

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

VITOR AUGUSTO UNGARO

**Desenvolvimento, estudo e aplicações de  
nanobiocatalisadores proteolíticos magnéticos**

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**06/03/2020**

VITOR AUGUSTO UNGARO

**Desenvolvimento, estudo e aplicações de  
nanobiocatalisadores proteolíticos magnéticos**

Tese apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências  
(Química)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

U57d Ungaro, Vitor Augusto Desenvolvimento,  
estudo e aplicações de nanobiocatalisadores  
proteolíticos magnéticos / Vitor Augusto  
Ungaro. - São Paulo, 2020.  
223 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Química  
Fundamental.

Orientador: Machini, Maria Teresa

1. Catálise. 2. Biotecnologia. 3. Nanotecnologia.  
4. Peptídeos. 5. Síntese Orgânica. I.  
T. II. Machini, Maria Teresa, orientador.



## DEDICO ESTA TESE

À minha Mãe, Maria Cristina Ungaro, por ter me gerado e criado sempre com muito carinho, ter batalhado como ninguém e, com seu incentivo e dedicação, permitir que eu chegasse onde estou hoje. Dedico também à minha Vó, Ana Maria Arroio Ungaro, que enquanto esteve entre nós foi ao mesmo tempo um farol e um porto seguro para mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família por sempre me apoiar e me ensinar muitas coisas. Agradeço ao meu primo Renan, alguém que considero um verdadeiro irmão e que me fez jogar Yu-Gi-Oh!.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Maria Terêsa Machini, por ter me aceitado em seu grupo, me orientado ao longo da minha iniciação científica e do doutorado, e por sempre estar lá para me ajudar quando precisasse.

Agradeço também ao Dr. Cleber Wanderlei Lira, especialista de laboratório que sempre me ajudou nas coisas do laboratório e pelos cafés filosóficos que aconteciam de vez em quando.

Agradeço a todos que passaram pelo laboratório pelo suporte enquanto estavam lá. Em especial, gostaria de agradecer ao Marcos pela amizade e caçadas a Pokémons; ao João, pela amizade, por me ajudar com o projeto e pela dedicação que teve com isso; à Nancy pela amizade, ajuda com coisas relacionadas ao Japão e por me mostrar que se tem que ser firme e perseverante nos momentos mais difíceis; à todos que me ajudaram até o último segundo.

Agradeço aos meus amigos de graduação que em algum momento começamos a nos chamar de Nerds Problemáticos por, simplesmente, sermos nerds e problemáticos. Agradeço ao Felipe pelos momentos de bobeira e por me fazer refletir sobre coisas profundas. Agradeço ao Tomaz por me ajudar a abrir um pouco meus horizontes e por me proporcionar alguém para discordar. Agradeço ao Leonardo pelos RPGs e jogatinas no geral. Agradeço à Pamela por um curto, mas aconchegante, período da minha vida, além da amizade que se manteve. Agradeço à Vanessa, que nos deixou ano passado, mas vive no coração de todos os Nerds Problemáticos, pela amizade e ajuda durante as aulas de Química Analítica.

Agradeço a todos os professores e professoras que me ajudaram a conhecer melhor a química e seus fundamentos.

Agradeço à Prof. Dra. Liane M. Rossi por fornecer as nanopartículas e permitir que usasse seu laboratório para realizar alguns dos experimentos.

Agradeço à Dra. Natália J. S. Costa por sintetizar algumas nanopartículas e ajudar quando foi preciso.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Nanomateriais e Catálise pela amizade e apoio.

Agradeço à Central Analítica do IQ USP pelas Análises Elementais e Microscopia de Transmissão de elétron.

Agradeço à Profa. Dra. Vera R. L. Constantino pelas Termogravimetrias feitas em seu laboratório.

Agradeço à Profa. Dra. Sayuri Miyamoto e ao Dr. Emerson Finco Marques, especialista de laboratório pela ajuda com o software Moscot Server.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório (Proc: nº 2015/36143-2).

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado (Proc: nº 142079/2014-6) e pelo apoio financeiro à minha orientadora (Proc: nº 308658/2015-9).

Agradeço também a todas as outras pessoas que passaram em algum momento na minha vida e ajudaram, de alguma maneira, a eu ser quem eu sou.

*“I think maybe we die every day. Maybe we're born new each dawn, a little changed, a little further on our own road. When enough days stand between you and the person you were, you're strangers. Maybe that's what growing up is. Maybe I have grown up.”*  
— Honório Jorg Ancrath em *Prince of Thorns* de Mark Lawrence.

*“-Não era inútil – protestei. – São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam. Elas nos ensinam a pensar. Se você dá uma resposta a um homem, tudo o que ele ganha é um fato qualquer. Mas, se você lhe der uma pergunta, ele procurará suas próprias respostas. (...)*

*-Assim, quando ele encontrar as respostas – continuei -, elas lhe serão preciosas. Quanto mais difícil a pergunta, com mais empenho procuramos a resposta. Quanto mais a procuramos, mais aprendemos.”*

— Kvothe em *O Nome do Vento* de Patrick Rothfuss.

*“How did you become friends with the bugs, anyway?”*

*“I was just very very careful. Everyone steps on bugs without thinking. Can you imagine how that feels?”*

*“What, to step on bugs?”*

*“No! To be stepped on!”*

*“Sound pretty painful.”*

*“Not just painful... It's sad when nobody even cares about you. So, I don't step on bugs, Audrey!”*

*“And just for that, they're your friends?”*

*“Yup! Caring about others goes a long way!”*

*“How could you care about something so insignificant... like bugs? How did you even know they would help you?”*

*“Huh? I didn't know they would help me! That's is not why I care about them, Audrey. I care about them because they're living things! And even if they never did anything to help me at all they would still be worth caring about.”*

Conversa entre o Bardo e a Heroína Audrey em *Wandersong* de Grag Lobanov



## RESUMO

Ungaro, V.A., **Desenvolvimento, estudo e aplicações de nanobiocatalisadores proteolíticos magnéticos**. 2020. (223p) Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As enzimas têm sido amplamente estudadas porque são essenciais para a ocorrência das transformações bioquímicas em seres vivos e exigidas em diversos setores da indústria. Em geral, os seus estudos de análise estrutural, modo de ação, inibição, mutação e modificação química (que inclui imobilização) tem o intuito de melhor entendê-las e, se possível, aprimorá-las ou evoluí-las. O presente trabalho visou desenvolver novos nanobiocatalisadores (NBCs) magnéticos proteolíticos, estudá-los e aplicá-los em proteólise e síntese de dipeptídeos. Assim, imobilizamos as endopeptidases termolisina bacteriana (TLN) e tripsina pancreática bovina (TRY) em nanopartículas de magnetita revestidas de sílica aminada ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$ ). Os  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY obtidos foram caracterizados em: atividade específica, recuperação dos meios reacionais, parâmetros cinéticos, estabilidade química, estabilidade térmica, pH ótimo e reuso, como fizemos com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -quimotripsina pancreática bovina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT) que desenvolvemos e estudamos anteriormente. Apesar de serem observadas quedas de atividade específica e dos valores dos parâmetros cinéticos pela imobilização por ligação covalente, todos os NBCs foram facilmente recuperáveis, suas estabilidades química e térmica foram aumentadas e eles puderam ser reutilizados por até 10 vezes. A aplicabilidade dos três novos NBCs em proteólises foi demonstrada usando as caseínas do leite bovino (X), uma fonte de peptídeos bioativos, e albumina do soro bovino (Y), uma proteína modelo. Em 24 h de incubação, foram detectados por LC-MS fragmentos peptídicos de X e Y nos seguintes totais, respectivamente: 84 e 48 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN); 34 e 28 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY); 29 e 24 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT). Do total geral (247) de peptídeos, 64 indicaram potencial de bioatividade por semelhança de sequência de aminoácidos com as de peptídeos bioativos conhecidos. Por ser um processo de interesse industrial, a proteólise seguida de coagulação do leite catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN também foi tentada e obtido sucesso, sendo o NBC reutilizado por 11 ciclos reacionais.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT ainda foram examinadas na aplicabilidade em síntese biocatalisada de dipeptídeos, opção enantioselectiva e mais limpa à síntese química. Usando rota sintética estabelecida por nós, foram estudadas as sínteses de: Ala-Phe (apresenta sabor amargo), Asp-Phe-OMe (apresenta sabor doce), Phe-Phe e Fmoc-Phe-Phe (apresentam propriedades gelificantes). A formação da ligação peptídica catalisada pela TLN livre ocorreu com rendimentos reacionais superiores (73-85 %) aos obtidos com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN nos casos das sínteses de Z-Ala-Phe-OMe, Z-Asp-Phe-OMe e Z-Phe-Phe-OMe (26-52 %), mas comparável no caso da síntese de Fmoc-Phe-Phe-OMe (72 %). A hidrólise do éster dos Z-Ala-Phe-OMe, Z-Phe-Phe-OMe e Fmoc-Phe-Phe-OMe catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT ocorreu com altos rendimentos (72-91%). De forma inédita, a remoção do grupo protetor benziloxicarbonil (Z) por hidrogenação catalisada pelo nanocatalisador magnético  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Pd forneceu os Ala-Phe, Asp-Phe-OMe e Phe-Phe desejados com 74, 81 e 70 %. Os NBCs e o  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Pd se mostraram facilmente recuperáveis dos meios reacionais e reutilizáveis por 1-10 vezes. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que os objetivos traçados foram atingidos, pois novos NBCs proteolíticos magnéticos e uma rota sintética verde foram desenvolvidos, obtidos e aplicados em proteólises e sínteses de peptídeos. Esses são processos biotecnológicos importantes no sequenciamento proteico, na indústria alimentícia e na geração/produção de peptídeos bioativos.

**Palavras-chave:** biocatálise, endopeptidases, imobilização de enzimas, nanopartículas superparamagnéticas, proteólise, síntese de peptídeos.

## ABSTRACT

Ungaro, V.A., **Development, study and applications of proteolytic magnetic nanobiocatalysts**. 2020. (223p) PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Enzymes are extensively studied because of their involvement in biochemical transformations and are needed in various sectors of the industry. In general, the studies focused on enzyme structural analysis, mode of action, inhibition, mutation, and chemical modification (including immobilization) intend a better understanding of these biocatalysts and, if possible, improvement of their properties or direct-evolution. This study aimed to develop new proteolytic magnetic nanobiocatalysts (NBCs) to study and apply them in proteolysis and dipeptide synthesis. Thus, we immobilized the endopeptidases bacterial thermolysin (TLN) and bovine pancreatic trypsin (TRY) on nanoparticles of magnetite coated by aminated silica ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-NH}_2$ ). The  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-TLN}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-TRY}$  obtained had examined their specific activity, recovery from reaction media, kinetic parameters, chemical and thermal stabilities, optimum pH and reusability, as we did for  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-}\alpha\text{-bovine pancreatic chymotrypsin}$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-}\alpha\text{-CT}$ ) developed and studied earlier. Although specific activity and the kinetic parameters values decreased, chemical and thermal stabilities increased and ease recovery was confirmed. In addition, the new NBCs could be reused 10 times without significant loss of catalytic activity. The applicability of the three magnetic NBCs on proteolysis was demonstrated using bovine milk casein (X), a food source of bioactive peptides, and bovine serum albumin (Y), a model protein. Indeed, incubation for 24 h generated the following numbers of peptide fragments from X and Y, respectively, detectable by LC-MS: 84 and 48 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-TLN}$ ); 34 and 28 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-TRY}$ ); 29 and 24 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-}\alpha\text{-QT}$ ). From the total number (247), 64 are likely to be bioactive as they presented high sequence homology to known bioactive peptides. Since proteolysis followed by milk coagulation is an industrial process of great interest,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-TLN}$  was also employed for this purpose showing to be suitable and reusable up to 10 cycles.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-TLN}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-}\alpha\text{-QT}$  were also employed as catalyst in dipeptide synthesis, an enantioselective and clean alternative to the chemical method. The syntheses of Ala-Phe (a bitter peptide), Asp-Phe-OMe (a sweet peptide), Phe-Phe and Fmoc-Phe-Phe (gel-forming peptides) could be accomplished using a synthetic route previously established by us. Peptide bond formation catalyzed by free TLN yielded more product (reaction yields of 73-85 %) than that catalyzed by  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-TLN}$  in the cases of Z-Ala-Phe-OMe, Z-Asp-Phe-OMe and Z-Phe-Phe-OMe (26-52 %), but not in the case of Fmoc-Phe-Phe-OMe (72 %). Esther hydrolysis of Z-Ala-Phe-OMe, Z-Phe-Phe-OMe and Fmoc-Phe-Phe-OMe catalyzed by  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-}\alpha\text{-QT}$  gave high reaction yields (72-91%). The pioneering removal of the benziloxycarbonyl (Z) protecting group by hydrogenation catalyzed by  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica\text{-Pd}$  yielded 74, 81 or 70 % of Ala-Phe, Asp-Phe-OMe or Phe-Phe, respectively. In all cases, the NBCs and the Pd-nanocatalyst could be efficiently recovered from the reaction media and reused (1-10 times). From these results, we can conclude that our goal was achieved because new proteolytic magnetic NBCs were developed, studied and successfully applied to proteolysis as well as to green dipeptide syntheses. These are biotechnological processes critical in protein sequencing, food industry, and generation/production of bioactive peptides.

**Keywords:** biocatalysis, endopeptidases, enzyme immobilization, superparamagnetic nanoparticles, proteolysis, peptide synthesis

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As abreviaturas dos aminoácidos estão de acordo a IUPAC [União Internacional de Química Pura e aplicada, Eur. J.Biochem. 138:9-37 (1984)]

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

**$\alpha$ -QT:**  $\alpha$ -quimotripsina bovina

**Abs:** absorvância

**ACN:** acetronitrila

**AcOEt:** acetato de etila

**APTES:** 3-aminopropiltrimetoxisilano

**ATP:** adenosina trifosfato

**BSA:** albumina do soro bovino

**Bz-Arg-pNA:** benzoil-arginil-p-nitroanilina

**C/Pd:** carvão paladiado

**Ca(Ac)<sub>2</sub>:** acetato de cálcio

**CaCl<sub>2</sub>:** cloreto de cálcio

**Da:** daltons

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**ECA:** enzima conversora de angiotensina

**EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FA:** furilacrilóil

**FAGLA:** N-(3-[2-Furil] Acrilóil)-Glicil-Leucina Amida

**FeCl<sub>3</sub>:** cloreto de ferro III

**FeCl<sub>2</sub>:** cloreto de ferro II

**Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>:** óxido de ferro II,III ou magnetita

**Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** óxido de ferro III

**Fmoc:** 9-fluorenilmetiloxicarbonil

**FT-IR:** infravermelho com transformada de Fourier

**H<sub>2</sub>:** gás hidrogênio

**H<sub>2</sub>O:** água

**HAc:** ácido acético

**HCl:** ácido clorídrico

**HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência

**LC/ESI-MS:** cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray

**LC:** cromatografia líquida

**LDL:** lipoproteína de baixa densidade

**MeOH:** metanol

**Migração relativa:**  $r_m$

**MS:** espectrometria de massa

**NaCl:** cloreto de sódio

**NaHCO<sub>3</sub>:** bicarbonato de sódio

**NaOH:** hidróxido de sódio

**NBC:** nanobiocatalisador

**NH<sub>4</sub>OH:** hidróxido de amônio

**NP:** nanopartícula

**SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato sódico

**PCR:** reação em cadeia da polimerase

**Pd:** paládio

**Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>:** tris(dibenzilideneacetona)dipaladio(0)

**PDB:** the Protein Data Bank

**pNA:** para-nitroanilina

**PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>:** fosfato

**PVA:** acetato de polivinila

**QP:** quebra perdida

**RP:** fase reversa

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**Suc-AAPF-pNA:** succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-p-nitroanilina

**Suc-AAPF-OH:** succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanina

**TEA:** trietilamina

**TEM:** microscopia de transmissão de elétrons

**Temp. Amb.:** temperatura ambiente

**TEOS:** tetraetilortosilicato

**TFA:** ácido trifluoroacético

**TGA:** termogravimetria

**TLN:** termolisina bacteriana

**TRIS:** tris(hidroximetil)aminometano

**TRY:** tripsina bovina

**Z, Cbz ou Bz:** benziloxicarbonil

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Enzimas e suas aplicações .....	20
1.2 Peptidases: hidrolases responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas ....	23
1.2.1 Termolisina bacteriana (TLN) .....	25
1.2.2 $\alpha$ -Quimotripsina bovina ( $\alpha$ -QT).....	28
1.2.3 Tripsina bovina (TRY) .....	32
1.3 Imobilização de enzimas: estratégias para aprimorar enzimas .....	34
1.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$ : um suporte superparamagnético para metais e enzimas .....	38
1.4 Uso de peptidases de interesse científico e industrial .....	44
1.4.1 Abordagem proteômica .....	44
1.4.2 Coagulação do leite para produção de queijos .....	46
1.4.3 Obtenção de peptídeos bioativos .....	49
1.4.4 Síntese de peptídeos .....	51
2. OBJETIVOS.....	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	60
3.1 Métodos analíticos.....	60
3.1.1 Método de Bradford.....	60
3.1.2 Hidrólise ácida total seguida de análise de aminoácidos do hidrolisado via cromatografia de alta eficiência (HPLC).....	61
3.1.3 Análise elementar.....	62

3.1.4	Análise térmica .....	62
3.1.5	Microscopia de eletrônica de transmissão (TEM) .....	62
3.1.6	Espectro de infravermelho (FT-IR).....	63
3.1.7	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) .....	63
3.1.8	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC/ESI-MS).....	64
3.1.9	Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	64
3.2	Etapas de caracterização das peptidases.....	67
3.2.1	Atividade peptidásica da TLN livre e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN .....	67
3.2.2	Estabilidade da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN após exposição a diferentes solventes orgânicos .....	69
3.2.3	Cinética enzimática da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN e da TLN livre .....	69
3.2.4	Estabilidade química da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN em suspensão .....	70
3.2.5	Estabilidade térmica da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN e da TLN livre .....	70
3.2.6	pH ótimo da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN .....	70
3.2.7	Reuso da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN .....	71
3.2.8	Atividade proteolítica da TLN livre e da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	71
3.2.9	Atividade amidásica da α-QT livre e da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT.....	72
3.2.10	Avaliação das propriedades da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT .....	73
3.2.11	Atividade amidásica da TRY livre e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY.....	73
3.2.12	Cinéticas enzimáticas da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY e da TRY livre .....	74



3.2.13 Estabilidade química da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY.....	74
3.2.14 Estabilidades térmicas da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY e da TRY livre .....	75
3.2.15 pHs ótimos da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY e da TRY livre .....	75
3.2.16 Reuso da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY na catálise da hidrólise Bz-Arg-pNA.....	75
3.2.17 Monitoramento por LC/ESI-MS da proteólise da caseína do leite bovino por Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	76
3.2.18 Identificação de fragmentos provenientes da proteólise .....	76
3.3 Métodos preparativos .....	78
3.3.1 Preparação de NPs e imobilização de enzimas .....	78
3.3.2 Síntese do nanocatalisador de paládio .....	81
3.3.3 Proteólise da caseína do leite bovino e da BSA pela TLN livre e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	82
3.3.4 Proteólise da caseína do leite bovino e da BSA por α-QT livre e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT .....	84
3.3.5 Proteólise da caseína do leite bovino e da BSA por TRY livre e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	87
3.3.6 Coagulação do leite bovino pela TLN livre e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	89
3.3.7 Síntese dos dipeptídeos protegidos catalisada por TLN ou Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica- TLN .....	90
3.3.8 Hidrólise de do éster metílico de Z-Ala-Phe-OMe catalisada por Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT .....	94
3.3.9 Hidrólise do éster de Fmoc-Phe-Phe-OMe e de Z-Phe-Phe-OMe catalisada por Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT .....	96

3.3.10	Processo geral de dessalinização com cartucho Sep-Pak C <sub>18</sub> .....	98
3.3.11	Remoção do grupo Z dos dipeptídeos protegidos por hidrogenação catalítica.....	98
4.	RESULTADOS .....	101
4.1	Imobilização, caracterização e aplicações da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	101
4.1.1	Imobilização da TLN e conteúdo proteico da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	101
4.1.2	Caracterização físico-química da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN .....	106
4.1.3	Atividade catalítica específica e reuso da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	109
4.1.4	Parâmetros cinéticos da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN frente ao FAGLA .....	112
4.1.5	Estabilidade química da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	114
4.1.6	Estabilidade térmica da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN .....	117
4.1.7	pH ótimo da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN .....	118
4.1.8	Proteólise da caseína do leite bovino catalisada por Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.	120
4.1.9	Proteólise da BSA.....	129
4.1.10	Coagulação das proteínas do leite bovino pela Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	135
4.2	Imobilização e aplicações da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica- $\alpha$ -QT.....	139
4.2.1	Imobilização da $\alpha$ -QT.....	139
4.2.2	Hidrólise de éster de dipeptídeos catalisada pela Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica- $\alpha$ QT .....	140
4.2.3	Proteólise da caseína do leite bovino pela Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica- $\alpha$ -QT .....	143
4.2.4	Proteólise da BSA catalisada por Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica- $\alpha$ -QT .....	148
4.3	Imobilização, caracterização e aplicações da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	152
4.3.1	Imobilização da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	152

4.3.2	Conteúdo proteico e morfologia da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	153
4.3.3	Atividade específica e reuso da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	156
4.3.4	Caracterização cinética da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	158
4.3.5	Estabilidade química e térmica da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	160
4.3.6	pH ótimo da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	162
4.3.7	Proteólise da caseína do leite bovino pela Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	163
4.3.8	Proteólise da BSA pela Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY .....	168
4.4	Síntese de dipeptídeos com as enzimas imobilizadas .....	171
4.4.1	Primeira etapa da síntese de dipeptídeos: formação da ligação peptídica .....	172
4.4.2	Segunda etapa da síntese de dipeptídeos: hidrólise do éster .....	179
4.4.3	Terceira etapa da síntese de dipeptídeos: hidrogenação catalítica do grupo Z.....	183
4.4.3.1	Z-Ala-Phe e reuso das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-Pd.....	187
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	189
5.1	Imobilização de endopeptidases .....	189
5.2	Aplicação das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT: proteólises das caseínas do leite bovino e da BSA .....	191
5.3	Aplicação das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT: coagulação do leite mediante catálise pela Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN.....	193
5.4	Aplicação das Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-α-QT: catalisadores em rota sintética de dipeptídeos pré-estabelecida por nós (UNGARO e col., 2015) .....	194

6. CONCLUSÕES .....	197
7. REFERÊNCIAS.....	199
SUMULA CURRICULAR.....	220

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Enzimas e suas aplicações

Enzimas são proteínas que têm a capacidade de catalisar reações químicas essenciais para todos os seres vivos permitindo que essas reações ocorram em tempo hábil para mantê-los assim. As estruturas primária, secundárias e terciárias (sequência de aminoácidos e estrutura 3D, respectivamente) das enzimas proporcionam a elas quimio-, régio- e estereosseletividade, fazendo delas catalisadores de alta eficiência e especificidade. Um exemplo é o conjunto de reações para conversão de açúcares em álcool, CO<sub>2</sub> e água com geração de energia na forma de ATP realizada pelas leveduras que espontaneamente levaria vários anos para ocorrer, mas graças à ação de enzimas específicas leva apenas alguns segundos (BLANCO; BLANCO, 2017; RENNEBERG et al., 2017).

Apesar do uso de enzimas ser antigo na história humana, seu estudo científico se iniciou apenas nos séculos XVIII e XIX. O termo enzima foi primeiramente utilizado por Willy Kuhne em 1877. Esse nome foi adotado após passar por vários outros, como diástase e fermento, tendo sido cunhado ao longo do entendimento do que são as enzimas. Emil Fischer foi o químico orgânico que em 1894 sugeriu que esses biocatalisadores funcionavam num sistema “chave-fechadura”, pois observou que uma enzima nem sempre reconhecia o substrato de outra e vice-versa (LEMIEUX; SPOHR, 1994). Hoje essa noção já não é considerada correta para se explicar a alta especificidade das enzimas, pois ela acaba implicando numa rigidez estrutural não compatível com o conhecimento gerado sobre proteínas e suas ações biológicas (KOSHLAND, 1995). De fato, no fim da década de 1950, Koshland propôs em seu trabalho (KOSHLAND, 1958) a hipótese do “ajuste induzido” em que a enzima é

estruturalmente maleável e o substrato tem capacidade de causar alterações em sua estrutura terciária ao interagir com ela, favorecendo a formação do complexo enzima substrato para que a reação ocorra. Essa hipótese é a mais aceita até os dias de hoje. (BLANCO; BLANCO, 2017; PUNEKAR, 2018).

Em 1898, foi proposta a reversibilidade das reações enzimáticas, o que acabou desencadeando estudos físico-químicos que contribuíram para a elucidação da ação de enzimas. Um dos mais importantes estudos nessa área foi feito por Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten, que conseguiram mostrar para uma concentração de enzima a relação entre a velocidade inicial da reação catalisada com a concentração de complexo enzima-substrato na famosa equação de Michaelis-Menten, que possibilita a determinação das constantes cinéticas  $V_{max}$  e  $K_m$ , de suma importância para o estudo cinético de enzimas até os dias atuais (JOHNSON; GOODY, 2011).

Outro passo importante para se compreender as enzimas foi dado por James B. Sumner em 1926, pois ele foi o primeiro a purificar e cristalizar a urease e a demonstrar que ela apresentava propriedades similares às das proteínas (SUMNER, 1926). Os trabalhos de purificação e cristalização de enzimas feitos por John H. Northrop (1932) e por outros sedimentaram a natureza proteica das enzimas, sendo que Sumner, Northrop e Stanley receberam o Nobel de Química 1946 (BLANCO; BLANCO, 2017; RENNEBERG et al., 2017).

Como todo ser vivo produz diferentes enzimas, ao longo da história, uma ampla gama de fontes enzimáticas foi descrita visando a aplicação em processos diversos na ciência e na indústria. Essas fontes são vegetais (IIZUKA; AISHIMA, 1999), animais (KAGEYAMA et al., 2010) e microbianas (ZHAO et al., 2019), porém atualmente as últimas são as mais exploradas por permitirem uma produção em escala maior das

enzimas de interesse, com mais controle, com menos contaminantes e ainda de maneira mais rápida e mais barata (SINGH; SINGH; SACHAN, 2019).

As enzimas podem ser usadas em sínteses orgânicas, conforme demonstrado no trabalho de Schultz e col. (2019), que utilizaram a enzima biossintética cilindrociclofane para realizar alquilação de Fidel-Crafts. Também podem ser empregadas na resolução de compostos quirais (LI et al., 2019b), em biossensores para detectar diferentes analitos em amostras biológicas (LIU et al., 2019)/ambientais (AYENIMO; ADELOJU, 2015), no tratamento de doenças como o câncer de mama (BENCHAMIN et al., 2019), na inibição da formação de biofilme agindo como antibiótico (CHEN et al., 2018) e para diversas outras aplicações. As enzimas também encontram aplicação na indústria alimentícia (SHARMA; PATEL; SUGANDHA, 2017), na obtenção de saborizantes (SCHWENDENWEIN et al., 2016), na limpeza de equipamentos (ARGÜELLO, 2003) e no enriquecimento nutricional (AGYEI; AKANBI; OEY, 2019).

De acordo com o “The Enzyme Database”, é possível organizar as enzimas conhecidas em sete diferentes classes de acordo com o tipo de reação que catalisam: oxidoredutases, enzimas que catalisam reações de oxidação; transferases, que catalisam a transferência de um grupo de uma molécula para outra; hidrolases, grupo que catalisa a reação de hidrólise de uma grande diversidade de ligações covalentes; liases, enzimas que catalisam diversas quebras e formações de ligações covalentes por mecanismos diferentes da oxidação ou hidrólise, podendo agir sobre um ou dois substratos ao mesmo tempo; isomerases, que catalisam mudanças geométricas ou estruturais em moléculas; ligases, grupo que catalisa a ligação de dois substratos ao mesmo tempo que hidrolisa moléculas de trifosfato, como, por exemplo, o ATP e translocases, enzimas que catalisam a transferência de íons ou moléculas através de

uma membrana (MCDONALD; BOYCE; TIPTON, 2015; *The enzyme database*, <https://www.enzyme-database.org/class.php>, acessado 30/12/2019).

## **1.2 Peptidases: hidrolases responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas**

Dentro das classes listadas acima há uma grande variedade de subclasses que especificam ainda mais a atividade de cada enzima. Entre as hidrolases existem aquelas chamadas de proteases ou peptidases. Esses dois termos foram introduzidos no início do século XX; o primeiro por S. H; Vines (1903) para definir “enzimas que digerem proteínas” e o segundo por W. Petersen (1918) para definir a ereptase como uma enzima que “destrói fragmentos tóxicos de proteínas” (que seriam peptídeos). Atualmente, os dois termos são sinônimos, sendo que peptidase é o mais preciso na descrição da natureza dessas enzimas (BARRETT; MCDONALD, 1986).

As peptidases participam de diversos processos biológicos intra- e extracelular, como no processamento pós-traducional de muitas proteínas, na neutralização de toxinas proteicas, na reciclagem de proteínas, na liberação de peptídeos bioativos pela digestão de proteínas, em vias de regulação de diversas células e na obtenção de aminoácidos a partir dos nutrientes (RAWLINGS; BARRETT, 2013). Elas podem ser divididas em dois subgrupos: as endopeptidases, que catalisam a hidrólise de ligações internas de proteínas e peptídeos, e as exopeptidases, que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas dos N- e C- terminais livres. Elas podem ser classificadas de acordo com o seu mecanismo catalítico, homologia estrutural ou pH ótimo. Neste trabalho será usada a classificação de acordo com o mecanismo catalítico (PHILIPPS-WIEMANN, 2018).

As seis principais classes são as serina-, treonina-, cisteína-, aspártico-, glutâmico- e metalo-endopeptidases. A principal diferença entre esses grupos é o



nucleófilo que inicia o processo catalítico. No caso das serina-, treonina- e cisteína-endopeptidases, o nucleófilo é a função da cadeia lateral do resíduo de aminoácido que dá nome ao grupo (serina, treonina e cisteína, respectivamente). Já nas aspártico-, glutâmico- e metalo-endopeptidases, o nucleófilo é a água, que é polarizada, respectivamente, pela cadeia lateral do ácido aspártico, do ácido glutâmico ou por um metal presente na enzima (PHILIPPS-WIEMANN, 2018).

A especificidade das peptidases está ligada diretamente a diversas interações entre a enzima e o substrato. Para o substrato, os resíduos que sofrerão a hidrólise são chamados de P1 (o resíduo de aminoácido que ficará com a carboxila livre) e P1' (o resíduo de aminoácido que ficará com a amina livre). Os outros resíduos de aminoácidos que são considerados para a interação vão subindo no número de indexação para os dois lados (-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-). Para a endopeptidase, as regiões que interagem com os substratos são chamadas de subsítios e são nomeadas como -Sn-Sn'- (onde n é o número correspondente àquele referente a Pn-Pn'-) seguindo a indexação da interação. São essas interações que definem se uma enzima é mais (tripsina) ou menos (termolisina) específica (SCHAUPERL et al., 2015; SCHECHTER; BERGER, 1967).

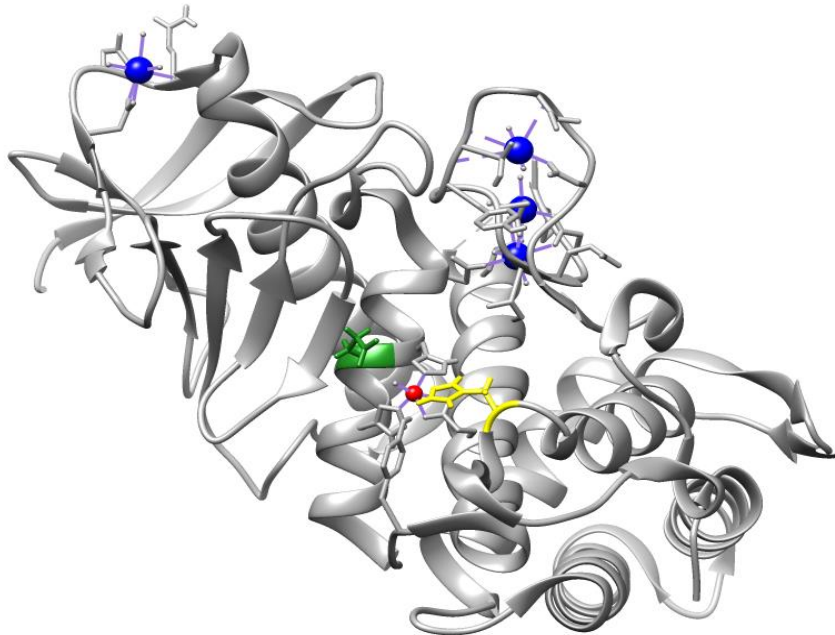
Além da importância biológica, as peptidases são utilizadas como catalisadores *in vitro* em diversos processos da pesquisa científica e industriais. Um dos usos mais importantes é na proteômica, o estudo de todas as proteínas de uma dada amostra biológica, em que essas enzimas são usadas na etapa de proteólise da amostra para gerar fragmentos que terão seus carboxi- e amino- terminais conhecidos, já que serão gerados de acordo com a especificidade da peptidase. Esses fragmentos serão analisados por espectrometria de massas para identificar a proteína a partir da comparação dos fragmentos gerados com diferentes bancos de dados (HIXSON et

al., 2017). Como a hidrólise da ligação peptídica catalisada por peptidases é reversível, é possível utilizar essas enzimas para catalisar a síntese da ligação peptídica partindo-se tanto de aminoácidos quanto de peptídeos como substratos. A síntese consiste em modificar esses substratos ou o meio reacional para tornar a síntese da ligação peptídica termodinamicamente favorável. Essa estratégia é utilizada na síntese industrial do adoçante aspartame (DICOSIMO et al., 2013).

Na indústria alimentícia e farmacêutica essas enzimas se destacam pela capacidade proteolítica, sendo utilizadas para: 1) amaciar a carne (BEKHIT et al., 2014; SINGH; SHRIVASTAVA; OJHA, 2019), 2) produção e processamento de queijo (FACHRANIAH et al., 2019; LIBURDI et al., 2018; RANI; JAGTAP, 2019), 3) preparação de fórmula infantil para suplemento alimentar (LI et al., 2019a; VANDENPLAS et al., 2019), 4) obtenção de peptídeos bioativos para isolamento ou desenho de novos medicamentos (RAMACHANDIRAN et al., 2019; SUTTISUWAN et al., 2019), 5) diminuição de efeitos alérgicos proteínas alimentares (WAN et al., 2019) e em diversas outras aplicações.

### 1.2.1 Termolisina bacteriana (TLN)

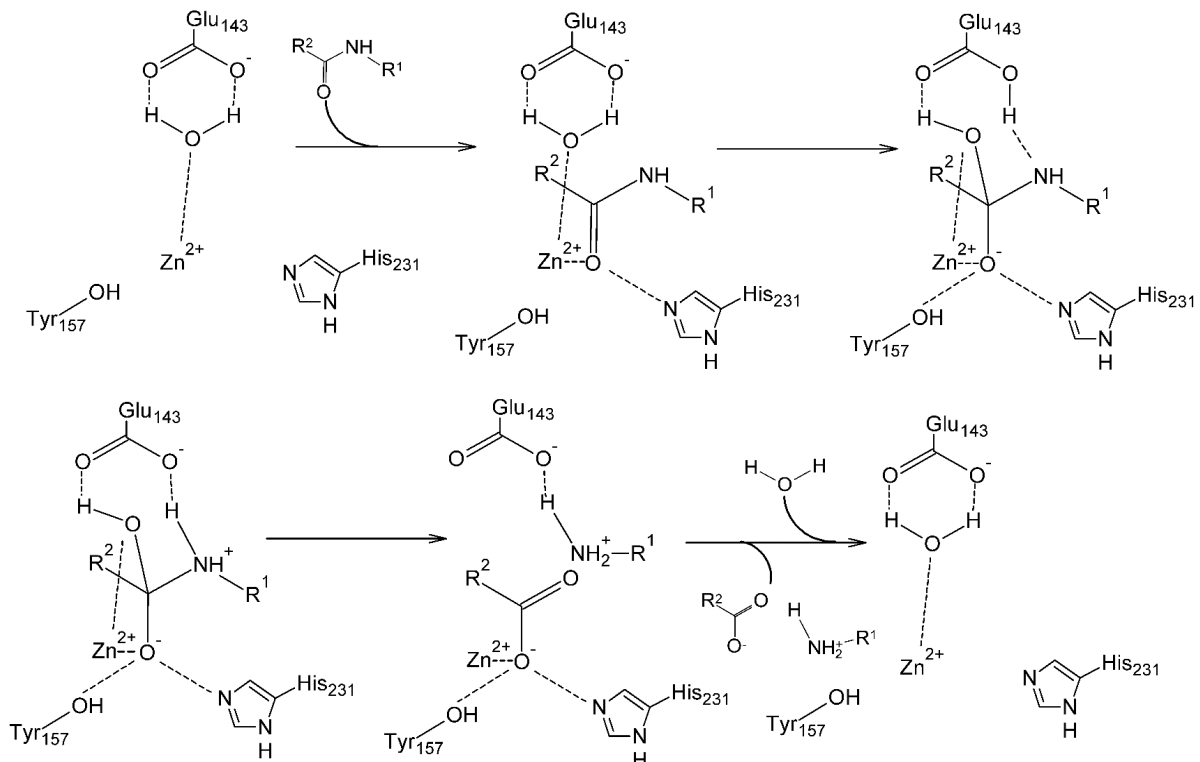
A termolisina bacteriana (TLN; EC 3.4.24.27) é uma metalo-endopeptidase de origem microbiana primeiramente isolada da bactéria gram-positiva *Bacillus thermoproteolyticus*. Historicamente, ela foi a primeira metalo-peptidase cristalizada e com estrutura elucidada (BURG; EIJSINK, 2013). Sua massa molecular é 34,6 kDa, tem 316 resíduos de aminoácidos em sua sequência e liga cálcio e zinco (TITANI et al., 1972). A **Figura 1** apresenta uma imagem montada com o software Chimera (PETTERSEN et al., 2004) usando os dados obtidos do Protein Data Bank (PDB), cujo código é 4OW3.



**Figura 1:** Modelo em fitas da TLN modelado pelo software Chimera a partir do arquivo PDB 4OW3. Amarelo: His<sub>231</sub>; Verde: Glu<sub>143</sub>; Vermelho: Zn<sup>2+</sup>; Azul: Ca<sup>2+</sup>.

Os quatro íons de Ca<sup>2+</sup> garantem uma estrutura mais rígida, dando à TLN maior resistência à autólise e maior estabilidade térmica. Já o íon de Zn<sup>2+</sup> participa da catálise polarizando a molécula de H<sub>2</sub>O que participará da reação de hidrólise de ligações peptídicas. Esse íon está ligado às histidinas do motivo His-Glu-Leu-Thr-His localizado na fenda do sitio catalítico. Além da água e do Zn<sup>2+</sup> é proposto que os resíduos Glu<sub>143</sub> e His<sub>231</sub> participem da catálise, sendo o Glu<sub>143</sub> responsável por polarizar a molécula de H<sub>2</sub>O e o His<sub>231</sub> protonado responsável por estabilizar o estado de transição. A **Figura 2** apresenta um mecanismo proposto para a hidrólise catalisada pela TLN (ADEKOYA; SYLTE, 2013; BURG; EIJSINK, 2013).

A TLN apresenta uma especificidade que depende da interação de vários resíduos de aminoácidos do substrato com ela. Sua especificidade primária é por ligações peptídicas com resíduos hidrofóbicos e volumosos na posição P1' (**item 1.2**), preferencialmente Phe, Ile, Leu, Val, Ala e Met e com menor probabilidade His, Tyr,



**Figura 2: Mecanismo da catálise da hidrólise da ligação peptídica pela TLN (ADEKOYA; SYLTE, 2013).**

Asn, Ser, Thr, Gly, Glu ou Asp. Em P1 há uma preferência por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e a hidrólise é dificultada quando Glu e Asp ocupam essa posição. Prolina não impede a hidrólise quando está na posição P1, mas o faz quando em P2' (KEIL, 1992). Em P2 e P2' há uma preferência na seguinte ordem: Leu>Ala>Phe>Gly. Ala, Phe ou Gly em P3 e P3' favorecem a catálise. Em P3' também há uma preferência por resíduos básicos (Lys, Arg e His) (BURG; EIJSINK, 2013).

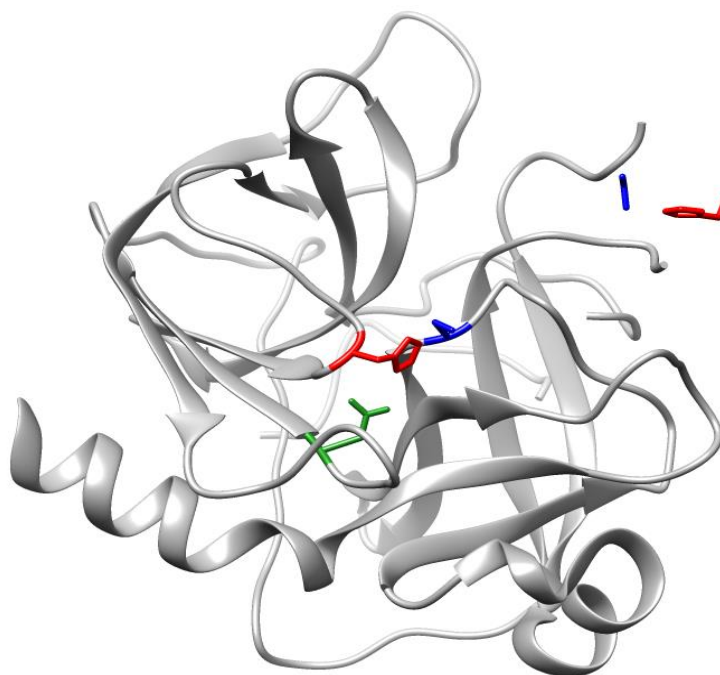
O pH ideal para a atividade amidásica da TLN é em torno de 7, tampão fosfato pode inibir sua atividade e a presença de  $CaCl_2$  no meio minimiza sua autólise (BURG; EIJSINK, 2013). Em meios contendo  $Ca^{2+}$  a TLN resiste a temperaturas próximas a 80 °C com pouca denaturação (GRANDI et al., 1980).

As principais aplicações da TLN vão desde a pesquisa científica até a indústria. Ela pode ser aplicada na digestão de proteínas para a obtenção de peptídeos bioativos de interesse nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Um desses peptídeos é a

caseína A, resultante da digestão da caseína do leite bovino catalisada pela TLN que tem ação antimicrobiana (GUINANE et al., 2015). Outros exemplos são o Leu-Arg-Ala e o Tyr-Tyr obtidos das proteínas do farelo de arroz e que apresentam atividade anti-hipertensiva (SHOBAKO et al., 2018). A TLN pode também ser utilizada como catalisador na síntese de ésteres de ciclodexina usados como material transportador de drogas terapêuticas (PEDERSEN et al., 2005), no desenvolvimentos de novos materiais inteligentes como as nanofibras peptídicas (DEBNATH; ROY; ULIJN, 2013) e peptídeos auto-organizáveis (CONTE; LAU; ULIJN, 2017). Na síntese de peptídeos, a TLN pode ser usada na obtenção de precursores de saborizantes, como o Z-Ser-Leu-OMe (ROMERO et al., 1997) e o Z-Ala-Phe-OMe (TRUSEK-HOLOWNIA, 2003b; UNGARO et al., 2015), na produção do adoçante aspartame (Asp-Phe-OMe) impedindo a formação do  $\beta$ -aspartame de sabor amargo como contaminante (DICOSIMO et al., 2013). Além dessas aplicações também já foi relatada sua aplicação no diagnóstico da doença causada pelo príon, pois a isoforma que causa a doença é resistente à TLN enquanto que a isoforma normal da proteína é hidrolisada rapidamente (OWEN et al., 2007).

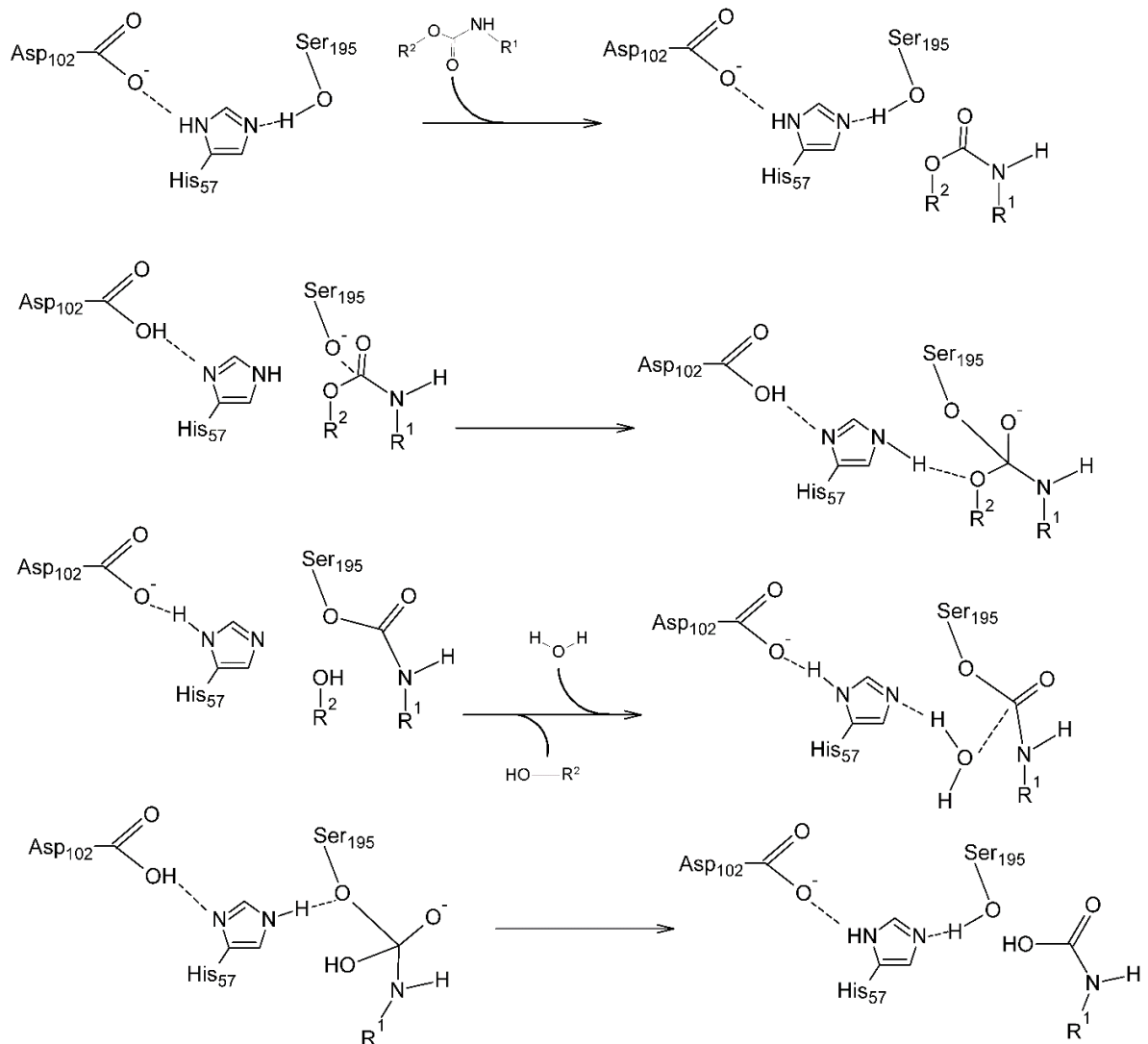
### 1.2.2 $\alpha$ -Quimotripsina bovina ( $\alpha$ -QT)

A  $\alpha$ -Quimotripsina bovina ( $\alpha$ -QT; EC 3.4.21.1) é uma serina-endopeptidase presente no suco digestivo que se origina do processamento proteolítico do precursor quimotripsinogênio A. Sua massa molar é de aproximadamente 25 g.mol<sup>-1</sup> e é composta por três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto. Sua sequência é dividida entre as três cadeias que ordinariamente estavam unidas no quimotripsinogênio A; a cadeia A vai do resíduo 1 ao 13, a B vai do 16 ao 147 e a C vai do 149 ao 245 (GRÁF; SZILÁGYI; VENEKEI, 2013). A **Figura 3** apresenta uma



**Figura 3: Modelo em fitas da  $\alpha$ -QT modelado pelo software Chimera a partir do arquivo PDB 4CHA. Verde: Asp<sub>102</sub>; Vermelho: His<sub>57</sub>; Azul: Ser<sub>195</sub>.**

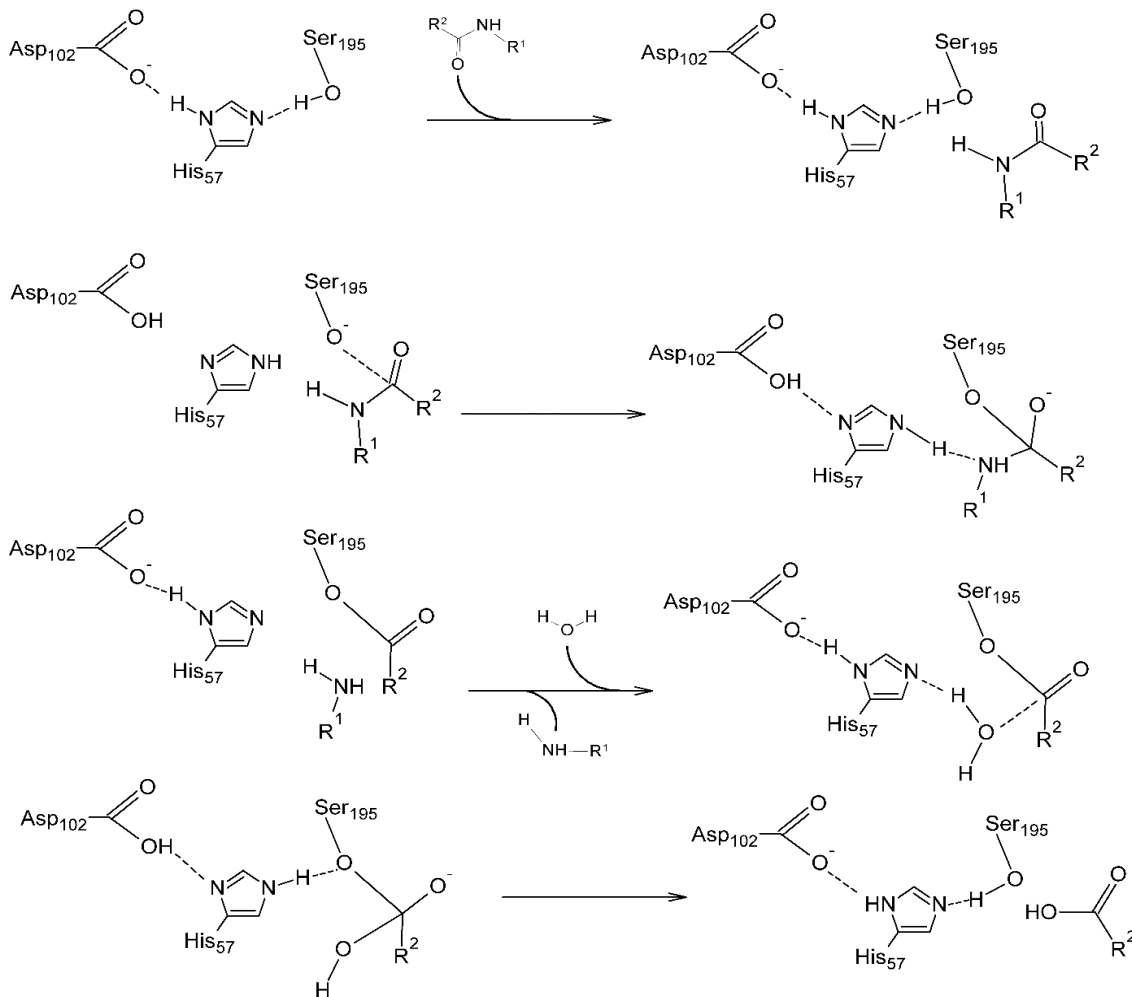
imagem montada da  $\alpha$ -QT com o software Chimera (PETTERSEN et al., 2004) usando os dados obtidos do PDB cujo código é 4CHA. Ela apresenta a tríade catalítica que é comum às serina-endopeptidase, formada pela His<sub>57</sub>, Asp<sub>102</sub> e Ser<sub>195</sub>. O resíduo de Ser<sub>214</sub> está ligado por ligação de hidrogênio ao Asp<sub>102</sub>, contribui para a estabilidade polar do ambiente e é essencial, para a capacidade catalítica da enzima, pois ataca nucleofílicamente a carbonila do substrato utilizando a His<sub>57</sub> como base geral (GRÁF; SZILÁGYI; VENEKEI, 2013). Outro resíduo importante para a catálise é o Gly<sub>193</sub>, que, junto com a Ser<sub>195</sub> orienta a posição do grupo NH do substrato no sítio ativo (MCGRATH et al., 1992). Além da atividade amidásica, a  $\alpha$ -QT apresenta atividade esterásica. A **Figura 4** apresenta o mecanismo de hidrólise catalisado pela  $\alpha$ -QT. A **Figura 5**, mostra o mecanismo da hidrólise de um éster (GRÁF; SZILÁGYI; VENEKEI, 2013).



**Figura 4: Mecanismo para a catálise da hidrólise da ligação peptídica por serina-endopeptidases (GRÁF; SZILÁGYI; VENEKEI, 2013).**

A especificidade da atividade amidásica da  $\alpha$ -QT é por Tyr, Phe, Trp e Leu na posição P1. Em P1' há uma preferência por Ser, Thr, Gln, Asn, Met, His, Ala e Lys, mas a presença de uma Pro desfavorece a hidrólise (DUAN; LAURSEN, 1994). O pH ideal para a  $\alpha$ -QT é em torno de 8.

Assim como a TLN, a  $\alpha$ -QT podem ser utilizadas na geração de peptídeos bioativos pela proteólise de proteínas. Jeewanthi e col. (2017) utilizaram a  $\alpha$ -QT e diversas outras endopeptidases para catalisar a digestão limitada da proteína do soro do queijo mozzarella e identificar a bioatividade detectada nesses hidrolisados. Ela também foi usada na proteólise de proteínas menos comuns, como



**Figura 5: Mecanismo para a catálise da hidrólise de éster pela  $\alpha$ -QT (GRÁF; SZILÁGYI; VENEKEI, 2013).**

a de músculo de polvo (*Octopus aegina*) para obter peptídeos antioxidantes (SUDHAKAR; NAZEER, 2017). Também foi empregada para identificar peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) pela proteólise de proteínas provenientes da espirulina (*Arthrospira platensis*) (ANEKTHANAKUL et al., 2019), bem como utilizada em estudos de proteômica (YAMAGUCHI et al., 2010).

Além disso, a  $\alpha$ -QT é usada como catalisador da síntese de diversos peptídeos com aplicações diferentes. Exemplos são as sínteses do Tyr-Tyr, um inibidor da ECA (NARAI-KANAYAMA et al., 2009), do precursor do analgésico neuropeptídico kyotorfina (Tyr-Arg) (KIM et al., 2001) e de oligopeptídeos de Lys-Cys-Leu usados em

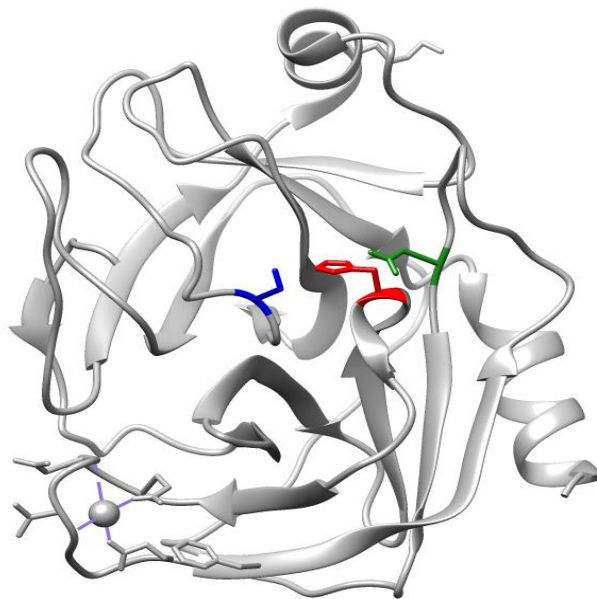


produtos para modelar cabelos, substituindo outras substâncias danosas ao cabelo (MARTINS; SILVA; CAVACO-PAULO, 2019).

### 1.2.3 Tripsina bovina (TRY)

A tripsina bovina (TRY; EC 3.4.21.4) também é uma serina-endopeptidase encontrada no suco digestivo de bovinos. Sua massa molar é de aproximadamente  $24 \text{ g.mol}^{-1}$  e tem 223 resíduos de aminoácidos divididos em duas cadeias polipeptídicas, a alfa-tripsina 1 e 2. A **Figura 6** apresenta uma estrutura representada na imagem montada com o software Chimera (PETTERSEN et al., 2004) usando os dados obtidos do PDB, cujo código é 4I8G. Ela também apresenta a tríade catalítica Asp<sub>102</sub>, His<sub>57</sub> e Ser<sub>195</sub>. Sua estrutura terciária é parecida com a da quimotripsina bovina, mas a primária é diferente (50%). Um resíduo de Asp<sub>189</sub> que ocupa a base do sítio ativo ajuda na estabilização das cargas dos resíduos de Arg e Lys que interagem com a enzima. Dois resíduos de Gly (o 216 e 226) também ajudam interagindo com a porção alifática das cadeias laterais dos dois resíduos (Arg e Lys) (BAIRD, 2017). Essa endopeptidase também apresenta atividade esterásica. A **Figura 4** resume o mecanismo de hidrólise da ligação peptídica catalisado pela TRY (BAIRD; CRAIK, 2013).

A especificidade dessa enzima é tamanha que praticamente reconhece apenas Lys e Arg na posição P1, o que faz dela uma endopeptidase bastante específica. Como no caso da  $\alpha$ -QT, Pro em P1' impede a proteólise. Outras interações entre enzima e substrato não parecem influenciar sua especificidade, mas algumas podem influenciar a catálise. De fato, Arg, Ile, Leu, Lys ou Phe na posição P2 ou Pro em P3 diminuem a atividade catalítica (BAIRD; CRAIK, 2013).



**Figura 6: Modelo em fitas da TRY modelado pelo software Chimera a partir do arquivo PDB 4I8G. Verde: Asp<sub>102</sub>; Vermelho: His<sub>57</sub>; Azul: Ser<sub>195</sub>.**

A TRY é a principal endopeptidase utilizada em proteômica graças às suas altas eficiência, especificidade e facilidade de fornecer peptídeos para sequenciamento por espectrometria de massas (VANDERMARLIERE; MUELLER; MARTENS, 2013). Esses fatores favoreceram que mais de 90% das massas de fragmentos depositados em banco de dados sejam de origem trípica (TSIATSIANI; HECK, 2015). Além da proteômica, as propriedades da TRY permitem que ela seja usada na obtenção de peptídeos bioativos como a TLN e a  $\alpha$ -QT, como ocorreu quando usada junto da TLN na obtenção de fosfo-peptídeos da caseína do leite bovino (ROCHA-MARTIN; FERNÁNDEZ-LORENTE; GUIBAN, 2018), na obtenção de peptídeos anti-inflamatórios (BAMDAD et al., 2017; SUTTISUWAN et al., 2019) e na obtenção do tripeptídeo Leu-Arg-Pro, que apresenta ação inibidora da ECA, a partir da proteólise da lactoferrina bovina (GU; WU, 2016). A TRY também foi usada como catalisador da síntese do precursor do Lys-Gly, um peptídeo com sabor umami/salgado (ROMERO et al., 1997), do Z-Arg-Gly-Asp-Ser-NH<sub>2</sub> o precursor do peptídeo Arg-Gly-Asp-Ser com propriedades de adesão celular (HUANG et al., 2006).

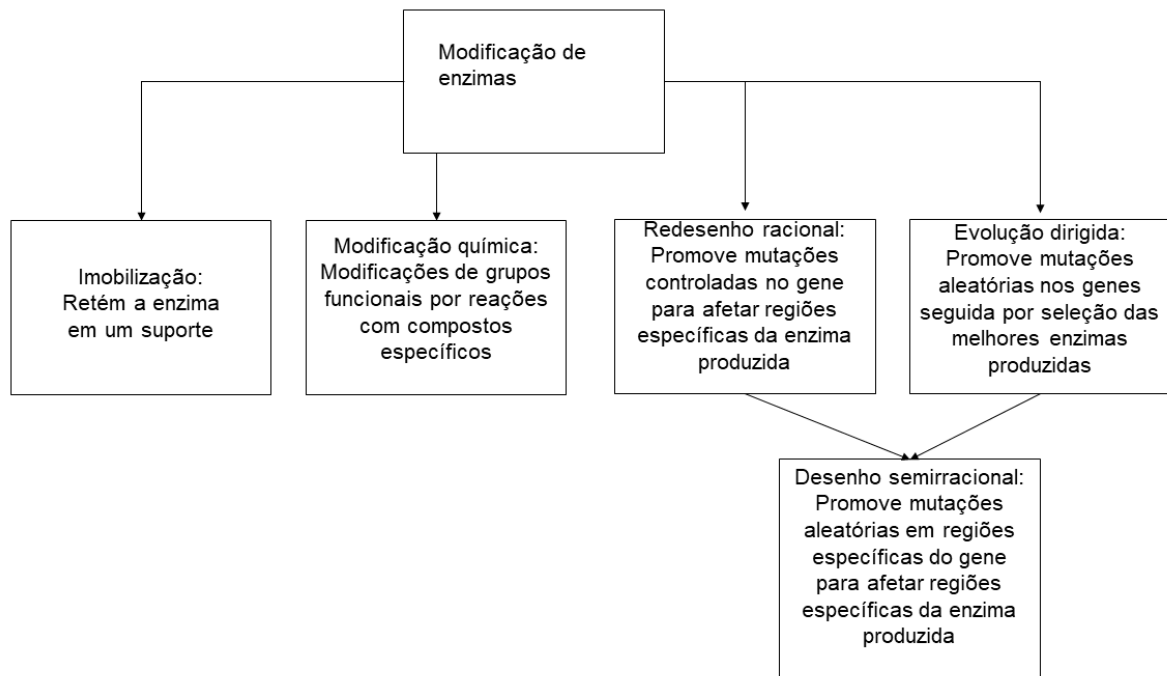
### 1.3 Imobilização de enzimas: estratégias para aprimorar enzimas

A diversidade de aplicações exemplificadas acima impulsiona cada vez mais o estudo de enzimas. Entretanto, a alta especificidade, a dependência de condições reacionais específicas (pH, temperatura, co-fatores), a dificuldade de reuso e o alto preço de algumas enzimas, tem inviabilizado e encarecido seu uso rotineiro em grande escala. Atualmente existem algumas estratégias que visam aprimorar enzimas. Uma delas é o estudo da evolução dirigida que visa alterar os genes de microrganismos para eles gerarem enzimas mais eficientes, sendo estas selecionadas por uma espécie de “seleção natural” feita em laboratório. Os passos para realizar essa seleção são: promoção de mutações nos microrganismos para gerar uma biblioteca mutante, seleção dos mutantes que expressam as enzimas de interesse e isolamento do gene responsável pela melhoria (MADHAVAN et al., 2017). Tal estratégia de modificação rendeu um Prêmio Nobel para Frances H. Arnold por conduzir o primeiro estudo de evolução dirigida de enzimas sendo um exemplo desse trabalho o aprimoramento da atividade da subtilisina em 256 x em meio de 60% de dimetilformamina (CHEN; ARNOLD, 1993). Outra estratégia que visa alterar a sequência primária da enzima é o redesenho racional, nele é usada a estrutura primária e terciária da enzima determinada por diferentes métodos para propor alterações na sequência de aminoácidos que alteraria propriedades como estabilidade e eficiência catalítica. Essas alterações são feitas por mutação em genes específicos de bactérias que produziram as enzimas (OSBON; KUMAR, 2020). Um exemplo da aplicação dessa estratégia é o trabalho de Yang e col. (2013) que utilizando um modelo baseado na estrutura cristalina de  $\alpha$ -Amilase do *Bacillus subtilis* propuseram modificações na sequência dessa enzima para melhorar sua eficiência catalítica e sua estabilidade em pH mais baixo que o convencional para ela.

As propriedades das enzimas também podem ser modificadas pela reação de grupos funcionais presentes nestas biomoléculas com outros compostos específicos, essa é a modificação química de enzima. Essas modificações podem trazer maior estabilidade, melhor eficiência catalítica, diferença em sua solubilidade, mudança em seu pH ideal entre outras (DÍAZ-RODRÍGUEZ; DAVIS, 2011; OSBON; KUMAR, 2020). Um exemplo dessa estratégia é a PEGlação, na qual a enzima é ligada covalentemente ao polímero polietileno glicol, o que pode melhorar sua solubilidade e estabilidade em meios orgânicos, como observado no trabalho relatado por Jeng e col. (2006) que promove a PEGlação da peroxidase de rabanete e mostra que o novo biocatalizador obtido se mostrou mais ativo, com maior estabilidade térmica e pode ser utilizado para a síntese do polímero poli(2-naftol). O tempo de meia vida de enzimas em meios biológicos também pode ser modificado, como ocorreu com a superóxido dismutase ligada ao éster butílico de poli-(estireno-co-ácido maleico) que teve seu tempo de meia vida *in vivo* aumentado em quase 50 vezes (OGINO et al., 2009).

Outra estratégia que visa principalmente aumentar a estabilidade de enzimas é a imobilização. Nela, a enzima pode ser ligada a um material insolúvel ou proteico, o que a torna menos suscetível à desativação por solventes orgânicos, menos perturbada por liofilização e mais resistente à pressão de cisalhamento e às temperaturas altas (BRADY; JORDAAN, 2009). Essa técnica produz estruturas parecidas com aquelas formadas quando as enzimas que estão associadas a membranas ou estruturas celulares o que dão a elas uma maior estabilidade (OSBON; KUMAR, 2020). O primeiro estudo de imobilização data de 1916, com a imobilização de uma invertase em carvão feita por Nelson e Griffin (1916). Nos dias atuais, a imobilização de enzimas se destaca por ser mais atrativa para aplicações industriais,

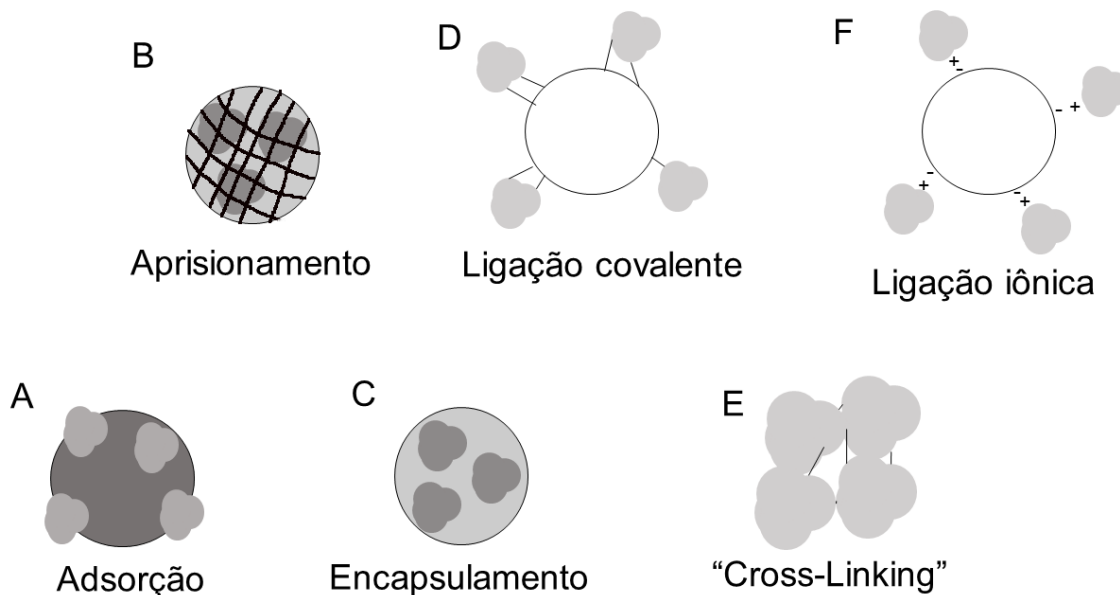
já que permite uma separação fácil do meio reacional e o reuso das enzimas (BRADY; JORDAAN, 2009). A **Figura 7** resume os métodos de modificação de enzimas.



**Figura 7: Métodos de modificação de enzimas. Adaptado de OSBON; KUMAR, 2019.**

Os métodos de imobilização podem ser divididos entre físicos e químicos. A principal diferença entre esses métodos é o tipo de interação entre o suporte e enzima. Os métodos físicos são a adsorção, o aprisionamento e a encapsulação, os quais dependem de forças de van der Waals, interação hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, sendo, portanto, reversíveis. Adsorção (**Figura 8A**) foi o primeiro método relatado para a imobilização de enzimas, sendo que as interações envolvidas são as três citadas acima e tem a vantagem de ser simples, de baixo custo e não interferir significativamente na estrutura tridimensional da enzima; porém, a sua principal desvantagem é a possibilidade de perda do catalisador para o meio. O aprisionamento (**Figura 8B**) consiste em prender a enzima na malha de um polímero, e como no caso da adsorção, é um processo simples, não altera profundamente a estrutura do

catalisador e não requer uma grande quantidade dele; seus pontos negativos são a possível perda de catalisador para o meio e a sua restrição ao substrato, que tem que ser pequeno o suficiente para entrar na malha. O encapsulamento (**Figura 8C**) é parecido com o aprisionamento, mas, ao invés de ficar presa na malha de um polímero, a enzima fica confinada por uma membrana que permite que haja um microambiente separado para ela; a sua principal vantagem é a alta eficiência catalítica; já a desvantagem é que pode ocorrer inativação da enzima e a membrana pode interferir no transporte de massa caso o substrato seja muito volumoso ou de alta massa molar (DWEVEDI, 2016; OSBON; KUMAR, 2020).



**Figura 8: Métodos de imobilização de enzimas. Adaptado de BRADY; JORDAAN, 2009.**

Os métodos de imobilização por ligação química são os de ligação covalente, "cross-linking" e ligação iônica que, em geral, são irreversíveis. A imobilização por ligação covalente (**Figura 8D**) consiste em ligar a enzima em um suporte sólido por esse tipo de interação que, em geral, impede a perda do catalisador para o meio e torna o catalisador mais rígido estruturalmente, o que aumenta sua resistência à

denaturação térmica. Ela pode ser feita de maneira direta ou usando um espaçador para minimizar a interferência do suporte na enzima; a principal desvantagem deste método é que a ligação pode alterar significativamente a estrutura tridimensional da enzima, reduzindo sua atividade catalítica. O “cross-linking” (**Figura 8E**) é o método que promove ligações cruzadas entre as moléculas das enzimas a partir de um ativador bi- ou multifuncional; suas principais vantagens são a simplicidade e o aumento de estabilidade estrutural da enzima; já as desvantagens são os efeitos negativos de transferência de massa e perda de enzima durante o processo. Finalmente, a imobilização por ligação iônica (**Figura 8F**) é feita usando um suporte com grupos funcionais ionizáveis que formam ligações iônicas com grupos funcionais das enzimas. Ele interfere pouco na estrutura do catalisador e a principal desvantagem é que a estabilidade da ligação iônica depende do pH e conseqüentemente impõe restrições de meios onde o biocatalisador pode ser usado (BRADY; JORDAAN, 2009; DWEVEDI, 2016; OSBON; KUMAR, 2020).

### **1.3.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-NH<sub>2</sub>: um suporte superparamagnético para metais e enzimas**

Há uma grande variedade de suportes para a imobilização de enzimas, tais como sílica (DAGLIOGLU; ZIHNIOGLU, 2012; WANG et al., 2017b), celulose (BALDIKOVA et al., 2017; PRIKRYL et al., 2012), nanogel (HONG et al., 2007), nanopátículas (NPs) (ATACAN et al., 2017; MASDEU et al., 2018). Os nanomateriais se destacam por apresentarem uma alta relação área superficial/volume, o que permite uma maior quantidade de enzima imobilizada por quantidade de suporte.

Nanomateriais apresentam de 1 a 100 nm em tamanho e, no geral, possuem alta resistência mecânica e não apresentam poros em sua superfície, permitindo que as enzimas fiquem em contato direto com o solvente ou meio reacional; isso acaba

minimizando o efeito negativo na transferência de massas que ocorre quando se usa materiais porosos, porém faz com que esses biocatalisadores fiquem mais expostos aos componentes do meio, o que podem afetar as suas atividades. Problemas difusionais também são minimizados com o uso de nanomateriais. Eles também podem apresentar superparamagnetismo, que ocorre quando um material apresenta propriedades magnéticas apenas quando exposto a um campo magnético sem qualquer magnetismo intrínseco residual, o que facilita a sua remoção de meios reacionais por atração ou decantação magnética (CIPOLATTI et al., 2016; ZDARTA et al., 2018a).

O método escolhido para sintetizar as NPs superparamagnéticas é muito importante, pois vai determinar propriedades como tamanho, estabilidade, morfologia e uniformidade das NPs. A síntese pode ser feita por diversos métodos como: esmerilhamento mecânico, co-precipitação, síntese hidrotermal, decomposição térmica, sol-gel, microemulsão e biológico. A **Tabela 1** resume as vantagens e desvantagens de cada método segundo Lu e col. (2007) e Duan e col. (2018).

**Tabela 1: Resumo das vantagens e desvantagens dos métodos de síntese de nanopartículas adaptado de Lu e col. (2007) e Duan e col. (2018).**

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Esmerilhamento mecânico	Simplicidade	Pouco controle de forma e tamanho das NPs
Co-precipitação	Simplicidade	Alta sensibilidade às condições reacionais
Hidrotermal	Alta dispersividade	Depende de alta temperatura e pressão
Decomposição térmica	Grande controle sobre forma e tamanho das NPs	Complicado e tempo reacional longo
Sol-gel	NPs com alta pureza, boa cristalinidade e pode ser facilmente modificado	Tempo reacional longo e uso de solventes orgânicos tóxicos
Microemulsão	NPs com pouca distribuição de tamanho e alta dispersividade, previne aglomeração durante a síntese	Difícil controle do tamanho das NPs e grande volume de solvente
Biológico	Limpo e eficiente	Pouco estudado e NPs resultantes variam com o organismo utilizado



São três os metais que apresentam propriedades ferromagnéticas: Fe, Co e Ni e, por isso, eles são usados para a síntese de NPs superparamagnéticas. A dificuldade de se lidar com esses metais de valência zero faz com que seja preferível utilizar NPs superparamagnéticas de óxidos de ferro, conhecidos como SPIONS, mais fáceis de se trabalhar. As NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  são as mais utilizadas pela facilidade de serem sintetizadas, pela pouca variação de tamanho e pela alta magnetização de saturação (ROSSI et al., 2014). As nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) são comumente utilizadas como suporte, mas podem sofrer agregação que prejudica a relação área superficial/volume. Essa agregação pode ser evitada por compostos com grupos funcionais (tiol, ácido carboxílico ou ácido fosfórico, por exemplo) que aumentam a dispersividade das NPs durante a sua síntese (ZHU et al., 2010).

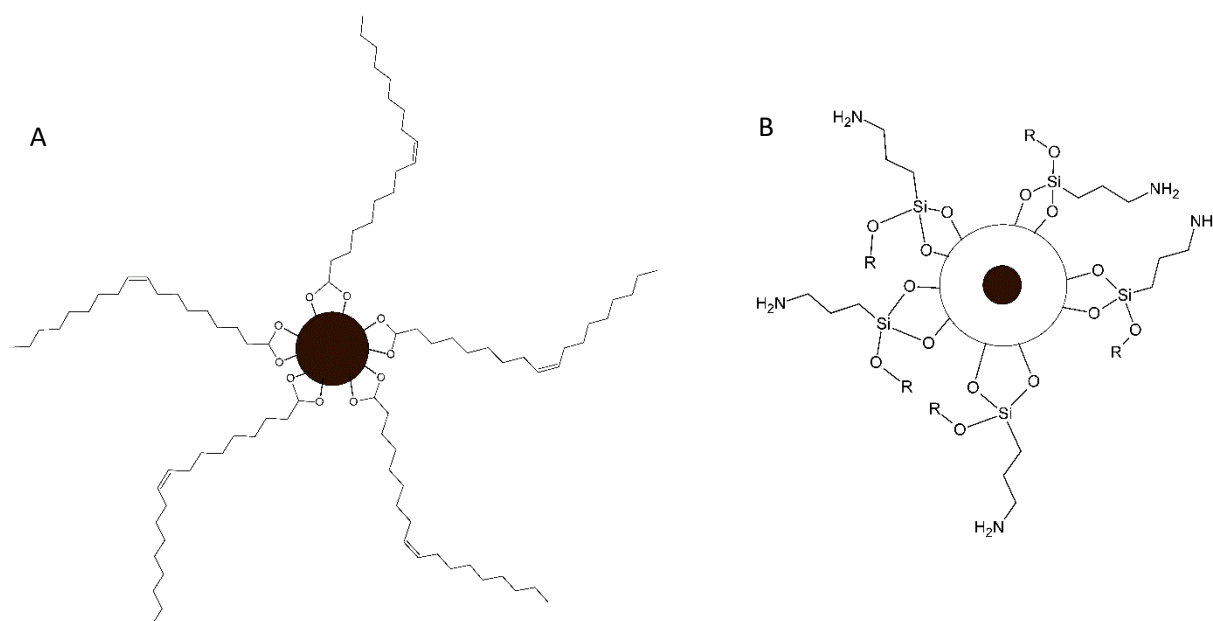
Os três metais citados acima (Fe, Ni e Co) sofrem facilmente oxidação quando expostos ao ar e, por esse motivo, muitas vezes é feito um revestimento nas NPs superparamagnéticas para impedir o contato do ar. Esses revestimentos geralmente formam uma estrutura chamada de “core-shell” e podem ser feitos a partir de compostos orgânicos (surfactantes e polímeros) ou inorgânicos (sílica, carbono e metais preciosos). A **Tabela 2** resume os diferentes revestimentos com suas principais características (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; ROSSI et al., 2014).

Tendo como objetivo um nanocatalisador de ródio ( $\text{Rh}(0)$ ) suportado em NPs superparamagnéticas, o grupo da Profa. Dra. Liane M. Rossi do Laboratório de Nanomateriais e Catálise do IQ-USP desenvolveu o suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$  (JACINTO et al., 2008). Seu núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi preparado pelo método de coprecipitação e revestido de ácido oleico, que forma uma camada protetora e ajuda a dispersão das NPs (**Figura 9A**); (ROSSI et al., 2007). Em seguida foram feitos um

**Tabela 2: Resumo dos revestimentos usados em NPs superparamagnéticas adaptado de Lu e col. (2007) e Rossi e col. (2014).**

Revestimento	Características
Sílica	Impede o contato de ligantes com o núcleo da NP Estável em meio aquoso Facilmente modificada Fácil controle das interações interpartículas
Carbono	Alta estabilidade química e térmica Impermeável à grande parte dos compostos químicos Mais utilizada para NPs metálicas ou de ligas metálicas
Polímeros e surfactantes	Revestimento por adsorção formando uma ou duas camadas Estável em suspensão das NPs Não são indicadas para NPs facilmente oxidáveis ou reativas Estabilidade térmica das NPs não é alta
Metais preciosos	Estabilidade frente a oxidação

revestimento com sílica pelo método da microemulsão e a funcionalização com (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) para chegar em  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$  (**Figura 9B**). A funcionalização com grupos amina serviu para aprimorar o carregamento com  $\text{Rh}^{+3}$ , precursor da nanopartícula de  $\text{Rh}(0)$ ; O nanocatalisador obtido foi aplicado em hidrogenações catalíticas de cicloexeno e benzeno; os resultados demonstraram que ele pôde ser utilizado em 20 ciclos reacionais sem perdas aparentes de atividade catalítica. A **Tabela 3** resume os metais carregados nas NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$ , as reações nas quais os nanocatalisadores foram empregados e seus reusos.

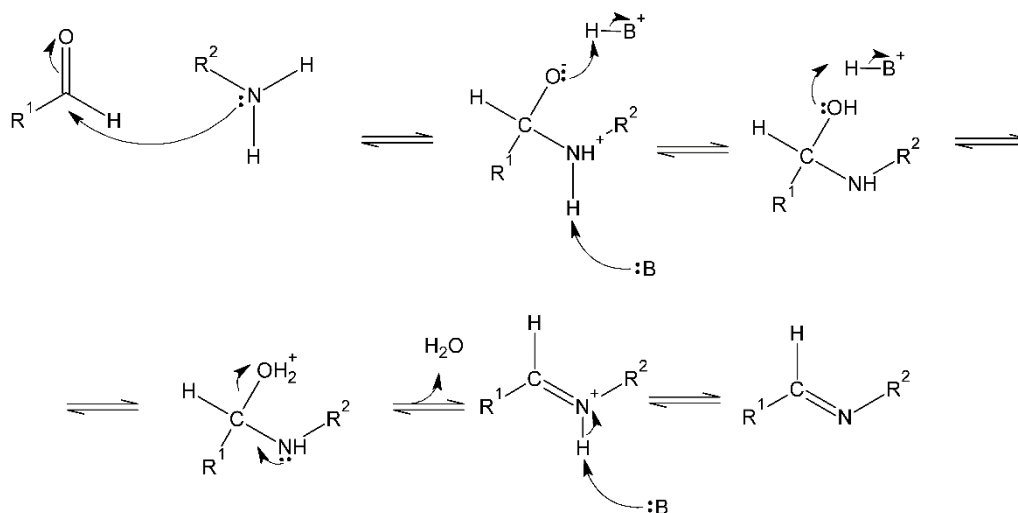


**Figura 9: (A) Figura da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  revestida de ácido oleico; (B) Figura da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$ .**

**Tabela 3: Resumo de trabalhos que utilizaram a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-NH<sub>2</sub> como suporte.**

Metal	Reação	Reuso (ciclos)	Referencia
Platina	Hidrogenação de olefinas e cetonas	7 a 14	(JACINTO; LANDERS; ROSSI, 2009)
Paládio	Hidrogenação de insaturações	10	(DA SILVA; FIORIO; ROSSI, 2017)
Ouro	Hidrogenação de fenilacetileno	5	(FIORIO; LÓPEZ; ROSSI, 2017)
Óxido de cobre	Oxidação de cicloexano	6	(DA SILVA; GONÇALVES; ROSSI, 2017)
Fosfina/Ródio	Hidroformilação	3	(RODRIGUES et al., 2019)
Ouro/Paládio	Oxidação de álcoois benzílicos	5	(SILVA; LANDERS; ROSSI, 2013)
Porfirina/cobre	Oxidação	3	(HENRIQUES et al., 2016)

Os resultados positivos e as vantagens que os métodos de síntese usados (co-precipitação e microemulsão) torna interessante este tipo de suporte para se obter nanocatalisadores de fácil remoção e reuso. Além disso, a presença de grupos amina livres na superfície dessa NP indica que ele também seja um candidato a suporte para imobilização covalente de enzimas em presença de glutardialdeído. Este leva à formação de bases de Schiff ao reagir com as amins livres do suporte e dos resíduos de aminoácidos (**Figura 10**), o que, de fato, já foi demonstrado no nosso trabalho anterior (LIRIA et al., 2014).

**Figura 10: Reação de formação da base de Schiff (XAVIER; SRIVIDHYA, 2014).**

Muitas enzimas já foram imobilizadas em outros nanomateriais superparamagnéticos (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). Feng e col. (2016) imobilizaram a amiloacilase de *Aspergillus oryzae* em nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> para facilitar sua recuperação do meio reacional e seu reuso. Masdeu e col. (2018) imobilizaram a cloroperoxidase fúngica, uma enzima que naturalmente catalisa halogenação e pode catalisar a oxidação de álcoois, em um cluster de NPs de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Além de NPs é possível imobilizar enzimas em estruturas nanométricas que apresentam atividade magnética que contém em seu interior NPs magnéticas, como por exemplo Hong e col. (2008) que desenvolveram um nanogel funcionalizado contendo NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e o utilizaram para imobilizar a  $\alpha$ -QT. Já Fotiadou e col. (2019) sintetizaram nanoestruturas híbridas de lipase B de *Pseudozyma antarctica* com cobre ou manganês e imobilizaram em NPs de  $\gamma$ -Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, demonstrando que a enzima podia ser reutilizada e adquiria uma estabilidade térmica maior do que a enzima livre. A **Tabela 4** sumariza outras NPs ou materiais nanoestruturados magnéticos usados para imobilização de enzimas.

**Tabela 4: Exemplos de enzimas imobilizadas em nanomateriais magnéticos.**

Enzima	Núcleo magnético	Revestimento	Estrutura	Referência
$\alpha$ -QT	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Poliacrilamida	Nanogel	(HONG et al., 2006)
Formato desidrogenase bacteriana	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Sílica	Nanopartícula	(NETTO et al., 2012)
TRY	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Sílica	Nanopartícula	(LEE et al., 2011)
TRY	$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Sem revestimento	Nanopartícula	(LI et al., 2010)
Celulase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Sem revestimento	Nanopartícula	(HAN et al., 2018)
Fosfolipase D bacteriana	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Sílica	Nanopartícula	(HAN et al., 2019)
TRY	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	$\gamma$ -metacriloxi-propil-trimetoxissilano	Nanopartícula	(ZHANG et al., 2018)

## 1.4 Uso de peptidases de interesse científico e industrial

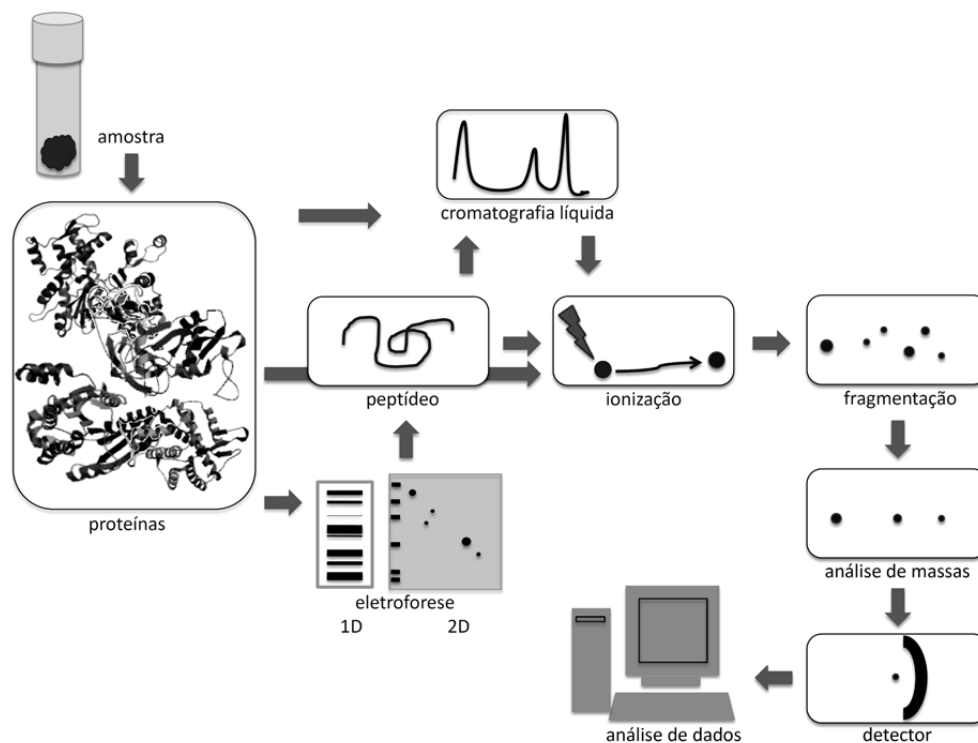
Proteólise é a primeira aplicação que se pode imaginar, já que essa é a função natural dessas enzimas (PHILIPPS-WIEMANN, 2018). A proteólise também é uma das etapas de diferentes processos como: estudos proteômicos (HIXSON et al., 2017), processamento de alimentos (WANG et al., 2018) e obtenção de peptídeos bioativos (RAMACHANDIRAN et al., 2019). Além dessas aplicações, as endopeptidases também podem ser usadas na química de proteínas e peptídeos, como no sequenciamento da insulina (SANGER; THOMPSON, 1953) e síntese de peptídeos (FABER, 2011).

### 1.4.1 Abordagem proteômica

Como foi citado no **item 1.2**, a proteômica refere-se ao estudo de todas as proteínas responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de processos biológicos em células animais ou vegetais, enquanto proteoma é o conjunto de todas as proteínas sintetizadas por um organismo (BARBOSA et al., 2012). O proteoma e o transloma (proteínas produzidas no organismo em uma determinada situação) são essenciais para o estudo de qualquer ser vivo por fornecer informações importantes da transcrição dos genes e como o meio interfere nesse processo (CLARK; PAZDERNIK, 2013; HIXSON et al., 2017).

As estratégias usadas em estudos proteômicos podem ser divididas em duas: top-down e a bottom-up. Na estratégia top-down as proteínas são identificadas ainda íntegras, por isso, ela é importante para identificar suas isoformas e as modificações que possam apresentar. Na estratégia bottom-up, as endopeptidases são mais utilizadas, pois as proteínas são proteolisadas para gerar peptídios, que são analisados (sequenciados) por espectrometria de massas. A identificação se dá

porque os seus valores de massas/cargas encontrados são comparados com bancos de dados obtidos de proteínas que foram identificadas por seus fragmentos únicos (BOGDANOV; SMITH, 2005; HIXSON et al., 2017). A importância de se usar endopeptidases imobilizadas nesse tipo de estudo está ligada ao fato de elas poderem ser reutilizadas, usadas em fluxo, apresentarem menos autólise e possibilitar o aumento da proporção enzima/substrato, diminuindo o tempo de proteólise e tornando o processo mais eficiente (MA et al., 2011). A **Figura 11** apresenta um esquema simplificado da metodologia geral do estudo proteômico (BARBOSA et al., 2012).



**Figura 11: Resumo da metodológico do estudo proteômico extraído de BARBOSA et al., 2012.**

Como comentado no **item 1.2.3** a TRY é a endopeptidase mais utilizada para estudos proteômicos. Isso pode ser considerado como uma vantagem no momento de se construir um banco de dados robusto com diversos fragmentos, porém acaba sendo também uma limitação. Ela gera muitos fragmentos menores que seis resíduos, o que dificulta a identificação de isoformas, por exemplo (SWANEY; WENGER;

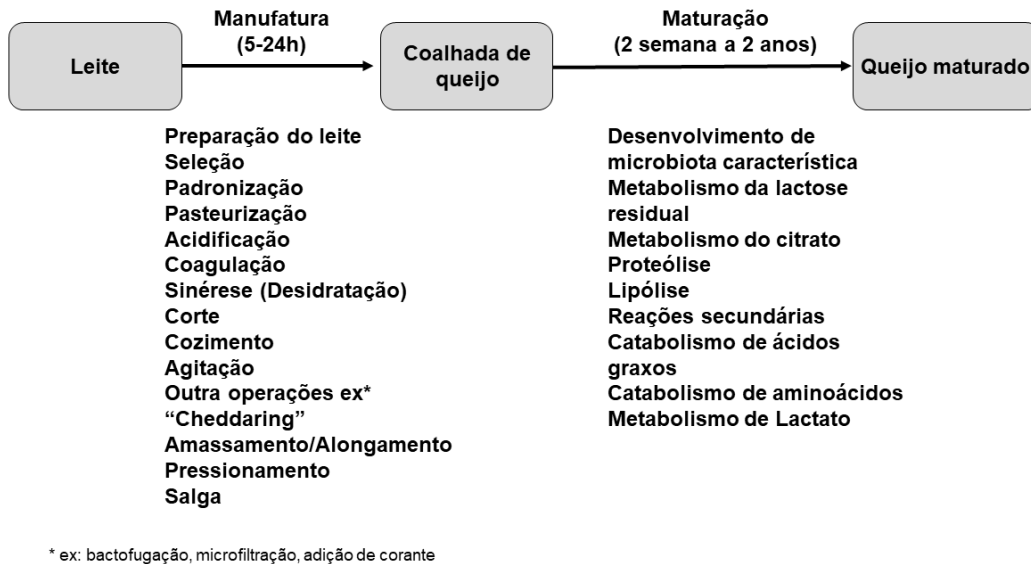
COON, 2010). A especificidade da TRY tem uma eficiência um pouco maior para a Arg que para a Lys, o que prejudica a precisão e a sensibilidade da proteólise. Por isso usar uma Lys-C, uma endopeptidase com especificidade para ligações com Lys, pode melhorar a proteólise (GLATTER et al., 2012). Por esses e outros fatores é importante buscar outras endopeptidases com especificidades diferentes que poderiam ser utilizadas para ajudar nesses estudos e a elucidar proteomas (TSIATSIANI; HECK, 2015).

A imobilização de endopeptidases permite a proteólise multi-enzimática, podendo ser usados reatores (TEMPORINI et al., 2009) ou sistemas em fluxo (WANG et al., 2016; YAMAGUCHI et al., 2010) com algumas enzimas que promoveriam a catálise ao mesmo tempo. Nos casos citados, são usadas a TRY e a  $\alpha$ -QT.

#### **1.4.2 Coagulação do leite para produção de queijos**

Como comentado no **item 1.2**, peptidases podem ser utilizadas no processamento de leite para produção de queijo. Uma das etapas da produção do queijo é a coagulação do leite que consiste em desestabilizar a micela de caseína promovendo, assim, sua coagulação na forma de coalhada, que, por sua vez, passará por diversas etapas que darão as características sensoriais ao queijo. As peptidases são responsáveis por catalisar a proteólise seletiva da caseína que irá provocar a coagulação sendo que, 75% dos queijos produzidos são obtidos dessa maneira, os outros 25% envolvem acidificação do meio para promover a coagulação. Os processos de produção envolvendo essas enzimas podem variar muito dependendo do produto desejado, mas ainda assim é possível dividir em duas etapas distintas: a manufatura, etapa que ocorre a coagulação e a maturação, etapa que determina as

características sensoriais do queijo. A **Figura 12** mostra um resumo do processo (GOBBETTI; NEVIANI; FOX, 2018).



**Figura 12: Resumo geral do processo de fabricação de queijos utilizando peptidases. Adaptado de Gobbetti e col., (2018).**

A micela do leite bovino é formada pelas caseínas e pelos lipídios presentes no leite. Elas normalmente ocorrem em quatro formas:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ . A **Tabela 5** apresenta as massas molares e número de resíduos de aminoácidos de cada forma. A **Figura 13** mostra a estrutura da micela de caseína apresentada por Walstra (1999) e as etapas do processo de coagulação por endopeptidases (DALGLEISH, 1993). A endopeptidase mais usada para a coagulação do leite é a quimosina encontrada no coalho do sistema digestório de bezerros. Ela é uma endopeptidase aspártica que catalisa a hidrólise da ligação Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína, liberando o caseíno macropéptido. A perda desse fragmento desestabiliza a micela do leite bovino e promove a agregação e precipitação na forma de coágulos (DALGLEISH, 1993).



Tabela 5: O número de resíduos de aminoácidos e massas molares das formas de caseína do leite bovino.

Forma da caseína	Resíduos de aminoácidos	Massa molecular aproximada (kDa)
$\alpha$ s1	199	23,0
$\alpha$ s2	207	24,3
$\beta$	209	24,0
$\kappa$	169	19,0

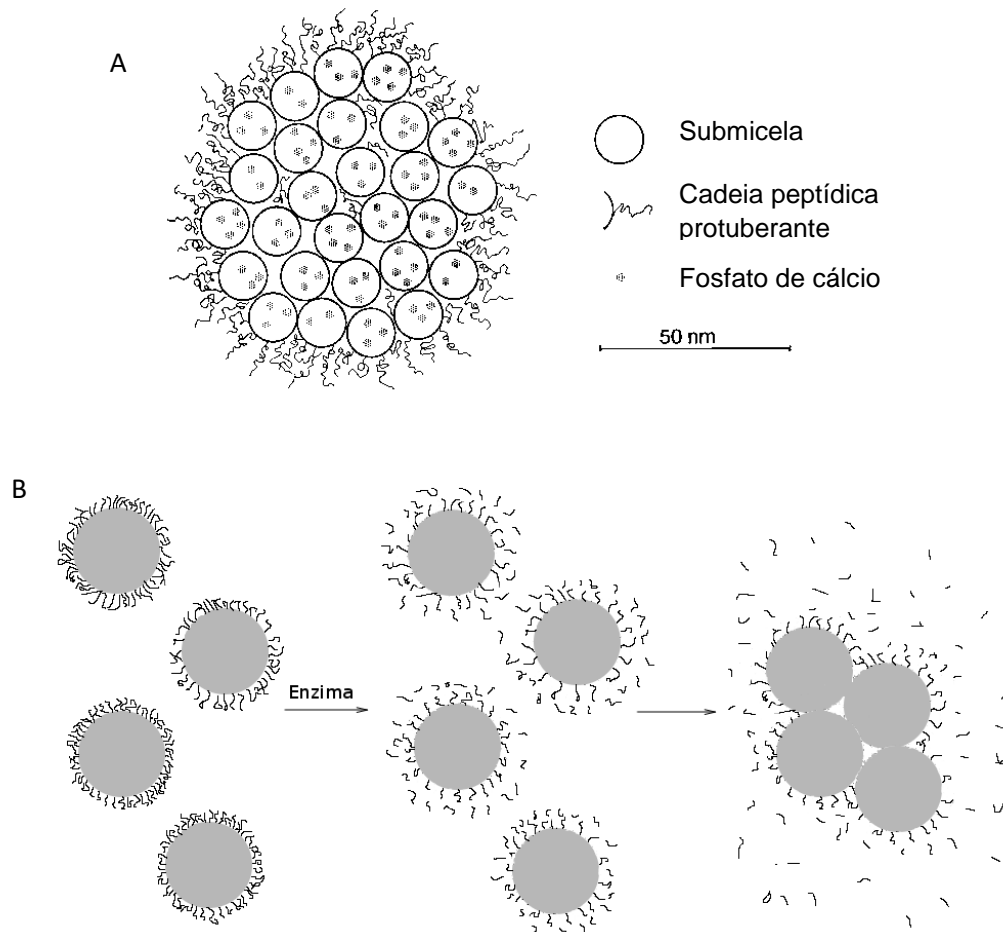


Figura 13: A) Representação gráfica proposta por Walstra (1999) da micela do leite bovino. B) Figura do processo de coagulação do leite a partir da hidrólise da  $\kappa$ -caseína catalisada enzimaticamente adaptado de Dalglesh, 1993. (A) Adaptado de Walstra, 1999; adaptado de Dalglesh, 1993.

Atualmente, o maior problema do uso do coalho para a produção de queijo é a sua disponibilidade. Para obtê-lo é necessário abater o bezerro, o que não é economicamente atrativo. Para contornar tal problema é possível utilizar peptidases alternativas ao coalho bovino, sendo obtidas de diferentes fontes, como animal (FOX,

1969), fúngica (THAKUR; KARANTH; NAND, 1990) ou bacteriana (YUN; OHMIYA; SHIMIZU, 1982) que ainda podem ser imobilizadas e reutilizadas (ALTUN; CETINUS, 2007; PESSELA et al., 2004; YUN et al., 1981).

### 1.4.3 Obtenção de peptídeos bioativos

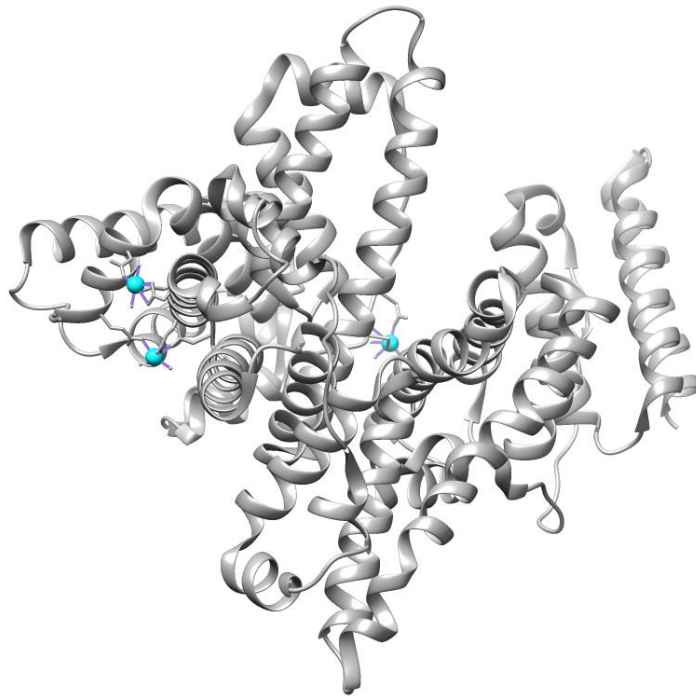
Peptídeos são moléculas formadas por dois a algumas dezenas de resíduos de aminoácidos ligados por ligações peptídicas (amida) que apresentam uma grande variedade de funções, tais como ações antimicrobiana (FÁZIO et al., 2006; HO et al., 2019; MACHADO et al., 2007), hormonal (KOPCHICK, 2003), tóxica (GOVINDU et al., 2019), neurotransmissora (HÖKFELT et al., 2000; JAHN, 2019), saborizantes (KIM; LI-CHAN, 2006), anti-tumoral (HILCHIE; HOSKIN; POWER COOMBS, 2019) e inibitória de enzimas (SHIOZAKI et al., 2010). Além disso, os peptídeos podem formar novos biomateriais (GREEN et al., 2018; JANGAMREDDY et al., 2018).

Muitos deles correspondem a fragmentos encontrados nas sequências primárias de proteínas dos seres vivos. Enquanto na proteína são inativos, sendo necessário liberá-los dela para serem ativos. A liberação *in vitro* pode ser conseguida via proteólise usando enzimas digestivas de origem animal, vegetal ou microbiana ou usando microrganismos. Os peptídeos bioativos podem ser provenientes de diversas proteínas, inclusive proteínas alimentícias, e vem sendo estudados visando a obtenção de novos medicamentos ou suplementos alimentares, pois apresentam uma série de vantagens sobre outros tipos de compostos, tais como: são menos alergênicos, possuem uma grande variedade de funções e alta bioespecificidade (ARSHAD et al., 2019; CHAUHAN; KANWAR, 2020). Além das atividades já citadas destacam-se também ações anti-hipertensiva (TU et al., 2018), opioide (SIENKIEWICZ-SZŁAPKA et al., 2009) e antioxidante (SHANMUGAM et al., 2015).

As caseínas do leite bovino citadas a cima também são importantes fontes de peptídeos bioativos. De acordo com os peptídeos encontrados no “Milk Bioactive Peptides Database”, mais de 50% dos encontrados no leite são provenientes delas (NIELSEN et al., 2017). Pan e col. (2019) demonstraram que peptídeos catiônicos encontrados no proteólido trípico das formas dessa proteína tem potencial de inibir a oxidação do colesterol LDL e que essa capacidade está ligada àquelas de eliminar radicais livres e quelar metais. Tu e col. (2019) detectaram no trato digestório de ratos o peptídeo AVYPYQR, derivado da  $\beta$ -caseína, que apresentou atividade anticoagulante. Peptídeos antimicrobianos e antifúngicos já foram obtidos a partir de caseína do leite bovino mediante catálise por peptidases fúngicas (ZANUTTO-ELGUI et al., 2019).

A BSA é uma proteína encontrada no soro do sangue e do leite de bovinos (*Bos taurus*), sua massa molecular é de 66,4 kDa pois contém 583 resíduos de aminoácidos. A **Figura 14** mostra sua estrutura 3D obtida com o software Chimera (PETTERSEN et al., 2004) usando os dados disponíveis no PDB, cujo código é 3V03. É a principal proteína presente no soro do sangue bovino e a sua função principal é regular a pressão osmótica coloidal do sangue, o que ajuda a equilibrar a perda de água do sistema circulatório. Além disso, é a principal transportadora de zinco e cobre no plasma do sangue animal (MAJOREK et al., 2012). Alguns peptídeos com atividade anti-hipertensiva (inibidores de ECA, renina e DPP-IV) foram encontrados no hidrolisado de BSA obtidos por tratamento dela com papaína, tendo sido demonstrado que eles apresentam potencial para uso *in vivo* (LAFARGA et al., 2016).

Albuminas de outras espécies também podem ser fontes de peptídeos bioativos. Oryzatensin é um peptídeo bioativo que foi isolado do hidrolisado trípico da albumina do arroz (*Oryza sativa*) apresenta atividades reguladora do sistema



**Figura 14:** Modelo em fitas da albumina modelado pelo software Chimera a partir do arquivo PDB 3V03.

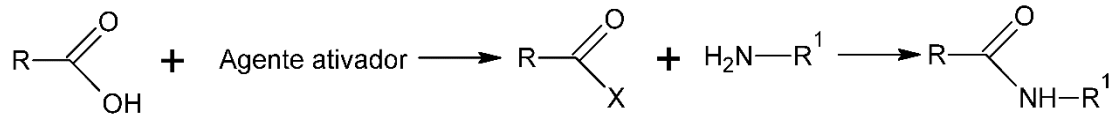
imunológico e anti-opioide (TAKAHASHI et al., 1994). A albumina do grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) também fornece de peptídeos antioxidantes (KOU et al., 2013). Esses exemplos mostram o potencial que alimentos têm na liberação de peptídeos bioativos

#### 1.4.4 Síntese de peptídeos

Peptídeos podem ser obtidos a partir de fontes naturais ou através de síntese laboratorial, o que se torna importante quando sua obtenção natural é difícil ou quando se deseja realizar modificações químicas em sua estrutura.

A síntese de peptídeos se baseia na formação da ligação peptídica (**Figura 15**) e para isso, é necessário que o grupo  $\alpha$ -carboxílico de um aminoácido ou fragmento peptídico (doador de acila) sofra um ataque nucleofílico do grupo  $\alpha$ -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico (receptor de acila). Esse ataque só ocorre se o

grupo  $\alpha$ -carboxílico do doador de acila seja ativado, pois a hidroxila de um grupo carboxílico não é um bom grupo de saída (MACHADO et al., 2004).



**Figura 15: Representação geral da ativação da carboxila de um doador de acila e da formação de uma ligação peptídica. R e R<sup>1</sup>: cadeias laterais dos aminoácidos. Extraído de MACHADO et al., 2004.**

Três diferentes métodos podem ser empregados para a síntese da ligação peptídica. A síntese química é um deles, na qual emprega-se um reagente químico como ativador (LOFFREDO et al., 2009; REMUZGO et al., 2009). A síntese química é bem estabelecida e pode ser feita em solução, o que demanda proteção da  $\alpha$ -carboxila do acceptor de acila, ou em fase sólida, na qual não há necessidade de proteger a  $\alpha$ -carboxila do acceptor de acila por ela já estar ligada à superfície de um polímero. A síntese química em fase sólida é mais utilizada devido à sua praticidade, rapidez e possibilidade de automação. Pode ser realizada pelo alongamento da cadeia adicionando-se aminoácido a aminoácido ou por condensação de fragmentos peptídicos já sintetizados. O alongamento da cadeia peptídica na síntese em fase sólida é feito por ciclos de desproteção (remoção do protetor da amina) e acoplamento (síntese da ligação peptídica entre o resíduo de aminoácidos/peptídeo ligado a resina e o resíduo de aminoácidos em solução). Ao final dos ciclos necessários à construção do peptídeo, ele é clivado da resina e os seus grupos protetores são removidos. As principais limitações da síntese química são: potencial de enantiomerização dos doadores de acila no processo de ativação e acoplamento; necessidade de empregar proteção dos aminoácidos reagentes; custo relativamente elevado devido às várias etapas de síntese e aos diversos reagentes e solventes necessários; agregação das cadeias peptídicas em crescimento, o que dificulta ou até mesmo impede a

incorporação de novos aminoácidos; ocorrência de reações secundárias e baixos rendimentos na obtenção de peptídeos longos (maiores que 25-30 resíduos de aminoácidos) (MACHADO et al., 2004). Atualmente um dos grandes desafios para a síntese química de peptídeos é a substituição de materiais nocivos, como solventes (por exemplo, o diclorometano ) e reagentes acopladores (geralmente derivados de benzotriazol, urônio e fosfônio), por alternativas mais limpas . Tal substituição é importante para a indústria que cada vez mais busca diminuir os impactos ambientais de seu setor (LOFFREDO et al., 2009; ISIDRO-LLOBET et al., 2019).

Outro método para a síntese de ligações peptídicas é a síntese via DNA recombinante, que se utiliza do maquinário de bactérias, fungos ou fagos para a obtenção do alvo. É considerada uma metodologia que não possui limite para o tamanho do peptídeo e tampouco demanda a utilização de grupos protetores, porém apresenta dificuldades, tais como a possível proteólise promovida pelo aparato do organismo que está produzindo o peptídeo, a interferência de processos pós-tradução, e a dificuldade de obtenção de sequências peptídicas com aminoácidos não usuais. Por isso, esse método não é o ideal para gerar peptídeos modificados (MACHADO et al., 2004; VAN HEEKE; STOUT; WAGNER, 1994).

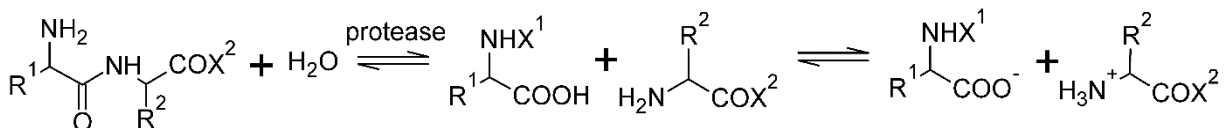
O terceiro método é o de síntese enzimática ou biocatalisada. Nele, a ligação peptídica é formada utilizando-se a capacidade catalítica de endopeptidases. Por utilizar enzimas, ele apresenta todas as vantagens desses biocatalisadores, tais como: o uso de meios reacionais mais brandos em comparação com os métodos químicos (não necessita de solventes clorados, por exemplo, e pode ocorrer em tampões), não apresenta perigo de enantiomerização dos aminoácidos envolvidos, pode ser realizado em reatores batelada ou em fluxo, não necessita de grupos protetores para as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e permite o

barateamento do processo. Por não utilizar solventes orgânicos, como dimetilformamida ou diclorometano, e por gerar menos resíduos de grande impacto ambiental, a síntese de peptídeos biocatalisada é considerada uma metodologia verde (YAZAWA; NUMATA, 2014).

Segundo Machado e col. (2004) a síntese enzimática da ligação peptídica pode ser feita através de três diferentes estratégias:

*I. Inversão da hidrólise da ligação peptídica (termodinamicamente controlada)*

A hidrólise da ligação amida em solução aquosa mediada por uma protease ocorre em duas etapas (**Figura 16**). Inicialmente, há a formação de produtos não ionizados, uma etapa endergônica ( $\Delta G_{hid} > 0$ ). Em seguida, ocorre a ionização e solvatação desses produtos, exergônica ( $\Delta G_{ion} < 0$ ). Como  $|\Delta G_{ion}|$  é maior do que  $|\Delta G_{hid}|$ , em água a hidrólise da ligação peptídica é termodinamicamente favorecida.

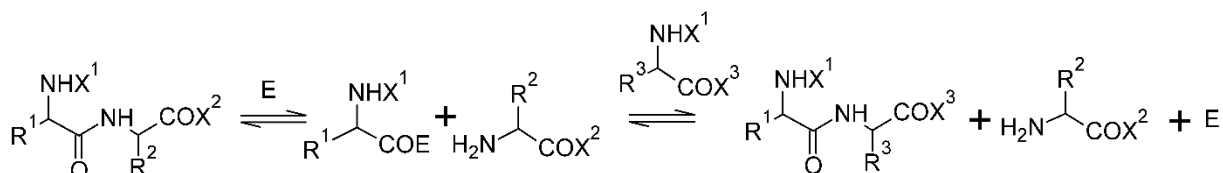


**Figura 16:** Hidrólise da ligação peptídica mediada por uma protease. X1: cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal. X2: cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal. R1 e R2: cadeias laterais dos aminoácidos. Extraído de MACHADO et al., 2004.

Para a síntese da ligação peptídica no mesmo solvente, é necessário diminuir o  $|\Delta G_{ion}|$ . Isso é feito através do bloqueio do grupo  $\alpha$ -amina do doador de acila e do grupo  $\alpha$ -carboxila do acceptor de acila, da adição de solventes orgânicos ao meio reacional (ambos favorecem a presença das formas não iônicas no pH usado), e do uso de excesso de um dos reagentes e/ou remoção do produto formado do meio reacional.

*II. Aminólise de amidas ou transpeptidação (termodinamicamente controlada)*

A quebra da ligação peptídica por uma protease pode ocorrer com a formação do intermediário ativo acil-enzima. Esse intermediário pode sofrer ataque nucleofílico de um aminoácido ou fragmento peptídico bloqueado em sua  $\alpha$ -carbonila com a formação de nova ligação peptídica (**Figura 17**).

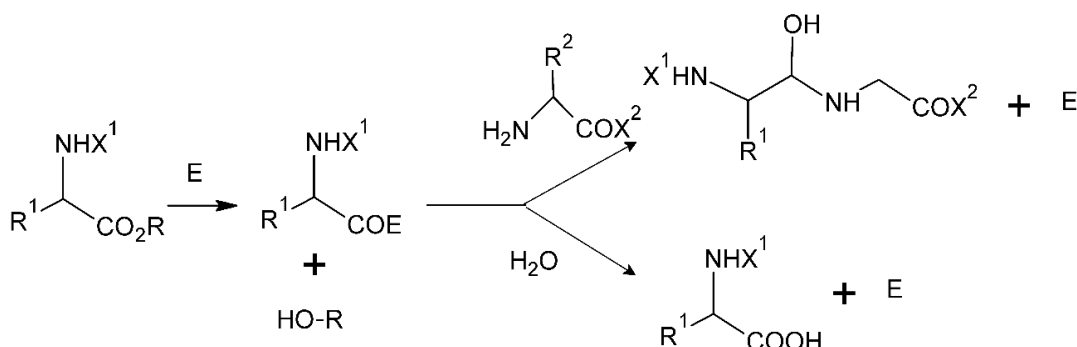


**Figura 17:** Síntese enzimática de peptídeos por aminólise de amidas ou transpeptidação. X1: cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal. X2 e X3: cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal. R1, R2 e R3: cadeias laterais dos aminoácidos. E: protease. Extraído de MACHADO et al., 2004.

Se o meio contiver água, este nucleófilo levará à hidrólise da ligação amida. Analogamente à inversão da hidrólise, na transpeptidação é necessário empregar substratos parcialmente protegidos, adicionar solventes orgânicos ao meio, usar excesso de reagentes e remover os produtos formados.

### III. Aminólise de ésteres (cineticamente controlada)

Na síntese por aminólise de ésteres, ocorre a formação do intermediário ativo acil-enzima, com liberação do álcool correspondente devido à hidrólise do éster, seguida de um ataque nucleofílico (etapa limitante do processo) por um aminoácido ou fragmento peptídico (**Figura 18**).



**Figura 18:** Síntese enzimática de peptídeos por aminólise de ésteres. X1: cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal. X2: cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal. R1 e R2: cadeias laterais dos aminoácidos. R: usualmente Me, Et ou Bzl. E: esterase. Extraído de MACHADO et al., 2004.



A natureza do éster empregado, a concentração e a nucleofilicidade do aceptor de acila, bem como a presença de água no meio reacional, determinam se haverá uma reação de síntese ou de hidrólise (do éster ou mesmo da ligação peptídica recém-formada).

Tais fundamentos encontram suporte nos textos de Kullman e col. (2018), Lombard e col. (2005); Guzmán e col., (2007) e Yagasaki e col. (2008)

As principais dificuldades relacionadas à síntese biocatalisada de peptídeos são a possibilidade de hidrólise do produto formado, algumas enzimas purificadas podem ser caras, de difícil recuperação a partir dos meios reacionais e de baixas estabilidades química e térmica (GUZMAN; BARBERIS; ILLANES, 2007). Por isso, a biocatálise é usada para obter peptídeos de baixa massa molar [dipeptídeos (MIYAZAWA et al., 2002; SHAN et al., 2019), tripeptídeos (ORIGONE et al., 2018; RUIZ et al., 2010), tetrapeptídeos (GETUN et al., 2001), por exemplo]. O aspartame, Asp-Phe-OMe, é um adoçante comercial que pode ser sintetizado *in vitro* mediante biocatálise usando TLN (DICOSIMO et al., 2013). O peptídeo antioxidante Tyr-Ala foi sintetizado por Shan e col. (2019) utilizando-se uma carboxipeptidase Y recombinante como catalisador. Entretanto, a síntese enzimática também foi usada com sucesso recentemente por Ardila-Fierro e col. (2018) que propuseram um sistema mecânico-enzimático para a síntese de polipeptídeos de um único aminoácido usando a papaína como catalisador e no passado para a condensação entre fragmentos peptídicos (FITÉ et al., 2002; KAWASAKI et al., 2005; NUIJENS et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

Diante do sucesso conseguido no uso de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$  para imobilizar a  $\alpha$ -QT pancreática bovina (LIRIA et al., 2014) decidimos ampliar o estudo imobilizando outras endopeptidase elaborando os seguintes objetivos:

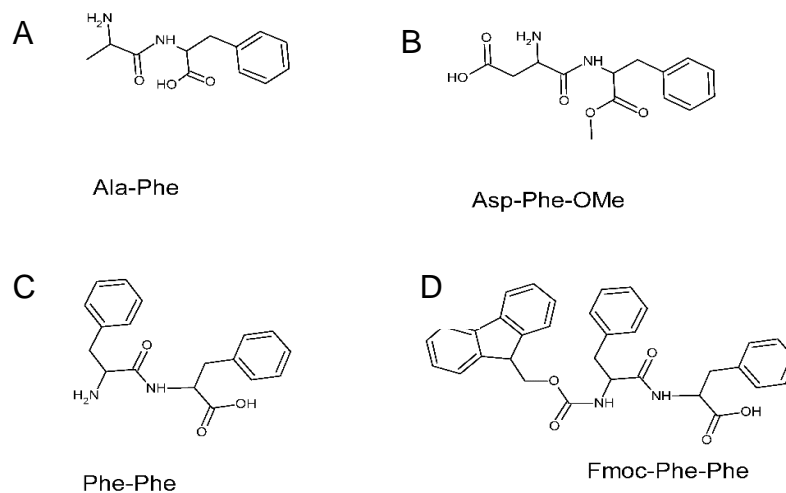
1. Imobilizar cada endopeptidase em nanopartículas de magnetita revestidas de sílica aminada ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$ )
2. Caracterizar cada nova enzima imobilizada ou NBC proteolítico magnético quanto às suas características (morfologia, estrutura, atividade específica, estabilidades química/térmica, pH ótimo, estocagem, recuperação e reuso)
3. Estudar a possibilidade de usar as enzimas imobilizadas:
  - em proteólises de interesse científico e/ou comercial
  - na síntese de dipeptídeos de interesse científico e/ou comercial

Detalhamento: A escolha dos dipeptídeo-alvos foi feita com base nas seguintes informações:

- O dipeptídeo Asp-Phe-OMe (aspartame) (**Figura 19A**) foi descoberto em 1965 por James Schlatter. Sua importância vem da sua doçura, que é cerca de 200 vezes maior do que a da sacarose (açúcar), mas diferentemente de outros adoçantes, não tem sabor amargo ou metálico. Como discutido anteriormente, ele pode ser obtido por síntese química, o que pode gerar sua forma  $\beta$  que não é doce, ou por síntese enzimática, que não leva a esse subproduto. O aspartame é um dos peptídeos mais vendidos no mundo (MAGNUSON et al., 2007).
- O dipeptídeo Ala-Phe (**Figura 19B**) apresenta sabor amargo, tendo assim o potencial de ser usado como saborizante (TRUSEK-HOLOWNIA, 2003a). Além disso, foi observado que ele apresenta efeito anti-hipertensivo a partir da detecção de sua presença em resíduos de levedura de cerveja que apresentavam tal efeito

(KANAUCHI et al., 2005). No atual trabalho usamos como reagentes de partida os Z-Ala e Phe-OMe. De acordo com Birrane e col. (2014) das 19000 toneladas produzidas mundialmente de aspartame, 2000 são obtidas pela síntese enzimática catalisada por TLN.

- O dipeptídeo Phe-Phe (**Figura 19C**) tem a capacidade de formar estruturas auto-organizadas em solução na presença de outros compostos (DATTA; TIWARI; GANESH, 2018; PAPPAS et al., 2014) com diversas aplicações, tais como entrega de medicamentos, formação de biomateriais e formação de estruturas adesivas (MARCHESAN; VARGIU; STYAN, 2015). Quando esse dipeptídeo está protegido pelo grupo Fmoc (Fmoc-Phe-Phe) (**Figura 9D**) pode formar hidrogéis utilizados em cultura de células (JAYAWARNA et al., 2009). Neste trabalho, empregamos os Fmoc-Phe ou Z-Phe e Phe-OMe como reagentes de partida.



**Figura 19: Peptídeos alvos do trabalho.**

O grupo Z foi escolhido como protetor de  $\alpha$ -aminas pelo seguinte:

-Durante a síntese enzimática de peptídeos é necessário proteger esse grupo do doador de acila que será usado na reação de formação da ligação peptídica. Entre os grupos protetores conhecidos está o benziloxicarbonil (grupo Cbz ou Z), um dos mais antigos. Segundo Bergmann e Zervas (1932) ele forma um éster diuretano quando

reage com aminas primárias. Esta ligação é lábil em condições extremamente ácidas ou nas condições de hidrogenação catalítica. O grupo Z é um dos grupos protetores mais usados devido à facilidade de se proteger aminoácidos com ele, pela sua resistência em meios básicos ou moderadamente ácidos e por suprimir a racemização dos aminoácidos durante a formação da ligação peptídica (BODANSZKY, 1993; ISIDRO-LLOBET; ÁLVAREZ; ALBERICIO, 2009).

-O grupo Z pode ser removido por hidrogenação catalítica ou hidrogenação por transferência catalítica (**Figura 20**). A diferença entre os dois métodos é a fonte de hidrogênio que irá promover a remoção do grupo: na primeira é o próprio H<sub>2</sub>, enquanto que na segunda é um doador de hidrogênio, como cicloexeno, hidrazina, 1,4-cicloexadieno ou ácido fórmico. Apesar da hidrogenação por transferência catalítica apresentar a vantagem de não utilizar um reagente altamente inflamável (H<sub>2</sub>), a última é a mais utilizada por usar meios menos danosos ao peptídeo obtido (GOWDA, 2002; GOWDA; ABIRAJ, 2002). O ponto em comum entre as duas estratégias é que o catalisador mais utilizado é o carvão paladiado (C/Pd) que apesar de apresentar bons rendimentos, não pode ser reutilizado em reações de hidrogenação catalítica, é pirofórico e precisa ser utilizado em grande quantidade quando o substrato é estericamente impedido. Por esses motivos, busca-se maneiras de otimizar tal remoção. Murata e col. (2003) utilizaram um complexo de hidroxiapatita e paládio (Pd) com bons resultados, inclusive com um dendrímero formado por ligações amidas e estericamente impedido.



tampão fosfato nas mesmas condições (análise em banco). Cada ponto da curva padrão foi analisado em triplicata.

A curva padrão de BSA foi usada para determinar o conteúdo proteico inicial e final de cada imobilização (**item 3.3.1**). Foram retiradas alíquotas do tempo inicial e final de cada meio de imobilização e diluídas 10, 50 e 100 vezes, 160  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram transferidos para um poço de uma placa de ELISA, adicionados 40  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford e após 5 min de reação as amostras foram lidas em uma leitora de placa em 595 nm.

### **3.1.2 Hidrólise ácida total seguida de análise de aminoácidos do hidrolisado via cromatografia de alta eficiência (HPLC)**

Através desse método, já utilizado anteriormente por nosso grupo (LIRIA et al., 2014), as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-protease obtidas nas imobilizações (**item 3.3.1**) foram expostas a uma hidrólise ácida de todas as ligações peptídicas e os hidrolisados foram analisados e comparados com padrões de aminoácidos para identificação e quantificação. As três endopeptidases imobilizadas foram: TLN (Protease Type x from *Bacillus thermoproteolyticus* rokka P-1512, Sigma Chemical Co., USA),  $\alpha$ -QT (de *Bos Taurus*, Biobras, Brasil) e TRY (de *Bos Taurus*, Sigma, EUA). A partir disso foi possível determinar a massa de endopeptidase imobilizada. Resumidamente, a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-endopeptidase foi lavada e liofilizada, o sólido obtido foi pesado em quadruplicata, e cada material ressuspensionado em uma solução de 50% HCl/ácido propiônico (V/V) com fenol. Cada meio reacional foi colocado em um forno Pico-Tag (Waters, EUA) ou Digi-Block (Laboratory Devices, Inc., EUA) a 130°C sob atmosfera de  $\text{N}_2$  por 24 h. Ao final, o que restou foi secado a baixa pressão em dessecador (Edwards Vacuum Ltd, EUA), e o sólido obtido ressuspensionado em água e filtrado. Cada filtrado foi analisado em um

sistema Dionex composto por amostrador automático (AS40), bomba quaternária (GS50), forno para a coluna (LC25), coluna de troca iônica (2x250 mm, AminoPac PA10), detector eletroquímico (ED50) e uma plataforma “Chromeleon” para controle e aquisição de dados. A quantidade de cada aminoácido foi calculada a partir da análise de uma mistura padrão contendo 19 aminoácidos em concentrações conhecidas (DING; YU; MOU, 2002).

### **3.1.3 Análise elementar**

Utilizando-se dos serviços da Central Analítica do IQ-USP foram feitas análises da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$ , da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Glutardialdeído e da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN em equipamento Perkin Elmer 2400 series II (Waltham, EUA) que forneceram as quantidades de carbono, nitrogênio e hidrogênio presentes nas amostras.

### **3.1.4 Análise térmica**

A análise térmica foi feita por termogravimetria (TGA) em uma termobalança (TGA-50 Shimadzu thermogravimetric analyzers) no laboratório da Profa. Dra. Vera R. Leopoldo Constantino do QFL-IQUSP. As amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Glutardialdeído e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN foram analisadas com a temperatura variando de 23 até 1000°C e observando a diminuição de massa das NPs.

### **3.1.5 Microscopia de eletrônica de transmissão (TEM)**

As morfologias dos nanomateriais  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Glutardialdeído,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY foram observadas em um microscópio de transmissão eletrônica (JEM-2100PlusTransmission Electron Microscope, JEOL USA

inc.). Cada amostra foi suspensa em 100  $\mu\text{L}$  de água e 4  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi seca em um grid de cobre com filme de carbono. A análise foi feita em colaboração com o Laboratório de Nanomateriais e Catálise da Prof. Dra Liane M. Rossi e realizada na Central Analítica do IQ-USP.

As imagens obtidas foram analisadas utilizando-se o software ImageJ (LOCI, University of Wisconsin) para se determinar o diâmetro médio dos nanomateriais. Foram usadas, em média, 300 medições para cada conjunto.

### **3.1.6 Espectro de infravermelho (FT-IR)**

Foram feitas análises por FT-IR da TLN,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Glutardialdeído e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN nas suas formas sólidas (secas). As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e as análises foram realizadas em um equipamento Frontier (Perkin Elmer, USA) na Central Analítica do IQ-USP.

### **3.1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)**

Para as análises por RP-HPLC foi utilizada uma coluna da Grace Vydac  $\text{C}_{18}$  (0,46 cm x 25,00 cm, 5 $\mu\text{M}$ , 300Å) (Grace, EUA) e cromatógrafo composto por bombas Constametric 3500 e 3200 da Thermo Separation Products (TSP, EUA), injetor automático Spectrasystem AS3000 da TSP, detector Spectromonitor 3100 da LDC Analytical ou um Tunable Absorbance Detector 486 da Waters (USA) e o software DataApex Clarity (DataApex, República Tcheca). As condições variaram de acordo com os peptídeos analisados.

As misturas de solventes foram preparadas de acordo com a necessidade e serão apresentadas em cada resultado obtido pela técnica. O fluxo foi de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  com gradiente linear de 5 a 95% de solvente B e leitura em 210 nm.



### **3.1.8 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC/ESI-MS)**

Foi empregado um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão), fluxo  $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  composto por desgaseificador modelo DGU-20A3, duas bombas modelo LC-20AD, injetor Rheodyne 8125, forno de coluna modelo CTO-20A, pré-coluna C18 (5 x 2 mm, 4,6 mm) Shim-pack GVP-ODS e coluna C<sub>18</sub> (150 x 2 mm, 4,6  $\mu\text{m}$ , 12 nm) Shim-pack VP-ODS acoplada a um espectrômetro de massas Amazon X da Bruker Daltonics (Fahrenheitstrasse, Alemanha) com fonte de ionização do tipo electrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo Ion trap. A voltagem aplicada no capilar foi de 3500 V. Para as análises dos espectros foi utilizado o software HyStar 3.2. Os solventes foram feitos de acordo com a necessidade e serão apresentados em cada resultado obtido pela técnica.

### **3.1.9 Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

Foram feitas eletroforeses verticais em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) para analisar e caracterizar diferentes soluções que continham proteínas. De maneira geral, o gel de separação continha 15 % de poliacrilamida e o de empilhamento continha 4% e nele foram moldadas cavidades para aplicação das amostras. Cada amostra foi incubada com tampão de amostra preparado com componentes fornecidos pela Bio-Rad (California, EUA) (tris  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6,8/25% glicina/0,2% SDS/4%  $\beta$ -mercapto etanol/Bromofenol Blue). O tempo de corrida foi 60 min em cuba vertical de acrílico contendo tampão Tris-Glicina  $50 \text{ m}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,3 a 110 volts nos primeiros 5 min e a 130 volts no tempo restante.

O gel foi corado com  $\text{Ag}^+$  seguindo o trabalho de Gromova e Celis (2006) ou com solução de Coomassie Blue ( $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Bio-Rad, California, EUA) em 50% metanol / 40%  $\text{H}_2\text{O}$  / 10% ácido acético (HAc). Também foram utilizados 2 padrões de massa molecular a fim de se determinar a massa molecular de cada proteína ou fragmento proteico presente nos géis. O padrão mais restrito (Unstained SDS-PAGE Standards, Bio-Rad, California, EUA) contendo uma mistura de: fosforilase b (97,4 KDa), BSA (66,2 KDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (31 KDa), inibidor de TRY (21,5 KDa) e lisozima (14,4 kDa), e o um mais amplo (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, California, EUA) contendo proteínas recombinantes que foram de 10 a 250 kDa. Outras condições mais específicas serão tratadas nas devidas utilizações do procedimento.

#### **a) Monitoramento da imobilização das endopeptidases**

Durante a imobilização da TLN foram retiradas alíquotas de sobrenadante de diferentes tempos (1, 2, 4 e 6 h), e foram congeladas para posterior aplicação no gel. As amostras foram preparadas adicionando 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra a 15  $\mu\text{L}$  da alíquota e posteriormente incubadas a 95 °C por 5 min. Os 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram aplicados nos poços do gel de SDS-PAGE e 5  $\mu\text{L}$  do padrão de massa molecular foram aplicados em uma das extremidades do mesmo gel. As corridas foram feitas com amperagem de 12 a 20mA e entre 90 e 120 min.

A autólise da TRY foi determinada em uma condição simulada de imobilização para observar a quantidade de enzima perdida no processo sem interferência da imobilização. As condições de SDS-PAGE foram as mesmas usadas para a TLN.

#### **b) Monitoramento da proteólise da caseína do leite bovino e da BSA**

Dois mililitros de uma solução 1,33 % de caseína do leite bovino (Sigma, EUA) em tampão Tris.HCl  $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , contendo  $\text{CaCl}_2$   $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,5 foi incubada

por 6 h com 200  $\mu\text{L}$  de suspensão de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Foram removidas alíquotas do meio reacional de 0, 10, 20 e 30 min, 1, 2, 4 e 6 h de reação, que foram congeladas para posterior aplicação no gel. As amostras foram preparadas adicionando 5  $\mu\text{L}$  tampão de amostra a 10  $\mu\text{L}$  de alíquota ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e posteriormente incubadas a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min. Foram aplicados 15  $\mu\text{L}$  de cada amostra nos poços do gel de SDS-PAGE e 5  $\mu\text{L}$  do padrão de massa molecular em uma das extremidades do mesmo gel. O procedimento foi repetido com uma solução de BSA ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl  $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  contendo  $\text{CaCl}_2$   $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,5.

O mesmo procedimento foi adotado para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT e a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY com as seguintes modificações: solução de caseína do leite bovino 1,33% em tampão fosfato  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8 e com solução de BSA ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em tampão  $\text{NaHCO}_3$   $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.

### **c) Monitoramento da coagulação do leite bovino**

Foram feitos dois géis de SDS-PAGE para monitorar a coagulação do leite bovino comercial (semidesnatado, Shefa, Agropecuária Tuiuti LTDA, Brasil) apresentada no **item 3.3.6**: um para o monitoramento das fases do processo e outro para o monitoramento dos reusos. No caso do monitoramento das fases do processo, alíquotas do tempo 0, do final da primeira fase (30 min), do soro (1h), da lavagem da coalhada e da coalhada dissolvida foram pegadas e diluídas até 2x. A cada 15  $\mu\text{L}$  de amostra foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  do tampão de amostra com posterior incubação a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min. Foram aplicados 7,5  $\mu\text{L}$  de cada amostra no gel. Além das amostras, foram aplicados o padrão de massa molecular adequado, leite semidesnatado diluído (10x), TLN em água ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e caseína em água ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Para o monitoramento do reuso do NBC foram removidas alíquotas do soro dos ciclos 1-5 e do soro obtido com a TLN livre. Cada amostra passou pelo mesmo

procedimento relatado acima antes de ser aplicada no gel. Além das amostras foram aplicados o padrão de massa molecular adequado, leite semidesnatado diluído (10x), TLN em água (1 g·L<sup>-1</sup>) e caseína em água (1 g·L<sup>-1</sup>).

#### **d) Reuso das enzimas imobilizadas**

O método de Zhang e col. (2018) foi adaptado e usado para o reuso das enzimas imobilizadas. Foi preparada uma solução estoque de BSA (0,3 g·L<sup>-1</sup>) em tampão NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8 para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-α-QT e outra em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,5 para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. As soluções estoque pré-incubadas a 94 °C para desnaturação proteica a fim de expor as proteínas ao catalisador. O meio reacional era composto por 100 µL da solução estoque de BSA, 200 µL do tampão usado na preparação da solução estoque e aproximadamente 300 mg de cada NBC (sólido obtido a partir de suspensão 5 g·L<sup>-1</sup>).

A reação ocorreu por 30 min, 300 rpm a 37 °C. Ao final os NBCs foram separados do sobrenadante com um ímã e lavados 2X com o tampão usado no meio reacional. O sobrenadante foi estocado a -4 °C e os NBCs foram usados novamente na reação. Cada catalisador foi usado 5 vezes.

### **3.2 Etapas de caracterização das peptidases**

#### **3.2.1 Atividade peptidásica da TLN livre e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN**

A atividade foi medida utilizando a reação de hidrólise do N-(3-[2-Furil] Acrilóil)-Glicil-Leucina Amida (FAGLA) (Bachem California Inc., USA). Essa reação é apresentada no **Figura 21**.



Para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN, as reações de hidrólise foram feitas em “eppendorfs” de 2,0 mL. O meio reacional foi composto por solução de FAGLA ( $9,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7,5 e suspensão de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. A preparação do meio reacional foi feita em banho de gelo. As reações foram realizadas nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12 e 15 min em um shaker a 300 rpm e  $37^\circ\text{C}$ . Foi utilizada uma solução de HAc 30% em água para interromper a reação. Por decantação magnética as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN foram separadas depois da reação e os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de ELISA que foi analisada na leitora de placas a 345nm.

### **3.2.2 Estabilidade da $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN após exposição a diferentes solventes orgânicos**

Foi investigada a interferência que as lavagens com os solventes ACN, dimetil sulfóxido (DMSO), álcool metílico (MeOH) e acetato de etila (AcOEt) poderiam causar à  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. Para isso, 250  $\mu\text{L}$  de suspensão de NBCs tiveram seu sobrenadante removido com o auxílio de um ímã. Esse material foi lavado 3x com 250  $\mu\text{L}$  de solvente e ressuspenso em 250  $\mu\text{L}$  do mesmo solvente. Foi feita a determinação da atividade peptidásica com essa suspensão como no **item 3.2.1**. Todos os solventes utilizados eram de grau síntese.

### **3.2.3 Cinética enzimática da $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN e da TLN livre**

Utilizando o método descrito no **item 3.2.1** e uma adaptação do procedimento descrito por Inouye e col. (1992) foram determinadas as velocidades iniciais da hidrólise da ligação peptídica de FAGLA usando concentrações de substrato que variaram de 0,36 a  $0,90 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  e de catalisador variando de 0,3 a  $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os

resultados permitiram calcular o valor de  $k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ , importante parâmetro cinético relacionado com a eficiência da catálise.

### 3.2.4 Estabilidade química da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN em suspensão

Foram estocadas suspensões de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN (5 g·L<sup>-1</sup>) em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,5 a 5 °C por 165 dias e à temperatura ambiente por 50 dias. Durante a estocagem foram retiradas alíquotas da suspensão (200 µL) para se realizar os testes de atividade peptidásica descritos no **item 3.2.2**.

Como controle, duas soluções de TLN livre (0,28 g·L<sup>-1</sup>) em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,5 foram estocadas em condições diferentes; uma a 5 °C por 74 dias, outra a temperatura ambiente por 42 dias. Durante a estocagem foram retiradas alíquotas da suspensão (200 µL) para se realizar os testes de atividade peptidásica descritos no **item 3.2.1**.

### 3.2.5 Estabilidade térmica da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN e da TLN livre

Uma suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN (5 g·L<sup>-1</sup>) e uma solução de TLN livre (0,28 g·L<sup>-1</sup>), ambas em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,5, foram incubadas por até 48 h a 60 °C sob agitação de 300 rpm em shaker. Foram retiradas alíquotas após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 20, 24, 30, 44 e 48 h de incubação, e suas atividades peptidásica foram medidas pelo método descrito no **item 3.2.1**.

### 3.2.6 pH ótimo da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

Foram feitas reações em que os meios reacionais apresentavam pH 4, 5, 6, 7, e 8 com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN e a TLN livre. A **Tabela 6** lista os valores de pH e as

soluções tampão utilizados para obtê-los. Cada solução foi usada para determinar a atividade peptidásica utilizando-se o método do **item 3.2.1**.

**Tabela 6: Tampões utilizados para medir a atividade da TLN livre ou Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN usando FAGLA como substrato.**

pH	Tampão
4	NaAc 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
5	NaAc 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
6	NaAc 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
7	Tris.HCl 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
8	Tris.HCl 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>

### 3.2.7 Reuso da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

Foram realizadas reações em sequência utilizando-se as condições do **item 3.2.1**, mas sendo interrompidas pela separação do sobrenadante das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN por decantação magnética. Aos sobrenadantes foram adicionados 100 µL da solução de HAc 30% em água para garantir que a reação tenha sido interrompida. Ao final de cada ciclo foi adicionada a solução de FAGLA em cada um dos “ependorfs” com as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN já usadas e o ciclo foi feito novamente.

Os sobrenadantes, já acidificados, foram transferidos para poços de uma placa de ELISA para que fossem determinadas suas absorbâncias em 345 nm. O branco usado foi uma mistura contendo a solução de FAGLA citada no **item 3.2.1**, HAc 30% e tampão no mesmo volume do meio reacional. Foi usada uma curva padrão de FAGLA e foram feitos um total de 10 ciclos em triplicata.

### 3.2.8 Atividade proteolítica da TLN livre e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

A atividade foi medida pela reação de hidrólise da caseína, sendo considerada a quantidade de tirosina liberada no meio reacional. A tirosina pode ser determinada pela sua absorbância em 275 nm, onde um incremento de 0,0074 cm<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> na







e por 0, 3, 6, 9, 12 e 15 min, sob agitação em um shaker a 300 rpm a 37 °C. As reações foram interrompidas utilizando-se uma solução de HAc 30% em água. As NPs foram separadas por decantação magnética, e os sobrenadantes transferidos para poços de uma placa de ELISA. A absorbância do produto foi medida a 410 nm na leitora de placa de ELISA. O branco usado foi uma mistura contendo solução de Bz-Arg-pNA citada acima, HAc 30% e tampão nos mesmos volumes do meio reacional. Foi usada uma curva padrão de pNA para calcular a quantidade de produto formado.

### **3.2.12 Cinéticas enzimáticas da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY e da TRY livre**

Foi utilizado o método descrito no **item 3.2.11** para se determinar as velocidades iniciais de hidrólise em diferentes concentrações de Bz-Arg-pNA utilizando-se a TRY livre e a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY. As concentrações variaram de  $7,03 \cdot 10^{-5}$  a  $1,05 \cdot 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>. Com os resultados, foi possível utilizar o gráfico de Lineweaver-Burk para determinar os valores de  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$  para os dois catalisadores.

### **3.2.13 Estabilidade química da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY**

Uma suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY (5 g·L<sup>-1</sup>) em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8 foi separada em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi estocada a 5 °C por 219 dias e a outra foi estocada a temperatura ambiente por 140 dias. Durante a estocagem foram retiradas alíquotas dessa suspensão (200 µL) para se realizar os testes de atividade amidásica descritos no **item 3.2.11**.

Como controle, uma solução de TRY ( $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>) em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8 foi estocada a 5 °C por 89 dias, e outra foi estocada

a temperatura ambiente por 40 dias. Ambas foram monitoradas pela atividade amidásica descrita no **item 3.2.11**.

### 3.2.14 Estabilidades térmicas da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY e da TRY livre

Uma suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY (5 g·L<sup>-1</sup>) e uma solução de TRY (1,0·10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>), ambas em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8, foram incubadas por até 48 h a 60 °C sob agitação de 300 rpm em um shaker. Foram retiradas alíquotas após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h de incubação, que tiveram medidas as suas atividades amidásicas pelo método do **item 3.2.11**.

### 3.2.15 pHs ótimos da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY e da TRY livre

Foram realizadas reações em que os meios reacionais apresentavam pH 5, 6, 7, 8, 9 e 10 com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY (5 g·L<sup>-1</sup>) e a TRY livre (1,0·10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>). A **Tabela 7** lista os valores de pH e os tampões utilizados para obtê-los. Cada solução foi usada para determinar a atividade amidásica usando o método do **item 3.2.11**.

**Tabela 7: Tampões utilizados para realizar a atividade da TRY livre e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY com Bz-Arg-pNA.**

pH	Tampão
5	NaAc 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
6	NaAc 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
7	Tris.HCl 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
8	Tris.HCl 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
9	NH <sub>4</sub> OH 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>
10	NH <sub>4</sub> OH 40 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 20 mmol·L <sup>-1</sup>

### 3.2.16 Reuso da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY na catálise da hidrólise Bz-Arg-pNA

As reações foram realizadas em tubos “ependorf”, e o meio reacional foi composto por solução de Bz-Arg-pNA (1,1·10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup>) em DMSO/tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8 (500 µL) e suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY (5

g·L<sup>-1</sup>) em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8. As reações ocorreram durante 0, 7,5 e 15 min, sob agitação em um shaker a 300 rpm e 37 °C, sendo interrompidas pela separação do sobrenadante da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY, por decantação magnética. Aos sobrenadantes separados foram adicionadas soluções de HAc 30% em água. Ao final de cada ciclo foi adicionada solução de Bz-Arg-pNA a cada um dos “eppendorf” com as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY já usadas e a reação repetida. Os sobrenadantes já acidificados foram transferidos para poços de uma placa de ELISA para que fosse determinada a absorbância em 410 nm. O branco usado foi uma mistura contendo solução de Bz-Arg-pNA citada acima, HAc 30% e tampão no mesmo volume do meio reacional. Foi utilizada uma curva padrão de pNA (Abs em 410 nm versus concentração) para monitorar a reação. Foram feitos um total de 10 ciclos em triplicata.

### **3.2.17 Monitoramento por LC/ESI-MS da proteólise da caseína do leite bovino por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY**

Para o monitoramento foi preparada uma solução de caseína 1,5% em tampão Tris.HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8. Essa solução foi pré-incubada a 94 °C para desnaturação proteica a fim de expor as proteínas ao catalisador. O meio foi composto por 2,0 mL de solução de caseína (1,5%) e 450 µL de suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY (5 g·L<sup>-1</sup>). A reação foi feita por 24 h a 37 °C e 300 rpm. A amostra foi dessalinizada seguindo o método descrito no **item 3.3.10**.

### **3.2.18 Identificação de fragmentos provenientes da proteólise**

A identificação dos fragmentos foi feita utilizando três softwares de identificação de proteínas a partir dos fragmentos obtidos na proteólise. Primeiramente, foram

obtidas as fragmentações teóricas das quatro formas da caseína do leite bovino utilizando a especificidade de cada uma das endopeptidase (TLN,  $\alpha$ QT e TRY). Para fazer essa fragmentação foi utilizado o software ExPASy PepideMass (WILKINS et al., 1997) e sequências das quatro formas das caseínas obtidas no banco de dados UniProt (**Tabela 8**) (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017). Na predição da fragmentação foram aceitos peptídeos com até 5 ligações peptídicas suscetíveis à hidrólise, mas que permaneceram intactas (clivagem perdida) e sem restrições de tamanho de peptídeo. O resultado apresentado pela fragmentação teórica foi de massa monoisotópica.

**Tabela 8: Código UniProt das formas da caseína do leite bovino.**

Forma da caseína do leite bovino	Código UniProt
$\alpha$ s1	CASA1_BOVIN
$\alpha$ s2	CASA2_BOVIN
$\beta$	CASB_BOVIN
$\kappa$	CASK_BOVIN

Os resultados obtidos pelo LC-MS com a TRY e a  $\alpha$ -QT foram aplicados primeiramente no software MS-Fit (BAKER; CLAUSER, <http://prospector.ucsf.edu>. Acessado pela última vez dia 04/02/2020) contra a proteólise teórica das caseínas gerada pelo próprio sistema a partir da sequência obtida no UniProt. Esse programa comparou os  $[M+H]^+$  obtidos com os teóricos e mostrou os possíveis fragmentos obtidos pela proteólise. Os parâmetros utilizados serão apresentados nos resultados.

Os resultados obtidos no MS-Fit foram aplicados no MASCOT Server Peptide Mass Fingerprint (Matrix Science, Boston, EUA) contra a proteólise teórica das caseínas gerada pelo próprio sistema, a partir da sequência obtida no UniProt e contra o banco de dados SwissProt.

Foi adotado o mesmo procedimento para a BSA. Nesse caso, o código UniProt é ALBU\_BOVIN.

Para a proteólise com a TLN foi utilizado o software Findpept do ExPasy (GATTIKER et al., 2002), uma vez que a regra de proteólise para a TLN no MS-Fit era diferente da que foi utilizada na predição.

Os peptídeos encontrados na proteólise da caseína do leite bovino foram comparados com o banco de dados Milk Bioactive Peptide Database (NIELSEN et al., 2017) para determinar quais fragmentos já foram descritos com atividade biológica.

Os peptídeos encontrados no proteolisado da BSA foram comparados com aqueles de 2 bancos de dados: o BIOPEP, que é geral, e o The Antimicrobial Peptide Database que é específico (IWANIAK et al., 2016; WANG; LI; WANG, 2016).

### **3.3 Métodos preparativos**

#### **3.3.1 Preparação de NPs e imobilização de enzimas**

A síntese do suporte magnético foi realizada no laboratório da Profa. Dra. Liane M. Rossi do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP com ajuda da, na época doutoranda, Natália J. S. Costa (JACINTO et al., 2008). O procedimento empregado está descrito no trabalho publicado em 2014 (LIRIA et al., 2014) e no **Figura 24** abaixo.

### 1ª Etapa: Síntese do suporte magnético amino-funcionalizado

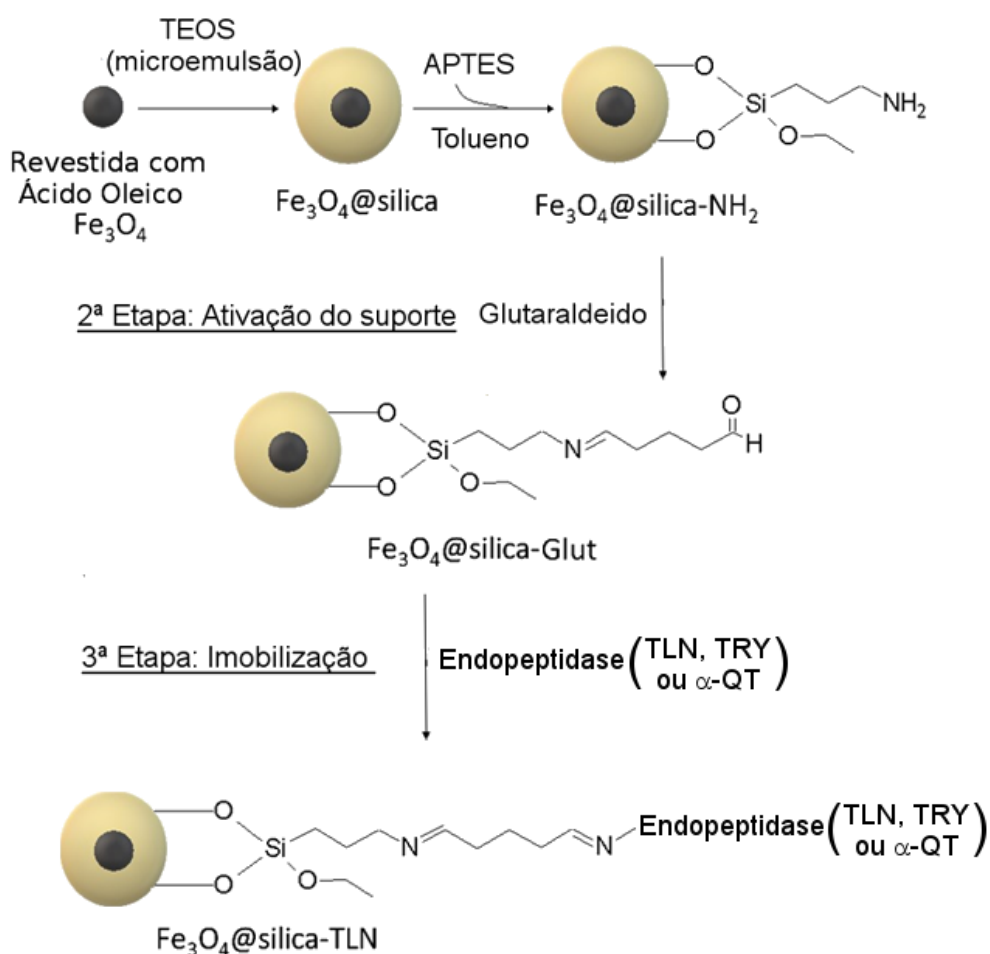


Figura 24: Etapas da imobilização para a TLN, TRY e  $\alpha$ -QT na  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica$ . Adaptado de LIRIA et al, 2014.

Brevemente, os núcleos magnéticos do suporte dos nanocatalisadores são de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e foram preparados pelo método da co-precipitação (PHILIPSE; BRUGGEN; PATHMAMANOHRAN, 1994). Inicialmente, foi preparada uma mistura de 10 mL de  $\text{FeCl}_3$  ( $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 2,5 mL de  $\text{FeCl}_2$  ( $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em  $\text{HCl}$  ( $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), que então foi colocada em um balão de três bocas sob atmosfera de  $\text{N}_2$  e agitação mecânica (10.000 rpm, Ultra-Turrax T18 Homogenizer, IKA Works) junto com 250 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Toda a água utilizada foi desoxigenada. A solução foi submetida a atmosfera inerte e agitação magnética por 30 min. As NPs de magnetita foram separadas da solução por magnetismo. Posteriormente, elas foram lavadas 3x



com 250 mL de água destilada, e em cada lavagem foram separadas por magnetismo. Elas, então, foram suspensas em 250 mL de água destilada.

Para o revestimento com ácido oleico foi adicionado à suspensão de NPs 1 mL de solução de ácido oleico ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em acetona. Essa mistura ficou sob agitação mecânica por 30 min, após os quais foi adicionado igual volume de acetona para promover a precipitação das NPs, que foram separadas por magnetismo. As NPs revestidas com ácido oleico foram, então, suspensas em 50 mL de cicloexano, e, para a remoção do material não estabilizado, a solução foi centrifugada a 5.000 rpm durante 30 min. Obteve-se assim NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em cicloexano.

Para o revestimento com sílica, 2,8 L de cicloexano foram adicionados a 178,4 g de Igepal CO-520 em um balão de fundo redondo. O balão foi posto em um banho de ultrassom por 5 min. Foram adicionados 0,8 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  fluído e 38,0 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  29%. A solução foi mantida sob agitação mecânica (agitador mecânico KIKA Labortechnik) até a solução ficar translúcida. Em seguida, foram adicionados 30,8 mL de tetraetilortosilicato (TEOS), e a solução resultante foi mantida sob agitação lenta por 16 horas.

Foi acrescentado MeOH à solução, o que fez com que as NPs decantassem e ficassem agregadas no fundo do balão. Essa mistura foi removida e centrifugada a 7.000 rpm por 20 min para separá-las. Elas foram lavadas uma vez com MeOH e duas vezes com etanol. A separação em cada lavagem ocorreu por centrifugação.

O sólido obtido, NPs de magnetita revestidas com sílica, foi seco à temperatura ambiente, macerado e colocado na estufa a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 h.

Para a aminação, foi retirado o ar do recipiente de reação por passagem de gás  $\text{N}_2$  e foram adicionados 75 mL de tolueno seco. Uma massa de 500 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica foi dispersa no tolueno. O recipiente foi submetido a atmosfera de  $\text{N}_2$ ,

enquanto foram acrescentados 750 $\mu$ L de 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTES) gota a gota. A mistura foi deixada sob agitação por 2h.

O material obtido foi separado magneticamente, o sobrenadante removido e lavado com tolueno (3x), sempre separando por magnetismo após cada lavagem. O material foi seco a vácuo e colocado na estufa por 20 h a 100 °C. Esse procedimento levou à obtenção de 500 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-NH<sub>2</sub>.

A funcionalização da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-NH<sub>2</sub> (50 mg) foi feita com glutardialdeído (16 mL de glutardialdeído (Vetec Química Fina Ltda., Brasil) /25% em H<sub>2</sub>O) e 24 mL de tampão fosfato, 50mM, pH 7,4. A suspensão foi agitada a 300 rpm por 1 h, após as quais as NPs foram lavadas com tampão e ressuspendidas em 40 mL do mesmo. Para a imobilização e obtenção do nanobiocatalisador (NBC), foram adicionados à suspensão 20 mg de TLN. A reação ocorreu sob rotação de 300 rpm por 2 a 16 h a 37 °C. As NPs obtidas foram lavadas com água e ressuspendidas em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7,4, sendo a concentração final de NBC 5 g·L<sup>-1</sup>.

A imobilização da  $\alpha$ -QT foi feita seguindo o mesmo procedimento, porém o estudo foi discutido em Liria e col. (2014). O tampão utilizado para estocar foi o fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7,4.

A imobilização da TRY foi feita seguindo-se o mesmo procedimento, mas com diferentes tempos e temperaturas de incubação. A reação foi incubada por 2 h a 37°C, por 6 e por 24 h a 4 °C, ambas as condições com agitação de 300 rpm. O tampão utilizado para estocar foi o Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8.

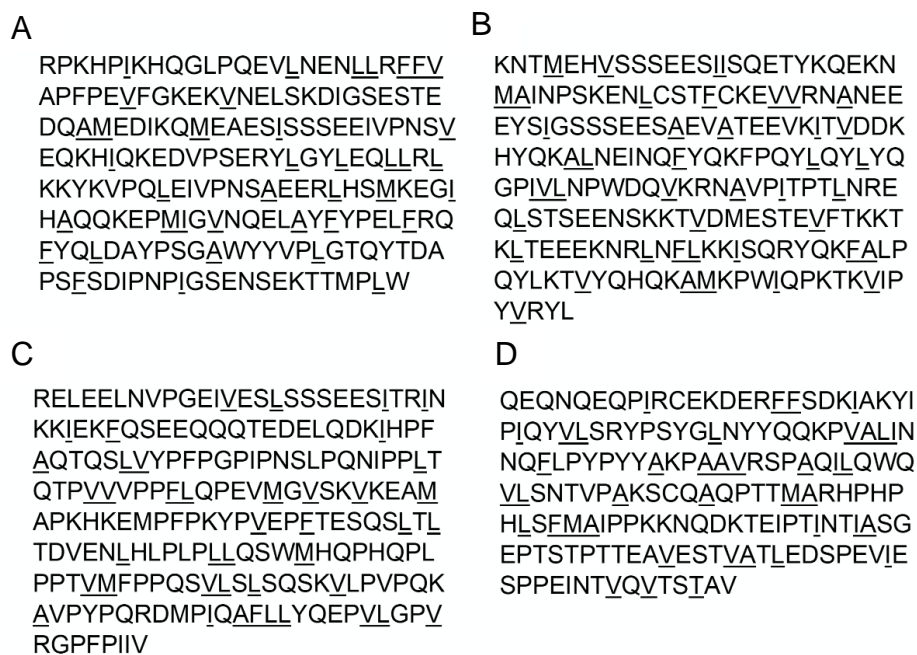
### 3.3.2 Síntese do nanocatalisador de paládio

A síntese foi realizada por membros do Laboratório de Nanomateriais e Catálise da Profa. Dra. Liane M. Rossi seguindo o procedimento descrito por Uberman e col.

(2014). Brevemente, as NPs de Pd foram preparadas pela decomposição direta do  $[\text{Pd}_2(\text{dba})_3]$  na presença do suporte magnético. O catalisador foi nomeado  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-Pd}$  e armazenado a temperatura ambiente sem controle de atmosfera.

### 3.3.3 Proteólise da caseína do leite bovino e da BSA pela TLN livre e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TLN}$

Foi preparada uma solução de caseína (1,3%) em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup> contendo  $\text{CaCl}_2$  10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,4. Essa solução foi pré-incubada a 94 °C para desnaturação proteica. Para a reação catalisada pela TLN livre foi preparada uma solução estoque de enzima no mesmo tampão ( $2,9 \cdot 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>). O meio reacional foi composto de 1 mL da solução de caseína e 2 µL de solução de TLN livre. O meio reacional da proteólise catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TLN}$  foi composto por 1 mL da solução de caseína e 10 µL de suspensão de NBC 5 (g·L<sup>-1</sup>). As reações ocorreram por 24 h a 37 °C e 300 rpm. Foram removidas alíquotas de 100 µL nos tempos de 0,5; 1; 2 e 4h. As reações foram interrompidas com congelamento das amostras. A **Figura 25** apresenta as sequências das quatro formas da caseína. À esquerda do resíduo sublinhado é esperada que haja a hidrólise catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TLN}$ . Essa posição foi determinada pelo software ExPASy PeptideCutter (GASTEIGER et al., 2005).



**Figura 25: Sequências das quatro formas da caseína bovina do leite, sendo que os resíduos à esquerda do sublinhado indicam onde a  $Fe_3O_4@silica-TLN$  pode catalisar a hidrólise. (A)  $\alpha_1$ -caseína; (B)  $\alpha_2$ -caseína; (C)  $\beta$ -caseína e (D)  $\kappa$ -caseína.**

Para a BSA foi adaptado o método utilizado por Yamaguchi e col. (2009). Foi preparada uma solução de BSA ( $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl  $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $CaCl_2$   $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,5. Para a reação catalisada pela TLN livre foi preparada uma solução estoque de enzima no mesmo tampão ( $2,9\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). O meio reacional foi composto por 2 mL da solução de BSA e 0,042 mL da solução de TLN livre. Para a reação com  $Fe_3O_4@silica-TLN$  foram adicionados o sólido úmido de 0,16 mL da suspensão de NBC ( $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 2 mL da solução de BSA. As reações ocorreram por 24 h a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e 300 rpm. As reações foram interrompidas pelo congelamento das amostras. A **Figura 26** apresenta as sequências BSA, à esquerda do resíduo sublinhado é esperada que haja a hidrólise catalisada pela  $Fe_3O_4@silica-TLN$ . Essa posição foi determinada pelo software ExPASy PeptideCutter (GASTEIGER et al., 2005).

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPF  
 DEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFG  
 DELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSH  
 KDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLE  
 IARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGA  
 CLLPKIETMREKVLASSARQRLRCASIQKEGERALK  
 AWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCH  
 GDLLCADDRADLAKYICDNQDTISSKLECCDKPL  
 LEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCCKNY  
 QEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEA  
 TLECCAKDDPHACYSTVFDKLVKHLVDEPQNLIKQ  
 NCDQFEKLVGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVE  
 VSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRL  
 CVLHEKTPVSEKVTCCCTESLVNRRPCFSALTPDE  
 TYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVEL  
 LKHKPKATEEQKVTVMENFVAFVDKCCAADDKEAC  
 FAVEGPKLVVSTQTALA

**Figura 26: Sequências da BSA, sendo que a esquerda do sublinhado indica onde a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN pode catalisar a hidrólise.**

Em ambos os casos a dessalinização foi feita seguindo o procedimento do **item**

### 3.3.10.

A análise do produto foi feita por LC-MS. As condições do LC para os eluídos com a solução 60% ACN foram: Solvente A = 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O; Solvente B = 60%ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O; Gradiente linear de 5 a 95 % de B por 30 min; Fluxo = 1 mL·min<sup>-1</sup>; λ =210 nm. Já para os eluídos com a solução 95%, as condições foram: Solvente A = 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O; Solvente B = 95%ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O; Gradiente linear de 5 a 95 % de B por 30 min; Fluxo = 1 mL·min<sup>-1</sup>; λ = 210 nm. Os resultados foram tratados seguindo-se o procedimento descrito no **item 3.2.18**.

### 3.3.4 Proteólise da caseína do leite bovino e da BSA por α-QT livre e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-α-QT

Foi preparada uma solução de caseína (1,3%, m/v) em tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8. Essa solução foi pré-incubada a 94 °C para desnaturação proteica. Para a reação catalisada pela α-QT livre foi preparada uma solução estoque de enzima (4,0·10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>) de enzima no mesmo tampão. O meio reacional foi composto

por 1 mL da solução de caseína e 5  $\mu\text{L}$  de solução de  $\alpha\text{-QT}$  livre. O meio reacional da proteólise catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-}\alpha\text{-QT}$  foi composto por 1 mL da solução de caseína e 45  $\mu\text{L}$  de suspensão de NBC ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). As reações ocorreram por 24 h a 37 °C e 300 rpm. Foram removidas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  nos tempos de 10, 20, 30 min, 1, 2, 4 e 6 h. As reações foram interrompidas pelo congelamento das amostras. A **Figura 27** apresenta as sequências das quatro formas da caseína. À direita do resíduo sublinhado é esperada que haja a hidrólise catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-}\alpha\text{-QT}$ . Essa posição foi determinada pelo software ExPASy PeptideCutter (GASTEIGER et al., 2005).

Para a BSA, foi adaptado o método utilizado por Yamaguchi e col. (2009). Foi preparada uma solução de BSA ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8. Para a reação catalisada pela  $\alpha\text{-QT}$  livre foi preparada uma solução estoque de enzima no mesmo tampão ( $2,9\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). O meio reacional foi composto por 2 mL da solução de BSA e 0,09 mL da solução de  $\alpha\text{-QT}$  livre. Para a reação com  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-}\alpha\text{-QT}$  foram adicionados o sólido úmido de 0,44 mL da suspensão de NBC ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 2 mL da solução de BSA. As reações ocorreram por 24 h a 37 °C e 300 rpm. Foram removidas alíquotas de 200 $\mu\text{L}$  no tempo 6h. A reação foi interrompida pelo congelamento das amostras.

**A**  
 RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLREFV  
 APFPEVEFGKEKVNELSKDIGSESTE  
 DQAMEDIKQMEAEISSSSEEIVPNSV  
 EQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLRL  
 KKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGI  
 HAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQ  
 FYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDA  
 PSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW

**B**  
 KNTMEHVSSSEESIISQETYKQEK  
 MAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEE  
 EYSIGSSSEESAEVATEEVKITVDDK  
 HYQKALNEINQFYQKFPQYLQYLYQ  
 GPIVLNPWDQVKNRNPITPTLNRE  
 QLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKKT  
 KLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFA  
 QYLKTVYQHQAAMKPKWIPKTKVIP  
 YVRYL

**C**  
 RELLELNVPGEIVESLSSSEESITRIN  
 KKIEKFQSEEQQTEDELQDKIHPE  
 AQTQSLVYPPFGPIPNLSPQNIPLT  
 QTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAM  
 APKHKEMPPFKYPVEPEFETESQSLTL  
 TDVENLHLLPLQLQSWMHQPHQPL  
 PPTVMFPPQSVLSLQSKVLPVPQK  
 AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPV  
 RGPFFIIV

**D**  
 QEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAKYI  
 PIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALLIN  
 NQFLPYPYAKPAAVRSPAQLQWQ  
 VLSNTVPAKSCQAQPTTMMARHPHP  
 HLSFMAIPPKKNQDKTEIPTINTIASG  
 EPTSTPTTEAVESTVATLEDSPVEIE  
 SPPEINTVQVTSTAV

**Figura 27:** Sequências das quatro formas da caseína bovina do leite sendo que à direita do sublinhado indica onde a  $Fe_3O_4@silica-\alpha$ -QT pode catalisar a hidrólise. (A)  $\alpha$ 1-caseína; (B)  $\alpha$ 2-caseína; (C)  $\beta$ -caseína e (D)  $\kappa$ -caseína.

A **Figura 28** apresenta a sequência da BSA. À direita do resíduo sublinhado é esperada que haja a hidrólise catalisada pela  $Fe_3O_4@silica-\alpha$ -QT. Essa posição foi determinada pelo software ExPASy PeptideCutter (GASTEIGER et al., 2005).

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLI<sup>1</sup>AFS<sup>2</sup>QYL<sup>3</sup>QQCP<sup>4</sup>E  
 DEHV<sup>5</sup>KL<sup>6</sup>VNEL<sup>7</sup>TEFA<sup>8</sup>KTCVA<sup>9</sup>DESHAG<sup>10</sup>CEKSL<sup>11</sup>H<sup>12</sup>TL<sup>13</sup>FG  
 DEL<sup>14</sup>CKVAS<sup>15</sup>L<sup>16</sup>RETY<sup>17</sup>GDM<sup>18</sup>ADCCEK<sup>19</sup>QEPERNE<sup>20</sup>CF<sup>21</sup>LS<sup>22</sup>H  
 KDDSP<sup>23</sup>DL<sup>24</sup>PK<sup>25</sup>L<sup>26</sup>KPDP<sup>27</sup>N<sup>28</sup>TL<sup>29</sup>CDEFKA<sup>30</sup>DEK<sup>31</sup>FW<sup>32</sup>GKY<sup>33</sup>LYE  
 IARRH<sup>34</sup>PY<sup>35</sup>FY<sup>36</sup>AP<sup>37</sup>ELL<sup>38</sup>YANK<sup>39</sup>YNG<sup>40</sup>VF<sup>41</sup>QECC<sup>42</sup>QAED<sup>43</sup>KGA  
 CLL<sup>44</sup>PKI<sup>45</sup>ET<sup>46</sup>MRE<sup>47</sup>KVL<sup>48</sup>ASSAR<sup>49</sup>QL<sup>50</sup>RCASIQ<sup>51</sup>K<sup>52</sup>GERAL<sup>53</sup>K  
 AW<sup>54</sup>SVAR<sup>55</sup>L<sup>56</sup>SQK<sup>57</sup>FPK<sup>58</sup>AEF<sup>59</sup>VEV<sup>60</sup>TK<sup>61</sup>LV<sup>62</sup>DT<sup>63</sup>L<sup>64</sup>TKV<sup>65</sup>H<sup>66</sup>KEC<sup>67</sup>H  
 GD<sup>68</sup>L<sup>69</sup>ECAD<sup>70</sup>DRAD<sup>71</sup>L<sup>72</sup>AKY<sup>73</sup>ICDN<sup>74</sup>QDTISS<sup>75</sup>KL<sup>76</sup>KECC<sup>77</sup>DK<sup>78</sup>PL  
 LE<sup>79</sup>KSH<sup>80</sup>CIAE<sup>81</sup>VEK<sup>82</sup>DAIP<sup>83</sup>ENL<sup>84</sup>PPL<sup>85</sup>TAD<sup>86</sup>FAED<sup>87</sup>KDV<sup>88</sup>CKNY  
 QEAK<sup>89</sup>DA<sup>90</sup>FL<sup>91</sup>GS<sup>92</sup>FL<sup>93</sup>YE<sup>94</sup>YSRR<sup>95</sup>HPE<sup>96</sup>YAV<sup>97</sup>SV<sup>98</sup>LL<sup>99</sup>R<sup>100</sup>L<sup>101</sup>AKE<sup>102</sup>YEA  
 TL<sup>103</sup>EECCA<sup>104</sup>KDD<sup>105</sup>PHAC<sup>106</sup>YST<sup>107</sup>V<sup>108</sup>FD<sup>109</sup>KL<sup>110</sup>KHL<sup>111</sup>V<sup>112</sup>DEP<sup>113</sup>QNL<sup>114</sup>IK<sup>115</sup>Q  
 NCDQ<sup>116</sup>FE<sup>117</sup>KL<sup>118</sup>GEY<sup>119</sup>GF<sup>120</sup>QNAL<sup>121</sup>IVRY<sup>122</sup>TRK<sup>123</sup>VP<sup>124</sup>QV<sup>125</sup>ST<sup>126</sup>PT<sup>127</sup>L<sup>128</sup>VE  
 VSR<sup>129</sup>SL<sup>130</sup>GK<sup>131</sup>VG<sup>132</sup>TRC<sup>133</sup>CTK<sup>134</sup>PESER<sup>135</sup>MP<sup>136</sup>CTED<sup>137</sup>Y<sup>138</sup>LS<sup>139</sup>L<sup>140</sup>IN<sup>141</sup>RL  
 CVL<sup>142</sup>HE<sup>143</sup>KTP<sup>144</sup>VSE<sup>145</sup>KV<sup>146</sup>TK<sup>147</sup>CCTES<sup>148</sup>LVN<sup>149</sup>RR<sup>150</sup>PC<sup>151</sup>F<sup>152</sup>SAL<sup>153</sup>TP<sup>154</sup>DE  
 TY<sup>155</sup>VP<sup>156</sup>KA<sup>157</sup>F<sup>158</sup>DE<sup>159</sup>KL<sup>160</sup>TF<sup>161</sup>HADICT<sup>162</sup>LP<sup>163</sup>DEK<sup>164</sup>QIK<sup>165</sup>K<sup>166</sup>Q<sup>167</sup>TAL<sup>168</sup>VEL  
 L<sup>169</sup>K<sup>170</sup>H<sup>171</sup>K<sup>172</sup>PK<sup>173</sup>ATEE<sup>174</sup>QL<sup>175</sup>K<sup>176</sup>TV<sup>177</sup>MEN<sup>178</sup>FVA<sup>179</sup>F<sup>180</sup>V<sup>181</sup>DK<sup>182</sup>CCA<sup>183</sup>ADD<sup>184</sup>KEAC  
 FAVE<sup>185</sup>GPK<sup>186</sup>L<sup>187</sup>VV<sup>188</sup>ST<sup>189</sup>QTALA

**Figura 28:** Sequências da BSA sendo que à direita do sublinhado indica onde a  $Fe_3O_4@silica-\alpha$ -QT pode catalisar a hidrólise.

Em ambos os casos a dessalinização foi feita seguindo o procedimento descrito no **item 3.3.10**.

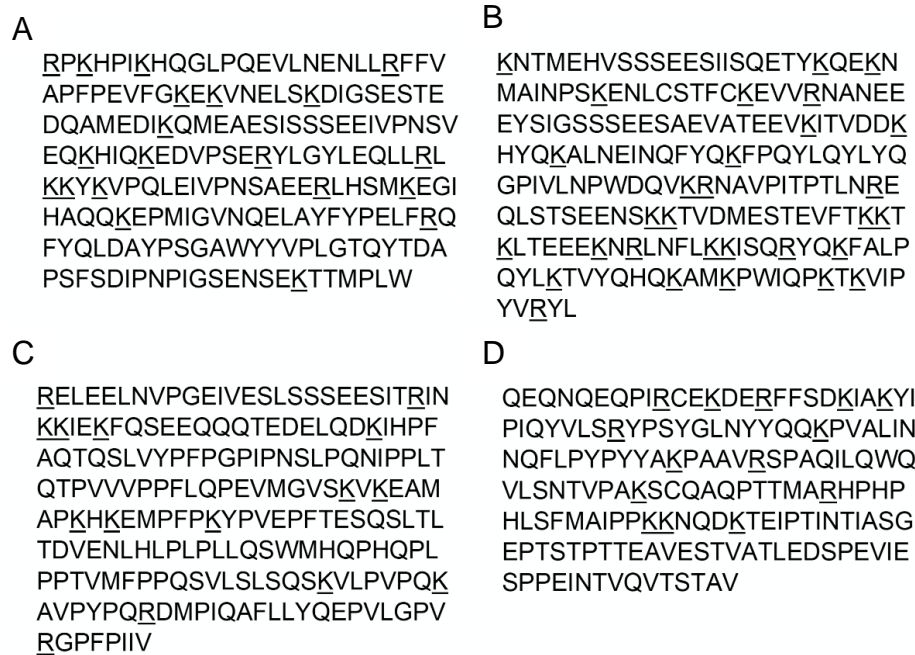
A análise do produto foi feita por LC-MS. As condições do LC para os eluídos com a solução 60% ACN foram: Solvente A = 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O; Solvente B = 60%ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O; Gradiente linear de 5 a 95 % de B por 30 min; Fluxo = 1 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  = 210 nm. Já para os eluídos com a solução 95%, as condições foram: Solvente A = 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O; Solvente B = 95%ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O; Gradiente linear de 5 a 95 % de B por 30 min; Fluxo = 1 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  = 210 nm. Os resultados foram tratados seguindo-se o procedimento descrito no **item 3.2.18**.

### **3.3.5 Proteólise da caseína do leite bovino e da BSA por TRY livre e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY**

Foi preparada uma solução de caseína (1,3%, m/v) em tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8. Essa solução foi pré-incubada a 94 °C para desnaturação proteica. Para a reação catalisada pela TRY livre foi preparada uma solução estoque de enzima (4,2·10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>) no mesmo tampão. O meio reacional foi composto por 1 mL da solução de caseína e 5,5  $\mu$ L de solução de TRY. O meio reacional da proteólise catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY foi composto por 1 mL da solução de caseína e 22,5  $\mu$ L de suspensão de NBC (5 g·L<sup>-1</sup>). As reações ocorreram por 24 h a 37 °C e 300 rpm. Foram removidas alíquotas de 200  $\mu$ L nos tempos de 0,5; 2 e 4 h. As reações foram interrompidas pelo congelamento das amostras.

A **Figura 29** apresenta as sequências das quatro formas da caseína. À direita do resíduo sublinhado é esperado que haja a hidrólise catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY. Essa posição foi determinada pelo software PeptideCutter da ExPasy (GASTEIGER et al., 2005).





**Figura 29: Sequências das quatro formas da caseína bovina do leite sendo que a direita do sublinhado indica a posição na qual a  $Fe_3O_4@sílica$ -TRY pode catalisar a hidrólise. (A)  $\alpha$ 1-caseína; (B)  $\alpha$ 2-caseína; (C)  $\beta$ -caseína e (D)  $\kappa$ -caseína.**

Para a BSA foi adaptado o método utilizado por Yamaguchi e col. (2009). Foi preparada uma solução de BSA ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8. Para a reação catalisada pela TRY livre foi preparada uma solução estoque de enzima no mesmo tampão ( $2,89\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). O meio reacional foi composto por 2 mL da solução de BSA e 0,09 mL da solução de TRY. Para a reação com  $Fe_3O_4@sílica$ -TRY foram adicionados o sólido úmido de 0,70 mL da suspensão de NBC ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 2 mL da solução de BSA. As reações ocorreram por 24 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 300 rpm. Foram removidas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  após 6 h. As reações foram interrompidas pelo congelamento das amostras.

A **Figura 30** apresenta a sequência da BSA. À direita do resíduo sublinhado é esperada que haja a hidrólise catalisada pela  $Fe_3O_4@sílica$ -TRY. Essa posição foi determinada pelo software ExPASy PeptideCutter (GASTEIGER et al., 2005). Em ambos os casos a dessalinização foi feita seguindo o procedimento do **item 3.3.10**.

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPF  
 DEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFG  
 DELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSH  
 KDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKFWGKYLIE  
 IARRHPYFYAPELLYANKYNGVFQECCQAEDKGA  
 CLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALK  
 AWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCH  
 GDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPL  
 LEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNY  
 QEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEA  
 TLEECCAADDPHACYSTVFDKHLVDEPQNLIKQ  
 NCDQFEKLGEGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVE  
 VSRSLGKVGTRCCTKPESEMPCTEDYLSLILNRL  
 CVLHEKTPVSEKVTCCTESLVNRRPCFSALTPDE  
 TYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKQTALVEL  
 LKHKPKATEEQKTVMENFVAFVDKCCAADDKEAC  
 FAVEGPKLVVSTQTALA

**Figura 30: Sequências da BSA sendo que a direita do sublinhado indica a posição na qual a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TRY}$  pode catalisar a hidrólise.**

A análise do produto foi feita por LC-MS. As condições do LC para os eluídos com a solução 60% ACN foram: Solvente A = 0,1%TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ ; Solvente B = 60%ACN/0,09% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ ; Gradiente linear de 5 a 95 % de B por 30 min; Fluxo = 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\lambda = 210 \text{ nm}$ . Já para os eluídos com a solução 95%, as condições foram: Solvente A = 0,1%TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ ; Solvente B = 95%ACN/0,09% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ ; Gradiente linear de 5 a 95 % de B por 30 min; Fluxo = 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\lambda = 210 \text{ nm}$ . Os resultados foram tratados seguindo o procedimento descrito no **item 3.2.18**.

### 3.3.6 Coagulação do leite bovino pela TLN livre e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TLN}$

A coagulação do leite foi feita com base no trabalho de Pessela e col. (2004) com as devidas adaptações. Foi preparada uma solução estoque de leite semidesnatado comercial Shefa ( $\text{Ca}^{+2}$  20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7 usando  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{NaOH}$  1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), estocada em gelo durante o procedimento. A  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TLN}$  foi preparado a partir de 900  $\mu\text{L}$  da suspensão 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Por decantação magnética foi removido o sobrenadante da suspensão e os NBCs foram lavados duas vezes com tampão Tris.HCl 40  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,4. O meio reacional foi

composto pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN lavada e 1 mL da solução estoque de leite. A reação foi feita em duas fases. Na primeira, o meio reacional foi incubado em banho de gelo (para manter a temperatura próxima do 0 °C) a 300 rpm por 30 min. Ao final dessa fase, os NBCs foram separados do sobrenadante por decantação magnética e lavados três vezes com tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,4 para que possam ser reutilizados seguindo o mesmo procedimento. O sobrenadante foi incubado à temperatura ambiente por 30 min (segunda fase) para gerar o coagulado. O monitoramento dessas duas fases foi feito por meio de fotografias nos tempos 0 h, fim da primeira fase (30 min) e fim da segunda fase (1 h). As  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN foram reutilizadas 11 vezes. O coagulado obtido foi centrifugado e separado do soro, e tanto o coagulado quanto o soro foram congelados para futuras análises.

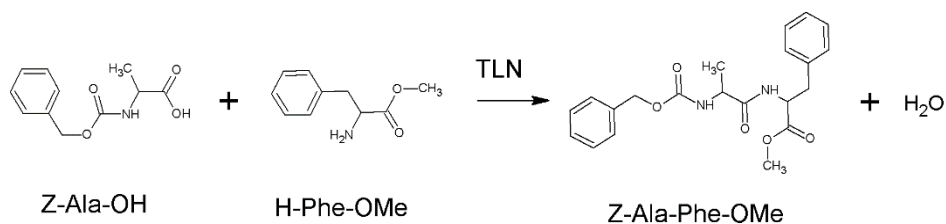
Foram feitas reações controle com uma solução de TLN livre em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,4. (1 g·L<sup>-1</sup>) seguindo o mesmo procedimento, mas com as seguintes alterações: foram feitas duas reações, uma com 200 µL e outra com 20 µL de solução de TLN livre em 1 mL da solução estoque de leite.

Também foram realizadas reações com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN com uma quantidade inicial de 90 µL da suspensão de NBCs e seguindo o procedimento anterior.

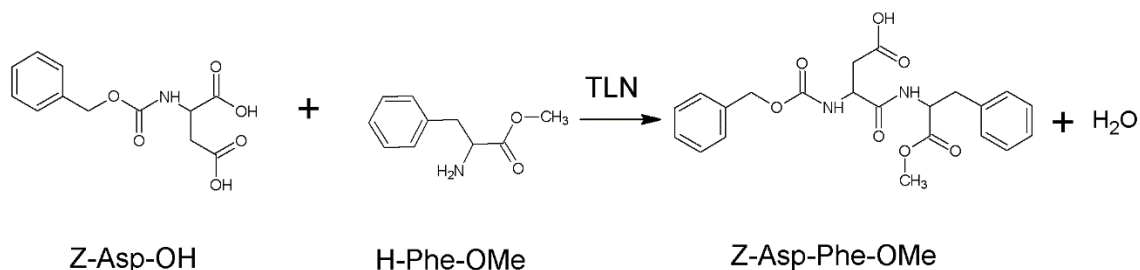
### **3.3.7 Síntese dos dipeptídeos protegidos catalisada por TLN ou $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN**

#### **a) Z-Ala-Phe-OMe e Z-Asp-Phe-OMe**

O **Figura 31** e **32** apresentam as reações de síntese do Z-Ala-Phe-OMe e Z-Asp-Phe-OMe.



**Figura 31: Síntese de Z-Ala-Phe-OMe catalisada por TLN.**



**Figura 32: Síntese de Z-Asp-Phe-OMe catalisada por TLN.**

O meio reacional foi formado por 1 mL de solução de acetato de sódio (0,2 mol·L<sup>-1</sup>, Ca(Ac)<sub>2</sub> 0,050 mol·L<sup>-1</sup>, pH 6,0), 200 mg de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Z-Ala (0,1 mol·L<sup>-1</sup>) ou Z-Asp (0,1 mol·L<sup>-1</sup>) (doador de acila), Phe-OMe.HCl (0,1 mol·L<sup>-1</sup>) (aceptor de acila) e 13,86 µL de trietilamina (TEA) para neutralizar o HCl proveniente do Phe-OMe.HCl. Para a reação com TLN livre foi usado 1 mg do catalisador. Para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN inicialmente foi usado o equivalente a 1 mg de TLN, aproximadamente 10 mg (sólido ainda úmido de 2 mL da suspensão estoque), depois foi considerado a perda de atividade da TLN após a imobilização, e foi usado aproximadamente 20 mg (sólido ainda úmido de 4 mL da suspensão estoque). As reações para síntese de Z-Ala-Phe-OMe foram realizadas durante 24 h a 300 rpm e 50 °C. As reações com Z-Asp-Phe-OMe foram realizadas durante 16 h a 300 rpm e 50 °C. Também foi estabelecida a proporção molar entre doador de acila/aceptor de acila igual a 1:2.

O sólido obtido na reação catalisada por TLN livre foi separado por centrifugação e lavado com a solução acetato de sódio (0,2 mol·L<sup>-1</sup> Ca(Ac)<sub>2</sub> 0,05 mol·L<sup>-1</sup> pH 6,0) (3x) e com água (3x) para, então, ser liofilizado em um liofilizador da Edwards e pesado. O produto obtido na reação catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN foi

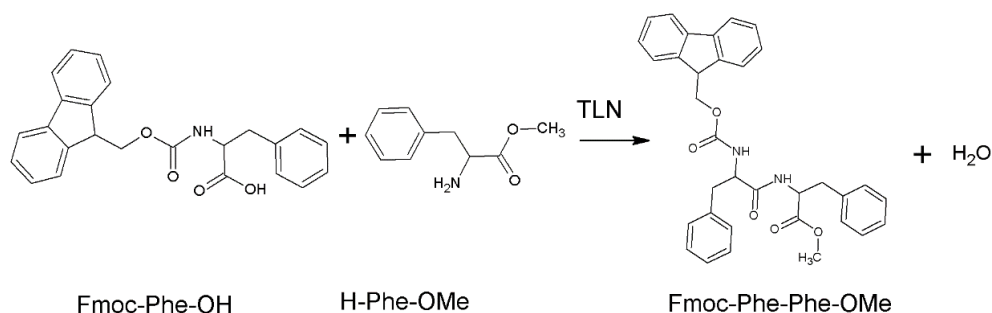
centrifugado junto com as NPs, e esse centrifugado foi lavado 3x com o tampão acetato e 3x com água. Também foi lavado 3x com uma solução 50% ACN/H<sub>2</sub>O para separar o produto das NPs. A separação foi feita por decantação magnética. A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN foi reutilizada seguindo o mesmo procedimento para a síntese do Z-Ala-Phe-OMe. A solução de ACN foi liofilizada, o sólido obtido foi pesado e seu rendimento calculado a partir do número de mols dos reagentes e do produto.

As reações também foram feitas em meio bifásico. Neste caso, a proporção entre doador de acila e acceptor de acila se manteve em 1:2. O meio foi composto por 1 mL de solução acetato de sódio (0,2 mol·L<sup>-1</sup>Ca(Ac)<sub>2</sub> 0,050 mol·L<sup>-1</sup> pH 6,0) e 1 mL de acetato de etila. A reação se seguiu como a anterior. Como nessas condições o produto foi solúvel na fase orgânica, foi feita uma extração. Primeiramente a fase orgânica foi retirada, a fase aquosa foi transferida para um funil de separação e foram feitas duas extrações com acetato de etila que foram adicionadas à fase orgânica. Esta fase foi transferida para um funil de separação, onde foi lavada 2x com solução NaHCO<sub>3</sub> (5%), 2x com H<sub>2</sub>O, 2x com solução HCl (1%) (ambas para remover o substrato que não reagiu) e 2x com H<sub>2</sub>O (para a remoção do sal). A água da fase orgânica foi removida com sulfato de magnésio e seca por rotaevaporação com um rotaevaporador BÜCHI Waterbath B-480 (BÜCHI Labortechnik, Switzerland).

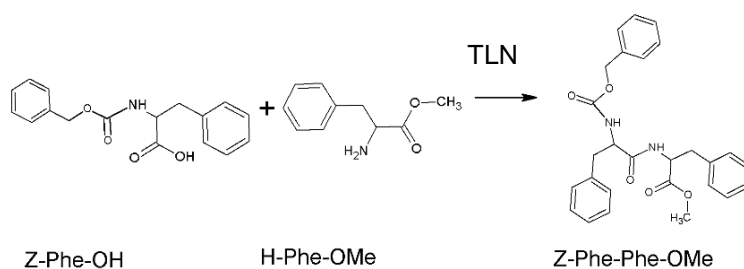
Todas as reações foram monitoradas por RP-HPLC e LC-MS. Os solventes usados foram 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O (solvente A), 60 % ACN/0,09 % TFA/H<sub>2</sub>O (solvente B), gradiente linear de 5 a 95 % de B, fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup> e leitura em 210 nm..

#### **b) Fmoc-Phe-Phe-OMe e Z-Phe-Phe-OMe**

Os **Figuras 33 e 34** mostram as reações de síntese do Fmoc-Phe-Phe-OMe e do Z-Phe-Phe-OMe.



**Figura 33: Síntese de Fmoc-Phe-Phe-OMe catalisada pela TLN.**



**Figura 34: Síntese de Z-Phe-Phe-OMe catalisada por TLN.**

O meio reacional obtido foi bifásico e composto por solução de acetato de sódio ( $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Ca}(\text{Ac})_2$   $0,050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 6,0), acetato de etila, solução de NaCl ( $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Fmoc-Phe ( $0,09 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (doador de acila), Phe-OMe.HCl ( $0,09 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (aceptor de acila) e  $12,47 \mu\text{L}$  de TEA para controle de pH. Para o Z-Phe-Phe-OMe, o meio reacional foi composto por tampão acetato de sódio ( $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Ca}(\text{Ac})_2$   $0,050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 6,0), acetato de etila, Z-Phe ( $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (doador de acila), Phe-OMe.HCl ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (aceptor de acila) e solução de NaOH  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para neutralizar o HCl proveniente do Phe-OMe.HCl. Em ambos os casos foi adicionado 1 mg de TLN livre ou 10 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN (sólido ainda úmido de 2 mL da suspensão estoque). Também foram feitas outras reações considerando a perda de atividade da TLN após a imobilização, usando aproximadamente 20 mg (sólido ainda úmido de 4 mL da suspensão estoque). O tempo de reação foi de 16 h, a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e 300 rpm.

O sólido obtido foi lavado 3x com tampão acetato e 3x com água. Ao fim da lavagem, o produto se encontrava agregado às NPs. Portanto, foi necessário fazer uma lavagem com 3x AcOEt para solubilizar o produto e separá-lo das NPs por

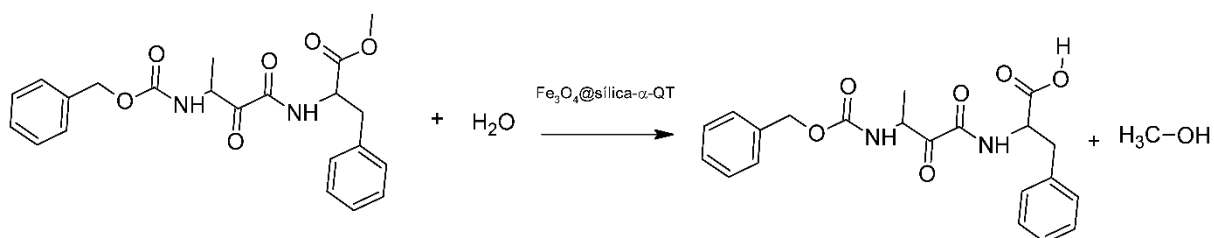
decantação magnética. O sobrenadante foi rotaevaporado, o sólido obtido foi pesado e seu rendimento foi calculado a partir do número de mols dos reagentes e do produto.

Para otimizar o isolamento do produto foi feita uma nova síntese com extração quimicamente ativa. A fração aquosa foi lavada por 2x com AcOEt. A fase orgânica da lavagem foi adicionada à fração acetálica da reação. Essa fração foi lavada com H<sub>2</sub>O, com solução de HCl 1% (3x), com H<sub>2</sub>O novamente, com solução de NaHCO<sub>3</sub> (3x), e novamente com H<sub>2</sub>O. A fração acetálica seca foi rotaevaporada e o material foi pesado para gerar o produto isolado.

As reações foram monitoradas por RP-HPLC e LC-MS. Os solventes usados foram 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O (solvente A), 95 % ACN/0,09 % TFA/H<sub>2</sub>O (solvente B), gradiente linear de 5 a 95 % de B, fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup> e leitura em 210 nm.

### 3.3.8 Hidrólise de do éster metílico de Z-Ala-Phe-OMe catalisada por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT

O Z-Ala-Phe-OMe obtido anteriormente foi submetido à hidrólise do éster catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT em pequena escala como descrita em Ungaro et al. 2015. O **Figura 35** apresenta a reação em questão.



**Figura 35:** Hidrólise do éster de Z-Ala-Phe-OMe catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT.

Esta reação foi repetida em escala maior, a fim de obter maior quantidade de produto. Foram feitos quatro ciclos reacionais utilizando-se os mesmos NBCs. O meio reacional foi composto por 2,56 mL de solução de Z-Ala-Phe-OMe (2,6 mmol·L<sup>-1</sup>) em

50% ACN/tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8 e 5,98 mL da suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT (3,6 g·L<sup>-1</sup>). Ao final, o sobrenadante foi removido e à Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT foram adicionados 5,98 mL de tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8 e 2,56 mL de solução de Z-Ala-Phe-OMe 0,78 mmol·L<sup>-1</sup> para nova reação (ciclo). Ao final do quarto ciclo, as NPs foram lavadas com tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8 (3x).

Todos os quatro sobrenadantes de cada ciclo e o da lavagem das NPs foram juntados, a mistura foi liofilizada, e um sólido composto pelo produto e por sal foi obtido. A ele foi adicionado AcOEt para dissolver o produto, e o sobrenadante foi separado por centrifugação (3x). As três frações provenientes desse processo foram reunidas e rotaevaporadas. O material obtido foi dissolvido em uma solução 50 % ACN/H<sub>2</sub>O e liofilizado para que fosse obtido o material final seco.

Para avaliar a fundo o reuso da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT foram feitos 10 ciclos seguindo o procedimento abaixo. O meio reacional de cada ciclo foi composto por 2,56 mL de solução de Z-Ala-Phe-OMe (2,6 mmol·L<sup>-1</sup>) e 5,98 mL da suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT (3,6 g·L<sup>-1</sup>). Ao final de cada ciclo, o sobrenadante foi removido e à Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT foram adicionados 5,98 mL de tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8 e 2,56 mL de solução de Z-Ala-Phe-OMe (0,78 mmol·L<sup>-1</sup>) para se iniciar um novo ciclo. Ao final do 10<sup>o</sup> ciclo as NPs foram lavadas com tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8 (3x).

A dessalinização com cartucho de Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters Corporation, Massachusetts, EUA) seguiu o procedimento descrito no item **2.3.10** de acordo com as condições a seguir: os meios reacionais de 2 ciclos foram misturados, acidificados até pH ~1 com TFA (30  $\mu$ L de TFA para cada mL de solução) e injetados manualmente no cartucho com um fluxo de aproximadamente 1 mL·min<sup>-1</sup>. O sal foi eluído com uma solução 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O e o produto reacional com uma solução 95%ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O.



Todos os procedimentos foram monitorados por RP-HPLC. As análises foram feitas utilizando-se alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do meio reacional, 0,1%TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (solvente A), 60 % ACN/0,09 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (solvente B), gradiente linear de 5 a 95 % de B, fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detecção em 210 nm. O material isolado foi analisado por LC-MS para comprovar sua identidade usando as mesmas condições.

### 3.3.9 Hidrólise do éster de Fmoc-Phe-Phe-OMe e de Z-Phe-Phe-OMe catalisada por $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ silica- $\alpha$ -QT

O Fmoc-Phe-Phe-OMe e o Z-Phe-Phe-OMe obtidos anteriormente foram submetidos à hidrólise do éster catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ silica- $\alpha$ -QT para gerar o Fmoc-Phe-Phe e o Z-Phe-Phe (Figura 36).

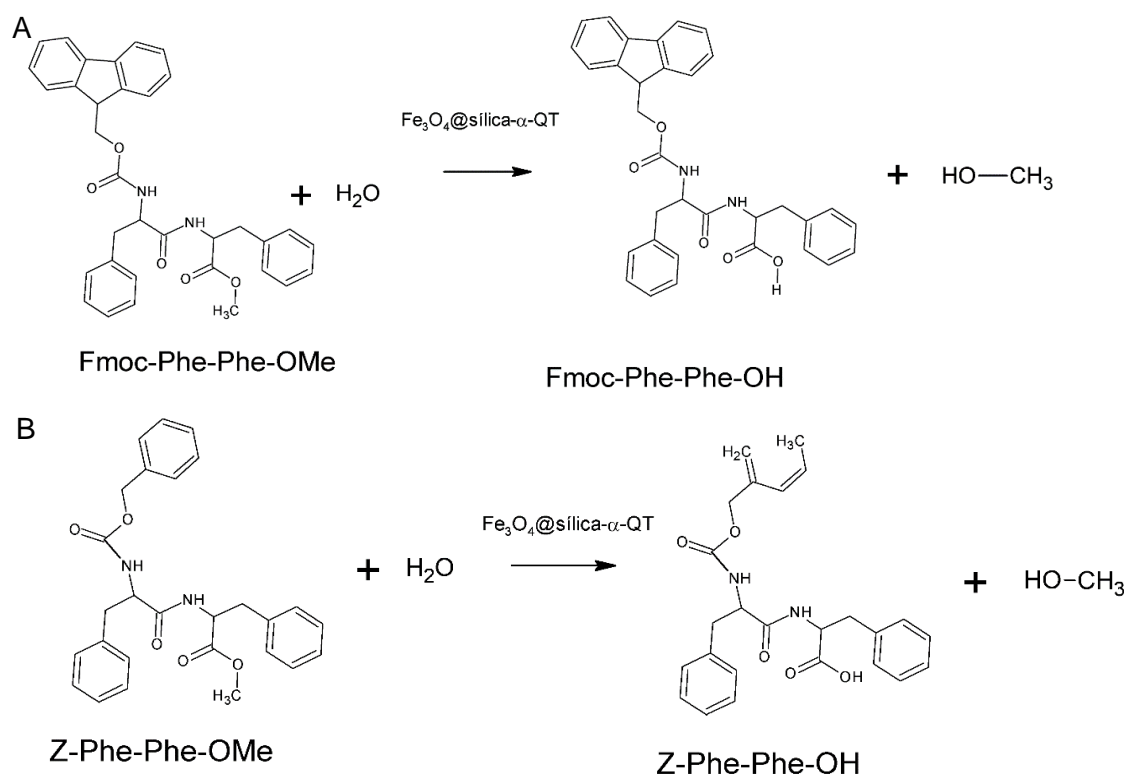


Figura 36: Hidrólise do éster de Fmoc-Phe-Phe-OMe (A) e de Z-Phe-Phe-OMe (B) catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ silica- $\alpha$ -QT.

O meio reacional em pequena escala foi composto por 140  $\mu\text{L}$  de suspensão de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ silica- $\alpha$ -QT ( $3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 60  $\mu\text{L}$  da solução de Fmoc-Phe-Phe-OMe ( $1,9$

mmol·L<sup>-1</sup> em DMSO) ou Z-Phe-Phe-OMe (2,2 mmol·L<sup>-1</sup> em ACN). As reações ocorreram por 2 h à temperatura ambiente e a 300 rpm. Foram retiradas alíquotas após 0, 1 e 2 h.

Esta reação foi repetida em escala maior, a fim de obter maior quantidade de produto. Foram feitas soluções estoques de cada substrato nos mesmos solventes e concentrações acima. Os meios reacionais foram compostos por 2,56 mL de solução de substrato (Z-Phe-Phe-OMe 2,2 mmol·L<sup>-1</sup> em ACN ou Fmoc-Phe-Phe-OMe 1,9 mmol·L<sup>-1</sup> em DMSO) e 5,98 mL da suspensão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT (3,6 g·L<sup>-1</sup>). A reação ocorreu sob agitação mecânica por 2 h. Ao final, os sobrenadantes foram removidos e à Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT foram adicionados novos 5,98 mL de tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8 e 2,56 mL de solução de substrato para nova reação (ciclo). Foram feitos quatro ciclos. Para a reação com Fmoc-Phe-Phe-OMe foi feito um ciclo adicional sem adição de substrato, pois foi observado que uma certa quantidade de material, provavelmente substrato, estava adsorvida no catalisador. Ao final, os NBCs foram lavadas com tampão fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8 (3x). O Fmoc-Phe-Phe inicialmente foi isolado seguindo o procedimento do aplicado ao Z-Ala-Phe. O isolamento dos produtos feito utilizando-se um cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> e seguindo o procedimento descrito no **item 2.3.10**. O sal foi eluído com solução 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O. Para a eluição do Fmoc-Phe-Phe foram usadas soluções 75% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, e para a eluição do Z-Phe-Phe foram usadas soluções 95% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O. As soluções eluídas foram liofilizadas e os sólidos obtidos foram pesados.

Todos os procedimentos foram monitorados por RP-HPLC. As análises foram feitas utilizando-se alíquotas de 20  $\mu$ L do meio reacional, 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O (solvente A), 95 % ACN/0,09 % TFA/H<sub>2</sub>O (solvente B), gradiente linear de 5 a 95 % de B, fluxo de

1 mL·min<sup>-1</sup> e leitura em 210 nm. O material isolado foi analisado por LC-MS para comprovar sua identidade usando as mesmas condições.

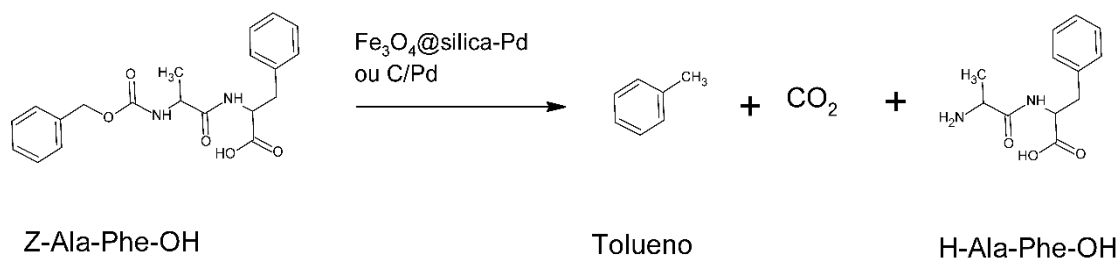
### 3.3.10 Processo geral de dessalinização com cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub>

Para dessalinizar soluções com proteínas e peptídeos foi adotado um procedimento com cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> para evitar perda de material. Inicialmente a amostra foi acidificada para pH ~1 com um ácido adequado (TFA ou ácido fórmico). Com uma seringa adequada (de 1 ou 5 mL) a amostra foi injetada manualmente com um fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. O cartucho foi lavado com 1,5 do volume injetado usando uma solução de 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O com fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. A amostra foi eluída com solução H<sub>2</sub>O/ACN/0,09% TFA ou 0,09% ácido fórmico sendo que a % de ACN dependia do material retido no cartucho. Durante o procedimento foram feitos testes com o reagente de Bradford a olho nu com o que era eluído para detectar se nele havia material proteico.

### 3.3.11 Remoção do grupo Z dos dipeptídeos protegidos por hidrogenação catalítica

#### a) Z-Ala-Phe e reuso

As reações foram feitas no laboratório da Prof. Dra. Liane M. Rossi. Foi feita uma solução 2 g·L<sup>-1</sup> de Z-Ala-Phe em 1 mL de MeOH em um balão. A esta solução, foram adicionados 2,0 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-Pd. O balão foi fechado num sistema StarFish Distribution Maniflods (Radley, UK). O sistema foi purgado três vezes com H<sub>2</sub> e deixado a 1 atm de H<sub>2</sub>, sob agitação magnética (700 rpm), por 2 h. (**Figura 37**). Foram coletadas alíquotas após 0 e 2 h para o monitoramento da reação.



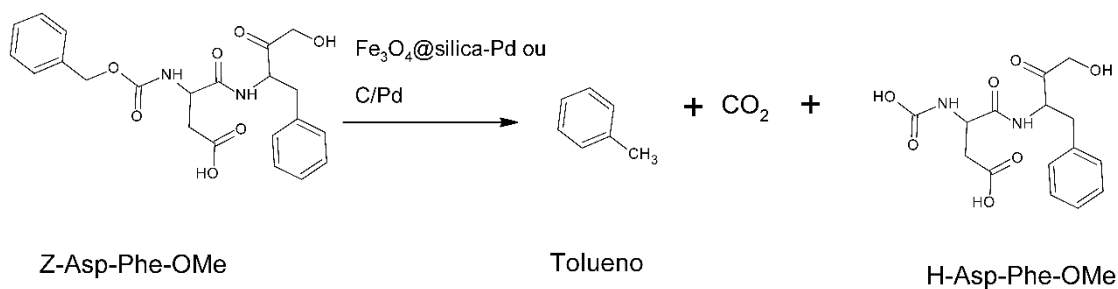
**Figura 37: Hidrogenação catalítica do Z-Ala-Phe.**

Ao final da reação o sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro e as NPs foram lavadas 2 vezes com 500  $\mu\text{L}$  de MeOH. A solução de lavagem foi adicionada ao sobrenadante da reação e as NPs foram estocadas para serem reutilizadas seguindo o mesmo procedimento. Uma alíquota do sobrenadante foi recolhida para o monitoramento da reação. O sobrenadante foi seco em um dessecador e o sólido obtido foi usado para se determinar o rendimento por gravimetria. As NPs foram usadas em quatro ciclos.

O monitoramento foi feito por RP-HPLC e LC-MS usando como solventes 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O (solvente A), 60 % ACN/0,09 % TFA/H<sub>2</sub>O (solvente B), gradiente linear de 5 a 95 % de B, fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup> e detecção em 210 nm.

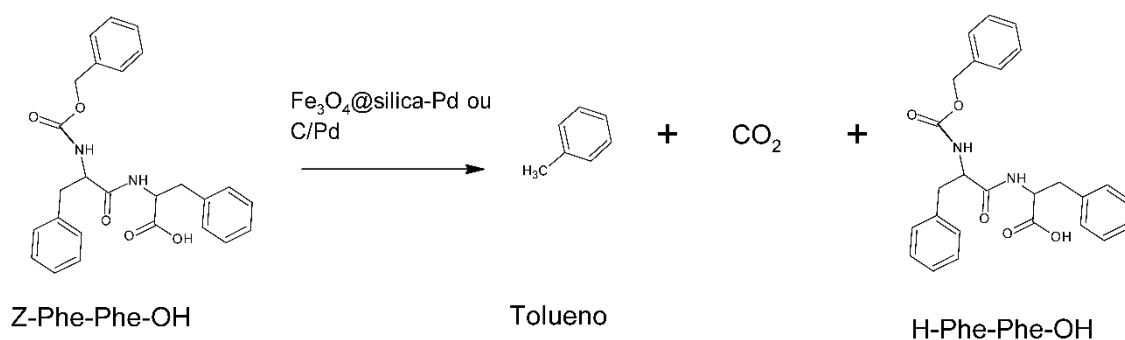
### **b) Z-Asp-Phe-OMe e Z-Phe-Phe**

Foi feita uma solução 10 g·L<sup>-1</sup> de Z-Asp-Phe-OMe em 1 mL de MeOH em um balão. A esta solução, foram adicionados 2,5 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-Pd. O balão foi fechado pelo mesmo sistema do **item 2.2.16**. O sistema foi purgado três vezes com H<sub>2</sub> e deixado a 1 atm de H<sub>2</sub>, sob agitação magnética (700 rpm), por 2 h (**Figura 38**). Foram coletadas alíquotas após 0 e 2 h para o monitoramento da reação.



**Figura 38: Hidrogenação catalítica do Z-Asp-Phe-OMe.**

Para o Z-Phe-Phe foi feita uma solução  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Z-Phe-Phe em 2 mL de MeOH em um balão. O maior volume foi devido à menor solubilidade dele no meio. A está solução foram adicionados 2,5 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-Pd}$ . O balão foi fechado pelo mesmo sistema descrito no **item 2.2.16**. O sistema foi purgado três vezes com  $\text{H}_2$  e deixado a 1 atm de  $\text{H}_2$ , sob agitação magnética (700 rpm), por 2 h (**Figura 39**). Foram coletadas alíquotas após 0 e 2 h para o monitoramento da reação.



**Figura 39: Hidrogenação catalítica de Z-Phe-Phe.**

Ao final das reações os sobrenadantes foram transferidos para fracos de vidro e as NPs foram lavadas 2 vezes com  $500 \mu\text{L}$  de MeOH. As soluções de lavagens foram adicionadas aos sobrenadantes das reações. Alíquotas dos sobrenadantes foram recolhidas para o monitoramento das reações. Os sobrenadantes foram secos em dessecador e os sólidos obtidos foram usados para determinar os rendimentos por gravimetria.

Estas reações foram monitoradas por RP-HPLC e LC-MS, e foram usados os solventes 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O (solvente A), 60 % ACN/0,09 % TFA/H<sub>2</sub>O (solvente B) para o Z-Asp-Phe-OMe e 95 % ACN/0,09 % TFA/H<sub>2</sub>O (solvente B) para o Z-Phe-Phe, gradiente linear de 5 a 95 % de B, fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup> e detecção em 210 nm.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Imobilização, caracterização e aplicações da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

#### 4.1.1 Imobilização da TLN e conteúdo proteico da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

O processo de imobilização da TLN nas NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-NH<sub>2</sub> foi realizado com sucesso empregando o método estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa para a endopeptidase  $\alpha$ -QT em estudo anterior já publicado (LIRIA et al., 2014). Inicialmente, o monitoramento da reação de ligação da enzima ao suporte sólido foi feito pela determinação do conteúdo proteico do meio reacional ao longo do tempo usando o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método foi escolhido pela sua simplicidade, rapidez e por ser amplamente utilizado para dosagem de proteínas (GOLDRING, 2019). Usando a curva padrão (**Figura 40**) para comparar os resultados para os meios reacionais do controle e da imobilização (**Figura 41**) nota-se um decréscimo de cerca de 20% de conteúdo proteico após 2-4 h sugerindo que ocorre autólise da TLN livre (**Figura 41A**). Já o conteúdo proteico do meio reacional da imobilização (**Figura 41B**) variou muito mais (54% após 2 h e 75% após 6 h) sugerindo que, além da autólise (20%), houve entre 34 e 55% de imobilização.

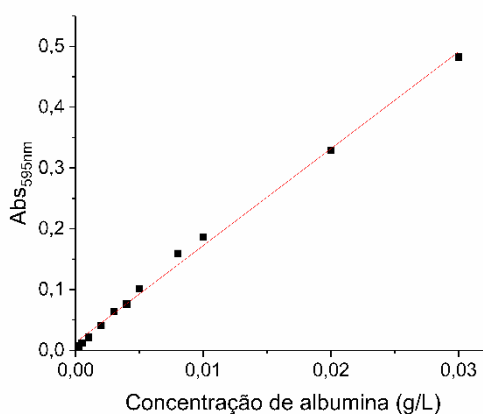


Figura 40: Curva padrão de albumina;  $y=1,59 \cdot 10^{-1}x + 1,31 \cdot 10^{-2}$  e  $R^2=0,996$ .

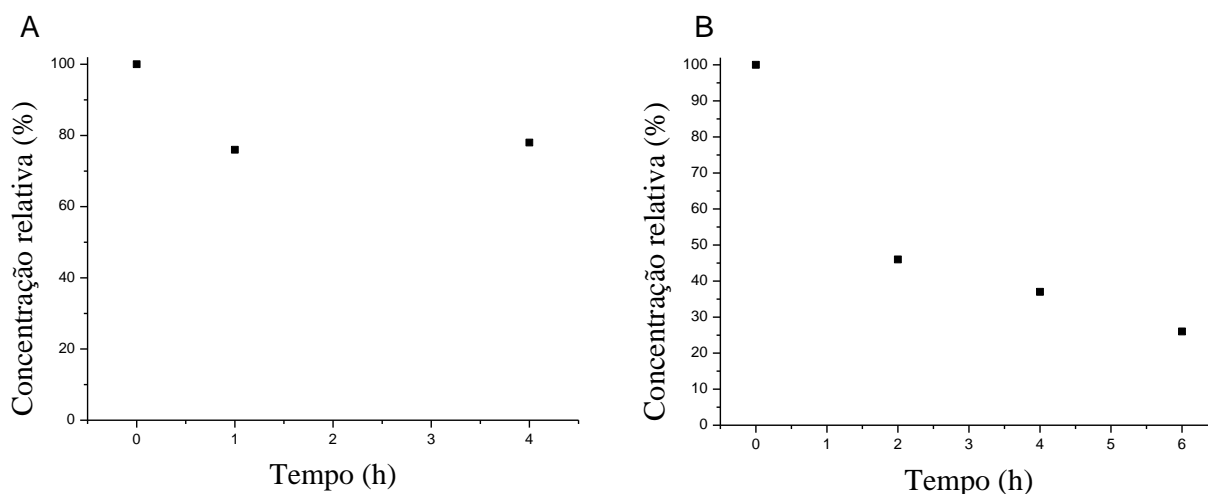


Figura 41: Concentração relativa em função do tempo da solução de: (A) TLN livre incubada por 4h a 37°C e 300 rpm; (B) imobilização da TLN nas NPs de  $Fe_3O_4@silica$  em vários tempos de reação. Condição reacional: 15 min a 37 °C.

Considerando que dos 20 mg de TLN sólida para imobilização a quantidade efetiva inicial de TLN na solução de imobilização foi 9,6 mg, calculada pela curva padrão de BSA, as quantidades de enzima imobilizada para cada tempo reacional são mostradas na **Tabela 9**.

Tabela 9: Conteúdo proteico na  $Fe_3O_4@silica$ -TLN determinado pelo método de Bradford.

Tempo de imobilização (h)	Conteúdo proteico da $Fe_3O_4@silica$ -TLN ( $\mu g$ de TLN·mg de $Fe_3O_4@silica$ )
2	66,5
4	79,5
6	104,5

O método de Bradford é confiável e frequentemente utilizado para determinar a quantidade de enzima imobilizada em suporte sólido (FAURÉ; HALLING; WIMPERIS, 2014; POORAKBAR et al., 2018), que corresponde à relação  $\frac{\text{enzima total inicial-final}}{\text{massa do suporte}}$ , considerando que apenas o processo de imobilização consome enzima do meio. Porém, no caso de proteases ocorre o processo de autólise, o que acaba contribuindo para a “remoção” de enzima íntegra do meio reacional e interferindo na determinação do conteúdo proteico. No caso da TLN, a autólise gera tanto fragmentos proteicos que são e que não são identificados pelo método de Bradford (<5000 Da), já que a sua autólise é seletiva (KRUGER, 1994) e pode levar a erros na medida de proteína total final (LIRIA et al. 2014).

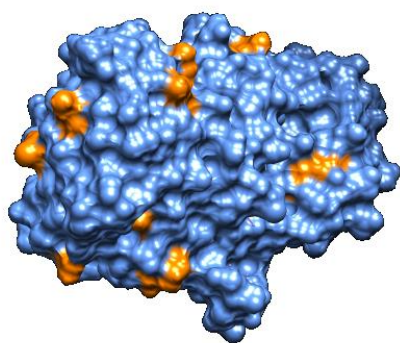
Para evitar este erro de interpretação devido a essa interferência foi feita a hidrólise ácida total da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN seguida pela análise de aminoácidos do hidrolisado, cujos resultados são apresentados na **Tabela 10**. Esta estratégia permite que seja medido apenas o que de fato foi ligado à NP, permitindo um resultado livre da interferência da autólise que ocorre durante a imobilização (BELYAEVA et al., 2008; FILIPPOVA et al., 2001). De fato, ao comparar os resultados da análise com os obtidos pelo método de Bradford (**Tabela 9**) é possível observar uma grande diferença que pode ser atribuída à ocorrência de autólise. Portanto, foi assumido que o valor mais próximo do real foi o obtido pela hidrólise total seguida por análise de aminoácidos, por ser mais direta e sofrer menos interferência da autólise.

**Tabela 10: Conteúdo proteico presente na Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN determinado por hidrólise total seguida por análise de aminoácidos do hidrolisado.**

Tempo de imobilização (h)	Conteúdo proteico da Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica - TLN (µg de TLN·mg <sup>-1</sup> de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica)
2	34
4	36
6	37

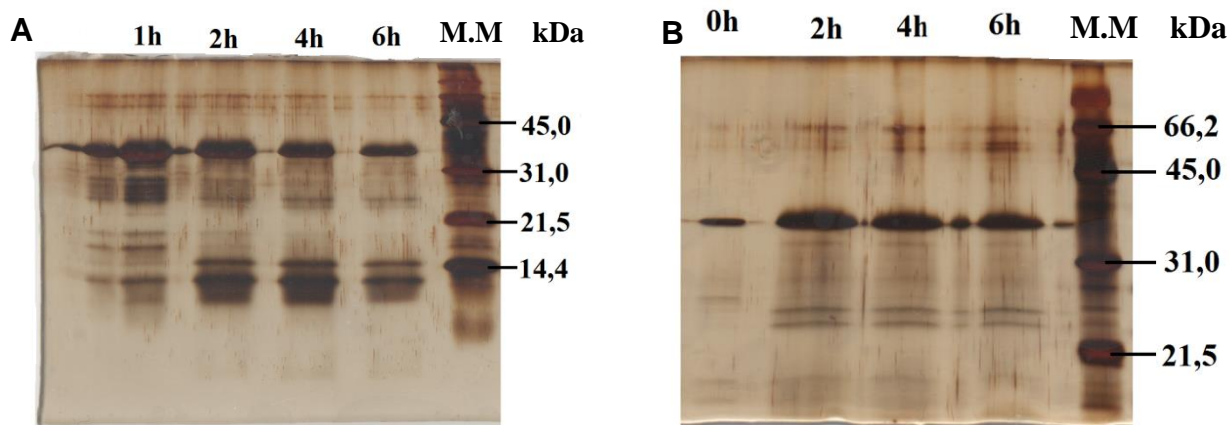


A quantidade de TLN por mg de suporte obtida foi maior do que a encontrada na literatura para a imobilização em “PVA cryogel”,  $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  (BELYAEVA et al., 2008) e  $10,6 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  (FILIPPOVA et al., 2001), e similar à obtida por Xin e col. (2010) para a imobilização da TLN em suportes superparamagnético de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  utilizando ligação direta ou tiofeno como ligante. Nessas condições, os autores obtiveram uma média de 2,1 % de massa de TLN/massa de NBC. Isso indica o já discutido acima, pelo suporte magnético apresentar uma maior relação superfície/volume eles apresentam uma maior massa de enzima/massa de suporte. O método aqui empregado se assemelha com o usado nos trabalhos acima citados, que consiste na funcionalização do suporte com aldeído, que por sua vez reage com os grupos amina das cadeias laterais dos resíduos de lisina ( $-(\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2$ ) formando ligações covalentes do tipo bases de Schiff (**Figura 42**).



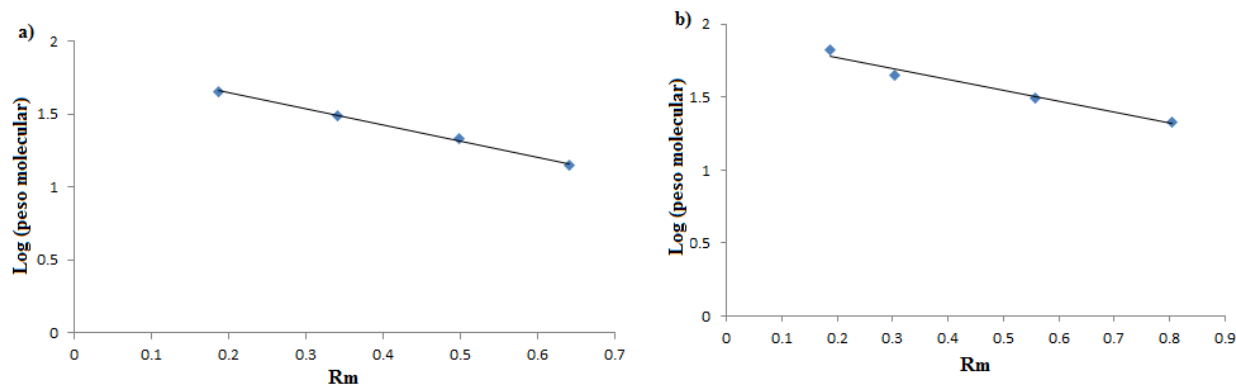
**Figura 42:** Modelo 3D da superfície da TLN com destaque nos resíduos de lisina com aminas primárias reativas em laranja. Imagem gerada pelo programa UCFS Chimera com base no arquivo PDB com ID 4OW3.

Para investigar melhor o efeito causado pela autólise na TLN, foi feito um monitoramento da reação de imobilização por SDS-PAGE do meio reacional de duas imobilizações. A **Figura 43A** mostra o perfil eletroforético do monitoramento da autólise da TLN até 6 h. A **Figura 43B** mostra um outro monitoramento de autólise da TLN.



**Figura 43:** Perfil eletroforético da solução de imobilização da TLN. (A) Monitoramento da 1ª imobilização; (B) Monitoramento da 2ª imobilização. Condições: Gel de empilhamento: 5%; Gel de separação: 17%; Volume aplicado aplicada: 20  $\mu$ L. Condições da eletroforese: 110 V por 10 min e 130 V x 60 min. Coloração feita com prata.

Os valores de massa molecular dos componentes observados foram obtidos usando-se a curva log PM versus migração relativa,  $R_m$ , (**Figura 44**) mostrada abaixo, construída a partir das migrações relativas e massas molares de proteínas conhecidas presentes nos padrões de massa molecular.



**Figura 44:** Gráficos de Log (PM) x  $R_m$  dos dois géis de SDS-PAGE. a) 1ª Imobilização,  $y = -1,1007x + 1,8661$ ,  $r^2=0,997$ ; 2ª Imobilização,  $y = -0,7548x + 1,9245$ ,  $r^2=0,9729$ .

No primeiro gel (**Figura 44A**), há uma banda que aparece em todos os tempos e corresponde a uma proteína de massa 36,7 kD, provavelmente referente à TLN descrita na literatura como tendo massa molecular de 34,6kD (FONTANA et al., 1986). Nos tempos 1-6 h foram observados fragmentos resultantes de autólise, sendo que, até 1 h de reação, os fragmentos com massa molecular entre 25-36 kDa

apresentaram-se majoritários em relação aos de massas entre 12,9–15,1 kDa, enquanto que o oposto foi observado após 2 h de reação em diante. No segundo gel (**Figura 44B**), a TLN aparece com massa molecular próxima de 39 kDa, o que demonstra um problema técnico, pois também não foi possível observar a banda referente a 14,4 kD do marcador de massa molecular. Da mesma forma que no gel anterior, nos tempos 2, 4 e 6 h foram observadas bandas correspondentes a fragmentos de massas 25-39 kDa, confirmando a ocorrência de autólise da TLN.

Esses resultados condizem com o trabalho de Fontana e col. (1986), que atribuiu a autólise seletiva da TLN à sua rigidez estrutural, e que tal rigidez depende do meio no qual a TLN está. Os fragmentos observados em 14,9 e 12,7 kDa correspondem, provavelmente, aos fragmentos com massa de 13,4 e 11,8 kDa relatados no trabalho citado, que adicionou cátion  $\text{Ca}^{2+}$  e EDTA no meio de autólise.

O monitoramento da imobilização também foi feito por TGA e análise elementar de CHN de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-glutaraldéido e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. A **Tabela 11** apresenta os resultados que mostram um acréscimo na quantidade de CHN e na massa do material, o que confirma a ocorrência de imobilização.

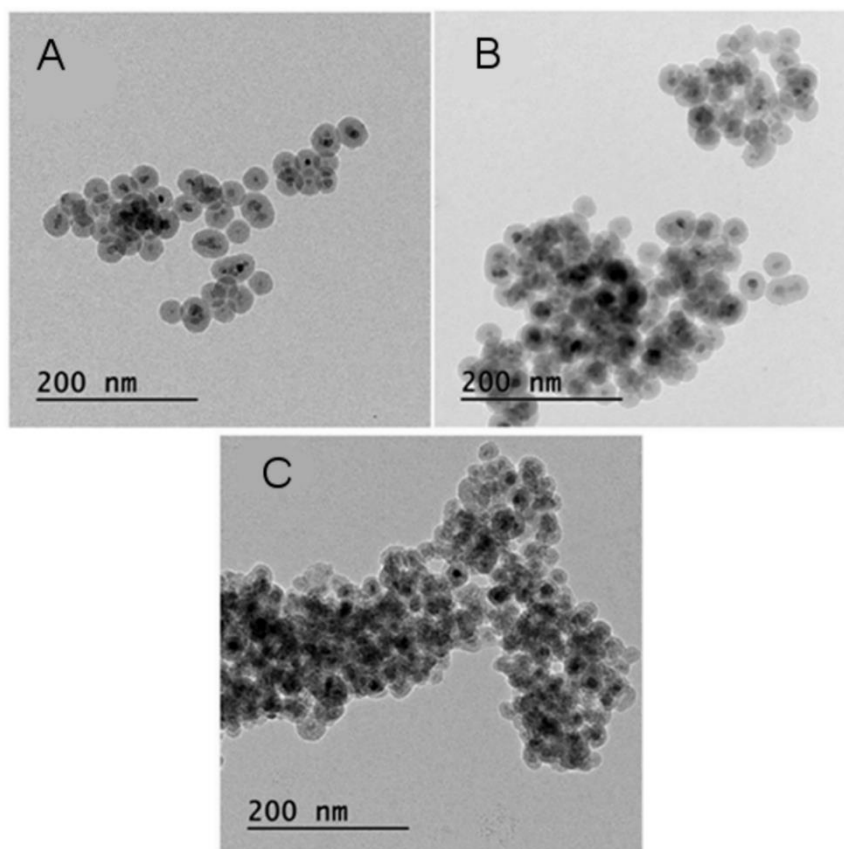
**Tabela 11. Composição elementar d a NP de partida, ativada eda $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN obtida.**

Nanomaterial	Análise elementar			TGA (% perda de massa)
	% C	% H	% N	
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\text{NH}_2$	3,54	1,53	0,87	10
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-NH- $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$	6,94	1,64	0,59	15
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN	8,97	1,90	1,23	20

#### 4.1.2 Caracterização físico-química da $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN

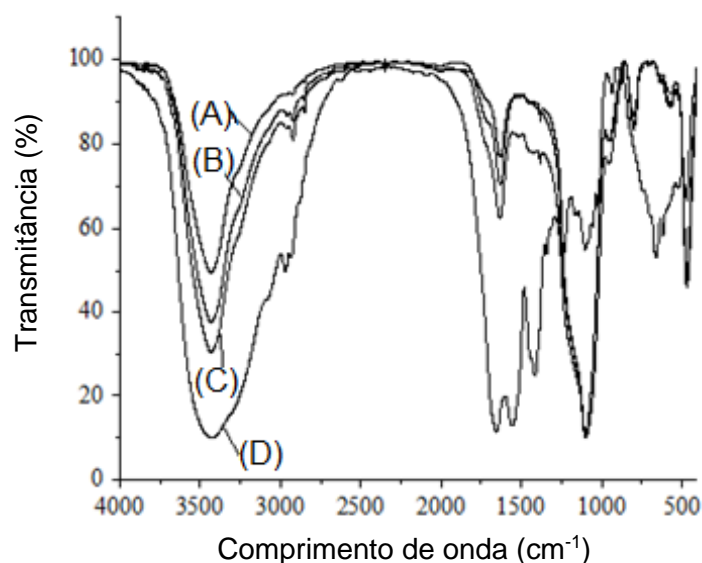
As características morfológicas de um nanomaterial são fundamentais para os NBCs. Portanto, foram obtidas imagens de TEM para observar sua morfologia e verificar se a imobilização e a estocagem são capazes de modificá-la. A **Figura 45**

apresenta as imagens obtidas pela TEM da NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-glutaraldaldeído (**Figura 45A**), da NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN logo após a imobilização (**Figura 45B**), e desta última 15 meses após a imobilização (**Figura 45C**). Pela imagem pode-se perceber que não ocorreram alterações na morfologia das NPs após a imobilização. Além disso, o diâmetro médio das NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-glutaraldaldeído foi de  $33 \pm 2$  nm, e das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN foi  $33 \pm 2$  nm, o que indica que não houve mudança expressiva no tamanho da NP. Após 15 meses em solução, as NPs mostraram um pouco de agregação ligada à interação entre as enzimas imobilizadas. Esse resultado condiz com o que foi encontrado para imobilização da  $\alpha$ -QT feita e caracterizada anteriormente pelo nosso grupo no mesmo material (LIRIA et al., 2014), e com o resultado obtido para a TLN imobilizada em uma nanopartícula magnética comercial (XIN; SI; XING, 2010).



**Figura 45:** Análise morfológica por TEM da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-glutaraldaldeído (A),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN estocada a  $5^\circ\text{C}$  por 5 dias depois da imobilização (B),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN estocada a  $5^\circ\text{C}$  por 15 meses (C).

A fim de se observar as mudanças estruturais dos nanomateriais ao longo do processo de imobilização referentes aos grupos funcionais, foram obtidos espectros de FT-IR da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica, da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-glutaraldéido, da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN e da TLN livre. A **Figura 46** mostra a sobreposição dos espectros obtidos. Na região entre  $3000$  e  $2700\text{ cm}^{-1}$ , foram observados incrementos de bandas que podem ser atribuídos à absorção de estiramento C-H de grupos alquila. Também foi observado um incremento de absorção na região entre  $3500$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  (região do estiramento O-H), e um incremento na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$ , que pode indicar dobramento de N-H referente aos grupos amins presentes na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-glutaraldéido e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. Essas variações indicam a presença do glutaraldéido e da TLN imobilizada no material analisado, comprovando a imobilização. Porém, não foi possível obter qualquer outra informação estrutural. A banda em  $1100\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento simétrico do Si-O-Si, e a banda em  $800\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao dobramento do Si-O-Si. Estas bandas são características da NP revestida por ácido oleico (GUO et al., 2008; PREMARATNE et al., 2014).

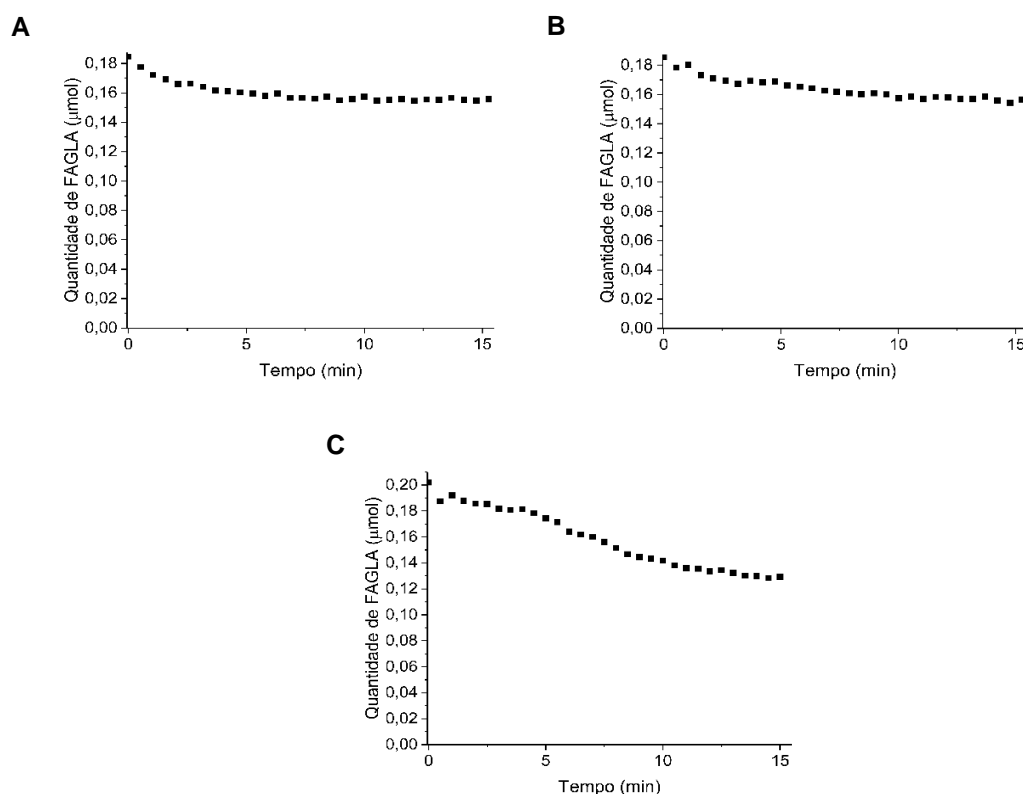


**Figura 46:** Espectro de infravermelho da: (A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica; (B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Glutaraldéido; (C)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN e (D) TLN livre.

#### 4.1.3 Atividade catalítica específica e reuso da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

A atividade peptidásica da TLN foi determinada a partir da hidrólise de FAGLA, um dos substratos mais usados para tal finalidade (FEDER; SCHUCK, 1970b).

A atividade da TLN livre recém dissolvida em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup> foi determinada utilizando três concentrações diferentes de TLN livre: 3,1·10<sup>-7</sup>; 1,9·10<sup>-7</sup> e 1,0·10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>. A **Figura 47** mostra a variação de absorbância em 345 nm do FAGLA, indicando que foram consumidos aproximadamente 13 % antes da reação alcançar o equilíbrio. As atividades específicas foram: 4,8; 4,9 e 5,0 U·mg<sup>-1</sup>.



**Figura 47:** Consumo de FAGLA na presença de TLN. (A) 3,1·10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>.; (B) 1,9·10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>.; (C) 1,0·10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>.

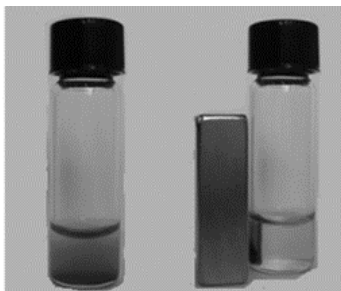
As atividades específicas para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN das três imobilizações da TLN citadas anteriormente (**Tabela 10, item 4.1.1**) estão apresentadas na **Tabela 12**. Como os valores obtidos foram muito próximos o tempo de imobilização escolhido como padrão foi de 2 h.

Tabela 12: Atividades específicas das três imobilizações da TLN.

Tempo de imobilização (h)	Atividade específica (U·mg <sup>-1</sup> )
2	3,5 ± 0,1
4	3,8 ± 0,1
6	3,1 ± 0,3

A atividade específica foi determinada para Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN de diversas imobilizações, sendo que a atividade específica média foi de 2.9 ± 0.3 U·mg<sup>-1</sup>. O mesmo foi feito com a TLN livre, obtendo-se uma atividade específica média de 4.7 ± 0.3 U·mg<sup>-1</sup>. A diferença entre os dois resultados já era esperada, uma vez que enzimas imobilizadas covalentemente tendem a ser menos ativas, o que pode ser atribuído i) ao fato de que o transporte de massa fica prejudicado, uma vez que a catálise foi heterogênea, ii) às mudanças na estrutura tridimensional (estrutura terciária), já que a enzima foi ancorada a um suporte rígido, diminuindo sua liberdade estrutural, iii) e ao efeito estérico proveniente da presença do suporte, que pode estar perto do sítio ativo ou dificultar a interação do substrato com o ele (BRADY; JORDAAN, 2009). Os resultados obtidos são significativamente melhores que os obtidos por Shinkai e col. (1991), que descreveram a imobilização da TLN em nanopartículas superparamagnéticas sem revestimento e ativadas apenas com APTES, sem glutardialdeído. Após a imobilização, a TLN apresentou uma queda de sua atividade inicial (mais de 90 %), atribuída ao impedimento estérico causado pelo suporte. O trabalho de Hoshino e col. (1997) também discute a imobilização da TLN por ligação covalente em um suporte de copolímeros de glicidil metacrilato, *N*-isopropil acrilamida e metacrilamida, e os resultados por eles obtidos mostraram que dependendo da temperatura e do copolímero utilizado a queda na atividade foi de 9 a 55%. Já em nosso trabalho de 2014, usamos o mesmo suporte (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica) e também apresentou uma queda de aproximadamente 55% da atividade inicial da α-QT após a imobilização, o que não é distante do obtido para a TLN (LIRIA et al., 2014).

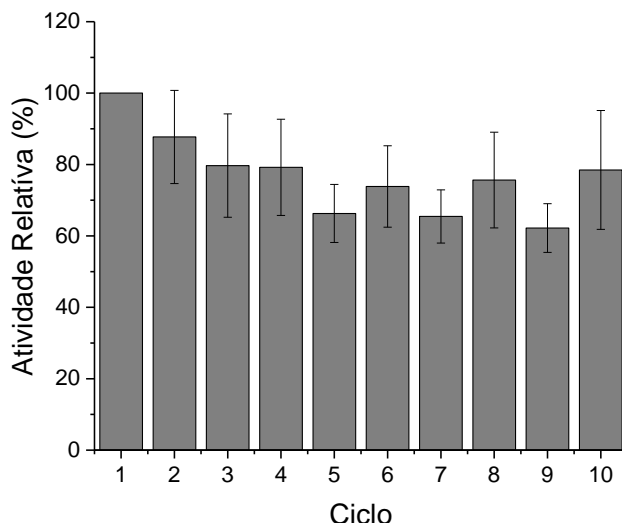
Uma grande vantagem de se utilizar enzimas imobilizadas é a sua recuperação para posterior reuso. A **Figura 48** apresenta a separação magnética que a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica proporciona como suporte para a TLN.



**Figura 48:** Separação magnética da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN a partir do meio reacional.

A atividade peptidásica da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN foi usada para determinar sua estabilidade frente ao reuso. A **Figura 49** mostra a eficiência no reuso da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN durante 10 ciclos. Foi possível perceber que a atividade relativa ficou entre 85 e 65%. A perda de atividade pode ter ocorrido por perda de NBC entre os ciclos, uma vez que a escala de trabalho é pequena e qualquer perda de material implica numa grande variação na atividade. Esses resultados são parecidos com os encontrados por Xin e col. (2010) para uma TLN imobilizada em NPs de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  comercial e com diferentes "linkers". O trabalho utiliza a síntese do Z-Asp-Phe-OMe como substrato para determinar a atividade. O melhor resultado apresentado foi com a  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  utilizando um linker de tiofeno, que mantém o rendimento da reação sem grandes alterações por cinco ciclos. Já quando foi usada a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com o linker de tiofeno, a queda no rendimento foi gradual durante os cinco ciclos, que forneceram resultados parecidos como os obtidos para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN.





**Figura 49: Monitoramento da atividade amidásica da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN durante seu reuso**  
 Condição reacional: 15 min a 37 °C.

#### 4.1.4 Parâmetros cinéticos da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN frente ao FAGLA

Os parâmetros cinéticos também foram estudados utilizando o FAGLA, dada sua importância para mostrar a eficiência catalítica da enzima (VOET; VOET, 2010). Ao utilizar esse substrato pouco solúvel no meio reacional foi necessário fazer uma aproximação da lei de velocidade da catálise (**Equação 1.1**).

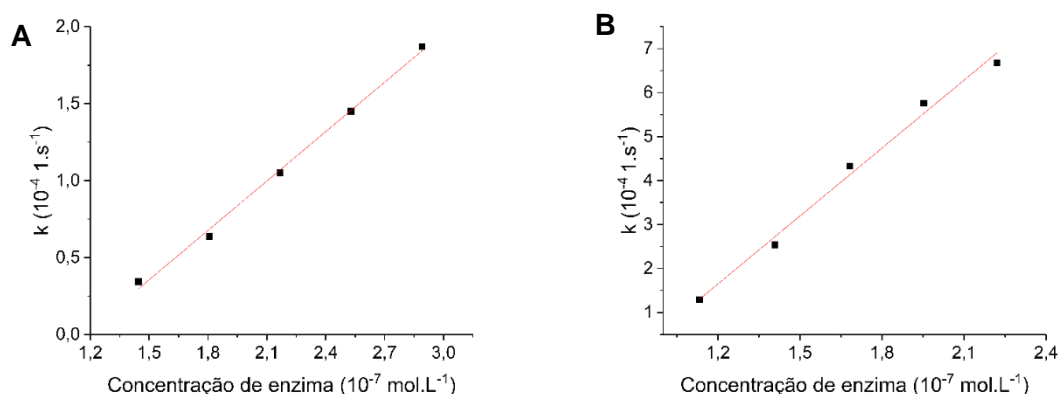
$$v_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad 1.1$$

Se a concentração de substrato ([S]) for muito menor que o K<sub>M</sub> (constante de Michaelis-Menten), podemos assumir que a concentração do complexo enzima/substrato ([ES]) seja baixa e que a concentração total de enzima livre ([E]<sub>T</sub>) é praticamente igual à quantidade de enzima utilizada ([E]). Considerando que, para a equação de Michaelis-Menten, k<sub>2</sub>=k<sub>cat</sub>, é possível chegar na **Equação 1.2**, que pode, por sua vez, ser convertida na **Equação 1.3**, uma reação de pseudo-primeira ordem que permite que seja calculado o k<sub>cat</sub>.K<sub>M</sub><sup>-1</sup> a partir da relação de k com [E] (FEDER; SCHUCK, 1970a).

$$v_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} ([E][S]) \quad 1.2$$

$$v_0 = k[S]; k = \frac{k_{cat}}{K_M} [E] \quad 1.3$$

Os gráficos de  $k \times [E]$  obtidos para a TLN livre e para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN são apresentados na **Figura 50**. O  $k_{cat} \cdot K_M^{-1}$  é um parâmetro cinético que mostra a eficiência do processo catalítico da enzima (VOET; VOET, 2010). Este parâmetro leva em consideração a velocidade de conversão do substrato ao produto ( $k_{cat}$ ) e a afinidade da enzima pelo substrato ( $K_M$ ). O  $k_{cat} \cdot K_M^{-1}$  calculado para a catálise da hidrólise do FAGLA com TLN livre foi de  $10,7 (\pm 0,4) \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , e com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN foi de  $5,1 (\pm 0,3) \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . O valor obtido para a TLN livre condiz com o encontrado em outros trabalhos (FEDER; BROUGHAM; WILDI, 1974; FEDER; SCHUCK, 1970a; KHAN; DARNALL, 1978). A queda dos parâmetros cinéticos condiz com o que foi encontrado para a atividade peptidásica específica média, e está relacionada aos mesmos motivos apresentados no **item 4.1.2**. Esse fenômeno já era esperado de acordo com dados da literatura (MERYAM SARDAR, 2015), e foi observado para o mesmo suporte, mas com a  $\alpha$ -QT (LIRIA et al., 2014).



**Figura 50: Constante de velocidade contra concentração de enzima. (A) TLN livre  $Y=1,070X - 1,249$ ,  $R^2=0,99$ ; (B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN  $Y = 5,148X - 4,526$ ,  $R^2 = 0,99$**

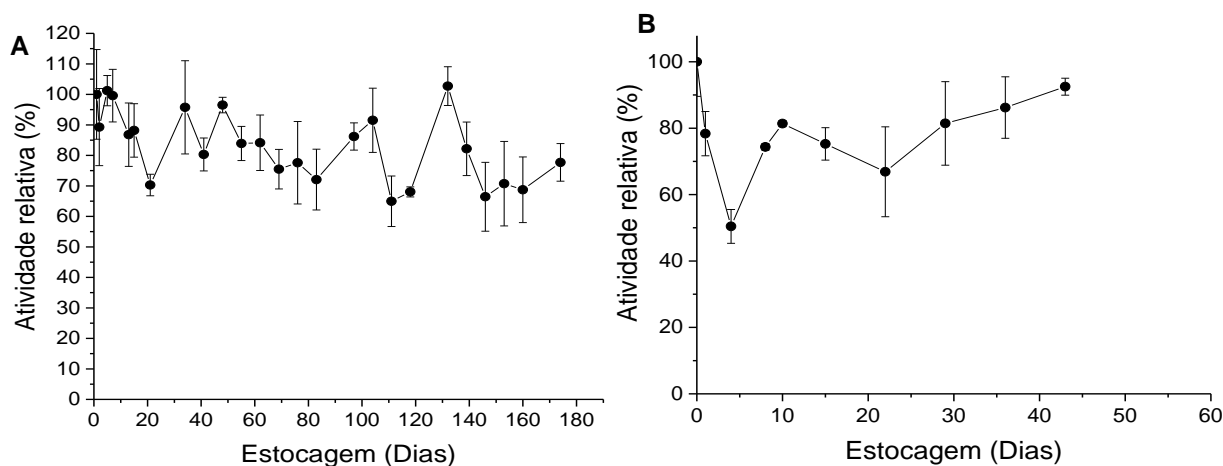
#### 4.1.5 Estabilidade química da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN.

Foi determinada a estabilidade química da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN quando exposta a diferentes solventes orgânicos, uma vez que podem afetar a atividade de enzimas (KLIBANOV, 1997) e sendo comum o seu uso em síntese enzimática de peptídeos (BASTIDA et al., 2018; NAGAYASU et al., 1994; TRUSEK-HOLOWNIA, 2003a), a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN poderia ser exposta a tais ao longo deste estudo. A **Tabela 13** apresenta a relação de solventes utilizados e a retenção de atividade enzimática relativa. Para todos os solventes foi mantida uma atividade acima de 50%, sendo que o metanol pareceu influenciar mais, provavelmente por ter um efeito inibitório na TLN (MUTA; INOUYE, 2002).

**Tabela 13: Atividade relativa da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN após ser exposta a diferentes solventes orgânicos.**

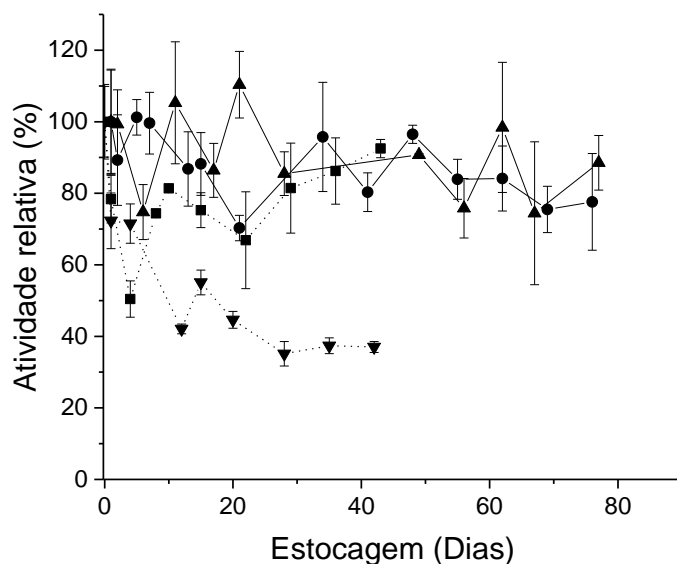
Solvente	Atividade relativa à inicial (%)
Acetato de Etila	90 ± 10
ACN	75 ± 6
DMSO	81 ± 5
Metanol	55 ± 10

A estabilidade química em solução é importante porque indica como e por quanto tempo a enzima imobilizada pode ser estocada. Foram estudadas três condições para teste de estabilidade da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN: liofilizada, em suspensão em tampão Tris.HCl (40 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,4) a 4 °C e em temperatura ambiente. Para a enzima liofilizada houve uma queda de 80 (±1) % em relação à atividade antes de liofilizada. Supõe-se que isso ocorreu pela perda irreversível de água da enzima e, conseqüentemente, sua desnaturação (HANAFUSA, 1972). Já a estocagem em solução foi feita por 174 dias a 5 °C (**Figura 51A**) e por 55 dias à temperatura ambiente (**Figura 51B**).



**Figura 51:** Atividade relativa da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN em função do tempo de estocagem em solução. (A) 5 °C por 174 dias (~6 meses); (B) temperatura ambiente por 55 dias (~2 meses) Condição reacional: 15 min a 37 °C.

A TLN livre também foi estocada em tampão Tris.HCl 40 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,4 por 77 dias a 5 °C e por 42 dias à temperatura ambiente. Os resultados obtidos com a TLN livre e a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN estão resumidos na **Figura 52**.



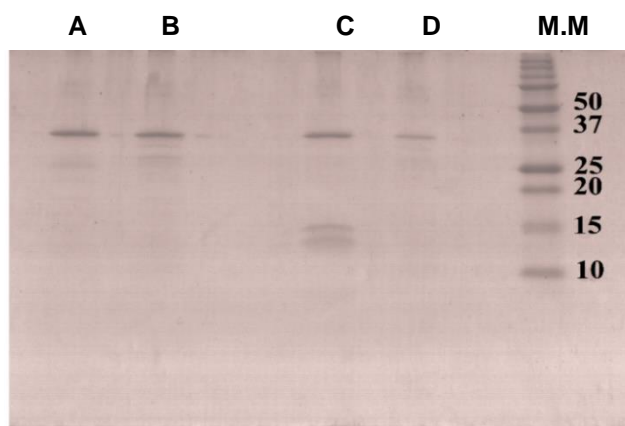
**Figura 52:** Atividade relativa em função do tempo de estocagem em solução a 5 °C e temperatura ambiente. (●) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN a 5 °C; (▲) TLN livre a 5 °C; (■) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN a temperatura ambiente; (▼) TLN livre a temperatura ambiente. Condição reacional: 15 min a 37 °C.

Apesar da grande variação na porcentagem da atividade relativa, é possível perceber que tanto a TLN livre quanto a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN estocada a 5 °C

mantiveram uma atividade média em torno de 90%. Já a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN estocada a temperatura ambiente manteve uma atividade média próxima de 80% da inicial, e a TLN livre estocada nas mesmas condições foi perdendo atividade gradualmente até se estabilizar em 30%. Era esperado que a TLN livre estocada a 5 °C retivesse atividade, já que, como abordado anteriormente, apresenta uma estabilidade relativa considerável frente a autólise em meios com cátions  $\text{Ca}^{+2}$  (FONTANA et al., 1986). Já à temperatura ambiente a TLN livre perdeu muito mais atividade durante a estocagem do que a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN, mostrando uma clara vantagem desta última. Foi observada a agregação dos NBCs durante a estocagem, mas ela é desfeita com a agitação e não afeta a atividade enzimática.

Também foi avaliada a perda de enzima durante a estocagem. Na **Figura 53** é exibido o perfil eletroforético do monitoramento da TLN em solução: (**53A**) a TLN livre logo após solubilizada e (**53C**) o meio da imobilização no tempo 2 h, pois eles representam, respectivamente, a TLN intacta e autolisada. Para se determinar as massas molares dos componentes proteicos presentes no gel, foi feita uma curva de log (massa molecular) versus  $r_m$  do padrão de massa molecular utilizado. A TLN apresenta uma massa de 34,6 kD, e é possível observar que em todos os casos há um componente majoritário com massa de 36,7 kD, indicando sua presença. Em (**53B**) não é possível ver os fragmentos proteicos que estão presentes em (**53C**), o que mostra que, mesmo após 14 dias em solução a 4 °C, a TLN livre não sofreu autólise significativa. Em (**53D**) pode-se detectar que houve perda de enzima da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN para o meio de estocagem após 72 dias, porém também sem apresentar autólise significativa. Essa perda para o meio pode ser a razão da queda gradual da atividade após um grande período de estocagem. A maior estabilidade da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN quando estocada a temperatura ambiente provavelmente ocorreu

por estar ligada covalentemente ao suporte. Esse tipo de imobilização tende a deixar a estrutura tridimensional mais rígida, aumentando sua resistência à desnaturação, além de dificultar o processo de autólise por dificultar a interação entre enzimas (OSBON; KUMAR, 2020).



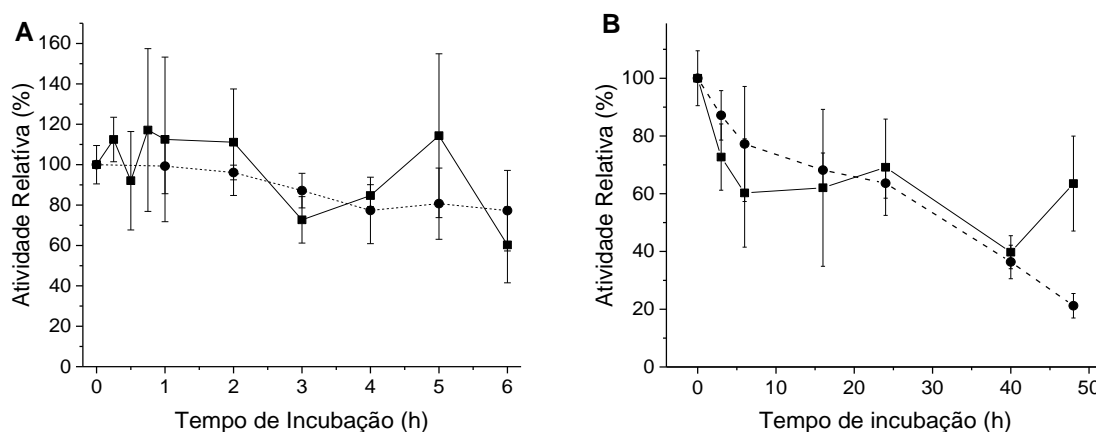
**Figura 53:** Perfil eletroforético onde cada coluna representa as seguintes condições: (A) TLN livre; (B) Meio de estocagem da enzima livre (tampão Tris.HCl com  $\text{Ca}^{+2}$  pH 7,5) após 14 dias; (C) Meio de imobilização a 2 h; (D) Meio de estocagem (tampão Tris.HCl com  $\text{Ca}^{+2}$  pH 7,5) da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN após 72 dias. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 18%; Volume aplicado: 20  $\mu\text{L}$ . Condições da eletroforese: 120V x 70 min. Coloração feita com corante Azul de Coomassie.

#### 4.1.6 Estabilidade térmica da $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN

A estabilidade térmica da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN é uma característica importante para ser estudada, pois o NBC será utilizado em reações de formação da ligação peptídica a 50 °C. A TLN livre e a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN foram incubadas a 60 °C para verificar se manteriam suas atividades depois da incubação.

A **Figura 54** apresenta dois gráficos de tempo de incubação versus atividade relativa. A **Figura 54A** apresenta o monitoramento dos tempos iniciais da incubação (0 a 6 h). É possível observar que ambos os catalisadores mantiveram sua atividade relativa inicial nas primeiras horas de incubação. A estabilidade apresentada pela TLN livre era esperada, já que é uma enzima termoestável em meios que contém  $\text{Ca}^{2+}$  (DAHLQUIST; LONG; BIGBEE, 1976). Porém, essa propriedade não se manteve quando a incubação foi feita por até 48 h (**Figura 54B**), o que corrobora com resultados presentes na literatura (CHEN et al., 2012). Já a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN

manteve 72% de sua atividade inicial ao fim da incubação a 60 °C por 48 h. Isso provavelmente ocorre porque a TLN está ligada covalentemente às NPs. Essas ligações funcionam como âncoras para a estrutura terciária, aumentando assim sua estabilidade térmica. A TLN imobilizada covalentemente em diferentes polímeros também apresenta uma maior estabilidade térmica. O trabalho de Epton e col. (1973) relatou a imobilização por ligação covalente em poliacrilamida, e também que o biocatalisador obtido reteve em entorno de 45% de sua atividade inicial após ser incubado a 80 °C, enquanto a enzima livre já havia sido inativada após 16 h de incubação.

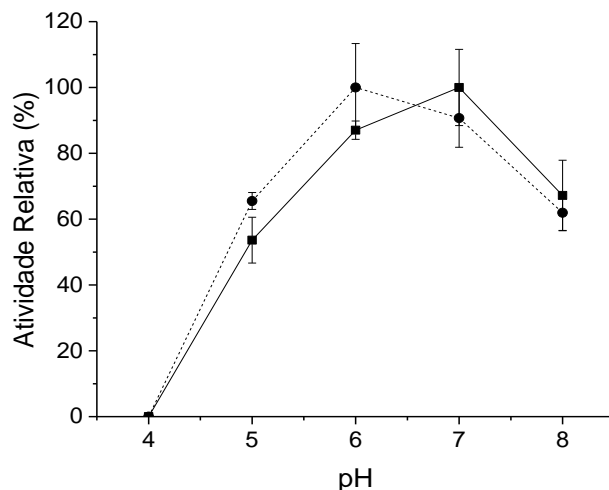


**Figura 54:** Atividade relativa em função do tempo de incubação a 60 °C das (●) TLN livre e (■) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. (A) primeiras horas de incubação; (B) 48 h de incubação. Condição reacional: 15 min a 37 °C.

#### 4.1.7 pH ótimo da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

Outra característica que a imobilização pode afetar é o pH ótimo de ação. Por isso, foram medidas a atividades da TLN livre e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN em quatro valores de pH (**Figura 55**).

Estes resultados indicaram que houve uma pequena mudança no pH ótimo de ação da TLN de 6 para 7 depois da imobilização. Isso pode ter ocorrido por: i) uma pequena alteração da estrutura 3D da enzima após a formação de ligação covalente



**Figura 55: Atividade relativa em função do tempo de incubação a 60 °C das (●) TLN livre e (■) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@silica-TLN. Condição reacional: 15 min a 37 °C.**

com a NP, o que acarretou em alteração de alguns pK de grupos ionizáveis das cadeias laterais dos aminoácidos; ii) a diminuição de número de cadeias laterais livres das lisinas contidas na TLN que reagiram com a NP ativada; iii) o microambiente causado pela presença do suporte, pois pode afetar o sítio catalítico da enzima; iv) o suporte poder apresentar aminas livres que não reagiram com o glutaraldeído e que poderiam ser protonadas nas condições reacionais; de fato, quando a superfície está positivamente carregada há a repulsão de prótons, o que faz o valor do pH ser mais alto, já que essa repulsão facilita a liberação do próton presente no sítio catalítico; já quando a superfície está carregada negativamente, o pH é mais baixo porque a atração do próton aumenta sua dificuldade de liberação pela enzima (DWEVEDI, 2016; GOLDSTEIN; LEVIN; KATCHALSKI, 1964). Pequenas variações no pH ótimo já foram descritas para TLN imobilizada em poliuretano descrita no trabalho de Kunigi e col. (1987) já o trabalho de Moeschel e col. (2003), que relata a imobilização em um polímero de poliamida por ligação covalente, também não apresentou grande mudanças no pH ótimo da TLN para a hidrólise da azocaseína.



#### 4.1.8 Proteólise da caseína do leite bovino catalisada por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

Uma das principais aplicações de endopeptidases é a catálise da digestão de proteínas, como foi discutido no **item 1.4**. Por isso, foi investigada a capacidade da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN de proteolisar a caseína do leite bovino, uma proteína fácil de se obter e de alto valor científico e industrial (HAQUE; CHAND; KAPILA, 2008; ROCHA-MARTIN; FERNÁNDEZ-LORENTE; GUIBAN, 2018).

Inicialmente foi determinada a atividade proteolítica. A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN foi capaz de catalisar a proteólise da caseína bovina com uma atividade específica de 7,1(±0,9) PU·mg<sup>-1</sup>, e ligeiramente menor que a da TLN livre de 10,9(±1,1) PU·mg<sup>-1</sup>, que condiz com o resultado obtido para a atividade amidásica (**item 4.1.3**).

O monitoramento da proteólise foi feito por SDS-PAGE por 6 h. O perfil eletroforético da **Figura 56** mostra que os componentes proteicos iniciais, as quatro formas da caseína do leite bovino na região de 26 a 38 kDa, foram quase completamente proteolisados após as 6 h, sem deixar fragmentos grandes o suficiente para serem retidos na malha usada (15 % de acrilamida). Esse resultado era esperado, pois a TLN tem uma especificidade relativamente abrangente, o que pode gerar uma grande quantidade de fragmentos pequenos. Na literatura também é possível encontrar fragmentos específicos gerados pela proteólise da caseína com TLN que são menores que 10 kDa, a menor proteína do padrão de peso molecular (TRUSEK-HOLOWNIA, 2008).

Como não foi possível identificar os fragmentos gerados pela proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN por SDS-PAGE, foi feita a identificação por LC-MS. Na **Figura 57** são mostrados os cromatogramas do produto obtido pela catálise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN nos tempos iniciais (2, 4 e 6 h) e final da reação.

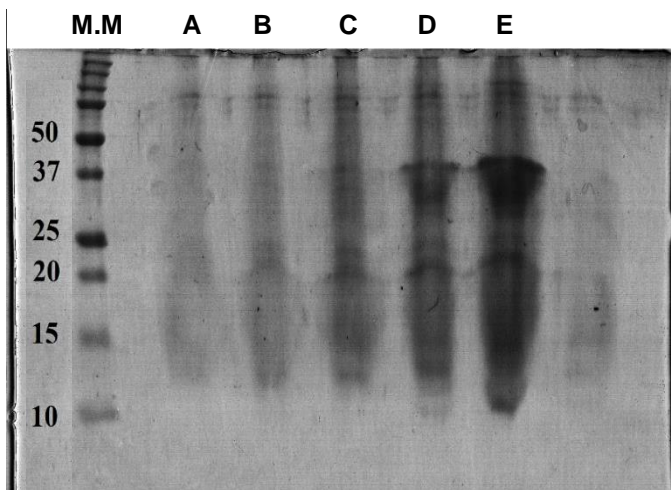


Figura 56: Perfil eletroforético do meio reacional da proteólise da caseína bovina catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @silica-TLN. (A) 6 h; (B) 4 h; (C) 2 h; (D) 1 h; (E) 0,5 h. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

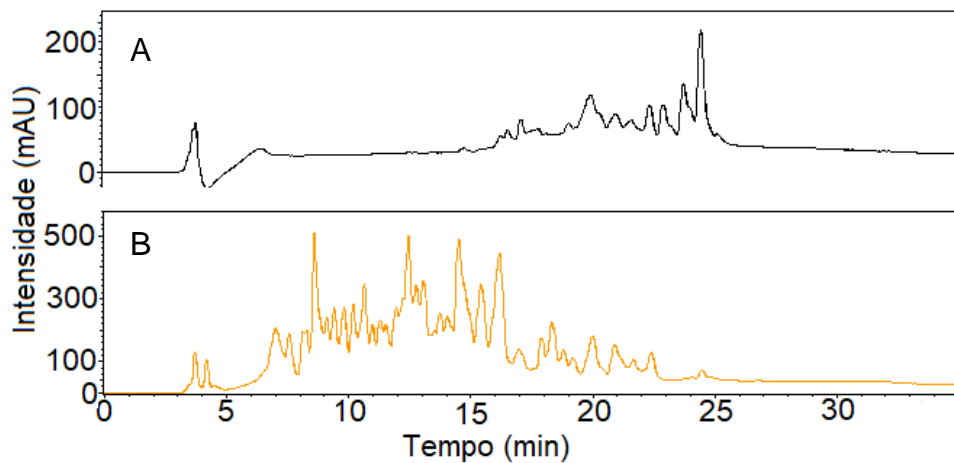
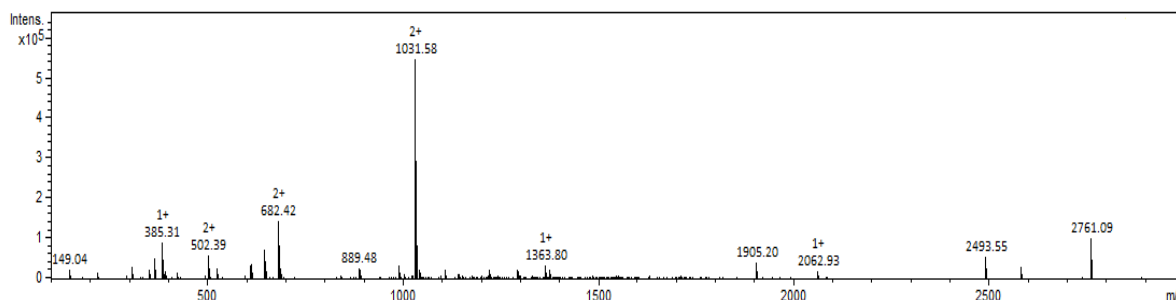


Figura 57: Cromatogramas obtidos por RP-HPLC da proteólise da caseína do leite bovino nos tempos iniciais (A) e final (B).

Esse resultado indica a formação de vários fragmentos da caseína do leite bovino ao longo do tempo. Foi escolhido fazer apenas o LC-MS, uma vez que a amostra era simples, sendo composta majoritariamente pelas quatro formas da caseína do leite bovino. O uso de LC-MS/MS poderia ajudar a identificar inequivocamente os fragmentos, mas poder-se-ia não detectar certos fragmentos, já que apenas os em maior quantidade seriam observados ao final da análise (CHAWNER; EYERS, 2011). A **Figura 58** mostra o espectro de massas dos produtos eluídos entre 12,5 e 12,7 min da proteólise por 24 h catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN.



**Figura 58:** Espectro de massas dos produtos da proteólise da caseína do leite bovino catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN eluídos entre os tempos de 12,5 e 12,7 min.

Para identificar os fragmentos obtidos foi utilizado o software Findpept do ExPASy, em que é possível utilizar os dados de massa obtidos para identificar peptídeos formados a partir da digestão de proteínas. Como a caseína do leite bovino apresenta quatro formas ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$  e  $\kappa$ ), foram feitas quatro comparações utilizando o código do banco de dados UniProt de cada uma das formas ( $\alpha$ 1: CASA1\_BOVIN;  $\alpha$ 2: CASA2\_BOVIN;  $\beta$ : CASB\_BOVIN;  $\kappa$ : CASK\_BOVIN) como proteína alvo e a TLN como protease (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017). Foi usada uma tolerância de 0,4 Da porque o equipamento ESI-Ion-Trap não tem uma resolução tão potente quanto outros equipamentos. Os resultados separados por forma da caseína, são apresentados nas **Tabelas 14 e 15**.

**Tabela 14:** Peptídeos encontrados no proteólise de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN oriundos das formas  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2. Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteólises catalisado pela TLN livre e imobilizada.

Sequência	Mr(exp)	Mr(calc.)	Delta	CP *	Peptídeo
$\alpha$ 1-CN(16-20)	633,43	633,3711	0,0617	0	(-)RPKHP(I)
$\alpha$ 1-CN(16-25)	1196,79	1196,689	0,1037	1	(-)RPKHPIKHQG(L)
$\alpha$ 1-CN(35-42)	961,59	961,5749	0,0178	4	(N)LLRFFVAP(F)
$\alpha$ 1-CN(35-51)	2023,02	2023,1295	-0,1068	6	(N)LLRFFVAPFPEVFGKEK(V)
$\alpha$ 1-CN(38-39)	312,23	312,1474	0,0853	1	(R)FF(V)
$\alpha$ 1-CN(35-74)	4649,86	4650,2680	0,408	8	(N)LLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGS ESTEDQAMEDIKQ(M)+ $\text{PO}_4^{3-}$
$\alpha$ 1-CN(80-95)	1861,91	1861,8459	0,0669	2	(S)ISSSEEIVPNSVEQKH(I)+ $\text{PO}_4^{3-}$
$\alpha$ 1-CN(107-109)	351,27	351,1794	0,0933	0	(Y)LGY(L)
$\alpha$ 1-CN(107-112)	721,47	721,3646	0,1081	1	(Y)LGYLEQ(L)
$\alpha$ 1-CN(113-115)	400,37	400,2798	0,0929	1	(Q)LLR(L)
$\alpha$ 1-CN(114-115)	287,2427	287,1957	0,047	0	(L)LR(L)
$\alpha$ 1-CN(116-123)	1002,7627	1002,6226	0,1402	1	(R)LKKYKVPQ(L)
$\alpha$ 1-CN(121-152)	3754,8027	3754,7613	0,0415	7	(K)VPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQ KEPMIG(V)+2 $\text{PO}_4^{3-}$
$\alpha$ 1-CN(135-137)	355,2527	355,1856	0,0672	0	(R)LHS(M)
$\alpha$ 1-CN(142-150)	1080,6627	1080,5386	0,1241	1	(G)IHAQQKEPM(I)
$\alpha$ 1-CN(160-164)	667,4027	667,3217	0,081	0	(Y)FYPEL(F)

as1-CN(165-167)	449,2527	449,2387	0,0141	0	(L)FRQ(F)
as1-CN(168-170)	456,2727	456,2009	0,0718	0	(Q)FYQ(L)
as1-CN(194-212)	2062,8927	2062,9517	-0,059	2	(S)FSDIPNPIGSENSEKTTMP(L)
as1-CN(201-212)	1292,6427	1292,5918	0,0509	1	(P)IGSENSEKTTMP(L)
as2-CN f(16-29)	1576,66	1576,711	0,051	3	(-)KNTMEHVSSEESI(I)
as2-CN(43-58)	1811,0327	1810,8593	0,1734	2	(A)INPSKENLCSTFCKEV(V)
as2-CN(103-110)	1119,6627	1119,5389	0,1238	1	(Q)FYQKFPQY(L)
as2-CN(111-119)	1093,5927	1093,5808	0,0119	2	(Y)LQYLYQGPI(V)
as2-CN(114-119)	689,3927	689,3748	0,0179	1	(Y)LYQGPI(V)
as2-CN(114-120)	788,4327	788,4432	-0,0105	2	(Y)LYQGPIV(L)
as2-CN(119-137)	2240,1427	2240,1718	-0,0291	5	(P)IVLNPWDQVKRNAVPITPT(L)+ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
as2-CN(138-142)	658,4027	658,3398	0,0629	0	(T)LNREQ(L)
as2-CN(176-181)	761,4927	761,4799	0,0128	2	(R)LNFLKK(I)
as2-CN(179-181)	387,3327	387,2845	0,0482	0	(F)LKK(I)

\* Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**Tabela 15: Peptídeos encontrados no proteólise de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN oriundos das formas β e κ. Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteólises catalisado pela TLN livre e imobilizada.**

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
β-CN(28-44)	1986,213	1985,967	0,2457	3	(I)VESLSSEESITRINKK(I) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
β-CN(38-40)	388,3127	388,2434	0,0693	0	(S)ITR(I)
β-CN(38-80)	5244,753	5244,521	0,2318	8	(S)ITRINKKIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHFAQT QSLVYFPFGPI(I) + 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
β-CN(41-44)	501,3727	501,3275	0,0453	0	(R)INKK(I)
β-CN(48-63)	1980,953	1980,855	0,0979	0	(K)FQSEEQQQTEDELQDK(I)
β-CN(45-101)	6513,68	6513,253	-0,426	9	(K)IEKFQSEEQQQTEDELQDKIPFAQTQSLVYFPF GPIPNPQNIPPLTQTPVVVPP(F)
β-CN(64-66)	365,2427	365,2063	0,0364	0	(K)IHP(F)
β-CN(67-72)	680,3727	680,313	0,0598	0	(P)FAQTQS(L)
β-CN(73-91)	2059,283	2059,114	0,1685	5	(S)LVYFPFGPIPNPQNIPPLTQTP(V)
β-CN(73-96)	2599,593	2599,405	0,1877	6	(S)LVYFPFGPIPNPQNIPPLTQTP(V)
β-CN(73-97)	2698,633	2698,473	0,1593	7	(S)LVYFPFGPIPNPQNIPPLTQTP(V)
β-CN(73-102)	3237,98	3237,791	-0,188	5	(S)LVYFPFGPIPNPQNIPPLTQTPVVVPP(F)
β-CN(74-91)	1946,153	1946,03	0,1225	4	(L)VYFPFGPIPNPQNIPPLTQTP(V)
β-CN(74-96)	2486,453	2486,321	0,1318	5	(L)VYFPFGPIPNPQNIPPLTQTP(V)
β-CN(92-96)	558,3727	558,3013	0,0714	0	(P)LTQTP(V)
β-CN(97-102)	656,4727	656,3898	0,083	3	(P)VVVPF(L)
β-CN(103-109)	772,4827	772,3789	0,1038	1	(F)LQPEVMG(V)
β-CN(110-112)	332,3127	332,206	0,1068	0	(G)VSK(V)
β-CN(113-116)	445,3527	445,2536	0,0991	0	(K)VKEA(M)
β-CN(117-130)	1700,023	1699,858	0,1649	1	(A)MAPKHKEMPFKYP(V)
β-CN(131-133)	343,2227	343,1743	0,0484	0	(P)VEP(F)
β-CN(134-139)	697,3427	697,2919	0,0508	0	(P)FTESQS(L)
β-CN(148-153)	688,5227	688,4272	0,0955	2	(N)LHLPLP(L)
β-CN(148-154)	801,6427	801,5112	0,1315	3	(N)LHLPLPL(L)
β-CN(154-158)	645,4427	645,3486	0,0941	1	(P)LLQSW(M)
β-CN(159-169)	1281,653	1281,629	0,0239	1	(W)MHQPHQPLPPT(V)
β-CN(171-177)	804,4127	804,384	0,0287	2	(V)MFPPQSV(L)
β-CN(177-179)	317,2427	317,1951	0,0477	1	(S)VLS(L)
β-CN(180-204)	2789,553	2789,526	0,0265	5	(S)LSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQA(F)
β-CN(180-205)	2936,573	2936,595	-0,0219	6	(S)LSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF(L)
β-CN(202-204)	330,2627	330,1903	0,0724	0	(P)IQA(F)
β-CN(202-205)	477,3427	477,2587	0,084	1	(P)IQAF(L)
β-CN(202-211)	1220,633	1220,644	-0,0114	3	(P)IQAFLLYQEP(V)
β-CN(205-206)	278,2027	278,163	0,0397	1	(A)FL(L)
β-CN(212-215)	384,3127	384,2373	0,0755	1	(P)VLGP(V)
β-CN(212-221)	1037,723	1037,602	0,1205	3	(P)VLGPVRGPFPI(I)
β-CN(212-224)	1362,723	1362,839	-0,116	6	(P)VLGPVRGPFPIIV(-)
β-CN(216-221)	671,4527	671,3755	0,0772	1	(P)VRGPFPI(I)
κ-CN(39-42)	495,2927	495,2329	0,0598	0	(F)FSDK(I)
κ-CN(49-51)	422,3027	422,2165	0,0862	0	(P)IQY(V)
κ-CN(49-52)	521,3827	521,2849	0,0978	1	(P)IQYV(L)
κ-CN(71-75)	600,4227	600,3231	0,0996	1	(A)LINNQ(F)

κ-CN(72-75)	487,3327	487,239	0,0937	0	(L)INNQ(F)
κ-CN(94-98)	686,4727	686,3752	0,0976	1	(Q)ILQWQ(V)
κ-CN(99-103)	532,3227	532,2857	0,037	1	(Q)VLSN(T)V
κ-CN(116-123)	981,6127	981,4715	0,1412	0	(T)MARHPHPH(L)
κ-CN(126-142)	1957,233	1957,034	0,1985	2	(S)FMAIPPKNQDKTEIPT(I)
κ-CN(127-142)	1810,153	1809,966	0,1869	1	(F)MAIPPKNQDKTEIPT(I)
κ-CN(143-145)	346,2227	346,1852	0,0375	0	(T)INT(I)
κ-CN(143-173)	3385,753	3385,403	0,35	4	(T)INTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEV(I) + 3 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
κ-CN(146-159)	1360,713	1360,636	0,0769	0	(T)IASGEPTSTPTTEA(V)
κ-CN(164-173)	1218,733	1218,446	0,2869	1	(T)VATLEDSPEV(I) + 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
κ-CN(167-182)	1847,913	1847,808	0,105	1	(T)LEDSPEVIESPPEINT(V) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
κ-CN(183-190)	963,5727	963,3716	0,2012	2	(T)VQVTSTAV(-) + 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>

\* Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

Foram encontrados 84 fragmentos no tempo 24 h, dos quais 20 são da αs1-caseína, 10 da αs2-caseína, 38 da β-caseína e 16 da κ-caseína. Essa distribuição se difere da abundância de cada forma no leite bovino (~44 % αs1, ~ 11% αs2, ~33 % β e ~11 % κ), e parece estar relacionada à solubilidade em meio contendo Ca<sup>2+</sup> (onde a ordem de solubilidade é κ>β>αs1>αs2 (SWAISGOOD, 2003)). Isso ocorre porque a caseína do leite bovino tem grande capacidade de complexar cálcio e diminuir ainda mais a sua solubilidade em água. Não foi feita a reação sem cálcio porque ele é importante para a estabilidade estrutural da TLN. Os fragmentos correspondem a diferentes porcentagens das formas da caseína, ~57% da αs1, ~53% da αs2, ~85% da β e ~53% da κ. Esses resultados foram alinhados com as sequências das caseínas para melhor visualizar como foi a fragmentação (**Figura 59**).

Como controle, foi realizada a proteólise da caseína do leite bovino catalisada pela TLN livre. Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 16 e 17**. Houve uma pequena diferença na quantidade de fragmentos detectados. Foram detectados 79 fragmentos, sendo 23 da αs1-caseína, 14 da αs2-caseína, 32 da β-caseína e 10 da κ-caseína. Comparando as **Tabelas 14, 15, 16 e 17** é possível perceber que há tanto fragmentos em comum como diferentes na proteólise catalisada pela TLN livre e pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica, o que pode indicar uma mudança na interação enzima-substrato da TLN causada pela imobilização. O trabalho de Ong e col. (1966) corrobora com essa

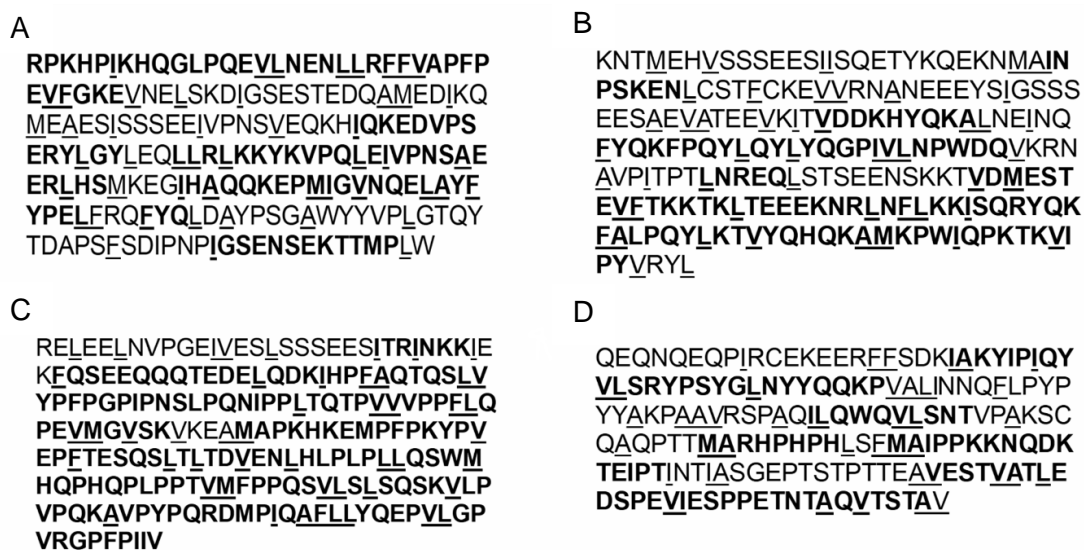


Figura 59: Sequências das quatro formas da caseína bovina do leite com destaque para os fragmentos gerados na proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. (A) αs1-caseína; (B) αs2-caseína; (C) β-caseína e (D) κ-caseína. Em negrito estão as regiões detectadas no proteolisado.

possibilidade, pois relataram uma mudança no padrão de fragmentação da proteólise do pepsinogenio quando utilizavam como catalisador a TRY livre e imobilizada em copolímero de ácido oleico. A diferença entre proteolisados com a TRY livre e imobilizada também foi observada por Zdarta e col. (2018b).

Tabela 16: Peptídeos encontrados no proteolisado de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela TLN livre oriundos das formas αs1 e αs2. Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteolisados catalisado pela TLN livre e imobilizada.

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
as1-CN(16-20)	633,5127	633,3711	0,1417	0	(-)RPKHP(I)
as1-CN(16-25)	1196,883	1196,689	0,1937	1	(-)RPKHPIKHQG(L)
as1-CN(21-30)	1147,863	1147,635	0,2278	1	(P)IKHQGLPQEV(L)
as1-CN(21-34)	1618,153	1617,847	0,3053	2	(P)IKHQGLPQEVLNEN(L)
as1-CN(31-38)	1017,733	1017,561	0,172	3	(V)LNENLLRF(F)
as1-CN(35-42)	961,6427	961,5749	0,0678	4	(N)LLRFFVAP(F)
as1-CN(35-51)	2023,143	2023,13	0,0132	6	(N)LLRFFVAPFPEVFGKEK(V)
as1-CN(36-38)	434,3627	434,2641	0,0986	1	(L)LRF(F)
as1-CN(96-106)	1362,893	1362,678	0,2148	0	(H)IQKEDVPSERY(L)
as1-CN(107-109)	351,2427	351,1794	0,0633	0	(Y)LGY(L)
as1-CN(113-115)	400,3927	400,2798	0,1129	1	(Q)LLR(L)
as1-CN(113-123)	1384,853	1384,892	-0,0391	3	(Q)LLRLK <sup>K</sup> YK <sup>V</sup> PQ(L)
as1-CN(114-123)	1272,043	1271,808	0,235	2	(L)LR <sup>L</sup> K <sup>K</sup> YK <sup>V</sup> PQ(L)
as1-CN(116-123)	1002,823	1002,623	0,2001	1	(R)L <sup>K</sup> K <sup>K</sup> YK <sup>V</sup> PQ(L)
as1-CN(121-126)	697,4427	697,401	0,0417	1	(K)VPQLEI(V)
as1-CN(124-137)	1592,663	1592,816	-0,1531	2	(Q)LEIVPNSAEERLHS(M)
as1-CN(135-137)	355,2727	355,1856	0,0872	0	(R)LHS(M)
as1-CN(142-150)	1080,763	1080,539	0,2241	1	(G)IHAQQKEPM(I)
as1-CN(142-159)	2068,313	2068,041	0,2716	3	(G)IHAQQKEPMIGV <sup>N</sup> QELAY(F)
as1-CN(160-164)	667,4627	667,3217	0,141	0	(Y)FYPEL(F)
as1-CN(168-170)	456,2927	456,2009	0,0918	0	(Q)FYQ(L)
as1-CN(194-212)	2063,24	2062,959	-0,281	1	(S)FSDIPNPIGSENSEKTTMP(L)
as1-CN(201-212)	1292,803	1292,592	0,2109	1	(P)IGSENSEKTTMP(L)
as2-CN(43-49)	800,5627	800,4028	0,1599	0	(A)INPSKEN(L)

as2-CN(88-96)	1102,713	1102,541	0,172	0	(T)VDDKHYQKA(L)
as2-CN(103-110)	1119,743	1119,539	0,2038	1	(Q)FYQKFPQY(L)
as2-CN(111-119)	1093,683	1093,581	0,1019	2	(Y)LQYLYQGPI(V)
as2-CN(114-119)	689,4727	689,3748	0,0979	1	(Y)LYQGPI(V)
as2-CN(114-120)	788,5127	788,4432	0,0695	2	(Y)LYQGPIV(L)
as2-CN(114-126)	1542,063	1541,788	0,2749	3	(Y)LYQGPIVLPWDQ(V)
as2-CN(138-142)	658,4627	658,3398	0,1229	0	(T)LNREQ(L)
as2-CN(154-161)	988,4927	988,346	0,1467	0	(T)VDMESTEV(F) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
as2-CN(154-167)	1722,083	1721,795	0,288	1	(T)VDMESTEVFTKTK(L) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
as2-CN(168-177)	1245,013	1244,636	0,3767	1	(K)LTEEEKNRLN(F)
as2-CN(176-181)	761,5527	761,4799	0,0728	2	(R)LNFLKK(I)
as2-CN(198-204)	872,6427	872,4504	0,1923	0	(T)VYQHQA(M)
as2-CN(205-218)	1728,293	1727,98	0,3131	3	(A)MKPWIQPKTKVIPY(V)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**Tabela 17: Peptídeos encontrados no proteólise de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela TLN livre oriundos das formas  $\beta$  e  $\kappa$ . Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteólises catalisado pela TLN livre e imobilizada.**

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
$\beta$ -CN(38-40)	388,3227	388,2434	0,0793	0	(S)ITR(I)
$\beta$ -CN(41-44)	501,3927	501,3275	0,0653	0	(R)INKK(I)
$\beta$ -CN(48-63)	2061,083	2060,821	0,2616	0	(K)FQSEEQQTDELQDK(I) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\beta$ -CN(64-66)	365,2627	365,2063	0,0564	0	(K)IHP(F)
$\beta$ -CN(67-72)	680,4527	680,313	0,1398	0	(P)FAQTQS(L)
$\beta$ -CN(73-91)	2059,393	2059,114	0,2785	5	(S)LVYFPFGPIPNLSLPQNIPP(L)
$\beta$ -CN(73-96)	2599,703	2599,405	0,2977	6	(S)LVYFPFGPIPNLSLPQNIPPLTQTP(V)
$\beta$ -CN(85-97)	1576,833	1576,73	0,1024	3	(S)LPQNIPPLTQTPV(V) + 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\beta$ -CN(89-102)	1664,203	1663,803	0,3999	5	(N)IPPLTQTPVVVPPF(L) + 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\beta$ -CN(103-109)	772,5327	772,3789	0,1538	1	(F)LQPEVMG(V)
$\beta$ -CN(110-112)	332,2727	332,206	0,0668	0	(G)VSK(V)
$\beta$ -CN(117-130)	1700,173	1699,858	0,3149	1	(A)MAPKHKEMPFKYP(V)
$\beta$ -CN(117-133)	2025,353	2025,022	0,3311	2	(A)MAPKHKEMPFKYPVEP(F)
$\beta$ -CN(117-141)	3238,153	3238,3	-0,1472	4	(A)MAPKHKEMPFKYPVEPFTESQSLT(L) + 4 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\beta$ -CN(131-133)	343,3127	343,1743	0,1384	0	(P)VEP(F)
$\beta$ -CN(131-149)	2477,693	2477,908	-0,2156	4	(P)VEPFTESQSLTLTDVENLH(L) + 4 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\beta$ -CN(148-153)	688,5927	688,4272	0,1655	2	(N)LHLPLP(L)
$\beta$ -CN(148-154)	801,7027	801,5112	0,1915	3	(N)LHLPLPL(L)
$\beta$ -CN(154-158)	645,4727	645,3486	0,1241	1	(P)LLQSW.M
$\beta$ -CN(159-169)	1281,873	1281,629	0,2439	1	(W)MHQPHQPLPPT(V)
$\beta$ -CN(171-177)	804,5327	804,384	0,1487	2	(V)MFPPQSV(L)
$\beta$ -CN(177-179)	317,2327	317,1951	0,0377	1	(S)VLS(L)
$\beta$ -CN(178-187)	1070,713	1070,634	0,0792	3	(V)LSLSQSKVLP(V)
$\beta$ -CN(180-204)	2789,893	2789,526	0,3665	5	(S)LSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQA(F)
$\beta$ -CN(185-201)	1934,303	1934,045	0,2579	3	(K)VLPVPQKAVPYPQRDMPI(I)
$\beta$ -CN(202-204)	330,2627	330,1903	0,0724	0	(P)IQAF(F)
$\beta$ -CN(202-205)	477,3627	477,2587	0,104	1	(P)IQAF(L)
$\beta$ -CN(202-211)	1220,773	1220,644	0,1286	3	(P)IQAFLLYQEP(V)
$\beta$ -CN(205-206)	278,1827	278,163	0,0197	1	(A)FL(L)
$\beta$ -CN(207-211)	648,4427	648,3119	0,1308	0	(L)LYQEP(V)
$\beta$ -CN(212-221)	1037,813	1037,602	0,2105	3	(P)VLGPVRGPF(I)
$\beta$ -CN(216-221)	671,5227	671,3755	0,1472	1	(P)VRGPF(I)
$\kappa$ -CN(37-62)	3165,043	3164,67	0,3729	5	(K)IAKYIPIQYVLSRYPYGLNYYQKQP(V)
$\kappa$ -CN(43-46)	521,3927	521,2849	0,1078	1	(P)IQYV(L)
$\kappa$ -CN(88-92)	686,5127	686,3752	0,1376	1	(Q)ILQWQ(V)
$\kappa$ -CN(93-97)	532,3827	532,2857	0,097	1	(Q)VLSNT(V)
$\kappa$ -CN(110-117)	981,6527	981,4715	0,1812	0	(T)MARHPHP(L)
$\kappa$ -CN(127-142)	1810,233	1809,966	0,2669	1	(F)MAIPKKNQDKTEIPT(I)
$\kappa$ -CN(154-183)	3301,193	3301,478	-0,2852	5	(A)VESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTA(V)
$\kappa$ -CN(158-167)	1218,843	1218,446	0,3969	1	(T)VATLEDSPEV(I) + 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\kappa$ -CN(158-183)	3125,003	3125,186	-0,1834	4	(T)VATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTA(V)
$\kappa$ -CN(161-176)	1848,063	1847,808	0,255	1	(T)LEDSPEVIESPPEINT(V) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>

\*\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

Também foram encontrados fragmentos que poderiam ser atribuídos à autólise da TLN nos meios reacionais de ambas as proteólises. Entre todos os fragmentos possíveis foram descartados aqueles com massas parecidas com algum fragmento da caseína do leite bovino pela resistência à autólise que a TLN e a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN apresentam em meios com Ca<sup>2+</sup>. No total, foram encontrados 10 fragmentos de TLN livre e 9 de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN que podem ter sido originados apenas da autólise da TLN (**Tabela 18**).

**Tabela 18: Fragmentos detectados provenientes da autólise da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN e TLN livre.**

Catalisador	Sequência	[M+H](Exp)	[M+H](calc)	Delta	Peptídeo
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN	16-24	979,59	979,471	-0,119	(G)LMAWPFGAS(A)
	93-106	1772,07	1771,906	-0,163	(V)MRFEQRYRGIPVYG(A)
	129-148	2259,28	2259,238	-0,042	(N)LDKRTLKTEAAISIQQAEMI(A)
	203-216	1571,56	1571,818	0,257	(M)IDAADGKVLNKWNQ(M)
	206-209	390,23	390,198	-0,031	(A)ADGK(V)
	229-240	1060,61	1060,575	-0,035	(V)AGTSTVGVGRGV(L)
	299-316	2082,23	2081,96	-0,269	(A)AAVDAHYYAGVVYDYK(V)
	471-473	366,25	366,202	-0,047	(A)AYL(L)
	500-504	628,41	628,334	-0,075	(R)ALVYY(L)
	500-513	1603,39	1603,8	0,41	(R)ALVYYLTPTSNSFSQ(L)
TLN livre	93-106	1772,21	1771,906	-0,303	(V)MRFEQRYRGIPVYG(A)
	142-171	3281,17	3280,695	-0,474	(S)IQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAE EGKPTR(L)
	189-205	1992,25	1992,041	-0,208	(N)VRFLTPVPGNWIYMIDA(A)
	203-216	1571,71	1571,818	0,107	(M)IDAADGKVLNKWNQ(M)
	229-240	1060,77	1060,575	-0,195	(V)AGTSTVGVGRGV(L)
	279-292	1561,02	1560,769	-0,25	(T)VLPGLWADVDNQ(F)
	343-350	940,64	940,398	-0,241	(N)AFWNGSQM(V)
	488-492	588,44	588,346	-0,093	(G)IGRDK(M)
	500-504	628,46	628,334	-0,125	(R)ALVYY(L)

Como abordado anteriormente, a caseína do leite bovino é muito estudada como fonte de peptídeos bioativos. Há na literatura vários artigos que utilizam a proteólise da caseína do leite bovino catalisada pela TLN para se obter peptídeos bioativos, porém a maioria foca em fragmentos específicos, e não tentam identificar todos os formados durante a proteólise, como foi feito neste projeto. Um exemplo é o trabalho de Guinane e col. (2015), que utilizaram a enzima livre para obter o peptídeo antimicrobiano caseicina A, um fragmento da  $\alpha$ s1-caseína, sem focar em outros fragmentos gerados tanto pela proteólise quanto pela autólise da TLN. Otte e col.



(2007) fizeram o mesmo a partir da  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -lactoferrina, focando apenas nos peptídeos com atividade inibidora da ECA, pois peptídeos com essa atividade poderiam ser utilizados em medicamentos para pressão arterial, já que a ECA está ligada diretamente à regulação da pressão arterial.

A **Tabela 19** apresenta os fragmentos encontrados no proteólise 24 h catalisado pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN que possuem semelhança em sua estrutura primária com peptídeos bioativos descritos em trabalhos na literatura. A porcentagem desse tipo de fragmento encontrada em relação ao total foi de 37%, e poderiam ser isolados ou usados como modelo para a síntese de peptídeos bioativos. Deles, 9 originaram-se da  $\beta$ -caseína, 9 da  $\alpha$ 1-caseína, 7 da  $\kappa$ -caseína e 4 de  $\alpha$ 2-caseína (NIELSEN et al., 2017).

**Tabela 19: Peptídeos potencialmente bioativos encontrados no proteólise resultantes da catálise por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN (24 h).**

Peptídeo encontrado	Posição	Peptídeo conhecido	Bioatividade	Referência
RPKHP	$\alpha$ 1-CN (16-20)	RPKHPI	Inibição da ECA	(MINERVINI et al., 2003)
LLRFFVAPFPEV FGKEK	$\alpha$ 1-CN (35-51)	RFFVAPFPEVFGK EKVNEL	Indução da biosíntese de madocidina	(GEORGALAKI et al., 2010)
ISSSEEIVPNSVE QKH	$\alpha$ 1-CN (80-95)	QMEAESISSSEEIV PNSVEQK	Imunoregulação	(HATA; HIGASHIYAMA; OTANI, 1998)
LGY	$\alpha$ 1-CN (107-109)	LGY	Antioxidante	(CONTRERAS et al., 2013)
LGYLEQ	$\alpha$ 1-CN (107-112)	YLGYLEQ	Ansiolítica	(CAKIR-KIEFER et al., 2011)
LKKYKVPQ	$\alpha$ 1-CN (116-123)	KKYNVQPQ	Inibição da ECA	(RUIZ et al., 2004)
FYPEL	$\alpha$ 1-CN (160-164)	FYPEL	Antioxidante	(CONTRERAS et al., 2013)
FSDIPNP	$\alpha$ 1-CN (194-200)	DIPNPI	Promotora de crescimento	(ZHANG et al., 2011)
IGSENSEKTTMP	$\alpha$ 1-CN (201-212)	IGSENSEKTTMP	Inibição da ECA	(HAYES et al., 2007)
INPSKENLCSTF CKEV	$\alpha$ 2-CN (43-58)	NMAINPSKENLC STFCK	Inibição da ECA	(TU et al., 2018)
FYQKFPQY	$\alpha$ 2-CN (103-110)	YQKFPQY	Antioxidante	(SILVA et al., 2006)
AVPITPT	$\alpha$ 2-CN (131-137)	VPITPT	Inibição de DPP-IV	(JENISHI et al., 2012)
LKK	$\alpha$ 2-CN (179-181)	LKK	Anticancer	(OTANI; SUZUKI, 2003)
INKK	$\beta$ -CN (41-44)	INKKI	Anticancer	(AZEVEDO et al., 2012)
LVYFPGPINSLP QNIPP	$\beta$ -CN (73-91)	VYFPGPINSLP QNIPP	Inibição da ECA	(OTTE et al., 2007)
LHLPLP	$\beta$ -CN (148-153)	LHLPLP	Inibição da ECA	(KOHMURA et al., 1989)

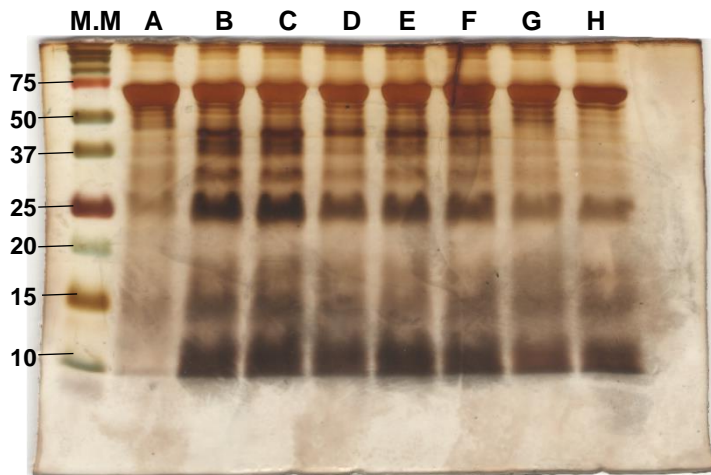
LHLPLPL	$\beta$ -CN (148-154)	LHLPLPL	Inibição da ECA	(QUIRÓS et al., 2007)
LLQSW	$\beta$ -CN (155-158)	LQSW	Inibição da ECA	(MAENO; YAMAMOTO; TAKANO, 1996)
LSQSKVLPVPQK	$\beta$ -CN (180-191)	SQSKVLPVPQ	Inibição da ECA	(HAYES et al., 2007)
VLPVPQK	$\beta$ -CN (185-191)	VLPVPQK	Antioxidante	(SHANMUGAM et al., 2015)
VLGPVRGPFPIIV	$\beta$ -CN (212-224)	YQEPVLGPVRG PFPIIV	Anti trombina	(ROJAS-RONQUILLO et al., 2012)
VRGPF	$\beta$ -CN (216-221)	VRGPF	Inibição da ECA	(GÓMEZ-RUIZ; RAMOS; RECIO, 2002)
FSDK	$\kappa$ -CN (39-42)	FFSDK	Antimicrobiana	(SEDAGHATI et al., 2014)
AKYIPIQYV	$\kappa$ -CN (44-52)	YIPIQYVLSR	Opioide	(SIENKIEWICZ- SZŁAPKA et al., 2009)
IQY	$\kappa$ -CN (49-51)	IQY	Antioxidante	(LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2007)
AKPAAVRSPAQIL QWQV	$\kappa$ -CN (83-99)	PAAVRSPAQILQ	Antimicrobiana	(LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2007)
MAIPPKKNQDK TEIPT	$\kappa$ -CN (127-142)	MAIPPKKNQDK TEIPTINT	Antimicrobiana	(ROBITAILLE et al., 2012)
ATLEDSPVEIESP PEINT	$\kappa$ -CN (165-182)	AVESTVATLED SPEVIESPPE	Antimicrobiana	(LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2007)
VQVTSTAV	$\kappa$ -CN (183-188)	VQVTSTAV	Antimicrobiana	(LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2007)

#### 4.1.9 Proteólise da BSA

Também foi investigada a possibilidade de proteólise da BSA, que é usada no Método de Bradford como proteína modelo (BRADFORD, 1976) e por apresentar diversas funções (MERLOT; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2014).

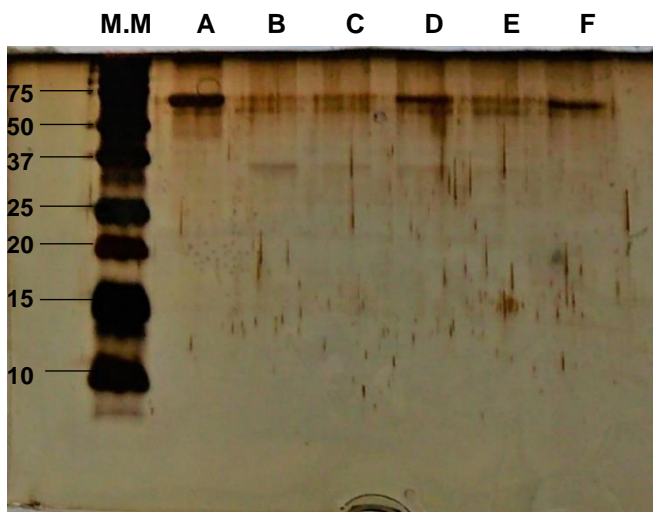
Assim como foi feito com a caseína do leite bovino, as seis primeiras horas foram monitoradas por SDS-PAGE (**Figura 60**). Em 0 h (**Figura 60A**) foi possível observar a presença da BSA pela banda que representa uma massa entre 47 e 70 kDa (Massa molecular da albumina: 66 kDa). Com o decorrer do tempo foi possível verificar a BSA sendo digerida, pois a banda que a representaria diminuiu gradativamente de tamanho (**Figura 60 B a H**). A digestão também foi observada pelo desaparecimento dos fragmentos gerados que apresentam massa molecular de 48, 36, 27 e 13 kDa.

Uma vez que a BSA apresenta apenas uma forma, diferente da caseína do leite bovino com quatro, ela foi escolhida para mostrar a capacidade de reuso da



**Figura 60:** Perfil eletroforético do meio reacional da proteólise da BSA pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN em relação com o tempo. (A) 0 h; (B) 10 min; (C) 20 min; (D) 30 min; (E) 1 h; (F) 2 h; (G) 4 h; (H) 6 h. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN. O reuso foi monitorado por SDS-PAGE (**Figura 61**). Em 0 h a banda que representa a massa molecular de 60 kDa é a BSA. Nos 5 usos foi possível notar seu consumo pela queda na intensidade dessa banda, além do surgimento de um fragmento na região de 38 kDa. Esses resultados indicam que o NBC continuou ativo nos cinco ciclos de proteólise. Rocha-Martin e col. (2018) relataram que a TLN imobilizada em agarose pode ser utilizada por três reações de proteólise de uma caseína digerida por TRY, corroborando com o observado.



**Figura 61:** Perfil eletroforéticos dos meios reacionais do reuso da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN frente a BSA. (A) 0 h; (B) 1º uso; (C) 2º uso; (D) 3º uso; (E) 4º uso; (F) 5º uso. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

A dessalinização foi feita com Sep-Pak C<sub>18</sub> e a detecção de fragmentos por LC-MS. Durante a reação foi observado que uma parte da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN ficou adsorvida na parede do frasco.

A **Tabela 20** apresenta os fragmentos detectados na proteólise da BSA catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. Foram detectados 48 diferentes fragmentos que correspondem a ~77% da sequência. A **Tabela 21** apresenta os fragmentos detectados quando o catalisador foi TLN livre, e no total foram encontrados 62 diferentes fragmentos que correspondem a ~54% da estrutura primária. A **Figura 62** apresenta a sequência da BSA e as regiões detectadas pela proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN.

**Tabela 20: Peptídeos encontrados no proteolisado da BSA após 24h de reação catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteolisados catalisado pela TLN livre e imobilizada.**

Sequência	Mr(exp.)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
43-54	1384,803	1384,776	0,0273	5	(H)FKGLVLIAFSQY(L)
46-48	343,2827	343,2471	0,0356	2	(G)LVL(I)
64-93	3351,54	3351,595	0,055	8	(H)VKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTL(F)+ Fosfato
90-103	1531,523	1531,771	-0,2477	3	(S)LHTLFGDELCKVAS(L)
139-145	783,5027	783,4127	0,0901	0	(K)LKDPNT(L)
188-211	2769,483	2769,296	0,187	4	(V)FQECCQAEDKGGACLLPKIETMREK(V)
193-232	4559,36	4559,396	0,035	13	(Q)AEDKGGACLLPKIETMREKVLASSARQRLRCASIQKF GERA(L)+Succ
193-234	4700,98	4700,559	-0,421	14	(Q)AEDKGGACLLPKIETMREKVLASSARQRLRCASIQKF GERALK(A)
202-207	699,4627	699,4167	0,0461	1	(L)LPKIET(M)
205-207	361,2127	361,1849	0,0278	0	(K)IET(M)
208-212	661,1027	661,3581	-0,2554	1	(T)MREKV(L)
212-241	3458,2	3457,891	-0,308	12	(K)VLASSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVAR(L)
224-239	1790,09	1789,991	-0,098	6	(C)ASIQKFGERALKAWSV(A)
224-263	4519,05	4519,539	0,489	12	(C)ASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVT DLTK(V)
226-238	1632,68	1632,87	0,189	4	(S)IQKFGERALKAWS(V)+Succ
287-312	3029,023	3029,337	-0,314	4	(Y)ICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHC(I)+ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
306-353	5351,783	5350,605	1,1774	8	(P)LLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNY QEAKDAFLGSF(L)
307-352	5090,423	5090,453	-0,0301	6	(L)LEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQ EAKDAFLGS(F)
328-371	5156,143	5156,534	-0,3914	8	(P)LTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHP EYAVSVLLR(L)
350-353	422,3027	422,2165	0,0862	1	(F)LGSF(L)
372-379	923,5727	923,46	0,1127	0	(R)LAKEYEAT(L)
380-409	3446,203	3446,558	-0,3554	5	(T)LEECCAKDDPHACYSTVFDKHLVDEPQN(L)
384-409	2982,62	2982,462	-0,158	7	(C)AKDDPHACYSTVFDKHLVDEPQNL(I)
404-409	700,0027	700,3028	-0,3001	0	(L)VDEPQN(L)
404-410	813,4827	813,3868	0,0959	1	(L)VDEPQNL(I)

404-431	3252,633	3252,576	0,0566	7	(L)VDEPQNLKQNCQDFEKLGEYGFQNALI(V)
405-450	5291,893	5291,633	0,2599	9	(A)LIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPE SERMPCTEDY(L) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
411-417	846,6127	847,3858	-0,7731	0	(L)IKQNCQDQ(F)
426-430	591,3527	591,3017	0,0511	1	(G)FQNAL(I)
476-478	331,2627	331,2107	0,052	1	(Y)LSL(I)
477-522	5230,09	5229,725	-0,365	12	(S)LILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSAL TPDETYVVK(A)
480-485	716,7527	716,4003	0,3524	2	(I)LNRLCV(L)
485-491	822,5727	822,4599	0,1128	1	(C)VLHEKTP(V)
485-522	4384,93	4384,133	0,203	7	(V)LHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYV PK(A)+ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
491-522	3599,973	3599,786	-0,1867	6	(P)VSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVVK(A)
511-513	323,1727	323,1481	0,0246	0	(C)FSA(L)
514-524	1232,853	1232,629	0,2239	1	(A)LTPDETYVVK(A)(F)
525-528	537,3327	537,2435	0,0893	0	(A)FDEK(L)
524-550	3166,43	3166,608	0,178	6	(K)AFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQT(A)
545-573	3407,74	3407,929	0,188	9	(Q)IKKQTALVELLKHKPKATEEQLKTVMENF(V)+Met
552-555	472,3727	472,2897	0,083	1	(A)LVEL(L)
552-597	5136,06	5135,592	-0,468	16	(A)LVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDK EACFAVEGPK(L)+Met
553-555	359,2427	359,2056	0,0371	0	(L)VEL(L)
575-577	335,5827	335,1845	0,3982	1	(F)VAF(V)
556-599	4979,35	4979,465	0,115	16	(L)LKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEAC FAVEGPKLV)V+Succ
575-604	3115,06	3115,474	0,413	11	(V)AFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTA(L)
591-605	1546,773	1545,84	0,9325	4	(C)FAVEGPKLVVSTQTA(L)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**Tabela 21: Peptídeos encontrados no proteólise da BSA após 24h de reação catalisada pela TLN livre. Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteólises catalisado pela TLN livre e imobilizada.**

Sequência	Mr(exp.)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
43-45	351,1727	350,1954	0,9773	0	(H)FKG(L)
46-48	343,2827	343,2471	0,0356	2	(G)LVL(I)
48-50	315,2227	315,2158	0,0069	1	(V)LIA(F)
49-54	727,5227	727,3541	0,1686	1	(L)IAFSQY(L)
51-54	543,3027	543,2329	0,0698	0	(A)FSQY(L)
66-89	2580,6627	2580,1836	0,4791	2	(K)LVNELTEFAKTCVADESHAGCEKS(L)
94-100	811,1927	810,3582	0,8345	0	(L)FGDELCK(V)
104-126	2845,3227	2845,0853	0,2375	1	(S)LRETYGDMADCCEKQEPERNECF(L) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
127-138	1350,8127	1350,6779	0,1348	0	(F)LSHKDDSPDLPK(L)
139-145	783,4527	783,4127	0,0401	0	(K)LKPDNT(L)
189-216	3442,63	3442,609	-0,021	5	(I)ARRHPYFYAPPELLYYANKYNGVFQECQ(A)
201-204	469,3927	469,3264	0,0663	1	(C)LLPK(I)
202-207	699,4327	699,4167	0,0161	1	(L)LPKIET(M)
205-207	361,2127	361,1849	0,0278	0	(K)IET(M)
221-233	1477,8927	1477,7823	0,1104	2	(R)LRCASIQKFGERA(L)
226-228	387,3227	387,2482	0,0746	0	(S)IQK(F)
229-233	578,3527	578,2813	0,0715	0	(K)FGERA(L)
239-241	344,2627	344,2172	0,0455	0	(S)VAR(L)
294-297	433,3227	433,2536	0,0691	0	(T)ISSK(L)
307-312	715,4327	715,3323	0,1004	0	(L)LEKSHC(I)
349-369	2532,0927	2532,2801	-0,1874	6	(A)FLGSFLYEYSRRHPEYAVSVL(L)
350-353	422,2427	422,2165	0,0262	1	(F)LGSF(L)
366-368	302,1627	303,1794	-1,0167	1	(A)VSV(L)
396-399	507,3727	507,2693	0,1034	1	(T)VFDK(L)
397-399	408,2427	408,2009	0,0418	0	(V)FDK(L)
400-402	396,3127	396,2485	0,0642	0	(K)LKH(L)
404-409	700,4227	700,3028	0,1199	0	(L)VDEPQN(L)
404-410	813,3527	813,3868	-0,0341	1	(L)VDEPQNL(I)
404-425	2566,3027	2566,2009	0,1018	4	(L)VDEPQNLKQNCQDFEKLGEYGF(F)

411-417	846,4827	847,3858	-0,9031	0	(L)IKQNCQ(F)
431-452	2514,3327	2514,4282	-0,0955	5	(L)IVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRS(L)
441-445	503,3127	503,2591	0,0536	0	(Q)VSTPT(L)
441-446	616,4427	616,3432	0,0995	1	(Q)VSTPTL(V)
441-455	1732,2027	1731,8209	0,3818	3	(Q)VSTPTLVEVSRS(L)GK(V)+ 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
453-455	316,2527	316,211	0,0417	0	(S)LGK(V)
476-478	330,2727	331,2107	-0,938	1	(Y)LSL(I)
478-482	627,4927	627,4068	0,086	2	(S)LILNR(L)
479-482	514,3827	514,3227	0,06	1	(L)ILNR(L)
480-482	401,2727	401,2386	0,0341	0	(I)LNR(L)
485-491	822,5327	822,4599	0,0728	1	(C)VLHEKTP(V)
485-495	1265,7627	1265,6979	0,0648	2	(C)VLHEKTPVSEK(V)
504-513	1161,7127	1161,6077	0,105	2	(S)LVNRRPCFSA(L)
511-513	323,1827	323,1481	0,0346	0	(C)FSA(L)
514-524	1232,7427	1232,6289	0,1139	1	(A)LTPDETYVPKA(F)
519-535	2021,88	2021,896	0,016	3	(K)VTKCCTESLVNRRPCFS(A)+ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
525-528	537,3127	537,2435	0,0693	0	(A)FDEK(L)
525-529	650,4027	650,3275	0,0752	1	(A)FDEKL(F)
525-551	3166,6927	3166,6009	0,0918	5	(A)FDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTA(L)
525-552	3279,6527	3279,6849	-0,0322	6	(A)FDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTAL(V)
552-555	472,3327	472,2897	0,043	1	(A)LEVEL(L)
553-555	359,2327	359,2056	0,0271	0	(L)VEL(L)
567-569	360,2527	360,2373	0,0155	0	(Q)LKT(V)
591-599	958,7227	958,5488	0,174	3	(C)FAVEGPKLV(V)
593-597	528,3427	528,2908	0,052	0	(A)VEGPK(L)
593-598	641,4327	641,3748	0,0579	1	(A)VEGPKL(V)
593-598	642,3127	641,3748	0,9379	1	(A)VEGPKL(V)
599-605	704,3427	704,3705	-0,0278	1	(L)VVSTQTA(L)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHREFK  
 DLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELT  
**EFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLR**  
 ETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKL  
 KPDPNTL CDEFK ADEKKFWGKYLYEIAARRHPYFYA  
 PELLYYANKYNGVFQECQAEDKGACLLPKIETMR  
**EKVLASSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVARLS**  
**QKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECAÐ**  
 DRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIA  
**EVEKDAIPENLPLTADFAEDKDVKKNYQEAKDAF**  
**LGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECC**  
**AKDDPHACYSTVFDKLLKHLVDEPQNLIKQNCQDF**  
**EKLGEGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRS**  
 GKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLC**VLHE**  
**KTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK**  
**AFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHK**  
**PKATEEQLKTYMENFVAFVDKCCAADDKEACFAV**  
**EGPKLVVSTQTALA**

Figura 62: Sequências BSA com destaque para os fragmentos gerados na proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. A hidrólise ocorreria a esquerda do resíduo sublinhado. Em negrito estão as regiões detectadas no proteolisado.

Comparando-se os dois resultados é possível observar que os fragmentos gerados pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN são maiores que os obtidos pela TLN livre, e,

provavelmente, por isso uma maior parcela da BSA foi detectada pela proteólise com o NBC. Assim como ocorreu com a caseína do leite bovino, pode ter ocorrido uma mudança no padrão de hidrólise por causa da imobilização (ONG; TSANG; PERLMANN, 1966). Os fragmentos foram comparados com dois bancos de dados de peptídeos bioativos (BIOPEP e The Antimicrobial Peptide Database). Entre eles, foram detectados dois fragmentos com atividade inibidora da ECA, o LVL e o VEL. Os resultados obtidos nas duas proteólises mostram a capacidade da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN em gerar peptídeos bioativos, catalisando a digestão de proteínas com a vantagem de poder ser reutilizada. Esses resultados vão de encontro com os relatados por Rocha-Martin e col. (2018) que se utiliza de TLN e TRY imobilizada para obter peptídeos fosfatados.

Foi possível detectar alguns fragmentos que podem ser provenientes da autólise da TLN. Foram detectados 14 fragmentos da TLN livre e 4 da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN (**Tabela 22**).

**Tabela 22: Fragmentos detectados provenientes da autólise da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN e TLN livre.**

Catalisador	Sequência	[M+H](Exp)	[M+H](calc)	Delta	Peptídeo
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN	81-144	7034	7033,732	-0,268	(L)IGKQTDELGHTVMRFEQRYR GIPVYGAVLVAVHNDGELSS LSGTLIPNLDKRTLKTEAAI SIQQ(A)
	309-369	6755	6755,15	0,149	(G)VVYDYKKNVHGRLSYDGSNA AIRSTVHYGRGYNNAFWNGS QMVYGDGDGQTFPLPFGGGID V(V)
	393-409	1920,4	1919,909	-0,49	(G)AINEAMSDIFGTLVEFY(A)
	466-518	5811,38	5811,066	-0,313	(G)IINKAAYLLSQGGVHYGVSV TGIGRDKMGKIFYRALVYYL TPTSNFSQLRAAC(V)
TLN livre	13-16	407,23	407,229	-0,001	(L)AFGL(M)
	13-30	1928,59	1928,94	0,349	(L)AFGLMAWPFGASAKEKSM(V)
	14-17	467,12	467,232	0,112	(A)FGLM(A)
	42-45	349,2	349,172	-0,028	(F)VSGS(L)
	145-147	350,23	350,138	-0,091	(Q)AEM(I)
	174-182	1047,73	1047,511	-0,219	(V)IYPDGETPR(L)
	184-190	850,56	850,442	-0,118	(L)AYEVNVR(F)
	202-205	449,32	449,206	-0,113	(Y)MIDA(A)
	317-329	1346,9	1346,645	-0,255	(N)VHGRLSYDGSNAA(I)
	351-377	2788,25	2788,321	0,071	(M)VYGDGDGQTFPLPFGGGIDVV GHELTHA(V)
	460-478	1943,15	1943,034	-0,115	(G)VHTNSGIINKAAYLLSQGG(V)
	493-496	448,31	448,259	-0,051	(K)MGKI(F)
	519-521	317,26	317,182	-0,078	(C)VQA(A)
	543-546	437,31	437,239	-0,07	(A)VG VY

#### 4.1.10 Coagulação das proteínas do leite bovino pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN

Como explicado anteriormente, a TLN apresenta especificidade por ligações que contém resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas e grandes. Essa especificidade é similar à da quimosina, uma protease aspártica encontrada no coalho de bezerros e usada na etapa de coagulação do leite durante a fabricação de uma grande variedade de queijos. Atualmente é buscada uma alternativa ao uso de quimosina, uma vez que sua obtenção pela fonte natural envolve o abate de bezerros, tornando-a economicamente inviável atualmente e não sustentável (GOBBETTI; NEVIANI; FOX, 2018). A TLN pode ser utilizada como substituinte da quimosina, pois reconhece a ligação que é necessário ser hidrolisada para provocar a coagulação, a -Phe<sub>126</sub>-Met<sub>127</sub>- da κ-caseína. Não foi possível encontrar o fragmento íntegro no hidrolisado de 24 h da κ-caseína, mas foi encontrado o κ-CN f(127-142) proveniente da hidrólise desse fragmento. Com esses resultados foi demonstrada a capacidade da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN de provocar a coagulação do leite.

A **Figura 63** mostra as fases do processo de coagulação com imagens exemplificando. A reação foi realizada tanto com a TLN livre quanto com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, e em ambos os casos foi bem-sucedida (**Figura 64**). O reuso também foi feito, e a **Figura 65** mostra o resultado de 11 usos da mesma quantidade de NBCs.



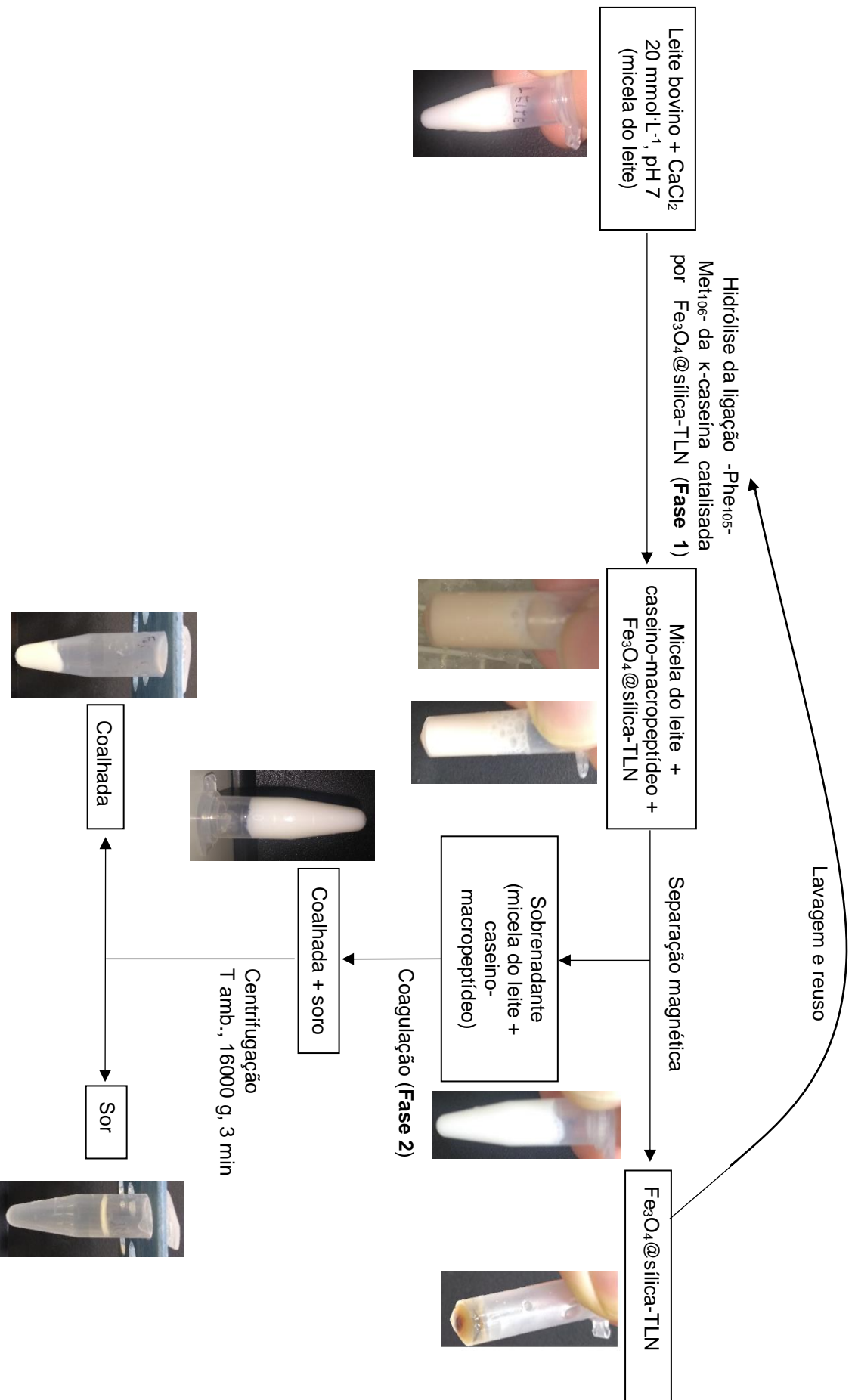


Figura 63: Procedimento usado na coagulação enzimática do leite bovino. Fase 1: 0 °C, 300 rpm, 30 min. Fase 2: temperatura ambiente, 30 min.

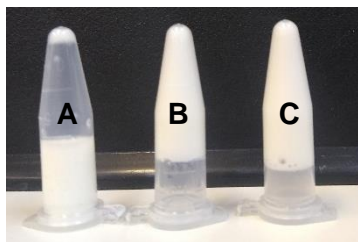


Figura 64: Resultado da coagulação do leite bovino pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN (B) e TLN livre (C). (A) Leite.

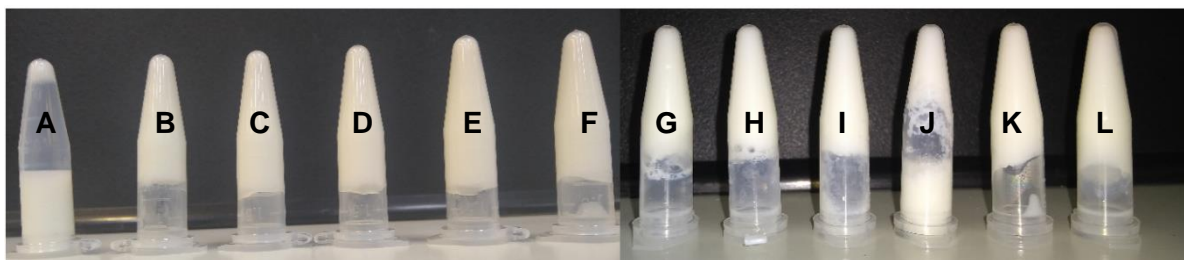
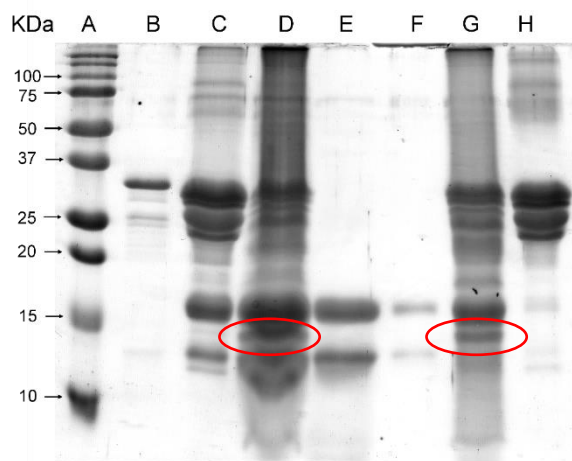


Figura 65: Ciclos de uso da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN como catalisador da coagulação do leite bovino após as etapas 1 e 2. (A) Leite bovino com  $\text{CaCl}_2$   $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (B) 1º uso; (C) 2º uso; (D) 3º uso; (E) 4º uso; (F) 5º uso; (G) 6º uso; (H) 7º uso; (I) 8º uso; (J) 9º uso; (K) 10º uso; (L) 11º uso.

O monitoramento do processo de coagulação foi feito por SDS-PAGE (Figura 66). Nele, é possível detectar as formas da caseína na região entre 24 e 33 kDa, principalmente no leite bovino e na amostra de caseína do leite bovino (Figura 66C e H). A proteólise é perceptível pela quantidade de fragmentos que aparecem após 30 min de hidrólise (Figura 66D). Entre os fragmentos, há um de massa  $\sim 13$  kDa, referente provavelmente é o para-k-caseína, peptídeo gerado pela hidrólise da ligação -Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>- e que seria um indicativo de que o leite coagulou. Esse fragmento só é detectado no meio de 30 min e no sólido, por ser insolúvel em água (Figura 66D e G) (DALGLEISH, 1993). Outro indicativo de que ocorreu a coagulação foi o soro não apresentar nenhuma forma da caseína (Figura 66E), indicando que as micelas do leite foram desestabilizadas e as formas da caseína precipitaram (PESSELA et al., 2004).

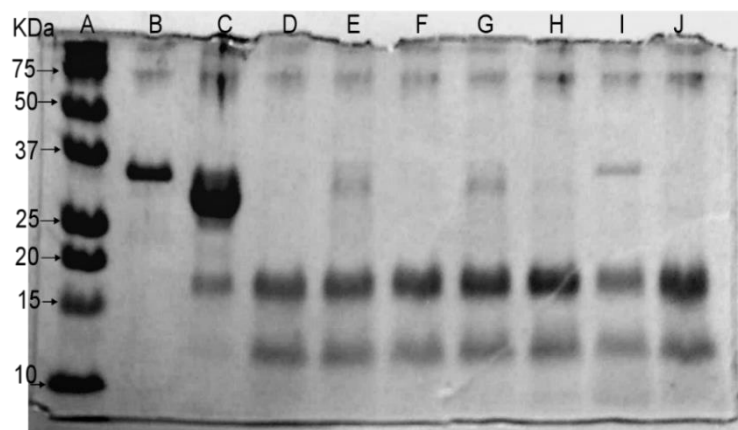
Também foi feito o monitoramento do reuso e da coagulação com a TLN livre por SDS-PAGE (Figura 67). Em todos os usos, a quase total ausência das formas da



**Figura 66:** Monitoramento por SDS-PAGE da coagulação do leite catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. (A) Padrão de massa molecular; (B) TLN; (C) Leite bovino com  $\text{CaCl}_2$  20 mmol.  $\text{L}^{-1}$ ; (D) Meio reacional após 30 min de hidrólise da ligação -Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>- da  $\kappa$ -caseína e separação magnética da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN (sobrenadante, Figura 25; fase 1); (E) Soro da coagulação (depois da centrifugação; Figura 25; fase 2); (F) Sobrenadante da lavagem da coalhada; (G) Parte da coalhada dissolvida e denaturada; (H) Caseína do leite bovino como referência. Marcado em vermelho: fragmento oriundo da hidrólise da ligação citada à cima, MM detectada = 13,6 KDa e MM teórica=13 kDa, Kim et al. 1968). Condições da eletroforese: 120V x 70 min. Coloração feita com corante Azul de Coomassie.

caseína do leite bovino indica que as coagulações foram bem-sucedidas (**Figura 67D a H**). A coagulação com a TLN livre também se mostrou bem-sucedida nas duas condições testadas. Os resultados obtidos mostram que a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN pode promover a coagulação do leite bovino por uma hidrólise controlada da  $\kappa$ -caseína, além de ser facilmente removido do meio e reutilizado por até 10 vezes. Os resultados obtidos indicam que a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN poderia substituir o coalho e ser utilizada na coagulação do leite com a vantagem do reuso. A TLN imobilizada foi pouco estudada como alternativa para o coalho. Os trabalhos que mais se destacam são os de Yun, que estudam desde a coagulação do leite (YUN et al., 1981; YUN; OHMIYA; SHIMIZU, 1982) até a produção de queijo utilizando um sistema em fluxo que se mostrou eficiente e com um tempo de maturação menor, porém com uma porcentagem maior de hidrólise de caseína (YUN, 1988), o que poderia interferir no sabor final do queijo, pois hidrolisados proteicos tendem a ter um sabor amargo (LI-CHAN; CHEUNG,

2010).



**Figura 67: Monitoramento por SDS-PAGE do ciclo de usos de TLN livre e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN na coagulação do leite bovino. (A) Padrão de massa molecular; (B) TLN livre; (C) Leite bovino com  $\text{CaCl}_2$  20  $\text{mmol. L}^{-1}$ ; (D) Soro do 1º uso; (E) Soro do 2º uso; (F) Soro do 3º uso; (G) Soro 4º uso; (H) Soro do 5º uso; I: Soro da coagulação com 170  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de TLN livre; J: Soro da coagulação com 17  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de TLN livre. Condições da eletroforese: 120V x 70 min. Coloração feita com corante**

## 4.2 Imobilização e aplicações da $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT

### 4.2.1 Imobilização da $\alpha$ -QT

A imobilização da  $\alpha$ -QT e caracterização da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT obtida foram descritas no trabalho de Liria e col. (2014). Essa enzima foi usada como ponto inicial desse projeto por apresentar uma especificidade que é complementar à TLN na síntese de peptídeos.

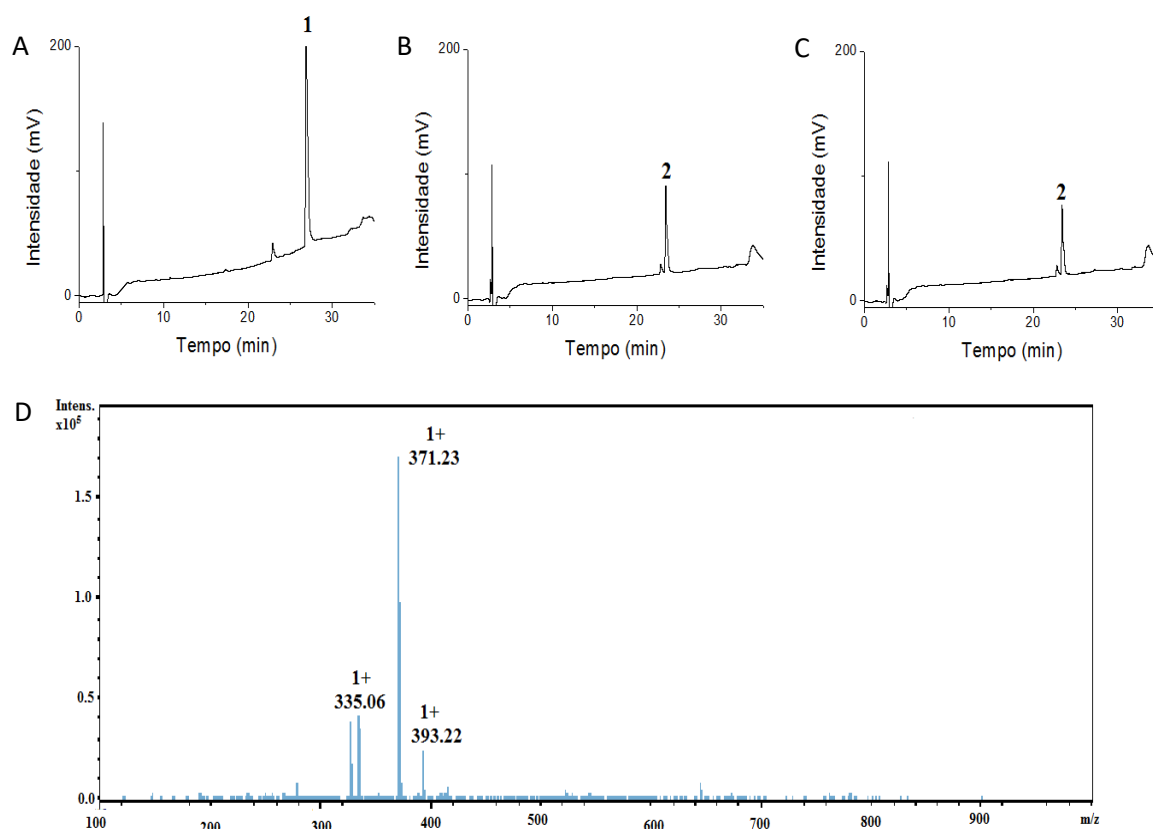
Para que a imobilização possa ser aplicada, é importante determinar sua atividade específica. Para isso, foi usada a hidrólise do Suc-AAPF-pNA como reação para determinar a atividade amidásica (LIRIA et al., 2014).

A  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT apresentou atividade de 42,1  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , o que representa uma queda significativa na atividade específica, já que a  $\alpha$ -QT livre apresentou 100  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Tal queda na atividade era esperada por já ser observada no trabalho anterior (LIRIA et al., 2014).

#### 4.2.2 Hidrólise de éster de dipeptídeos catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ QT

Além da sua atividade amidásica, o  $\alpha$ -QT é conhecida por apresentar atividade esterásica. Isso a torna interessante para ser aplicada na síntese de peptídeos, uma vez que muitos protetores de carboxila são ésteres. Para se avaliar a aplicação na hidrólise de ésteres, foi usado o substrato Z-Ala-Phe-OMe, um precursor do peptídeo amargo Ala-Phe. Sua síntese foi inicialmente estudada pelo nosso grupo em Ungaro e col. (2015).

Antes de se fazer o reuso do material, foi realizado um teste em microescala do procedimento. A **Figura 68A a C** apresenta o monitoramento por HPLC e identificação por LC/ESI-MS (**Figura 68D**, [M+H]<sup>+</sup> de 371.23).



**Figura 68:** Monitoramento da hidrólise do éster de Z-Ala-Phe-OMe. Condições HPLC: Vol. injeção 10  $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210 nm. Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h de reação; (B) 1 h de reação; (C) 2 h de reação (D) espectro de massas do produto isolado. 1: Z-Ala-Phe-OMe; 2: Z-Ala-Phe.

O monitoramento mostrou que a reação ocorreu com eficiência e que foi possível isolar o produto ao seu final. Verificou-se que 1 h de reação foi o suficiente para se consumir todo o substrato, o que corrobora com os resultados obtidos anteriormente (UNGARO et al., 2015) e com o trabalho de Flaschel e col. (1988) que obtiveram conversão peptídeos de 100% na hidrólise de estes de fenilalanina em meio bifásico. Inicialmente o reuso foi feito apenas quatro vezes em escala maior para se obter o produto em quantidade substancial para a remoção do grupo Z. O método utilizado para isolar o produto nesse reuso teve um rendimento de 71%.

No nosso trabalho de 2015 (Ungaro et al. 2015), a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT foi utilizada por até 10 ciclos seguidos. Por isso, neste trabalho tentou-se utilizá-la por 10 ciclos na condição em maior escala da hidrólise de éster. A **Figura 69** apresenta o monitoramento por HPLC com o meio reacional inicial e os meios finais dos ciclos 1, 5 e 10. Em todos os casos foi possível observar o consumo completo do substrato e a presença apenas do produto ao final. Esse reuso está de acordo com o resultado obtido por Hong e col. (2007), que imobilizaram a  $\alpha$ -QT covalentemente em nanogéis magnéticos e relataram que ela pode ser usada por até 6 ciclos para hidrolisar o éster etílico de N-Benzoil-L-tirosina praticamente sem perder atividade.

Na estratégia de quatro ciclos o substrato pareceu ser totalmente consumido, porém o rendimento final ficou em 71%, o que pode indicar uma perda de produto durante o processo. Para aumentar esse rendimento foi usado um cartucho Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  no processo de isolamento. A **Figura 70** apresenta o monitoramento desse isolamento. O rendimento médio obtido ao final dos 10 ciclos usando-se o Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  foi de 87 ( $\pm$  4)%, o que mostra uma maior eficiência no isolamento frente à solubilização com ACN.

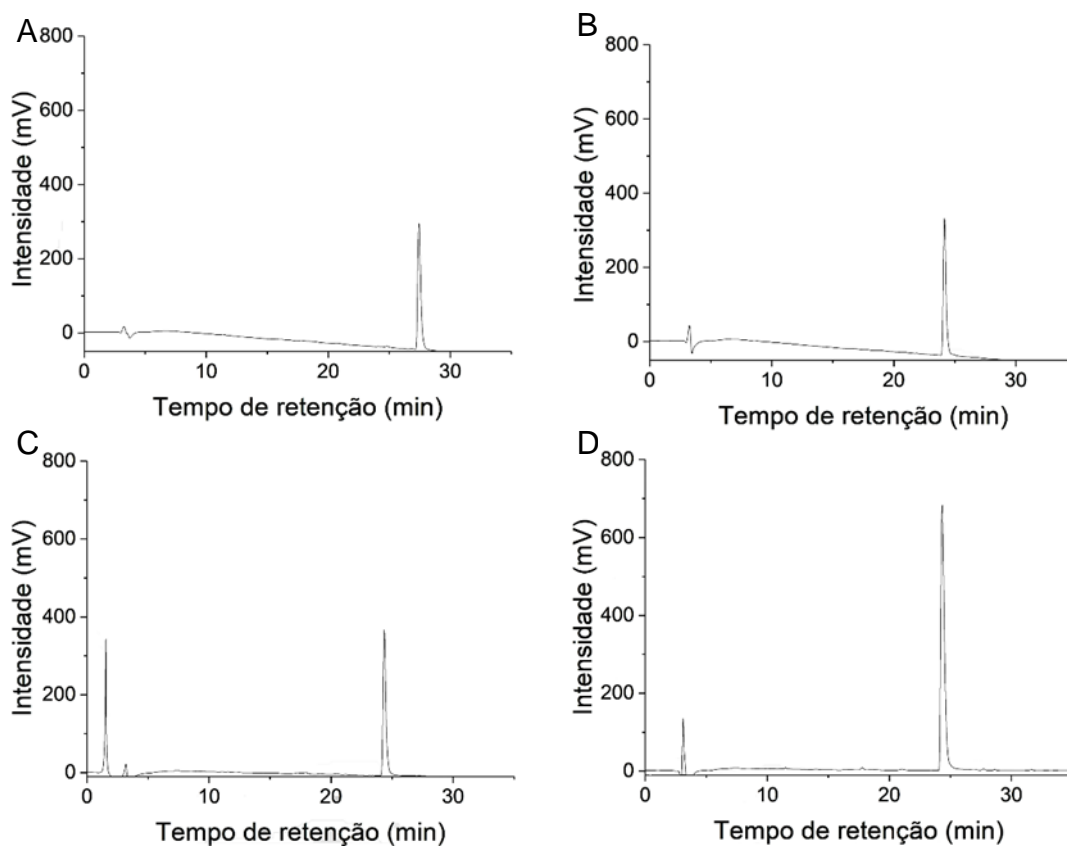


Figura 69: Monitoramento por RP-HPLC do reuso da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ QT na reação de remoção de éster do Z-Ala-Phe-OMe. (A) inicial; (B) 1º ciclo; (C) 5º ciclo; (D) 10º ciclo.

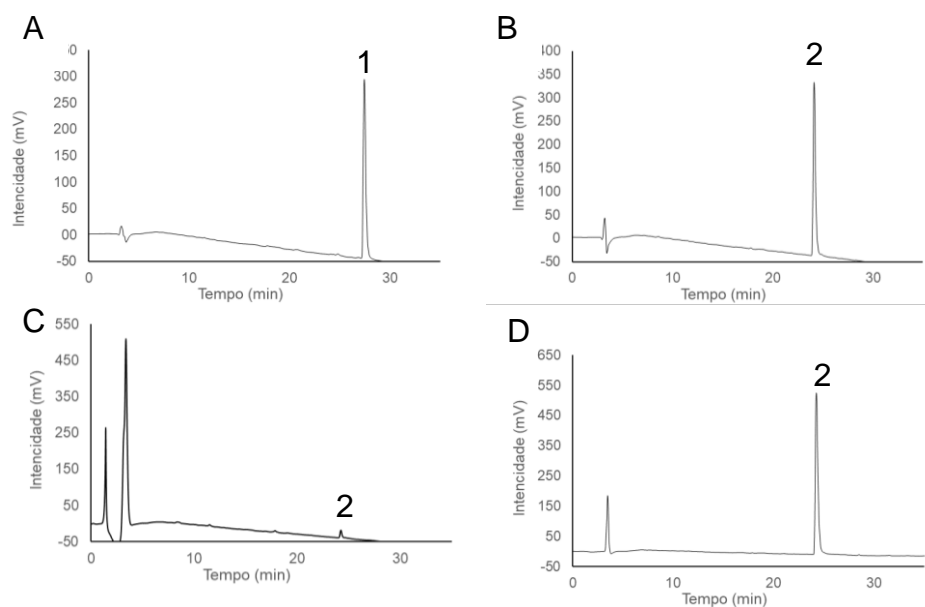
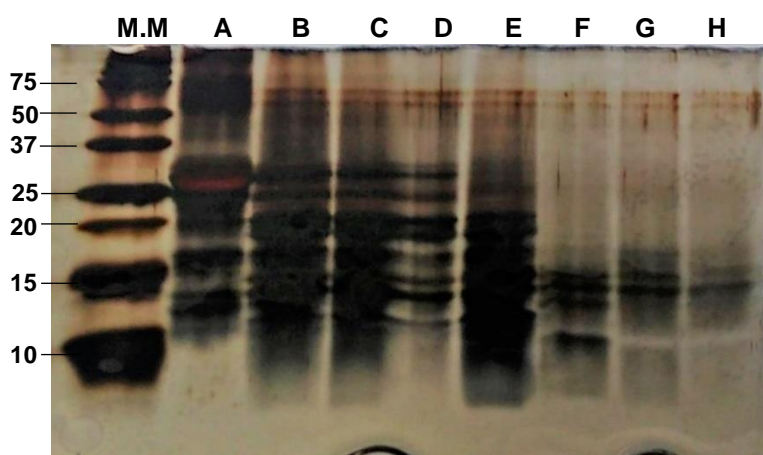


Figura 70: Monitoramento por RP-HPLC da hidrólise de Z-Ala-Phe-OMe e isolamento do produto. (A) inicial; (B) 2 h; (C) Meio reacional eluído; (D) Produto eluído. 1 Z-Ala-Phe-OMe; 2 Z-Ala-Phe.

#### 4.2.3 Proteólise da caseína do leite bovino pela $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT

Pelo fato da  $\alpha$ -QT apresentar uma especificidade diferente da TLN, a digestão da caseína bovina do leite gera fragmentos diferentes, o que permite: i) acessar peptídeos bioativos diferentes; ii) obter peptídeos de tamanhos diferentes; iii) ajudar em estudos proteômicos (TSIATSIANI; HECK, 2015). As seis primeiras horas da proteólise foram monitoradas por SDS-PAGE (**Figura 71**). Utilizando-se da mesma metodologia aplicada anteriormente, pela relação do log (massa molecular) pela  $\text{R}_m$  do padrão de massa molecular foi possível determinar a massa molecular das proteínas presentes no gel. No tempo 0 h (**Figura 71A**) é possível observar várias proteínas, e as caseínas estão presentes na região correspondente a proteínas com massas molares entre 24 e 36 kDa. Na 1ª hora (**Figura 71 B a E**) foi possível observar a digestão da caseína e a formação de fragmentos proteicos de massa molecular menor. A partir da 2ª hora (**Figura 71 F a H**) já não foi possível identificar as caseínas, e grande parte dos fragmentos de proteínas de menor massas molares já haviam sido digeridas. Após 6 h (**Figura 71 H**) de reação ainda foi possível identificar alguns fragmentos/proteínas com aproximadamente 14 kDa.



**Figura 71:** Monitoramento por SDS-PAGE da proteólise da BSA catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT. (A) 0 h; (B) 10 min; (C) 20 min; (D) 30 min; (E) 1 h; (F) 2 h; (G) 4 h; (H) 6 h. Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$ . Condições da eletroforese: 120V x 70 min. Coloração feita com prata.



A proteólise de 24 h foi analisada por LC/ESI-MS para identificação dos fragmentos proteicos. Os resultados apresentados na **Tabela 23** mostram de fato que o número de fragmentos é menor do que o observado na proteólise com TLN, provavelmente pela especificidade mais restrita da  $\alpha$ -QT. Foram encontrados 29 fragmentos distribuídos da seguinte maneira: 10 vindos da  $\alpha$ s1, 5 da  $\alpha$ s2, 10 da  $\beta$  e 4 da  $\kappa$ . Diferente do que ocorreu no proteolisado catalisado pela TLN, a distribuição ficou mais próxima da abundância de cada uma das formas da caseína do leite bovino. A **Figura 72** apresenta os fragmentos obtidos na sequência das caseínas.

**Tabela 23: Peptídeos encontrados no proteolisado de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ QT. Em cinza escuro: Fragmentos identificados no proteolisado catalisado pela  $\alpha$ QT livre e imobilizada.**

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
$\alpha$ s1-CN f(32–38)	904,6027	904,4766	0,1261	2	(L)NENLLRF(F)
$\alpha$ s1-CN f(107–114)	947,7127	947,5328	0,18	4	(Y)LGYLEQLL(R)
$\alpha$ s1-CN f(70–109)	4620,663	4621,225	0,5622	3	(M)EDIKQMEAESISSSEEIVPNSVEQKHQ KEDVPSERYLGY(L)
$\alpha$ s1-CN f(136–168)	3964,893	3964,939	-0,0465	5	(L)HSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYF (YPELFRQF(Y)
$\alpha$ s1-CN f(158–165)	1048,653	1048,491	0,1622	3	(L)AYFYPEL(F)
$\alpha$ s1-CN f(166–169)	612,4427	612,302	0,1407	1	(F)RQFY(Q)
$\alpha$ s1-CN f(170–179)	1106,653	1106,503	0,1495	1	(Y)QLDAYPSGAW(Y)
$\alpha$ s1-CN f(180–188)	1102,683	1102,534	0,1492	3	(W)YYVPLGTQY(T)
$\alpha$ s1-CN f(181–188)	939,6427	939,4702	0,1725	2	(Y)YVPLGTQY(T)
$\alpha$ s1-CN f(181–214)	3755,163	3754,771	0,3915	5	(Y)YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSE KTTMPLW(-)
$\alpha$ s2-CN f(111–115)	698,4927	698,3639	0,1288	3	(Y)LQYLY(Q)
$\alpha$ s2-CN f(116–124)	1022,723	1022,555	0,1678	1	(Y)QGPIVLNPW(D)
$\alpha$ s2-CN f(169–186)	2295,443	2295,234	0,2093	3	(L)TEEEKNRLNFKKISQRY(Q)
$\alpha$ s2-CN f(187–195)	1106,653	1106,612	0,0403	2	(Y)QKFALPQYL(K)
$\alpha$ s2-CN f(187–199)	1598,063	1597,887	0,1759	3	(Y)QKFALPQYLKTVY(Q)
$\beta$ -CN(141–154)	1574,113	1573,872	0,2412	2	(L)TLTDVENLHLPLPL(L)
$\beta$ -CN(141–158)	2088,453	2088,126	0,3272	4	(L)TLTDVENLHLPLPLLQSW(M)
$\beta$ -CN(149–154)	688,5327	688,4272	0,1055	0	(L)HLPLPL(L)
$\beta$ -CN(149–158)	1202,873	1202,681	0,1916	2	(L)HLPLPLLQSW(M)
$\beta$ -CN(155–158)	532,3627	532,2645	0,0982	1	(L)LQSW(M)
$\beta$ -CN(159–178)	2280,473	2280,155	0,318	0	(W)MHQPHQLPPTVMFPQSVL(S)
$\beta$ -CN(206–208)	407,2927	407,242	0,0507	2	(F)LLY(Q)
$\beta$ -CN(206–224)	2106,533	2106,224	0,3086	4	(F)LLYQEPVLPVVRGPFPIIV(-)
$\beta$ -CN(207–224)	1993,453	1993,14	0,3126	3	(L)LYQEPVLPVVRGPFPIIV(-)
$\beta$ -CN(208–224)	1880,343	1880,056	0,2867	2	(L)YQEPVLPVVRGPFPIIV(-)
$\kappa$ -CN(40-63)	2850,59	2850,503	0,0871	5	(F)SDKIAKYIPIQYVLSRYPYGLNYSKI AKYIPIQYVLSRYPYGLNY(Y)
$\kappa$ -CN(47-59)	1598,07	1597,858	0,212	2	(Y)IPIQYVLSRYPY(G)
$\kappa$ -CN(72-81)	1267,79	1267,631	0,159	1	(L)INNQLFPYPY(Y)
$\kappa$ -CN(82-97)	1798,23	1797,996	0,234	2	(Y)YAKPAAVRSPAQILQW(Q)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**A**  
 RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVA  
 PFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQ  
 AMEDIKQMEAESISSSEEIVPNSVEQK  
**HIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYK**  
 VPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQ  
**KEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLD**  
 AYPGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIP  
**NPIGSENSEKTT MPLW**

**B**  
 KNTMEHVSSSEESIISQETYKQEKNM  
 AINPSKENL CSTFCKEVVRNANEEY  
 SIGSSSEESAEVATEEVKITVDDKHQYQ  
 KALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVL  
**NPWDQVKNRNPITPTLNREQLSTSE**  
 ENSKKTVDMESTEVEFTKTKL TEEK  
**NRLNFLKISQRYQKFALPQYLKTVY**  
 QHQKAMKPW IQPKTKVIPYVRYL

**C**  
 RELEELNVPGEIVESLSSEESTRINK  
 KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPEAQT  
 QSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPV  
 VVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKHK  
 EMPFPKYPVEPFETESQSLTLTDVENL  
**HLPLLLQSWMHQPHQLPPTVMFP**  
**PQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRD**  
 MPIQAFLLYQEPVLPVGRGPFPIIV

**D**  
 QEQNQEPIRCEKDERFFSDKIAKY  
**IPIQYVLSRYPYGLNYYQQKVALI**  
**NNQFLPYPYAKPAAVRSPAQLQ**  
**WQVLSNTVPAKSCQAQPTT MARHP**  
 HPHLSFMAIPPKKNQDKTEIPTINTIA  
 SGEPTSTPTTEAVESTVATLED SPE  
 VIESPPEINTVQVTSTAV

Figura 72: Sequências das quatro formas da caseína bovina do leite com destaque para os fragmentos gerados na proteólise com a  $Fe_3O_4@silica-\alpha$ -QT. (A)  $\alpha$ s1-caseína; (B)  $\alpha$ s2-caseína e (C)  $\beta$ -caseína; (D)  $\kappa$ -caseína. Em negrito: regiões detectadas.

A Tabela 24 mostra os peptídeos obtidos pela proteólise catalisada pela  $\alpha$ -QT livre. Ela gerou 32 fragmentos com uma distribuição um pouco diferente: 10 vindos da  $\alpha$ s1, 7 da  $\alpha$ s2, 14 da  $\beta$  e 2 da  $\kappa$ . A diferença foi de 4 fragmentos no total, o que pode indicar que a imobilização não influencia na eficiência do processo, corroborando com o resultado obtido para a TLN.

Tabela 24: Peptídeos encontrados no proteólise de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela  $\alpha$ QT livre. Em cinza escuro: Fragmentos identificados no proteólise catalisado pela  $\alpha$ QT livre e imobilizada.

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
$\alpha$ s1-CN f(32–38)	904,5827	904,4766	0,1061	2	(L)NENLLRF(F)
$\alpha$ s1-CN f(32–39)	1051,663	1051,545	0,1177	3	(L)NENLLRFF(V)
$\alpha$ s1-CN f(107–110)	464,3227	464,2635	0,0592	2	(Y)LGYL(E)
$\alpha$ s1-CN f(107–114)	947,6727	947,5328	0,14	4	(Y)LGYLEQLL(R)
$\alpha$ s1-CN f(120–159)	4620,463	4620,287	0,1758	3	(Y)KVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHA QQKEPMIGVNQELAY(F) + $PO_4^{3-}$
$\alpha$ s1-CN f(166–169)	612,4027	612,302	0,1007	1	(F)RQFY(Q)
$\alpha$ s1-CN f(170–179)	1106,633	1106,503	0,1295	1	(Y)QLDAYPSGAW(Y)
$\alpha$ s1-CN f(180–188)	1102,653	1102,534	0,1192	3	(W)YYVPLGTQY(T)
$\alpha$ s1-CN f(181–188)	939,6227	939,4702	0,1525	2	(Y)YVPLGTQY(T)
$\alpha$ s1-CN f(181–214)	3755,003	3754,771	0,2315	5	(Y)YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSEN SEKTTMPLW(-)
$\alpha$ s2-CN f(163–179)	2091,363	2091,169	0,194	3	(F)TKKTKL TEEKNRLNFL(K)
$\alpha$ s2-CN f(169–179)	1391,903	1391,705	0,1983	2	(L)TEEKNRLNFL(K)
$\alpha$ s2-CN f(179–189)	1438,003	1437,846	0,1571	2	(F)LKKISQRYQKF(A)
$\alpha$ s2-CN f(187–195)	1106,633	1106,612	0,0203	2	(Y)QKFALPQYL(K)
$\alpha$ s2-CN f(195–222)	3455,803	3455,963	-0,1604	5	(Y)LKTVYQHQKAMKPW IQPKTKVIPY VRYL(-)
$\alpha$ s2-CN f(209–222)	1717,223	1717,029	0,1937	2	(W)IQPKTKVIPYVRYL(-)
$\alpha$ s2-CN f(219–222)	549,4027	549,3275	0,0753	1	(Y)VRYL(-)

$\beta$ -CN f(68–102)	3753,213	3753,018	0,1945	2	(F)AQTQSLVYFPFGPIPNLSLPQNIPPLTQTPVVVPPF(L)
$\beta$ -CN f(74–103)	3237,953	3237,784	0,1685	2	(L)VYFPFGPIPNLSLPQNIPPLTQTPVVVPPF(L)
$\beta$ -CN f(93–103)	1196,713	1196,681	0,0322	1	(L)TQTPVVVPPF(L)
$\beta$ -CN f(141–154)	1574,063	1573,872	0,1912	2	(L)TLTDVENLHLPLPL(L)
$\beta$ -CN f(141–155)	1687,143	1686,956	0,1871	3	(L)TLTDVENLHLPLPL(Q)
$\beta$ -CN f(141–158)	2088,383	2088,126	0,2572	4	(L)TLTDVENLHLPLPLQSW(M)
$\beta$ -CN f(155–158)	532,3427	532,2645	0,0782	1	(L)LQSW(M)
$\beta$ -CN f(159–178)	2280,383	2280,155	0,228	0	(W)MHQPHQPLPPTVMFPPQSVL(S)
$\beta$ -CN f(179–205)	3023,843	3023,627	0,2161	1	(L)SLSQSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQAF(L)
$\beta$ -CN f(181–206)	2936,863	2936,595	0,2681	1	(L)SQSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQAF(L)
$\beta$ -CN f(206–224)	2106,463	2106,224	0,2386	4	(F)LLYQEPVLGPVRGPFPIIV(-)
$\beta$ -CN f(207–224)	1993,403	1993,14	0,2626	3	(L)LYQEPVLGPVRGPFPIIV(-)
$\beta$ -CN f(208–224)	1880,273	1880,056	0,2167	2	(L)YQEPVLGPVRGPFPIIV(-)
$\beta$ -CN f(209–224)	1717,223	1716,993	0,23	1	(Y)QEPVLGPVRGPFPIIV(-)
$\kappa$ -CN f(40-51)	1438,01	1437,794	0,216	1	(F)SDKIAKYIPIQY(V)
$\kappa$ -CN f(72-81)	1267,75	1267,631	0,119	1	(L)INNQFLPYPY(Y)

\* Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

Comparando-se as **Tabelas 23** e **24** é possível observar uma grande quantidade de fragmentos com ligações peptídicas que não foram hidrolisadas, o que sugere que a proteólise não foi total na condição empregada. Também foi possível observar diferenças entre os fragmentos obtidos pela catálise usando a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT e a  $\alpha$ -QT livre, indicando que a imobilização afetou a interação enzima-substrato, como ocorreu com a TLN. Os fragmentos cobrem 60% da  $\alpha$ 1, 21% da  $\alpha$ 2, 28% da  $\beta$  e 24% da  $\kappa$  para a proteólise com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT. Yamaguchi e col. (2010) estudaram um microreator com a  $\alpha$ -QT imobilizada, obtendo uma cobertura de 57% da  $\beta$ , mas as condições aplicadas em seu trabalho foram diferentes. Quanto à autólise, foram encontrados três possíveis fragmentos provenientes da  $\alpha$ -QT em ambos os proteolisados. Foram detectados 7 fragmentos de autólise na proteólise com  $\alpha$ -QT livre e 6 na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT (**Tabela 25**).

**Tabela 25: Fragmentos detectados provenientes da autólise da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT e  $\alpha$ -QT livre.**

Catalisador	Sequência	[M+H](Exp)	[M+H](calc)	Delta	Peptídeo
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica- $\alpha$ -QT	1-13	1253,69	1253,692	-0,002	CGVPAIQPVLSGL(S)
	1-29	3018,87	3018,551	0,319	CGVPAIQPVLSGLSRIVNGE EAVPGSWPW(Q)
	109-130	2191,32	2190,986	0,334	(L)STAASFSQTVSAVCLPSASD DF(A)
	109-143	3409,99	3409,556	0,433	(L)STAASFSQTVSAVCLPSASD DFAAGTTCVTTGWGL(T)
	164-192	3054,77	3054,397	0,372	(L)SNTNCKKYWGTKIKDAMICA GASGVSSCM(G)
	200-215	1761,17	1760,952	0,218	(L)VCKKNGAWTLVGIVSW(G)
A-QT livre	1-13	1253,65	1253,692	-0,042	CGVPAIQPVLSGL(S)
	1-29	3018,74	3018,551	0,189	CGVPAIQPVLSGLSRIVNGE EAVPGSWPW(Q)
	47-83	3919,06	3918,918	0,142	(L)INENWVVTAHCGVTTSDVV VAGEFDQGSSEKIQL(K)
	109-130	2191,3	2190,986	0,314	(L)STAASFSQTVSAVCLPSASD DF(A)
	109-143	3409,88	3409,556	0,323	(L)STAASFSQTVSAVCLPSASD DFAAGTTCVTTGWGL(T)
	147-180	3820,99	3820,947	0,042	(Y)TNANTPDRLQQASLPLSNT NCKKYWGTKIKDAM(I)
	200-215	1761,1	1760,952	0,148	(L)VCKKNGAWTLVGIVSW(G)

Como feito na proteólise catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, foram determinados fragmentos com potencial bioatividade por similaridade. Dentre todos os fragmentos identificados, aproximadamente 38% poderiam ser bioativos. A **Tabela 26** apresenta esses peptídeos, sendo possível notar que, novamente, a maioria se refere a peptídeos com atividade inibidora de ECA.

Os resultados eram esperados pois, a  $\alpha$ -QT é utilizada para gerar diversos peptídeos bioativos a partir da proteólise de diferentes proteínas. Kumar e col. (2016) utilizaram a  $\alpha$ -QT e outras duas endopeptidases (alcalase e papaína) para proteolisar caseína do leite de camelo e obter peptídeos antioxidantes. Apesar de bem-sucedidos, os pesquisadores não tentaram identificar todos os fragmentos gerados no processo. A  $\alpha$ -QT também foi utilizada para catalisar a proteólise de proteínas de cogumelos comestíveis (*Agaricus bisporus* e *Terfezia claveryi*), tanto sozinha quanto com outras endopeptidase. O proteolisado quimotríptico mostrou atividade antioxidante e antimicrobiana, mas os proteolisados por ações da  $\alpha$ -QT com as outras

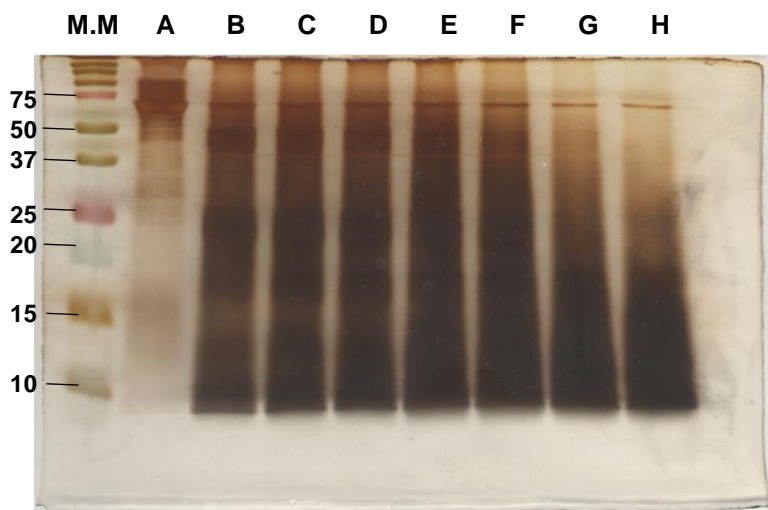
**Tabela 26: Peptídeos potencialmente bioativos encontrados no proteólise resultantes da catálise por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ QT (24h).**

Peptídeo encontrado	Posição	Peptídeo conhecido	Bioatividade	Referencia
NENLLRF	$\alpha$ s1-CN (32-38)	ENLLRF	Inibição da ECA	(QUIRÓS et al., 2005)
LGYLEQLL	$\alpha$ s1-CN (107-114)	LGYLEQLLRL	Antimicrobiana	(LIU; EICHLER; PISCHETSRIEDER, 2015)
AYFYPELF	$\alpha$ s1-CN (158-165)	AYFYPEL	Opioide	(MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2012)
QLDAYPSGAW	$\alpha$ s1-CN (170-179)	DAYPSGAW	Inibição da ECA	(PIHLANTO-LEPPÄLÄ; ROKKA; KORHONEN, 1998)
YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTPLW	$\alpha$ s1-CN (181-214)	GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	Inibição da ECA	(YAMAMOTO; AKINO; TAKANO, 1994)
QKFALPQYL	$\alpha$ s2-CN (187-195)	FALPQYLK	Antioxidante	(LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2007)
TLTDVENLHLPLPL	$\beta$ -CN (141-154)	VENLHLPLPLL	Inibição da ECA	(ROBERT et al., 2004)
HLPLPL	$\beta$ -CN (149-154)	HLPLP	Inibição da ECA	(KOHMURA et al., 1989)
LQSW	$\beta$ -CN (155-158)	LQSW	Inibição da ECA	(MAENO; YAMAMOTO; TAKANO, 1996)
LLY	$\beta$ -CN (206-208)	LLY	Imunoregulação	(BERTHOU et al., 1987)
LYQEPVLGPVRGPFPIIV	$\beta$ -CN (207-224)	LLYQEPVLGPV RGPFPPIIV	Inibição da ECA	(YAMAMOTO; AKINO; TAKANO, 1994)

enzimas foram mais eficientes (FARZANEH et al., 2018). Castillo e col. (2017) usaram a  $\alpha$ -QT para proteolisar o extrato de proteínas da semente de quiabo e obter peptídeos com atividade inibidora de ECA. Os pesquisadores mostraram que foi possível obter peptídeos usados na prevenção e tratamento de hipertensão.

#### 4.2.4 Proteólise da BSA catalisada por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ QT

O monitoramento das primeiras horas de proteólise foi feito por SDS-PAGE (Figura 73). No tempo 0 h (Figura 73A) a BSA se encontra na banda que corresponde à massa molecular de 65 a 76 kDa, e foi consumida ao longo do tempo conforme observado pela gradativa diminuição na intensidade dessa região (Figura 73B a H). Diferente da proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, é difícil observar bandas bem definidas. Isso pode ocorrer porque a especificidade da  $\alpha$ -QT reconhece menos resíduos de aminoácidos, o que pode gerar fragmentos maiores que, por consequência, apresentam uma maior massa, sendo retidos ao longo do gel.



**Figura 73:** Perfil eletroforético do monitoramento da proteólise da BSA catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT. (A) 0 h; (B) 10 min; (C) 20 min; (D) 30 min; (E) 1 h; (F) 2 h; (G) 4 h; (H) 6 h. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

Foram detectados 24 fragmentos no proteolisado com os NBCs, correspondendo a 23% da sequência da BSA. Esses fragmentos estão apresentados na **Tabela 27**. A **Figura 74** apresenta a sequência e as regiões detectadas. A **Tabela 28** mostra os fragmentos detectados no proteolisado com a  $\alpha$ -QT livre. Foram 35 fragmentos, cobrindo 30% da sequência da BSA. Comparando-se as duas proteólises é possível notar que 54% dos fragmentos são comuns a ambos os proteolisados. Nos dois proteolisados foram detectados fragmentos da  $\alpha$ -QT, e em ambos os casos foram observados 4 peptídeos com sequências diferentes (**Tabela 29**).

**Tabela 27:** Peptídeos encontrados no proteolisado de BSA após 24h de reação catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ QT. Em cinza escuro: Fragmentos identificados no proteolisado catalisado pela  $\alpha$ QT livre e imobilizada.

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
36–43	973,6027	973,4505	0,1522	1	(F)KDLGEEHF(K)
44–54	1237,763	1237,707	0,0557	3	(F)KGLVLIAFSQQ(L)
44–55	1350,843	1350,791	0,0516	4	(F)KGLVLIAFSQQ(L)
52–55	509,3027	509,2486	0,0542	1	(F)SQQ(L)
158–163	828,5227	828,417	0,1057	3	(F)WGKLY.E
172–173	328,2527	328,1423	0,1104	1	(Y)FY(A)
172–178	851,5527	851,4429	0,1098	3	(Y)FYAPELL(Y)
174–179	704,3427	704,3745	-0,0317	2	(Y)APELL(Y)
258–261	446,3027	446,2377	0,0651	0	(L)VTDL(T)
287–298	1415,923	1415,6	0,3224	0	(Y)ICDNQDTISSKL(K) + $\text{PO}_4^{3-}$
356–357	310,2227	310,1165	0,1063	0	(Y)EY(S)
105–108	567,2725	567,2669	0,0056	0	(L)RETY(G)
394–397	452,3027	452,2271	0,0756	0	(Y)STVF(D)
398–400	374,2327	374,2165	0,0162	0	(F)DKL(K)
401–403	396,2227	396,2485	-0,0258	0	(L)KHL(V)

411-424	1713,133	1713,803	-0,6705	2	(L)IKQNCQFEKLG(EY)(G)
422-446	3076,343	3076,423	-0,0798	4	(L)GEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTL(V) + 3 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
425-430	648,4027	648,3231	0,0796	1	(Y)GFQNAL(I)
447-453	788,5927	788,4392	0,1535	0	(L)VEVSRSL(G)
487-511	2890,093	2890,425	-0,3324	1	(L)HEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCF(S)
512-520	995,5427	995,4447	0,098	1	(F)SALTPDETY(V)
515-520	724,5127	724,2916	0,2212	0	(L)TPDETY(V)
526-530	650,4327	650,3275	0,1052	1	(F)DEKLF(T)
575-577	335,2427	335,1845	0,0582	0	(F)VAF(V)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

DTHKSEIAHREKDLGEEHFKGLVLIAFSQQYLLQCCP  
 FDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFG  
 DELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSH  
 KDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKKFWGKLYLE  
 IARRHPYFYAPPELLYYANKYNGVFECCQAEDKGA  
 CLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFEGERALK  
 AWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCH  
 GDLLCADDRADLAKYICDNQDTISSKLECCDKP  
 LLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKN  
 YQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYE  
 ATLECCAADDPHACYSTVFDKLEKHLVDEPQNLIK  
 QNCQFEKLG(EY)GFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLV  
 EVSRSLGKVGTRCCTKPESEMPCTEDYLSLILNR  
 LCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPD  
 ETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVE  
 LLKHKPKATEEQKTMENEFVAFVDKCCAADDKEA  
 CFAVEGPKLVVSTQTALA

Figura 74: Sequências BSA com destaque para os fragmentos gerados na proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT. A hidrólise ocorreria a direita do resíduo sublinhado. Em negrito estão as regiões detectadas no proteolisado.

Tabela 28: Peptídeos encontrados no proteolisado de BSA após 24h de reação catalisada pela  $\alpha$ -QT livre. Em cinza escuro: Fragmentos identificados no proteolisado catalisado pela  $\alpha$ QT livre e imobilizada.

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
36-43	973,5827	973,4505	0,1322	1	(F)KDLGEEHF(K)
39-51	1458,763	1458,7871	-	3	(L)GEEHFKGLVLIAF(S)
44-46	316,2027	316,211	-	0	(F)KGL(V)
44-51	859,5827	859,5531	0,0296	2	(F)KGLVLIAF(S)
44-54	1237,743	1237,707	0,0357	3	(F)KGLVLIAFSQQY(L)
44-55	1350,873	1350,7911	0,0816	4	(F)KGLVLIAFSQQY(Q)
52-54	396,2027	396,1645	0,0382	0	(F)SQQY(L)
61-66	739,4927	739,3864	0,1063	0	(F)DEHVKLV(V)
67-70	473,2727	473,2486	0,0242	0	(L)VNEL(T)
127-158	3755,983	3755,8505	0,1322	5	(F)LSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKKFW(G)
158-163	828,4827	828,417	0,0657	3	(F)WGKLYLE
173-184	1506,963	1506,7394	0,2233	5	(F)YAPPELLYYANKY(N)
174-178	541,4227	541,3111	0,1116	1	(Y)APPELL(Y)
179-180	344,1927	344,1372	0,0555	1	(L)YY(A)
230-251	2518,623	2518,3808	0,2419	3	(F)GERALKAWSVARLSQKFPKAEF(V)
235-237	403,2827	403,2219	0,0608	0	(L)KAW(S)
238-251	1606,203	1606,8831	-	1	(W(S)VARLSQKFPKAEF(V)
258-261	446,2827	446,2377	0,0451	0	(L)VTDL(T)
351-354	422,2927	422,2165	0,0762	1	(L)GSFL(Y)
354-376	2854,383	2854,5129	-	7	(F)LYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYE
			0,1302		

358-364	943,7127	943,4624	0,2503	0	(Y)SRRHPEY(A)
370-372	400,3427	400,2798	0,0629	1	(L)LRL(A)
394-397	452,3027	452,2271	0,0756	0	(Y)STVF(D)
394-403	1186,613	1186,671	-	2	(Y)STVFDKCLKHL(V)
			0,0583		
398-400	374,2527	374,2165	0,0362	0	(F)DKL(K)
422-424	367,1727	367,1379	0,0348	0	(L)GEY(G)
422-426	571,3027	571,2278	0,0749	1	(L)GEYGF(Q)
425-430	648,4027	648,3231	0,0796	1	(Y)GFQNAL(I)
447-453	788,5727	788,4392	0,1335	0	(L)VEVSRSL(G)
476-478	331,2527	331,2107	0,042	1	(Y)LSL(I)
477-480	444,2927	444,2948	-0,002	1	(L)SLIL(N)
515-520	724,5127	724,2916	0,2212	0	(L)TPDETY(V)
526-530	650,4227	650,3275	0,0952	1	(F)DEKLF(T)
575-577	335,2127	335,1845	0,0282	0	(F)VAF(V)
599-606	817,4927	817,4545	0,0382	0	(L)VVSTQTAL(A)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**Tabela 29: Fragmentos detectados provenientes da autólise da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT e  $\alpha$ -QT livre.**

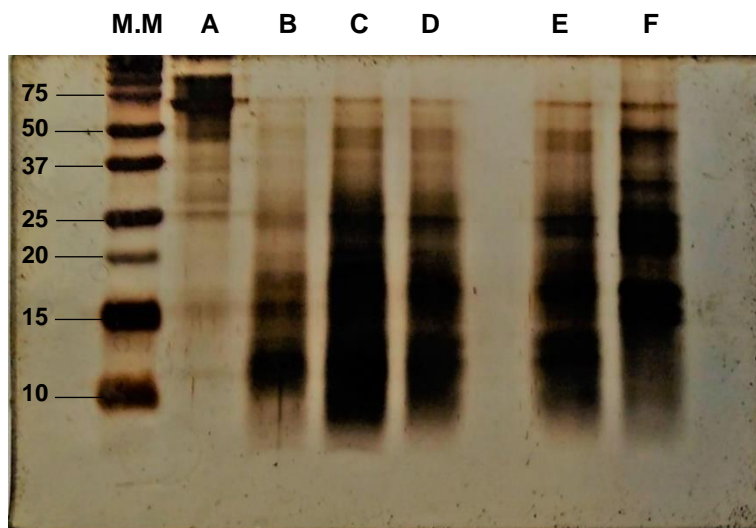
Catalisador	Sequência	[M+H](Exp)	[M+H](calc)	Delta	Peptídeo
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica- $\alpha$ -QT	164-172	1143,18	1143,525	-0,345	(L)SNTNCKKYW(G)
	210-215	660,46	660,372	-0,088	(L)GIVSW(G)
	210-245	3723,93	3723,88	-0,05	(L)VGIVSWGSSSTCSTSTPGVYA RVTALVNWVQQTAAAN
	238-245	844,54	844,452	-0,087	(W)VQQTAAAN
A-QT livre	1-10	996,55	996,555	0,004	CGVPAIQPVL(S)
	1-14	3445,65	3445,794	0,143	CGVPAIQPVL SGLSRIVNGE EAVPGSWPWQVSL(Q)
	90-94	639,38	639,346	-0,033	(F)KNSKY(N)
	210-215	660,47	660,372	-0,098	(L)VGIVSW(G)

A comparação com os dois bancos de dados (BIOPEP e The Antimicrobial Peptide Database) indicou três sequências com atividade inibidora da ECA: FY, EY e VAF.

Assim como feito para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, o reuso da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT foi determinado pela proteólise da BSA. Na **Figura 75** é possível observar o consumo da BSA (66 kDa) pela queda na intensidade da banda correspondente a BSA e pelo aparecimento de diversos fragmentos com massa molecular inferior em todos os usos indica que ela pode ser reutilizada, porém a proteólise parece mais acentuada no 1º uso do que nos demais pela intensidade das bandas presentes (**Figura 75A**), o que indica uma perda na atividade com o uso recorrente. Tal perda é comparável com o obtido por Ju e col. (2012) que imobilizaram a  $\alpha$ -QT em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-quitosina e mostraram que ela reteve mais de 50% da atividade inicial depois de 12 usos na síntese do



dipeptídeo protegido *N*-Ac-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>. A Perda de atividade da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT também foi observada no reuso para a hidrólise do Bz-DL-Tyr- pNA apresentado em Liria e col. (2014).



**Figura 75:** Perfil eletroforético dos meios reacionais do reuso da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT frente a BSA. (A) 0 h; (B) 1º uso; (C) 2º uso; (D) 3º uso; (E) 4º uso; (F) 5º uso. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu$ g Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

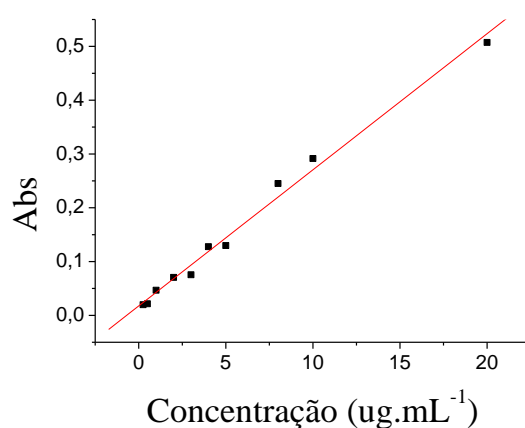
### 4.3 Imobilização, caracterização e aplicações da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY

#### 4.3.1 Imobilização da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY

A TRY foi imobilizada seguindo os mesmos procedimentos adotados para a TLN e para a  $\alpha$ -QT. Inicialmente, essa imobilização foi feita a 37 °C pois essa temperatura já havia se mostrado efetiva para TLN e  $\alpha$ -QT. Posteriormente, foram feitas imobilizações a 4 °C, pois foram encontrados na literatura alguns trabalhos que utilizam essa temperatura para imobilizar a TRY (ATACAN; ÖZACAR, 2015; WANG et al., 2017a). Esse processo ajudaria a diminuir a autólise, já que a TRY fica menos ativa em temperaturas mais baixas. As diferenças entre duas condições serão apresentadas em suas devidas itens.

#### 4.3.2 Conteúdo proteico e morfologia da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY

Assim como adotado com a TLN, o conteúdo proteico foi determinado tanto pela análise da solução de imobilização pelo método de Bradford como por hidrólise total ácida seguida da análise de aminoácidos da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY obtida. Pelo método de Bradford foi feita uma comparação de quanto de enzima havia no meio de imobilização antes e o quanto sobrou após a reação, que pode se calcular com a ajuda de uma curva padrão de BSA (**Figura 76**).

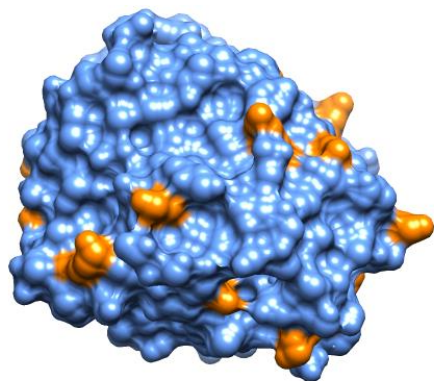


**Figura 76:** Curva padrão de albumina.  $Y=0,0253.X+0,01756$ .  $r^2=0,99$ .

Quando se compara a quantidade de enzima consumida/imobilizada (**Tabela 30**) nas três condições de imobilização e pelos dois métodos de análise há uma grande diferença entre a imobilização a 37 °C e a 4 °C. Isso ocorre devido a autólise da TRY que ser mais intensa a 37 °C do que a 4 °C. A **Figura 77** apresenta em laranjas as cadeias laterais que formariam a base de Schiff com as NPs.

**Tabela 30: Conteúdo proteico por método de Bradford e por hidrólise total ácida seguida por análise de aminoácidos da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY.**

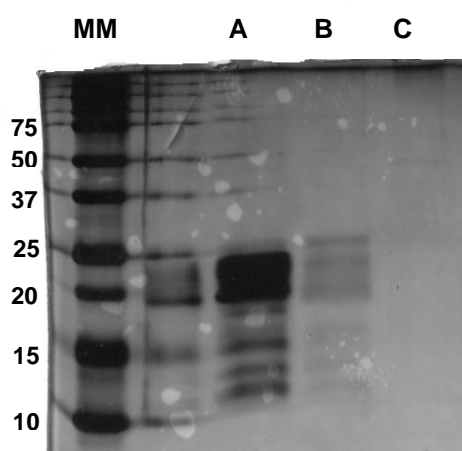
Temp. de imobilização (°C)	Tempo de imobilização (h)	Método de Bradford (nmol de enzima.mg <sup>-1</sup> de NP)	Análise de aminoácidos (nmol de enzima.mg <sup>-1</sup> de NP)
37	2	4,4	2,1
4	6	1,6	1,2
4	24	2,5	2,0



**Figura 77: Modelo 3D da superfície da TRY com destaque nos resíduos de lisina com aminas primárias reativas em laranja. Imagem gerada pelo programa UCFS Chimera com base no arquivo PDB com ID 4I8G.**

Os conteúdos proteicos por análise de aminoácidos das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY das imobilizações a 37 °C por 2 h e a 5 °C por 24 h foram parecidos, mas o da imobilização a 5 °C por 6 h teve um conteúdo proteico menor. Esses resultados sugerem que a imobilização a 37 °C por 2 h e a 5 °C por 24 h seriam equivalentes em conteúdo proteico. Tais resultados são comparáveis a outros encontrados na literatura. Wang e Lee (2003) realizaram uma imobilização da TRY em NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por ligação covalente e obtiveram um conteúdo proteico de 0,6 % de massa de TRY/massa de NPs. Já Atacan e col. (2015) que imobilizaram usando glutaraldeído a TRY em NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> revestidas com ácido tânico obtiveram um conteúdo proteico próximo dos apresentados aqui, aproximadamente 3% de massa de TRY/massa de NPs. O trabalho de Li e col. (2007), que também imobiliza em uma NPs superparamagnéticas funcionalizadas com aminas, obtiveram NBCs com proporção de maior do que a apresentada nesse trabalho, 7% de TRY/NPs em massa.

Foi feito o monitoramento por SDS-PAGE da autólise da TRY nas condições de imobilização sem as NPs (**Figura 78**). A TRY apresenta massa molecular de 23,3 KDa e o  $\alpha$ -QT, geralmente um contaminante da TRY, apresenta massa molecular de 25 KDa. O gel obtido apresenta várias bandas que indicam os seguintes componentes: TRY e outros de diferentes massas molares no tempo 0 h (**78A**) que podem vir de contaminantes ( $\alpha$ -QT sendo o mais comum) e/ou de fragmentos gerados durante a solubilização da TRY. No tempo 1 h (**78B**), as bandas já estão bem mais fracas e as 3 h (**78C**) já não é possível ver nem a enzima nem outros componentes citados, o que indica que houve autólise que, praticamente, consumiu toda a enzima, todo o contaminante e todos os fragmentos gerados a concentrações não detectáveis pelo perfil eletroforético comprovando que a autólise ocorre ao mesmo tempo que a imobilização.



**Figura 78:** Monitoramento da autólise da TRY por SDS-PAGE. (A) TRY logo após solubilizada; (B) TRY incubada a 37 °C por 1h; (C) TRY incubada a 35 °C por 3 h; Massa molecular = MM em KDa. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Volume aplicado: 20  $\mu$ L. Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

Foi feito o monitoramento da morfologia das NPs antes e depois da imobilização por TEM (**Figura 79**). Foi possível determinar que o tamanho médio não teve grande alteração com a imobilização da mesma forma que na imobilização de TLN em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica, sendo que a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica manteve os 33  $\pm$  2 nm depois da imobilização da TRY.

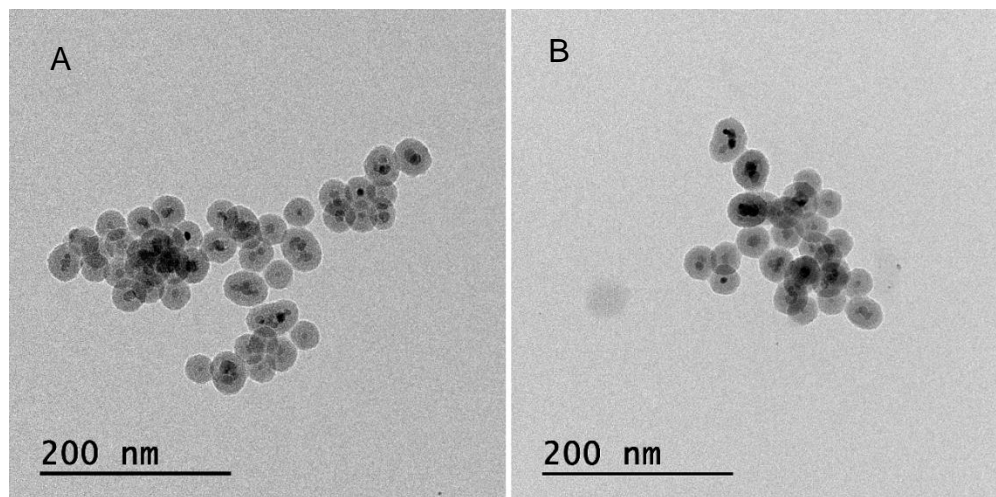


Figura 79: Microscopia TEM das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica (A) e das  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY (B).

#### 4.3.3 Atividade específica e reuso da $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY

A atividade amidásica da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY foi determinada pela hidrólise de Bz-Arg-pNA, esta reação libera p-nitroanilina por isso foi feita uma curva padrão para determinar a atividade (**Figura 80**).

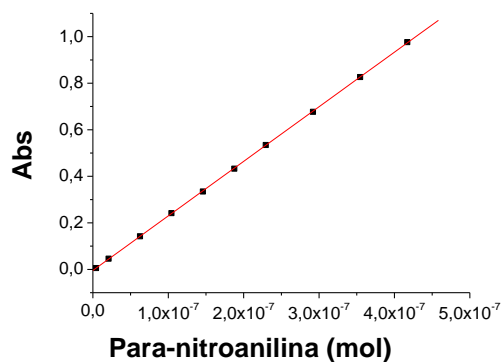


Figura 80: Curva padrão de pNA.  $Y=2,34501 \cdot 10^6 \cdot X - 0,00456$ ,  $r^2=0,99$ .

Na **Tabela 31** pode-se observar que a atividade específica da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY dependeram da condição de imobilização. Quando foi utilizada temperatura de 37 °C a atividade caiu para menos da metade da TRY livre, enquanto que nas duas condições a 5 °C ela reteve mais da metade da atividade em relação à enzima livre.

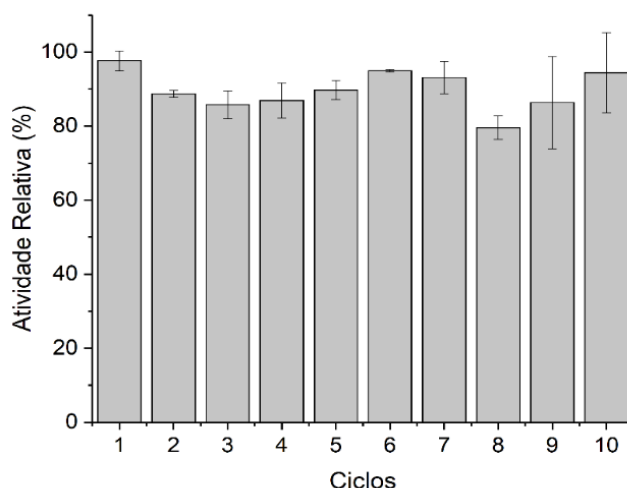
**Tabela 31: Atividade específica da TRY livre e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY em diferentes condições de imobilização.**

Catalisador	Tempo de imobilização (h)	Temp. de imobilização (°C)	Atividade específica (U·mg <sup>-1</sup> de enzima <sup>-1</sup> )
TRY livre	--	--	7,6±0,5
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY	2	37	2,1±0,3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY	4	37	1,8±0,2
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY	6	4	4,8±0,2
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY	24	4	4,2±0,5

Esses resultados indicam que o processo de autólise, além de influenciar a taxa de imobilização, também afeta a atividade da enzima imobilizada já que a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY imobilizada por 2 h a 37 °C tem o mesmo conteúdo proteico da imobilizada a 4 °C, mas uma atividade específica menor. Esse efeito da autólise pode ocorrer e influenciar na atividade da enzima imobilizada, a baixa temperatura diminui esse efeito e permite que o NBC retenha mais atividade (ATACAN; ÖZACAR, 2015; LEE et al., 2011).

Assim como feito para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, foi determinado o reuso da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY. Usando o Bz-Arg-pNa como substrato para reação de hidrólise, foi possível reutilizar até nove vezes (dez ciclos) os NBC sem perda significativa na atividade em relação com a inicial (**Figura 81**). Isso está de acordo com o demonstrado para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN e com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT (LIRIA et al., 2014). Esses resultados corroboram com os obtidos por Li e col. (2007) que também demonstraram que a imobilização da TRY em NPs superparamagnéticas permite o seu reuso. Nesse trabalho eles imobilizaram a TRY em uma NP funcionalizada com grupos aminas, mas sem revestimento, usando o glutaraldeído para ativar o suporte. Eles mostraram o reuso até o 11° ciclo, sendo que a partir do 9° ciclo apresentou uma expressiva queda em relação a atividade inicial. Esses resultados também estão de acordo com os obtidos por Sun e col. (2017) para uma outra NP com núcleo de magnetita. Eles imobilizaram a TRY covalentemente em NPs de magnetita revestidas

com quitosana usando o glutaraldeído como ativador ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CM-CTS-GA-TRY}$ ). Eles caracterizaram esse material considerando várias propriedades, entre elas o reuso, que se mostrou eficiente por, pelo menos, seis ciclos.



**Figura 81:** Reuso da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TRY}$  na hidrólise de Bz-Arg-pNa. Condição reacional: 15 min a 37 °C.

#### 4.3.4 Caracterização cinética da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TRY}$

Assim como feito com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TLN}$  foram determinados os parâmetros cinéticos da  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TRY}$ . Para determiná-los foram feitas várias reações de hidrólise do substrato Bz-Arg-pNA com concentrações diferentes. Como a TRY é uma enzima michaeliana (ROYER, 1975), os dados obtidos devem seguir a cinética de Michaelis-Menten e a linearização de Lineweaver-Burk (VOET; VOET, 2010). A **Figura 82** apresenta a linearização para a TRY livre (**Figura 82A**) e para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TRY}$  (**Figura 82B**). Por elas é possível encontrar os  $V_{\max}$  e os  $K_M$ . Nas condições de velocidade inicial é possível determinar os  $k_{\text{cat}}$ , que seria a constante de primeira ordem da catálise. Esses parâmetros são importantes para determinar a razão  $k_{\text{cat}} \cdot K_M^{-1}$ , que representa a eficiências da catálise. Ele é dado pela **Equação 2**. A **Tabela 32** apresenta os parâmetros cinéticos encontrados para a TRY livre e para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{sílica-TRY}$ .

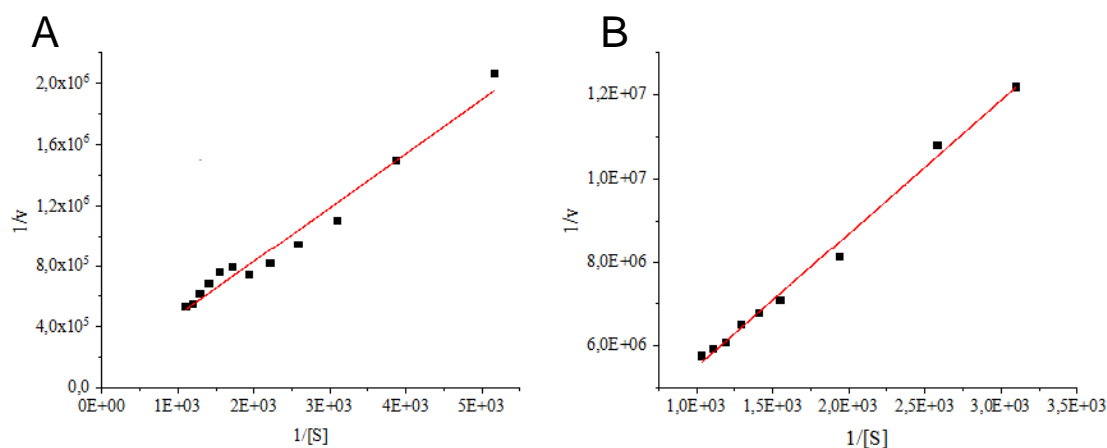


Figura 82: Diagrama de Lineweaver-Burk para a TRY livre (A) e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY (B).

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \quad 2$$

Tabela 32: Características cinéticas da TRY livre e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY.

Catalisador	K <sub>M</sub> (mmol·L)	V <sub>max</sub> (μmol·L <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (L·mmol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )
TRY livre	0,66 (± 0,05)	1,3 (± 0,1)	3,8 (± 0,4)	5,8 (± 0,5)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY	0,86 (± 0,08)	1,0 (± 0,1)	2,9 (± 0,2)	3,4 (± 0,1)

Assim como o ocorrido com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, houve uma queda na eficiência catalítica da TRY após a imobilização. Analisando as diferenças no k<sub>cat</sub> e no K<sub>M</sub> pode-se atribuir essas mudanças à interação do substrato com a TRY (menor K<sub>M</sub>) e a uma piora na eficiência catalítica (menor k<sub>cat</sub>), pelos mesmos motivos abordados anteriormente (MERYAM SARDAR, 2015). Quedas nos parâmetros cinéticos já foram observadas em outras imobilizações da TRY como no trabalho de Karimi e col. (2014) quando a TRY foi imobilizada em nanoestruturas mesoporosas por adsorção e no trabalho de Sun e col. (2017) que relataram a imobilização da TRY em nanopartículas superparamagnéticas funcionalizadas com carboxi quitosana por ligação covalente. Essa queda também é comparável com a da α-QT imobilizada no mesmo suporte que foi discutida em Liria e col. (2014).



#### 4.3.5 Estabilidade química e térmica da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY

A estabilidade em solução da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY também foi estudada. A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY e a TRY livre foram estocadas a 5 °C e a temperatura ambiente (Figura 83).

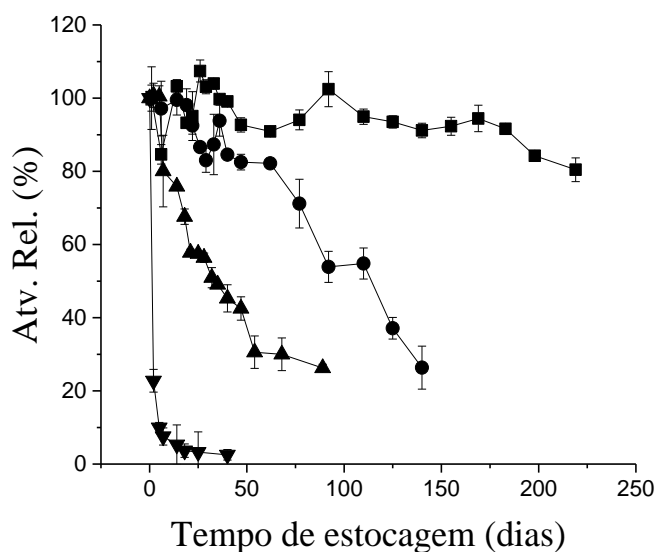
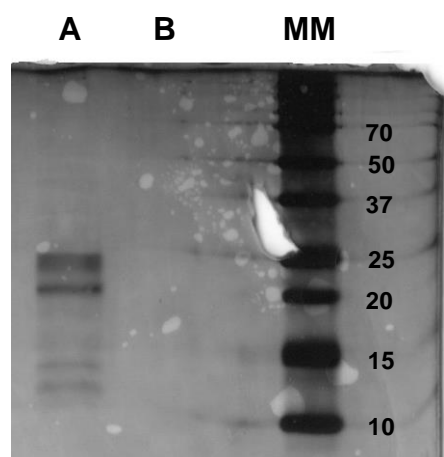


Figura 83: Atividade relativa da TRY livre e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY após estocada. (■) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY estocada a 4 °C; (●) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY estocada a temp. amb.; (▲) TRY livre estocada a 4 °C; (▼) TRY livre estocada a temp. amb. Condição reacional: 15 min a 37 °C.

Na Figura 83 pode-se observar que a TRY livre ficou praticamente inativa três dias após ser solubilizada e estocada a temperatura ambiente. A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY também estocada a temperatura ambiente reteve mais de 50 % de sua atividade inicial após 92 dias e só chegou próximo a 20 % depois de 140 dias. Já a TRY livre quando estocada a 5 °C reteve um pouco menos que 30 % de sua atividade inicial após 50 dias. O melhor resultado foi o da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY estocada a 4 °C, que manteve mais de 90 % de sua atividade inicial durante 180 dias e após 219 dias ela ainda retinha mais de 80 %. Esses resultados são bem parecidos com os encontrados para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT já relatados pelo nosso grupo (LIRIA et al., 2014). A estabilidade a temperatura ambiente é comparável ou até melhor que a TRY imobilizada por

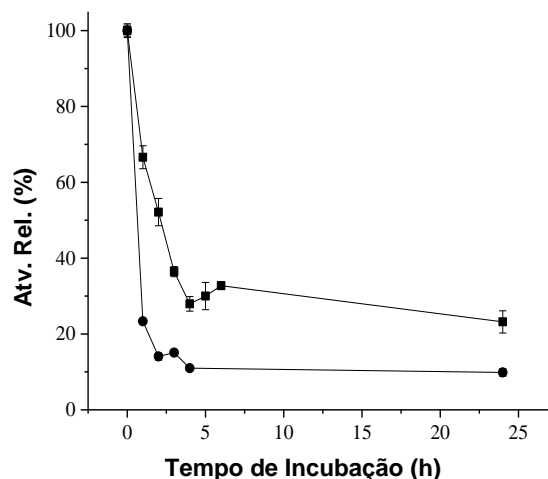
ligação covalente em NPs de  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  pois no trabalho de Li e col. (2010) após 6 dias de estocagem a TRY apresentava 80% da atividade inicial. Quanto à estocagem em baixa temperatura, ela se mostrou mais eficiente do que a TRY imobilizada em grãos magnéticos, após 1 mês de estocagem a 5 °C tiveram suas atividades reduzidas para 80% da inicial (BAYRAMOGLU et al., 2014). Essa maior estabilidade pode ocorrer pela formação de ligações covalentes com o suporte. Esse tipo de ligação pode funcionar como “âncora” e proporcionar maior rigidez à estrutura tridimensional de enzimas e no caso da TRY imobilizada, dificultar o processo de autólise (BRADY; JORDAAN, 2009). Assim como o ocorrido com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN, houve agregação da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY, mas a perda na atividade parece mais relacionada com a própria autólise que com a agregação.

Foi feita uma SDS-PAGE (**Figura 84**) para detectar o efeito da estocagem a 5 °C para a TRY livre e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY. Nela é possível ver a TRY ainda em solução após 47 dias de estocagem (**Figura 84A**) e que não há uma aparente perda de enzima imobilizada mesmo após 169 dias de estocagem (**Figura 84B**).



**Figura 84:** Perfil eletroforético da (A) TRY estocada em solução por 47 dias a 5 °C; (B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY estocada em suspensão por 169 dias. Massa molecular = MM em KDa. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com corante azul de comassie.

Também foi estudada a estabilidade térmica da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY. A **Figura 85** mostra o quanto de atividade os dois catalisadores retiveram após incubação de 24 h.



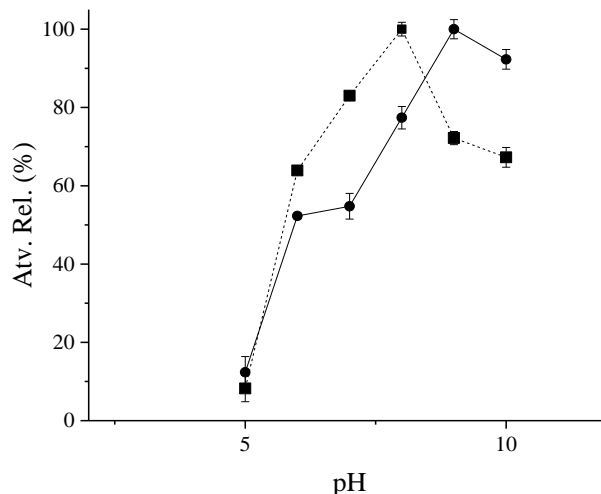
**Figura 85:** Estabilidade térmica da TRY e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY a 60 °C. (■) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY; (●) TRY. Condição reacional: 15 min a 37 °C.

A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY reteve 23 % da atividade inicial, mais que o dobro do que reteve a TRY livre. Novamente, o resultado é parecido com o encontrado para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT (LIRIA et al., 2014) e estão em concordância com os obtidos por Atacan e col. (2017), e refletem a maior estabilidade térmica que a imobilização geralmente confere às enzimas. Isso ocorre porque suas estruturas tridimensionais podem ficar mais rígidas por causa das ligações covalentes com o suporte, dificultando as mudanças estruturais promovidas pelo aumento da temperatura que podem causar perda de atividade (DWEVEDI, 2016).

#### 4.3.6 pH ótimo da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY

Foi determinada a atividade da TRY livre e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY em diferentes pH (**Figura 86**) e foi observado um deslocamento do pH ótimo para valores mais altos. A mudança do pH pode estar relacionada com: i) pequena alteração da estrutura 3D da enzima após formação de ligação covalente com a NP que acarretou em alteração de alguns pK de grupos ionizáveis das cadeias laterais dos aminoácidos; ii) pela diminuição de número de cadeias laterais livres das lisinas contidas na TRY que

reagiram com a NP ativada; iii) pelo microambiente causado pela presença do suporte, ele pode afetar o sítio catalítico da enzima (DWEVEDI, 2016; GOLDSTEIN; LEVIN; KATCHALSKI, 1964).

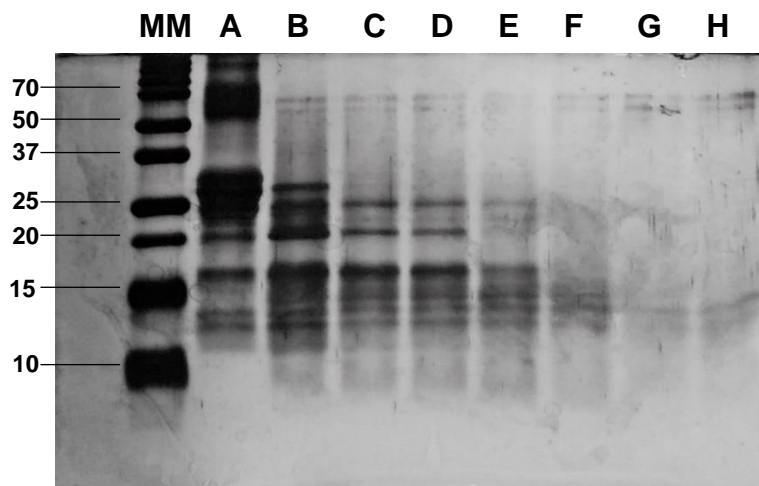


**Figura 86:** Atividade da TRY e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY em função do pH do meio reacional. (■) TRY; (●) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY. Condição reacional: 15 min a 37 °C.

#### 4.3.7 Proteólise da caseína do leite bovino pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY

Assim como feito para a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN também foi estudada a possibilidade de usar a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY para promover a proteólise da caseína do leite bovino. A abordagem seguiu a mesma das outras duas endopeptidases. As seis primeiras horas foram monitoradas por SDS-PAGE (**Figura 87**). Utilizando a mesma metodologia aplicada anteriormente, pela relação do R<sub>m</sub> x Log(MM) do padrão de massa molecular (**Figura 87A**) foi possível determinar a massa molecular das proteínas presentes no gel. No tempo 0 h é possível observar várias proteínas, as caseínas são as que estão na região entre 25 e 38 kDa. Nos primeiros 30 min (**Figura 87B a D**) foi possível observar a digestão da caseína, a formação de fragmentos proteicos de massa molecular menor e o consumo desses mesmos fragmentos. Em 2 h a caseína foi consumida a concentrações não detectáveis no perfil eletroforético e em 6 h haviam poucos fragmentos detectáveis. Esses resultados são parecidos com

os obtidos por Atacan e col. (2017) para a TRY imobilizada em nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcionalizadas com ácido tânico.



**Figura 87:** Perfil eletroforético do monitoramento da proteólise da caseína do leite bovino catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY. (A) 0 h; (B) 10 min; (C) 20 min; (D) 30 min; (E) 1 h; (F) 2 h; (G) 4 h; (H) 6 h. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

A **Tabela 33** apresenta os 34 fragmentos identificados no proteólise catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY oriundos da caseína: 9 vindos da  $\alpha\text{s}1$ , 14 da  $\alpha\text{s}2$ , 8 da  $\beta$  e 4 da  $\kappa$ . Esses resultados foram alinhados com as sequências das caseínas para melhor visualizar como foi a fragmentação (**Figura 88**). A **Tabela 34** apresenta os 31 fragmentos identificados na proteólise catalisada pela TRY livre sendo 13 vindos da  $\alpha\text{s}1$ , 6 da  $\alpha\text{s}2$ , 11 da  $\beta$  e 1 da  $\kappa$ . Novamente a diferença foi pequena na quantidade de fragmentos detectados, porém houve uma grande diferença entre as origens desses fragmentos, o que pode indicar a mudança na interação com o substrato. Foram detectados três fragmentos da autólise da TRY em ambos os proteólises (**Tabela 35**).

**Tabela 33:** Peptídeos encontrados no proteólise de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY. Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteólises catalisados pela TRY livre e imobilizada nas condições iniciais.

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
$\alpha\text{s}1$ -CN f(23–37)	1759,123	1758,938	0,1851	0	(K)HQGLPQEVLNENLLR(F)
$\alpha\text{s}1$ -CN f(38–49)	1383,903	1383,723	0,18	0	(R)FFVAPFPEVFGK(E)
$\alpha\text{s}1$ -CN f(52–73)	2677,173	2677,016	0,1572	1	(K)VNELSKDIGSESTEDQAMEDIK(Q) + 3 $\text{PO}_4^{3-}$
$\alpha\text{s}1$ -CN f(58–73)	1926,863	1926,684	0,1785	0	(K)DIGSESTEDQAMEDIK(Q) + 2 $\text{PO}_4^{3-}$
$\alpha\text{s}1$ -CN f(106–115)	1266,863	1266,697	0,1655	0	(R)YLGYLEQLLR(L)

as1-CN f(106–120)	1926,863	1927,129	-0,2667	3	(R)YLGYLEQLLRLKKYK(V)
as1-CN f(140–147)	909,6327	909,4668	0,1659	0	(K)EGIHAAQK(E)
as1-CN f(148–166)	2315,363	2315,13	0,2331	0	(K)EPMIGVNVQELAYFYPELFR(Q)
as1-CN f(209–214)	747,4827	747,3625	0,1202	0	(K)TTMPLW(-)
as2-CN f(61–85)	3007,133	3007,022	0,1105	0	(R)NANEEEEYSIGSSSEESAEEVATEEVK(I) + 4 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
as2-CN f(96–106)	1366,863	1366,688	0,1746	0	(K)ALNEINQFYQK(F)
as2-CN f(107–128)	2708,613	2708,4	0,2125	0	(K)FPQYLQYLYQGPIVLPWDQVK(R)
as2-CN f(130–140)	1194,803	1194,672	0,1307	0	(R)NAVPITPTLNR(E)
as2-CN f(130–152)	2555,323	2555,319	0,0037	2	(R)NAVPITPTLNREQLSTSEENSKK(T)
as2-CN f(141–164)	2746,103	2746,286	-0,1827	2	(R)EQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTK(K)
as2-CN f(153–164)	1465,823	1465,605	0,2179	0	(K)TVDMESTEVFTK(K) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
as2-CN f(166–173)	976,7327	976,5077	0,2251	1	(K)TKLTEEEK(N)
as2-CN f(168–173)	747,4827	747,365	0,1177	0	(K)LTEEEK(N)
as2-CN f(168–181)	1761,143	1760,978	0,1643	3	(K)LTEEEKNRLNFKK(I)
as2-CN f(176–180)	633,4727	633,385	0,0877	0	(R)LNFLK(K)
as2-CN f(189–196)	978,6827	978,5538	0,1289	0	(K)FALPQYLK(T)
as2-CN f(204–212)	1097,793	1097,606	0,1872	0	(K)AMKPWIQPK(T)
as2-CN f(221–222)	294,2627	294,1579	0,1048	0	(R)YL(-)
β-CN(17–40)	2965,303	2965,157	0,1455	0	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESITR(I) + 4 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
β-CN(115–120)	645,4327	645,3156	0,1172	0	(K)EAMAPK(H)
β-CN(121–128)	1012,553	1012,516	0,0363	1	(K)HKEMPFK(Y)
β-CN(123–128)	747,4827	747,3625	0,1202	0	(K)EMPFK(Y)
β-CN(185–191)	779,6127	779,4905	0,1222	0	(K)VLPVPQK(A)
β-CN(192–198)	829,5727	829,4446	0,1281	0	(K)AVPYPQR(D)
β-CN(199–217)	2185,403	2185,161	0,2422	0	(R)DMPIQAFLLYQEPVLPVVR(G)
β-CN(218–224)	741,5527	741,4425	0,1102	0	(R)GPFPIIV(-)
k-CN(38–42)	642,4227	642,3013	0,1214	0	(R)FFSDK(I)
k-CN(43–45)	330,2727	330,2267	0,046	0	(K)IAK(Y)
k-CN(90–107)	1979,323	1979,084	0,2387	0	(R)SPAQILQWQVLSNTVPAK(S)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

A

RPKHPIKHQGLPQEVNENLLRFFVA  
 PFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQ  
 AMEDIKQMEAESISSSEEIVPNSVEQK  
 HIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYK  
 VPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQ  
 KEMPVGNQELAYFYPELFRQFYQLD  
 AYPGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIP  
 NPIGSENSEKTT MPLW

B

KNTMEHVSSSEESIISQETYKQEKNM  
 AINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEY  
 SIGSSSEESAEEVATEEVKITVDDKHYYQ  
 KALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVL  
 NPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSE  
 ENSKKTVDMESTEVEFTKTKLTEEEK  
 NRLNFKKISQRYQK FALPQYLKTVY  
 QHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL

C

RELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK  
 KIEKFQSEEQQTEDELQDKIHPFAQT  
 QSLVYPPFGPIPNLQNPPLTQTPV  
 VVPPFLQPEVMGVSKVEAMAPKHK  
 EMPFKYYPVEPFTESQSLTLTDVENLH  
 LPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPP  
 QSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRD  
 MPIQAFLLYQEPVLPVVRGPFPIIV

D

QEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAKYIP  
 IQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINQ  
 FLPYPYAKPAAVRSPAQILQWQVLSN  
 TVPAKSCQAQPTTMARHPHPLSFM  
 AIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTP  
 TTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTV  
 QVTSTAV

Figura 88: Sequências das quatro formas da caseína bovina do leite com destaque para os fragmentos gerados na proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-α-QT. (A) as1-caseína; (B) as2-caseína e (C) β-caseína (D) κ-caseína. A hidrólise ocorreria entre o resíduo sublinhado e o resíduo a sua direita. Em negrito estão as regiões detectadas no proteolisado.

**Tabela 34: Peptídeos encontrados no proteólise de caseína do leite bovino após 24h de reação catalisada pela TRY livre. Em cinza escuro: Fragmentos identificados nos proteólises catalisados pela TRY livre e imobilizada nas condições iniciais.**

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
αs1-CN f(23–37)	1759,113	1758,938	0,1751	0	(K)HQGLPQEVNLNLLR(F)
αs1-CN f(38–49)	1383,863	1383,723	0,14	0	(R)FFVAPFPEVFGK(E)
αs1-CN f(50–57)	945,6127	945,5131	0,0996	1	(K)EKVNELSK(D)
αs1-CN f(52–57)	688,4527	688,3755	0,0772	0	(K)VNELSK(D)
αs1-CN f(95–105)	1336,833	1336,674	0,1592	1	(K)HIQKEDVPSE(Y)
αs1-CN f(99–105)	830,4527	830,377	0,0757	0	(K)EDVPSE(Y)
αs1-CN f(106–115)	1266,813	1266,697	0,1155	0	(R)YLGYLEQLLR(L)
αs1-CN f(116–139)	2836,763	2836,563	0,1995	4	(R)LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMK(E)
αs1-CN f(119–166)	5735,863	5735,831	0,0318	4	(K)YKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQ KEPMIGVNQELAYFYPELFR(Q) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
αs1-CN f(140–147)	909,5527	909,4668	0,0859	0	(K)EGIHAQQK(E)
αs1-CN f(140–166)	3206,833	3206,586	0,2469	1	(K)EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR(Q)
αs1-CN f(148–166)	2315,323	2315,13	0,1931	0	(K)EPMIGVNQELAYFYPELFR(Q)
αs1-CN f(209–214)	747,4327	747,3625	0,0702	0	(K)TTMLPW(-)
αs2-CN f(107–128)	2708,553	2708,4	0,1525	0	(K)FPQYLQYLYQGPIVL NPWDQVK(R)
αs2-CN f(107–129)	2864,723	2864,501	0,2214	1	(K)FPQYLQYLYQGPIVL NPWDQVKR(N)
αs2-CN f(168–173)	747,4327	747,365	0,0677	0	(K)LTEEEK(N)
αs2-CN f(189–196)	978,6827	978,5538	0,1289	0	(K)FALPQYLK(T)
αs2-CN f(197–203)	902,5427	902,461	0,0817	0	(K)TVYQHQA(A)
αs2-CN f(221–222)	294,1927	294,1579	0,0348	0	(R)YL(-)
β-CN(17–44)	3128,833	3128,609	0,2239	2	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKK(I)
β-CN(17–47)	3498,603	3498,83	-0,2277	3	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIE K(F)
β-CN(45–47)	387,9627	388,2322	-0,2694	0	(K)IEK(F)
β-CN(113–120)	872,5927	872,4789	0,1138	1	(K)VKEAMAPK(H)
β-CN(121–128)	1012,653	1012,516	0,1363	1	(K)HKEMPFPK(Y)
β-CN(123–128)	747,4327	747,3625	0,0702	0	(K)EMPFPK(Y)
β-CN(129–184)	6358,243	6358,249	-0,0059	0	(K)YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQ SWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK(V)
β-CN(185–191)	779,5627	779,4905	0,0722	0	(K)VLPVPQK(A)
β-CN(192–198)	829,5227	829,4446	0,0781	0	(K)AVPYPQR(D)
β-CN(199–217)	2185,293	2185,161	0,1322	0	(R)DMPIQAFLLYQEPVLPV(G)
β-CN(218–224)	741,5527	741,4425	0,1102	0	(R)GPFPIIV(-)
k-CN(46–89)	5241,903	5241,748	0,1544	1	(K)YIPIQYVLSRYPYGLNYYQQKPVALINN QFLPYPPYAKPAAVR(S)

\* Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**Tabela 35: Fragmentos detectados provenientes da autólise da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY e TRY livre**

Catalisador	Sequência	[M+H](Exp)	[M+H](calc)	Delta	Peptídeo
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TRY	74-94	2721,04	2720,913	0,127	(K)QMEAESISSSEIIVPNSVEQ K(H) + 2 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	119-134	1952,13	1951,952	0,177	(K)YKVPQLEIVPNSAEER(L) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	121-134	1661	1660,794	0,205	(K)VPQLEIVPNSAEER(L) + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
TRY livre	73-112	4417,6	4417,198	0,402	(R)LGEDNINVEGNEQFISASK SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK(L)
	113-159	4714,14	4714,381	-0,241	(K)LKSAASLNSRVASISLPTSC ASAGTQCLISGWGNTKSSGT SYPDVLK(C)
	194-223	2910,76	2910,318	0,442	(K)DSCQGDSSGPPVCSGKLGQI VSWGSGCAQK(N)

Atacan e col. (2017) imobilizaram a TRY em NPs superparamagnéticas revestidas com ácido tânico, a utilizaram na proteólise da caseína do leite bovino com monitoramento por LC-MS/MS e observaram que o uso da TRY imobilizada levou a mais fragmentos provenientes da caseína do leite bovino e menos da autólise. Eles não fizeram uma identificação dos fragmentos gerados então não apresentaram um número total de fragmentos.

Seguindo o que foi feito com as outras enzimas, os fragmentos obtidos foram comparados com os do banco de dados *Milk Bioactive Peptide Database* e, novamente, a proporção de peptídeos possivelmente bioativos foi 50% do total de fragmentos tendo prevalência de peptídeos inibidores de ECA e antimicrobianos entre eles (Tabela 36).

**Tabela 36: Peptídeos que poderiam ter bioatividade encontrados no proteolisado com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY.**

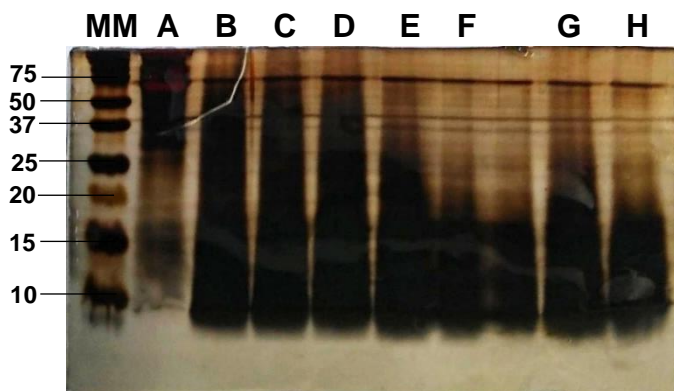
Peptídeo encontrado	Posição	Peptídeo conhecido	Bioatividade	Referência
FFVAPFPEVFG K	αs1-CN (38-49)	FFVAPFPEVFG K	Inibição da ECA	(YAMADA et al., 2015)
YLGYLEQLLR	αs1-CN (106-115)	YLGYLEQLLR	Ansiolítica	(CAKIR-KIEFER et al., 2011)
TTMPLW	αs1-CN (-209)	TTMPLW	Antimicrobiana	(MCCLEAN; BEGGS; WELCH, 2014)
ALNEINQFYQK	αs2-CN (96-106)	ALNEINQFYQK	Inibição da ECA	(TAUZIN; MICLO; GAILLARD, 2002)
FALPQYLK	αs2-CN (189-196)	FALPQYLK	Antioxidante	(LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2007)
AMKPWIQPK	αs2-CN (204-212)	AMKPWIQPK	Inibição da ECA	(MAENO; YAMAMOTO; TAKANO, 1996)
YL	αs2-CN (221-222)	YL	Inibição da ECA	(MULLALLY; MEISEL; FITZGERALD, 1996)
ELEELNVPGEI VESLSSSEESI TR	β-CN (17-40)	RELEELNVPGE IVESLSSSEESI TR	Caseinofosfo peptídeo	(FITZGERALD, 1998)
EAMAPK	β-CN (115-120)	EAMAPK	Antimicrobiana	(SEDAGHATI et al., 2016)
HKEMPFPK	β-CN (121-128)	HKEMPFPK	Antimicrobiana	(SEDAGHATI et al., 2016)
EMPFPK	β-CN (123-128)	EMPFPK	Inibição da ECA	(PIHLANTO-LEPPÄLÄ; ROKKA; KORHONEN, 1998)
VLPVPQK	β-CN (185-191)	VLPVPQK	Antioxidante	(SHANMUGAM et al., 2015)
AVPYPQR	β-CN (192-198)	AVPYPQR	Antioxidante	(RIVAL; BOERIU; WICHERS, 2001)
DMPIQAFLLYQ EPVLPVPR	β-CN (199-217)	DMPIQAFLL YQEPVLPVPR	Anti-inflamatória	(MALINOWSKI et al., 2014)
GPFPPIIV	β-CN (218-224)	VRGPFPPIIV	Inibição da ECA	(QUIRÓS et al., 2007)
FFSDK	κ-CN (38-42)	FFSDK	Antimicrobiana	(SEDAGHATI et al., 2014)
IAK	κ-CN (43-45)	IAK	Antimicrobiana	(SEDAGHATI et al., 2014)



Algumas dessas sequências foram encontradas em proteolisados trópticos de formas da caseína corroborando com os resultados obtidos (MALINOWSKI et al., 2014; MARUYAMA et al., 1985). O trabalho de Sedaghati e col. (2016) também corrobora, mas utilizando a plasmina bovina, uma serina endopeptidase com especificidade parecida com a da TRY, para catalisar a proteólise  $\beta$ -caseína do leite bovino.

#### 4.3.8 Proteólise da BSA pela $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY

O monitoramento da proteólise da BSA foi feito nas primeiras 6 h por SDS-PAGE (**Figura 89**). Assim como para os outros dois NBCs, a banda que representa a massa molecular da BSA (60 kDa) apresenta uma queda na intensidade com o tempo de reação mostrando a digestão da proteína.



**Figura 89:** Perfil eletroforético do monitoramento da proteólise da BSA catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY. (A) 0 h; (B) 10 min; (C) 20 min; (D) 30 min; (E) 1 h; (F) 2 h; (G) 4 (H) 6 h. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

A **Tabela 37** apresenta os 28 fragmentos detectados na reação com os NBCs após 24 h, referentes a 42% da sequência da BSA (**Figura 90**). A **Tabela 38** apresenta os 24 fragmentos obtidos com a TRY livre, cobrindo 33% da estrutura primária da BSA. Foram detectados 1 fragmento proveniente da autólise da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY e três fragmentos da autólise da TRY livre nos hidrolisados (**Tabela 39**).

**Tabela 37: Peptídeos encontrados no proteólido de BSA após 24h de reação catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY. Em cinza escuro: Fragmentos identificados no proteólido catalisado pela αQT livre e imobilizada.**

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
25-34	1192,653	1192,5949	0,0579	1	(R)DTHKSEIAHR(F)
25-36	1468,123	1467,7582	0,3645	2	(R)DTHKSEIAHRFK(D)
29-34	711,4027	711,3664	0,0364	0	(K)SEIAHR(F)
35-44	1248,663	1248,6139	0,0488	1	(R)FKDLGEEHFK(G)
66-75	1162,763	1162,6234	0,1394	0	(K)LVNELTEFAK(T)
156-160	664,4427	664,3697	0,073	1	(K)KFWGK(Y)
161-167	926,5927	926,4861	0,1066	0	(K)YLYEIAR(R)
169-183	1887,743	1887,9195	-0,1768	0	(R)HPYFYAPELLYYANK(Y)
223-228	648,3327	648,3265	0,0062	0	(R)CASIQK(F)
236-241	688,4127	688,3656	0,0471	0	(K)AWSVAR(L)
242-248	846,5827	846,4963	0,0864	1	(R)LSQKFPK(A)
249-256	921,5427	921,4807	0,062	0	(K)AEFVEVTK(L)
257-263	788,5127	788,4644	0,0484	0	(K)LVTDLTK(V)
337-374	4479,292	4478,324	0,9677	5	(K)DVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAK(E)
347-359	1566,943	1566,7354	0,2073	0	(K)DAFLGSFLYEYSR(R)
360-371	1439,023	1438,8045	0,2183	1	(R)RHPEYAVSVLLR(L)
402-412	1304,833	1304,7088	0,1239	0	(K)HLVDEPQNLIK(Q)
421-433	1479,013	1478,7881	0,2246	0	(K)LGEYGFQNALIVR(Y)
437-451	1639,073	1638,9305	0,1422	1	(R)KVPQVSTPTLVEVSR(S)
452-455	403,2627	403,2431	0,0197	0	(R)SLGK(V)
452-459	816,6327	816,4818	0,151	1	(R)SLGKVGTR(C)
456-459	431,2827	431,2492	0,0335	0	(K)VGTR(C)
469-498	3459,805	3459,6781	-0,3554	3	(R)MPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVT(K)
490-495	659,4027	659,349	0,0537	0	(K)TPVSEK(V)
508-544	4245,363	4245,0439	0,3189	2	(R)RPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEK(Q)
549-557	1013,753	1013,6121	0,1406	0	(K)QTALVELLK(H)
562-568	817,4627	817,4181	0,0446	0	(K)ATEEQLK(T)
598-607	1001,683	1001,5757	0,107	0	(K)LVVSTQTALA(-)

\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIASFQYLQQCP  
FDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLF  
GDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLS  
HKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEK**KFWGKYL**  
**YEIARRHPYFYAPELLYYANKY**NGVVFQ**ECCQAEDK**  
GACLLPKIETMREKVLASSARQRL**R**CASIQK**FGER**  
AL**K**AWSVARLSQK**F**PKAEFVEVTKLVTDLTK**VHKE**  
CCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKL**KECC**  
DKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAED**KDV**  
**C**KNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRL  
**A**K**E**YEATL**E**CCAKDDPHACYSTVFD**KL**KHLVDEP  
QNLIKQNCQDQFE**K**LGEYGFQNALIVR**Y**TR**KVPQVS**  
TPTLVEVSR**S**LG**K**VGTRCCTKPESER**MPCTEDYL**  
**SLILNRLCVLHEKTPVSEKVT**K**CCTESLVNRRPCF**  
**SALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIK**  
**K**QTALVELLK**K**HKPK**K**ATEEQL**K**TVMENFVAFVD**KCC**  
AADD**K**EACFAVEGPK**LVVSTQTALA****

**Figura 90: Sequências BSA com destaque para os fragmentos gerados na proteólise com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TRY. A hidrólise ocorreria entre o resíduo sublinhado e o resíduo a sua direita. Em negrito estão as regiões detectadas no proteólido.**

**Tabela 38: Peptídeos encontrados no proteólise de BSA após 24h de reação catalisada pela TRY livre. Em cinza escuro: Fragmentos identificados no proteólise catalisado pela  $\alpha$ QT livre e imobilizada.**

Sequência	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	CP*	Peptídeo
29-34	711,3827	711,3664	0,0164	0	(K)SEIAHR(F)
35-44	1248,653	1248,614	0,0388	1	(R)FKDLGEEHFK(G)
37-44	973,5027	973,4505	0,0522	0	(K)DLGEEHFK(G)
66-75	1162,723	1162,623	0,0994	0	(K)LVNELTEFAK(T)
161-167	926,5727	926,4861	0,0866	0	(K)YLYEIAR(R)
223-228	648,3427	648,3265	0,0162	0	(R)CASIQK(F)
236-241	688,4227	688,3656	0,0571	0	(K)AWSVAR(L)
249-256	921,5227	921,4807	0,042	0	(K)AEFVEVTK(L)
257-263	788,4627	788,4644	-0,0016	0	(K)LVTDLTK(V)
319-336	1955,083	1954,952	0,1304	0	(K)DAIPENLPPLTADFAEDK(D)
341-346	751,3727	751,35	0,0227	0	(K)NYQEAK(D)
347-359	1566,823	1566,735	0,0873	0	(K)DAFLGSFLYEYSR(R)
360-371	1439,013	1438,805	0,2083	1	(R)RHPEYAVSVLLR(L)
402-412	1304,793	1304,709	0,0839	0	(K)HLVDEPQNLIK(Q)
421-433	1478,953	1478,788	0,1646	0	(K)LGEYGFQNALIVR(Y)
437-451	1639,053	1638,931	0,1222	1	(R)KVPQVSTPTLVEVSR(S)
452-455	403,2427	403,2431	-0,0003	0	(R)SLGK(V)
456-459	431,3027	431,2492	0,0535	0	(K)VGTR(C)
490-495	659,3627	659,349	0,0137	0	(K)TPVSEK(V)
548-561	1631,703	1632,009	-0,3059	2	(K)KQ TALVELLKHKPK(A)
548-580	3812,853	3812,091	0,7618	4	(K)KQ TALVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVD K(C)
549-557	1013,753	1013,612	0,1406	0	(K)QTALVELLK(H)
562-568	817,4527	817,4181	0,0346	0	(K)ATEEQLK(T)
598-607	1001,663	1001,576	0,087	0	(K)LVVSTQTALA(-)

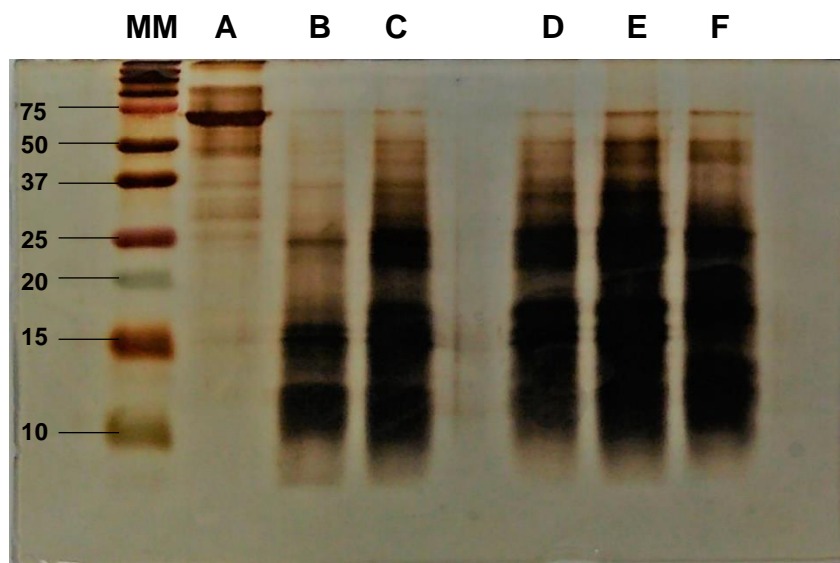
\*Clivagem perdida: Ligação peptídica reconhecida pela especificidade da protease, mas que não foi hidrolisada.

**Tabela 39: Fragmentos detectados provenientes da autólise da  $Fe_3O_4$ @sílica-TRY e TRY livre.**

Catalisador	Sequência	[M+H](Exp)	[M+H](calc)	Delta	Peptídeo
$Fe_3O_4$ @sílica-TRY	194-209	1495,7	1495,615	-0,084	(K)DSCQGDGGPVVCSGK(L)
TRY livre	73-112	4417,6	4417,198	-0,402	(R)LGEDNINVEGNEQFISASK SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK(L)
	113-159	4714,14	4714,381	0,241	(K)LKSAASLNSRVASISLPTSC ASAGTQCLISGWGNTKSSGT SYPDVLK(C)
	194-223	2910,76	2910,318	-0,442	(K)DSCQGDGGPVVCSGKLQGI VSWGSGCAQK(N)

O reuso da  $Fe_3O_4$ @sílica- $\alpha$ -QT na proteólise da BSA também foi monitorado por SDS-PAGE (**Figura 91**). Como para os outros NBCs, foi possível observar o reuso pelo consumo da BSA pela queda ou desaparecimento da banda que corresponde à massa molecular de 65 kDa. Como ocorrido com a  $Fe_3O_4$ @sílica- $\alpha$ -QT, a proteólise do primeiro uso foi mais intensa que os outros quatro seguintes. Novamente os resultados não são muito diferentes de outras TRYs imobilizadas, como as obtidas por Li e col. (2007) para a proteólise do citocromo C (9 ciclos sem perda significativa

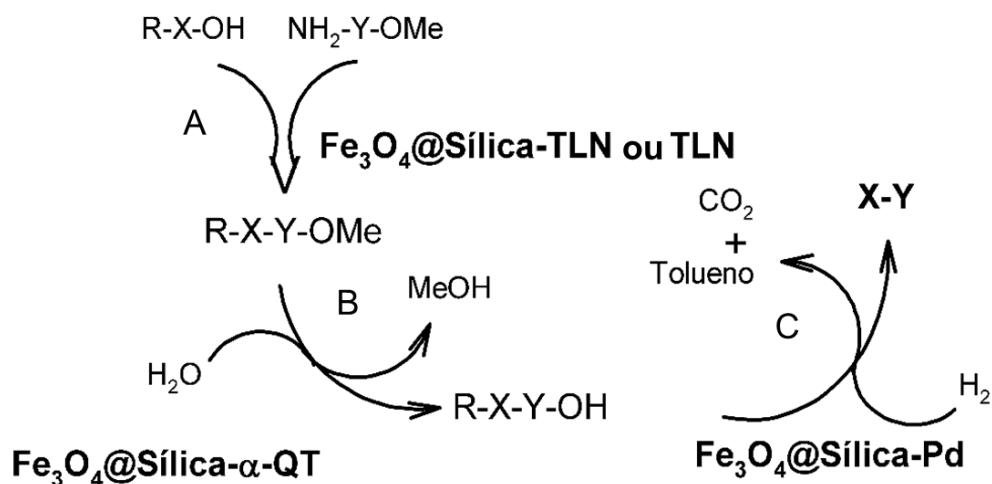
de eficiencia) e por Rocha-Martin e col. (2018) para a proteólise de caseína do leite bovino (3 ciclos catalíticos sem perder eficiencia).



**Figura 91:** Perfil eletroforético do reuso da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY frente a proteólise da BSA. (A) 0 h; (B) 1º uso; (C) 2º uso; (D) 3º uso; (E) 4º uso; (F) 5º uso. Condições: Gel de empilhamento: 4%; Gel de separação: 15%; Massa aplicada: 10  $\mu\text{g}$  Condições da eletroforese: 100 V x 10 min; 120V x 70 min. Coloração feita com prata.

#### 4.4 Síntese de dipeptídeos com as enzimas imobilizadas

Tomando como ponto de partida a rota sintética apresentada no trabalho Ungaro e col. (2015), elaborou-se uma rota sintética utilizando apenas nanocatalisadores superparamagnéticos. A **Figura 92** apresenta as etapas dessa proposta.

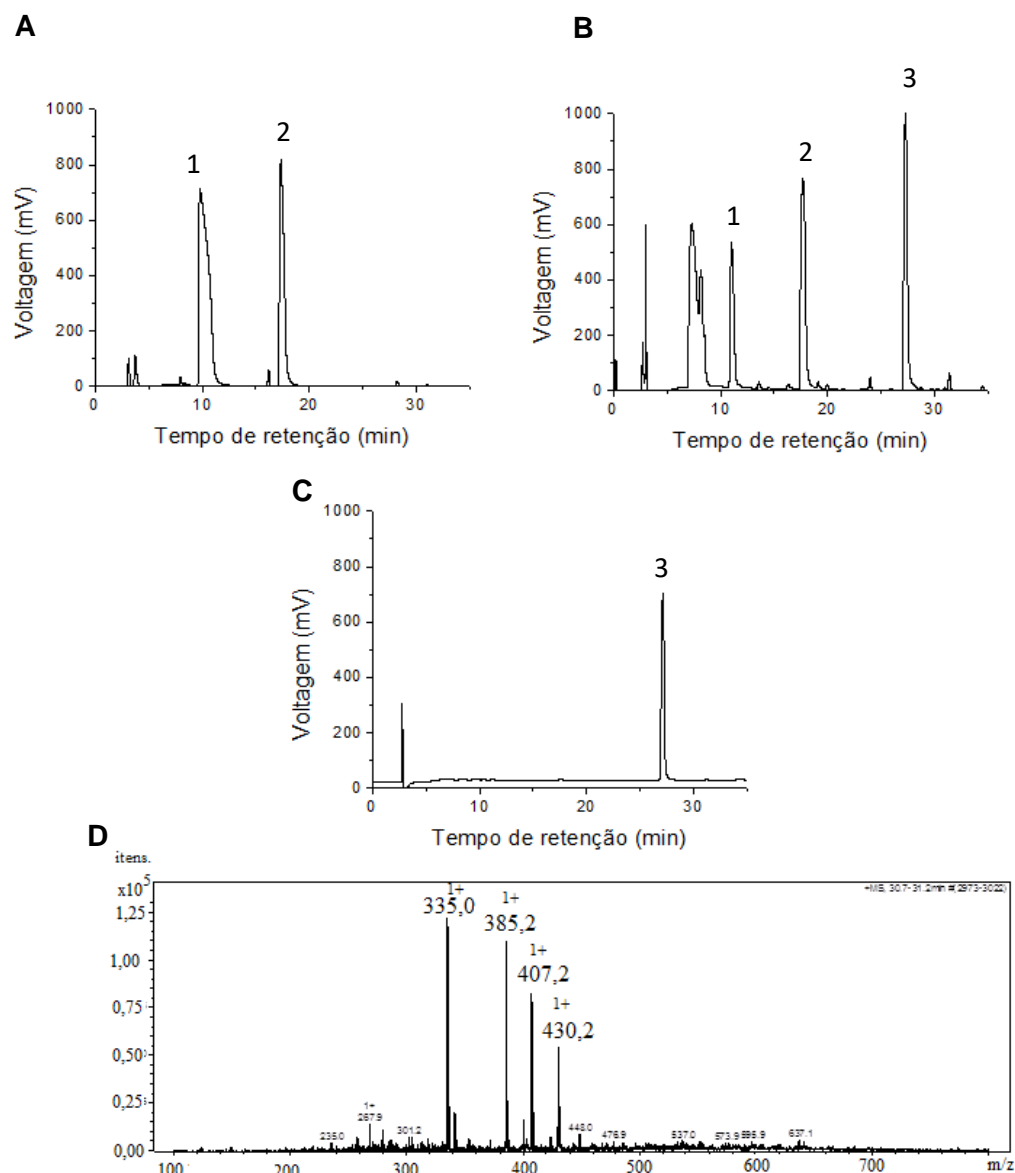


**Figura 92:** Proposta de rota sintética para dipeptídeos com nanocatalisadores superparamagnéticos. (A) síntese da ligação peptídica; (B) hidrólise do éster protetor de grupo carboxila; (C) hidrogenação do grupo Z protetor de grupo amino.

A primeira etapa (**Figura 92A**) corresponde à formação da ligação peptídica catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. Esta etapa também foi realizada, em outros momentos, com a TLN livre, que é costumeiramente usada para tal aplicação (DE MIRANDA et al., 1986; DEBNATH; ROY; ULIJN, 2013; TRUSEK-HOLOWNIA, 2003a). A segunda etapa (**Figura 92B**) corresponde à hidrólise do éster catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT, e o resultado com a enzima livre está relatado em Ungaro e col. (2015). A terceira etapa (**Figura 92C**) corresponde à hidrogenação do grupo protetor Z catalisada pelo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Pd, também inicialmente relatada no trabalho Ungaro e col. (2015).

#### 4.4.1 Primeira etapa da síntese de dipeptídeos: formação da ligação peptídica

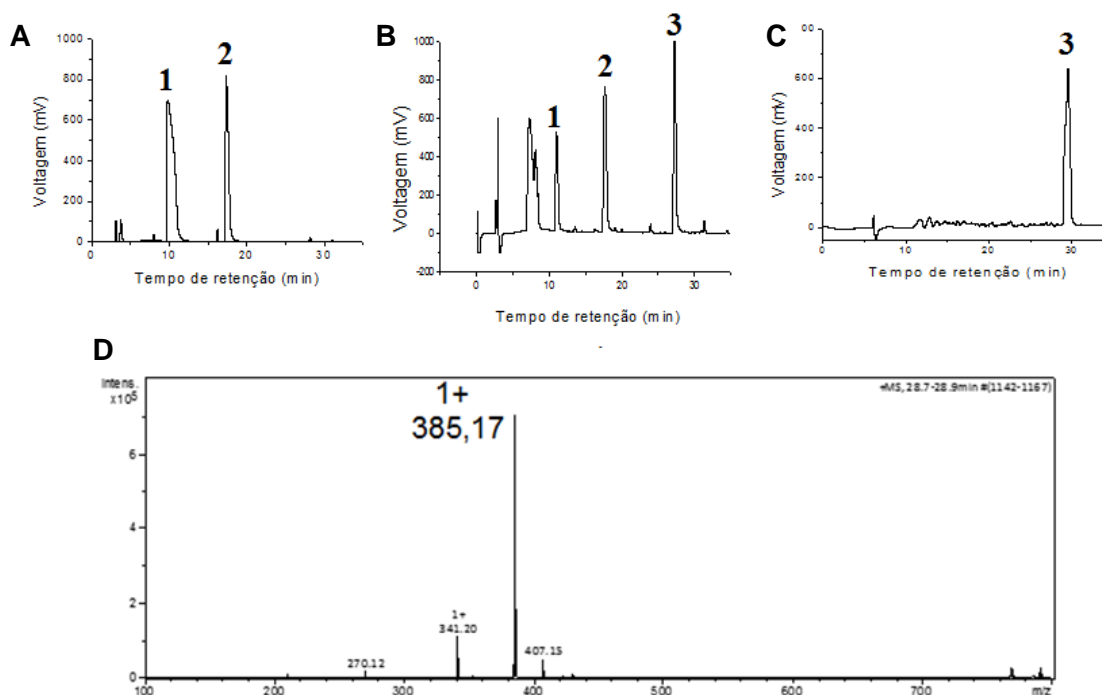
Inicialmente, foram usadas quantidades equimolares de Z-Ala e Phe-OMe e o rendimento verificado na síntese do dipeptídeo Z-Ala-Phe-OMe foi de 70% em mol (26 mg) quando usou-se TLN livre como catalisador, e de 28% em mol (10 mg) com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. A **Figura 93** apresenta o monitoramento por HPLC nos tempos 0 e 24 h (**Figura 93A e B**, respectivamente) da reação catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. O cromatograma do produto isolado e o seu espectro de massas podem ser vistos na **Figura 93C e D**. O espectro de massas comprovou a presença do produto (**Figura 93D**,  $[\text{M} + \text{H}^+]$  de 385,2). A intensidade do espectro de massas foi baixa (na ordem de  $10^5$ ), o que evidenciou também os sinais presentes na condição basal. Em seguida, foi elaborada uma nova estratégia para aumentar o rendimento, na qual foi usado um excesso de 50% de Phe-OMe em relação ao Z-Ala. Com essa mudança, foram obtidos rendimentos de 82 ( $\pm 3$ )% quando o catalisador foi TLN livre, e 50 ( $\pm 2$ )% quando o catalisador foi a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN, demonstrando que o excesso foi efetivo, pois quase dobrou o rendimento da reação.



**Figura 93:** Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210nm. Condição reacional: 24 h a 50 °C. Condições MS: Voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h; (B) 24 h; (C) produto isolado; (D) espectro de massas do produto isolado, [M + H<sup>+</sup>] = 385,2 m/z. 1: Phe-OMe; 2: Z-Ala; 3: Z-Ala-Phe-OMe.

A **Figura 94** apresenta os resultados do monitoramento desta reação por HPLC nos tempos 0 e 24 h (**Figura 94 A e B**, respectivamente) A identidade do produto foi confirmada por espectrometria de massas (**Figura 94D**, [M + H<sup>+</sup>] de 385,2). A diferença no rendimento da reação catalisada pela TLN livre e imobilizada pode ser atribuída à adsorção de produto na Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, pois o produto foi arrastado junto às NBCs quando feita a decantação magnética. Foi também esse o motivo de

utilizar solução de ACN para a remoção do produto. Foi realizado o reuso das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN nos dois procedimentos. O reuso seguindo o primeiro procedimento teve um rendimento de 16%, já o reuso seguindo o com excesso de 50% de Phe-OMe teve rendimento de 13%. Essa queda no rendimento pode estar relacionada à própria queda de atividade mostrada no **item 3.1.6**, considerando-se que no reuso o NBC já inicia a reação com uma atividade inicial menor (em torno de 70% da inicial), é esperado que haja uma queda no rendimento final.



**Figura 94:** Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu\text{L}$ , coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B.  $\lambda$ : 210nm. Condição reacional: 24 h a 50 °C. Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h de reação; (B) 24 h de reação; (C) produto isolado; (D) espectro de massas do produto isolado. 1: Phe-OMe; 2: Z-Ala; 3: Z-Ala-Phe-OMe.

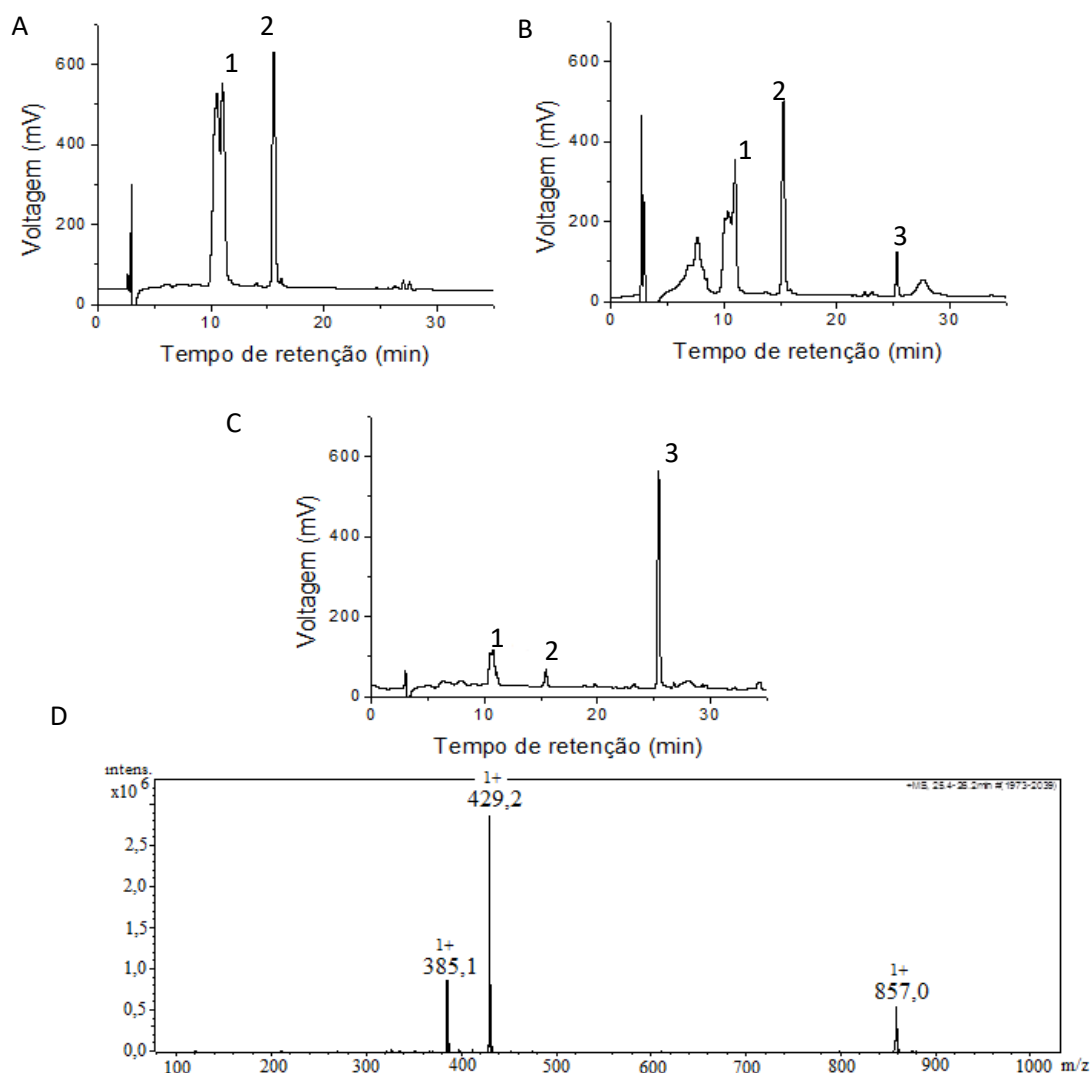
Foi proposta uma terceira condição com maior quantidade de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN para se compensar a perda na atividade amidásica detectada anteriormente (**item 4.1.3**), mas o rendimento manteve-se próximo a 50%.

A quarta condição proposta foi a síntese do Z-Ala-Phe-OMe em meio bifásico, mas este apresentou um rendimento de 52 ( $\pm 2$ )%, ou seja, aumento não significativo em relação ao meio aquoso. Para a síntese do Z-Asp-Phe-OMe foram usadas quantidades equimolares de Z-Asp e Phe-OMe e também apresentou o problema de adsorção na Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, mas em um grau maior, já que o NBC ficou preso junto ao produto e à parede do recipiente, prejudicando o transporte de massa. O rendimento obtido para a síntese do dipeptídeo Z-Asp-Phe-OMe utilizando-se a TLN livre como catalisadora foi de 73 ( $\pm 1$ )%, e com a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN foi de 16 ( $\pm 4$ )%. O monitoramento da síntese é mostrado pelos cromatogramas na **Figura 95**.

Os cromatogramas de 0 e 16 h (**Figura 95A e B**) mostram o desaparecimento dos reagentes e o surgimento do produto, e o cromatograma da **Figura 95C** demonstra que foi possível concentrar o produto no meio reacional. O espectro de massas permitiu identificar o produto (**Figura 95D**, [M + H<sup>+</sup>] de 429,2). A reação foi feita novamente utilizando-se meio bifásico com AcOEt, e observou-se um aumento do rendimento para 26 %. Essa estratégia foi adotada porque já havia sido aplicada em outros trabalhos com bons resultados, Nagayasu e col. (1994) obtiveram rendimentos de 80% e Nakanishi e col. (1986) obtiveram rendimento de 90%. A síntese do precursor Z-Phe-Phe-OMe ocorreu com rendimento de 85 ( $\pm 4$ )% para a reação catalisada pela TLN livre e de 15% pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN, e também apresentou adsorção aparente.

O monitoramento por HPLC dessa reação pode ser visto na **Figura 96**, onde se pode observar o desaparecimento do substrato e o aparecimento do produto (**Figura 96 A e B**). Pode-se perceber que o Phe-OMe não aparece no cromatograma. Isso ocorre porque o solvente utilizado apresenta um alto teor de ACN (95%), fazendo com que esse éster de aminoácido seja coeluído com o AcOEt. A **Figura 96C** mostra

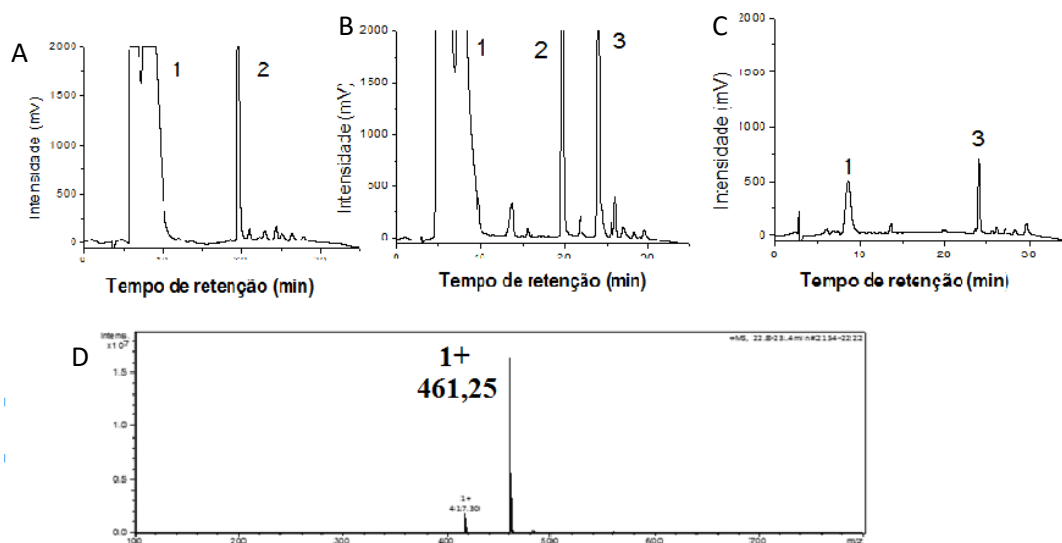




**Figura 95:** Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210nm. Condição reacional: 16 h a 50 °C. Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES+. (A) 0 h; (B) 16 h; (C) produto isolado; (D) espectro de massas do produto isolado, [M + H<sup>+</sup>] = 429,2 m/z. 1: Phe-OMe; 2: Z-Asp; 3: Z-Asp-Phe-OMe.

a qualidade do produto obtido após o isolamento descrito no **item 3.8.3**. O espectro de massas permitiu identificar o produto (**Figura 96D**, [M + H<sup>+</sup>] de 461,25).

Procurando otimizar este processo, foi adicionado mais NBC a fim de compensar a perda de atividade enzimática com a imobilização e foi feito o isolamento com extração ativa para diminuir contaminantes e perdas. Com este novo procedimento, foi possível obter um rendimento de 49 ( $\pm$  1)%. Em comparação com os resultados obtidos por Nakanishi e col. (1988), que utilizaram uma TLN imobilizada por adsorção em diferentes micros suportes poliméricos, o resultado foi superior ao



**Figura 96:** Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 95% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210nm. Condição reacional: 16 h a 50 °C. Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h de reação; (B) 16 h de reação; (D) produto isolado (D) espectro de massas do produto isolado. 1: AcOEt; 2: Z-Phe; 3: Z-Phe-Phe-OMe.

obtido em diversos dos polímeros utilizados, foi próximo do obtido quando usado o polímero Dowex MWA (46,5%), e foi inferior ao obtido com a TLN imobilizada em Amberlite (~80%).

Para a síntese do dipeptídeo Fmoc-Phe-Phe-OMe o rendimento obtido foi de 80 ( $\pm$  3)% quando catalisada pela TLN livre, e de 44% quando catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. A **Figura 97** mostra o monitoramento da reação por HPLC nos tempos 0 e 16 h (**Figura 97A e B**, respectivamente) quando usada a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN. Já a **Figura 97C e D** mostram, respectivamente, o produto isolado do Fmoc-Phe e seu espectro de massas. A **Figura 97B** mostra o monitoramento da fase orgânica final (o produto é hidrofóbico) no tempo 16h. O espectro de massas permitiu identificar o produto (**Figura 97D**, [M + H<sup>+</sup>] de 549).

A otimização da reação foi novamente feita com a compensação da queda na atividade decorrente da imobilização. O isolamento também foi diferente, utilizando extração quimicamente ativa para a diminuição das perdas e remoção dos substratos. Com essas medidas foi possível obter um rendimento de 72 ( $\pm$  2)%.

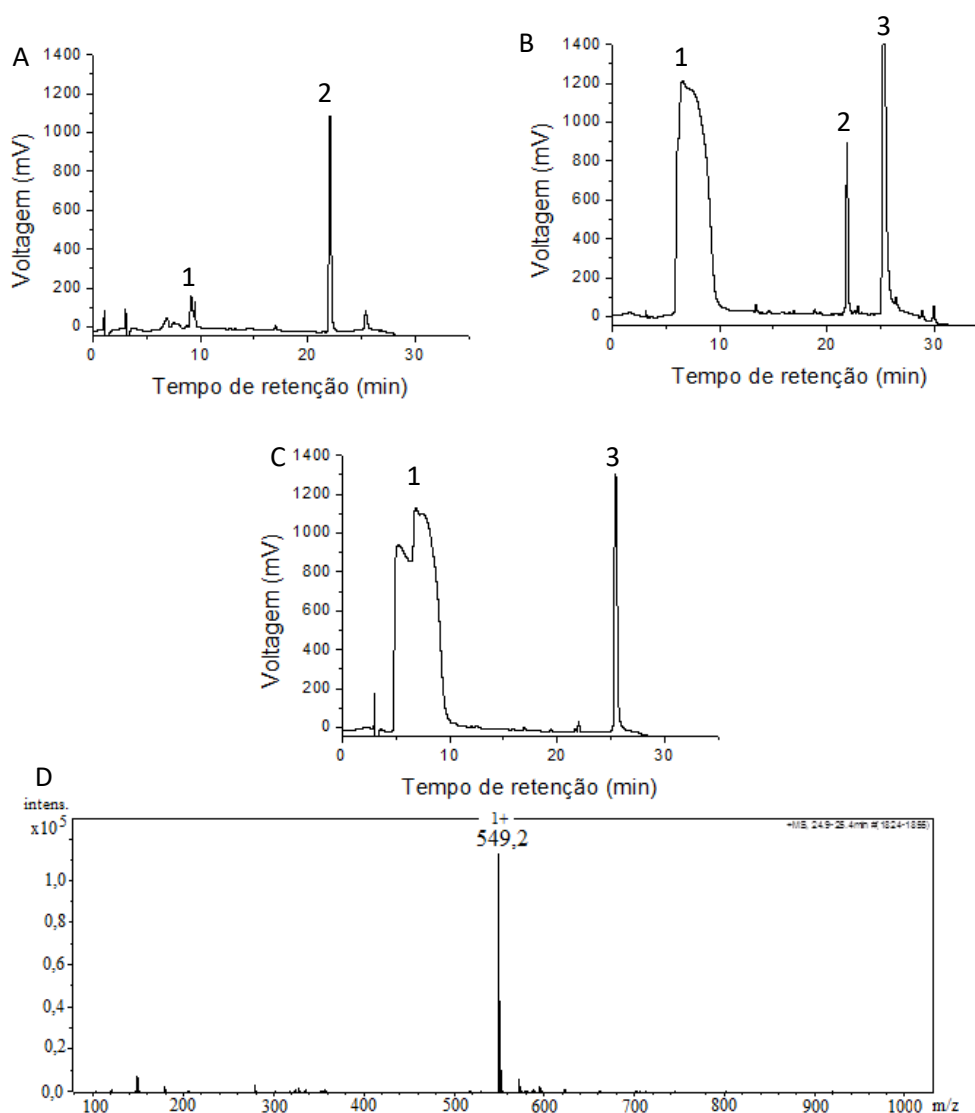


Figura 97: Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 90% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ =210nm. Condição reacional: 24 h a 50 °C. Condições MS: Condições =voltage do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h; (B)24 h; (C) produto isolado; (D) espectro de massas do produto isolado, [M + H<sup>+</sup>] = 549 m/z. 1: acetato de etila; 2: Fmoc-Phe; 3: Fmoc-Phe-Phe-OMe.

A **Tabela 40** resume os melhores rendimentos de cada precursor de dipeptídeo com a TLN livre e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-TLN.

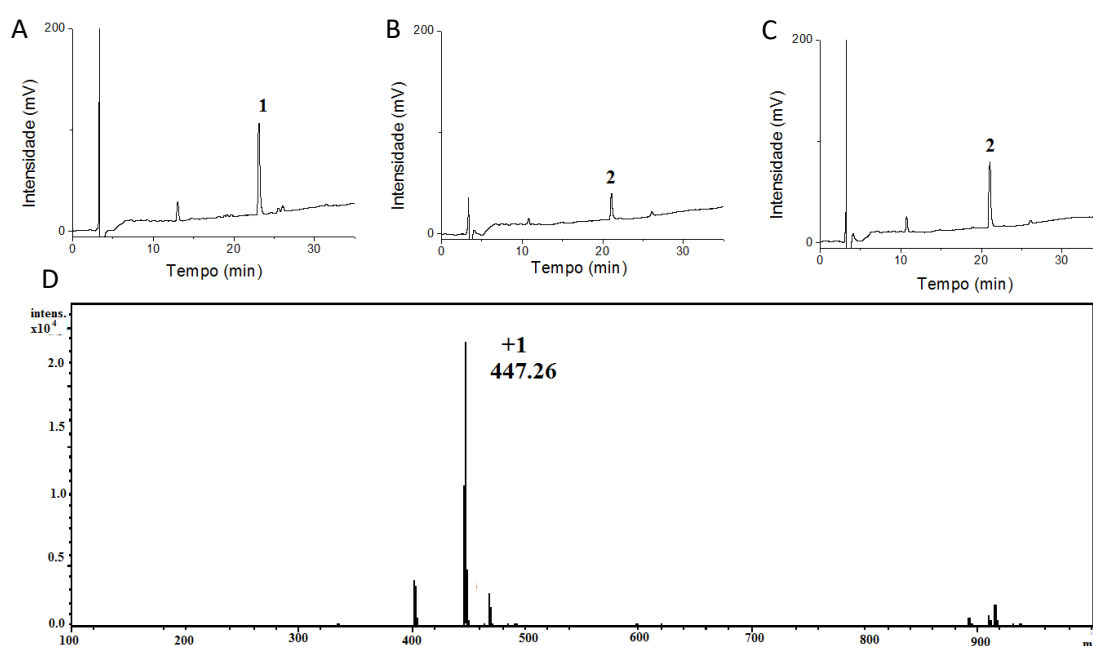
**Tabela 40:** Resumo dos melhores rendimentos de síntese dos precursores de dipeptídeos.

Peptídeo	Rendimento TLN livre (%)	Rendimento Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @sílica-TLN (%)
Z-Ala-Phe-OMe	82 ( $\pm$ 3)	52 ( $\pm$ 2)
Z-Asp-Phe-OMe	73 ( $\pm$ 1)	26
Z-Phe-Phe-OMe	85 ( $\pm$ 4)	49 ( $\pm$ 1)
Fmoc-Phe-Phe-OMe	80 ( $\pm$ 3)	72 ( $\pm$ 2)

#### 4.4.2 Segunda etapa da síntese de dipeptídeos: hidrólise do éster

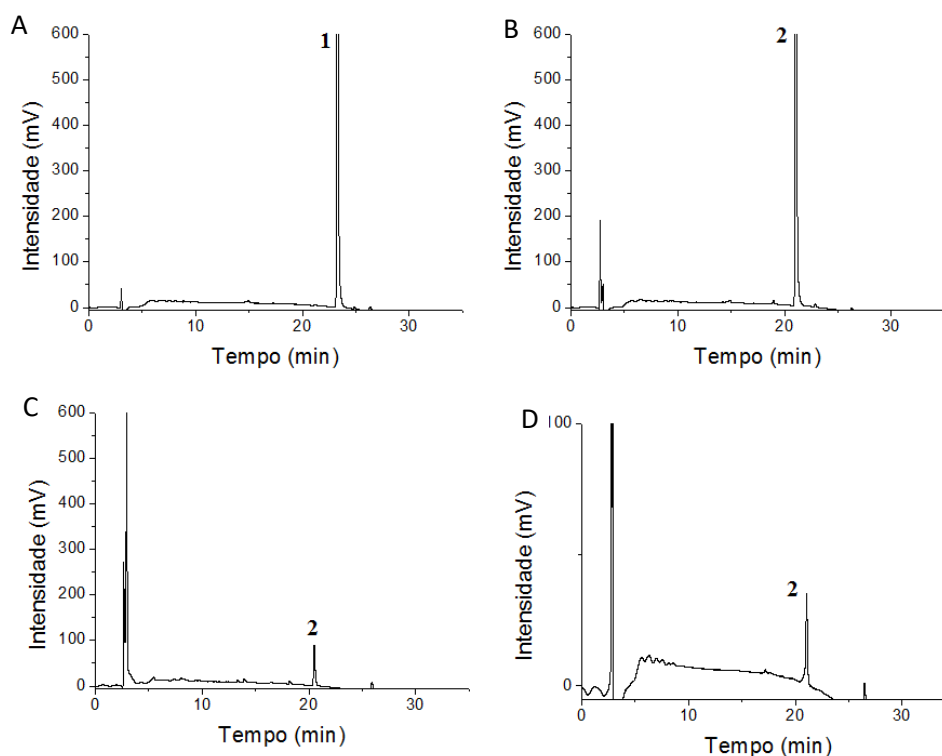
O precursor Z-Asp-Phe-OMe não será submetido a hidrólise do éster, pois o produto desejado (aspartame, Asp-Phe-OMe) mantém este éster. No **item 4.2.2** foi abordada a hidrólise do éster de Z-Ala-Phe-OMe catalisada pela Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica- $\alpha$ -QT e seu reuso. Os outros precursores de dipeptídeos (Z-Phe-Phe-OMe e Fmoc-Phe-Phe-OMe) também foram hidrolisados em duas condições: em microescala sem reuso e em escala maior e com reuso de, pelo menos, quatro ciclos.

A hidrólise do éster de Z-Phe-Phe-OMe em microescala seguiu sem grandes diferenças da hidrólise do éster de Z-Ala-Phe-OMe. No entanto, neste caso foi necessário solubilizar o substrato em 100% ACN. O monitoramento por HPLC (**Figura 98**) mostrou que a reação se completou em 1 h (**98 A, B e C**). Por esse monitoramento é possível estimar que a reação de hidrólise do éster foi quantitativa. O espectro de massas permitiu identificar o produto (**98 D**, [M + H<sup>+</sup>] de 447,26).



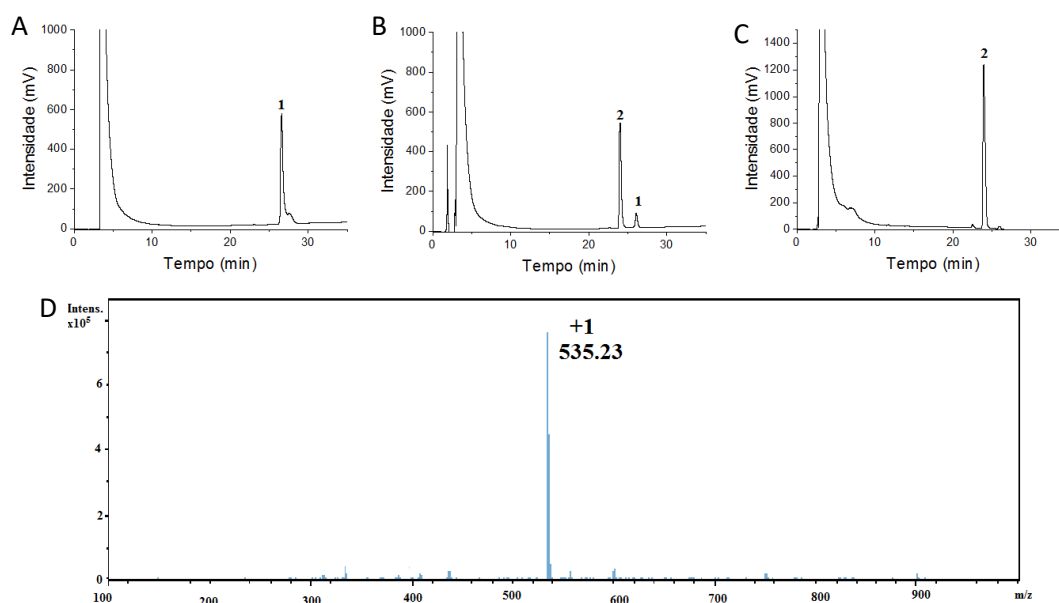
**Figura 98:** Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 95% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210nm. Condição reacional: 2 h a temp. amb.. Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h de reação; (B) 1 h de reação; (C) 2 h; (D) espectro de massas do produto isolado. 1: Z-Phe-Phe-OMe; 2: Z-Phe-Phe.

Quanto ao aumento de escala, o monitoramento (**Figura 99A e B**) indicou que a hidrólise do éster foi completada em 2 h. Como o produto obtido é mais apolar do que o anterior, a remoção do sal do meio reacional foi feita por filtração com retenção do produto em um cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> seguindo-se o procedimento do **item 2.2.15** e utilizando-se solvente 95% ACN/ 0,09% TFA/H<sub>2</sub>O para eluir o produto. Na **Figura 99C** pode-se observar que o Sep-Pak não reteve por completo o Z-Phe-Phe. Por isso, foi necessário passar o meio reacional novamente pelo Sep-Pak. A **Figura 99D** mostra que o produto foi eluído ao final do processo. Essa estratégia de dessalinização levou a um rendimento final de 91 ( $\pm 3$ )% em mol.



**Figura 99:** Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 95% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210 nm. Condição reacional: 2 h a temp. amb.. (A) 0 h de reação; (B) 1 h de reação; (C) meio reacional após passar pelo Sep-Pak pela primeira vez; (D) eluído do Sep-Pak; 1: Z-Phe-Phe-OMe; 2: Z-Phe-Phe.

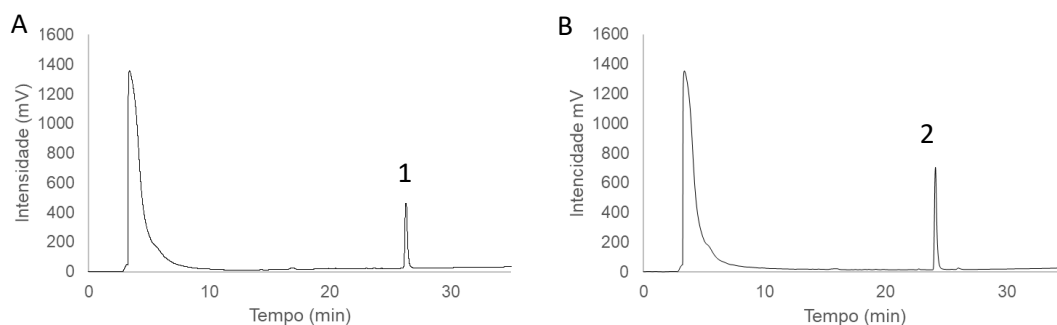
A hidrólise do éster de Fmoc-Phe-Phe-OMe em microescala se mostrou eficiente. O monitoramento por HPLC mostra que a reação se completou em 2 h (**Figura 100A, B e C**). Por esse monitoramento é possível estimar que a reação de hidrólise do éster foi quantitativa. O espectro de massas permite identificar o produto (**Figura 100D**,  $[M + H]^+$  de 535,23).



**Figura 100:** Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 95% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210 nm. Condição reacional: 2 h a temp. amb.. Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h de reação; (B) 1 h de reação; (C) 2 h de reação; (D) espectro de massas do produto isolado. 1: Fmoc-Phe-Phe-OMe; 2: Fmoc-Phe-Phe.

O aumento de escala da hidrólise do éster de Fmoc-Phe-Phe-OMe apresentou algumas diferenças em relação às duas outras hidrólises. O substrato teve que ser dissolvido em DMSO, uma vez que sua hidrofobicidade é maior do que do Z-Ala-Phe-OMe e Z-Phe-Phe-OMe e ao longo dos ciclos o substrato ou o produto começaram a ficar adsorvidos no NBC, sendo perceptíveis pontos brancos nos NBCs que foram solubilizados em DMSO. O monitoramento por RP-HPLC (**Figura 101A e B**) mostra que houve desaparecimento do reagente do meio reacional. O produto foi isolado do mesmo modo como havia sido feito para o Z-Ala-Phe. O rendimento final foi de 41 %,

inferior aos encontrados para outros dois precursores (74 % para o Z-Ala-Phe e 91 % para Z-Phe-Phe). A justificativa mais provável para o total desaparecimento do reagente do meio reacional e os baixos rendimentos reacionais foi o método de isolamento usado e/ou a adsorção de substrato ou produto nas NBCs.



**Figura 101: Condições HPLC: Vol. injeção 10 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 95% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210 nm. Condição reacional: 2 h a temp. amb.. Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>. (A) 0 h de reação; (B) 2 h de reação; 1: Fmoc-Phe-Phe-OMe; 2: Fmoc-Phe-Phe.**

Numa tentativa de contornar esses problemas, a reação foi refeita com as seguintes alterações: a cada 2 ciclos foi realizado um ciclo adicionando-se DMSO e tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,4, e foi adotado o isolamento por cartucho de Sep-pak C<sub>18</sub>. As adaptações escolhidas se mostraram eficientes, pois o rendimento subiu de 41% pelo método de precipitação para 74 ( $\pm$  2)% com o uso do cartucho. Nesse método foi feita uma extração em fase sólida (SPE), que consiste em solubilizar a amostra em uma fase líquida e usar a sua afinidade por uma fase estacionária para remover o sal. Se comparado com outras técnicas de separação por precipitação ou extração líquido-líquido, esta demanda maior tempo, porém é a que garante maior seletividade na separação. Esta técnica é frequentemente usada em proteômica para dessalinizar amostras proteolisadas, já que a análise por LC/ESI-MS precisa de um meio com baixo teor de sal (CROTTI et al., 2017). Essa técnica se mostrou mais eficiente nos isolamentos dos precursores dos dipeptídeos.

A remoção de éster de dipeptídeos já foi abordada em alguns trabalhos, o primeiro trabalho a utilizar a  $\alpha$ -QT para tal fim já obteve bons resultados (rendimentos que variaram de 80 a 95%) para uma diversidade de dipeptídeos esterificados (WALTON et al., 1962). Além do nosso trabalho (UNGARO et al., 2015), não há trabalhos que empregaram a  $\alpha$ -QT imobilizada em NPs superparamagnéticas para hidrolisar grupos protetores de peptídeos.

#### **4.4.3 Terceira etapa da síntese de dipeptídeos: hidrogenação catalítica do grupo Z**

O passo de remoção do grupo Z seguiu as condições apresentadas no nosso trabalho de 2015 (UNGARO et al., 2015). Foram realizadas hidrogenações do Z-Phe-Phe com o C/Pd e com as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Pd (UBERMAN et al., 2014) a fim de se comparar o método mais clássico com o proposto aqui (**Figura 102**) de forma pioneira. Os resultados indicaram que o consumo do reagente foi próximo de 100%. Os rendimentos reacionais em massa de produto obtido não foram significativamente diferentes, porém o monitoramento da reação com C/Pd apresentou componentes com tempo de retenção que não foram identificados. Esses resultados são parecidos com o obtido anteriormente para o Z-Ala-Phe em Ungaro e col. (2015).

Embora o consumo do reagente foi próximo de 100%, o rendimento final após o isolamento do produto foi de 81%, o que pode indicar uma perda de material durante o processo de separação do produto do frasco de reação. O espectro de massas permitiu identificar o produto (**Figura 103**  $[\text{M} + \text{H}^+]$  de 313,13).



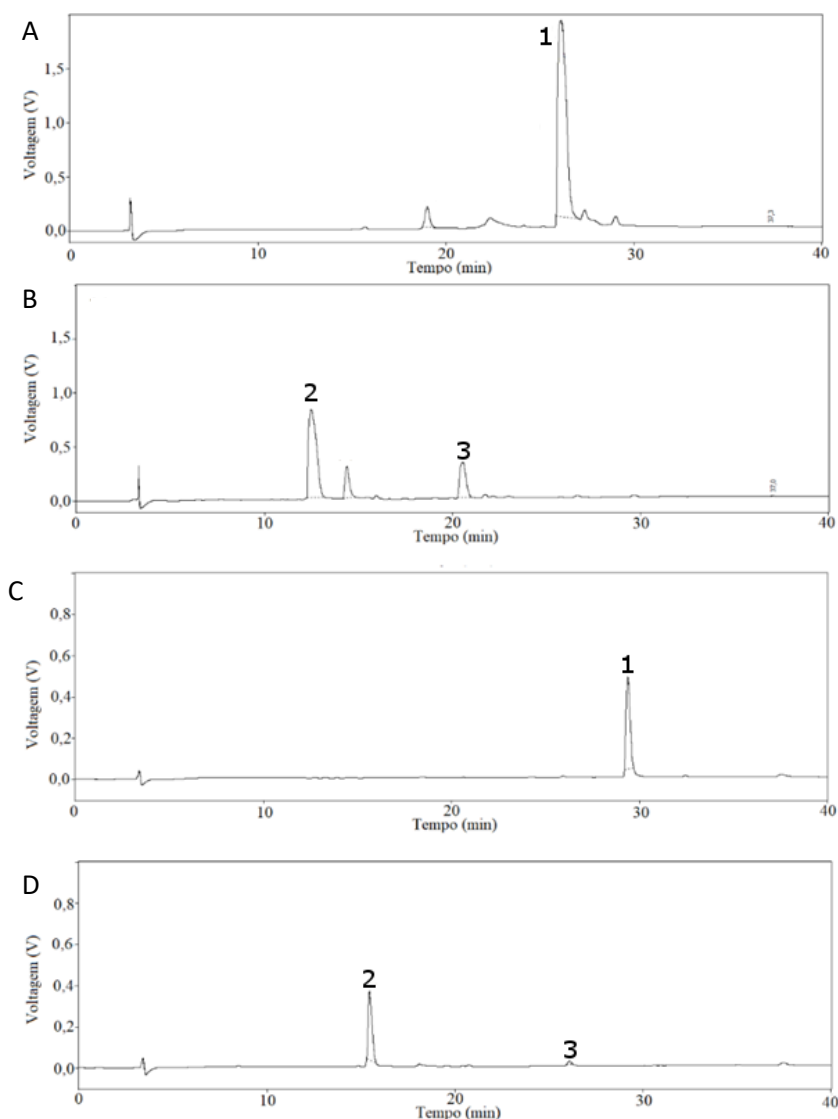


Figura 102: Monitoramento das reações de hidrogenação do Z-Phe-Phe. Condições HPLC: Vol. injeção 20 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 95% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210 nm. Condição reacional: 2 h a temp. amb.. (A) 0 h de reação com C/Pd; (B) 2 h de reação com C/Pd; (C) 0 h de reação com NP-Pd; (D) 2 h de reação com NP-Pd. 1: Z-Phe-Phe; 2: Phe-Phe; 3: tolueno. Obs. Os tempos de retenção dos componentes 1, 2 e 3 obtidos nos cromatogramas (A) e (B) são ligeiramente diferentes daqueles obtidos nos cromatogramas (C) e (D) porque as análises (A) e (B) foram obtidas em dias e em equipamentos diferentes das análises (C) e (D).

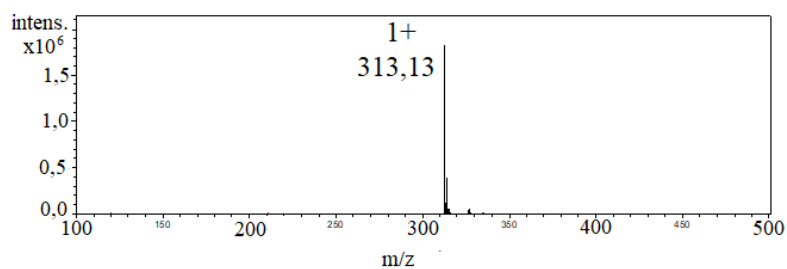
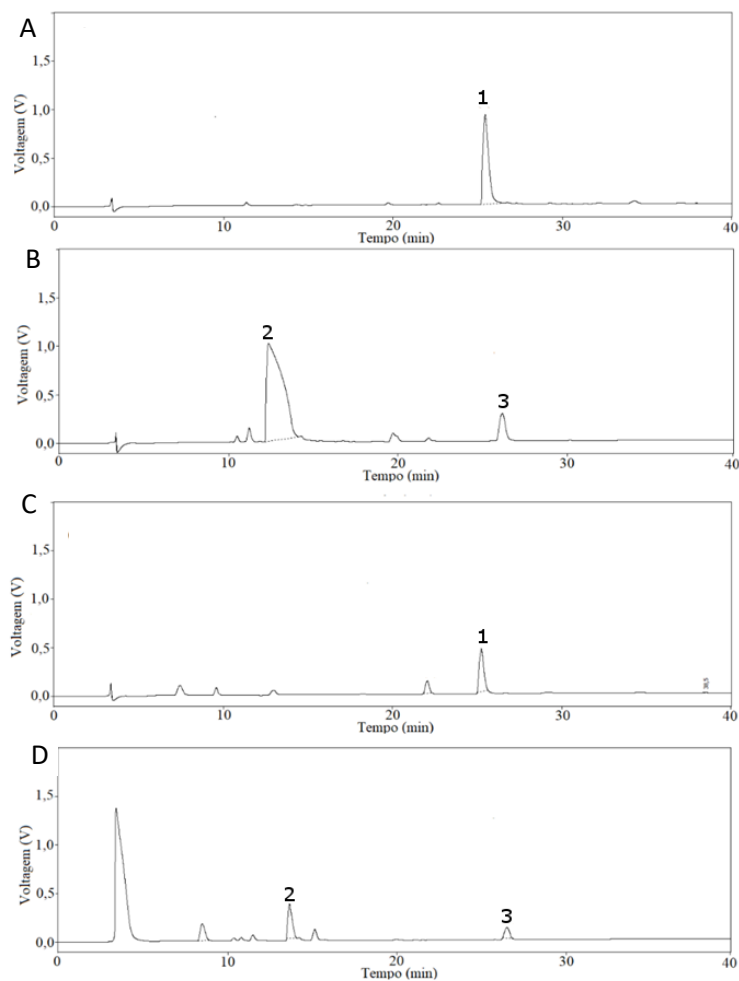
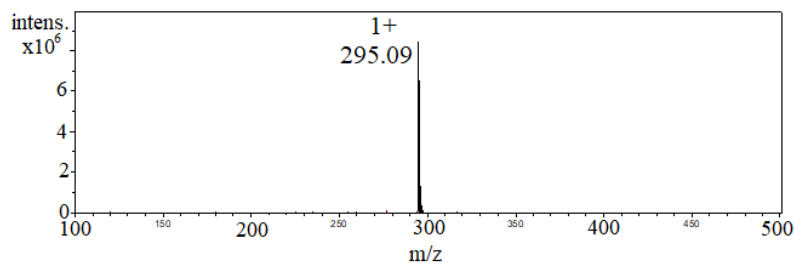


Figura 103: Espectro de massas do produto da remoção do Z isolado (Phe-Phe). Condições MS. voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>.

O Z-Asp-Phe-OMe também passou pelo processo de hidrogenação catalítica com o C/Pd e as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-Pd (**Figura 104**). O desaparecimento do Z-Asp-Phe-OMe foi similar ao desaparecimento do Z-Phe-Phe (~100%), como mostrado pelo monitoramento por RP-HPLC. Entretanto, a massa de produto isolado indicou 70% de rendimento, ou seja, menor que 100% como indicado no cromatograma. Esta redução pode ter sido causada pela etapa de retirada do produto do frasco de reação. O espectro de massas permitiu identificar o produto (**Figura 105**, [M + H<sup>+</sup>] de 295,09). Os resultados obtidos para a conversão (próximo de 100%) pelo monitoramento por HPLC e (em torno de 70 e 80%) pelo isolamento condizem com os resultados obtidos por UBERMAN e col. (2014) na hidrogenação de alquinos. O uso de Pd suportado em cloreto de poli(vinila) na remoção do grupo Z de peptídeos foi reportado por Hemantha e col. (2011), que obtiveram rendimento entre 68 e 100% dependendo do peptídeo.



**Figura 104: Monitoramento das reações de hidrogenação do Z-Asp-Phe-OMe** Condições HPLC: Vol. injeção 20 $\mu$ L, coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, fluxo: 1mL·min<sup>-1</sup>, gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210 nm. Condição reacional: 2 h a temp. amb.. (A) 0 h de reação com C/Pd; (B) 2 h de reação com C/Pd; (C) 0 h de reação com NP-Pd; (D) 2 h de reação com NP-Pd. 1: Z-Asp-Phe-OMe; 2: Asp-Phe-OMe; 3: tolueno.



**Figura 105: Espectro de massas do produto da remoção do Z isolado (Asp-Phe-OMe).** Condições MS: voltagem do capilar: 3,5 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>.

#### 4.4.3.1 Z-Ala-Phe e reuso das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-Pd

A reação de hidrogenação do grupo Z da Z-Ala-Phe foi escolhida para mostrar o reuso por já ter sido estudada anteriormente pelo grupo (UNGARO et al., 2015). O nanocatalisador foi reutilizado três vezes (quatro ciclos no total) (**Figura 106**). Estes resultados foram condizentes com os do reuso desse nanocatalisador para a hidrogenação do 3-butin-1-ol (UBERMAN et al., 2014). Estes resultados de reuso também são comparáveis aos de outros catalisadores com Pd. Hemantha e col. (2011), conseguiram utilizar o mesmo catalisador de Pd por três ciclos sem perder rendimento de reação. Já Patel e col. (2019) conseguiram reutilizar o catalisador de Pd imobilizado em celite por até cinco ciclos sem perda de atividade na hidrogenação de cinamato de metila.

Em comparação com os dados da literatura a utilização das Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sílica-Pd pode ser mais vantajosa por serem facilmente removidas do meio reacional, serem reutilizáveis e não serem pirofóricas, três características que o C/Pd não apresenta. O rendimento obtido da remoção do grupo Z do Z-Ala-Phe foi de 74 ( $\pm 3$ )%.

Os rendimentos finais da rota sintética, considerando-se os melhores resultados de cada etapa, estão apresentados na **Tabela 41**. Os rendimentos finais foram calculados pelo produtório dos rendimentos de cada etapa de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Rendimento final} = \prod \text{rendimento de cada etapa}$$

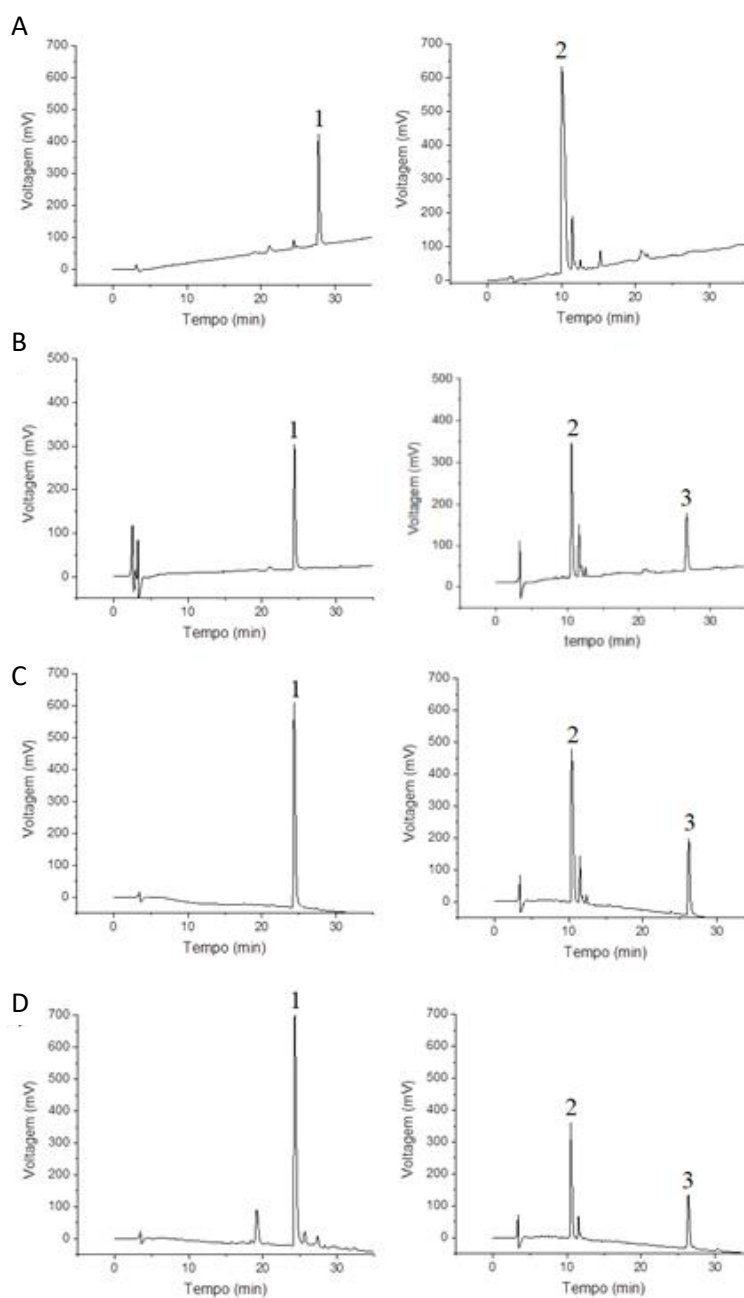


Figura 106: Monitoramento do reuso da  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Pd}$  na hidrogenação catalítica da Z-Ala-Phe. Condições HPLC: Vol. injeção 20 $\mu\text{L}$ , coluna: Vydac C18, Solvente A: 0,1% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ , Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ , fluxo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , gradiente linear: 5-95% de B e  $\lambda$ : 210 nm. Condição reacional: 2 h a temp. amb.. (A) 0 h e 2h de reação do 1<sup>o</sup> ciclo; (B) 0 h e 2h de reação do 2<sup>o</sup> ciclo; (C) 0 h e 2h de reação do 3<sup>o</sup> ciclo; (D) 0 h e 2h de reação do 4<sup>o</sup> ciclo. 1: Z-Ala-Phe; 2: Ala-Phe; 3: tolueno.

Tabela 41: Rendimento final de cada um dos dipeptídeos alvo.

Peptídeo	Rendimento (%)
Ala-Phe	53
Asp-Phe-OMe	51
Phe-Phe	63
Fmoc-Phe-Phe	59

## 5. DISCUSSÃO GERAL

### 5.1 Imobilização de endopeptidases

Entre as modificações possíveis de se fazer em enzimas, a imobilização é escolhida quando se deseja recuperação eficiente após uso e subsequentes reusos ou desenvolver um sistema reacional em fluxo. Além disso, a imobilização pode alterar propriedades das enzimas, tornando-a mais estável à denaturação e autólise (quando ela é uma peptidase). Por outro lado, pode resultar em queda da sua atividade específica.

A escolha de um suporte nanométrico deve levar em conta vários aspectos já comentados aqui; os suportes manométricos magnéticos mais usados são os de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (DUAN et al., 2018; ROSSI et al., 2014). Pelas propriedades discutidas e pela disponibilidade do material no Laboratório de Nanomateriais e Catálise da Prof. Dra. Liane M. Rossi, nossa colaboradora, esse estudo empregou como suporte nanopartículas de magnetita revestidas com sílica aminada ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$ ) para a imobilização de TLN e TRY, endopeptidases de interesse para a química de peptídeos e proteínas. Elas já tinham sido imobilizadas em outras NPs super-paramagnéticas mas há poucos trabalhos relativos à TLN (CONTE et al., 2018; KOBAYASHI; MATSUNAGA, 1991; SHINKAI; HONDA; KOBAYASHI, 1991; XIN; SI; XING, 2010) a TRY é particularmente importante como catalisador de proteólises. As imobilizações seguiram a da  $\alpha$ -QT anteriormente estudada por nós (LIRIA et al., 2014), mas está serina-endopeptidase também foi imobilizada novamente para uso neste estudo.

A primeira característica investigada neste trabalho e no estudo anterior (e que o diferencia da maioria se refere ao conteúdo proteico dos NBCs obtidos. Ele é

importante porque indica que a imobilização, de fato, ocorreu e permite que as capacidades catalíticas deles sejam comparadas com as das enzimas livres de forma mais acurada. Por isso, esse conteúdo foi determinado pelo método da hidrólise ácida total dos NBCs obtidos seguida pela análise de aminoácidos dos hidrolisados. Os conteúdos proteicos em  $\text{mol.mg}^{-1}$  (1,0 nmol para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN, 1,6 nmol para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY e 1,2 nmol para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT) foram parecidos entre si e comparáveis com os obtidos por Xin e col. (2010), já esse que eles relataram a imobilização por ligação covalente de TLN,  $\alpha$ -QT e papaína em NPs de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  não revestidas e obtiveram conteúdos proteicos em torno de 2,2 ( $\pm 0,5$ )% de massa de enzima/massa de NP [a média obtida das três enzimas imobilizadas nesse trabalho foi 2,7 ( $\pm 0,6$ )]. Os resultados apresentados indicam que a imobilização em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica usando a metodologia de ligação covalente com ativação pelo glutardialdeído é rápida e fácil para produzir NBCs proteolíticos magnéticos com conteúdos proteicos aceitáveis.

Quanto à atividade específica frente aos seus substratos específicos, os NBCs aqui descritos apresentaram queda em relação às enzimas livres (39% para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN, 37% para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY e de 62% para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT), indicando que a autólise durante a imobilização foi mais intensa para a segunda. As características cinéticas, representadas pela relação  $k_{\text{cat}}.K_m^{-1}$ , para os substratos seguiram a mesma tendência. Essas quedas já eram esperadas e estão de acordo com resultados de imobilização por ligação covalente da literatura já citados (BRADY; JORDAAN, 2009; HOSHINO et al., 1997; KARIMI et al., 2014; SHINKAI; HONDA; KOBAYASHI, 1991; SUN et al., 2017).

Apesar da queda na atividade ser um ponto negativo ela foi compensada pela possibilidade de reuso que a imobilização proporcionou, pois, os três NBCs puderam

ser usados por, pelo menos, 10 ciclos de hidrólise dos substratos específicos retendo mais de 60% da atividade inicial (com destaque para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY que manteve ao menos 80% em todos os ciclos) e por 5 ciclos de proteólise da BSA. Esses resultados estão de acordo com os descritos por autores que imobilizaram essas endopeptidases (JU et al., 2012; LI et al., 2010; ROCHA-MARTIN; FERNÁNDEZ-LORENTE; GUIBAN, 2018; SUN et al., 2017; XIN; SI; XING, 2010) e são promissores para futuras aplicações.

As outras características determinadas para os novos NBCs obtidos também seguiram o esperado: houve aumento das estabilidades química e térmica como já observado para outras proteases por Atacan e col, (2017), Bayramoglu e col, (2014), Epton e col, (1973) e Rodríguez-Martínez e col, 2009.

Enfim, os resultados para os três novos NBCs obtidos demonstraram que as imobilizações foram bem-sucedidas. Tal sucesso abre a possibilidade de se tentar a imobilização dessas enzimas ao mesmo tempo, o que poderia ser explorado no futuro.

## **5.2 Aplicação das $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY e $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT: proteólises das caseínas do leite bovino e da BSA**

Nesse trabalho de tese também foram estudadas aplicações para os novos NBCs obtidos que seriam favorecidas pela imobilização. Uma delas foi a proteólise (um processo importante, por exemplo, para a obtenção de peptídeos bioativos a partir de preparados proteicos, estudos proteômicos e eliminação de proteínas alergênicas consumíveis), pois a imobilização pode beneficiar tal aplicação caso a autólise seja diminuída por ela, o que diminui a presença de peptídeos interferentes no proteolisado e permite o reuso do biocatalisador proteolítico.



Quando foram aplicados na proteólise da caseína do leite bovino, os três NBCs catalisaram a sua digestão em 24 h de incubação, gerando uma quantidade de fragmentos equiparável com os produzidos quando as endopeptidases usadas estavam livres, porém com diferença no padrão de fragmentação. Esse tipo de resultado concorda com Ong e col., (1966) e Zdarta e col., (2018b) e era esperado já que, como discutido anteriormente, o suporte pode interferir na interação entre enzima e substrato. A  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN gerou mais que o dobro do que as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY e - (79 contra 32 e 29, respectivamente), o que também era esperado, pois a especificidade frente às ligações peptídicas de um substrato é mais ampla.

Como as caseínas do leite bovinos são conhecidas por apresentarem peptídeos bioativos encriptados na sua sequência de aminoácidos (GUINANE et al., 2015; ROCHA-MARTIN; FERNÁNDEZ-LORENTE; GUIBAN, 2018; ZANUTTO-ELGUI et al., 2019), os fragmentos gerados foram comparados neste trabalho com os descritos no *Milk Bioactivepeptides Database* (NIELSEN et al., 2017) visando avaliação de performance. Foram encontrados nos três proteolisados 57 fragmentos peptídicos com potencial bioatividade, pois suas sequências de aminoácidos eram idênticas ou parecidas à de bioativos descritos na literatura. Já as proteólises da BSA também foram bem-sucedidas, apesar da maior resistência à digestão em 6 h de reação (**Figuras 60, 73 e 89**) quando comparada com a proteólise das caseínas. Isso pode estar relacionado ao tamanho 3 x maior que as caseínas e com a aderência dos NBCs à parede do frasco reacional. Novamente, foram encontrados mais fragmentos peptídicos (48) gerados pela catálise de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN do que pela de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT (24) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY (28). Dos fragmentos encontrados

apenas 5 tem potencial bioatividade segundo o banco de dados *BIOPEP* (IWANIAK et al., 2016).

A partir destes resultados, portanto, é possível delinear novos estudos visando o isolamento e testes biológicos dos peptídeos gerados no estudo realizado, além de identificar novos que ainda não estejam descritos na literatura. Tais fragmentos também podem ser usados como bases de novos peptídeos sintéticos pelas alterações de suas sequências ou pela funcionalização.

### **5.3 Aplicação das $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TRY e $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT: coagulação do leite mediante catálise pela $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN**

Como já descrito acima a coagulação do leite, a qual é uma das etapas da fabricação de queijos, depende da hidrólise da ligação -Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>- da  $\kappa$ -caseína. Tal ligação é reconhecida pela TLN e por esse motivo, a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN foi examinada na sua capacidade de causar a coagulação do leite bovino. Os resultados positivos obtidos e o fato de ela ser reutilizável por dez ciclos sem aparentemente perder atividade são bastante interessantes porque na literatura apenas alguns trabalhos realizados por Yun e col. (1981; 1982; 1988) estudaram esse processo usando a TLN imobilizada.

A obtenção da quimosina bovina apresenta problemas econômicos, de sustentabilidade e éticos por necessitar o abate do bezerro e, por isso, ela vem sendo cada vez menos utilizada e abrindo espaço para quimosina de outras origens e endopeptidases capazes de coagular o leite. Assim sendo, a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN poderia substituir a quimosina por ser recuperável, reutilizável e vir de fonte bacteriana perene. Por outro lado, ela só poderia ser utilizada para fabricação de queijos após estudos sensoriais detalhados do produto obtido e das suas eficiências catalíticas

e especificidades primária e secundárias frente aos substratos proteicos. De fato, o trabalho de Meng e col. (2018), por exemplo, mostrou que a coagulação catalisada por protease proveniente do *Bacillus subtilis* foi capaz de levar a um queijo com sabor de leite sem o esperado sabor amargo causado pela hidrólise excessiva de proteínas. Vale ressaltar que antes de qualquer aplicação em alimentos uma NP e seus derivados precisam passar por estudos toxicológicos para averiguar impactos na saúde de quem consumi-los ou se expor a eles.

#### **5.4 Aplicação das $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN e $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT: catalisadores em rota sintética de dipeptídeos pré-estabelecida por nós (UNGARO e col., 2015)**

Como descrito nos itens anteriores, endopeptidases podem catalisar a quebra e a síntese da ligação peptídica, dependendo das condições experimentais. Tendo isso em mente, neste trabalho dois NBCs também foram avaliados como biocatalisadores magnéticos mais estáveis, recuperáveis e recicláveis para essa aplicação porque poucos no mundo têm feito estudo a mesma, que como comentado na **Introdução** é vantajosa em diversos aspectos e em relação ao ambiente.

Inicialmente, foi estabelecida a rota sintética para o dipeptídeo Ala-Phe (UNGARO et al., 2015), que está totalmente de acordo com os princípios da Química Verde, pois empregou biocatálise, nenhum ou pouco solvente orgânico e hidrogenação catalítica em etapa de remoção de grupos protetores. Nela, foram usados como catalisadores a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT e o  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Pd. Em função dos altos rendimentos obtidos, essa rota continuou a ser estudada substituindo a TLN livre pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN; em paralelo, estudamos a aplicabilidade da rota na síntese de três outros dipeptídeos de interesse científico e comercial, de modo a usar

os catalisadores magnéticos  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN na formação da ligação peptídica, a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT na hidrólise do éster e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Pd na remoção do grupo protetor Z.

Os rendimentos reacionais obtidos na primeira etapa mediante catálise pela TLN livre (73-85 %) foram superiores aos obtidos com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN nos casos das sínteses de Z-Ala-Phe-OMe, Z-Asp-Phe-OMe e Z-Phe-Phe-OMe (26-52 %), mas comparável no caso da síntese de Fmoc-Phe-Phe-OMe (72 %). Além disso, o reuso desse NBC não apresentou rendimentos satisfatórios (13-16 %). Tais rendimentos são inferiores aos obtidos nas sínteses anteriores de Z-Asp-Phe-OMe e Z-Phe-Phe-OMe em meios aquo-orgânicos (AcOEt ou álcool de terc-amila) catalisadas pela TLN imobilizada em Amberlite XAD-7 ou  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (XIN et al., 2010; NAGAYASU et al., 1994; MIYANAGA et al., 1995), o que nos levou questionar se a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-NH<sub>2</sub> empregada era um bom suporte de imobilização de endopeptidases com finalidade sintética. Por outro lado, as sínteses de Z-Ala-Phe-OMe e Z-Asp-Phe-OMe catalisadas pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN ocorreram em meio aquoso em que os produtos precipitam (facilitando as suas remoções e, eliminando etapas de extração com solventes orgânicos) e as sínteses dos Z-Phe-Phe-OMe e Fmoc-Phe-Phe-OMe, que precisaram ser feitas em meio bifásico, utilizaram o AcOEt considerado aceitável em processos químicos limpos (ALDER et al., 2016; ALFONSI et al., 2008; PRAT et al., 2016).

A segunda etapa da rota explorada é a hidrólise do éster protetor da carboxila terminal dos precursores dos dipeptídeos catalisada pela  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT. No nosso trabalho de 2015 (UNGARO et al., 2015), a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT se mostrou menos autolítica do que a  $\alpha$ -QT e reutilizável por até 10 ciclos. Neste trabalho de Tese, essas propriedades foram confirmadas pelos altos rendimentos obtidos para a hidrólise do éster dos Z-Ala-Phe-OMe, Z-Phe-Phe-OMe e Fmoc-Phe-Phe-OMe

catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica- $\alpha$ -QT (72-91%). Esse sucesso também evidenciou que a suspeita de inadequação do suporte levantada acima não procede e que fatores já discutidos em **Resultados** explicam os baixos rendimentos obtidos na primeira etapa da rota sintética usando a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-TLN. Quanto ao “aspecto verde” dessa etapa reacional, o reuso do NBC por vários ciclos também se mostrou uma grande vantagem. Por outro lado, o uso dos solventes ACN e DMSO não é totalmente desejável, já que o primeiro requer atenção no manuseio e o segundo tem impacto ambiental moderado (ALDER et al., 2016; ALFONSI et al., 2008; PRAT et al., 2016). Por isso, otimizamos a dissolução dos substratos e a condição reacional para apenas 15-30 % de ACN ou 30% DMSO.

A terceira e última etapa da rota sintética estudada é a remoção do grupo protetor Z do amino terminal do peptídeo por hidrogenação catalítica em que, pela primeira vez, o C/Pd foi substituído com sucesso pelo nanocatalisador  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Pd (UNGARO et al. 2015). No presente trabalho, conseguimos demonstrar que o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Pd também foi eficiente na remoção do grupo Z dos Z-Ala-Phe, Z-Asp-Phe-OMe e Z- Phe-Phe (rendimentos de reação: 70-81%), além de ter sido usado 4 vezes sem perdas aparentes de eficiência. A hidrogenação catalítica empregando o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @sílica-Pd, portanto, foi confirmada como uma alternativa geral, mais segura e limpa à hidrogenação catalisada por C/Pd, pois o nanocatalisador não é pirofórico, é facilmente recuperável e é reutilizável e os resultados que forneceu são comparáveis aos de hidrogenação do grupo Z de peptídeos catalisada por Pd imobilizado em outros materiais (HEMANTHA; SURESHBABU, 2011; MURATA et al., 2003).

Os rendimentos finais de obtenção dos dipeptídeos Ala-Phe, Asp-Phe-OMe, Phe-Phe e Fmoc-Phe-Phe purificados foram 51-63%, comparáveis com os de

enzimáticas ou quimo-enzimáticas de síntese de di- ou tripeptídeos anteriores (DE MIRANDA et al., 1986; MIRANDA et al., 1991; ZHOU et al., 2003).

Diante do exposto acima, conclui-se que a rota sintética “verde” (pois, segue princípios descritos em ANASTAS; WARNER, 1998) inicialmente estabelecida por nós pode ser otimizada e fornecer os dipeptídeo-alvos com maiores rendimentos finais se composta de: formação da ligação peptídica catalisada pela TLN livre em meio aquoso ou aquo-orgânico bifásico (AcOEt como solvente orgânico), remoção do éster protetor por hidrólise catalisada com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT em meio contendo até 30 % de ACN ou DMSO e a remoção do grupo Z por hidrogenação catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Pd. Adicionalmente, a rota em pauta se mostra aplicável para a síntese de outros dipeptídeos de valor científico e comercial. Da mesma forma, o suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$  poderia ser usado para a obtenção de novos nanobiocatalisadores proteolíticos magnéticos.

## 6. CONCLUSÕES

O estudo realizado e aqui descrito é interdisciplinar, pois enquadra-se nas áreas de Química de Macromoléculas, de Catálise, de Nanotecnologia e/ou de Biotecnologia, pois três biocatalisadores proteolíticos foram imobilizados em nanopartículas magnéticas, os produtos foram extensivamente caracterizados e o potencial de aplicação em processos de interesse biotecnológico também foi verificado. Os resultados obtidos mostraram que as peptidases TLN e a TRY puderam ser covalentemente ligadas à nanopartícula magnética aminada  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\text{NH}_2$  via ativação usando glutardialdeído, de maneira simples, rápida e eficiente para produzir dois novos NBC magnéticos proteolíticos.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY, apesar de menos ativas do que as TLN e TRY livres, são recuperáveis, reutilizáveis, mais estáveis quando estocadas em suspensão aquosa de pH definido sob refrigeração e apresentam maior termoestabilidade, revelando as vantagens que a imobilização trouxe a estas enzimas de interesse biotecnológico.

Os resultados das proteólises das caseínas do leite e albuminas do soro bovinos catalisadas por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TRY ou por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT obtido e estudado por nós anteriormente, mostraram as suas aplicabilidades na geração de fragmentos funcionais - peptídeos bioativos - de maneira eficiente e confirmaram as suas capacidades de se manterem ativos e serem reutilizáveis. Já a coagulação do leite bovino comercial catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN mostrou potencial de uso no processamento de alimento (leite), porém, para tal seria necessário realizar um estudo toxicológico, afinal trata-se de um NBC magnético.

A rota de síntese limpa de dipeptídeos desenvolvida neste estudo usando os novos NBCs proteolíticos magnéticos  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT se mostrou eficiente para a síntese de Ala-Phe, Phe-Phe e Fmoc-Phe-Phe. Na primeira etapa de formação da ligação peptídica catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-TLN, o rendimento reacional nem sempre foi alto; o aspartame também foi obtido, porém com baixo rendimento final. A segunda etapa de hidrólise do éster catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica- $\alpha$ -QT mostrou-se particularmente eficiente para todos os casos. A terceira etapa de remoção do grupo Z por hidrogenação ocorreu com rendimentos altos quando catalisada pelo método clássico usando C/Pd ou quando, pioneiramente, foi catalisada por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ sílica-Pd, sendo que o NBC magnético também se mostrou recuperável e reutilizável.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADEKOYA, O. A.; SYLTE, I. Thermolysin. In: KRETSINGER, R. H.; UVERSKY, V. N.; PERMYAKOV, E. A. (Eds.). . **Encyclopedia of Metalloproteins**. New York: Springer US, 2013. p. 2213–2221.
- AGYEI, D.; AKANBI, T. O.; OEY, I. Enzymes for Use in Functional Foods. In: MOHAMMED, K. (Ed.). . **Enzymes in Food Biotechnology**. Cambridge: Academic Press, 2019. p. 129–147.
- ALDER, C. M. et al. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. **Green Chemistry**, v. 18, n. 13, p. 3879–3890, 2016.
- ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.
- ALTUN, G. D.; CETINUS, S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 964–971, 2007.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- ANEKTHANAKUL, K. et al. Natural ACE inhibitory peptides discovery from *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) strain C1. **Peptides**, v. 118, p. 170107, 2019.
- ARDILA-FIERRO, K. J. et al. Papain-catalysed mechanochemical synthesis of oligopeptides by milling and twin-screw extrusion: Application in the Juliá-Colonna enantioselective epoxidation. **Green Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1262–1269, 2018.
- ARGÜELLO, M. Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation. **Journal of Membrane Science**, v. 216, n. 1–2, p. 121–134, 2003.
- ARSHAD, N. et al. Enzyme and Bioactive Peptides—A Strategy for Discovery and Identification of Antihypertensive Peptides. In: KUDDUS, M. (Ed.). . **Enzymes in Food Biotechnology**. Cambridge: Academic Press, 2019. p. 343–367.
- ATACAN, K. et al. Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 148–155, 2017.
- ATACAN, K.; ÖZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 227–236, 2015.
- AYENIMO, J. G.; ADELOJU, S. B. Inhibitive potentiometric detection of trace metals with ultrathin polypyrrole glucose oxidase biosensor. **Talanta**, v. 137, p. 62–70, 2015.
- AZEVEDO, R. A. et al. Antitumor Effect of Cationic INKKI Peptide from Bovine  $\beta$ -Casein on Melanoma B16F10. **Journal of Cancer Therapy**, v. 3, n. 4, p. 237–244, 2012.
- BAIRD, T. T. Trypsin ☆. In: **Reference Module in Life Sciences**. Amsterdã: Elsevier, 2017. v. 16p. 8–11.



BAIRD, T. T. J.; CRAIK, C. S. Trypsin. In: RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (Eds.). . **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3. ed. London: Elsevier Inc., 2013. p. 2594–2600.

BAKER, P. R.; CLAUSER, K. R. **Protein Prospector**. Disponível em: <<http://prospector.ucsf.edu>>.

BALDIKOVA, E. et al. Magnetically modified bacterial cellulose: A promising carrier for immobilization of affinity ligands, enzymes, and cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 214–221, 2017.

BAMDAD, F. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 609, 2017.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.

BARRETT, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochemical Journal**, v. 237, n. 3, p. 935–935, 1986.

BASTIDA, A. et al. Highly improved enzymatic peptide synthesis by using biphasic reactors. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, n. 3, p. 271–278, 2018.

BAYRAMOGLU, G. et al. Trypsin immobilized on magnetic beads via click chemistry: Fast proteolysis of proteins in a microbioreactor for MALDI-ToF-MS peptide analysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 12, p. 4554–4564, 2014.

BEKHIT, A. A. A. et al. Exogenous Proteases for Meat Tenderization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 8, p. 1012–1031, 2014.

BELYAEVA, A V et al. Biocatalytic properties of thermolysin immobilized on polyvinyl alcohol cryogel. **Bioorganicheskaja khimiia**, v. 34, n. 4, p. 487–494, 2008.

BENCHAMIN, D. et al. Anti-proliferative activity of L-asparaginase enzyme from fungi on breast cancer. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 407–410, 2019.

BERGMANN, M.; ZERVAS, L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 65, n. 7, p. 1192–1201, 1932.

BERTHOU, J. et al. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. **FEBS Letters**, v. 218, n. 1, p. 55–58, 1987.

BIRRANE, G.; BHYRAVBHATLA, B.; NAVIA, M. A. Synthesis of aspartame by thermolysin: An x-ray structural study. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 6, p. 706–710, 2014.

BLANCO, A.; BLANCO, G. Enzymes. In: BLANCO, A.; BLANCO, G. (Eds.). . **Medical Biochemistry**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2017. p. 153–175.

BODANSZKY, M. **Peptide chemistry: a practical textbook**. 2. ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 1993.

BOGDANOV, B.; SMITH, R. D. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down

and bottom up. **Mass spectrometry reviews**, v. 24, n. 2, p. 168–200, 2005.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.

BURG, B. VAN DEN; EIJSINK, V. Thermolysin and Related Bacillus Metallopeptidases. In: RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (Eds.). . **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3. ed. London: Elsevier Inc., 2013. p. 540–553.

CAKIR-KIEFER, C. et al. Transport Across Caco-2 Cell Monolayer and Sensitivity to Hydrolysis of Two Anxiolytic Peptides from  $\alpha$  s1 -Casein,  $\alpha$ -Caseozepine, and  $\alpha$  s1 -Casein-(f91–97): Effect of Bile Salts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 22, p. 11956–11965, 2011.

CASE, A.; STEIN, R. L. Mechanistic origins of the substrate selectivity of serine proteases. **Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 3335–3348, 2003.

CASTILLO, I. J. B. et al. Antihypertensive property of the peptic and chymotryptic hydrolysates derived from the crude protein extract of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] seeds. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 6, p. 2586–2592, 2017.

CHAUHAN, V.; KANWAR, S. S. Bioactive peptides: Synthesis, functions and biotechnological applications. In: VERMA, M. L.; CHANDEL, A. K. (Eds.). . **Biotechnological Production of Bioactive Compounds**. Amsterdã: Elsevier, 2020. p. 107–137.

CHAWNER, R.; EYERS, C. E. The Forgotten Fragments. **European Pharmaceutical Review**, n. 5, p. 1–9, 2011.

CHEN, F. et al. A novel and efficient method for the immobilization of thermolysin using sodium chloride salting-in and consecutive microwave irradiation. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 158–163, 2012.

CHEN, K.; ARNOLD, F. H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 12, p. 5618–5622, 1993.

CHEN, Z. et al. Enzyme Mimicry for Combating Bacteria and Biofilms. **Accounts of Chemical Research**, v. 51, n. 3, p. 789–799, 2018.

CIPOLATTI, E. P. et al. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. **RSC Advances**, v. 6, n. 106, p. 104675–104692, 2016.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Proteomics: The Global Analysis of Proteins. In: CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. (Eds.). . **Molecular Biology**. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2013. p. e309–e314.

CONTE, M. P. et al. Biocatalytic Self-Assembly on Magnetic Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 3, p. 3069–3075, 2018.

CONTE, M. P.; LAU, K. H. A.; ULIJN, R. V. Biocatalytic Self-Assembly Using

Reversible and Irreversible Enzyme Immobilization. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 4, p. 3266–3271, 2017.

CONTRERAS, M. DEL M. et al. Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 71–78, 2013.

CROTTI, S. et al. Mass spectrometry in the pharmacokinetic studies of anticancer natural products. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 36, n. 2, p. 213–251, 2017.

DA SILVA, F. P.; FIORIO, J. L.; ROSSI, L. M. Tuning the Catalytic Activity and Selectivity of Pd Nanoparticles Using Ligand-Modified Supports and Surfaces. **ACS Omega**, v. 2, n. 9, p. 6014–6022, 2017.

DA SILVA, F. P.; GONÇALVES, R. V.; ROSSI, L. M. Magnetically recoverable copper oxide catalysts for aerobic allylic oxidation of cyclohexene. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 426, p. 534–541, 2017.

DAGLIOGLU, C.; ZIHNIOGLU, F. Covalent immobilization of trypsin on glutaraldehyde-activated silica for protein fragmentation. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 40, n. 6, p. 378–384, 2012.

DAHLQUIST, F. W.; LONG, J. W.; BIGBEE, W. L. Role of calcium in the thermal stability of thermolysin. **Biochemistry**, v. 15, n. 5, p. 1103–1111, 1976.

DALGLEISH, D. G. The Enzymatic Coagulation of Milk. In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Boston, MA: Springer US, 1993. p. 69–100.

DATTA, D.; TIWARI, O.; GANESH, K. N. New archetypes in self-assembled Phe-Phe motif induced nanostructures from nucleoside conjugated-diphenylalanines. **Nanoscale**, v. 10, n. 7, p. 3212–3224, 2018.

DE MIRANDA, M. T. M. et al. Thermolysin as a catalyst in enzymatic synthesis of asparagine-containing peptides. **Bioorganic Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 182–193, 1986.

DEBNATH, S.; ROY, S.; ULIJN, R. V. Peptide nanofibers with dynamic instability through nonequilibrium biocatalytic assembly. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 45, p. 16789–16792, 2013.

DÍAZ-RODRÍGUEZ, A.; DAVIS, B. G. Chemical modification in the creation of novel biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 211–219, 2011.

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437, 2013.

DING, Y.; YU, H.; MOU, S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 982, n. 2, p. 237–244, 2002.

DUAN, M. et al. Recent progress in magnetic nanoparticles: synthesis, properties, and applications. **Nanotechnology**, v. 29, n. 45, p. 452001, 2018.

DUAN, Y. J.; LAURSEN, R. A. Protease Substrate Specificity Mapping Using Membrane-Bound Peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 216, n. 2, p. 431–438, 1994.

DWEVEDI, A. Basics of Enzyme Immobilization. In: DWEVEDI, A. (Ed.). **Enzyme Immobilization**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 21–44.

EPTON, R.; MCLAREN, J. V.; THOMAS, T. H. Water-insoluble polyacrylamide-thermolysin conjugates. **Biochimica et biophysica acta**, v. 328, n. 2, p. 418–27, 1973.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.

FACHRANIAH et al. Papain Enzyme and Lemon as Coagulants in Cottage Cheese. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 536, n. 1, 2019.

FARZANEH, P. et al. Bioactive properties of *Agaricus bisporus* and *Terfezia clavervii* proteins hydrolyzed by gastrointestinal proteases. **LWT**, v. 91, p. 322–329, 2018.

FAURÉ, N. E.; HALLING, P. J.; WIMPERIS, S. A solid-state NMR study of the immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on mesoporous silica. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 2, p. 1042–1048, 2014.

FÁZIO, M. A. et al. Structure-activity relationship studies of gomesin: Importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 205–218, 2006.

FEDER, J.; BROUGHAM, L.; WILDI, B. Inhibition of Thermolysin by Dipeptides. **Biochemistry**, v. 13, n. 6, p. 1186–1189, 1974.

FEDER, J.; SCHUCK, J. M. Comparative kinetic studies on the neutral protease and thermolysin catalyzed hydrolysis of simple dipeptide substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 12, n. 2, p. 313–319, 1970a.

FEDER, J.; SCHUCK, J. M. Studies on the *Bacillus subtilis* neutral-protease- and *Bacillus thermoproteolyticus* thermolysin-catalyzed hydrolysis of dipeptide substrates. **Biochemistry**, v. 9, n. 14, p. 2784–2791, 1970b.

FENG, J. et al. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 286, p. 216–222, 2016.

FILIPPOVA, Y. et al. Proteinases immobilized on poly ( vinyl alcohol ) cryogel : novel biocatalysts for peptide synthesis in organic media. **Russian Chemical Bulletin, International Edition**, v. 50, n. 10, p. 1–6, 2001.

FIORIO, J. L.; LÓPEZ, N.; ROSSI, L. M. Gold–Ligand-Catalyzed Selective Hydrogenation of Alkynes into cis -Alkenes via H<sub>2</sub> Heterolytic Activation by Frustrated Lewis Pairs. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 4, p. 2973–2980, 2017.

FITÉ, M. et al. Integrated process for the enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1214–1220, 2002.

FITZGERALD, R. J. Potential Uses of Caseinophosphopeptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5–6, p. 451–457, 1998.

FLASCHEL, E.; CRELIER, S.; RENKEN, A. Enzymatic Ester Hydrolysis in Liquid Two-Phase Systems for the Preparation of L-Phenylalanine, b. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 542, n. 1 Enzyme Engine, p. 219–223, 1988.

FONTANA, A. et al. Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. **Biochemistry**, v. 25, n. 8, p. 1847–1851, 1986.

FOTIADOU, R. et al. Development of effective lipase-hybrid nanoflowers enriched with carbon and magnetic nanomaterials for biocatalytic transformations. **Nanomaterials**, v. 9, n. 6, 2019.

FOX, P. F. Milk-clotting and proteolytic activities of rennet, and of bovine pepsin and porcine pepsin. **Journal of Dairy Research**, v. 36, n. 3, p. 427–433, 1969.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, M. (Ed.). . **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, NJ, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GATTIKER, A. et al. FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification. **Proteomics**, v. 2, n. 10, p. 1435–1444, 2002.

GEORGALAKI, M. et al. Milk protein fragments induce the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 1143–1151, 2010.

GETUN, I. V. et al. SDS-subtilisin catalyzed synthesis of tetra-peptides containing multifunctional amino acid residues in ethanol. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 15, p. 105–110, 2001.

GLATTER, T. et al. Large-scale quantitative assessment of different in-solution protein digestion protocols reveals superior cleavage efficiency of tandem Lys-C/trypsin proteolysis over trypsin digestion. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 11, p. 5145–5156, 2012.

GOBBETTI, M.; NEVIANI, E.; FOX, P. The Cheeses of Italy: Science and Technology. In: **The Cheeses of Italy: Science and Technology**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 39–53.

GOLDRING, J. P. D. Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. In: B., K.; R., S. (Eds.). . **Electrophoretic Separation of Proteins. Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2019. v. 1855p. 31–39.

GOLDSTEIN, L.; LEVIN, Y.; KATCHALSKI, E. A Water-insoluble Polyanionic Derivative of Trypsin. II. Effect of the Polyelectrolyte Carrier on the Kinetic Behavior of the Bound Trypsin \*. **Biochemistry**, v. 3, n. 12, p. 1913–1919, 1964.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 8, p. 697–706, 2002.

GOVINDU, P. C. V. et al. Conformations of cysteine disulfides of peptide toxins: Advantage of differentiating forward and reverse asymmetric disulfide conformers. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 8, p. 2017–2029, 2019.

GOWDA, D. C. Removal of some commonly used protecting groups in peptide syntheses by catalytic transfer hydrogenation with formic acid and 10% palladium on carbon. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 1064–1067, 2002.

GOWDA, D. C.; ABIRAJ, K. Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation in peptide synthesis. **Letters in Peptide Science**, v. 9, n. 4–5, p. 153–165, 2002.

GRÁF, L.; SZILÁGYI, L.; VENEKEI, I. Chymotrypsin. In: RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (Eds.). **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3. ed. London: Elsevier Inc., 2013. p. 2626–2633.

GRANDI, C. et al. Thermolysin and Bacillus Subtilis neutral proteases. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 16, n. 4, p. 327–38, 1980.

GREEN, H. et al. RGD-presenting peptides in amphiphilic and anionic  $\beta$ -sheet hydrogels for improved interactions with cells. **RSC Advances**, v. 8, n. 18, p. 10072–10080, 2018.

GROMOVA, I.; CELIS, J. E. Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass Spectrometry. In: CELIS, J. E. (Ed.). **Cell Biology**. 3. ed. Cambridge: Academic Press, 2006. v. 4p. 219–223.

GU, Y.; WU, J. Bovine lactoferrin-derived ACE inhibitory tripeptide LRP also shows antioxidative and anti-inflammatory activities in endothelial cells. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 375–384, 2016.

GUINANE, C. M. et al. Generation of the antimicrobial peptide caseicin A from casein by hydrolysis with thermolysin enzymes. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 1–7, 2015.

GUO, Y. et al. The surface modification of nanosilica, preparation of nanosilica/acrylic core-shell composite latex, and its application in toughening PVC matrix. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 4, p. 2671–2680, 2008.

GUZMAN, F.; BARBERIS, S.; ILLANES, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 279–314, 2007.

HAN, J. et al. Preparation and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>@4-arm-PEG-NH<sub>2</sub>, a novel magnetic four-arm polymer-nanoparticle composite for cellulase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 130, p. 90–98, 2018.

HAN, Q. et al. Immobilization of phospholipase d on silica-coated magnetic nanoparticles for the synthesis of functional phosphatidylserine. **Catalysts**, v. 9, n. 4, 2019.

HANAFUSA, N. Denaturation of enzyme protein by freeze-thawing and freeze-drying: II. Freeze-thawing and freeze-drying of catalase. **Contributions from the Institute of Low Temperature Science.**, v. B17, p. 21–38, 1972.

HAQUE, E.; CHAND, R.; KAPILA, S. Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. **Food Reviews International**, v. 25, n. 1, p. 28–43, 2008.

HATA, I.; HIGASHIYAMA, S.; OTANI, H. Identification of a phosphopeptide in bovine  $\alpha$ (s1)-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures. **Journal of Dairy Research**, v. 65, n. 4, p. 569–578, 1998.

HAYES, M. et al. Casein Fermentate of Lactobacillus animalis DPC6134 Contains a Range of Novel Propeptide Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4658–4667, 2007.

HEMANTHA, H. P.; SURESHBABU, V. V. Poly(vinyl)chloride supported palladium

nanoparticles: Catalyst for rapid hydrogenation reactions. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 2597–2601, 2011.

HENRIQUES, C. A. et al. Biologically Inspired and Magnetically Recoverable Copper Porphyrinic Catalysts: A Greener Approach for Oxidation of Hydrocarbons with Molecular Oxygen. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 19, p. 3359–3368, 2016.

HILCHIE, A. L.; HOSKIN, D. W.; POWER COOMBS, M. R. Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1117p. 131–147.

HIXSON, K. K. et al. Proteomics. In: LINDON, J. C.; TRANTER, G. E.; KOPPENAAL, D. W. (Eds.). . **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. 3. ed. Cambridge: Academic Press, 2017. p. 766–773.

HO, P. L. et al. HEXIM1 peptide exhibits antimicrobial activity against antibiotic resistant bacteria through guidance of cell penetrating peptide. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–10, 2019.

HÖKFELT, T. et al. Neuropeptides--an overview. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1337–1356, 2000.

HONG, J. et al. Conjugation of  $\alpha$ -chymotrypsin on a polymeric hydrophilic nanolayer covering magnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 3–4, p. 99–105, 2006.

HONG, J. et al. Covalent binding of  $\alpha$ -chymotrypsin on the magnetic nanogels covered by amino groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3–4, p. 84–90, 2007.

HONG, J. et al. Stability and activity of chymotrypsin immobilized on magnetic nanogels covered with carboxyl groups. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 6, p. 2844–2850, 2009.

HOSHINO, K. et al. Preparation of a novel thermo-responsive polymer and its use as a carrier for immobilization of thermolysin. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 246–252, 1997.

HUANG, Y.-B. et al. Chemo-enzymatic synthesis of precursor tetrapeptide Bz–RGDS–NH<sub>2</sub> of cellular adhesion motif in low-water organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1159–1165, 2006.

IIZUKA, K.; AISHIMA, T. Tenderization of beef with pineapple juice monitored by fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 973–977, 1999.

INOUE, K. Effects of Salts on Thermolysin: Activation of Hydrolysis and Synthesis of N-Carbobenzoxy-L-Aspartyl-L-Phenylalanine Methyl Ester, and a Unique Change in the Absorption Spectrum of Thermolysin. **The Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 3, p. 335–340, 1992.

ISIDRO-LLOBET, A. et al. Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification: From R&D to Production. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 84, n. 8, p. 4615–4628, 2019.

ISIDRO-LLOBET, A.; ÁLVAREZ, M.; ALBERICIO, F. Amino Acid-Protecting Groups. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 6, p. 2455–2504, 2009.

IWANIAC, A. et al. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. **Food Research International**, v. 85, p. 155–161, 2016.

JACINTO, M. J. et al. Recoverable rhodium nanoparticles: Synthesis, characterization and catalytic performance in hydrogenation reactions. **Applied Catalysis A: General**, v. 338, n. 1–2, p. 52–57, 2008.

JACINTO, M. J.; LANDERS, R.; ROSSI, L. M. Preparation of supported Pt(0) nanoparticles as efficient recyclable catalysts for hydrogenation of alkenes and ketones. **Catalysis Communications**, v. 10, n. 15, p. 1971–1974, 2009.

JAHN, H. Atrial Natriuretic Peptide, the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis, and Panic Attacks. **Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology**, p. 177–186, 2019.

JANGAMREDDY, J. R. et al. Short peptide analogs as alternatives to collagen in pro-regenerative corneal implants. **Acta Biomaterialia**, v. 69, p. 120–130, 2018.

JAYAWARNA, V. et al. Introducing chemical functionality in Fmoc-peptide gels for cell culture. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 3, p. 934–943, 2009.

JEEWANTHI, R. K. C. et al. Peptide Analysis and the Bioactivity of Whey Protein Hydrolysates from Cheese Whey with Several Enzymes. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 37, n. 1, p. 62–70, 2017.

JENG, F.-Y.; LIN, S.-C. Characterization and application of PEGylated horseradish peroxidase for the synthesis of poly(2-naphthol). **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1566–1573, 2006.

JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264–8269, 2011.

JU, H.-Y. et al. Optimal covalent immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 9–15, 2012.

KAGEYAMA, H. et al. Differences in the P1' substrate specificities of pepsin A and chymosin. **Journal of Biochemistry**, v. 147, n. 2, p. 167–174, 2010.

KANAUCHI, O. et al. A Yeast Extract High in Bioactive Peptides has a Blood-Pressure Lowering Effect in Hypertensive Model. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 26, p. 3085–3090, 2005.

KARIMI, B. et al. Immobilization, stability and enzymatic activity of albumin and trypsin adsorbed onto nanostructured mesoporous SBA-15 with compatible pore sizes. **RSC Adv.**, v. 4, n. 9, p. 4387–4394, 2014.

KAWASAKI, T. et al. Control of Hydrolysis and Condensation Activities of Thermolysin by Ultrasound Irradiation. **Chemistry Letters**, v. 34, n. 12, p. 1602–1603, 2005.

KEIL, B. **Specificity of Proteolysis**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992.

KHAN, S. M.; DARNALL, D. W. The hydrolysis of 3-(2-furylacryloyl)-glycyl-L-leucine amide by thermolysin. **Analytical Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 332–336, 1978.



- KIM, C. et al. Synthesis of kyotorphin precursor from eutectic mixtures catalysed by  $\alpha$ -chymotrypsin. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1423–1427, 2001.
- KIM, H.-O.; LI-CHAN, E. C. Y. Quantitative Structure–Activity Relationship Study of Bitter Peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 10102–10111, 2006.
- KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 97–101, 1997.
- KOBAYASHI, H.; MATSUNAGA, T. Amino-silane modified superparamagnetic particles with surface-immobilized enzyme. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 141, n. 2, p. 505–511, 1991.
- KOHMURA, M. et al. Inhibition of Angiotensin-converting Enzyme by Synthetic Peptides of Human  $\beta$ -Casein. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2107–2114, 1989.
- KOJIMA, K.; NAKATA, H.; INOUE, K. Involvement of Val 315 located in the C-terminal region of thermolysin in its expression in *Escherichia coli* and its thermal stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 2, p. 330–338, 2014.
- KOPCHICK, J. J. History and Future of Growth Hormone Research. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 60, n. 3, p. 103–112, 2003.
- KOSHLAND, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, n. 2, p. 98–104, 1958.
- KOSHLAND, D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 33, n. 2324, p. 2375–2378, 1995.
- KOU, X. et al. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 591–598, 2013.
- KRUGER, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: J.M., W. (Ed.). **Basic Protein and Peptide Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1994. p. 9–16.
- KULLMANN, W. **Enzymatic Peptide Synthesis**. Boca Raton: CRC Press, 2018.
- KUMAR, D. et al. Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 3, p. 391–404, 2016.
- KUNUGI, S. et al. Immobilization of Thermolysin by Water-Soluble Reactive Polyurethane: Influence of Charges on the Matrix and Metal-Exchange at the Active-Site. **Polymer Journal**, v. 19, n. 2, p. 269–273, 1987.
- KUSANO, M.; YASUKAWA, K.; INOUE, K. Effects of the mutational combinations on the activity and stability of thermolysin. **Journal of Biotechnology**, v. 147, n. 1, p. 7–16, 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAFARGA, T. et al. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously

hypertensive rats. **Food Research International**, v. 81, p. 91–99, 2016.

LEE, B. et al. Rapid and efficient protein digestion using trypsin-coated magnetic nanoparticles under pressure cycles. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 2, p. 309–318, 2011.

LEMIEUX, R. U.; SPOHR, U. How Emil Fischer was Led to the Lock and Key Concept for Enzyme Specificity. **ADVANCES IN CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**, v. 50, p. 1–20, 1994.

LI-CHAN, E. C. Y.; CHEUNG, I. W. Y. Flavor-Active Properties of Amino Acids, Peptides, and Proteins. In: **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010. p. 341–358.

LI, D. et al. Functionalization Strategies for Protease Immobilization on Magnetic Nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 11, p. 1767–1777, 2010.

LI, W. et al. Purification and Characterization of a Novel Pentadecapeptide from Protein Hydrolysates of *Cyclina sinensis* and Its Immunomodulatory Effects on RAW264.7 Cells. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 30, 2019a.

LI, X. et al. Combining enzymatic hydrolysis with magnetic nanoparticles for resolution of chiral substances. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 564, p. 101–107, 2019b.

LI, Y. et al. Immobilization of Trypsin on Superparamagnetic Nanoparticles for Rapid and Effective Proteolysis. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 9, p. 3849–3855, 2007.

LIBURDI, K. et al. A preliminary study of continuous milk coagulation using *Cynara cardunculus* flower extract and calf rennet immobilized on magnetic particles. **Food Chemistry**, v. 239, p. 157–164, 2018.

LIRIA, C. W. et al. Synthesis, properties, and application in peptide chemistry of a magnetically separable and reusable biocatalyst. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 11, p. 2612, 2014.

LIU, L. et al. Poly(noradrenalin) based bi-enzyme biosensor for ultrasensitive multi-analyte determination. **Talanta**, v. 194, p. 343–349, 2019.

LIU, Y.; EICHLER, J.; PISCHETSRIEDER, M. Virtual screening of a milk peptide database for the identification of food-derived antimicrobial peptides. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 11, p. 2243–2254, 2015.

LOFFREDO, C. et al. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis at 60 degrees C: alternative conditions with low enantiomerization. **Journal of peptide science**, v. 15, n. 12, p. 808-817, 2009.

LOMBARD, C.; SAULNIER, J.; WALLACH, J. Recent Trends in Protease-Catalyzed Peptide Synthesis. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 7, p. 621–629, 2005.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I. et al. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. **Le Lait**, v. 87, n. 4–5, p. 241–249, 2007.

LU, A.-H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.

- MA, J. et al. Immobilized enzyme reactors in proteomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 691–702, 2011.
- MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.
- MACHADO, A. et al. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine  $\alpha$ -hemoglobin: Effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v. 88, n. 3, p. 413–426, 2007.
- MADHAVAN, A. et al. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1304–1313, 2017.
- MAENO, M.; YAMAMOTO, N.; TAKANO, T. Identification of an Antihypertensive Peptide from Casein Hydrolysate Produced by a Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1316–1321, 1996.
- MAGNUSON, B. A. et al. Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 8, p. 629–727, 2007.
- MAJOREK, K. A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, v. 52, n. 3–4, p. 174–182, 2012.
- MALINOWSKI, J. et al. Identification of a NF $\kappa$ B inhibitory peptide from tryptic  $\beta$ -casein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 165, p. 129–133, 2014.
- MARCHESAN, S.; VARGIU, A.; STYAN, K. The Phe-Phe Motif for Peptide Self-Assembly in Nanomedicine. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 19775–19788, 2015.
- MARTÍNEZ-MAQUEDA, D. et al. Food-Derived Peptides Stimulate Mucin Secretion and Gene Expression in Intestinal Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 35, p. 8600–8605, 2012.
- MARTINS, M.; SILVA, C.; CAVACO-PAULO, A.  $\alpha$ -Chymotrypsin catalysed oligopeptide synthesis for hair modelling. **Journal of Cleaner Production**, v. 237, p. 117743, 2019.
- MARUYAMA, S. et al. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Derived from an Enzymatic Hydrolysate of Casein. II. Isolation and Bradykinin-potentiating Activity on the Uterus and the Ileum of Rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 1405–1409, 1985.
- MASDEU, G. et al. Hybrid chloroperoxidase-magnetic nanoparticle clusters: effect of functionalization on biocatalyst performance. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 233–245, 2018.
- MCCLEAN, S.; BEGGS, L. B.; WELCH, R. W. Antimicrobial activity of antihypertensive food-derived peptides and selected alanine analogues. **Food Chemistry**, v. 146, p. 443–447, 2014.
- MCDONALD, A. G.; BOYCE, S.; TIPTON, K. F. Enzyme Classification and Nomenclature. In: **eLS**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–11.
- MCGRATH, M. E. et al. Perturbing the polar environment of Asp102 in trypsin: consequences of replacing conserved Ser214. **Biochemistry**, v. 31, n. 12, p. 3059–3064, 1992.

- MENG, F. et al. Newly Effective Milk-Clotting Enzyme from *Bacillus subtilis* and Its Application in Cheese Making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 24, p. 6162–6169, 2018.
- MERLOT, A. M.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–7, 2014.
- MERYAM SARDAR, R. A. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 04, n. 02, 2015.
- MINERVINI, F. et al. Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5297–5305, 2003.
- MIYAZAWA, T. et al. *Aspergillus melleus* protease-catalyzed peptide synthesis using the carbamoylmethyl ester as an acyl donor in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol/*N,N*-dimethylformamide. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1945–1949, 2002.
- MOESCHEL, K. et al. Immobilization of thermolysin to polyamide nonwoven materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 190–199, 2003.
- MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Short Communication. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 377, n. 4, p. 259–266, 1996.
- MURATA, M. et al. Efficient deprotection of *N*-benzyloxycarbonyl group from amino acids by hydroxyapatite-bound Pd catalyst in the presence of molecular hydrogen. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 27, p. 4981–4984, 2003.
- MUTA, Y.; INOUE, K. Inhibitory Effects of Alcohols on Thermolysin Activity as Examined Using a Fluorescent Substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 132, n. 6, p. 945–951, 2002.
- NAGAYASU, T. et al. Synthesis of dipeptide precursors with an immobilized thermolysin in ethyl acetate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 11, p. 1108–1117, 1994.
- NAKANISHI, K.; KIMURA, Y.; MATSUNO, R. Kinetics and equilibrium of enzymatic synthesis of peptides in aqueous/organic biphasic systems. Thermolysin-catalyzed synthesis of *N*-(benzyloxycarbonyl)-*L*-aspartyl-*L*-phenylalanine methyl ester. **European journal of biochemistry**, v. 161, n. 3, p. 541–9, 1986.
- NAKANISHI, K.; KONDO, M.; MATSUNO, R. Repeated batch and continuous syntheses of *N*-(benzyloxycarbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-phenylalanine methyl ester with immobilized thermolysin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 229–234, 1988.
- NARAI-KANAYAMA, A. et al. Availability of tyrosine amide for  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed synthesis of oligo-tyrosine peptides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 457–462, 2009.
- NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 5, p. 1109–1115, 1916.
- NETTO, C. G. C. M. et al. Improving the catalytic activity of formate dehydrogenase

from *Candida boidinii* by using magnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 136–143, 2012.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 71–92, 2013.

NIELSEN, S. D. et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.

NORTHROP, J. H.; KUNITZ, M. Crystalline trypsin: II. General properties. **Journal of General Physiology**, v. 16, n. 2, p. 295–311, 1932.

NUIJENS, T. et al. Fully Enzymatic N→C-Directed Peptide Synthesis Using C-Terminal Peptide  $\alpha$ -Carboxamide to Ester Interconversion. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 7, p. 1039–1044, 2011.

NUIJENS, T. et al. Enzymatic Fragment Condensation of Side Chain-Protected Peptides using Subtilisin A in Anhydrous Organic Solvents: A General Strategy for Industrial Peptide Synthesis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 355, p. 287–293, 2013.

OGINO, T. et al. Chemical modification of superoxide dismutase Extension of plasma half life of the enzyme through its reversible binding to the circulating albumin. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 32, n. 2, p. 153–159, 2009.

ONG, E. B.; TSANG, Y.; PERLMANN, G. E. Action of water-insoluble trypsin derivatives on pepsinogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 23, p. 5661–5666, 1966.

ORIGONE, A. et al. Enzymatic and chemical synthesis of new anticoagulant peptides. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 5, p. 1093–1101, 2018.

OSBON, Y.; KUMAR, M. Biocatalysis and Strategies for Enzyme Improvement. In: KHALID, M. (Ed.). . **Biophysical Chemistry - Advance Applications**. London: IntechOpen, 2020. p. 1–22.

OTANI, H.; SUZUKI, H. Isolation and characterization of cytotoxic small peptides, alpha-caseidins, from bovine alphas1-casein digested with bovine trypsin. **Animal Science Journal**, v. 74, n. 5, p. 427–435, 2003.

OTTE, J. et al. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 12, p. 1460–1472, 2007.

OWEN, J. P. et al. Use of thermolysin in the diagnosis of prion diseases. **Molecular Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 161–170, 2007.

PAN, M. et al. Positively charged peptides from casein hydrolysate show strong inhibitory effects on LDL oxidation and cellular lipid accumulation in Raw264.7 cells. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 119–128, 2019.

PAPPAS, C. G. et al. Tuneable Fmoc-Phe-(4-X)-Phe-NH<sub>2</sub> nanostructures by variable electronic substitution. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 50, n.

73, p. 10630–3, 2014.

PATEL, H. A. et al. Celite-Polyaniline supported palladium catalyst for chemoselective hydrogenation reactions. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 1–11, 2019.

PEDERSEN, N. R. et al. Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 16, n. 3, p. 615–622, 2005.

PESSELA, B. C. C. et al. Immobilization of rennet from *Mucor miehei* via its sugar chain. Its use in milk coagulation. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 2029–2033, 2004.

PETERSEN, W.; SHORT, C. A. On the relation of the serum ereptase (peptidase) titer to the clinical course in pneumonia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 147–153, 1918.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PHILIPPS-WIEMANN, P. Proteases—general aspects. In: NUNES, C. S.; VIKAS KUMAR (Eds.). **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. Cambridge: Academic Press, 2018. p. 257–266.

PHILIPSE, A. P.; BRUGGEN, M. P. B. VAN; PATHMAMANO HARAN, C. Magnetic Silica Dispersions: Preparation and Stability of Surface-Modified Silica Particles with a Magnetic Core. **Langmuir**, p. 92–99, 1994.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 4, p. 325–331, 1998.

POORAKBAR, E. et al. Synthesis of magnetic gold mesoporous silica nanoparticles core shell for cellulase enzyme immobilization: Improvement of enzymatic activity and thermal stability. **Process Biochemistry**, v. 71, p. 92–100, 2018.

PRAT, D. et al. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 288–296, 2016.

PREMARATNE, W. A. P. J. et al. Synthesis of Nanosilica from Paddy Husk Ash and Their Surface Functionalization. **Journal of Science of the University of Kelaniya Sri Lanka**, v. 8, p. 33, 2014.

PRIKRYL, P. et al. Magnetic bead cellulose as a suitable support for immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 2, p. 295–305, 2012.

PUNEKAR, N. S. Enzymes: Historical Aspects. In: **ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 5–13.

QUIRÓS, A. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3480–3487, 2005.

QUIRÓS, A. et al. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 1, p. 33–41, 2007.

RAMACHANDIRAN, S. et al. Anti-cancer Properties of Protein Hydrolysate from the

Posterior Salivary Gland of *Amphioctopus membranaceus* (Quoy & Gaimard, 1832). **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 2019.

RANI, S.; JAGTAP, S. Acceleration of Swiss cheese ripening by microbial lipase without affecting its quality characteristics. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 497–506, 2019.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. **Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans**. 3. ed. London: Elsevier Inc., 2013.

REMUZGO, C. et al. Acanthoscurrin fragment 101-132: total synthesis at 60 degrees C of a novel difficult sequence. **Biopolymers**, v. 92, n. 1, p. 65–75, 2009.

RENNEBERG, R. et al. Chapter 2 – Enzymes: Molecular Supercatalysts for Use at Home and in Industry. **Biotechnology for Beginners**, p. 33–63, 2017.

RIVAL, S. G.; BOERIU, C. G.; WICHERS, H. J. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 295–302, 2001.

ROBERT, M.-C. et al. Identification of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Sodium Caseinate Hydrolysates Produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 6923–6931, 2004.

ROBITAILLE, G. et al. Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 1, p. 1–8, 2012.

ROCHA-MARTIN, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. Sequential hydrolysis of commercial casein hydrolysate by immobilized trypsin and thermolysin to produce bioactive phosphopeptides. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, n. 2, p. 159–171, 2018.

RODRIGUES, F. M. S. et al. Hydroaminomethylation reaction as powerful tool for preparation of rhodium/phosphine-functionalized nanomaterials. Catalytic evaluation in styrene hydroformylation. **Catalysis Today**, 2019.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. A et al. Enzymatic activity and thermal stability of PEG- $\alpha$ -chymotrypsin conjugates. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 6, p. 883–7, 2009.

ROJAS-RONQUILLO, R. et al. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 147–154, 2012.

ROMERO, M. D. et al. Synthesis of delicious peptide fragments catalyzed by immobilized proteases. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 108, n. 1, p. 657–664, 1997.

ROSSI, L. M. et al. A magnetically recoverable scavenger for palladium based on thiol-modified magnetite nanoparticles. **Applied Catalysis A: General**, v. 330, n. 1–2, p. 139–144, 2007.

ROSSI, L. M. et al. Magnetic nanomaterials in catalysis: advanced catalysts for magnetic separation and beyond. **Green Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 2906, 2014.

ROYER, G. P. Fixed enzymes, application of the study of protein structure and

function. In: WEETALL, H. H.; SUZUKI, S. (Eds.). . **Immobilized Enzyme Technology**. Boston, MA: Springer US, 1975. p. 299–316.

RUIZ, C. et al. Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*-related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1672, n. 3, p. 184–91, 2004.

RUIZ, D. M. et al. Peptide synthesis catalysed by a haloalkaliphilic serine protease from the archaeon *Natrialba magadii* (Nep). **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 691–696, 2010.

SANGER, F.; THOMPSON, E. O. P. The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. **Biochemical Journal**, v. 53, n. 3, p. 366–374, 1953.

SCHAUPERL, M. et al. Characterizing Protease Specificity: How Many Substrates Do We Need? **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142658, 2015.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157–162, 1967.

SCHULTZ, E. E. et al. Biocatalytic Friedel-Crafts Alkylation Using a Promiscuous Biosynthetic Enzyme. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 10, p. 3151–3155, 2019.

SCHWENDENWEIN, D. et al. Selective Enzymatic Transformation to Aldehydes in vivo by Fungal Carboxylate Reductase from *Neurospora crassa*. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 358, n. 21, p. 3414–3421, 2016.

SEDAGHATI, M. et al. Plasmin digest of  $\kappa$ -casein as a source of antibacterial peptides. **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 2, p. 245–251, 2014.

SEDAGHATI, M. et al. Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of  $\beta$ -casein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 217–225, 2016.

SHAN, Y. et al. Solid-Phase Enzymatic Peptide Synthesis to Produce an Antioxidant Dipeptide. **Transactions of Tianjin University**, v. 25, n. 3, p. 276–282, 2019.

SHANMUGAM, V. P. et al. Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 1–5, 2015.

SHARMA, H. P.; PATEL, H.; SUGANDHA. Enzymatic assisted extraction and clarification of fruit juices—A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1215–1227, 2017.

SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Preparation of Fine Magnetic Particles and Application for Enzyme Immobilization. **Biocatalysis**, v. 5, n. 1, p. 61–69, 1991.

SHIOZAKI, K. et al. Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. **Fisheries Science**, v. 76, n. 5, p. 865–872, 2010.

SHOBAKO, N. et al. A Novel Antihypertensive Peptide Identified in Thermolysin-Digested Rice Bran. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 4, p. 1700732, 2018.



SIENKIEWICZ-SZŁAPKA, E. et al. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 258–263, 2009.

SILVA, C. J. S. M. et al. Immobilization of proteases with a water soluble–insoluble reversible polymer for treatment of wool. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 634–640, 2006.

SILVA, T. A. G.; LANDERS, R.; ROSSI, L. M. Magnetically recoverable AuPd nanoparticles prepared by a coordination capture method as a reusable catalyst for green oxidation of benzyl alcohol. **Catalysis Science & Technology**, v. 3, n. 11, p. 2993, 2013.

SINGH, P. K.; SHRIVASTAVA, N.; OJHA, B. K. Enzymes in the Meat Industry. In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**. Cambridge: Academic Press, 2019. p. 111–128.

SINGH, R.; SINGH, A.; SACHAN, S. Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes? In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**. Cambridge: Academic Press, 2019. p. 827–843.

SUDHAKAR, S.; NAZEER, R. A. In vitro preparation and assessment of radical reducing peptide from Octopus aegina using digestive proteases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 1, p. 36–42, 2017.

SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. **J. Biol. Chem.**, v. 69, n. 2, p. 435–441, 1926.

SUN, J. et al. Stability and activity of immobilized trypsin on carboxymethyl chitosan-functionalized magnetic nanoparticles cross-linked with carbodiimide and glutaraldehyde. **Journal of Chromatography B**, v. 1054, n. March, p. 57–63, 2017.

SUTTISUWAN, R. et al. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from trypsin hydrolysis of microalgae protein ( *Synechococcus* sp. VDW). **Food Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 303–324, 2019.

SWAISGOOD, H. E. **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. 3. ed. Boston: Springer US, 2003. v. 1

SWANEY, D. L.; WENGER, C. D.; COON, J. J. Value of Using Multiple Proteases for Large-Scale Mass Spectrometry-Based Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 3, p. 1323–1329, 2010.

TAKAHASHI, M. et al. Isolation and characterization of oryzaensin: a novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 33, n. 6, p. 1151–8, 1994.

TAUZIN, J.; MICLO, L.; GAILLARD, J. L. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine  $\alpha$ S2-casein. **FEBS Letters**, v. 531, n. 2, p. 369–374, 2002.

TEMPORINI, C. et al. On-line multi-enzymatic approach for improved sequence coverage in protein analysis. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 8, p. 1120–1128, 2009.

THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G.; NAND, K. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 409–413, 1990.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 2017.

TITANI, K. et al. Amino acid sequence of thermolysin. Isolation and characterization of the fragments obtained by cleavage with cyanogen bromide. **Biochemistry**, v. 11, n. 13, p. 2427–2435, 1972.

TRUSEK-HOLOWNIA, A. Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate–water system catalysed by thermolysin. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 153–163, 2003a.

TRUSEK-HOLOWNIA, A. A membrane phase contactor for enzymatic synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 69–77, 2003b.

TRUSEK-HOLOWNIA, A. Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 221–229, 2008.

TSIATSIANI, L.; HECK, A. J. R. R. Proteomics beyond trypsin. **FEBS Journal**, v. 282, n. 14, p. 2612–2626, 2015.

TU, M. et al. Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms. **Food Chemistry**, v. 256, p. 98–104, 2018.

TU, M. et al. Identification and characterization of a novel casein anticoagulant peptide derived from in vivo digestion. **Food & Function**, v. 10, n. 5, p. 2552–2559, 2019.

UBERMAN, P. M. et al. A recoverable Pd nanocatalyst for selective semi-hydrogenation of alkynes: hydrogenation of benzyl-propargylamines as a challenging model. **Green Chem.**, v. 16, n. 10, p. 4566–4574, 2014.

UENISHI, H. et al. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 1, p. 24–30, 2012.

UNGARO, V. A. et al. A green route for the synthesis of a bitter-taste dipeptide combining biocatalysis, heterogeneous metal catalysis and magnetic nanoparticles. **RSC Advances**, v. 5, n. 46, p. 36449–36455, 2015.

VALIVETY, R. et al. Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 7, p. 879–886, 1997.

VAN HEEKE, G.; STOUT, J. S.; WAGNER, F. W. Synthesis of Recombinant Peptides. In: PENNINGTON, M. W.; DUNN, B. M. (Eds.). **Peptide Analysis Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1994. v. 36p. 245–260.

VANDENPLAS, Y. et al. Partially hydrolyzed formula in non-exclusively breastfed infants: A systematic review and expert consensus. **Nutrition**, v. 57, p. 268–274, 2019.

VANDERMARLIERE, E.; MUELLER, M.; MARTENS, L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 47, n. 12, p. 000–000, 2013.

- VINES, S. H. Proteolytic Enzymes in Plants (II). **Annals of Botany**, v. os-17, n. 3, p. 597–616, 1903.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons inc., 2010.
- WALSTRA, P. Colloidal Particles of Milk. In: **Dairy Technology**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 107–148.
- WALTON, E. et al. Peptide Synthesis. An Application of the Esterase Activity of Chymotrypsin. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 2255–2257, 1962.
- WAN, K. et al. Enzymatic Degradation of Allergen Peptides from Bovine Casein by a Combination of Streptomyces Aminopeptidases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 2, p. 570–582, 2019.
- WANG, B. et al. Preparation and application of immobilized enzymatic reactors for consecutive digestion with two enzymes. **Journal of Chromatography A**, v. 1477, p. 22–29, 2016.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.
- WANG, H. et al. Covalent organic framework-coated magnetic graphene as a novel support for trypsin immobilization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 8, p. 2179–2187, 2017a.
- WANG, M. et al. Thiol–ene photoimmobilization of chymotrypsin on polysiloxane gels for enzymatic peptide synthesis. **RSC Advances**, v. 8, n. 22, p. 11843–11849, 2018.
- WANG, T.-H.; LEE, W.-C. Immobilization of proteins on magnetic nanoparticles. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 4, p. 263–267, 2003.
- WANG, Y. et al. Core-shell silica microsphere-based trypsin nanoreactor for low molecular-weight proteome analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 985, p. 194–201, 2017b.
- WILKINS, M. R. et al. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - a World-Wide-Web-accessible tool. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3–4, p. 403–408, 1997.
- XAVIER, D. A.; SRIVIDHYA, N. Synthesis and Study of Schiff base Ligands. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 06–15, 2014.
- XIN, B.; SI, S.; XING, G. Protease Immobilization on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles for the Synthesis of Oligopeptides in Organic Solvents. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 5, n. 6, p. 1389–294, 2010.
- YAGASAKI, M.; HASHIMOTO, S. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 13–22, 2008.
- YAMADA, A. et al. Antihypertensive effect of the bovine casein-derived peptide Met-Lys-Pro. **Food Chemistry**, v. 172, p. 441–446, 2015.
- YAMAGUCHI, H. et al. Rapid and efficient proteolysis for proteomic analysis by protease-immobilized microreactor. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. 18, p. 3257–3264, 2009.

YAMAGUCHI, H. et al. Multidigestion in continuous flow tandem protease-immobilized microreactors for proteomic analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 407, n. 1, p. 12–18, 2010.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 4, p. 917–922, 1994.

YANG, H. et al. Structure-based engineering of histidine residues in the catalytic domain of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* for improved protein stability and catalytic efficiency under acidic conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 1, p. 59–66, 2013.

YAZAWA, K.; NUMATA, K. Recent Advances in Chemoenzymatic Peptide Syntheses. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13755–13774, 2014.

YUN, S.-E. et al. Increase in Curd Tension of Milk Coagulum Prepared with Immobilized Proteases. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 3, p. 705–707, 1981.

YUN, S.-E.; OHMIYA, K.; SHIMIZU, S. Role of  $\beta$ -Casein in Milk Curdling. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 443–449, 1982.

YUN, S. Immobilization of Thermolysin and Application of the Immobilized Thermolysin to Cheese-making. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 245–251, 1988.

ZANUTTO-ELGUI, M. R. et al. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 278, p. 823–831, 2019.

ZDARTA, J. et al. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 2018a.

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

ZHANG, L. et al. Recyclable trypsin immobilized magnetic nanoparticles based on hydrophilic polyethylenimine modification and their proteolytic characteristics. **Analytical Methods**, v. 10, n. 4, p. 459–466, 2018.

ZHANG, Q. et al. Isolation and Characterization of Three Novel Peptides from Casein Hydrolysates That Stimulate the Growth of Mixed Cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7045–7053, 2011.

ZHAO, X. et al. Purification and characterization of a novel milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 11, p. 2447–2457, 2019.

ZHOU, Y.-Y. et al. Chemo-enzymatic synthesis of tripeptide RGD in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 55–61, 2003.

ZHU, Y. et al. Magnetic Nanocomposites: A New Perspective in Catalysis. **ChemCatChem**, v. 2, n. 4, p. 365–374, 2010.

## SUMULA CURRICULAR

### Dados pessoais

Nome: Vitor Augusto Ungaro

Local e data de nascimento: São Paulo, 07 de agosto de 1988

Nacionalidade: Brasileiro

E-mail: vitoraungaro@gmail.com

### Formação acadêmica

#### 2° grau:

Escola Técnica Estadual Professor Horácio Augusto da Silveira, São Paulo – SP, 2004-2006.

#### Graduação:

Bacharel em Química com ênfase em bioquímica e biologia molecular, pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2009-2013.

### Formação Complementar

#### Iniciação científica:

-Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Laboratório de Química dos Peptídeos, São Paulo-SP, 2010-2013.

#### Bolsa recebida:

-CNPq-PIBIC, 01/08/2013 a 31/07/2014 (Bolsa de iniciação científica)

-CNPq, 06/2014 a 05/2019 (Bolsa de Doutorado)

### **Publicações em periódicos:**

-**UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W.; ROMAGNA, C. D.; COSTA, N. J. S.; PHILIPPOT, K.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M T. A green route for the synthesis of a bitter taste dipeptide combining biocatalysis, heterogeneous metal catalysis and magnetic nanoparticles. RSC Advances, v. 5, p. 36449-36455, 2015.

-LIRIA, C. W.; **UNGARO, V. A.**; FERNANDES, R. M.; COSTA, N. J. S.; MARANA, S. R.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T. Synthesis, properties, and application in peptide chemistry of a magnetically separable and reusable biocatalyst. Journal Of Nanoparticle Research (ONLINE), v. 16, p. 2612, 2014.

### **Participação em eventos científicos:**

- **UNGARO, V. A.**; FAIRBANKS, J. P. A.; L. M. ROSSI; MACHINI, M T. (Poste) Magnetic nanocatalysts in a green route for short peptides production. 42<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Joenville, SC, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

- **UNGARO, V. A.**; FAIRBANKS, J. P. A.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T. (Poste) Thermolysin Supported on MNP: Preparation and Characterization of a New Thermostable Biocatalyst Suitable for Peptides Production. 10th International Peptide Symposium, Quito, Japão, 2018.

- **UNGARO, V. A.**; FAIRBANKS, J. P. A.; LIRIA, C. W. ; ROSSI, L. M. ; MACHINI, M. T. (Poste) Thermolysin immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@silica nanoparticle: preparation and characterization of a new recoverable biocatalyst. 46<sup>o</sup> World Chemistry Congress/40<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, SP, 2017.

- **UNGARO, V. A.**; FAIRBANKS, J. P. A. ; LIRIA, C. W.; ROSSI, L. M. ; MACHINI, M. T. (Apresentação oral) Thermolysin immobilized on fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub>@silica nanoparticle: preparation and characterization of a new recoverable biocatalyst. 40<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, SP, 2017.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W.; COSTA, N. J. S.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T. Synthesis, characterization and potential application of the magnetic nanobiocatalyst Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@silica-thermolysin in peptide chemistry. 2nd International Symposium on Nanoparticle/Nanomaterials and Application, Caparica, Portugal, 2016.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W.; COSTA, N. J. S.; MARANA, S. R.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T. (Poster) Synthesis, characterization and properties of a magnetically separable and reusable bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. 38<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2015.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W. ; FENANDES, R. M. ; ROMAGNA, C. D. ; COSTA, N. J. S. ; ROSSI, L. M. ; MARANA, S. R. ; MACHINI, M. T. (Poster) Immobilization of proteases in superparamagnetic nanoparticles: changes in properties and applicability in peptide synthesis. 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterial and Applications, Caparia, Portugal, 2014.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W. ; MACHINI, M. T. ; COSTA, N. J. S. ; ROSSI, L. M. ; MARANA, S. R. (Poster) Efeito da imobilização em nanopartículas superparamagnéticas nas propriedades catalíticas da  $\alpha$ -Quimotripsina. 36<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2013.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W. ; COSTA, N. J. S. ; ROSSI, L. M. ; MARANA, S. R. ; MACHINI, M. T. (Poster) Imobilização de termolisina em nanopartículas superparamagnéticas. XXI Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, São Carlos, SP, 2013.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W. ; MACHINI, M. T. ; COSTA, N. J. S. ; ROSSI, L. M. (Poster) Remoção do grupo Z de Z-aminoácidos e Z-peptídeos usando paládio imobilizado em nanopartículas superparamagnéticas. 35<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, 2012.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W.; COSTA, N. J. S.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T.. (Poster) Remoção do grupo Z de Z-aminoácidos e Z-dipeptídeo usando paládio imobilizado em nanopartículas superparamagnéticas. XIX Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Carlos, SP, 2011.

### **Publicações em anais de eventos:**

- **UNGARO, V. A.**; FAIRBANKS, J. P. A.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T. Thermolysin Supported on MNP: Preparation and Characterization of a New Thermostable Biocatalyst Suitable for Peptides Production. In: 10th International Peptide Symposium, 2019, Quioto. Peptide Science 2018: Proceedings of the 10th

International Peptide Symposium / The 55th Japanese Peptide Symposium. Osaka: THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY, 2018. p. 118-118.

- **UNGARO, V. A.**; LIRIA, C. W.; FENANDES, R. M.; ROMAGNA, C. D.; COSTA, N. J. S.; ROSSI, L. M.; MARANA, S. R.; MACHINI, M. T. Immobilization of proteases in superparamagnetic nanoparticles: changes in properties and applicability in peptide synthesis. In: 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterial and Applications, 2014, Caparica. Proceedings of the 1st ISN2A, 1st International Symposium on Nanoparticles/ Nanomaterials and Applications. Caparica: Proteomass Scientific Society, 2014.

**Atividade de ensino:**

-Monitoria PAE: Bioquímica Experimental (QBQ-2463, Química Integral), 07-12/2014, Departamento de Bioquímica- Instituto de Química – USP.

-Monitoria PAE: Química Orgânica Experimental (QFL-1423, Química Integral) 07-11/2015, Departamento de Química Fundamental-Instituto de Química-USP

**Prêmios:**

-Prêmio Lavoisier - Bacharel em Química com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular, Conselho Regional de Química 4ª Região, 2014.