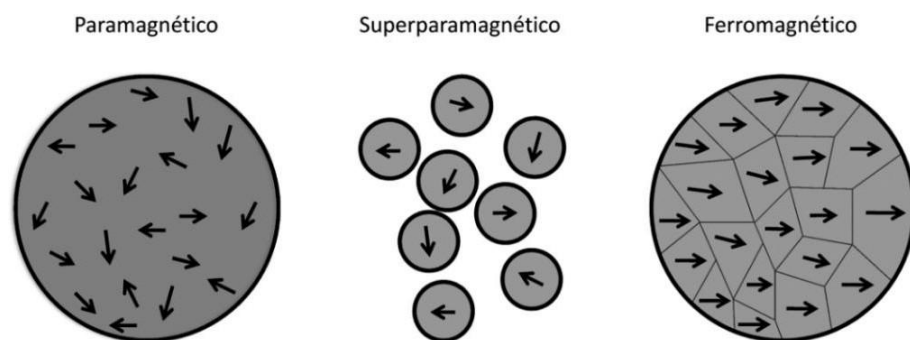
2.2 Nanopartículas magnéticas

Os nanomateriais magnéticos têm despertado grande interesse devido aos efeitos quânticos associados à redução de tamanho e ao aumento da razão área superficial/volume. Quando a dimensão das partículas atinge a escala nanométrica, propriedades magnéticas que são estáveis no estado macroscópico passam a se comportar de maneira distinta, surgindo fenômenos como o tunelamento quântico, a flutuação térmica dos momentos magnéticos e, sobretudo, o superparamagnetismo (Tasca *et al.*, 2015).

Do ponto de vista estrutural, os materiais magnéticos apresentam momentos dipolares originados do movimento de elétrons desemparelhados nos íons metálicos. Esses momentos podem organizar-se de maneira paralela ou antiparalela na rede cristalina, formando regiões de ordenamento denominadas domínios magnéticos. A formação, a estabilidade e a orientação desses domínios dependem de fatores como composição, cristalinidade, tamanho e forma das partículas (Martins; Trindade, 2012). Contudo, em escala nanométrica, a redução dos domínios e o aumento da relação superfície/volume tornam a magnetização muito mais suscetível às interações térmicas e às flutuações de spin, modificando profundamente o comportamento magnético (Figuerola *et al.*, 2010).

Nesse contexto, os materiais podem ser classificados em diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos e antiferromagnéticos, conforme ilustrado na Figura 4. É importante destacar que essas categorias não são rígidas, pois as propriedades magnéticas são extremamente sensíveis ao tamanho, à geometria e à temperatura, podendo ser alteradas significativamente conforme a variação desses parâmetros (Figuerola *et al.*, 2010; Martins; Trindade, 2012).

Figura 4: Diferentes tipos do comportamento magnético dos materiais



Fonte: (Martins; Trindade, 2012)

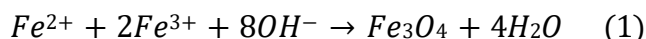
Com base nessa classificação, os materiais diamagnéticos não apresentam dipolos magnéticos permanentes e respondem negativamente a um campo magnético externo, gerando

uma magnetização induzida em sentido oposto ao campo aplicado. Já os materiais paramagnéticos possuem dipolos magnéticos desordenados na ausência de campo externo, os quais podem se alinhar parcialmente quando submetidos a um campo aplicado. Entre os materiais que apresentam ordenamento magnético espontâneo, destacam-se os ferromagnéticos, que exibem dipolos alinhados paralelamente mesmo sem a ação de um campo externo, resultando em magnetização permanente. Os materiais ferrimagnéticos possuem dipolos antiparalelos de intensidades distintas, gerando um momento magnético resultante diferente de zero. Por fim, os materiais antiferromagnéticos apresentam dipolos igualmente intensos e antiparalelos, de modo que seus momentos magnéticos se cancelam na ausência de um campo externo; MnO, CoO e NiO são exemplos típicos desse comportamento (Cavalcanti, 2020; Martins; Trindade, 2012).

Avançando para a escala nanométrica, quando as partículas magnéticas são reduzidas abaixo de um tamanho crítico (raio superparamagnético), a formação de múltiplos domínios torna-se energeticamente desfavorável, resultando em partículas de domínio único (*single-domain*). Em tamanhos ainda menores, a energia térmica é suficiente para desalinhar espontaneamente os spins, fazendo com que a magnetização seja mantida apenas sob ação de um campo externo. Esse fenômeno, denominado superparamagnetismo (Bean; Jacobs, 1956; Figuerola *et al.*, 2010), é particularmente relevante para aplicações em separação magnética. Entre as nanopartículas magnéticas mais usuais, destacam-se as compostas por ferro, cobalto e níquel (Cavalcanti, 2020; Martins; Trindade, 2012).

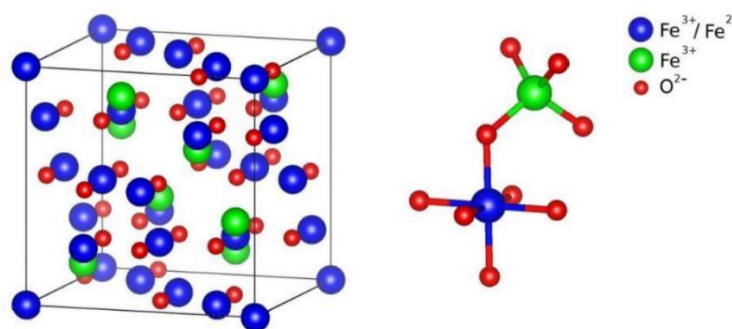
Especificamente no caso do ferro, as nanopartículas podem assumir diferentes formas de óxidos, como ferrihidrita (Fe_3HO_8), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e magnetita (Fe_3O_4). Embora todas apresentem aplicações tecnológicas, apenas a magnetita, e em casos específicos, a maguemita, possui momento magnético suficientemente alto, baixa toxicidade, um processo de obtenção economicamente viável e estabilidade química para ser aplicada em sistemas biológicos (Cavalcanti, 2020; Figuerola *et al.*, 2010).

Dessa forma, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) são constituídas predominantemente de magnetita, um óxido misto de FeO (óxido de ferro II) e Fe_2O_3 (óxido de ferro III) na proporção 1:2, correspondendo à fórmula Fe_3O_4 . Entre os métodos de síntese disponíveis, o mais utilizado é a coprecipitação, na qual íons Fe^{2+} e Fe^{3+} reagem em meio alcalino sob atmosfera inerte, produzindo nanopartículas esféricas com distribuição de tamanho uniforme. A ausência de oxigênio é fundamental para evitar a oxidação da magnetita a hidróxidos férricos indesejáveis (Mahmoudi *et al.*, 2011). A reação global é representada por:



A estrutura da magnetita é do tipo espinélio invertido e foi proposta pela primeira vez por Bragg em 1915. Um espinélio ideal pode ser representado pela fórmula geral AB_2X_4 , onde A e B indicam cátions metálicos com valências diferentes e o oxigênio atua como ânion. Na rede cristalina da magnetita, os íons O^{2-} formam um arranjo cúbico de face centrada (CFC) que dá origem a dois tipos de sítios intersticiais: o tetraédrico e o octaédrico. Na estrutura invertida, os íons Fe^{3+} ocupam tanto os sítios tetraédricos quanto parte dos sítios octaédricos, enquanto os íons Fe^{2+} ocupam exclusivamente os sítios octaédricos remanescentes. Esse material pertence ao grupo espacial de simetria $Fd\bar{3}m$, com oito fórmulas unitárias por célula unitária (Bini, 2016).

Figura 5: Célula unitária da estrutura cristalina do tipo espinélio.



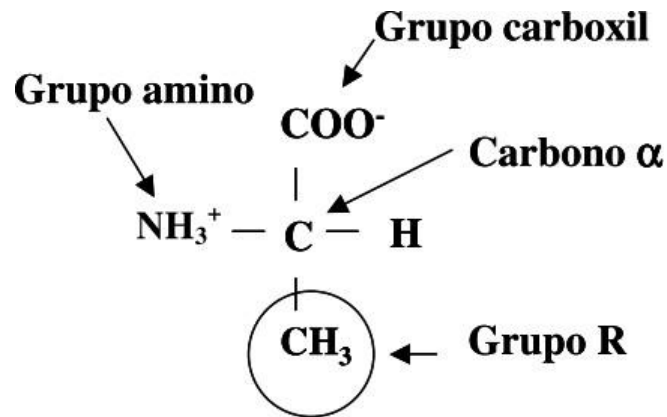
Fonte: (Bini, 2016).

2.3 α -Amilase (AM)

As proteínas são macromoléculas biológicas formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, constituídas pela união de aminoácidos conectados entre si por ligações peptídicas. Esses aminoácidos, divididos em um conjunto de vinte unidades estruturais padrão, diferenciam-se apenas pela cadeia lateral R, enquanto compartilham a mesma estrutura fundamental: um carbono α assimétrico ligado a um grupo carboxila, a um grupo amino primário e a um átomo de hidrogênio. A sequência específica desses resíduos ao longo da cadeia polipeptídica determina as propriedades físico-químicas e a função biológica da proteína (Cavalcanti, 2020; Marco, 2006).

A diversidade estrutural e funcional das proteínas deriva justamente da variação química das cadeias laterais R, que confere propriedades físico-químicas essenciais, como polaridade, hidrofobicidade e capacidade de ionização. As interações entre essas cadeias, distribuídas em regiões polares e apolares, contribuem para a estabilidade e a manutenção da estrutura tridimensional, assegurando a atividade biológica de proteínas e enzimas (Cavalcanti, 2020).

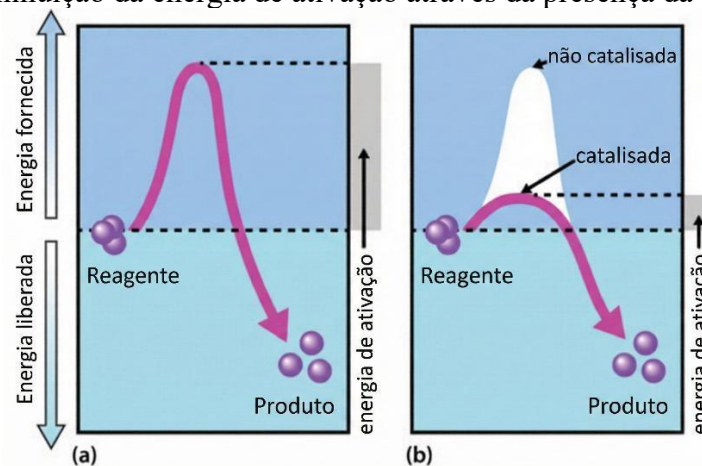
Figura 6: Estrutura básica dos aminoácidos.



Fonte: (Torres, 2006).

Dentro desse amplo grupo, as enzimas constituem uma classe particular de proteínas que atuam como catalisadores biológicos altamente seletivos, aumentando significativamente a velocidade das reações químicas sem serem consumidas no processo. Essa capacidade catalítica decorre de sua elevada especificidade pelo substrato, determinada pela conformação tridimensional e pela distribuição de cargas no sítio ativo. Dessa forma, apenas moléculas que apresentam configuração complementar conseguem se ligar adequadamente e ser convertidas em produtos. Além disso, as enzimas reduzem a energia de ativação necessária para alcançar o estado de transição, tornando-o cineticamente mais acessível e acelerando a reação sem modificar os níveis de energia livre dos reagentes ou dos produtos, como ilustrado na Figura 7 (Marco, 2006; Robinson, 2015).

Figura 7: Diminuição da energia de ativação através da presença da enzima no meio.

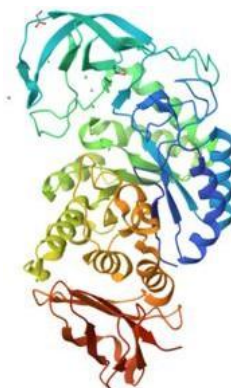


Fonte: Adaptado de (Robinson, 2015)

Historicamente, o termo enzima foi utilizado pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne, em 1878, ao descrever a capacidade do fermento de produzir álcool a partir de açúcares. A palavra deriva das raízes gregas *en* (“dentro”) e *zyme* (“levedura”). Apesar dos

avanços nos séculos XIX e XX quanto à extração e caracterização de enzimas, somente na década de 1920 elas foram cristalizadas, permitindo o estudo detalhado de suas estruturas (Robinson, 2015).

Figura 8: Estrutura cristalina da α -amilase Termamyl®.



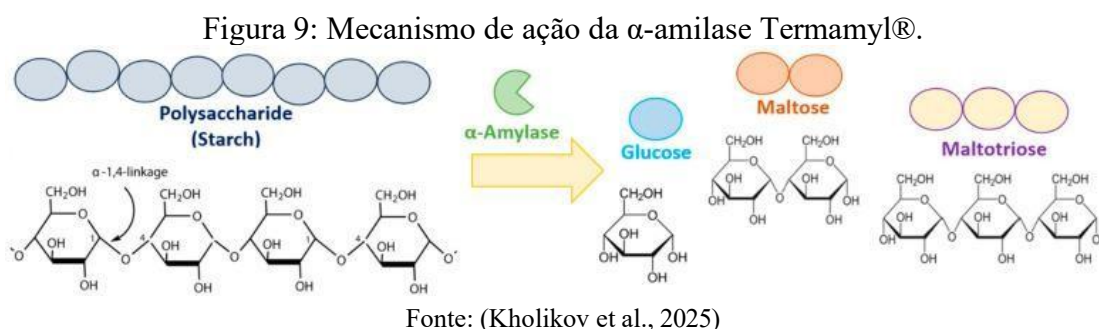
Fonte: Protein Data Bank < <https://doi.org/10.2210/pdb1BPL/pdb> > Acesso em 19/11/2025

Em 1894, o químico alemão Emil Fischer propôs que a especificidade enzimática resultava da complementaridade estrutural entre o substrato e o sítio ativo, formulando a chamada “hipótese da chave e fechadura”. Nessa analogia, apenas uma chave com formato correto se encaixa na fechadura, assim como apenas o substrato adequado se ajusta ao sítio ativo. Contudo, com a obtenção de modelos cristalográficos mais detalhados, verificou-se que as enzimas não apresentam estrutura rígida, mas sim elevada flexibilidade. Assim, em 1958, Daniel Koshland ampliou as ideias de Fischer ao propor o “modelo do ajuste induzido”, segundo o qual a enzima sofre pequenas alterações conformacionais para acomodar o substrato, de maneira semelhante ao ajuste de uma luva ao ser colocada na mão (Robinson, 2015).

Por apresentarem elevada especificidade estrutural e funcional, as enzimas reconhecem seletivamente seus substratos e promovem transformações químicas de forma eficiente e sob condições brandas de temperatura e pH. Tais características as tornam fundamentais tanto nos sistemas biológicos, onde desempenham papéis centrais no metabolismo, quanto em diversas aplicações industriais e médicas (Robinson, 2015).

As amilases, especificamente, são enzimas hidrolíticas que clivam ligações glicosídicas, atuando principalmente sobre ligações do tipo α -glicosídicas em polissacarídeos. Dividem-se em três classes principais: α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase. A α -amilase é uma endoenzima que rompe ligações α -1,4 no interior das cadeias de amido, formando dextrinas, maltose e maltotriose. A β -amilase é uma exoenzima que hidrolisa sequencialmente ligações α -1,4 a partir da extremidade não redutora, liberando β -maltose. Já a amiloglucosidase cliva

ligações α -1,4e α -1,6, liberando glicose diretamente da extremidade não redutora (Silva *et al.*, 2017).



Essas enzimas são amplamente encontradas na natureza, desempenhando funções essenciais em diversos organismos. Em animais, incluindo humanos, atuam na digestão do amido; em plantas, participam da germinação e mobilização de reservas energéticas; e em microrganismos, especialmente dos gêneros *Bacillus* e *Aspergillus*, são produzidas com alta eficiência (Silva *et al.*, 2017).

As enzimas de origem microbiana destacam-se para fins industriais devido ao elevado rendimento, estabilidade e possibilidade de manipulação genética. Microrganismos termofílicos, em particular, produzem amilases termoestáveis com maior resistência a variações drásticas de pH e temperatura (Silva, 2020). A α -amilase possui grande importância biotecnológica e ampla demanda de mercado, estando presente na indústria de celulose, na panificação, na clarificação de cervejas, na produção de etanol e em processos têxteis, como a desengomagem (Kikani, 2022).

No que se refere às condições de atividade, as α -amilases apresentam parâmetros ótimos que variam conforme sua origem. Amilases vegetais geralmente exibem pH ótimo em torno de 5,0 e temperatura ótima próxima a 40 °C, enquanto as de origem animal operam melhor em pH próximo a 6,8 e 37 °C. Já a α -amilase produzida por *Bacillus licheniformis*, uma variante termoestável de massa molar 55,32 kDa, é amplamente utilizada na indústria devido à sua robustez estrutural (Silva, 2020).

A enzima comercial Termamyl®, derivada desse microrganismo, apresenta pH ótimo na faixa de 5,5 a 7,0 e temperatura ótima entre 60 e 100 °C. Seu ponto isoelétrico (7,18) contribui para sua estabilidade em diferentes condições de processamento. Em comparação com α -amilases vegetais e animais, que operam em temperaturas mais baixas (40–70 °C), a Termamyl® destaca-se por sua elevada tolerância térmica e eficiência catalítica, sendo ideal para processos conduzidos em condições extremas (Silva-Salinas *et al.*, 2021; Torres; Leonel; Mischan, 2012).

2.4 Imobilização da α -amilase

O processo de imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido, cujo objetivo principal é formar um biocatalisador passível de reutilização, tornando seu uso economicamente mais vantajoso (Mendes; Castro; Giordano, 2011). De maneira geral, não existe um único método de imobilização aplicável a todas as enzimas; contudo, todas as técnicas apresentam vantagens que variam conforme a biomolécula e a aplicação desejada. Entre os benefícios destacam-se: o prolongamento da atividade catalítica, a facilidade na separação do produto, a recuperação simplificada do biocatalisador e, em alguns casos, o aumento da estabilidade frente a variações de pH e temperatura (Cavalcanti, 2020).

Além disso, quando a enzima é imobilizada, algumas de suas propriedades físico-químicas podem ser alteradas em decorrência das modificações impostas pelas forças intermoleculares envolvidas no processo (Cavalcanti, 2020). Assim, o desempenho da enzima imobilizada depende fortemente das características do suporte. A escolha criteriosa desse material pode aumentar o tempo de meia-vida do biocatalisador, tornando o processo industrialmente mais atrativo (Bayazidi; Almasi; Asl, 2018). Dessa forma, as diversas vantagens proporcionadas pela imobilização justificam sua ampla aplicação em diferentes setores, uma vez que a facilidade na separação das fases resulta em ganhos econômicos e ambientais significativos (Bayazidi; Almasi; Asl, 2018).

Para a correta avaliação do processo de imobilização da α -amilase, um passo fundamental é o estabelecimento de um método confiável para a medida da atividade enzimática. Isso permite determinar a eficiência catalítica antes e após a fixação no suporte. O método do DNS baseia-se em uma reação de oxirredução entre os grupos redutores dos carboidratos e o reagente. Em meio alcalino e sob aquecimento, o grupo hemiacetal terminal dos monossacarídeos e oligossacarídeos é oxidado, enquanto o ácido 3,5-dinitrossalicílico (amarelo) é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, de coloração vermelho-tijolo intensa. Essa conversão gera um complexo cromóforo estável, cujo máximo de absorção em 540 nm permite quantificar, por espectrofotometria, a concentração de açúcares redutores presentes na amostra, correlacionando-a diretamente com a atividade da enzima (Maldonade; Carvalho; Ferreira, 2013).

A α -amilase pode ser imobilizada em diferentes tipos de suporte, dependendo da finalidade da aplicação. Um exemplo relevante é o trabalho de (Mardani *et al.*, 2018) no qual a α -amilase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em microesferas nanoestruturadas de quitosana-montmorilonita, visando aumentar a estabilidade da enzima. As nanopartículas de

montmorilonita (10–30 nm) foram incorporadas à quitosana e a superfície das esferas foi ativada com glutaraldeído, possibilitando a imobilização covalente da enzima com eficiência de aproximadamente 87%. Os autores concluíram que o sistema apresentou alta estabilidade de estocagem (perda de apenas 36% da atividade em 40 dias a 4 °C, contra 95% para a enzima livre), maior resistência térmica e ácida, além de manter atividade catalítica significativa após cinco ciclos de reutilização.

Outro estudo importante foi conduzido por (Khan; Husain; Ansari, 2013), o qual a α -amilase foi imobilizada em nanocompósitos de prata suportados em polianilina. Após a síntese dos nanocompósitos polianilina-Ag por oxidação química, obtiveram-se filmes condutores com nanopartículas de prata homogeneamente dispersas, alta área superficial e elevada estabilidade térmica, caracterizados por DRX, TGA, MEV e FTIR. A enzima foi então covalentemente conjugada à superfície funcionalizada, resultando em um biocatalisador com maior tolerância a variações de pH e temperatura e maior eficiência na hidrólise de amido em batelada quando comparado à forma livre, evidenciando o potencial desses materiais como suportes robustos para biotecnologia.

2.4.1 Adsorção Física, Química e Iônica

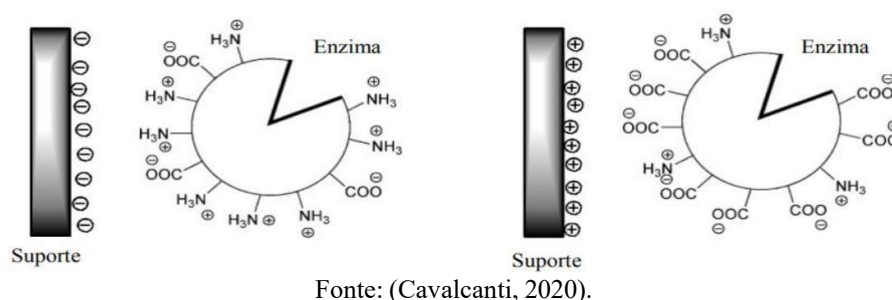
A imobilização de enzimas pode ser realizada através de métodos como a adsorção física e a química. A adsorção física (fisissorção) é um processo reversível, governado por interações hidrofóbicas não específicas, eletrostáticas fracas, ligações de hidrogênio e, principalmente, por forças de Van der Waals, as quais se assemelham às forças de coesão molecular. Esse conjunto de interações possibilita a fixação da enzima e a formação de multicamadas de adsorbato na superfície do suporte (Agboola; Benson, 2021).

Já a adsorção química (quimissorção) distingue-se da fisissorção por envolver a formação de ligações químicas fortes entre o adsorbato e a superfície. Esse processo ocorre mediante a troca ou compartilhamento de elétrons entre a enzima e o suporte, caracterizando-se por elevada entalpia, irreversibilidade e alta especificidade. Frequentemente descrita por modelos cinéticos de pseudo-segunda ordem, a quimissorção costuma ser uma etapa determinante em catálise heterogênea e na remoção de metais pesados (Kulkarni, 2017). Vale ressaltar que os dois fenômenos podem coexistir, sendo possível a formação de uma camada quimissorvida sobre a qual se depositam multicamadas fisissorvidas (Webb, 2003).

Conforme mencionado anteriormente, as interações eletrostáticas, frequentemente denominadas adsorção iônica ou troca iônica, inserem-se no contexto dos métodos de adsorção física. A troca iônica é definida como um processo estequiométrico e reversível, caracterizado

pela interação atrativa entre os resíduos de aminoácidos carregados da enzima e os grupos de carga oposta presentes na superfície do suporte (Figura 10). Nesse sentido, a eficiência da imobilização é governada por parâmetros críticos como o pH do meio reacional, o ponto isoelétrico (pI) da enzima e a distribuição de cargas na superfície do suporte (Cavalcanti, 2020).

Figura 10: Representação da interação iônica de uma enzima e seu suporte com diferentes distribuições de cargas na superfície.



Quando o pH da solução utilizada se iguala ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, as quantidades de cargas positivas e negativas se equivalem, resultando em uma molécula com carga líquida nula. Em condições de pH abaixo do pI, as proteínas adquirem carga líquida positiva, ao passo que, em valores superiores ao pI, tornam-se negativamente carregadas. Conseqüentemente, a minimização das repulsões eletrostáticas nas interfaces enzima–enzima e enzima–suporte favorece a densidade de empacotamento, sendo a capacidade máxima de adsorção geralmente observada em valores próximos ao pI da enzima (Rabe; Verdes; Seeger, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foi realizada a síntese e a caracterização das nanopartículas magnéticas utilizadas como suporte para a imobilização da enzima. Na etapa seguinte, foram avaliadas as diferentes condições de imobilização, bem como a determinação da atividade enzimática da α -amilase livre e imobilizada, obtendo-se o nanobiocatalisador SPION@AM. Por fim, foram conduzidas análises de estabilidade e dessorção do conjugado. A seguir, apresenta-se a descrição detalhada dos materiais e procedimentos empregados.

3.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados durante a síntese, caracterização e ensaios enzimáticos apresentavam grau de pureza analítica, sendo utilizados sem purificação prévia. Os materiais empregados na síntese foram: sulfato de ferro (II) hepta-hidratado (99%, Sigma-Aldrich),

cloreto de ferro (III) anidro (99%, Vetec) e hidróxido de sódio (99%, Sigma-Aldrich). O solvente utilizado em todas as etapas foi água deionizada obtida de um sistema de purificação Milli-Q (resistividade de 18,2 M Ω ·cm, Millipore, Bedford, EUA). Durante as sínteses, foi utilizado gás nitrogênio (N₂) (99%, White Martins) para atmosfera inerte.

Para o preparo da solução de Bradford, foram utilizados: corante Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol 95%, ácido fosfórico 85% e albumina sérica bovina (BSA). Para as medidas de atividade enzimática, foram empregados: acetato de sódio P.A. (99,2%, NEON), ácido acético glacial (99,7%, Synth), amido solúvel P.A. (Vetec), enzima α -amilase Termamyl®, ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado.

3.2 Síntese das nanopartículas de óxido de ferro e caracterização

As nanopartículas foram obtidas através do método de coprecipitação desenvolvido por (Park *et al.*, 2011) e adaptado por (Cavalcanti, 2020). Foram preparadas duas soluções precursoras: uma contendo 6,9505 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O_{(s)}$, em balão volumétrico de 100 mL, e outra contendo 13,5150 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O_{(s)}$ anidro, também em balão volumétrico de 100 mL, completando-se os volumes com água deionizada. Ambas as soluções foram vertidas em um balão de três vias de fundo redondo (500 mL), mantido sob agitação mecânica constante e atmosfera inerte de nitrogênio.

Posteriormente, foram adicionados ao sistema, por gotejamento via bomba peristáltica (vazão de 0,100 mL.min⁻¹), aproximadamente 60 mL de uma solução de NaOH 10 mol.L⁻¹ até o final da reação. Após o término da síntese, o precipitado negro foi separado magneticamente com auxílio de um ímã de neodímio e lavado exaustivamente com água deionizada até atingir pH neutro. O material foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas. A caracterização do material sintetizado foi realizada pelas seguintes técnicas: Espectroscopia no Infravermelho (FTIR), Difração de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3.3 Desenvolvimento do protocolo de imobilização

Inicialmente, 300 mg das nanopartículas foram incubadas em etanol 95% para remoção de possíveis impurezas superficiais, mantidas sob condições estáticas por 24 h. Após esse período, as nanopartículas foram lavadas com água deionizada e recuperadas magneticamente (Cavalcanti, 2020).

O processo de imobilização foi realizado pelo método de adsorção física, conforme descrito por Pereira (2014). Os 300 mg de SPIONs, previamente tratados, foram adicionados a

19,68 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), juntamente com 320 μ L de α -amilase Termamyl® correspondente a um excesso cinco vezes maior que a carga teórica calculada). O sistema foi mantido sob agitação orbital de 200 rpm a 25 °C por 24 h. Ao final, o nanobiocatalisador (SPION@AM) foi separado do sobrenadante por aplicação de campo magnético externo. O sobrenadante foi recolhido para quantificação de proteína residual e o sólido foi armazenado para os ensaios de atividade.

3.4 Determinação do teor de enzima imobilizada

A quantificação de proteína foi baseada no método de Bradford (1976). O reagente foi preparado dissolvendo-se 10 mg do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 5 mL de etanol 95%. Em seguida, foram adicionados 10 mL de ácido fosfórico (85% P.A.), e a solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água deionizada. Após homogeneização, a solução foi filtrada, armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração a 4 °C.

Para a quantificação, construiu-se uma curva de calibração utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, na faixa de concentração entre 2 e 15 μ g.mL⁻¹. Alíquotas da solução estoque de BSA (0,1 mg.mL⁻¹) foram misturadas a 2700 μ L do reagente de Bradford, completando-se o volume final para 3000 μ L com água deionizada. As leituras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro UV-Vis a 595 nm.

O teor de enzima imobilizada foi determinado indiretamente pela quantificação de proteína no sobrenadante pós-imobilização. Alíquotas de 100 μ L do sobrenadante foram adicionadas a 5,0 mL do reagente de Bradford e, após 5 min de reação estática, a absorbância foi medida a 595 nm. A concentração foi calculada utilizando a equação da reta obtida na curva de calibração (R^2 satisfatório).

3.5 Atividade enzimática livre e imobilizada

A atividade enzimática foi determinada pela quantificação de açúcares redutores formados na hidrólise do amido, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). O reagente DNS foi preparado conforme metodologia descrita na literatura (Maldonado; Carvalho; Ferreira, 2013). Uma curva de calibração foi construída utilizando glicose como padrão para correlacionar a absorbância com a concentração de açúcares redutores.

O substrato consistiu em uma solução de amido solúvel a 2% (m/v), preparada pela dissolução de 1 g de amido em 25 mL de água destilada sob aquecimento até gelatinização

completa (aspecto translúcido). A solução foi avolumada para 50 mL com tampão acetato pH 5,2. Para o ensaio enzimático, foram adicionados 1,0 mL da solução de amido em um tubo de ensaio (Tubo 1), o qual foi incubado a 37 °C. Após 10 min, tempo estimado para equilíbrio térmico, adicionou-se 1,0 mL do complexo enzimático, mantendo a incubação nas mesmas condições por mais 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de NaOH 1 N, seguida de resfriamento imediato em banho de gelo.

Para o ensaio da enzima livre, 1,0 mL da solução de amido foi incubado a 37 °C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL da solução enzimática (sobrenadante da imobilização), mantendo-se a reação por 15 min. A hidrólise foi interrompida pela adição de 0,5 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹ seguida de resfriamento em banho de gelo. Para a revelação, 1,0 mL da mistura reacional foi transferido para um novo tubo contendo 1,0 mL do reagente DNS. O sistema foi aquecido em banho-maria (100 °C) por 5 min, resfriado e diluído com 8,0 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 540 nm.

Para a enzima imobilizada (SPION@AM), utilizou-se 10 mg do biocatalisador sólido em substituição à solução enzimática. O procedimento seguiu as mesmas condições (amido 2%, 37 °C, 15 min). Ao final, aplicou-se um campo magnético para separação das nanopartículas e o sobrenadante foi recolhido. Adicionou-se 0,5 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹ ao sobrenadante para garantir a interrupção da reação e seguiu-se com a etapa de adição do DNS e leitura espectrofotométrica a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6 Estudo de dessorção

A estabilidade da ligação enzima-suporte foi avaliada por testes de dessorção sob estresse mecânico. Para isso, 10 mg de SPION@AM foram ressuspensos em 2 mL de água deionizada e submetidos a banho ultrassônico por 5 min. Após a separação magnética, o sobrenadante foi analisado pelo método de Bradford para verificar a presença de proteína lixiviada. O procedimento foi repetido por 5 ciclos consecutivos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

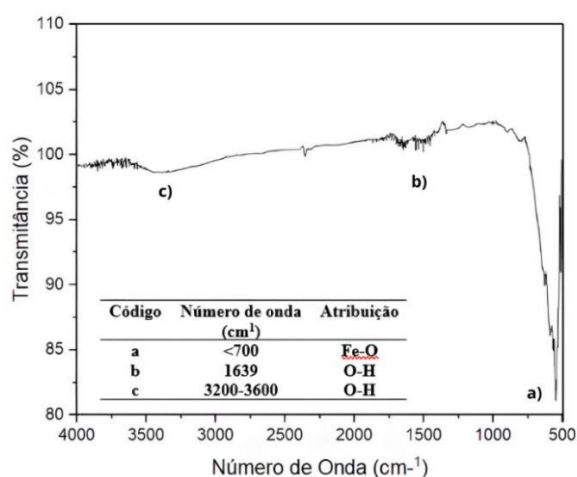
4.1 Caracterização das nanopartículas de óxido de ferro

As SPIONs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação de íons Fe²⁺ e Fe³⁺ em meio aquoso com adição de uma base, um processo simples comparado a outras metodologias. Esse método permitiu a realização da síntese produzindo partículas de pequenos tamanhos e homogêneas. De forma geral, o tamanho e a forma das nanopartículas são influenciados por

fatores como concentração de íons, pH, tempo de síntese, concentração do agente redutor, velocidade de agitação e temperatura. A metodologia usada no presente trabalho já foi amplamente testada no nosso grupo de pesquisa e permite a nucleação rápida seguida de crescimento lento, o que é crucial para obter nanopartículas homogêneas. De forma geral, a caracterização das SPIONs foi conduzida por espectroscopia no infravermelho (IV), Difração de Raios-X e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de materiais, pois permite analisar as vibrações das ligações químicas e identificar grupos funcionais, modos de coordenação, interações de superfície e alterações estruturais. Nessa técnica, a radiação infravermelha interage diretamente com a amostra e o equipamento gera um espectro de absorbância ou transmitância em função do número de onda, no qual as bandas observadas indicam as frequências absorvidas e permitem inferir os grupos funcionais presentes no material (Gong; Chen; Wu, 2024).

Figura 11: Caracterização por FTIR conduzida nas SPIONs.



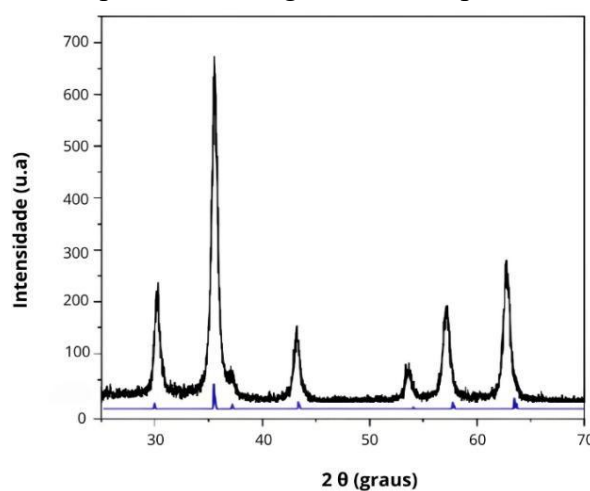
Fonte: Autor.

As amostras de SPIONs analisadas por FTIR apresentaram bandas características da ligação Fe-O. A absorção abaixo de 700 cm⁻¹ se refere às deformações das ligações Fe-O nos sítios octaédricos e tetraédricos do óxido de ferro na forma de magnetita (Márquez *et al.*, 2017). A banda na região de 3200 cm⁻¹ a 3600 cm⁻¹ e em 1639 cm⁻¹ deve-se às vibrações de estiramento O-H, associadas à presença de água e grupos hidroxilas provenientes da etapa de síntese (Răcuci; Creangă; Airinei, 2006). Bandas de absorção similares foram obtidas para as nanopartículas do trabalho de (Cavalcanti, 2020), comprovando a natureza das nanopartículas na amostra.

A Difração de Raios X (DRX) é uma técnica fundamental para a caracterização de nanopartículas. O método fornece um padrão de difração que atua como uma "impressão digital" de cada arranjo atômico, permitindo a obtenção de informações detalhadas sobre a estrutura cristalina e os parâmetros de rede. A composição das fases presentes pode ser determinada comparando-se a posição e a intensidade dos picos experimentais com os padrões de referência disponíveis no *International Centre for Diffraction Data* (ICDD). O difratograma resultante consiste em um gráfico que apresenta a intensidade dos raios X difratados em função do ângulo de varredura 2θ (Kumar, 2022).

A análise do difratograma (Figura 5) revelou picos de difração em 2θ correspondentes a $30,2^\circ$; $35,6^\circ$; $43,2^\circ$; $53,6^\circ$; $57,1^\circ$ e $62,8^\circ$. Esses sinais são atribuídos, respectivamente, aos planos (220), (311), (400), (422), (511) e (440), característicos da estrutura de espínélio invertido da magnetita Fe_3O_4 . A estrita concordância desse perfil com os dados reportados por (Cavalcanti, 2020), que utilizou rota sintética análoga, confirma a identidade química das nanopartículas e atesta a reprodutibilidade do método de síntese.

Figura 12: Difratograma das SPIONs onde, em azul é apresentado o padrão de DRX para a magnetita e em preto o difratograma obtido para as SPIONs sintetizadas.



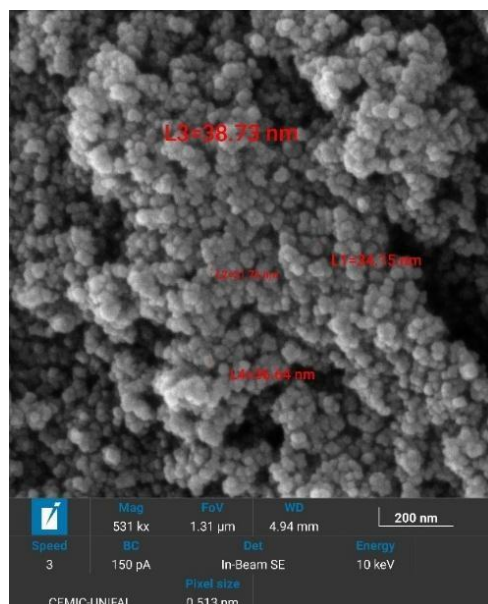
Fonte: Autor.

Por fim, a caracterização morfológica foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Esta técnica utiliza um feixe de elétrons focalizado para varrer a superfície da amostra, gerando sinais (como elétrons secundários e retroespalhados) que são convertidos em imagens com resolução significativamente superior à da microscopia óptica. Para nanomateriais, o MEV é fundamental na determinação da morfologia superficial, tamanho e forma das partículas (Lin *et al.*, 2014).

Na análise das SPIONs em estado sólido, a micrografia (Figura 8) evidenciou a formação de aglomerados com dimensões aproximadas de 200 nm, um fenômeno

frequentemente atribuído ao processo de secagem da amostra, que favorece a aproximação das interfaces devido à alta energia superficial. Entretanto, a análise individualizada das partículas permitiu estimar um tamanho médio primário de aproximadamente 20 nm.

Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das SPIONs.



Fonte: Autor.

4.2 Teor de enzima imobilizada: Bradford e atividade residual do sobrenadante

O teor de proteína da solução de enzima utilizada na imobilização foi inicialmente avaliado pelo método de Bradford, empregando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A curva de calibração foi ajustada segundo:

$$A_{595} = 0,9745 m + 0,0421 \quad (R^2 = 0,9921) \quad (5)$$

em que A_{595} é a absorvância a 595 nm e m é a massa de proteína presente na alíquota analisada (μg). A inclinação próxima de 1 e o coeficiente de determinação elevado indicam uma boa linearidade na faixa de trabalho originalmente estabelecida para o método.

Para a solução inicial de Termamyl® usada na imobilização, a absorvância medida após diluição adequada situou-se confortavelmente dentro da faixa linear da curva, permitindo uma estimativa confiável da massa de proteína e, conseqüentemente, de sua concentração aproximada. Essa informação serve como referência para a quantidade total de proteína enzimática adicionada ao sistema de imobilização.

Por outro lado, as amostras de sobrenadante obtidas após o contato da solução enzimática com as nanopartículas magnéticas (SPIONs) apresentaram absorvâncias muito próximas do valor do branco, caindo abaixo da faixa em que a Eq. (5) pode ser aplicada com

segurança. Nessa região, pequenas variações instrumentais no valor de A_{595} produzem grande incerteza na massa de proteína calculada (incluindo valores próximos de zero ou até negativos quando se considera o intercepto), o que indica que o teor de proteína residual está abaixo do limite de quantificação (LOQ) do método nas condições usadas.

Complementarmente, a atividade catalítica do sobrenadante foi avaliada pelo mesmo ensaio DNS empregado para a enzima livre, com as devidas correções no fator de conversão. Os resultados mostraram que a atividade no sobrenadante é praticamente desprezível frente à atividade da solução inicial de Termamyl®, indicando que a fração de enzima que permanece em solução, ainda ativa, é muito pequena (ordem de $\leq 1\%$ da atividade inicial).

A combinação de proteína residual abaixo do LOQ pelo Bradford; e atividade residual praticamente nula pelo DNS, sustenta a conclusão de que a imobilização da α -amilase em SPIONs foi praticamente quantitativa em termos de quantidade de enzima ligada ao suporte. Assim, para os cálculos subsequentes, adotou-se a aproximação:

$$m_{\text{enz, imobilizada}} \approx m_{\text{enz, inicial}} \quad (6)$$

ou, em termos de unidades de atividade, que as $\approx 5,2 \times 10^4$ U inicialmente presentes no volume de Termamyl® utilizado na imobilização foram efetivamente associadas aos 300 mg de SPIONs empregados (ver seção 3.4).

Essa aproximação é coerente com a sensibilidade dos métodos analíticos empregados e é usual em estudos de imobilização com alta eficiência de adsorção, desde que explicitada a limitação de detecção das técnicas espectrofotométricas envolvidas.

Do ponto de vista físico-químico, a imobilização praticamente quantitativa observada é compatível com o cenário de forte atração eletrostática entre a α -amilase e a superfície das SPIONs. Estudos prévios realizados no mesmo grupo de pesquisa mostraram que nanopartículas magnéticas sintetizadas por rota análoga apresentam ponto de carga zero (pH_{PZC}) em torno de 4,7, com potencial zeta positivo em meios mais ácidos ($\approx +35$ mV em pH 3,0) e negativo em meios mais básicos (≈ -35 mV em pH 12,0) (Cavalcanti, 2020). Como a imobilização foi conduzida em pH 6, as SPIONs tendem a apresentar carga superficial líquida levemente negativa. Por outro lado, α -amilases microbianas termoestáveis de *Bacillus licheniformis* (como a Termamyl®) possuem ponto isoelétrico na faixa neutra ($\text{pI} \approx 6,9-7,4$), de modo que em pH 6 a enzima estará, em média, carregada positivamente (Ivanona; Dobreva; Emanuilova, 1993). Essa combinação do suporte fracamente aniônico e enzima predominantemente catiônica, favorece a formação de múltiplos contatos eletrostáticos e, possivelmente, ligações de hidrogênio adicionais com grupos hidroxila da superfície do óxido de ferro, explicando a adsorção quase quantitativa inferida pelos dados de Bradford e de

atividade residual. Estudos futuros, envolvendo medidas sistemáticas de potencial zeta de SPIONs e da enzima em função do pH, bem como isotermas de adsorção, poderão quantificar de forma mais direta essa contribuição eletrostática e distinguir entre componentes de adsorção física e interações de natureza mais específica.

4.3 Determinação da atividade da α -amilase na forma livre

A atividade catalítica da α -amilase comercial (Termamyl®) foi determinada pelo método do dinitrossalicilato (DNS), empregando glicose como padrão de açúcares redutores. A curva de calibração foi construída na faixa de concentrações em que a relação entre absorvância e concentração se manteve linear, resultando na equação:

$$A_{540} = a C_{\text{glic}} + b$$

em que A_{540} é a absorvância a 540 nm, C_{glic} é a concentração de glicose equivalente (g L^{-1}), e a e b são, respectivamente, o coeficiente angular e o intercepto obtidos por regressão linear (com $R^2 \approx 0,99$). Dentro dessa faixa, a equação permite converter diretamente a leitura de absorvância em concentração de açúcares redutores.

Rearranjando:

$$C_{\text{glic}} = \frac{A_{540} - b}{a} \quad (1)$$

Considerando o protocolo usado no ensaio de atividade descrito na subseção 3.5 da metodologia, a concentração C_{glic} obtida pela Eq. (1) é a concentração de glicose equivalente nos 10 mL finais (tubo com DNS). A massa de glicose nesse tubo é $m_{\text{DNS}} = C_{\text{glic}} (\text{g L}^{-1}) \times 10 \text{ mL} = 10 C_{\text{glic}} \text{ mg}$. Como esses 10 mL se originam de 1,0 mL da mistura reação + NaOH (volume total 2,5 mL), a massa total de glicose produzida no tubo de reação é:

$$m_{\text{total}} = m_{\text{DNS}} \times \frac{2,5}{1,0} = 25 C_{\text{glic}} \text{ mg}$$

Convertendo essa massa em μmol (massa molar da glicose $\approx 180 \text{ g mol}^{-1} = 180 \text{ 000 mg mol}^{-1}$):

$$n_{\text{glic}}(\mu\text{mol}) = \frac{25 C_{\text{glic}} \text{ mg}}{180 \text{ mg mmol}^{-1}} \times 10^3 = C_{\text{glic}} \times \frac{25 \times 10^3}{180} \approx C_{\text{glic}} \times 138,9 \quad (2)$$

Por definição, 1 unidade de atividade enzimática (1 U) corresponde à conversão de 1 μmol de substrato (ou açúcares redutores equivalentes) por minuto, nas condições do ensaio. Com tempo de reação $t = 15 \text{ min}$:

$$U_{\text{tubo}} = \frac{n_{\text{glic}}}{t} = C_{\text{glic}} \times \frac{138,9}{15} \approx C_{\text{glic}} \times 9,259 \quad (3)$$

Esse U_{tubo} é a atividade contida nos 1,0 mL de solução de enzima utilizada no ensaio. Se a solução de Termamyl® foi previamente diluída por um fator FD em relação à solução estoque, a atividade volumétrica da solução estoque de Termamyl® é:

$$U_{\text{estoque}} (\text{U mL}^{-1}) = C_{\text{glic}} (\text{g L}^{-1}) \times FD \times 9,259 \quad (4)$$

Aplicando a Eq. (4) aos ensaios realizados com duas diluições distintas da Termamyl® ($FD = 20\ 000$ e $FD = 30\ 000$), obtiveram-se valores consistentes de atividade volumétrica, com média aproximada de:

$$U_{\text{estoque}} \approx 1,6 \times 10^5 \text{ U mL}^{-1}$$

Esse valor está na ordem de grandeza reportada para α -amilases microbianas termoestáveis empregadas industrialmente, que frequentemente apresentam atividades na faixa de 10^4 – 10^5 U mL^{-1} quando expressas em unidades baseadas em μmol de açúcares reduzidos por minuto.

Essa atividade volumétrica da Termamyl® é o ponto de partida para estimar quantas unidades de enzima foram efetivamente colocadas no meio de imobilização e, portanto, qual seria a atividade “esperada” para uma determinada massa de suporte, caso a imobilização não provocasse perda de atividade específica (U/mg).

4.4 Atividade da α -amilase imobilizada em SPIONs

A atividade catalítica da α -amilase imobilizada foi determinada substituindo a solução enzimática livre por 10 mg de SPIONs@AM no ensaio de hidrólise do amido. O protocolo foi levemente alterado e está descrito na subseção 3,5 de Materiais de Métodos.

Novamente, a Eq. (1) fornece a concentração de glicose equivalente nos 10 mL finais (C_{glic} , g L^{-1}). A massa de glicose no tubo com DNS é dada por $m_{\text{DNS}} = 10 C_{\text{glic}}$ mg. Neste caso, os 10 mL se originam de 1,0 mL de uma mistura com volume total de 1,5 mL (sobrenadante + NaOH). Portanto, a massa total de glicose produzida é:

$$m_{\text{total}} = m_{\text{DNS}} \times \frac{1,5}{1,0} = 15 C_{\text{glic}} \text{ mg}$$

Convertendo para μmol :

$$n_{\text{glic}} (\mu\text{mol}) = \frac{15 C_{\text{glic}}}{180} \times 10^3 = C_{\text{glic}} \times 83,33 \quad (7)$$

Com tempo de reação de 15 min:

$$U_{(10 \text{ mg})} = \frac{n_{\text{glic}}}{t} = C_{\text{glic}} \times \frac{83,33}{15} \approx C_{\text{glic}} \times 5,556 \quad (8)$$

A Eq. (8) fornece diretamente a atividade (U) correspondente aos 10 mg de SPIONs@Am utilizados no ensaio, em função da concentração de glicose equivalente (g L^{-1}) calculada a partir da curva DNS. Aplicando essa equação às três amostras independentes (A, B e C) de SPIONs@Am obtidas sob as condições otimizadas de imobilização, obtiveram-se valores típicos de C_{glic} entre aproximadamente 1,0 e 1,3 g L^{-1} , resultando nas atividades:

Tabela 1: Atividades encontradas nos nanobiocatalisadores A, B e C

Amostra	$C_{\text{glic}}(\text{g L}^{-1})$	$U_{(10 \text{ mg})}(\text{U})$
A	$\approx 1,02$	$\approx 5,64$
B	$\approx 1,18$	$\approx 6,55$
C	$\approx 1,26$	$\approx 7,00$

A atividade média para 10 mg de SPIONs@Am foi, portanto, $\bar{U}_{(10 \text{ mg})} \approx 6,4$ U com variação relativamente modesta entre réplicas, o que evidencia boa reprodutibilidade do protocolo de ensaio. É também possível expressar a atividade em termos de U por mg de suporte, por simples normalização:

$$U_{(\text{por mg de SPION})} = \frac{U_{(10 \text{ mg})}}{10} \approx 0,56\text{--}0,70 \text{ U mg}^{-1}$$

Esses valores representam a atividade aparente do biocatalisador, já incorporando todos os efeitos de difusão, acessibilidade de sítios ativos e possíveis alterações conformacionais decorrentes da interação enzima–nanopartícula.

4.5 Percentual de atividade enzimática recuperada

Para avaliar em que medida a imobilização preservou a atividade catalítica intrínseca da α -amilase, é necessário comparar a atividade observada para os 10 mg de SPIONs@Am com a atividade que seria esperada para a mesma quantidade de enzima, caso está se mantivesse na forma livre.

A partir da atividade volumétrica da solução estoque de Termamyl® (Eq. 4), obteve-se $U_{\text{estoque}} \approx 1,6 \times 10^5 \text{ U mL}^{-1}$. Na preparação do meio de imobilização, foram adicionados 0,320 mL da solução estoque de Termamyl®; volume total de solução enzimática = 20 mL e massa de SPIONs = 300 mg. O número total de unidades de atividade adicionadas ao sistema de imobilização é, portanto

$$U_{\text{total, imobilização}} = U_{\text{estoque}} \times V_{\text{Termamyl}^{\circledR}} \approx (1,6 \times 10^5 \text{ U mL}^{-1}) \times 0,320 \text{ mL} \approx 5,2 \times 10^4 \text{ U}$$

Como discutido na seção 3.2, a combinação de Bradford e DNS para o sobrenadante indica que a fração de enzima que permanece em solução é desprezível. Assim, é razoável assumir que essas $\approx 5,2 \times 10^4$ U de atividade foram distribuídas pelos 300 mg de SPIONs presentes na suspensão de imobilização.

Se essa quantidade de enzima mantivesse a mesma atividade específica da forma livre, a fração correspondente a 10 mg de SPIONs (massa de suporte usada no ensaio) deveria apresentar:

$$U_{\text{teórico}(10 \text{ mg})} = U_{\text{total, imobilização}} \times \frac{10}{300} \approx \frac{5,2 \times 10^4}{30} \approx 1,7 \times 10^3 \text{ U}$$

Comparando esse valor “teórico” com a atividade média experimental dos 10 mg de SPIONs@Am ($\bar{U}_{(10 \text{ mg, imobilizada})} \approx 6,4$ U), como mostrado na tabela 2, obtém-se o percentual estimado de atividade recuperada após a imobilização, para a mesma quantidade de moléculas de enzima:

$$\% \text{ atividade recuperada} = \frac{\bar{U}_{(10 \text{ mg, imobilizada})}}{U_{\text{teórico}(10 \text{ mg})}} \times 100 \approx \frac{6,4}{1,7 \times 10^3} \times 100 \approx 0,4\%$$

Tabela 2: Comparação entre a atividade teórica e a atividade recuperada experimentalmente do nanobiocatalisador.

Atividade recuperada encontrada $\bar{U}_{(10 \text{ mg})}$	Atividade teórica recuperada $U_{\text{teórico}(10 \text{ mg})}$
6,4	$1,7 \times 10^3$

Esse resultado indica que, embora a imobilização tenha sido praticamente quantitativa em termos de quantidade de enzima ligada ao suporte, houve uma perda muito pronunciada de atividade específica (por molécula), com recuperação da ordem de apenas $\sim 0,4\%$ da atividade catalítica esperada.

Tabela 3: Desempenho catalítico e do teor de enzima imobilizada do nanobiocatalisador de acordo com as amostras A, B e C.

Amostras	Teor de enzima imobilizada (%)	Atividade do nanobiocatalisador (U/10mg)	Percentual de atividade recuperada (%)
A	95,09	5,64	0,33
B	98,88	6,55	0,38
C	99,99	7,00	0,41

Assim, observa-se, a partir dos dados apresentados na Tabela 3, que o teor de enzima imobilizada foi elevado em todas as amostras (A, B e C). No entanto, a atividade do nanobiocatalisador, bem como o percentual de atividade, apresentaram valores inferiores ao

esperado quando comparados ao valor teórico de atividade do biocatalisador, estimado em $1,7 \times 10^3$ U para 10 mg de enzima imobilizada.

A combinação entre imobilização praticamente quantitativa e recuperação de atividade muito baixa sugere que a maior parte das moléculas de Termamyl® adsorvidas se encontram em conformações ou orientações desfavoráveis para a catálise. Em pH 6, a enzima está globalmente carregada positivamente, enquanto as SPIONs apresentam carga líquida negativa; isso tende a promover uma adsorção forte, com múltiplos pontos de ancoragem e possível “achatamento” da proteína sobre a superfície (Cavalcanti, 2022). As α -Amilases de *Bacillus licheniformis* são proteínas de domínio $(\beta/\alpha)_8$ (tipo barril TIM), contendo pontes dissulfeto que contribuem para a estabilidade térmica e estrutural, o que lhes confere uma certa rigidez global, embora regiões de alças e o domínio B mantenham flexibilidade local (Ahmad; Rahamtullah; Mishra, 2022; Kholikov *et al.*, 2025; Mehta; Satyanarayana, 2016). Em contraste, lipases como a TLL, frequentemente utilizadas como modelo no mesmo grupo de pesquisa, apresentam um “lid” hidrofóbico altamente móvel que facilita a interfacialização sem necessariamente comprometer o sítio ativo (Cavalcanti *et al.*, 2022).

Assim, no caso da Termamyl®, a combinação de uma superfície de óxido de ferro relativamente hidroxilada, carregada negativamente, com uma enzima mais rígida pode favorecer orientações em que o sítio ativo fica parcialmente bloqueado ou sofre distorções locais, resultando em “coronas proteicas” com enzimas adsorvidas, porém com atividade muito diminuída, fenômeno que tem sido amplamente descrito para proteínas em contato com diferentes nanopartículas (Park, 2020).

Estudos sobre corona proteica indicam que a adsorção em superfícies de nanopartículas pode induzir rearranjos conformacionais, exposição de regiões hidrofóbicas e até desnaturação parcial, o que, em enzimas, se traduz diretamente na perda de atividade catalítica mesmo na presença de grande quantidade de proteína ligada (Park, 2020).

4.6 Estudo de dessorção

O estudo de dessorção foi realizado através de um protocolo já desenvolvido dentro do grupo de pesquisa. Uma massa de 10 mg de SPIONs@Am foi submetida a um stress mecânico durante 5 minutos, após esse tempo o sobrenadante foi retirado e analisado pelo método de Bradford para determinação de proteína a fim de quantificar quanta enzima havia se dessorvido do suporte. Esse processo foi repetido 5 vezes. Os valores obtidos de absorbância também ficaram muito próximos do valor do branco, caindo abaixo da faixa em que a Eq. (5) pode ser aplicada com segurança. Como já explicado na secção 4.2, devido a esse fator pode-se concluir

que a dessorção da enzima do suporte foi nula em torno de todos os 25 minutos devido a não identificação de proteínas nas amostras analisadas.

4.7 Comparação com outros sistemas de imobilização de α -amilase

A literatura reporta diversos sistemas de imobilização de α -amilase, incluindo especificamente a Termamyl® em diferentes suportes. Alguns exemplos representativos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 2: Exemplos de imobilização de α -amilase (incluindo Termamyl®) e recuperação de atividade.

Sistema enzimático	Suporte / estratégia	Enzima (fonte)	Atividade recuperada / observada*	Observações principais	Ref
Termamyl® 60 L em bagasse dialdeído	Celulose de bagaço ativada com periódico (ligação covalente)	Termamyl® (B. licheniformis)	$\approx 44\%$ em relação à enzima livre.	Boa estabilidade térmica e reversibilidade; uso em hidrólise contínua de amido.	(Varavinit; Chaokasem; Shobsngob, [S.d.])
Termamyl® 2X em Duolite® A-568	Resina de troca iônica (adsorção)	Termamyl® 2X	$\approx 30,4\%$ (adsorção) e $31,4\%$ (ligação cruzada)	Boa reusabilidade e estabilidade de armazenamento. Liberação controlada; boa estabilidade; uso em meio ruminal/gástrico; melhoria da digestão do amido	(Silva et al., 2023)
Termamyl® em blendas pectina-PVA	Aprisionamento em matriz polimérica	Termamyl® comercial	Atividade em líquido ruminal: $0,021$ UE/mg (24h); $0,099$ UE/mg (48h)	Imobilização aumentou a atividade e permitiu reutilização por pelo menos 5 ciclos.	(Cruz et al., 2015)
α -amilase em nanopartículas magnéticas CLBFNPs	Nanopartículas de ferrita de bário recobertas com quitosana	α -amilase microbiana (Bacillus paramycoides)	Atividade específica imobilizada ≈ 247 U mg^{-1} vs 222 U mg^{-1} livre ($\approx 111\%$ da atividade)	Elevada estabilidade térmica e operacional.	(Hallol et al., 2022)
α -amilase termoestável em dialdeído-celulose	Microesferas de pHEMA (com e sem agente de reticulação EGDMA)	α -amilase Type II-A de <i>Bacillus</i> sp.	Atividade recuperada $\sim 40-50\%$ e elevada estabilidade em múltiplos ciclos de reuso	Imobilização praticamente quantitativa em termos de quantidade adsorvida, porém com forte perda de atividade específica.	(Arica; Hasirci; Alaeddinoğlu, 1995)
Presente trabalho	imobilização por adsorção em nanopartículas magnéticas	Termamyl® (comercial)	Atividade recuperada $\approx 0,4\%$ em relação à atividade esperada para mesma quantidade de enzima		-

*Observação: “*atividade recuperada*” é definida de forma ligeiramente distinta em cada trabalho (por exemplo, baseada em U totais, U g^{-1} de suporte ou U mg^{-1} de proteína), mas em todos os casos representa a comparação entre o sistema imobilizado e a enzima livre sob condições equivalentes de dosagem.

De modo geral, a literatura que fala sobre a imobilização de α -amilase relata recuperação de atividade entre 30 e 80%, podendo chegar a valores superiores em ambientes onde o suporte favorece a conformação ativa da enzima, como nanopartículas magnéticas funcionalizadas ou matrizes poliméricas específicas. Assim, o valor de $\approx 0,4\%$ obtido neste trabalho indica que, embora o suporte magnético apresente excelente desempenho na separação e manipulação do biocatalisador, as condições específicas de adsorção não foram suficientes para preservar a atividade catalítica da Termamyl®.

A baixa recuperação de atividade pode ser atribuída, primeiramente, a interações desfavoráveis entre a enzima e a superfície polar das SPIONs, rica em grupos hidroxila. Essas ligações podem promover múltiplos pontos de contato, restrições conformacionais e até distorção da vizinhança do sítio ativo, fenômenos amplamente documentados em imobilizações por adsorção em óxidos metálicos (Andrade *et al.*, 2022; Márquez *et al.*, 2017). Outro fator a se discutir é a orientação aleatória da enzima sobre o suporte, que pode resultar no bloqueio parcial ou total do sítio ativo quando a molécula se adsorve voltada para a superfície, reduzindo significativamente a atividade apesar de a enzima permanecer estruturalmente intacta (Boliviari, 2022; Viswanat *et al.*, 1998).

Por fim, é possível que tenha ocorrido desativação parcial durante o processo de imobilização, especialmente porque pequenas variações de pH, temperatura ou força iônica podem comprometer a estabilidade conformacional da Termamyl® (Gama *et al.*, 2024; Guzik; Hupert-Kocurek; Wojcieszynska, 2014). Assim, o desempenho reduzido observado indica que, embora a imobilização tenha sido quantitativa, melhorias no tratamento superficial das nanopartículas, nas condições de adsorção ou na escolha do método de imobilização são essenciais para elevar a atividade recuperada.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho atingiu o objetivo geral de desenvolver um nanobiocatalisador baseado na imobilização da α -amilase Termamyl® em SPIONs, permitindo uma análise crítica sobre a viabilidade da adsorção física para este sistema. Em relação aos objetivos específicos de síntese e caracterização, obteve-se com êxito a produção de nanopartículas magnéticas funcionais. As técnicas empregadas (DRX, MET e IV) confirmaram a obtenção de um suporte

com tamanho nanométrico e estrutura de magnetita. O comportamento superparamagnético dessas SPIONs já havia sido demonstrado anteriormente por magnetometria de amostra vibrante (VSM) para nanopartículas sintetizadas pela mesma (Cavalcanti, 2022), permitindo assumir propriedades magnéticas equivalentes no presente estudo.

No que tange à metodologia de análise e ao processo de imobilização, o método do reagente DNS foi validado com sucesso para a enzima livre, gerando uma correlação matemática clara (Eq. 4) entre a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). As análises do sobrenadante pelo método de Bradford demonstraram que a imobilização por adsorção física foi altamente eficiente em termos de afinidade, apresentando uma taxa de adsorção praticamente quantitativa (>99%) da enzima na superfície das SPIONs.

Contudo, ao determinar a atividade da enzima imobilizada em comparação à livre, observou-se uma discrepância significativa. O biocatalisador sólido (SPIONs@AM) apresentou valores médios de 6,4 U por 10 mg de suporte, correspondendo cerca de 0,4% da atividade teórica esperada. Esse desempenho, inferior ao relatado em sistemas similares, evidencia que a alta taxa de adsorção não garante, por si só, a eficiência catalítica.

O estudo de dessorção sob estresse mecânico forneceu indícios sobre as possíveis causas desse fenômeno. A baixa atividade recuperada sugere a ocorrência de alterações conformacionais severas na enzima ou o bloqueio do sítio ativo devido à interação direta com a superfície inorgânica (impedimento estérico). Tais constatações reforçam a distinção crucial entre eficiência de imobilização e atividade recuperada.

Portanto, conclui-se que, embora o suporte magnético e o protocolo de adsorção sejam promissores em capacidade de carga, torna-se evidente a necessidade de otimizar as condições de imobilização. Para trabalhos futuros, indica-se a modificação da superfície das SPIONs por meio de recobrimentos poliméricos biocompatíveis. Tais estratégias são imperativas para minimizar os efeitos deletérios sobre a estrutura proteica, visando favorecer o desempenho catalítico e a estabilidade operacional do sistema em futuros estudos de reuso.

6 REFERÊNCIAS

ABEDANZADEH, Sedigheh *et al.* Nanozymes: Supramolecular perspective. **Biochemical Engineering Journal**, v. 183, p. 108463, jun. 2022.

AGBOOLA, Omowumi D.; BENSON, Nsikak U. Physisorption and Chemisorption Mechanisms Influencing Micro (Nano) Plastics-Organic Chemical Contaminants Interactions: A Review. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 28 maio 2021.

AHMAD, Aziz; RAHAMTULLAH; MISHRA, Rajesh. Structural and functional adaptation in extremophilic microbial α -amylases. **Biophysical Reviews**, v. 14, n. 2, p. 499–515, 24 abr. 2022.

ALI, Arbab *et al.* Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 13 jul. 2021.

AMARAL DE FARIA SILVA, Luciana *et al.* Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa. **Caderno de Ciências Agrárias (CCAUFMG)** v. 9, n. 1, p. 49–53, 2017.

ARICA, M. Y.; HASIRCI, V.; ALAEDDINOĞLU, N. G. Covalent immobilization of α -amylase onto pHEMA microspheres: preparation and application to fixed bed reactor. **Biomaterials**, v. 16, n. 10, p. 761–768, jul. 1995.

BAYAZIDI, Pashew; ALMASI, Hadi; ASL, Asghar Khosrowshahi. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2544–2551, fev. 2018.

BEAN, C. P.; JACOBS, I. S. Magnetic Granulometry and Super-Paramagnetism. **Journal of Applied Physics**, v. 27, n. 12, p. 1448–1452, 1 dez. 1956.

BINI, Raquel Dosciatti. **Desenvolvimento de nanopartículas de magnetita para aplicações biológicas**: propriedades estruturais, microestruturais e magnéticas. 2016. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

BOLIVAR, Juan M.; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, 15 jul. 2022.

CAVALCANTI, Marcello Henrique da Silva. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄) e seu uso como suporte para imobilização de lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2020.

CAVALCANTI, Marcello *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 431, p. 134128, mar. 2022.

CRUZ, Maurício *et al.* Improvement of Starch Digestion Using α -Amylase Entrapped in Pectin-Polyvinyl Alcohol Blend. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

DE ANDRADE SILVA, Thais *et al.* Impact of immobilization strategies on the activity and recyclability of lipases in nanomagnetic supports. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

DULIŃSKA-LITEWKA, Joanna *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles current and prospective medical applications. **Materials**, 19 fev. 2019.

EKER, Furkan *et al.* A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity. **Molecules**, v. 29, n. 15, p. 3482, 25 jul. 2024.

FARAJI, Amir H.; WIPF, Peter. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, abr. 2009.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, María; SANROMÁN, M. Ángeles; MOLDES, Diego. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, dez. 2013.

FIGUEROLA, Albert *et al.* From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 126–143, ago. 2010.

GAMA CAVALCANTE, Antônio Luthierre *et al.* Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials: toward sustainable industrial applications. **RSC Advances**, v. 14, n. 25, p. 17946–17988, 2024.

GONG, Yahui; CHEN, Xuerong; WU, Wei. Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in sample preparation: Material characterization and mechanism investigation. **Advances in Sample Preparation**, v. 11, p. 100122, ago. 2024.

GUZIK, Urszula; HUPERT-KOCUREK, Katarzyna; WOJCIESZYNSKA, Danuta. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties - Application to oxidoreductases. **Molecules**, 2014.

HALLLOL, Merehan *et al.* Optimization of Alpha-Amylase Production by a Local *Bacillus paramycooides* Isolate and Immobilization on Chitosan-Loaded Barium Ferrite Nanoparticles. **Fermentation**, v. 8, n. 5, p. 241, 22 maio 2022.

IVANOVA, Viara N.; DOBREVA, Elena P.; EMANUILOVA, Elka I. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 28, n. 2–3, p. 277–289, abr. 1993.

KHAN, Mohammad Jahir; HUSAIN, Qayyum; ANSARI, Sajid Ali. Polyaniline-assisted silver nanoparticles: a novel support for the immobilization of α -amylase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1513–1522, 26 fev. 2013.

KHOLIKOV, Askar *et al.* Characterization of a Thermostable α -Amylase from *Bacillus licheniformis* 104.K for Industrial Applications. **Microorganisms**, v. 13, n. 8, p. 1757, 28 jul. 2025.

- KIKANI, Bhavtosh A.; SUTHAR, Sadikhusain; JOSHI, Disha. Nanomaterials: An Efficient Support to Immobilize Microbial α -Amylases for Improved Starch Hydrolysis. **Starch**, 1 set. 2022.
- KULKARNI, Sunil Jayant. Chemisorption: a Review. **International Journal of Research & Review**, v. 4, p. 15, 2017.
- KUMAR, Manoj. XRD Analysis for Characterization of Green Nanoparticles: A Mini Review. **Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, 21 jul. 2022.
- LIN, Ping-Chang *et al.* Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 711–726, jul. 2014.
- MAHMOUDI, Morteza *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 1–2, p. 24–46, jan. 2011.
- MALDONADE, Iriani R.; CARVALHO, Patrícia G. B.; FERREIRA, Nathalie A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Comunicado Técnico 85. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013.
- MARDANI, Tohid *et al.* Immobilization of α -amylase on chitosan-montmorillonite nanocomposite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 354–360, dez. 2018.
- MÁRQUEZ, Augusto *et al.* Enzyme adsorption-induced activity changes: A quantitative study on TiO₂ model agglomerates. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, 21 jul. 2017.
- MARTINS, Manuel A.; TRINDADE, Tito. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.
- MEHTA, Deepika; SATYANARAYANA, Tulasi. Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 28 jul. 2016.
- MENDES, Adriano A.; CASTRO, Pedro de Oliveira; GIORDANO, Raquel de L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831–840, 25 mar. 2011.
- MORTE, Ellen de Freitas Bôa; SILVA, Daiana de Souza; RODRÍGUEZ, Rubén Jesus Sánchez. Nanopartículas modificadas de Fe₃O₄ para imobilização covalente de lipase com alta retenção de atividade. *In*: CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 12.; CONGRESSO FLUMINENSE DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5., 2020, Campos dos Goytacazes. **Anais eletrônicos** [...]. Campinas: Galoá, 2020.
- PAPATOLA, F. *et al.* Biocatalyst immobilization on magnetic nano-architectures for potential applications in condensation reactions. **Microbial Biotechnology**, v. 17, n. 6, 8 jun. 2024.

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

PARK, Sung Jean. Protein–Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 5783–5802, ago. 2020.

QUINA, Frank H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028–1029, dez. 2004.

RABE, Michael; VERDES, Dorinel; SEEGER, Stefan. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, n. 1–2, p. 87–106, fev. 2011.

RĂCUCIU, M.; CREANGĂ, D. E.; AIRINEI, A. Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications. **The European Physical Journal E**, v. 21, n. 2, p. 117–121, 27 out. 2006.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 15 nov. 2015.

SILVA, Fernanda Santos *et al.* Immobilization of alpha-amylase (Termamyl® 2X) in Duolite® A-568 resin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 49, p. 102661, maio 2023.

SILVA-SALINAS, Anaid *et al.* Novel Thermotolerant Amylase from *Bacillus licheniformis* Strain LB04: Purification, Characterization and Agar-Agarose. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1857, 1 set. 2021.

SOUZA, Livia Tereza de Andrade *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Editora Blucher, 2017. v. 4, p. 529–568.

TASCA, Rodolfo A. *et al.* Desenvolvendo Habilidades e Conceitos de Nanotecnologia no Ensino Médio por Meio de Experimento Didático Envolvendo Preparação e Aplicação de Nanopartículas Superparamagnéticas. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 3, 2015.

TORRES, Antonio Marco. **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima**. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. (Nota: Esta referência estava duplicada como MARCO, juntei aqui pelo sobrenome correto).

TORRES, Livia Maria; LEONEL, Magali; MISCHAN, Martha Maria. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1327–1332, 19 jun. 2012.

VARAVINIT, Saiyavit; CHAOKASEM, Narisa; SHOBSNGOB, Sujin. Immobilization of a thermostable alpha-amylase. **ScienceAsia**, v. 28, p. 247-251, 2002.

VISWANATH, S. *et al.* Site-directed and random immobilization of subtilisin on functionalized membranes: Activity determination in aqueous and organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 5, p. 608–616, 5 dez. 1998.

WEBB, Paul A. **Introduction to chemical adsorption analytical techniques and their applications to catalysis**. Norcross: Micromeritics Instrument Corp., 2003.