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

CAMILA M. KISUKURI

**Mudanças na Interface de Nanopartículas de Au/Ag e
Lipases: Seus efeitos na atividade enzimática**

Versão corrigida da dissertação

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

10/03/2014

CAMILA M. KISUKURI

**Mudanças na Interface de Nanopartículas de Au/Ag e
Lipases: Seus efeitos na atividade enzimática**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química*

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

2014

*Dedico este trabalho
as minhas irmãs Daniele e Victória
Obrigada pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Aos familiares...

Aos meus pais por terem me apoiado em todas as minhas decisões. Agradeço pela educação, carinho e amor. Sem dúvida vocês são os alicerces da minha vida e a quem eu pretendo me espelhar pelo resto dela. Obrigada pela conversa acolhedora de todos os dias e pelos conselhos.

As minhas irmãs Daniele e Victória pela amizade incondicional, apoio e carinho. A vocês agradeço por simplesmente existirem. Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim. Desejo a vocês o melhor que a vida tem a oferecer, amo vocês mais que tudo...

Aos familiares pelo apoio. Minhas tias Odila e Olga pelo carinho e cuidado de sempre. Obrigada pelos regalos, dados deste a minha graduação. A minha avó Victória, mulher guerreira na qual com certeza me espelho para enfrentar a vida. E a minha saudosa tia Dirce a melhor pessoa que eu me lembro de ter conhecido, saudades. Agradeço a todos os familiares que com certeza torcem para o meu sucesso, através de rezas e pensamentos positivos.

Aos Orientadores...

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade pela orientação. Obrigada pela confiança depositada em mim, pelas discussões longas sobre o meu trabalho e por sempre me dar o apoio, e oportunidade para que eu pudesse prosperar.

Ao Prof. Dr. Pedro H. C. Camargo por nos fornecer o material necessário para realização deste trabalho e por sempre estar disponível para nos auxiliar.

A Prof.^a Dr.^a Maria Helena Sarragiotto, por ter me inserido na vida científica. Obrigada pela orientação pelos conselhos, pela amizade e acima de tudo pela confiança. Sei que mesmo longe você torce pelo meu sucesso e eu torço sempre para que o seu ascenda ainda mais.

Aos Amigos...

Aos meus amigos do LQFB, Edna, Hendraw (Rodrigo), Dayvson, Juliana, Lidiane, Felipe, Joel e Hiléia. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos, pelos momentos de descontração pelas ajudas e principalmente pela amizade.

Aos meus ICs, Caio, Raquel e Thalita. Cada um de vocês contribuíram para que este trabalho desse certo, muito obrigada.

Aos amigos de Maringá, Laisera, Valéria, Manuzinha, Valquíria, George, Franciele, Vanessa e a todos meus amigos do bloco 31. Os momentos vividos em Maringá foram uma das melhores fases da minha vida e vocês me proporcionaram isso. Acima de tudo obrigada pelos ensinamentos e pela amizade simples e virtuosa.

Aos meus amigos assisenses, pelo apoio e pela paciência. Obrigada pelas baladas, pelos acampamentos, pelas viagens, pelas aventuras. Obrigada por acreditarem em mim.

A Deus...

A fé me fez chegar até aqui. Obrigada pela força, saúde e por sempre andar ao meu lado. Agradeço por colocar no meu caminho cada pessoa maravilhosa citada acima. Obrigada por mais esta conquista.

Agradeço a FAPESP pela bolsa de mestrado concedida e pelo apoio financeiro.

RESUMO

Kisukuri, C. M. **Mudanças na Interface de Nanopartículas de Au/Ag e Lipases: Seus efeitos na atividade enzimática.** 2014. (143p). Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesta dissertação estão descritos os resultados obtidos sobre a preparação de nanocascas funcionalizadas (nanopartículas ocas) de ouro/prata de diâmetro de 50 nm e imobilização de diferentes lipases (*Burkholderia cepacia* (BCL) e pâncreas de porco (PPL)). Um esquema simplificado deste processo segue abaixo.

Condições: **a)** ácido mercapto acético; ácido mercaptopropiônico; ácido mercaptoundecanóico; cisteamina; **b)** Glutaraldeído; **c)** EDC; **d)** lipase de *Burkholderia cepacia* ou Lipase de pâncreas de porco.

Representação da funcionalização, ativação e imobilização das lipases nas nanopartículas de ouro e prata.

Inicialmente as nanocascas de ouro/prata (NSs AgAu) foram sintetizadas e caracterizadas, através de imagens de MEV e MET. Através destas imagens algumas características das NSs AgAu foram elucidadas, como seu tamanho e sua característica oca.

Em seguida, a funcionalização das NSs AgAu com diferentes moléculas mercapto-alcanóicas e uma molécula mercapto-amina foi realizada. Depois de funcionalizadas as NSs-funcionalizadas foram ativadas, com glutaraldeído ou EDC, para que assim elas ficassem aptas à imobilização das lipases, via ligação covalente. Para a BCL foi possível imobilizar 0,155-0,282 mg de proteína/3 mg do suporte. No caso da PPL uma menor quantidade de enzima foi imobilizada (0,035-0,048 mg/3 mg do suporte).

A atividade da enzima imobilizada foi testada frente à reação de acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila (RCE, resolução cinética enzimática). Excelentes resultados de conversão (50%) e seletividade ($E > 200$) foram conseguidos com a BCL imobilizada em todos os suportes. A PPL livre não catalisava a acetilação deste substrato e quando esta enzima foi imobilizada nas diferentes NSs-funcionalizadas, os resultados apresentados para acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila foram interessantes. Nesse caso conseguimos alcançar conversões de até 4% do substrato *R* à sua forma acetilada com excelente enantiosseletividade ($> 99\%$ e.e. do produto).

Como uma alternativa de demonstrar a atividade enzimática da BCL imobilizada em reação tradicional de hidrólise, o teste da hidrólise do palmitato de *p*-Nitrofenila pela BCL livre e imobilizada foi realizado. Este teste revelou que a BCL imobilizada nas NSs-funcionalizadas catalisavam a hidrólise do palmitato de *p*-Nitrofenila mais rápido

que a enzima livre, comprovando os bons resultados obtidos na RCE, mostrando que os sistemas onde tínhamos a BCL imobilizada foram mais eficientes que a enzima livre.

As NSs AgAu, NSs-funcionalizadas e até as nanocascas contendo as lipases imobilizadas foram caracterizadas por de imagens de MEV e MET, análises de FT-IR e método de Bradford.

Outros estudos com os sistemas contendo a BCL imobilizada foram elucidados. Diferentes funcionalizadores de diferentes tamanhos foram utilizados e a influência de cada um deles sobre a atividade enzimática foi estudado. Por exemplo, quando as NSs AuAg foram funcionalizadas com moléculas mercapto-alcanóicas menores, como por exemplo, o ácido mercapto acético, melhores resultados para a RC do (*R,S*)-1-feniletanol foram conseguidos.

As diferentes formas de ativação da NSs-funcionalizadas utilizando glutaraldeído ou EDC, para consequente imobilização da BCL não resultaram em alterações da atividade enzimática na RC, apresentando valores idênticos para RCE.

Experimentos para testar a estabilidade dos sistemas contendo a BCL imobilizada também foram feitos. Descobrimos que é possível armazenar a BCL imobilizada nos diferentes sistemas à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 28 dias. O estudo da reciclagem destes sistemas revelou que por até 3 ciclos os sistemas conseguiram manter 90% da atividade enzimática.

Palavras-chave: Nanocacas de Ouro/Prata, Funcionalização, Imobilização de Lipases, Resolução cinética, Ácidos mercapto-alcanóicos.

ABSTRACT

Kisukuri, C. M. **Changes in the interface of nanoparticles of gold / silver and lipases: their effects on enzyme activity.** 2014. (143p). Masters Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This dissertation presents the results achieved on the preparation of functionalized gold/silver nanoshells (hollow nanoparticles, 50 nm) and immobilization of different lipases (*Burkholderia cepacia* (BCL) and porcine pancreatic (PPL)). A simplified schematic of this process follows.

Conditions: a) mercapto acetic acid, mercaptopropionic acid; mercaptoundecanoic acid, cysteamine, b) glutaraldehyde c) EDC d) lipase from *Burkholderia cepacia* lipase or pancreas porcine.

Representation of functionalization, activation and immobilization of lipases on nanoparticles of gold and silver.

Initially Gold/Silver nanoshells (NSs Ag Au) were synthesized and characterized through SEM and TEM pictures. By these images some characteristics of NSs AgAu were elucidated, as its size and hollow feature.

The functionalization NSs AgAu with different mercapto-alkanoic molecules and mercapto-amine molecule was next step performed. After the functionalized NSs-functionalized were activated with glutaraldehyde or EDC, after that they remained suitable for the immobilization of lipases via covalent bond. BCL was possible immobilized 0.155-0.282 mg protein/3 mg of support. And the PPL a smaller amount of enzyme was immobilized (from 0.035-0.048 mg / 3 mg of support).

The activity of the immobilized enzyme was assayed by the reaction enantioselective acetylation of (*R,S*)-1-phenylethanol with vinyl acetate (KR, kinetic resolution). Excellent conversion results (50%) and selectivity ($E > 200$) were achieved with the immobilized BCL. The free PLP did not catalyzed acetylation of the substrate and when this enzyme was immobilized on NSs-functionalized the results for enantioselective acetylation of (*R,S*)-1-phenylethanol with vinyl acetate were interesting. In this case we achieve conversions of 4% of the substrate (*R*) to acetylated form with excellent enantioselectivity ($> 99\%$ e.e. of the product).

As alternative to demonstrate the enzymatic activity of BCL immobilized on traditional hydrolysis reaction, the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate by free and immobilized BCL was performed. This test revealed BCL immobilized on NSs-functionalized catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate faster than free enzyme, confirming the good results obtained in KR, showing that systems which had immobilized BCL were more efficient than the enzyme free.

The NSs AgAu, NSs-functionalized and Nanoshells containing the immobilized lipases were characterized by SEM and TEM images , FT-IR analysis , the Bradford method.

Other studies with systems containing immobilized BCL were elucidated. Different spacers with different sizes were used for functionalized the nanoshells, and the influence of each of the enzymatic activity was studied. For example, when the NSs were functionalized with smaller molecules mercapto-alkanoic and cysteamine best results for the KR (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol were obtained.

The different forms of activation of NSs-functionalized using glutaraldehyde or EDC, for subsequent immobilization of BCL did not result in changes in enzyme activity in the KR .

Experiments to test the stability of systems containing immobilized BCL were also made . We found it possible to store the BCL immobilized on different systems at - 4 ° C for 30 days. The study of the recycling of these systems was made and by 3 cycles systems maintain 90% of the enzyme activity .

Keywords: Gold/Silver Nanoshells, Functionalization, Immobilization of Lipases, Kinetic Resolution, Mercapto alkanoic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgAu-CIS	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com cisteamina
AgAu-MAC	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto acético
AgAu-PROP	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto propiônico
AgAu-UND	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto undecanóico
AgAu-CIS-GLU	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com cisteamina ativada com glutaraldeído
AgAu-MAC-EDC	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto acético ativada com EDC
AgAu-PROP-EDC	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto propiônico ativada com EDC
AgAu-UND-EDC	Nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto undecanóico ativada com EDC
AgAu-CIS-BCL	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com cisteamina
AgAu-MAC-BCL	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto acético
AgAu-PROP-BCL	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto propiônico
AgAu-UND-BCL	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto undecanóico
AgAu-CIS-PPL	Lipase de Pâncreas de porco imobilizada em nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com cisteamina
AgAu-MAC-PPL	Lipase de Pâncreas de porco imobilizada em nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto acético
AgAu-PROP-PPL	Lipase de Pâncreas de porco imobilizada em nanopartículas de

	Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto propiônico
AgAu-UND-PPL	Lipase de Pâncreas de porco imobilizada em nanopartículas de Ouro/Prata funcionalizadas com ácido mercapto undecanóico
BCL	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
<i>E</i>	Razão Enantiomérica
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
NSs AgAu	Nanopartícula de Ouro/Prata
NSs-funcionalizada(s)	Refere-se às NSs AgAu funcionalizadas com cistemina, ácido mercapto acético, ácido mercapto propiônico e ácido mercapto undecanóico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -Nitrofenol
<i>p</i> -NPP	Palmitato de <i>p</i> -Nitrofenila
PPL	Lipase de Pâncreas de porco
<i>R</i>	Refere-se ao enantiômero <i>R</i>
RC	Resolução cinética
RCE	Resolução cinética enzimática
<i>S</i>	Refere-se ao enantiômero <i>S</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1.0 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Nanopartículas Metálicas.....	20
1.1.1 Nanopartículas Bimetálicas	22
1.2 Lipases	23
1.3 Imobilização de enzimas.....	28
2.0 OBJETIVOS.....	32
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1 Síntese do (R,S)-1-feniletanol.....	35
3.2 Síntese das Nanocascas de Ouro/Prata (NSs AgAu).....	35
3.3 Funcionalização das nanocascas de Au-Ag (NSs-funcionalizadas).....	40
3.4 Ativação das nanocascas-funcionalizadas (NSs-funcionalizadas) para imobilização das lipases.....	45
3.5 Ensaio Enzimáticos.....	47
3.5.1 Preparação das soluções aquosas de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> e pâncreas de porco.....	47
3.5.2 Imobilização das lipases (<i>Burkholderia cepacia</i> e pâncreas de porco) nas nanopartículas de Au-Ag	48
3.5.3 Quantificação de enzimas livres e imobilizadas	51
3.5.3.1 Método de Bradford.....	51
3.5.3.2 Quantificação das enzimas imobilizadas	53
3.5.3.3 Quantificação da enzima livre	55
3.6 Caracterização dos sistemas NSs AgAu-Lipase	56
3.6.1 Caracterização da imobilização das lipases nas NSs AgAu por FT-IR	56
3.6.2 Caracterização da imobilização das lipases nas NSs AgAu por imagens de MET	59
3.7 Teste da atividade enzimática das lipases imobilizadas.....	61
3.7.1 Teste da acetilação enantiosseletiva do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisado pelas lipases livres e imobilizadas	61
3.7.2 Teste da hidrólise do palmitato de p-nitrofenila catalisada pela lipase de BCL.....	67
3.8 Análise cromatográfica da atividade enzimática da PPL e BCL imobilizada.....	71
3.9 Estudo cinético da BCL imobilizada	75

3.10 Reciclagem da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada.....	76
3.11 Estudo sobre a lixiviação de enzimas imobilizadas durante a resolução cinética enzimática.....	78
3.12 Armazenamento da BCL imobilizada nas nanocascas funcionalizadas.....	79
3.13 Investigação da pureza da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada.....	80
3.14 Calculo teórico da quantidade de enzima que poderia ser imobilizada nas nanocascas	81
3.15 Imobilização da lipase de BCL nas NSs AgAu não funcionalizadas (NSs-BCL).....	82
3.16 Investigação da importância do suporte (NSs AgAu) na atividade da enzima imobilizada	84
4.0 CONCLUSÃO.....	87
5.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	88
5.1 Materiais e Métodos	88
5.2 Síntese dos compostos utilizados.....	90
5.2.1 Síntese do (R,S)-1-Feniletanol.....	90
5.2.2 Síntese do acetato de (R,S)-1-feniletila.....	91
5.2.3 Síntese do (R)-1-feniletanol.....	91
5.2.4 Síntese do palmitato de p-nitrofenila (p-NPP).....	93
5.2.5 β-Benzilmercaptoetilamina.....	94
5.2.6 Ácido benzilsulfanil-acético.....	94
5.2.7 5-(2-Benzilsufanil-etilimino)-pentanal	95
5.2.8 Cloreto de {3-[2-(2-benzilsulfanil-acetil)-3-etil-isoureia]-propil}-dimetil amônio.....	96
5.3 Síntese das Nanocascas.....	96
5.3.1 Síntese das Nanocascas de Ouro e Prata (NSs AgAu) ¹¹	96
5.3.1.1 Síntese das Nanopartículas de Prata (Np-Ag)	96
5.3.1.2 Síntese das Nanocascas de Ouro/Prata (NSs AgAu).	97
5.4 Funcionalização das Nanopartículas de Ouro/Prata.....	97
5.5 Funcionalização das nanocascas AgAu com glutaraldeído	98
5.6 Funcionalização das nanocascas com EDC	98
5.7 Imobilização das Lipases nas Nanocascas	99
5.7.1 Imobilização das Lipases (<i>Burkholderia cepacia</i> e Pâncreas de porco) nas NSs AgAu funcionalizadas	99
5.7.2 Imobilização das Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> na NSs AgAu (sem funcionalização)	100
5.8 Caracterização das Nanocascas.....	100
5.8.1 Preparação das amostras para FT-IR.....	100

5.8.2 Preparação das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	100
5.8.3 Preparação das amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	101
5.9 Ensaaios enzimáticos.....	101
5.9.1 Preparação da solução enzimática para imobilização enzimática.....	101
5.9.2 Preparação da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> e Pâncreas de porco para catálise enzimática.....	102
5.10 Quantificação de Proteínas.....	102
5.10.1 Montagem da curva de calibração para quantificação da proteína através do método de Bradford	102
5.10.2 Método de preparação das amostras para medida da quantidade de enzima imobilizada.....	103
5.11 Teste da Atividade Catalítica de Lipases.....	104
5.11.1 Teste da Atividade Enzimática: Reação de Transesterificação enantiosseletiva do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila.....	104
5.11.2 Teste da atividade enzimática: Reação de Hidrólise do Palmitato de p-Nitrofenila (p-NPP) catalisado por lipases'.....	104
6.0 REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	111
Espectros selecionados.....	111
Espectros de FT-IR.....	121
Imagens de MEV e MET.....	127
Curriculum Vitae	131
Artigo Publicado	136

1.0 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os químicos têm voltado sua atenção para aplicação de biocatalisadores na síntese de compostos quirais, usando enzimas ou células.¹ O interesse em biocatalisadores, como enzimas, para produção química está em crescimento porque geralmente eles apresentam estéreo-, quimio- e regioseletividade.²

Além disso, o uso de biocatalisadores, tanto como enzimas ou células inteiras, para a fabricação de produtos químicos oferece grandes vantagens como melhora da seletividade, melhora na segurança e sustentabilidade de produção.³

Mesmo assim, a utilização de enzimas livres como biocatalisadores é limitada. Enquanto enzimas apresentam atividade catalítica eficaz sob condições suaves (temperatura ambiente e meios aquosos), isso pode variar, quando estas condições são modificadas alterando a estabilidade e atividade enzimática.²

Estas limitações associadas ao custo elevado do material, grandes quantidades necessárias para a produção comercial limita a utilização de enzimas livres. Assim a Imobilização da enzima pode ser utilizada, como ferramenta, para aumentar a estabilidade, a recuperação, e acabar com as desvantagens de recuperação geradas com uso da enzima livre em solução, tornando-a industrialmente e comercialmente viáveis.²⁻⁴

A nanotecnologia tem proporcionado uma riqueza de diversidade no campo de nanomateriais, que podem ser utilizados como suporte para imobilização de enzimas

¹ Fessner, W.; Turner, N. J.; Wang, M. Biocatalysis – A Gateway to Industrial Biotechnology. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2189-2190.

² Tran, D. N.; Balkus, K. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 956-968.

³ Zheng, G.; Xu, J.; New opportunities for biocatalysis: Driving the Synthesis of Chiral Chemicals. *Biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, 22, 784-792.

⁴ Gaffney, D.; Cooney, J.; Magner, E. Modification of Mesoporous Silicates for Immobilization of Enzymes. *Top Catal.* **2012**, 55, 1101-1106.

devido às suas potenciais aplicações em biotecnologia, imunossensores e áreas biomédicas.⁵ Enzimas imobilizadas em nanoestruturas como esferas (Au, Ag, Cu, Fe), fibras (PVA) e tubos (silicato) foram recentemente relatados.⁶

Um requisito importante para a imobilização de proteínas é de que a matriz deve fornecer um ambiente inerte e biocompatível, isto é, não deve interferir com a estrutura nativa da proteína, que, assim, não possa comprometer a sua atividade biológica.⁵

Nanopartículas metálicas foram extensivamente usadas em várias aplicações biomédicas, pois apresentam tamanhos pequenos, grande área superficial e extensiva habilidade térmica.⁷ Este tipo de material já foi utilizado como suporte de diversas enzimas, como glucose oxidase⁸, *Horseradish* peroxidase^{9,10}, lactato desidrogenase¹⁰, lipase de *Candida rugosa*¹⁰, pepsina¹⁰, lipase de *Burkholderia cepacia*¹⁰ entre outras. A imobilização das enzimas citadas acima em nanopartículas metálicas proporcionou em todos os casos a melhora de alguma característica enzimática como, por exemplo, seletividade e/ou incremento da atividade enzimática.

Dentre a classe de nanopartículas metálicas, existem as nanopartículas bimetalicas. Nanopartículas bimetalicas permitem a combinação de propriedades e/ou sinergismo das características que fazem parte da composição de cada componente. Os

⁵ Ansari, S. A.; Husain, Q. Potential Applications of Enzymes Immobilized on/in nano materials: A review. *Biotech. Adv.* **2012**, *30*, 512-523.

⁶ Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1017–1026.

⁷ Tiwari, P. M.; Vig, K.; Dennis, V. A.; Singh, S. R. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *J. Nanomater.* **2011**, *1*, 31-63.

⁸ a) Li,D.; He, Q.; Cui, Y.; Duan, L.; Li, J. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochem. Biophys. Re. Commun.* **2007**, *2*, 488-93. b) Tellechea, E.; Wilson, K. J.; Bravo, E.; Hamad-Schifferli, K. Engineering the Interface between Glucose Oxidase and Nanoparticles. *Langmuir.* **2012**, *28*, 5190-5200. c) Hsu, F.; Yu, D.; Chang, J.; Chuang, C. Silver Nanoparticles as a glucose oxidase Immobilization matrix for Amperometric glucose biosensor construction, *J. Chin. Chem. Soc.* **2011**, *58*, 756-760.

⁹ Jedrzejewska, H.; Ostaszewski, R. Studies Toward Stereoselective Bionanocatalysis on gold nanoparticles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *90*, 12–16.

¹⁰ Bjerneld, E.; Foeldes-Papp, Z.; Kaell, M.; Rigler, R. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman and Fluorescence Correlation Spectroscopy of Horseradish Peroxidase. *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 1213-1218

materiais bimetálicos têm propriedades que partículas constituídas de um único material não possuem. Elas podem ser ocas, o que proporcionaria um aumento na área superficial e possibilitaria a imobilização de uma maior quantidade de enzimas e podem agregar características pertencentes a cada material para formar um material mais estável e favorável.¹¹

Nanopartículas são também passíveis de funcionalização, ou seja, é possível através de reações químicas entre diversas moléculas e o suporte, agregar grupos a superfície deste material. Grupos tióis fazem fortes ligações com átomos de ouro e prata. Neste tipo de ligações tióis ou moléculas que contenham este grupo atuam como um espaçador que preenche a superfície destes materiais. A funcionalização ainda estabiliza estas nanopartículas e permite o seu armazenamento por um longo período.¹²

1.1 Nanopartículas Metálicas

Muitos autores definem nanopartícula, como materiais coloidais com diâmetros de até 100 nm, que devem estar dispersos em uma solução.¹³ Estes materiais possuem diversas aplicações, em áreas como corantes e tintas, cosméticos, comida, na medicina, biotecnologia e na química eles atuam principalmente na catálise.^{14,15,16,17} Devido a sua

¹¹ Petri, M. V.; Ando, R. A.; Camargo, P. H. C. Tailoring the structure, composition, optical properties and catalytic activity of Ag–Au nanoparticles by the galvanic replacement reaction. *Chem. Physics Lett.* **2012**, *531*, 188.

¹² Hegde, S.; Joshi, S.; Mukherjee, T.; Kapoor, S. Formation of gold nanoparticles via a thiol functionalized polyoxometalate. *Mat. Sci. Engin. C.* **2013**, *33*, 2332–2337

¹³ Lechner, M. D. Determination of the particle size distribution of 5-100nm nanoparticles with the analytical ultracentrifuge: consideration and correction on diffusion effects. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **1999**, *113*, 37-43.

¹⁴ Mody, V. V.; Siwale, R.; Mody, H. R. Introduction to Metallic Nanoparticles. *J. Pharm. Bioall. Sci.*, **2010**, *4*, 282-289.

¹⁵ Katz, E.; Willner, I. Integrated Nanoparticle–Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6042-6108.

¹⁶ Boote, B. W.; Byun, H.; Kim, J. One-pot synthesis of various Ag–Au bimetallic nanoparticles with tunable absorption properties at room temperature. *Gold Bull.* **2013**, *46*, 185-193.

¹⁷ Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jackel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J. Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles, *J. Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1805-1825.

grande aplicação este tipo de material vem sendo extensivamente estudado e com isso grandes avanços estão surgindo nesta área.¹⁹

Dentre as principais características destes nanomateriais podemos citar a grande área superficial e a sua fácil preparação e manipulação.¹⁹

Estes nanomateriais podem ser preparados principalmente através de dois métodos, o método químico ou físico.¹⁸ O método físico mais conhecido para produção de nanopartículas é chamado de Deposição física de vapor (PVD). O PVD é uma técnica que consiste em depositar uma série de materiais sobre a superfície de filmes ultrafinos, podendo levar a formação de nanopartículas. Esta técnica envolve a condensação de um material vaporizado sobre um substrato, *sob*vácuo altamente controlável. Dentre os métodos físicos para formação de nanopartículas que utilizam o PVD, podemos citar a pulverização catódica e evaporação térmica.¹⁹

O método químico para preparação de nanopartículas envolve principalmente a redução de íons metálicos para átomos do metal, esta abordagem baseia-se na redução química de um sal ou ácido do metal com um agente redutor.^{19,20} O método químico para preparação de Nps foi o tipo de método escolhido para a preparação das nanopartículas utilizadas neste trabalho.

¹⁸ Toshima, N.; Yonezawa, T. Bimetallic nanoparticles novel materials for chemical and physical Applications. *New J. Chem.* **1998**, 33, 1179-1201.

¹⁹ Pandey, P. A.; Bell, G. R.; Rourke, J. P.; Sanchez, A. M.; Elkin, M. D. E.; Hickey, B. J.; Wilson, N. R. Physical Vapor Deposition of Metal Nanoparticles on Chemically Modified Graphene: Observations on Metal–Graphene Interactions. *Small*. **2011**, 7, 22, 3202–3210.

²⁰ Gutierrez-Wing, C.; Velazquez-Salazar, J. J.; Jose-Yacaman, M. Procedures for the Synthesis and Capping of Metal Nanoparticles. *Methods Mol. Biol.* **2012**, 906, 3-19.

1.1.1 Nanopartículas Bimetálicas

Nanopartículas bimetálicas podem ser definidas como a combinação de dois metais de nanoescala em seu intervalo de tamanho e que formam um único material nanométrico. Este tipo de material bimetálico tem atraído grande atenção dos pesquisadores nos últimos tempos, por apresentarem características distintas, daquelas apresentadas por um material formado por um único metal.²¹ Características estas como sinergismo e grande área superficial.^{22,23}

Estes materiais bimetálicos podem ser classificados em quatro tipos: nanopartículas *core-shell*, nanopartículas *sub-clusters*, nanopartículas mistas e nanopartículas *multishell*. Nanopartículas *core-shell* consistem em nanopartículas formadas por uma casca de um tipo de átomo em torno de um núcleo de um outro tipo de átomo, nanopartículas do tipo *sub-clusters* consistem em uma partícula formada por subgrupos que podem partilhar uma interface mista, ou apenas ter um número pequeno de ligações, nanopartículas mistas são aquelas originadas da mistura de átomos do metal, esta mistura pode ser aleatória ou ordenada e nanopartículas *multishell* são aquelas constituídas por mais de uma camada.²²

Muitos tipos de nanopartículas bimetálicas já foram sintetizadas e utilizadas para diversos fins, dentre as nanopartículas bimetálicas sintetizadas mais conhecidas

²¹ AbdelHamid, A. A.; Al-Ghobashy, M. A.; Fawzy, M.; Mohamed, M. B.; Abdel-Mottaleb, M. M. S. A. Phytosynthesis of Au, Ag, and Au–Ag Bimetallic Nanoparticles Using Aqueous Extract of Sago Pondweed (*Potamogeton pectinatus* L.). *ACS Sustainable Chem. Eng.* "In press" (2013).

²² Ferrando, R.; Jellinek, J.; Johnston, R.L. Nanoalloys: from theory to applications of alloy clusters and nanoparticles. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 845-910.

²³ Wang, D. S.; Li, Y. D. Bimetallic nanocrystals: liquid-phase synthesis and catalytic applications, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 1044-1060.

podemos citar nanopartículas de ouro/prata, prata/paládio, platina/cobre entre muitas outras.^{24,25,26}

1.2 Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3 *triacylglycerol acilhidrolases*) estão presentes em diversas plantas, animais e microorganismos.²⁷ Esta classe de enzima tem levantado aproximadamente 20 milhões de dólares no mercado industrial enzimático²⁸. As lipases vêm ganhando destaque como grande biocatalisador devido ao seu potencial para diversas aplicações indústrias. Elas apresentam características importantes que contribuem para isso, como a habilidade de suportar variações de temperaturas, pH, solventes orgânicos e por possuir quimio-, régio- e enantiosseletividade²⁹. Algumas das aplicações industriais de lipase encontram-se relacionadas na **Tabela I**.

²⁴ Zhang, W.; Huang, L.; Zhu, J.; Liu, Y.; Eang, J. Synthesis of monodisperse Ag–Au alloy nanoparticles with large size by a facile fabrication process. *Mat. Chem. and Physics*. **2011**, *131*, 136–141.

²⁵ Rao, V. K.; Radhakrishnan, T. P. Hollow bimetallic nanoparticles generated in situ inside a polymer thin film: fabrication and catalytic application of silver–palladium–poly(vinyl alcohol). *J. Mater. Chem. A*. **2013**, *1*, 13612–13618.

²⁶ Shiraishi, Y.; Sakamoto, H.; Sugano, Y.; Ichikawa, S.; Hirai, T. PtCu Bimetallic Alloy Nanoparticles Supported on Anatase TiO₂: Highly Active Catalysts for Aerobic Oxidation Driven by Visible Light. *ACS Nano*. **2013**, *10*, 9287–9297.

²⁷ Verma N.; Thakur S.; Bhatt A. K. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *Int. Res. J. Biological Sci*. **2012**, *8*, 88–92.

²⁸ Mala, J. G. S.; Takeuchi, S. Understanding structural features of microbial. *Anal. Chem. Insights*. **2008**, *3*, 9–19.

²⁹ Patil K.J., Chopda M.Z. and Mahajan R.T. Lipase biodiversity, *Indian J. Sci. Tech*. **2011**, *8*, 971–982.

Tabela I¹⁶: Algumas aplicações industriais de lipases.

Indústria	Aplicação Enzimática	Aplicação no Produto
Laticínio	Hidrólise de leite, queijo, amadurecimento do queijo, modificação da gordura da manteiga.	Desenvolvimento de agente aromatizante em leite de queijo e manteiga
Padaria	Melhora do sabor	Prolongamento da vida de prateleira
Bebidas	Melhora no aroma	Bebidas alcólicas, como vinho.
Alimentos em molho	Melhoria da qualidade	Maionese
Carnes e peixes	Desenvolvimento do sabor	Remoção da gordura do produto
Cosméticos	Esterificação	Cremes para pele, óleos de banho.
Surfactantes	Substitui Fósfolipases na produção de lisofosfolipídios	Poliglicerol e ésteres de ácidos gordos hidratos de carbono utilizados como emulsificantes industriais como detergentes e na formulação de alimentos, tais como molhos e sorvetes.
Agrotóxicos	Esterificação	Como fenóxiopropionato
Farmacêutica	Reações com álcoois	Produzir intermediários utilizados na fabricação de medicamentos
Combustíveis	Transesterificação	Produção de biodiesel
Controle da poluição	Hidrólise e transesterificação de óleos e gorduras	Remover óleos e graxas

A lipase também é aplicável para catálise de uma ampla gama de reações como esterificação³⁰, transesterificação¹⁷, reações aldólicas cruzadas³¹, hidrólise³², acilação de aminas³³ e adição do tipo-Michael²⁰.

³⁰ Massadeh, M.; Sabra, F.; Dajani, R.; Arafat, A. Purification of Lipase Enzyme Produced by *Bacillus Stearothermophilus* HU1. *Int. Conf. On Eco-Systems and Bio Sci.* **2012**, 19-20.

³¹ Xie, Z.; Na Wang, N.; Zhou, L.; Wan, F.; He, T.; Le, Z.; Yu, X. Lipase-Catalyzed Stereoselective Cross-Aldol Reaction Promoted by Water. *Chem. Cat. Chem.* **2013**, 7, 19635-1940.

Em geral, as lipases são proteínas de 20-60 kDa, com um resíduo serina presente no sítio ativo de estrutura Ser-His-Asp. As lipases pertencem à família da hidrolases α/β com estrutura β -folha central contendo uma serina, localizado em um local denominado “cotovelo catalítico”. A ativação interfacial ocorre na presença de um substrato que entra em contato com a enzima através do movimento de uma tampa enzimática e da exposição da bolsa hidrofóbica e da estrutura do sítio ativo acima da concentração micelar crítica do substrato. Esta ativação interfacial é única para a classe das lipases, (**Figura I**³⁴), e também responsável pela versatilidade das reações biocatalisadas.³⁵

³² Belluci, L.; Laino, T.; Tafi, A.; Botta, M. Metadynamics simulations of enantioselective acylation give insights into the catalytic mechanism of *Burkholderia cepacia* lipase. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, 6, 1145–1156.

³³ Zhe, H.; Chun-lin, D. A study on lipase-mediated selective synthesis of monoglyceride. *J. Lionin. Normal Univer. Nat. Scien.* **2007**, 30, 343-347

³⁴ www.maptest.rutgers.edu/ acessado em 22/00/2013.

³⁵ Mala, J. G. S.; takeuchi, S. Understanding structural features of microbial. *Anal. Chem. Insights.* **2008**, 3, 9-19.

Figura I: Representação da lipase a) Estrutura do sítio ativo da lipase b) Estrutura do sítio ativo com a tampa fechada c) Estrutura do sítio ativo com a tampa aberta.²¹

Na estrutura das lipases existem sete resíduos de lisina perto da superfície da proteína, o que possibilita a imobilização eficaz a diversos suportes através da ligação com grupo amina³⁶. A estrutura da lipase de *Burkholderia cepacia* encontra-se abaixo,

Figura II.³⁷

³⁶ Jedrzejewska, H.; Ostaszewski, R. Studies toward stereoselective bionanocatalysis on gold nanoparticles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, 90, 12–16.

³⁷ <http://www.rcsb.org/> acessado em 28/03/2013.

Figura II: Estrutura da *Burkholderia cepacia* (partes em vermelho representam grupos cisteína e partes em verde representam grupos lisina).²³

Como neste trabalho utilizamos a reação de transesterificação do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisado pela lipase para o teste de atividade da enzima imobilizada, o mecanismo para esta reação está ilustrado abaixo (**Esquema I**).

Neste mecanismo, primeiramente, temos o ataque do grupo hidróxi da serina ao acilante (acetato de vinila) para formação do intermediário tetraédrico 1. Pela deslocalização dos elétrons da carbonila do acilante o intermediário tetraédrico é desfeito para a formação da espécie acil enzima. Comumente doadores de acila são utilizados em reações de transesterificação enantiosseletiva, pois o enol formado depois da acilação é rapidamente convertido em acetaldeído que é mais estável e desloca o equilíbrio para formação dos produtos.³⁸ Depois a espécie acil enzima sofre o ataque do álcool secundário para a formação do intermediário tetraédrico 2, que devido a deslocalização dos elétrons da carbonila promove a clivagem do grupo acil enzima para a formação de um éster como produto e restauração do catalisador.

³⁸ Rebelo, L. P. Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em resolução cinética de álcoois secundários quirais. 2009. Dissertação (Mestrado em Química, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, **2009**.

Esquema I: Mecanismo de transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipase.²⁴

1.3 Imobilização de enzimas.

A imobilização de enzimas é uma técnica bastante utilizada nos dias atuais como uma alternativa para aprimorar a performance do biocatalisador.³⁹ Devido a grande comercialização das enzimas, o fator econômico tem-se tornando muito importante, assim o fator reutilização tornou-se obrigatório.⁴⁰

A manutenção da estabilidade estrutural da enzima durante qualquer reação é altamente desafiador. Consequentemente, enzimas imobilizadas com eficiência

³⁹ Nisha, S.; Arun, K. S.; Goboi, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chem Sci Rev Lett.* **2012**, *1*, 148-155.

⁴⁰ Datta, S.; Christena, R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.*, **2013**, *3*, 1-9.

funcional, reprodutibilidade melhorada são utilizadas como alternativas para diminuir o elevado custo dos biocatalisadores.⁴¹

A imobilização de uma enzima consiste no confinamento deste catalisador a um suporte ou matriz. Polímeros inertes e materiais inorgânicos são normalmente utilizados como suporte/matriz. Além de ser acessível, uma matriz/suporte deve englobar características como inércia, estabilidade, e se possível ser capaz de aumentar a especificidade da enzima/atividade.⁴¹

Vários métodos são utilizados para a imobilização de enzimas ao suporte, dentre os mais conhecidos temos o método de imobilização por adsorção, por ligação covalente da enzima ao suporte, imobilização por afinidade e imobilização por aprisionamento.

O método de imobilização por adsorção consiste na ligação da enzima ao suporte/matriz através forças denominadas mais fracas, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações iônicas e forças de Van der Waals. Materiais como carvão ativo, resinas de troca iônica e polímeros já foram utilizados como suporte de enzimas pelo método por adsorção. O método de imobilização por adsorção é considerado um método fácil e barato e fácil, uma desvantagem deste método é a força de ligação fraca entre o suporte e a enzima o que torna este método, um método reversível.^{42,43}

A imobilização por ligação covalente ocorre por que grupos funcionais presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, como arginina, ácido aspártico, histidina, lisina entre outros conseguem ligar-se covalentemente a grupos presentes na

⁴¹ Tischer, W.; Wedekind, F. Immobilized Enzymes: *Meth. Applicat.* **1999**, 200, 95-126.

⁴² Brady, D., Jordan, A. Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol. Lett.* **2009**, 31, 1639- 1650.

⁴³ Tanyolac, D., Yuruksoy, B.I., Ozdural, A.R. Immobilization of a thermostable α -amylase, termamyl, onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding. *Biochem. Eng. J.* **1998**, 2, 179-186.

superfície do suporte. A ligação covalente da enzima ao suporte é uma ligação forte e estável. Dentre os materiais que já foram utilizados como suporte adotando este tipo de ligação temos a poliacrilamida, vidro poroso, agarose e sílica porosa.³⁹ Esta ligação covalente da enzima com o suporte envolve duas principais etapas, tais como, a ativação do suporte pela adição de um composto reativo e o segundo envolve uma modificação da estrutura do suporte para ativar o suporte. O passo de ativação do suporte produz um grupo eletrofílico na superfície do material que são capazes de reagir com os nucleófilos presentes na superfície das proteínas.⁴⁴

Aumento da meia-vida e a estabilidade térmica das enzimas têm sido conseguidos por ligação covalente da enzima a diferentes suportes.⁴⁵ Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas via ligação covalente já podem ser encontradas em produtos farmacêuticos e nas indústrias, devido à sua maior longevidade, estabilidade operacional e reutilização.⁴⁶

A imobilização por afinidade explora a especificidade de enzimas ao suporte em diferentes condições fisiológicas. Este tipo de imobilização pode ocorrer de duas maneiras: A matriz tem sua superfície modificada com um ligante que possui afinidade pela enzima ou a enzima é modificada e a partir desta modificação ela passa a ter afinidade pela matriz.⁴⁷ Suportes e matrizes com afinidade a enzimas são muito utilizadas para a purificação de enzimas.⁴⁸

⁴⁴ Berna, B. M.; Batista, F. Enzyme immobilization literature survey methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells., **2006**, 2nd (Ed.), 15-30.

⁴⁵ Ispas, C.; Sokolov, I.; Andreescu, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 543–554.

⁴⁶ Yusdy; Patel, S. R.; Yap, M. G. S.; Wang, D. I. C. Immobilization of L-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. *Biochem. Eng. J.* **2009**, 48, 13–21.

⁴⁷ Sardar, M.; Gupta, M. N. Immobilization of tomato pectinase on Con A–Seralose 4B by bioaffinity layering. *Enzyme Microb. Tech.* **2005**, 37, 355–359.

⁴⁸ Ho, L. F.; Li, S. Y.; Lin, S. C.; Hsu, W. H. Integrated enzyme purification and immobilization processes with immobilized metal affinity adsorbents. *Process Biochem.* **2004**, 39, 1573–1581.

A imobilização por aprisionamento consiste no encarceramento de enzimas por ligação covalente ou não covalente dentro de géis ou fibras. Estes suportes que contêm a enzima normalmente são permeáveis, o que permite que os substratos e os produtos passem sobre ele, mantendo a enzima aprisionada. A imobilização de enzimas por aprisionamento é um processo rápido, barato e utiliza condições brandas no processo de reação. Uma desvantagem deste método é que pouca quantidade enzimática pode ser anexada ao suporte. Este método oferece uma grande área de superfície entre o material polimérico e a enzima.⁴⁹

⁴⁹ Bernfeld, P.; Wan, J. Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into the lattices of synthetic polymers, *Science*. **1963**,142, 678-679.

2.0 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o emprego de nanocascas de Ouro/Prata (NSs AgAu) funcionalizadas com moléculas contendo o grupo tiol e amina/ácido carboxílico. A utilização destas nanocascas funcionalizadas com suporte de lipases de BCL e PPL (BCL, lipase *Burkholderia cepacia*; PPL, lipase de pâncreas de porco) via ligação covalente, enzima-suporte. Especificamente, estávamos interessados em investigar o efeito da mudança da interface entre NSs AgAu-enzima, observando como diferentes funcionalizações das NSs AgAu influenciam na atividade enzimática. Outro objetivo deste trabalho foi desenvolver testes sobre a estabilidade da enzima imobilizada como teste da atividade da enzima imobilizada, reciclagem dos sistemas contendo a enzima imobilizada e o armazenamento da enzima imobilizada.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como vimos, nanopartículas vem despertando o interesse de diversos campos de pesquisa, isso por apresentarem características como grande área superficial e sinergismo. Vimos também que as lipases são de grande importância, tanto para o meio industrial como científico. Isso por serem excelentes catalisadores apresentando características como quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade e ainda, estes biocatalisadores, não necessitam de condições reacionais drásticas como a maioria dos catalisadores químicos. Emanamos também que a imobilização enzimática em diversos suportes é uma ferramenta para auxiliar no uso de enzimas para pequenos e grandes sistemas reacionais, visando evitar o desperdício do catalisador, através de seu reuso e em vários casos procurando aumentar a capacidade catalítica da enzima.

Desta forma foi proposto um estudo que visava a utilização de nanocascas de ouro/prata como suporte de lipases (Pâncreas de porco e *Burkholderia cepacia*), bem como a investigação de diferentes substituintes orgânicos ligados a superfície desse material para a imobilização dessas lipases. É sabido na literatura que grupos tióis (H-S) ligam-se fortemente a materiais como ouro e prata e esta característica então foi utilizada para que assim pudéssemos funcionalizar (aderir grupos a superfície do material) as nanocascas formando diferentes nanocascas bimetálicas funcionalizadas que foram utilizadas como suporte de enzimas.

Vale ressaltar que este estudo teve também como objetivo investigar como as diferentes funcionalizações da nanopartícula afetam o biocatalisador, visto que esta análise é pouco explorada na literatura.

Outro fator considerado neste estudo foi que, com base nas diferentes funcionalizações das nanocascas, nós conseguimos fazer uma correlação entre tamanho

do funcionalizador *versus* atividade catalítica da enzima, provando que o espaço entre nanopartícula e enzima tem influência na atividade enzimática.

Sobre o estudo da atividade catalítica da lipase, nós escolhemos utilizar para este teste a reação de acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol. Alcoóis secundários são intermediários de grande importância no meio sintético, sendo estes utilizados para síntese de diversos outros produtos úteis. Assim nós utilizamos este tipo de reação para teste da atividade em meio orgânico. Outro objetivo para utilização deste substrato é que quando promovemos a reação de acetilação enantiosseletiva deste álcool podemos monitorar a capacidade enantiosseletiva da lipase imobilizada, ou seja, ver como a característica seletiva da lipase permanece depois do processo de imobilização.

A escolha destas duas diferentes lipases baseou-se no seguinte argumento, uma das enzimas, a lipase de *Burkholderia cepacia*, já é bastante conhecida por promover a catálise da acetilação enantiosseletiva de alcoóis secundários, mas a lipase de pâncreas de porco, ao contrario da lipase de BCL, não possui eficiência catalítica nessa reação. Entretanto, a PPL possui uma boa atividade catalítica em reações de hidrólise. Com base nesses argumentos, decidiu-se utilizar essas duas lípases, e com isso, procurar uma melhoria nas propriedades catalíticas da BCL e transformar a PPL em um bom catalisador, depois da imobilização, para uma reação em que ela não era um bom catalisador.

Baseado então em todas essas ponderações arquitetou-se este estudo sobre imobilização de lipases em um novo suporte.

3.1 Síntese do (*R,S*)-1-feniletanol

O (*R,S*)-1-feniletanol (**1**) foi utilizado como substrato para o teste da atividade enzimática das lipases livres e imobilizadas utilizadas neste estudo. A escolha deste substrato foi feita, pois alcoóis secundários são excelentes substratos frente a reações de acetilação catalisadas por lipases, sendo bastante utilizado para este fim.⁵⁰ A utilização deste substrato permite além de tudo o acompanhamento da seletividade enzimática durante o processo reacional, pois há inúmeros relatos de que frente a este substrato a lipase promove uma acetilação enantiosseletiva, ou seja, promove a acetilação do substrato *R* ou *S* do álcool. Este substrato foi obtido facilmente através de uma reação de redução da 1-feniletanona pelo hidreto de boro e sódio (NaBH_4), com excelente rendimento, 98%, **Esquema 1**.⁵¹

Esquema 1: Síntese do (*R,S*)-1-feniletanol

3.2 Síntese das Nanocascas de Ouro/Prata (NSs AgAu)

A obtenção das NSs AgAu ocorre através duas etapas, a primeira etapa é a preparação das nanopartículas de prata (Np-Ag). Estas nanopartículas foram sintetizadas através de um processo de redução do nitrato de prata (AgNO_3) pelo citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) em água sob aquecimento (**Esquema 2**).

⁵⁰ Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. A Rule To Predict Which enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

⁵¹ Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V. Asymmetric synthesis of arylseleno alcohols by means of the reduction of organoseleno acetophenones by whole fungal cells. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *29*, 47-54.

Esquema 2: Síntese das Np- Ag, pela redução do nitrato de prata com $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

Em seguida, as Np-Ag foram caracterizadas através de imagens de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (**Figura 1**). O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 x) e resolução. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV.

Figura 1: Imagem de MEV das Np-Ag.

Pelas imagens de MEV comprovamos a formação das nanopartículas de prata e conseguimos elucidar algumas características destas nanopartículas, como sua característica esférica e seu diâmetro entre $41\text{nm} \pm 5\text{ nm}$.

A partir das Np-Ag foram então sintetizadas as nanocascas de ouro/prata. Esta síntese ocorre através de uma reação de substituição galvânica da prata com ácido de tetraclore áurico (AuCl_4^-). A reação de substituição galvânica é um método versátil para preparar nanoestruturas metálicas ocas com estrutura e composição que podem ser controladas durante o processo reacional. Este tipo de reação envolve um processo redox, que é acionado pela diferença de potencial eletroquímico entre duas espécies metálicas. A espécie com menor potencial redox é oxidada a partir de seu interior (gerando um interior oco) e sua superfície serve com molde (*Template*) para o outro metal que está sendo reduzido (que vai se acumulando na superfície deste metal).^{52,53}

Em nossos estudos as nanopartículas de prata foram utilizadas como “*template*”, sendo então oxidadas a partir do seu interior, enquanto o AuCl_4^- foi utilizado como agente oxidante, sendo as partículas de ouro depositadas na superfície da prata. Uma representação reacional do processo de substituição galvânica está ilustrado no esquema abaixo (**Esquema 3**).

Esquema 3: Equação representando a reação de substituição galvânica do AuCl_4^- .¹¹

A composição e estrutura das nanocascas podem ser controladas durante o processo reacional através da quantidade de reagentes utilizados e do tempo de adição destes reagentes. Por exemplo, se adicionarmos o AuCl_4^- em uma maior quantidade o

⁵² Hwan M. et al. Galvanic Replacement Reactions in Metal Oxide Nanocrystals. *Science*, **2013**, 340, 964-968.

⁵³ Cao, M.; Zhou, L.; Xu, X.; Cheng, S.; Yao, J.; Fan, L. Galvanic replacement approach for bifunctional polyacrylonitrile/Ag-M (M ¼ Au or Pd) nanofibers as SERS-active substrates for monitoring catalytic reactions. *J. of Mat. Chem. A*. **2013**, 1, 8942-8949.

tamanho da nanopartículas será maior. A velocidade da adição do reagente de oxidação também pode ainda influenciar na estrutura da nanocasca formada.

A caracterização das nanocascas sintetizadas foi feita através de imagens de MEV e MET (**Figuras 2**). O MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão), também é um microscópio de alta resolução que mostra imagens planas do material analisado.⁵⁴

Figura 2: Imagens de MEV e MET (inserte) das NSs AgAu. A escala da barra no inserte corresponde a 15 nm.

Pelas imagens adquiridas pelo MEV e MET, algumas características das NSs AgAu foram comprovadas, como seu tamanho aproximado (50 nm) e determinação da característica oca da nanopartículas. Esta característica oca pode ser determinada pela diferença de contraste nas imagens de MEV e MET.⁵⁵ Abaixo segue um recorte de uma imagem de MEV das NSs AgAu que mostra mais claramente a diferença de contraste (**Figura 3**). Outras imagens das nanocascas podem ser vistas no **ANEXO**.

⁵⁴ Egerton, R. *Physical Principles of Electron Microscopy*. 1st ed. **2005**. Corr. p. 122 .

⁵⁵ Yang, L.; Yan, B.; Reinhard, B. M. Correlated Optical Spectroscopy and Transmission Electron Microscopy of Individual Hollow Nanoparticles and their Dimers. *J. Phys. Chem. C. Nanomater Interfaces*. **2008**, *112*, 15989–15996.

Figura 3. Recorte de uma imagem de MEV que ilustra a diferença de contraste nas NSs AgAu, o que comprova a característica oca da nanocasca.

A escolha deste material como suporte das lipases (*Burkholderia cepacia* e Pâncreas de porco) foi feita com base nas suas características estruturais e da sua composição química. As nanocascas de Ouro/Prata possuem maior área superficial que materiais constituídos por um único metal, isso porque durante o processo de formação deste nanomaterial o ouro é reduzido sobre a superfície da prata de forma irregular, causando rugosidades. Essas nanopartículas podem ainda apresentar a característica de sinergismo, ou seja, formando um material que possui características superiores a de um material formado por um de seus constituintes (ouro ou prata). Estas nanocascas podem ainda ser funcionalizadas com moléculas orgânicas bifuncionais, o que permite o estudo da funcionalização desta partícula e seus efeitos sobre a atividade da enzima imobilizada. Além disso, estas nanocascas são um material novo e que não foi explorado para este fim. Assim, a utilização deste material como suporte de enzimas é um estudo inédito.

3.3 Funcionalização das nanocascas de Au-Ag (NSs-funcionalizadas)

A funcionalização das NSs AgAu baseou-se no fato de que moléculas que contenham o grupo funcional tiol (H-S) ligam-se fortemente a materiais como ouro e prata. Esta ligação é descrita na literatura como uma ligação extremamente forte e que requer 126 kJ/mol para ser rompida, sendo então uma reação praticamente irreversível.⁵⁶ Com base nessas características, diferentes moléculas que continham este grupo foram escolhidas para a funcionalização das NSs AgAu, moléculas tais como cisteamina ($\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$), ácido mercapto acético (HSCH_2COOH), ácido mercapto propiônico ($\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) e ácido mercapto undecanóico ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$). As moléculas escolhidas para funcionalização além do grupo tiólico possuíam dois diferentes grupos funcionais diferentes, amina primária e ácido carboxílico, ambos escolhidos propositalmente. Quando temos nanocascas funcionalizadas com o grupo amina, esta para se ligar covalentemente a enzima, ainda precisam ser funcionalizadas com glutaraldeído (um processo que chamamos de ativação da nanopartícula funcionalizada). Quando trabalhamos com as nanocascas funcionalizadas com grupos carboxilas, esta para se ligar a enzima, precisam ser tratadas com EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e com isso transformar o grupo carboxila num éster reativo. A escolha de diferentes formas de funcionalização levou a diferentes ativações das NSs funcionalizadas, e com isso espera-se que as diferentes ativações das nanocascas afetem a atividade da enzima imobilizada (esse assunto foi discutido em um tópico à frente).

Outro fator estudado foi o tamanho dos espaçadores utilizados para funcionalização das NSs AgAu. Moléculas mercapto-alcanóicas com cadeias carbônicas de tamanhos diferentes foram utilizadas no processo de funcionalização para investigar

⁵⁶ Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*. **2010**, 368, 1333-1383.

se o distanciamento entre enzima e nanopartícula causaria alguma influência na atividade catalítica da lipase imobilizada. O tamanho das moléculas utilizadas como funcionalizadores, também chamadas de espaçadores, foi estimado utilizando o software ChemBio 3D Ultra versão 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA) seguido de uma minimização de energia MM2, como está representado na **Figura 4**.⁵⁷ Através deste software, por exemplo, podemos estimar o tamanho da molécula de cisteamina que apresentou um tamanho aproximado de 4,68 Å, enquanto as moléculas de ácido mercapto acético, ácido mercapto propiônico e ácido mercapto undecanóico apresentaram valores de 3,19 Å, 4,84 Å e 16,59 Å, respectivamente.

Figura 4: Moléculas usadas para funcionalizar as NSs AgAu.

⁵⁷ Cha, K.; Cho, K.; Kim, M.; Kim, J.; Park, H. J.; Park, J.; Cho, W.; Park, J. Enhancement of the dissolution rate and bioavailability of fenofibrate by a melt-adsorption method using supercritical carbon dioxide. *Int J Nanomedicine*. **2012**, 7, 5565-5575.

Assim, depois de escolhidas as moléculas que seriam utilizadas como espaçadores, partimos para processo de funcionalização das nanocascas. Para funcionalizar as NSs AgAu, aproximadamente 2,5-3 mg de nanopartículas foram colocadas para reagir com os funcionalizadores (0,05 mmol) em etanol a temperatura ambiente por 2h (**Esquema 4**). As nanocascas funcionalizadas com cisteamina foram chamadas de AgAu-CIS e as nanonascacas funcionalizadas com ácido mercapto acético, ácido mercapto propiônico e ácido mercapto undecanóico foram chamadas de AgAu-MAC, AgAu-PROP e AgAu-UND, respectivamente.

Condições: 2,5-3,0 mg de NSs AgAu, 0,05 mmol de cisteamina, ácido mercapto acético, ácido mercapto propiônico ou ácido mercapto undecanóico, etanol a temperatura ambiente.

Esquema 4: Processo para funcionalização das NSs AgAu.

A comprovação da funcionalização e formação deste novo material funcionalizado foi feita através de espectroscopia de FT-IR e o estudo da morfologia deste material, depois deste processo, foi acompanhado por imagens de TEM. Comparamos os espectros de FT-IR das nanocascas antes e depois do processo de funcionalização e assim pudemos comprovar a sua funcionalização (**Figura 5**).

No espectro de FT-IR das NSs AgAu notamos que há uma banda intensa na região de 3432 cm^{-1} referente aos estiramentos do grupo amina do PVP (pirrolidina

polivinilica) que é incorporado às nanopartículas para atuar como estabilizante das mesmas (**Figura 5 A**).

Ao analisarmos os espectros de FT-IR para as nanopartículas funcionalizadas pelas moléculas mercapto-alcanóicas (**AgAu-MAC**, **AgAu-PROP** e **AgAu-UND**), podemos notar bandas na região de $1648\text{--}1687\text{ cm}^{-1}$, referentes a absorção do grupo carbonila que sofre deformação axial. Bandas na Região de $3434\text{--}3435\text{ cm}^{-1}$, referentes a absorção dos grupos OH do ácido carboxílico, podemos também notar nestes espectros a ausência de uma banda em aproximadamente $2550\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$, que se refere a deformação axial do grupo tiol (S-H), esta ausência comprova a ligação do enxofre à nanopartícula, pois o enxofre não faz mais a ligação com o hidrogênio (S-H), e sim com nanocasca (S-nanocasca). A **Figura 5 C** refere-se ao espectro da NSs AgAu funcionalizada com o ácido mercapto acético, os outros espectros referente a nanocasca funcionalizada com os ácidos mercapto-alcanólicos encontram-se em **ANEXO**.

Figura 5: Espectro de FT-IR das NSs AgAu (A), AgAu-CIS (B) e AgAu-MAC (C), onde T equivale a Transmitância.

As nanopartículas mercapto-amino funcionalizadas (**AgAu-CIS**) em seu espectro de FT-IR apresentaram uma banda em 3435 cm^{-1} , característico do grupo -NH_2 da cisteamina além da ausência da banda S-H entre $2550\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$, comprovando também a funcionalização das nanopartículas (**Figura 5B**).

Depois de comprovada a funcionalização, nós então, partimos para a caracterização da morfologia deste novo material através de imagens de MET. Nosso objetivo neste caso era procurar saber se depois do processo de imobilização as nanocascas permaneciam intactas em sua aparência, ou seja, se não havia ocorrido destruição das nanocascas durante o processo de funcionalização. Pelas imagens de MET adquiridas dos sistemas **AgAu-CIS**, **AgAu-MAC**, **AgAu-PROP** e **AgAu-UND** (**Figuras 6**) vimos então que durante o processo de funcionalização não há perda das NSs AgAu, por eventual destruição das nanocascas e que elas depois deste processo permanecem intactas.

Figura 6: Imagens de MET das NSs AgAu Funcionalizadas; A - AgAu-CIS; B – AgAu-MAC; C – AgAu-PROP; D – AgAu-UND.

Depois de caracterizadas, as nanocascas funcionalizadas foram submetidas a outro processo para que fosse possível a imobilização das lipases, num processo que chamamos de ativação das NSs-funcionalizadas.

3.4 Ativação das nanocascas-funcionalizadas (NSs-funcionalizadas) para imobilização das lipases

As NSs-funcionalizadas (**AgAu-CIS**, **AgAu-MAC**, **AgAu-PROP** e **AgAu-UND**) precisaram passar por mais uma etapa para consequente imobilização das lipases. Este processo se fez necessário para que assim a enzima pudesse se ligar covalentemente às nanopartículas funcionalizadas. As nanopartículas funcionalizadas com o grupo carbóxi (**AgAu-MAC**, **AgAu-PROP** e **AgAu-UND**) foram funcionalizadas com EDC. O EDC foi aplicado para ativar o grupo carboxila do suporte, formando o intermediário O-acilisouréia. Este intermediário reage rapidamente com os grupos amino presentes na superfície da enzima, tendo como consequência a imobilização da mesma (através de uma ligação covalente).⁵⁸ Assim 2,5-3 mg de nanopartículas carboxi funcionalizadas foram submetidas a reação com EDC (5 mL de uma solução 2% v/v) em água, por 30 minutos no sonificador (**Esquema 5**). As nanocascas **AgAu-MAC**, **AgAu-PROP** e **AgAu-UND** foram nomeadas depois da ativação com EDC de **AgAu-MAC-EDC**, **AgAu-PROP-EDC** e **AgAu-UND-EDC** respectivamente.

⁵⁸ Hung, T. C.; Giridhar, R.; Chiou, S. H.; Wu, W. T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, 26, 69-78

Condições: 2,5-3 mg das nanocascas funcionalizadas com os ácidos mercapto alcanóicos, 5 mL de uma solução de EDC (2% v/v), temperatura ambiente, 30 min no sonicador.

Esquema 5: Processo para ativação da carboxila das nanocascas carbóxi funcionalizadas para imobilização das lipases de BCL e PPL.

As nanopartículas amino funcionalizadas (**AgAu-CIS**) precisaram ser ativadas com glutaraldeído para criar um sitio de ligação com a enzima (grupo carbonílico do aldeído), ou seja, criou-se um grupo passível de ligação com a enzima. Para esta funcionalização uma solução de glutaraldeído em água (25% v/v) foi adicionada as nanopartículas amino funcionalizadas. Essa mistura foi agitada a 28°C por 2h no *thermomixer*®, (**Esquema 6**). As **AgAu-CIS** ativadas com glutaraldeído foram nomeadas **AgAu-CIS-GLU**.

Condições: 2,5-3 mg da nanocascasfuncionalizada com cisteamina, 50 µL de uma solução de glutaraldeído (25% v/v), 28°C, 800 rpm.

Esquema 6: Esquema para funcionalização das nanocascas aminos funcionalizadas com glutaraldeído.

As nanopartículas funcionalizadas com glutaraldeído podem reagir com grupos amino dos aminoácidos presentes na superfície da enzima levando a iminas e a consequente imobilização covalente da enzima ao suporte.

Tanto as nanopartículas funcionalizadas com EDC (**AgAu-MAC-EDC**, **AgAu-PROP-EDC** e **AgAu-UND-EDC**) como as nanopartículas funcionalizadas com glutaraldeído (**AgAu-CIS-GLU**) puderam ser armazenadas a ~ 15°C. A funcionalização das nanopartículas de certa forma estabiliza as nanopartículas, aumentando o tempo de armazenamento à baixa temperatura.

3.5 Ensaaios Enzimáticos

3.5.1 Preparação das soluções aquosas de lipase de *Burkholderia cepacia* e pâncreas de porco

O processo de imobilização das lipases de *Burkholderia cepacia* e pâncreas de porco, sobre as nanocascas ativadas (**AgAu-CIS-GLU**, **AgAu-MAC-EDC**, **AgAu-PROP-EDC** e **AgAu-UND-EDC**), foi feita através da reação destas nanocascas com uma solução de lipase. A preparação das soluções de lipase foi feita da mesma maneira para as duas enzimas, onde 100 mg da enzima comercial foram adicionadas em um microtubo (*eppendorf*®) juntamente com uma solução tampão fosfato (20 mM) pH 7. A mistura foi agitada e o sobrenadante foi separado da parte sólida por centrifugação. A solução sobrenadante foi a solução enzimática utilizada no processo de imobilização.

A quantificação de proteínas nesta solução enzimática foi medida através do método de Bradford. Este estudo foi feito em triplicata e o processo para obtenção da solução enzimática está ilustrado na **Figura 7**.

Figura 7: Preparação das soluções proteicas usadas no processo de imobilização.

O uso de uma solução protéica e descarte do material insolúvel foi feito para evitar possíveis problemas durante o processo de imobilização da enzima na nanopartícula. Se utilizássemos uma solução proteica com sólidos, seria mais difícil separar os sólidos remanescentes das nanopartículas durante o processo de imobilização enzimática.

3.5.2 Imobilização das lipases (*Burkholderia cepacia* e *pâncreas de porco*) nas nanopartículas de Au-Ag

A solução protéica das duas diferentes lipases foi utilizada no processo de imobilização da lipase nas nanopartículas funcionalizadas (**AgAu-CIS-GLU**, **AgAu-MAC-EDC**, **AgAu-PROP-EDC** e **AgAu-UND-EDC**). Em nosso estudo, foi utilizado o método de imobilização através da ligação covalente da enzima ao suporte, ou seja, grupos presentes na superfície da enzima reagiram com grupos presentes na superfície da nanocasca funcionalizada e ativada para formar uma ligação covalente.

As nanopartículas funcionalizadas e ativadas (**seção 3.4**) foram tratadas com uma solução de 1 mL da referente lipase (BCL (0,55 mg/mL); PPL (0,52 mg/mL))

preparadas segundo **seção 3.5.1**. Um esquema representativo do processo de imobilização da lipase segue abaixo (**Esquema 7**).

Esquema 7: Imobilização das lipases de pâncreas de porco e *Burkholderia cepacia* nas nanopartículas funcionalizadas com glutaraldeído ou carbodiimida.

A imobilização covalente da enzima na nanopartícula foi escolhida, pois relatos na literatura mostram que imobilizações da enzima por este tipo de ligação não causam alterações na conformação nativa da enzima e que este tipo de imobilização dá uma maior rigidez a enzima em diferentes solventes.⁵⁹

A imobilização covalente da lipase nas nanocascas funcionalizadas com EDC ocorre através de uma reação de substituição nucleofílica. Grupos NH_2 presentes na superfície da enzima promovem o ataque à carbonila do éster da nanopartícula ativada. Devido a deslocalização dos elétrons da carbonila do éster, ocorre a eliminação do dimetilpropanoamina 3-(3-etiluréia) (grupo de saída) formando uma amida no processo de imobilização, como mostrado no **Esquema 8**.

⁵⁹ 56 Zhu, X.; Zhou, T.; Wu, X.; Cai, Y.; Yao, D.; Xie, C.; Liu, D. Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, 72, 145–149.

Esquema 8. Mecanismo para imobilização das lipases nas NSs AgAu ativadas com EDC.

A imobilização covalente da lipase nas nanocascas funcionalizadas com glutaraldeído ocorreu através do ataque de grupos NH_2 presentes na superfície da enzima à carbonila do aldeído da nanocasca ativada com consequente eliminação de água, formando uma base de Schiff, como ilustrado no **Esquema 9**.

Esquema 9. Mecanismo para imobilização das lipases nas NSs AgAu ativadas com glutaraldeído.

Os sistemas que tiveram as lipases imobilizadas foram nomeados de **AgAu-CIS-GLU-BCL**, **AgAu-MAC-BCL**, **AgAu-PROP-BCL** e **AgAu-UND-BCL**, quando a lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) foi imobilizada sobre as nanocascas ativadas.

Quando a lipase de pâncreas de porco foi imobilizada sobre as nanocascas ativas, os sistemas resultantes foram nomeados de **AgAu-CIS-PPL**, **AgAu-MAC-PPL**, **AgAu-PROP-PPL** e **AgAu-UND-PPL**. Abaixo segue uma figura mostrando cada nanopartícula funcionalizada contendo a enzima imobilizada e os códigos que as representaram (**Figura 8**).

Figura 8: Figura representativa, contendo os suportes funcionalizados onde as enzimas foram imobilizadas e seus códigos.

3.5.3 Quantificação de enzimas livres e imobilizadas

3.5.3.1 Método de Bradford

Como citado acima, a quantificação das proteínas e a determinação da quantidade de enzima imobilizada foi determinada pelo método de Bradford.⁶⁰

Este ensaio baseia-se na utilização de um corante (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), no qual a proteína se liga e altera as propriedades de absorção de luz do corante. A adição de proteína a este corante resulta em uma mudança do máximo de absorção do corante de 465 nm para a região de 595 nm. Com o aumento da concentração de

⁶⁰ Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry*. **1976**, 72, 248–254.

proteína, a absorvância de luz a 595 nm aumenta linearmente. Este aumento de absorvância pode ser medida com ajuda de um espectrofotômetro UV-VIS.

Para quantificar a proteína em uma amostra utilizando este método é necessário antes, fazer uma curva de calibração utilizando como padrão uma solução da albumina soro bovino (SBA) com concentração conhecida, neste caso utilizamos uma solução 20 mg/mL de SBA. Esta solução foi então diluída para os valores de 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,1 mg/mL e 1,2 mg/mL utilizando uma solução de tampão fosfato pH 7. A estas soluções foram então adicionados o reagente de Bradford e a absorvância da solução resultante foi medida a 595 nm. Uma solução controle (Branco) foi preparada com tampão fosfato e reagente de Bradford e seu valor de absorvância foi utilizado nos cálculos com a enzima. Assim com estes dados, foi plotado o **Gráfico 1**, onde estão representado os valores de absorvância a 595 nm *versus* concentração proteica.

Gráfico 1: Curva analítica da albumina do soro bovino em diversas concentrações.

Pelo gráfico obtido foi possível então através da curva de calibração calcular a quantidade de enzimas presentes nas soluções feitas previamente da lipase BCL e PPL em mg/mL.

3.5.3.2 Quantificação das enzimas imobilizadas

A quantificação da lipase imobilizada nas nanocascas foi feita através da diferença da medida da quantidade protéica entre a solução inicial utilizada no processo de imobilização e a resultante, removida após separação das nanopartículas depois do processo de imobilização. A figura abaixo ilustra o esquema que foi utilizado (**Figura 9**).

Figura 9: Esquema utilizado para quantificação da enzima imobilizada.

No processo de imobilização das duas diferentes lipases nas AgAu-Funcionalizadas, inicialmente foram utilizados dois diferentes tempos afim de estudar esta variável, quantidade de enzima imobilizada *versus* tempo reacional. Assim os tempos reacionais de uma e duas horas foram estudados, a **Tabela 1** contém os resultados obtidos para este estudo.

Tabela 1. Quantidade de lipase imobilizada sobre as NSs AuAg usando diferentes tempos reacionais.

AgAu- funcionalizadas	Quantidade de lipase imobilizada (mg)			
	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	Pâncreas de	Pâncreas de
	(1h)	(2h)	porco (1h)	porco (2h)
AgAu-CIS-GLU	0,275	0,282	0,035	0,042
AgAu-MAC	0,278	0,275	0,035	0,038
AgAu-MAP	0,152	0,155	0,037	0,035
AgAu-UND	0,190	0,186	0,050	0,048

Ao analisarmos os dados da **Tabela 1**, vimos que no processo de imobilização da BCL o sistema AgAu-CIS-GLU, foi o sistema que conseguiu imobilizar uma maior quantidade de lipase apresentando um valor de 0,282 mg de enzima/suporte num tempo de 2 horas. Para os sistemas onde temos a BCL imobilizada nas nanocascas funcionalizadas a quantidade de lipase imobilizada variou de 0,282-0,152 mg de enzima por suporte em reações de 1 e 2 horas. No processo de imobilização da PPL nas nanocascas funcionalizada o sistema AgAu-UND, foi o sistema que conseguiu imobilizar uma maior quantidade de enzima (0,050 mg/suporte) em um tempo de 1 hora de reação. A quantidade de PPL imobilizada nas nanocascas funcionalizadas variou de 0,035-0,050 mg de enzima por suporte em reações de 1 e 2 horas.

Ao analisarmos os resultados para imobilização da lipase no tempo de uma e duas horas, para as duas enzimas, vimos que a diferença de enzima imobilizada para estes diferentes tempos foi pequena, assim resolvemos adotar o tempo de uma hora no processo de imobilização.

3.5.3.3 *Quantificação da enzima livre*

Quando imobilizamos a enzima e testamos sua atividade, nós precisávamos comparar estes resultados obtidos com atividade da mesma quantidade de enzima livre, isso com objetivo de observar se a atividade catalítica da enzima imobilizada é alterada depois da imobilização e de evidenciar se houve alguma melhora na atividade e estabilidade da enzima.

Dessa forma, decidiu-se preparar uma quantidade de enzima livre equivalente à quantidade imobilizada e submetê-las ao mesmo teste de atividade realizado com as enzimas imobilizadas.

Para a preparação da enzima livre, inicialmente foi feita uma solução enzimática igual aquela utilizada para imobilização das lipases (mesma concentração e volume (1 mL); BCL 0,55 mg/mL; PPL 0,45 mg/mL) esta solução foi então submetida a liofilização. Nós escolhemos trabalhar com a solução enzimática, pois na solução estão as mesmas enzimas utilizadas no processo de imobilização.

Em posse das lipases liofilizadas essas foram pesada, chegando ao um peso de 9 mg para BCL e 8,7 mg para PPL. Assim concluímos que em uma solução de 1 mL das lipases, estas continham uma massa de 9 e 8,7 mg para BCL e PPL, respectivamente.

A quantidade de enzima livre utilizada para as duas lipases foi igual aos maiores valores conseguidos para imobilização enzimática das lipases nas NSs AgAu, ou seja, 0,278 mg para BCL e 0,050 mg para PPL. Os cálculos feitos seguiram o modelo representado na figura abaixo (**Figura 10**), onde temos o cálculo feito para a quantidade de BCL livre.

Figura 10: Representação do calculo utilizado para quantificação da enzima livre utilizada em nossos estudos.

Seguindo estes cálculos o valor de PPL livre que utilizamos foi de 1 mg, este valor equivale a quantidade de 0,050 mg de enzima na solução enzimática e para BCL valor utilizado foi de 4,5 mg, como representado na **Figura 10**.

3.6 Caracterização dos sistemas NSs AgAu-Lipase

A comprovação da imobilização das lipases nas NSs AgAu, além de feitas por Método de Bradford e estudo da atividade catalítica das lipases (estudo que será mostrado adiante) também foi feito através de espectros de FT-IR e imagens de MET.

3.6.1 Caracterização da imobilização das lipases nas NSs AgAu por FT-IR

Como uma análise complementar, as diferentes nanocascas funcionalizadas contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada foram submetidas à análise de FT-IR e seus espectros foram comparados com os espectros de FT-ITR das nanocascas funcionalizadas, afim se ajudar na comprovação da imobilização das lipases.

Abaixo seguem os espectros da AgAu-CIS e AgAu-CIS-BCL **Figura 11**, e AgAu-MAC e AgAu-MAC-BCL **Figura 12**.

Figura 11: Espectro de FT-IR da AgAu-CIS (preto) e AgAu-CIS-BCL (vermelho).

Na **Figura 11**, pelo espectro da FT-IR do sistema **AgAu-CIS**, representado pela cor preto, podemos ver uma banda na região de 1508 cm⁻¹ que pode ser referida a absorção de amins alifáticas. Depois do processo de imobilização esse grupo é transformado em uma imina e pelo espectro de FT-IR representado pela cor vermelha, referido ao sistema **AgAu-CIS-BCL**, podemos ver uma banda em 1630 cm⁻¹ que pode estar relacionada a absorção deste grupo funcional.

Figura 12: Espectro de FT-IR da AgAu-MAC (preto) e AgAu-MAC-BCL (vermelho).

Na **Figura 12**, pelo espectro da FT-IR do sistema **AgAu-MAC**, representado pela cor preto, podemos ver uma banda na região de 1687 cm^{-1} que pode ser referida a absorção da carbonila do ácido carboxílico, presentes nas nanopartículas funcionalizadas com ácido mercapto-alcanóico. Depois do processo de imobilização da lipase esse grupo funcional é transformado em uma amida, e pelo espectro de FT-IR representado pela cor vermelha, referido ao sistema AgAu-MAC-BCL, podemos ver uma banda em 1636 cm^{-1} que pode ser correlacionada absorção deste grupo. Devido à transformação do grupo funcional ácido carboxílico para uma amida ocorre o deslocamento da banda da carbonila de 1697 para 1636 cm^{-1} .

Os outros espectros referentes às nanocascas funcionalizadas contendo a BCL imobilizada encontram-se no **ANEXO**.

Nos espectros ilustrados acima é possível notar que depois do processo de imobilização ocorre uma diminuição na transmitância dos espectros, que pode estar correlacionado com um aumento da absorbância, que por sua vez pode estar relacionado com aumento da massa orgânica presente na superfície da nanocasca, consequência da imobilização da lipase na partícula. Este resultado ajudaria a comprovar a imobilização da BCL nas NSs-funcionalizadas.

3.6.2 Caracterização da imobilização das lipases nas NSs AgAu por imagens de MET

Outra análise complementar, imagens de MET, foram feitas para ajudar na comprovação da imobilização das lipases nas NSs AgAu (**Figura 13**).

Os sistemas analisados neste caso foram **AgAu-CIS-BCL**, **AgAu-MAC-BCL**, **AgAu-PROP-BCL**, **AgAu-UND-BCL**, **AgAu-CIS-PPL**, **AgAu-MAC-PPL**, **AgAu-PROP-PPL** e **AgAu-UND-PPL**. As imagens destes sistemas foram comparadas com as respectivas imagens da NSs-funcionalizadas.

Figura 13. (A-D) Imagens de MET das NSs-Funcionalizadas: (A) AgAu-CIS; (B) AgAu - MAC; (C) AgAu-PROP; e (D) AgAu-UND. (E-L) Imagens de MET das NSs-funcionalizadas depois do processo de imobilização da enzima: (E) AgAu-CIS-GLU-BCL; (F) AgAu-MAC-BCL; (G) AgAu-PROP-BCL; (H) AgAu-UND-BCL; (I) AgAu-CIS-GLU-PPL; (J) AgAu - MAC-PPL; (K) AgAu-PROP-PPL; e (L) AgAu -UND-PPL.

Através das imagens de MET das nanocascas contendo a enzima imobilizada foi possível por comparação com imagens das NSs-funcionalizadas visualizar uma nova característica. Percebemos que as nanocascas onde foram imobilizadas as enzimas apresentaram em sua superfície uma pequena rugosidade, que pode estar relacionado

com a imobilização da lipase. Este tipo de observação já foi citado por diversos autores na literatura.⁶¹

Através das imagens de MET destes sistemas nós também comprovamos que depois do processo de imobilização das lipases a estrutura das nanocascas permanece a mesma.

3.7 Teste da atividade enzimática das lipases imobilizadas

3.7.1 Teste da acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisado pelas lipases livres e imobilizadas

O teste para avaliar a atividade das lipases via reação de acetilação enantiosseletiva, tanto da BCL quanto da PPL, imobilizadas e livres, foi realizado. O (*R,S*)-1-feniletanol foi utilizado como substrato nas reações de acetilação enantiosseletiva com acetato de vinila em tolueno a 32°C, e a lipase (imobilizada e livre) foi utilizada como catalisador enzimático (**Esquema 10**).

Condições: (*R,S*)-1-feniletanol (0,002 mmol), acetato de vinila (0,07 mmol), 1 mL de tolueno, enzima imobilizada, 32°C, 800 rpm.

Esquema 10: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol pela BCL ou PPL imobilizada.

⁶¹ Ren, Y.; Rivera, J. G.; Lihong, H.; Kulkarni, H.; Lee, D.; Messersmith, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnology*, **2011**, *11*, 1-8.

Esta reação foi escolhida, pois alcoóis secundários são de extrema importância para a indústria farmacêutica, por exemplo, sendo utilizado como intermediário em diversos processos sintéticos. Escolhemos testar esta reação em solvente orgânico, porque normalmente processos sintéticos adotam este tipo de solvente e ao utilizar este tipo de solvente nós poderíamos testar a estabilidade da lipase imobilizada neste tipo de condição reacional.

A reação de acetilação enantiosseletiva foi acompanhada por CG-FID. Pelas análises obtidas no CG-FID, nos conseguimos acompanhar o tempo total para conversão do substrato (*R*)-1-feniletanol à sua forma acetilada, catalisado pelas enzimas imobilizadas nas diferentes nanocascas funcionalizadas. Também conseguimos acompanhar o tempo total da conversão deste mesmo substrato à sua forma acetilada, quando a enzima livre foi utilizada como catalisador.

Os resultados obtidos pela imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* nas NSs AgAu funcionalizadas, estão representados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol catalisado pela lipase de *B. cepacia* livre e imobilizada^a

Entrada	AgAu-lipase	e.e.s ^b	e.e.p ^c	Conv. ^d	Tempo	<i>E</i> ^e
1	AgAu-CIS-BCL	> 99%	> 99%	50%	6 h	>200
2	AgAu-MAC-BCL	> 99%	> 99%	50%	6 h	>200
3	AgAu-PROP-BCL	> 99%	> 99%	50%	12 h	>200
4	AgAu-UND-BCL	> 99%	> 99%	50%	12 h	>200
5	BCL livre	13,7 %	> 99%	12 %	6 h	>200

^aCondições reacionais: (*R,S*)-1-feniletanol (0,002 mmol), lipase, acetato de vinila (0,07 mmol), tolueno (1 mL), 32°C e 800 rpm.

^b e.e.s = Excesso enantiomérico do substrato foi determinado por análise de CG.

^c e.e.p = Excesso enantiomérico do produto foi determinado por análise de CG.

^dConv.= conversão = e.e.s/(e.e.s + e.e.p).

^e $E = \{\ln[e.e.p(1 - e.e.s)] / (e.e.p + e.e.s)\} / \{\ln[e.e.p(1 + e.e.s)] / (e.e.p + e.e.s)\}$.

Como podemos ver, a tabela acima ilustra tempos de conversão para a reação de acetilação de 6 e 12 horas, nós escolhemos expor estes tempos pois são os tempos em que as enzimas imobilizadas convertem totalmente o substrato *R* à sua forma acetilada (50%). Escolhemos na **Tabela 2**, detalhar o resultado obtido em 6 horas para o processo que envolve a enzima livre, pois assim poderíamos comparar este valor com o nosso melhor resultado, quando utilizamos a enzima imobilizada.

Assim pelos resultados obtidos e demonstrados na **Tabela 2**, vimos que, o sistema AgAu-CIS-BCL, por exemplo, foi capaz de catalisar a transformação do enantiômero (*R*)-1-feniletanol ao acetato de (*R*)-1-feniletila em 6 horas (**Tabela 2**

entrada 1), enquanto que para BCL livre, neste mesmo tempo obteve-se apenas 12% de conversão (**Table 2, entrada 5**). Pela comparação destes resultados vimos que a BCL imobilizada é capaz de promover a conversão do substrato mais rápido que a BCL livre. Podemos observar também na **Tabela 2** que todos os sistemas contendo a enzima imobilizada conseguiram converter totalmente o substrato *R* à sua forma acetilada e que eles conseguiram promover esta conversão mais rápido que a BCL livre. Os sistemas AgAu-PROP-BCL e AgAu-UND-BCL, completaram a acetilação enantiosseletiva em 12 horas enquanto a enzima livre neste mesmo tempo havia convertido 44% do substrato.

Todos os resultados para acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol revelam que as enzimas imobilizadas nas diferentes NSs-funcionalizadas apresentaram valores melhores de atividade enzimática do que a enzima livre. Uma explicação para isto pode estar relacionada com o fato de que a imobilização da BCL pode promover uma maior rigidez na enzima levando a uma melhora atividade enzimática, resultando em uma maior estabilidade da enzima em solventes orgânicos. Este comportamento tem sido observado em várias enzimas imobilizadas. Como vários substratos para as reações enzimáticas são altamente solúveis em solvente orgânico, o método de imobilização também tem sido utilizado para assegurar a aplicação de reações enzimáticas em síntese orgânica.⁶²

Dentre os sistemas onde temos a BCL imobilizada, a principal diferença que pode ser observada entre estes sistemas é a velocidade de conversão do substrato. Como mostrado anteriormente, foram utilizados moléculas de diferentes tamanhos para funcionalizar as NSs AgAu, depois estas foram ativadas, tiveram a lipase de BCL

⁶² Haouz A.; Glandieres J. M.; Alpert B. Involvement of protein dynamics in enzyme stability: The case of glucose oxidase. *FEBS Lett.* **2001**, 506, 216-220.

imobilizada e esta teve sua atividade testada. O observado foi que, quando a BCL estava ligada à NSs AgAu funcionalizadas com moléculas mercapto-alcanóicas contendo cadeias de carbono curtas, a lipase foi capaz de converter o substrato mais rápido do que quando BCL estava ligada a nanocasca funcionalizadas por um espaçador maior. Neste caso, a imobilização da lipase de *B. cepacia* em NSs AgAu funcionalizadas utilizando espaçadores menores podem proporcionar maior rigidez a enzima levando a uma maior estabilidade num solvente orgânico, o que poderia explicar as vantagens obtidas na conversão do substrato pela enzima imobilizada.

Outro ponto a ser discutido foram os resultados obtidos na RCE pela BCL imobilizada nas nanocascas com diferentes ativações (AgAu-CIS-GLU e AgAu-MAC-EDC). Os sistemas funcionalizados com grupos amino tiveram que ser ativados com glutaraldeído e os sistemas funcionalizados com grupos carboxi foram ativados com EDC isso para que assim a nanopartícula funcionalizada pudesse reagir com a BCL. Ao comparar os resultados obtidos no teste de atividade para os sistemas AgAu-CIS-BCL e AgAu-MAC-BCL, vimos que estes precisaram de 6 horas reacionais para promover a catálise enzimática, ou seja, obtiveram resultados iguais, assim concluímos que os diferentes métodos utilizados na ativação das NSs-funcionalizadas não influenciaram na atividade catalítica da enzima imobilizada.

Sobre os testes com a PPL imobilizada, os resultados para catálise enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol seguem abaixo. Nós escolhemos utilizar esta lipase, pois esta não é um bom catalisador para o tipo de reação utilizada no teste de atividade, assim nosso objetivo foi observar uma possível melhora na atividade catalítica deste catalisador.

Observando a **Tabela 3**, vimos que a PPL livre não era um bom catalisador para RCE, pois nenhuma atividade para esta reação foi observada, mesmo com o tempo de reação longo, 72h (**Tabela 3, entrada 5**).

Tabela 3: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol catalisado pela lipase de pâncreas de porco livre e imobilizada.

Entrada	AgAu-lipase	e.e.s ^b	e.e.p ^c	Conv. ^d	Tempo	<i>E</i> ^e
1	AgAu-CIS-GLU-PPL	-	> 99%	1%	72 h	-
2	AgAu-MAC-PPL	-	-	-	72 h	-
3	AgAu-PROP-PPL	-	> 99%	0,5%	72 h	-
4	AgAu-UND-PPL	4%	> 99%	4%	72 h	207
5	PPL Livre	-	-	-	72 h	-

^aCondições reacionais: (*R,S*)-1-feniletanol (0,002 mmol), lipase, acetato de vinila (0,07 mmol), tolueno (1 mL), 32°C e 800 rpm.

^b e.e.s = Excesso enantiomérico do substrato foi determinado por análise de CG.

^c e.e.p = Excesso enantiomérico do produto foi determinado por análise de CG.

^dConv.= conversão = e.e.s/(e.e.s + e.e.p).

^e $E = \{\ln[e.e.p(1-e.e.s)]/(e.e.p + e.e.s)\} / \{\ln[e.e.p(1 + e.e.s)]/(e.e.p + e.e.s)\}$.

Nos estudos iniciais com PPL imobilizada nas nanocascas funcionalizadas diferentes condições reacionais foram testadas. Diferentes tempos reacionais para resolução cinética foram testados, como 24 e 48 horas, mas não foi observado conversão do substrato. Temperaturas, tais como 40 °C e 28 °C foram testados, mas nenhuma conversão foi observada. Entretanto, quando a PPL imobilizada foi avaliada por 72 horas (32° C, 800 rpm), uma pequena formação produto foi observada. Os

resultados apresentados pela PPL imobilizada, com estas condições reacionais estão representados na **Tabela 3**, onde podemos observar a formação do produto desejado catalisado por alguns dos sistemas contendo a PPL imobilizada (4% , **Tabela 3** , **entrada 4**).

Apesar de valores baixos demonstrados na **Tabela 3**, a PPL imobilizada em três diferentes NSs-funcionalizadas demonstraram alguma atividade, sendo seletivas, mostrando que a imobilização da lipase foi uma boa alternativa para melhorar a atividade desta enzima. Como enzimas são polímeros orgânicos, o ambiente no qual elas podem ser mantidas tal como a presença de solventes orgânicos, diferentes pHs, temperaturas e até mesmo ligada a um suporte, isso tudo é muito importante para atividade enzimática. Esses fatores externos podem causar pequenas modificações estruturais na enzima, que podem fornecer para o sítio ativo da enzima a posição certa para agir como catalisador da reação desejada.

Outra fato observado neste estudo, foi que para todos os sistemas onde temos as lipase de BCL e PPL imobilizada sobre as NSs AgAu, estas mantiveram sua seletividade intacta, ou seja depois do processo de imobilização a lipase que tinha preferência em reagir com o enantiomero *R* do substrato utilizado, continuou a converter este mesmo substrato com uma eficiência maior que a enzima livre.

3.7.2 Teste da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada pela lipase de BCL

O teste da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* livre e imobilizada foi realizado, este estudo foi feito, pois queríamos comparar estes resultados de atividade com os obtidos na acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol. Essa reação foi utilizada para verificar atividade

da BCL livre e imobilizada num sistema conhecido na literatura para medida de atividade de lipases.

Esse teste avalia a concentração do *p*-nitrofenolato (*p*-NP, coloração amarela), por um espectrofotômetro UV-VIS (410 nm), formado a partir da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisado pela lipase em solvente orgânico (**Esquema 11**). O nucleófilo desta reação é resultante da própria enzima, ou seja, da água presente no interior do próprio catalisador.

Esquema 11: Hidrólise do *p*-NPP catalisada pela lipase livre e imobilizada

O *p*-NPP utilizado neste estudo foi sintetizado a partir da reação do ácido palmítico com o *p*-nitrofenol, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) catalítico em diclorometano seco (**Esquema 12**).

Esquema 12: Síntese do palmitato de *p*-nitrofenila

A síntese do *p*-NPP foi comprovada através de RMN de ^1H e os dados foram comparados com os da literatura.⁶³

Para a quantificação do *p*-NP formado nos testes de hidrólise catalisada pela enzima é necessário a preparação de uma curva calibração de absorbância *versus* concentração do *p*-NP. Esta curva forneceu o coeficiente de extinção molar ou absortividade molar (ϵ) que é necessário para o cálculo da concentração de *p*-NP produzido no meio através da equação de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$).

A curva de calibração foi feita a partir de seis diferentes concentrações de *p*-nitrofenol (*p*-NP) em uma solução de 0,1 mol/L de NaOH (**Figura 14**).

Figura 14: Gráfico de Abs. *versus* concentração do *p*-NP para determinação do ϵ .

A absortividade molar do *p*-nitrofenol pode ser determinado pela tangente ($\text{tg}\theta$) da equação da reta. Neste caso o valor encontrado foi de $\epsilon = 1,1048\text{E}4 \text{ L/mol.cm}$, que foi próximo ao apresentado na literatura.

Em posse do valor de absortividade molar, podemos então calcular a atividade enzimática (U) das reações catalisadas pela BCL livre e da BCL imobilizada nas NSs

⁶³ Qian, L.; Liu, J.; Liu, J.; Yu, H.; Li, C.; Xu, J. Fingerprint lipolytic enzymes with chromogenic *p*-nitrophenyl esters of structurally diverse carboxylic acids. *J.Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, 73, 22–26

AgAu (**AgAu-CIS-BCL**, **AgAu-MAC-BCL**, **AgAu-PROP-BCL**, **AgAu-UND-BCL**).

Para a medida de U da BCL livre (~ 4,5 mg), a enzima seca foi adicionada em 1 mL de uma solução de *p*-NPP (10 mM) em heptano e deixado reagir por 10 minutos a 32°C, 850 rpm no *Termomixer*®. Para a lipase imobilizada nas NSs AgAu, cada um dos sistemas foi adicionados a 1 mL de uma solução de *p*-NPP (10 mM) em heptano e deixado reagir por 10 minutos a 32°C, 850 rpm no *Termomixer*®.

Depois de transcorrido 10 minutos uma alíquota de 50 µL foi removida das reações e adicionada em Microtubos (*eppendorf*®) contendo 1 mL da solução de NaOH 0,1 mol/L. A solução resultante foi então agitada e adicionada a uma cubeta de 1 mL e a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS foi realizada (410 nm). Os valores lidos foram então comparados com os resultados obtidos na curva de calibração do *p*-nitrofenolato *versus* absorbância.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de lipase requerida para produzir 1 µmol de *p*-NP por minuto.

Os valores apresentados para atividade enzimática foram, BCL Livre 0,25 U/mg, **AgAu-CIS-BCL** 0,36 U/mg, **AgAu-MAC-BCL** 0,37 U/mg, **AgAu-PROP-BCL** 0,50 U/Mg e **AgAu-UND-BCL** 0,51 U/mg.

Dentre os sistemas avaliados, o **AgAu-PROP-BCL** e **AgAu-UND-BCL** foram os que apresentaram maiores valores de atividade enzimática, enquanto os outros dois sistemas tendo a enzima imobilizada apresentaram valores menores, o contrário do observado no teste de acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol. Sem dúvida, essa diferença de atividade apresentada pela BCL imobilizada nas diferentes nanocascas funcionalizadas esta relacionada com os diferentes tipos de reações e substratos a qual ela é submetida. Dependendo do substrato ou reação (hidrólise ou acetilação) a lipase

imobilizada atuará na catalise de forma diferente podendo apresentar diferentes resultados de seletividade e atividade. Pelos resultados vimos também que mesmo mudando a forma de determinação da atividade enzimática os sistemas onde temos a enzima imobilizada, estes foram mais ativos do que a enzima livre.

3.8 Análise cromatográfica da atividade enzimática da PPL e BCL imobilizada

As reações de acetilação enantiosseletiva catalisadas pelas lipases de BCL e PPL livre e imobilizada foram analisadas utilizando cromatografia a gás, com coluna de fase estacionária quiral. Dessa forma, inicialmente foram obtidos os cromatogramas dos padrões ((*R*)-1-feniletanol, (*S*)-1-feniletanol, acetato de (*R*)-1-feniletila e acetato de (*S*)-1-feniletila (**Figura 15 e 16**).

Figura 15: Cromatograma obtido pelo CG-FID do (*R,S*)-1-feniletanol.

Através do cromatograma do composto (*R,S*)-1-feniletanol (**Figura 15**), foi possível determinar o tempo de retenção dos enantiômeros *R* e *S* do 1-feniletanol, 5,41 min (*R*) e 6,40 min (*S*), respectivamente. Além disso, o cromatograma do acetato de (*R,S*)-1-feniletila revelou o tempo de retenção dos compostos acetilados, que foram de 4,35 min para o enantiômero *R* e 3,76 min para o enantiômero *S* (**Figura 16**).

Figura 16: Cromatograma obtido pelo CG-FID do (R,S) acetato de 1-feniletila.

Após essa etapa de identificação dos enantiômeros (padrões), partiu-se para o estudo comparativo destes cromatogramas com os coletados das reações de acetilação enantiosseletiva catalisado pelas lipases. Abaixo segue, a título de exemplo, o cromatograma de uma reação de acetilação enantiosseletiva do (R,S)-1-feniletanol catalisada pela BCL imobilizada (AgAu-CIS-BCL) a 32°C em 6 horas (**Figura 17**).

Figura 17: Cromatograma referente a reação enantiosseletiva do (R,S)-1-feniletanol catalisada pelo sistema AgAu-CIS-BCL.

Neste cromatograma pode ser observado, que transcorrido as 6 horas reacionais, o sinal referente ao (R)-1-feniletanol (~5,7 min.) desaparece e há o surgimento de um sinal em 4,1 min. referente ao (R)-acetato de 1-feniletila. Para todos os outros sistemas onde tínhamos a BCL imobilizada (**AgAu-MAC-BCL**, **AgAu-PROP-BCL** e **AgAu-**

UND-BCL), os resultados foram semelhantes aos apresentados pelo sistema **AgAu-CIS-BCL**.

Com os testes para a PPL, nós iniciamos as análises cromatográficas pela análise da reação de acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol catalisada pela PPL livre á 32°C e 800 rpm, **Figura 18**.

Figura 18: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pela enzima PPL em 72h.

Através deste análise cromatográfica via CG-FID, nós confirmamos que a PPL livre não era um bom catalisador para o tipo de reação a qual ela foi submetida, pois ela não foi capaz de catalisar a acetilação do substrato *R* do feniletanol. No cromatograma observamos os dois enantiômeros do 1-feniletanol inalterados. Por outro lado, quando submetemos os sistemas contendo a PPL imobilizada (**AgAu-CIS-PPL**, **AgAu-MAC-PPL**, **AgAu-PROP-PPL** e **AgAu-UND-PPL**) a RCE, diferentes resultados daqueles apresentados pela PPL livre foram observados, (**Figuras 19-22**).

Figura 19: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pelo sistema **AgAu-CIS-PPL** em 72h.

Figura 20: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pelo sistema AgAu-MAC-PPL em 72h.

Figura 21: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pelo sistema AgAu-PROP-PPL em 72h.

Figura 22: Resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pelo sistema AgAu-UND-PPL em 72h.

Para a RC utilizando o sistema AgAu-CIS-PPL, em uma reação de 72 horas em 32°C e 800 rpm, observamos que houve a conversão mínima (1%) do enantiômero (*R*)-1-feniletanol para sua forma acetilada (**Figura 19**). O sistema AgAu-MAC-PPL mostrou uma conversão bastante baixa, assim como sistema AuAg-PROP-PPL (**Figuras 20 e 21**). O sistema AgAu-UND-BCL, foi o que apresentou melhor resultado

frente a resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila, mostrando uma conversão de 4% (**Figura 22**).

Os cromatogramas mostram que a PPL imobilizada, quando empregada à resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila em um tempo reacional de 72 horas, apresentou baixas conversões do substrato, mas com enantiosseletividade excelentes. Comparando estes resultados com os obtidos para a enzima livre que não apresentou nenhuma atividade, podemos considerar que a imobilização da enzima foi uma ótima estratégia para melhorar a atividade enzimática, pois a enzima livre não apresentava nenhuma atividade e depois da imobilização, apesar de baixa a PPL, apresentou alguma atividade.

3.9 Estudo cinético da BCL imobilizada

O acompanhamento da resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol pela *Burkholderia cepacia* imobilizada nas diferentes nanocascas funcionalizadas foi realizado a cada 2 horas e comparado com a enzima livre (**Gráfico 2**).

Gráfico 2: Acompanhamento cinético da resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol catalisada pela BCL livre e imobilizada nas nanopartículas funcionalizadas.

Pelo **Gráfico 2**, observamos que todos os sistemas onde a enzima foi imobilizada, esta catalisou a reação do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila mais rápido que a enzima livre. Observamos também que nas primeiras 6 horas de reação para enzima imobilizada a conversão foi alta, quando comparada com a enzima livre, atingindo quase o máximo de conversão para todos os sistemas.

Nas primeiras 2 horas de reação vimos que os sistemas **AgAu-CIS-BCL**, **AgAu-MAC-BCL** e **AgAu-UND-BCL** atingiram altos valores de conversão do substrato, quanto comparado com enzima livre, 28%, 33% e 32%, respectivamente, enquanto a enzima livre em 2 horas converteu 2% do substrato. Quando a reação atingiu 4 horas os sistemas **AgAu-CIS-BCL** e **AgAu-UND-BCL** atingiram valores de conversão de 44% e 43% enquanto que a conversão do sistema **AgAu-MAC-BCL** foi de 35% apresentando uma velocidade de conversão menor comparada as duas primeiros neste tempo reacional.

Após 6 horas de reação, os sistemas **AgAu-CIS-BCL**, **AgAu-MAC-BCL** e **AgAu-UND-BCL**, já haviam convertido quase todo o substrato na sua forma acetilada.

O sistema **AuAg-PROP-BCL**, dentre os sistemas da imobilização enzimática, foi o que teve uma menor velocidade de conversão do substrato.

3.10 Reciclagem da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada.

A reciclagem da BCL imobilizada foi explorada e utilizamos para este estudo as mesmas condições reacionais utilizadas na RCE. Todos os sistemas em que a enzima foi imobilizada foram reutilizados pelo menos três vezes. Os resultados desta reciclagem estão representados nos gráficos abaixo, **Gráfico 3**.

Gráfico 3: Reciclagem da BCL imobilizada. A atividade da lipase foi calculada para o máximo de conversão na RC (50%).

Observando os resultados para o reuso dos catalisadores vemos que os sistemas **AgAu-CIS-BCL** e **AgAu-UND-BCL**, no segundo ciclo conseguiram converter todo o substrato *R* a sua forma acetilada, mantendo o máximo da atividade, enquanto que para os sistemas **AgAu-MAC-BCL** e **AgAu-PROP-BCL**, no segundo ciclo tiveram um decréscimo na atividade enzimática, não conseguindo converter totalmente o substrato, fato mais evidente no sistema **AgAu-PROP-BCL**.

Para o terceiro ciclo todos os sistemas perderam um pouco da sua atividade enzimática, mas os sistemas **AgAu-CIS-BCL**, **AgAu-MAC-BCL** e **AgAu-UND-BCL**, ainda mantiveram uma atividade enzimática alta entre 96-98%, enquanto o sistema **AgAu-PROP-BCL** no terceiro ciclo apresentou uma perda da atividade de 33%.

Para acompanhar a quantidade de ciclos em que a BCL imobilizada se manteria ativa, o sistema **AgAu-CIS-BCL** foi utilizado para resolução cinética do (*R,S*)-1-

feniletanol com acetato de vinila por vários ciclos, até que a perda de atividade enzimática fosse total. O resultados deste estudo estão representados no **Gráfico 4**.

Gráfico 4: Reciclagem do sistema AgAu-CIS-BCL.

Analisando os resultados vimos que a lipase imobilizada para este caso foi 100% ativa nos dois primeiros ciclos e a partir do terceiro ciclo a atividade enzimática apresentou um pequeno decréscimo. A partir do quarto e quinto ciclos a atividade da enzima já caiu cerca de 35% e 70%, respectivamente. A queda de aproximadamente 70% da atividade enzimática no quinto ciclo pode estar ligada com o tempo de exposição da enzima ao solvente orgânico, o que poderia causar a sua desnaturação. A partir do 6 ciclo a atividade enzimática foi muito baixa, perdendo quase que totalmente a capacidade de transesterificação enantiosseletiva.

3.11 Estudo sobre a lixiviação de enzimas imobilizadas durante a resolução cinética enzimática

Um estudo sobre a possível lixiviação das enzimas imobilizadas foi realizado. Este estudo visava verificar se havia desprendimento da enzima imobilizada do suporte durante a resolução cinética enzimática.

Para a resolução cinética enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol eram adicionados a um microtubo (*eppendorf*®) além do substrato, acetato de vinila, a enzima imobilizada e tolueno. Se houvesse qualquer desprendimento da enzima imobilizada esta se deslocaria para o solvente reacional (tolueno). Ao final da reação o solvente contendo os produtos, reagente e possivelmente as enzimas livres foram separados das nanopartículas. Uma análise deste solvente pelo método de Bradford permitiria saber se enzimas estariam no solvente reacional. Este solvente foi então evaporado. Após utilizou-se o método de Bradford para verificar a presença de alguma enzima/proteína (**Figura 23**).

Figura 23: Processo para verificar a perda da enzima por desprendimento do suporte.

A quantidade de enzima avaliada pelo método de Bradford neste caso foi zero. Isso significa que durante todo processo da resolução cinética não há perda da enzima por desprendimento do suporte e que a diminuição da conversão do substrato durante os ciclos e durante o aumento do tempo reacional está ligada à inativação da enzima por algum outro motivo.

3.12 Armazenamento da BCL imobilizada nas nanocascas funcionalizadas

O tempo de armazenamento da enzima imobilizada também foi estudado. Depois da imobilização as nanopartículas contendo a enzima puderam ser armazenadas

em tampão fosfato pH 7 (20 mM). As enzimas imobilizadas foram armazenadas em ~15°C e -4°C.

Para este estudo, 24 mg de **AgAu-CIS-BCL** foram armazenadas a 15°C. Para proceder com estes testes a cada dia 3mg das **AgAu-CIS-BCL** eram retiradas do seu armazenamento e a atividade da BCL imobilizada era testada. Através destes testes observamos que a BCL se manteve ativa, armazenada a ~15°C por até 7 dias, depois deste tempo a atividade das enzimas imobilizadas começou a cair perante a resolução cinética, ou seja a enzima não apresentou o máximo conversão do substrato que ela apresentava.

Para as enzimas armazenadas a -4°C, o teste da atividade enzimática foi feito semanalmente e a atividade enzimática se manteve por até 28 dias (atividade máxima conseguida nas condições utilizadas nos estudos da atividade enzimática), conseguindo depois de descongelada converter totalmente o substrato de interesse.

Por estes dados constatamos que o armazenamento da enzima imobilizada é possível e que menores temperaturas favorecem o prolongamento do tempo de armazenamento.

3.13 Investigação da pureza da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada

Para comprovar o grau de pureza da BCL utilizada neste estudo e coletar mais informações sobre a imobilização da lipase no suporte, preparou-se um gel de eletroforese desnaturante da solução protéica antes e depois do processo de imobilização (**Figura 24**).

Figura 24: Gel de eletroforese da solução de BCL antes (1) e depois do processo de imobilização(2).

Por este gel conseguimos verificar que a solução enzimática esta praticamente pura na solução preparada. O primeiro ponto (1) significa a solução de enzimas antes de entrar em contato com a nanopartículas. O terceiro ponto (2) é a solução enzimática depois do contato da solução enzimática com as nanopartículas funcionalizadas, assim consequentemente depois da imobilização. Pelo gel podemos ver que houve um decréscimo da intensidade da mancha do ponto 1 quando comparado com ponto 2, isso também auxilia na comprovação de que a concentração enzimática da solução depois do processo de imobilização diminui levando a crer que houve imobilização da lipase à nanocasca.

3.14 Calculo teórico da quantidade de enzima que poderia ser imobilizada nas nanocascas

Para conseguirmos estimar a quantidade de lipases que poderiam ser imobilizadas na superfície da NSs AgAu, nós realizamos o seguinte cálculo.

Primeiramente o cálculo da área superficial da nanocasca foi realizado, através da fórmula $A = 4 \cdot \pi R^2$, onde A é a área superficial, e R é o raio da esfera. Através desta fórmula determinamos o valor teórico da superfície da nanocasca, 23561,9 nm².

Na literatura, o valor estimado para o diâmetro da lipase é de aproximadamente 4-5 nm, assim dividindo este valor pela área superficial da enzima encontramos o número de lipases que poderiam ser imobilizadas na superfície da nanocasca, que foi de 4712 lipases por nanocasca.⁶⁴

Este número de lipases que podem estar imobilizadas na superfície é uma estimativa, pois a superfície deste novo material utilizado como suporte possui algumas irregularidades causadas durante o processo de formação da nanocasca.

3.15 Imobilização da lipase de BCL nas NSs AgAu não funcionalizadas (NSs-BCL)

No desenvolver do nosso projeto, uma questão foi levantada. Se a imobilização da lipase na nanopartícula sem a funcionalização das nanocascas seria possível. Para verificar este fato nós desenvolvemos uma metodologia para responder esta questão. Sendo assim, 3 mg de NSs AgAu foram colocadas para reagir com a solução de lipase de *Burkholderia cepacia* (1 mL, 0,55mg/mL) por uma hora a 32°C e 800 rpm.

Depois do processo de imobilização, a quantidade de lipase imobilizada foi medida através do método de Bradford, onde o valor de 0,052 mg foi encontrado. Sendo assim, para cada 3 mg de NSs AgAu podem ser imobilizadas 0,052 mg de BCL.

Por estes resultados, nós constatamos que foi possível a imobilização da lipase nas NSs AgAu não funcionalizadas. A imobilização da lipase nas nanocascas

⁶⁴ Li, Y.; Gao, F.; Wei, W.; Qu, J.; Ma, G.; Zhou, W. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 66, 182–189.

provavelmente ocorre por adsorção da lipase as partículas ou esta ligação pode ocorrer através de grupos presentes na superfície da lipase (grupos como $-NH_2$, $-OH$ e $-SH$) com o ouro presente na superfície da nanocasca. Comparando o valor de BCL imobilizada (0,052 mg) nas nanocascas não funcionalizadas com os valores encontrados quanto a lipase foi imobilizada nas NSs-funcionalizadas, vimos que as NSs-funcionalizadas são capazes de imobilizar uma maior quantidade de lipase (0,152-0,278 mg). Dessa forma, pode ser concluído que a etapa de funcionalização das partículas auxilia no aumento de proteínas ligadas a sua superfície, e que realmente os compostos de enxofre atuam como espaçadores, distanciando proteína da superfície da nanopartícula.

Para finalizar este estudo, a BCL imobilizada nas NSs AgAu não funcionalizadas foram submetidas ao teste de atividade pela RC do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila. Nesta RC o sistema NSs-BCL em 6 horas foi capaz de promover a acetilação do substrato *R* a sua forma acetilada com uma conversão de 40% (e.e.p >99%). Comparando este valor com os melhores resultados dos sistemas onde temos a BCL imobilizada nas NSs-funcionalizadas vimos que estes apresentaram resultados melhores do que a BCL imobilizada na NSs AgAu não funcionalizada.

Assim neste tópico concluímos que a imobilização da lipase nas NSs AgAu não funcionalizadas foi possível, mas os resultados apresentados por este sistemas não foram melhores do que quando a BCL foi imobilizada nas NSs-funcionalizadas com os menores espaçadores.

3.16 Investigação da importância do suporte (NSs AgAu) na atividade da enzima imobilizada

Para investigar a importância da nanopartícula na atividade enzimática da lipase imobilizada, foi desenvolvido um estudo onde adicionamos a BCL moléculas orgânicas parecidas com os espaçadores utilizados para funcionalização das NSs AgAu.

Para isso, foram sintetizadas moléculas semelhantes aos espaçadores e que seriam ligadas a BCL (**Figura 25**).

Figuras 25: Moléculas que foram ligadas a enzima.

Estas moléculas tiveram suas estruturas confirmadas por RMN ^1H e os dados foram comparados com os da literatura. Confirmado suas estruturas, nós partimos para a ativação destas moléculas, para que assim estas pudessem se ligar a lipase (utilizando o mesmo procedimento adotado nas nanopartículas) (**Esquema 12**).

Esquema 12: Ativação das moléculas que foram adicionadas a enzima.

Depois de ativadas, estas moléculas foram então adicionadas a uma solução de BCL (1 mL, 0,55 mg/mL) (**Esquema 13**) e ao final da reação esta foi filtrada utilizando uma membrana de 10 kda, onde nela ficaram retidas a lipase contendo as moléculas orgânicas incorporadas (**6 e 7**) e as moléculas menores (**3 e 5**) (peso molecular) foram separadas.

Esquema 13: Reação das moléculas orgânicas com a lipase de BCL.

Após a reação dos sulfetos **3** e **5** com a lipase, nós partimos então para comprovação dos produtos **6** e **7**, via MALDI-LR. Assim, inicialmente a análise da lipase pura foi feita (**Figura 26**), isso com objetivo de comparar este resultado com a lipase contendo os grupos ligados, ou seja, observar no espectro de massa um acréscimo de massa referente aos grupos incorporados na enzima.

Figura 26: Espectro de massa da lipase de *Burkholderia cepacia* obtido via M@LDI-LR.

Pelo espectro de massa da BCL nós conseguimos determinar a sua massa, que foi de aproximadamente 33 u.m.a. Depois de realizado este experimento, nos partimos para análise de massas da BCL contendo os grupos incorporados.

Nos espectros de massas obtidos para BCL substituída, não foi possível observar uma mudança de massa significativa que pudesse comprovar a introdução de substituintes na lipase, devido os fragmentos de massa incluídos serem muitos pequenos para serem detectados neste aparelho.

Assim como a comprovação da incorporação dos grupos desejados à enzima não foi possível, resolvemos não prosseguir com este estudo.

4.0 CONCLUSÃO

Em resumo, duas diferentes lipases foram imobilizadas sobre Nanocascas de Ouro/Prata funcionalizadas com diferentes moléculas contendo o grupo tiol. Dependendo do tamanho do espaçador utilizado para imobilizar as lipases a atividade desta enzima imobilizada foi alterada. De fato, nossos resultados demonstraram que a lipase imobilizada sobre as NSs AgAu funcionalizadas representam uma boa estratégia para incrementar a atividade enzimática. A BCL imobilizada sobre os sistemas AgAu-CIS e AgAu-MAC mostraram os melhores resultados como catalisadores na reação de acetilação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol (50% de conversão em 6 horas) do que a enzima livre. A PPL imobilizada sobre as NSs AgAu funcionalizadas apresentaram melhores resultados do que a enzima livre, mostrando grande seletividade. Pelo teste de atividade utilizando a hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila observamos que a atividade da enzima imobilizada nas nanocascas funcionalizadas pode alterar de acordo com o substrato e reação a que ela é submetida.

A modificação do suporte e a imobilização das lipases pode ser comprovado através de diversos experimentos, como TEM, MEV, FT-IR e método Bradford. A reciclagem da lipase de *Burkholderia cepacia* foi realizada e os sistemas AgAu-BCL puderam ser utilizados por até três vezes.

5.0 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiais e Métodos

Os solventes e reagentes, quando necessário, foram purificados conforme procedimentos descritos na literatura.⁶⁵ Lipase de *Burkholderia cepacia* (Amano Lipase PS) e lipase de pâncreas de porco (PPL, Type II) foram compradas da Sigma-Aldrich®. O tolueno foi destilado sobre hidreto de cálcio (CaH₂) em atmosfera de nitrogênio antes de seu uso e armazenado em um recipiente fechado contendo peneira molecular (~2 mm, 1 nm).

As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel (Acros Organics 0,035-0,070 mm) como fase estacionária. CCD, placas cromatográficas em camada delgada, foram utilizadas para acompanhar uma reação ou detectar a pureza dos compostos (sílica em folhas de alumínio 60 F254 Merck). As placas foram reveladas em câmera de luz UV (254 nm) ou com uma solução ácida de vanilina seguida de aquecimento.

Para obtenção dos cromatogramas utilizou-se um cromatógrafo a gás CG-17A equipado com detector FID, usando hidrogênio como gás de arraste (100 kPa). A coluna utilizada para determinação do excesso enantiomérico foi Chirasil-Dex CB β-cyclodextrin (25 m X 0,25 mm).

As análises de massas foram obtidas através de um cromatógrafo (GC 2010 Shimadzu) equipado com injetor automático (auto-sampler AOC-20i) e acoplado a um detector de massas quadrupolo, Shimadzu (GCMS-QP 2010). Uma coluna capilar de sílica fundida HP-5-MS (30 m x 0,25 mm e 1 μm; 5% fenil-polidimetilsiloxano), foi utilizada tendo como gás de arraste o hélio (He).

⁶⁵ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. Purification of Laboratory Chemical. 2. ed. New York, Pergamon Press, 1980.

As Análises de massas de alta foram realizadas em um MALDI-LR (Micromass®, Manchester, Reino Unido). Os espectros foram adquiridos no modo linear e positivo de aquisição de íons com as seguintes voltagens: tensão de pulso 2500V, tensão do linear 2000V, tensão da fonte 15000V e tensão do MCP 1800V. A desorção/ionização foi realizada com um laser de nitrogênio ($\lambda = 337$ nm). O equipamento foi calibrado com microbelynx no intervalo das massas moleculares (m/z 1000-9000). Para realizar as análises utilizou-se uma placa de MALDI de aço inoxidável de 96 spots (Micromass®, Manchester, Reino Unido). Todos os espectros obtidos foram tratados no software Masslynx 4.0 (Waters, Manchester, Reino Unido).

Os espectros de FT-IR foram adquiridos à temperatura ambiente por um espectrômetro, modelo BOMEM MB-100 (Hartman–Braun) equipado com um detector padrão DTGS/KBr com variação de $4000 - 400$ cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} , depois de adquiridos os espectros foram processados pelo software Win-Bomem Easy.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um Bruker DRX 300, operando nas frequências de 300 MHz para o núcleo de ^1H e 75 MHz para o núcleo de ^{13}C . O solvente utilizado para preparo das amostras foi clorofórmio deuterado (CDCl_3) e os deslocamentos químicos (δ) estão representados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS, padrão interno, $\delta = 0$ ppm) para os espectros de RMN de ^1H .

As imagens das nanopartículas foram obtidas a partir de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). O aparelho de MEV composto por um microscópio JEOL FEG-SEM JSM 6330F operou a 5 kV. As imagens de Transmissão eletrônica foram obtidas por um microscópio JEOL 1010 operando em 80 kV.

5.2 Síntese dos compostos utilizados

5.2.1 Síntese do (R,S)-1-Feniletanol

Em um balão de 250 mL contendo etanol (60 mL) adicionou-se 1-feniletanona (3,50 mL, 30 mmol) sob agitação magnética à 0°C. Em seguida adicionou-se hidreto de boro e sódio (NaBH₄, 1,25 g, 33 mmol) aos poucos. Depois da adição do NaBH₄ deixou-se a reação atingir a temperatura ambiente e esta foi acompanhada por cromatografia de camada delgada.

Ao término da reação (~ 60 min), o solvente foi evaporado sob vácuo. À mistura reacional foi adicionado água (60 mL) e o pH da mistura foi corrigido (pH = 6) pela adição de HCl (solução 2 M). Essa mistura foi então transferida para um funil de separação (250 mL) e extraída com diclorometano (3 x 50 mL). A fração orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente foi evaporado.

O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando como fase móvel uma mistura hexano/acetato de etila (8:2).

Rendimento: 98% **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7,38-7,30 (m, 5H), 4,83 (q, 1H, *J* = 9 Hz), 3,14 (s, 1H), 1,48 (d, 3H, *J* = 6 Hz), **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 25,0 (CH₃), 70,0 (C-OH), 125-130,0 (CH Ar), 145,0 (C₀) **MS (EI): *m/z* (intensidade relativa):** 129 (0,02), 122 (42), 107 (100), 79 (94), 63 (3), 43 (30), 39 (6,5).

5.2.2 Síntese do acetato de (R,S)-1-feniletila

Em um tubo de ensaio (10 mL) com tampa, foi adicionado piridina (3 mL), anidrido acético (0,01 mmol, 1 mL) e (R,S)-1-feniletanol (0,005 mmol 0,6 mL), esta reação foi então colocada em um *Thermomixer*® a 900 rpm, 50°C por 1 hora. Após este tempo a mistura reacional foi colocada em um funil de separação (50 mL), diluída com diclorometano (15 mL) e tratada com uma solução saturada de sulfato de cobre (CuSO₄, 3 x 25 mL) para retirada da piridina remanescente. A fase orgânica foi lavada com água destilada (3 x 20 mL), seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e o solvente foi evaporado com auxílio de um evaporador rotativo.

Rendimento: 89% **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,53 (d, 3H, Me, *J* = 6 Hz), 2,05 (s, 3H, Me), 5,88 (q, 1H, CH, *J* = 6,5 Hz), 7,25-7,35 (m, 5H, Ar); **MS (EI): *m/z*** (**intensidade relativa**): 164 (17,34), 122 (100), 104 (92,56), 77 (32,10), 63 (2,74), 43 (66,36).

5.2.3 Síntese do (R)-1-feniletanol

Em um tubo de ensaio (10 mL) com tampa, adicionou-se o (R,S)-1-feniletanol (0,005 mmol, 0,6 µL), 10 mg de lipase *Pseudomonas cepacia* (Amano PS-C II, imobilizada sobre partículas de cerâmica), acetato de vinila (0,03 mmol, 3 µL) em Tolueno (3 mL). Esta reação foi colocada em um *Thermomixer*®, por 24h em 800 rpm.

Ao final da reação, esta foi filtrada em papel filtro para retirada das enzimas e o solvente foi evaporado. Para a separação do (*S*)-1-feniletanol do acetato de (*R*)-1-feniletila foi feita uma coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando como fase móvel uma mistura hexano/acetato de etila (8:2).

Depois da coluna o acetato de (*R*)-1-feniletila foi submetido à reação de hidrólise para obtenção do (*R*)-1-feniletanol. O acetato de (*R*)-1-feniletila foi adicionado a um balão (25 mL), juntamente com carbonato de potássio (2 equivalentes) e MeOH (10 mL), esta reação foi deixada reagir por 12 horas. Ao final do tempo reacional a reação foi transferida para um funil de separação (100 mL) e extraída com acetato de etila (50 mL). A fase orgânica foi lavada com água (3 x 25 mL), seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄), filtrada e o solvente foi evaporado.

Rendimento: 95% **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7,38-7,30 (m, 5H), 4,83 (q, 1H, *J* = 9 Hz), 3,14 (s, 1H), 1,48 (d, 3H, *J* = 6 Hz), **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 25,0 (CH₃), 70,0 (C-OH), 125-130,0 (CH Ar), 145,0 (C₀) **MS (EI): *m/z* (intensidade relativa):** 129 (0,02), 122 (42), 107 (100), 79 (94), 63 (3), 43 (30), 39 (6,5).

5.2.4 Síntese do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP)⁶⁶

Em um balão de 50 mL foram adicionados o *p*-nitrofenol (0,05 mmol, 6,7 mg), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,008 mmol, 1 mg) o ácido palmítico (0,078 mmol, 20 mg) em diclorometano anidro (10 mL) sob agitação. A temperatura desta solução foi então diminuída para 0°C e a *N,N*-diciclocarbodiimida foi adicionada (DCC, 0,082 mmol). Depois da adição do DCC a temperatura da reação foi elevada até temperatura ambiente e esta permaneceu sob agitação *over-night*.

A mistura reacional foi filtrada em um funil de vidro sinterizado contendo sílica gel para retirada da diciclohexiluréia (DCU), formada durante o processo reacional. O solvente foi evaporado para obtenção do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP).

Rendimento: 86% **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,86 (t, 3H, Me), 1,26 (m, 24H, (CH₂)₁₂), 1,75 (m, 1 H, CH₂) , 1,85 (m, 1H, CH₂), 7,28, 8,28 (m, 4H, Ar) **MS (EI):** *m/z* (**intensidade relativa**): 347 (1,28), 239 (55,45), 109 (100), 85 (21,45), 71 (30,88), 57 (49,62), 43 (32,88).

⁶⁶ Bowie, J. H.; Stapleton, B. J. Electron impact studies. XCVI. Negative ion mass spectra of naturally occurring compounds. Nitrophenyl esters derived from long-chain acids and alcohols. *Australian J. Chem.* **1975**, 28, 1011 – 1015.

5.2.5 β -Benzilmercaptoetilamina⁶⁷

Em um balão de duas bocas contendo H₂O/Etanol (5:15 mL), foi adicionado hidróxido de lítio (LiOH, 10,2 mmol, 0,245 g). Neste balão, sob atmosfera de N₂ e agitação magnética, adicionou-se o hidrocloreto de cisteamina (0,568 g, 5 mmol) e em seguida foi adicionado, gota-a-gota, o brometo de benzila (5 mmol, 0,6 mL). O tempo reacional foi de 40 minutos, mantendo a reação á 35°C. Depois deste tempo o etanol foi removido por evaporação e mais 20 mL de água foram adicionados à reação. Esta solução então, foi transferida para um funil de separação (100 mL) e extraída com diclorometano (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄) e evaporada sob vácuo.

O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel uma mistura de diclorometano/metanol (gradiente 98:2 para 80:20).

Rendimento: 86% **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,23 (2H-NH₂), 2,50 (m, J = 6.0 Hz, 2H), 2,63 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3,54 (s, 2H), 7,09-7,36 (m, 5H-Ar).

5.2.6 Ácido benzilsulfanil-acético⁶⁸

Em um balão (25 mL) foi adicionado o ácido mercapto acético (1 mmol, 0,7 mL), o brometo de benzila (1,2 mmol, 0,14 mL), sílica gel ativada e tolueno (2 mL). Esta mistura

⁶⁷ Grosh, S.; Tochtrop, G. P. A new strategy for the synthesis of β -benzylmercaptoethylamine derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1723-1726.

⁶⁸ Basu, B.; Paul, S.; Nanda, A. K. Silica-promoted facile synthesis of thioesters and thioethers: a highly efficient, reusable and environmentally safe solid support. *Green Chem.* **2010**, 12, 767-771.

reacional foi mantida sob agitação magnética em atmosfera de N₂ por 12 horas à temperatura ambiente. Ao final da reação esta foi filtrada em um funil de vidro sinterizado contendo silica gel para retirada das impurezas e lavado com tolueno (10 mL) para extração do produto restante. Ao final da filtragem o solvente foi evaporado sob vácuo para obtenção do produto.

Rendimento: 86% **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2,65 (m, CH₂), 7,20-7,33 (m, 5H, Ar)

5.2.7 5-(2-Benzilsufanil-etilimino)-pentanal

Em um microtubo (*ependorf*®, 2 mL) foi adicionado a β-benzilmercaptoetilamina (0,5 mmol, 8 mg), uma solução de glutaraldeído (80 μL, 25% v/v) e heptano (100 μL). Esta solução resultante foi colocada para reagir em um *Thermomixer*®, 800 rpm, 25°C por 4 horas. Ao término do tempo reacional o microtubo foi colocado sob uma atmosfera de vácuo para retirada do heptano. Depois da retirada do heptano o microtubo foi armazenado na geladeira para estudos posteriores.

5.2.8 Cloreto de {3-[2-(2-benzilsulfanil-acetil)-3-etil-isoureia]-propil}-dimetil amônio

Em um microtubo (eppendorf®, 2mL) adicionou-se 5-(2-benzilsufanil-etilimino)-pentanal (0,5 mmol, 9 mg), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 0,5 mmol, 7,7 mg) e água (100 µL). Esta mistura reacional foi colocada em um ultrassom por 1 hora. Ao término da reação o microtubo foi armazenado na geladeira para futuros estudos.

5.3 Síntese das Nanocascas

5.3.1 Síntese das Nanocascas de Ouro e Prata (NSs AgAu)¹¹

Para a síntese das nanocascas metálicas de Ouro e Prata (NSs AgAu, 50 nm), inicialmente foi necessário a síntese das nanopartículas de prata (Np-Ag). Em posse das Np-Ag foram então sintetizado as NSs AgAu, pela reação de redução galvânica com AuCl^- .

5.3.1.1 Síntese das Nanopartículas de Prata (Np-Ag)

Em um balão de duas bocas (2000 mL) adicionou-se 90 mg de nitrato de prata (AgNO_3) e 500 mL de água. Esta solução foi aquecida até a ebulição e 10 mL de uma solução de ácido cítrico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 34 mM) foram adicionados. Esta solução

resultante foi deixada reagir por aproximadamente 1 hora. Ao final da reação a solução foi armazenada para que futuramente fosse utilizada na síntese das nanocascas de ouro/prata.

5.3.1.2 Síntese das Nanocascas de Ouro/Prata (NSs AgAu).

Em um balão (25 mL) foi adicionado uma solução aquosa de pirrolidina polivinílica (PVP, 1mg/mL, 10mL), esta solução foi aquecida a 100°C e uma alíquota de 200 µL da solução de nanopartículas de prata, preparada previamente, foi adicionada. Depois de 10 minutos uma solução de ácido tetracloroáurico ($\text{AuCl}_4^{\text{aq}}$, 0,2 mM, 2 mL) foi adicionada gota-a-gota. A NSs AgAu formada foi lavada com água (3 x 10 mL), seguido de centrifugação, para retirada do sobrenadante. Depois de lavadas as nanocascas foram ressuspensas em água e armazenadas na geladeira para futuros estudos.

5.4 Funcionalização das Nanopartículas de Ouro/Prata⁶⁹

Para funcionalização das NSs AgAu, foram utilizados uma quantidade da solução de nanocascas sintetizada previamente (40 mL, 2,5-3 mg). Esta solução foi centrifugada utilizando um tubo tipo *Falcon* (50 mL) para retirada do sobrenadante, depois da retirada do sobrenadante as nanocascas foram então lavadas com etanol (1 x 20 mL), seguido de centrifugação (8000 rpm).

As nanopartículas lavadas foram colocadas em um balão (25 mL), seguido de adição de etanol (5 mL) e da molécula utilizada como funcionalizador (0,5 mmol; ácido mercapto acético, ácido mercapto propiônico, ácido mercapto undecanóico ou cisteamina). A mistura reacional foi deixada em agitação por 2 horas à temperatura ambiente.

Ao término da reação as nanopartículas foram lavadas com água (3 x 15 mL), seguido de centrifugação para remoção do sobrenadante. Após elas foram ressuspensas

Woehrle, G. H.; Brown, L. O.; Hutchison, J. E. Thiol-Functionalized, 1.5-nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions: Scope and Mechanism of Ligand Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2173-2183.

em água para seu armazenamento na geladeira (5°C). As nanopartículas funcionalizadas com cisteamina, ácido mercapto acético, ácido mercapto propiônico e ácido mercapto undecanóico foram nomeadas de AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP e AgAu-UND, respectivamente.

5.5 Funcionalização das nanocascas AgAu com glutaraldeído

Em um microtubo (*ependorf*®, 2 mL) foram adicionadas as nanocascas de ouro/prata (3 mg) funcionalizadas com grupo amino (cisteamina), preparadas previamente, água (1 mL) e uma solução de glutaraldeído (25 % (v/v), 25 µ). O frasco contendo a mistura reacional foi colocado em um *Thermomixer*®, 800 rpm, 25 °C durante 2 horas. Ao término da reação, as nanocascas funcionalizadas com glutaraldeído foram lavadas com água (3 x 1,5 mL), seguido de centrifugação para remoção do sobrenadante (8000 rpm) e, depois ressuspensas em água e armazenadas para futuros estudos (15 mL, 5°C). Estas nanocascas foram nomeadas de AgAu-CIS-GLU.

5.6 Funcionalização das nanocascas com EDC

Em um tubo *Falcon* (15 mL) foram adicionadas as nanocascas de ouro/prata funcionalizadas com ácidos carboxílicos (ácido mercapto acético, ácido mercapto propiônico ou ácido mercapto undecanóico), preparadas conforme mostrado anteriormente, água (5 mL) e 1-Etill-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 5 mL de uma solução 2% v/v). O frasco contendo a mistura reacional foi colocado para reagir em um ultrassom por 30 minutos. Ao término da reação as nanocascas EDC funcionalizadas foram lavadas com água (3x10 mL) e ressuspensas neste mesmo solvente e armazenadas na geladeira para futuros estudos. Estas nanocascas foram nomeadas de AgAu-MAC-EDC para as nanocascas funcionalizadas com ácido mercapto acético, AgAu-PROP-EDC e AgAu-

UND-EDC para as nanocascas funcionalizadas com ácido mercapto propiônico e ácido mercapto undecanóico.

5.7 Imobilização das Lipases nas Nanocascas

5.7.1 Imobilização das Lipases (*Burkholderia cepacia* e Pâncreas de porco) nas NSs AgAu funcionalizadas

Em um microtubo (eppendorf®, 2 mL) foram adicionadas as NSs AgAu funcionalizadas (3 mg; AgAu-CIS-GLU, AgAu-MAC-EDC, AgAu-PROP-EDC e AgAu-UND-EDC) e uma solução de lipase, em tampão fosfato (pH 7, 20 mM, Lipase de *Burkholderia cepacia*, 0,55 mg/mL; Lipases de pâncreas de porco, 0,45 mg/mL). O frasco contendo a mistura reacional foi colocado para reagir em um *Thermomixer*®, 800 rpm, 32 °C durante 1 ou 2 horas. Ao término da reação, esta foi lavada com tampão fosfato pH 7, 20 mM (3 x 1,5 mL) por centrifugação (8000 rpm), seguido de centrifugação para remoção do sobrenadante. Depois de lavadas as nanocascas contendo a lipase imobilizada foram ressuspensas em tampão (15 mL, 5°C) e armazenadas para estudos futuros. Estas nanocascas foram nomeadas de AgAu-CIS-GLU-BCL, AgAu-MAC-BCL, AgAu-PROP-BCL e AgAu-UND-BCL, para as nanocascas funcionalizadas que serviram de suporte para lipase de *Burkholderia cepacia* e AgAu-CIS-GLU-PPL, AgAu-MAC-PPL, AgAu-PROP-PPL e AgAu-UND-PPL, para as nanocacas funcionalizadas que serviram de suporte para lipase de Pâncreas de porco.

5.7.2 Imobilização das Lipase de *Burkholderia cepacia* na NSs AgAu (sem funcionalização)

Em um microtubo (*eppendorf*®, 2mL) foram adicionados as NSs AgAu (3 mg) e uma solução de lipase de *Burkholderia cepacia* em tampão fosfato pH 7 (20 mM). Este microtubo foi então colocado para reagir por 2 horas em um *Thermomixer*®, 800 rpm á 32 °C. Ao término da reação as nanocascas contendo a lipase imobilizada foram lavadas com uma solução tampão fosfato pH 7 (20 mM, 3 x 1,5 mL) e foram armazenadas em solução tampão fosfato na geladeira para estudos futuros. Esta NSs AgAu contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada foram nomeadas de AuAg-BCL.

5.8 Caracterização das Nanocascas

5.8.1 Preparação das amostras para FT-IR

As amostras para análise em FT-IR foram preparadas seguindo sempre a mesma metodologia. As amostras foram dispostas em quantidades maiores que 1 mg em um microtubo (*eppendorf*®, 1,5 mL) e estas foram secas com auxílio de uma bomba de vácuo.

Foram enviadas para análise de FTIR amostras de: NSs AgAg, AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP, AgAu-UND, AgAu-CIS-GLU-BCL, AgAu-MAC-BCL, AgAu-PROP-BCL e AgAu-UND-BCL (**ANEXO**).

5.8.2 Preparação das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises do MEV todas as amostras foram preparadas seguindo a mesma metodologia. Uma solução da amostra a que se quer analisar foi gotejada sobre uma placa de silício (2 x 2μL) e esta foi seca a temperatura ambiente.

Foram enviadas para análise de MEV: NSs AgAg, AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP, AgAu-UND, AgAu-CIS-GLU e AgAu-MAC-EDC.

5.8.3 Preparação das amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para as análises de TEM todas as amostras foram preparadas seguindo a mesma metodologia. Uma solução da amostra a que se quer analisar foi gotejada sobre (4 µL) uma grade de cobre revestida de carbono e esta foi deixada para secar a temperatura ambiente.

Foram enviadas para análise de TEM: NSs AgAg, AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP, AgAu-UND, AgAu-CIS-GLU-BCL, AgAu-MAC-BCL, AgAu-PROP-BCL, AgAu-UND-BCL, AgAu-CIS-GLU-PPL, AgAu-MAC-PPL, AgAu-PROP-PPL e AgAu-UND-PPL.

5.9 Ensaios enzimáticos

5.9.1 Preparação da solução enzimática para imobilização enzimática

Para preparação da solução da lipase Amano PS/*Burkholderia cepacia* e lipase de pâncreas de porco pesou-se 100 mg desta lipase e adicionou-se 1 mL de solução tampão fosfato pH 7 (20 mM). Esta solução foi agitada e depois centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante desta solução foi recolhido e 50 µL desta solução foi adicionada à 1,5 mL de reagente de Bradford para medida da absorbância e determinação da concentração proteica. A solução restante foi então utilizada no processo de imobilização da lipase as NSs AgAu.

5.9.2 Preparação da lipase de *Burkholderia cepacia* e Pâncreas de porco para catálise enzimática.

Soluções proteicas de lipase de *Burkholderia cepacia* e pâncreas de porco (1 mL, 0,55mg/mL e 0,45 mg/mL, respectivamente) foram submetidas a liofilização. Depois do processo de liofilização obtivemos então a enzima em pó que pode ser adequada a mesma quantidade de enzima imobilizada as nanopartículas para análise catalítica.

5.10 Quantificação de Proteínas

5.10.1 Montagem da curva de calibração para quantificação da proteína através do método de Bradford⁷⁰

Para montagem da curva de calibração foram utilizados 14 microtubos, (eppendorf®, 2 mL). Em cada microtubo foram adicionados 1,5 mL do reagente de Bradford. Em 13 diferentes microtubos contendo o reagente de Bradford foram adicionados 50 µL de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) em tampão fosfato pH 7: 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,1 mg/mL e 1,2 mg/mL. Depois da adição do BSA esperou-se cerca de 1 minuto e a absorbância foi medida utilizando a região de 595 nm. O branco para esta curva de calibração foi medido a partir da mistura de 50 µL da solução tampão fosfato pH 7 e 1,5 mL do reagente de Bradford (em um eppendorf®).

A partir dos dados de absorbância obtidos pelas leituras das diferentes concentrações de BSA foi montado, com auxílio do Software OringinPro 7.0, a curva de

⁷⁰ Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.

calibração de Absorbância *versus* Concentração de proteína (mg/mL). Com esta curva foi possível então obter a equação da reta que auxiliou na quantificação de proteínas.

5.10.2 Método de preparação das amostras para medida da quantidade de enzima imobilizada.

Como a imobilização da lipase nas NSs AuAg envolve o contato de uma solução de lipase com nanocascas funcionalizadas ou “puras”, a quantificação da proteína imobilizada foi feita pelo cálculo da diferença de concentração de lipases antes e depois do processo de imobilização. A medida da concentração da lipase foi feita pela retirada de certa quantidade da solução de lipase antes do processo de imobilização (50 µL) e esta quantidade foi analisada pelo método de Bradford (50 µL da solução de lipase + 1,5 mL do reagente de Bradford e medida da absorbância). Para medida da concentração da lipase depois do processo de imobilização, primeiramente o microtubo (*eppendorf*®), contendo a lipase imobilizada nas nanocascas e a lipase livre remanescente, foi centrifugado e certa quantidade da solução do sobrenadante (50 µL) foi analisada pelo método de Bradford (50 µL da solução de lipase + 1,5 mL do reagente de Bradford e medida da absorbância).

$$\begin{aligned} \text{Quantificação da enzima imobilizada} = \\ \text{Qde de enzima medida antes do processo de} \\ \text{imobilização} - \text{Qde de enzima medida depois do} \\ \text{processo de imobilização} \end{aligned}$$

5.11 Teste da Atividade Catalítica de Lipases.

5.11.1 Teste da Atividade Enzimática: Reação de Transesterificação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila⁷¹

Para esta reação, 2,5-3 mg de nanopartículas contendo a lipase imobilizada ou a enzima livre em pó, foram adicionadas a um microtubo (eppendorf®, 2 mL) juntamente com (*R,S*)-1-feniletanol (0,002 mmol, 0,18 µL), acetato de vinila (0,07 mmol, 4,6 µL) em tolueno (1 mL). O frasco contendo a mistura reacional foi colocada para reagir em um Thermomixer® à 800 rpm, 32°C. A reação foi acompanhada por CG/FID.

5.11.2 Teste da atividade enzimática: Reação de Hidrólise do Palmitato de *p*-Nitrofenila (*p*-NPP) catalisado por lipases^{72,73}

Neste teste, primeiramente uma curva de calibração de absorbância *versus* diferentes concentrações do *p*-nitrofenol (*p*-NP, 1E⁻⁵, 2E⁻⁵, 3E⁻⁵, 4E⁻⁵, 5E⁻⁵ e 6E⁻⁵ mol/L) foi feita. A partir desta curva calculou-se a absorvidade molar (ε) para *p*-NP.

Para a reação de hidrólise do *p*-NPP catalisada pela enzima de *Burkholderia cepacia*, foram adicionados a um microtubo (eppendorf®, 2 mL) a lipase de *B. cepacia* imobilizada nas NSs AgAu (2,5-3 mg) ou a enzima livre em pó, em uma solução de *p*-NPP

⁷¹ Andrade, L. H. ; Rebelo, Lya P. ; Netto, Caterina G.C.M. ; Toma, Henrique E. . Kinetic resolution of a drug precursor by Burkholderia cepacia lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *J. Mol.Catal.. B, Enzym.* **2010**, 66, 55-62.

⁷² Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. A Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the Pseudomonas cepacia lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *J. C. Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 18, 417-422.

⁷³ Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. A model of the pressure dependence of the enantio selectivity of Candida rugosa lipase towards (+/-)-menthol. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, 28, 473-479.

em heptano (10 mM, 1,5 mL). Esta solução foi colocada para reagir em um *Thermomixer*® à 800 rpm, 32°C por 10 minutos.

Ao final da reação uma alíquota foi retirada da reação (50 µL) e adicionado a um microtubo contendo uma solução de NaOH (0,1 M, 1 mL), esta solução do microtubo teve então sua absorbância medida para verificar a quantidade de *p*-Nitrofenol produzido, através do ϵ calculado e pela equação de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$).

6.0 REFERÊNCIAS

1. Fessner, W.; Turner, N. J.; Wang, M. Biocatalysis – A Gateway to Industrial Biotechnology. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2189-2190.
2. Tran, D. N.; Balkus, K. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *1*, 956-968.
3. Zheng, G.; Xu, J.; New opportunities for biocatalysis: Driving the Synthesis of Chiral Chemicals. Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 784-792.
4. Gaffney, D.; Cooney, J.; Magner, E. Modification of Mesoporous Silicates for Immobilization of Enzymes. *Top Catal.* **2012**, *55*, 1101-1106.
5. Ansari, S. A.; Husain, Q. Potential Applications of Enzymes Immobilized on/in nano materials: A review. *Biotech. Adv.* **2012**, *30*, 512-523.
6. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1017–1026.
7. Tiwari, P. M.; Vig, K.; Dennis, V. A.; Singh, S. R. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *J. Nanomater.* **2011**, *1*, 31-63.
8. a) Li, D.; He, Q.; Cui, Y.; Duan, L.; Li, J. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *2*, 488-93. b) Tellechea, E.; Wilson, K. J.; Bravo, E.; Hamad-Schifferli, K. Engineering the Interface between Glucose Oxidase and Nanoparticles. *Langmuir.* **2012**, *28*, 5190-5200. c) Hsu, F.; Yu, D.; Chang, J.; Chuang, C. Silver Nanoparticles as a glucose oxidase Immobilization matrix for Amperometric glucose biosensor construction, *J. Chin. Chem. Soc.* **2011**, *58*, 756-760.
9. Jedrzejewska, H.; Ostaszewski, R. Studies Toward Stereoselective Bionanocatalysis on gold nanoparticles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *90*, 12–16.
10. Bjerneld, E.; Foeldes-Papp, Z.; Kaell, M.; Rigler, R. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman and Fluorescence Correlation Spectroscopy of Horseradish Peroxidase. *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 1213-1218
11. Petri, M. V.; Ando, R. A.; Camargo, P. H. C. Tailoring the structure, composition, optical properties and catalytic activity of Ag–Au nanoparticles by the galvanic replacement reaction. *Chem. Physics Lett.* **2012**, *531*, 188.
12. Hegde, S.; Joshi, S.; Mukherjee, T.; Kapoor, S. Formation of gold nanoparticles via a thiol functionalized polyoxometalate. *Mat. Sci. Engin. C.* **2013**, *33*, 2332–2337
13. Lechner, M. D. Determination of the particle size distribution of 5-100nm nanoparticles with the analytical ultracentrifuge: consideration and correction on diffusion effects. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **1999**, *113*, 37-43.
14. Mody, V. V.; Siwale, R.; Mody, H. R. Introduction to Metallic Nanoparticles. *J. Pharm. Bioall. Sci.* **2010**, *4*, 282-289.
15. Katz, E.; Willner, I. Integrated Nanoparticle–Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6042-6108.

16. Boote, B. W.; Byun, H.; Kim, J. One-pot synthesis of various Ag–Au bimetallic nanoparticles with tunable absorption properties at room temperature. *Gold Bull.* **2013**, *46*, 185-193.
17. Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jackel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J. Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles, *J. Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1805-1825.
18. Toshima, N.; Yonezawa, T. Bimetallic nanoparticles novel materials for chemical and physical Applications. *New J. Chem.* **1998**, *33*, 1179-1201.
19. Pandey, P. A.; Bell, G. R.; Rourke, J. P.; Sanchez, A. M.; Elkin, M. D. E.; Hickey, B. J.; Wilson, N. R. Physical Vapor Deposition of Metal Nanoparticles on Chemically Modified Graphene: Observations on Metal–Graphene Interactions. *Small.* **2011**, *7*, 22, 3202–3210.
20. Gutierrez-Wing, C.; Velazquez-Salazar, J. J.; Jose-Yacamán, M. Procedures for the Synthesis and Capping of Metal Nanoparticles. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *906*, 3-19.
21. AbdelHamid, A. A.; Al-Ghobashy, M. A.; Fawzy, M.; Mohamed, M. B.; Abdel-Mottaleb, M. M. S. A. Phytosynthesis of Au, Ag, and Au–Ag Bimetallic Nanoparticles Using Aqueous Extract of Sago Pondweed (*Potamogeton pectinatus* L.). *ACS Sustainable Chem. Eng.* “In press” (**2013**).
22. Ferrando, R.; Jellinek, J.; Johnston, R.L. Nanoalloys: from theory to applications of alloy clusters and nanoparticles. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 845-910.
23. Wang, D. S.; Li, Y. D. Bimetallic nanocrystals: liquid-phase synthesis and catalytic applications, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 1044-1060.
24. Zhang, W.; Huang, L.; Zhu, J.; Liu, Y.; Eang, J. Synthesis of monodisperse Ag–Au alloy nanoparticles with large size by a facile fabrication process. *Mat. Chem. and Physics.* **2011**, *131*, 136–141.
25. Rao, V. K.; Radhakrishnan, T. P. Hollow bimetallic nanoparticles generated in situ inside a polymer thin film: fabrication and catalytic application of silver–palladium–poly(vinyl alcohol). *J. Mater. Chem. A.* **2013**, *1*, 13612–13618.
26. Shiraishi, Y.; Sakamoto, H.; Sugano, Y.; Ichikawa, S.; Hirai, T. PtCu Bimetallic Alloy Nanoparticles Supported on Anatase TiO₂: Highly Active Catalysts for Aerobic Oxidation Driven by Visible Light. *ACS Nano.* **2013**, *10*, 9287–9297.
27. Verma N.; Thakur S.; Bhatt A. K. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *Int. Res. J. Biological Sci.* **2012**, *8*, 88-92.
28. Mala, J. G. S.; Takeuchi, S. Understanding structural features of microbial. *Anal. Chem. Insights.* **2008**, *3*, 9-19.
29. Patil K.J., Chopda M.Z. and Mahajan R.T. Lipase biodiversity, *Indian J. Sci. Tech.* **2011**, *8*, 971-982.
30. ¹ Massadeh, M.; Sabra, F.; Dajani, R.; Arafat, A. Purification of Lipase Enzyme Produced by *Bacillus Stearothermophilus* HU1. *Int. Conf. On Eco-Systems and Bio Sci.* **2012**, 19-20.
31. Xie, Z.; Na Wang, N.; Zhou, L.; Wan, F.; He, T.; Le, Z.; Yu, X. Lipase-Catalyzed Stereoselective Cross-Aldol Reaction Promoted by Water. *Chem. Cat. Chem.* **2013**, *7*, 19635-1940.
32. Belluci, L.; Laino, T.; Tafi, A.; Botta, M. Metadynamics simulations of enantioselective acylation give insights into the catalytic mechanism of *Burkholderia cepacia* lipase. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1145–1156.

33. Zhe, H.; Chun-lin, D. A study on lipase-mediated selective synthesis of monoglyceride. *J. Lionin. Normal Univer. Nat. Scien.* **2007**, *30*, 343-347
34. www.maptest.rutgers.edu/ acessado em 22/00/2013.
35. Mala, J. G. S.; takeuchi, S. Understanding structural features of microbial. *Anal. Chem. Insights.* **2008**, *3*, 9-19.
36. Jedrzejewska, H.; Ostaszewski, R. Studies toward stereoselective bionanocatalysis on gold nanoparticles. *J. Mol. Catal.B: Enzym.* **2013**, *90*, 12–16.
37. <http://www.rcsb.org/> acessado em 28/03/2013.
38. Rebelo, L. P. Imobilização da lipase de Burkholderia cepacia em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em resolução cinética de álcoois secundários quirais. 2009. Dissertação (Mestrado em Química, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, **2009**.
39. Nisha, S.; Arun, K. S.; Goboi, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chem Sci Rev Lett.* **2012**, *1*, 148-155.
40. Datta, S.; Christena, R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.*, **2013**, *3*, 1–9.
41. Tischer, W.; Wedekind, F. Immobilized Enzymes: *Meth. Applicat.* **1999**, *200*, 95-126.
42. Brady, D., Jordan, A, Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639- 1650.
43. Tanyolac, D., Yuruksoy, B.I., Ozdural, A.R. Immobilization of a thermostable α -amylase, termamyl, onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding. *Biochem. Eng. J.* **1998**, *2*, 179-186.
44. Berna, B. M.; Batista, F. Enzyme immobilization literature survey methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells., **2006**, 2nd (Ed.), 15-30.
45. Ispas, C.; Sokolov, I.; Andreescu, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 543–554.
46. Yusdy; Patel, S. R.; Yap, M. G. S.; Wang, D. I. C. Immobilization of L-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *48*, 13–21.
47. Sardar, M.; Gupta, M. N. Immobilization of tomato pectinase on Con A–Seralose 4B by bioaffinity layering. *Enzyme Microb. Tech.* **2005**, *37*, 355–359.
48. Ho, L. F.; Li, S. Y.; Lin, S. C.; Hsu, W. H. Integrated enzyme purification and immobilization processes with immobilized metal affinity adsorbents. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1573–1581.
49. Bernfeld, P.; Wan, J. Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into the lattices of synthetic polymers, *Science.* **1963**, *142*, 678-679.
50. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. A Rule To Predict Which enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from Pseudomonas cepacia, and Lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

51. Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V. Asymmetric synthesis of arylseleno alcohols by means of the reduction of organoseleno acetophenones by whole fungal cells. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *29*, 47–54.
52. Hwan M. et al. Galvanic Replacement Reactions in Metal Oxide Nanocrystals. *Science*, **2013**, *340*, 964-968.
53. Cao, M.; Zhou, L.; Xu, X.; Cheng, S.; Yao, J.; Fan, L. Galvanic replacement approach for bifunctional polyacrylonitrile/Ag–M (M $\frac{1}{4}$ Au or Pd) nanofibers as SERS-active substrates for monitoring catalytic reactions. *J. of Mat. Chem. A*. **2013**, *1*, 8942-8949.
54. Egerton, R. *Physical Principles of Electron Microscopy*. 1st ed. **2005**. Corr. p. 122 .
55. Yang, L.; Yan, B.; Reinhard, B. M. Correlated Optical Spectroscopy and Transmission Electron Microscopy of Individual Hollow Nanoparticles and their Dimers. *J. Phys. Chem. C. Nanomater Interfaces*. **2008**, *112*, 15989–15996.
56. Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*. **2010**, *368*, 1333-1383.
57. Cha, K.; Cho, K.; Kim, M.; Kim, J.; Park, H. J.; Park, J.; Cho, W.; Park, J. Enhancement of the dissolution rate and bioavailability of fenofibrate by a melt-adsorption method using supercritical carbon dioxide. *Int J Nanomedicine*. **2012**, *7*, 5565-5575.
58. Hung, T. C.; Giridhar, R.; Chiou, S. H.; Wu, W. T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *26*, 69-78
59. Zhu, X.; Zhou, T.; Wu, X.; Cai, Y.; Yao, D.; Xie, C.; Liu, D. Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *72*, 145–149.
60. Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry*. **1976**, *72*, 248–254.
61. Ren, Y.; Rivera, J. G.; Lihong, H.; Kulkarni, H.; Lee, D.; Messersmith, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnology*, **2011**, *11*, 1-8.
62. Haouz A.; Glandieres J. M.; Alpert B. Involvement of protein dynamics in enzyme stability: The case of glucose oxidase. *FEBS Lett.* **2001**, *506*, 216-220.
63. Qian, L.; Liu, J.; Liu, J.; Yu, H.; Li, C.; Xu, J. Fingerprint lipolytic enzymes with chromogenic p-nitrophenyl esters of structurally diverse carboxylic acids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *73*, 22–26
64. Li, Y.; Gao, F.; Wei, W.; Qu, J.; Ma, G.; Zhou, W. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *66*, 182–189.
65. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemical*. 2. ed. New York, Pergamon Press, **1980**.

66. Bowie, J. H.; Stapleton, B. J. Electron impact studies. XCVI. Negative ion mass spectra of naturally occurring compounds. Nitrophenyl esters derived from long-chain acids and alcohols. *Australian J. Chem.* **1975**, *28*, 1011 – 1015.
67. Grosh, S.; Tochtrop, G. P. A new strategy for the synthesis of α -benzylmercaptoethylamine derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1723-1726.
68. Basu, B.; Paul, S.; Nanda, A. K. Silica-promoted facile synthesis of thioesters and thioethers: a highly efficient, reusable and environmentally safe solid support. *Green Chem.* **2010**, *12*, 767–771.
69. Woehrle, G. H.; Brown, L. O.; Hutchison, J. E. Thiol-Functionalized, 1.5-nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions: Scope and Mechanism of Ligand Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2173-2183.
70. Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
71. Andrade, L. H. ; Rebelo, Lya P. ; Netto, Caterina G.C.M. ; Toma, Henrique E. . Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *J. Mol.Catal.. B, Enzym.* **2010**, *66*, 55-62.
72. Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. A Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *J. C. Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 417-422.
73. Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. A model of the pressure dependence of the enantio selectivity of *Candida rugosa* lipase towards (+/-)-menthol. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 473-479.

ANEXOS

Espectros seleccionados

Espectro de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) para (R,S)-1-feniletanol

Espectro de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) para (R,S)-1-feniletanol

Spectrum

Peak#:1 R.Time:5.373(Scan#:476)

MassPeaks:30

RawMode:Averaged 5.370-5.380(475-477)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

Espectro de Massas CG-MS (EI) do (R,S)-1-feniletanol

Espectro de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) para Acetato de 1-feniletila

Peak#:1 R.Time:7.118(Scan#:824)

MassPeaks:31

RawMode:Averaged 7.110-7.120(823-825)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

Espectro de Massas CG-MS (EI) do Acetato de (*R,S*) 1-feniletila

Espectro de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) para Palmitato de *p*-Nitrofenila

Spectrum

Peak#:1 R.Time:22.135(Scan#:3828)

MassPeaks:51

RawMode:Averaged 22.130-22.140(3827-3829)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

Espectro de Massas CG-MS (EI) do palmitato de *p*-Nitrofenila

Espectro de ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) para β-Benzilmercaptoetilamina

Espectro de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) para Ácido Benzilsulfanil- acético

Espectros de FT-IR

Espectro FT-IR de AgAu-CIS

Espectro FT-IR de AgAu-MAC

Espectro FT-IR de AgAu-PROP

Espectro FT-IR de AgAu-UND

Espectro FT-IR de AgAu-CIS-BCL.

Espectro FT-IR de AgAu-MAC-BCL

Espectro FT-IR de AgAu-PROP-BCL

Espectro FT-IR de AgAu-UND-BCL

Imagens de MEV e MET

Imagem de TEM de AgAu-CIS-BCL

Imagem de TEM de AgAu-MAC-BCL

Imagem de TEM de AgAu-PROP-BCL

Imagem de TEM de AgAu-UND-BCL

Imagem de MEV de AgAu NSs.

Zoom da imagem de MEV de AgAu NSs.

Camila de Menezes Kisukuri

Curriculum Vitae

Camila de Menezes Kisukuri

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Camila de Menezes Kisukuri
Nome em citações bibliográficas KISUKURI, C. M.; KISUKURI, CAMILA M.
Sexo Feminino

Cor ou Raça Amarela

Filiação Claudio Kisukuri e Luzia de Menezes Kisukuri
Nascimento 01/03/1988 - assis/SP - Brasil
Carteira de Identidade 446598148 ssp - SP - 11/12/1997
CPF 368.671.638-07

Endereço residencial Avenida Independência, n 190
jardim faria - Assis
19807-160, SP - Brasil
Telefone: 18 33246247

Endereço eletrônico

E-mail para contato : kisukuri@hotmail.com
e-mail alternativo : kisukuri@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2012 Mestrado em Química Orgânica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Biocatálise
Orientador: Leandro Helgueira de Andrade
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2007 - 2011 Graduação em Química.
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil
Orientador: Maria Helena Sarragiotto

Atuação profissional

1. Universidade Estadual de Maringá - UEM

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Outro (especifique) , Enquadramento funcional: pesquisa

2. universidade sem fronteiras - USF

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Bolsista extensão , Enquadramento funcional: extensão universitária , Carga horária: 20

Áreas de atuação

1. Química

Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa**2011 - 2012** Síntese de novos derivados potencialmente ativos contendo o núcleo benzimidazólico com diferentes heterociclos na posição-2

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Camila de Menezes Kisukuri (Responsável); ;

2010 - 2010 Síntese e caracterização de novas 3-(-4-oxo-tiazolinil)-beta-carbolinas contendo o grupo 1-fenilssubstituído na posição-1

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Camila de Menezes Kisukuri (Responsável); ;

2010 - 2011 Síntese e caracterização de novos derivados b-carbolínicos contendo o grupo 2-imino-4-tiazolidinona na posição-3

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Camila de Menezes Kisukuri (Responsável); ;

2009 - 2010 Síntese e caracterização de derivados 3-[-2-ona-1,3,4-oxadiazol-5-il]-beta-carbonílicos-1-1fenilssubstituídos

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Camila de Menezes Kisukuri; maria helena sarragiotto (Responsável)

Projeto de extensãoProjeto de extensão**2008 - 2008** O Ensino de Química Integrando a Universidade Estadual de Maringá com Escolas Públicas da Periferia com vistas a uma formação cidadã.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (4); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Camila de Menezes Kisukuri; maria aparecida rodrigues (Responsável)

2008 - 2008 Apoio aos Professores de Química: Parceria entre escola e a Universidade

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Camila de Menezes Kisukuri (Responsável); ;

Outros tipos de projetosOutros tipos de projetos**2009 - 2009** Monitoria na Disciplina de Química Orgânica

Situação: Concluído Natureza: Outros tipos de projetos
Integrantes: Camila de Menezes Kisukuri (Responsável); ;

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente
--------	--

Prêmios e títulos

2010	"Prêmio de Química", maior média entre os alunos matriculados na terceira série do curso de Química Licenciatura, Universidade Estadual de Maringá
2009	"Prêmio de Química", maior média entre os alunos matriculados na terceira série do curso de Química Licenciatura, Universidade Estadual de Maringá

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. KISUKURI, CAMILA M., MACEDO, ALEXANDRA, OLIVEIRA, CAIO C. S., CAMARGO, PEDRO H. C., ANDRADE, LEANDRO H.
Investigating the Influence of the Interface in Thiol-Functionalized Silver-Gold Nanoshells over Lipase Activity. *Langmuir*. , v.29, p.15974 - 15980, 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Vários. Home page: [\[http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la404081n\]](http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la404081n) [doi:10.1021/la404081n]

Artigos aceitos para publicação

1. SAVARIZ, F. C., BARBOSA, V. A., KISUKURI, C. M., RUIZ, A. L., FOGLIO, M. A., CARVALHO, J. E., MEYER, E., SARRAGIOTTO, M. H.
Synthesis and Antitumor Activity of Novel 1-Substituted phenyl-3-(2- alkylamino-1,3,4-oxadiazol-5-yl)-β-carboline Derivatives. *Medicinal Chemistry (Hilversum)*. , 2011.

Palavras-chave: alkaloid, 2-alkylamino-1,3,4-oxadiazole., antitumor, cancer, b-carboline, synthesis

Áreas do conhecimento : Química

Referências adicionais : Inglês.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **36 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2013. (Congresso)
Nanopartículas bimetálicas de Au/Ag como suporte de enzimas: um estudo sobre atividade

enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia*.

2. **Zing Conference Biocata**, 2012. (Congresso)

Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on Au-Ag nanoparticles.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **34 Reunião Anual, Sociedade Brasileira de Química**, 2011. (Encontro)

Síntese e avaliação da atividade antitumoral de β -carbolidinas contendo o grupo carboidrazida-(3-etil-4-oxo-tiazolidin-2-ilideno) na posição-3.

4. Apresentação Oral no(a) **XX Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2011. (Encontro)

Síntese e Caracterização de Novos Derivados b-Carbonílicos contendo o grupo 2-Imino-4-Tiazolidonona na posição-3.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII Encontro de Química da Região Sul**, 2010. (Encontro)

Síntese e atividade Antitumoral de derivados de 3-(2-alquiloamino-1,3,4-oxadiazol-5-il)-b-carbonílicos.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010. (Encontro)

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE b-CARBOLINAS CONTENDO O GRUPO 2-ONA-1,3,4- OXADIAZOLIL NA POSIÇÃO-3.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII Encontro de Química da Região Sul**, 2010. (Encontro)

Síntese e caracterização de novas N2-(2-fenilssubstituído-4-tiazolidinona)-triptamiinas.

8. Apresentação Oral no(a) **XIX Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2010. (Encontro)

Síntese e Caracterização de novas 3-(4-oxo-tiazolinil)-b-carbolinas contendo grupo 1-fenilsubstituído na posição-1.

9. Conferencista no(a) **Semana de Integração nas Ciências Exatas**, 2010. (Outra)

Tópicos Básicos de Química.

10. **XXVI Semana de Química**, 2010. (Outra)

.

11. **XV Encontro Nacional de Ensino de Química**, 2010. (Encontro)

.

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII SBQSUL**, 2009. (Congresso)

Síntese e avaliação da atividade antitumoral de 9-metil-9-carbolinas-3-benzilidenocarboidrazidas.

13. **XXV Semana de química**, 2009. (Outra)

.

14. **XXIV Semana de química**, 2008. (Outra)

.

15. **XXIII Semana de química**, 2007. (Outra)

.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	1
Artigos aceitos para publicação.....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	3
Participações em eventos (encontro).....	7
Participações em eventos (outra).....	5

Artigo Publicado

Investigating the Influence of the Interface in Thiol-Functionalized Silver–Gold Nanoshells over Lipase Activity

Camila M. Kisukuri,[†] Alexandra Macedo,[‡] Caio C. S. Oliveira,[‡] Pedro H. C. Camargo,^{*,‡} and Leandro H. Andrade^{*,†}

[†]Laboratório de Química Fina e Biotcatálise and [‡]GrAND - Grupo para o Avanço no Design de Nanomateriais, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, SP 05508-900 São Paulo, Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: We employed thiol-functionalized AgAu nanoshells (AgAu NSs) as supports for the covalent attachment of lipases (BCL, *Burkholderia cepacia* lipase; PPL, pancreatic porcine lipase). Specifically, we were interested in investigating the effect of the nature/size of the spacer in AgAu NSs-functionalized organic thiols over the covalent attachment of lipases. The catalytic performance of AgAu-lipase systems was measured in the kinetic resolution of (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol via a transesterification reaction. In comparison to free BCL, the lipase attached to AgAu NSs using a small spacer such as cysteamine or mercaptoacetic acid, with the largest spacer mercaptoundecanoic acid, had the fastest conversion rate. The recycling potential for BCL was investigated. After three reaction cycles, the enzyme activity was kept at around 90% of the initial value. The results described herein show that the size of the spacer plays an important role in optimizing lipase activities in metallic nanoshells as solid supports.

1. INTRODUCTION

Lipases can be considered to be remarkable biocatalysts because they are able to catalyze several reactions such as hydrolysis, esterification, transesterification, alcoholysis, and acidolysis.^{1–5} Enzymes such as lipases have important synthetic properties such as high chemoselectivity, stereoselectivity, and regioselectivity.^{6,7} Moreover, lipases do not require cofactors, and their stability and tolerance to organic solvents have also increased their use as synthesis tools.^{8–10}

The attachment of enzymes to solid supports has been studied mainly to improve the stability, recyclability, and, in several cases, activity.^{11–15} In fact, an immobilized enzyme can be efficiently used under high temperatures and in the presence of several organic solvents.^{16–18} Regarding solid supports, nanomaterials have received a great deal of attention with respect to the attachment of biomolecules, allowing wide applications in chemistry, physics, and biology.^{19–22} Among all classes of nanomaterials, hollow systems are especially appealing because their hollow interiors provide higher surface to volume ratios relative to their solid counterparts.^{23,24}

In this work, we employed thiol-functionalized AgAu nanoshells (AgAu NSs) as supports for the covalent attachment of lipases, BCL, and PPL (BCL, *Burkholderia cepacia* lipase; PPL, pancreatic porcine lipase). Specifically, we were interested in investigating the effect of the interface between Ag–Au NSs and functionalized organic thiols over lipase immobilization and the resulting activity. Organic thiols (mercapto-alkane amine and mercapto-alkanecarboxylic acid), named as spacers between lipase and AgAu NSs, were chosen because it is well

established that thiol groups bind strongly to metal surfaces, including Au and Ag.^{25,26} The selected lipases were *Burkholderia cepacia* lipase, which is frequently employed for the kinetic resolution of secondary alcohols, and porcine pancreatic lipase, which has been widely applied in hydrolysis reactions.^{27,28} By changing the organic thiols (spacers), we expected to find optimal conditions to increase enzyme activity. The efficiency of this protocol was measured in the kinetic resolution of (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol via a transesterification reaction.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials. *Burkholderia cepacia* lipase (amano lipase PS) and porcine pancreatic lipase (type II) were purchased from Sigma-Aldrich. Solvents were purified by standard procedures. The chemicals are commercially available and were used without further purification. GC analyses were performed in a Shimadzu GC-17A instrument with an FID detector using hydrogen as a carrier gas (100 kPa). Chiral column Chirasil-Dex CB β -cyclodextrin (25 m $\times$ 0.25 mm) was used for the determination of enantiomeric excesses.

2.2. Synthesis of Silver–Gold Nanoshells (AgAu NSs). The Ag NPs were employed as sacrificial templates in a galvanic replacement reaction with AuCl_4^- (aq) to afford AgAu NSs.

AgNO_3 (180 mg) was dissolved in 1000 mL of water. The solution was brought to a boil, and 20 mL of $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (34 mM) was added. The reaction boiled for 1 h to give a Ag NP dispersion.

Received: August 21, 2013

Revised: November 29, 2013

Published: December 6, 2013

An aqueous PVP solution (500 mL, 1 mg/mL) was heated to 100 °C, and a 300 mL aliquot of the above Ag NP dispersion was added. After 10 min, 600 mL of 0.2 mM AuCl_4^- (aq) was added dropwise. The reaction proceeded for another 10 min. The resulting nanoparticles were washed three times with water by successive rounds of centrifugation at 6000 rpm and the removal of the supernatant.²⁴

2.3. Synthesis of Functionalized Gold–Silver Nanoparticles (AgAu-Functionalized). The Ag–Au NSs (3 mg), the organic thiols (cysteamine, mercaptoacetic acid, mercaptopropionic acid, and 0.5 mmol of mercaptoundecanoic acid), and ethanol (4 mL) were added to a 15 mL Falcon conical tube. After being stirred at 25 °C for 2 h (Thermomixer), the functionalized Ag–Au NSs were removed from the reaction mixture by centrifugation and then washed with water (3×3 mL). The functionalized AgAu NSs were kept in water (1 mL) for further studies. They were named AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP, and AgAu-UND for AgAu NSs functionalization with cysteamine, mercaptoacetic acid, mercaptopropionic acid, and mercaptoundecanoic acid, respectively.

2.4. Activation of Functionalized Nanoshells (AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP, and AgAu-UND NSs) for Further Covalent Lipase Attachment. **2.4.1. Activation of AgAu-CIS via Glutaraldehyde.** In a 2 mL microtube (Eppendorf) containing AgAu-CIS (3 mg) was added glutaraldehyde (50 μL , 25% aqueous solution). After stirring for 1 h at 25 °C and 800 rpm (Thermomixer), the resulting material (AgAu-CIS-Glu) was removed from the reaction mixture by centrifugation, and then washed with water (3×2 mL). The AgAu-CIS-GLU NSs were kept in water (1 mL) for further use.

2.4.2. Activation of AgAu-MAC, AgAu-PROP, and AgAu-UND NSs via EDC. In a 2 mL microtube (Eppendorf) containing AgAu-MAC, AgAu-PROP, or AgAu-UND (3 mg) was added an EDC solution [5 mL, 2% v/v, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride]. After stirring for 30 min in a sonicator at 25 °C, the resulting EDC-functionalized NSs were removed from the reaction mixture by centrifugation and then washed with water (3×2 mL). The nanostructures (AgAu-MAC-EDC, AgAu-PROP-EDC, and AgAu-UND-EDC) were maintained in water (1 mL) for further studies.

2.5. General Method for Lipase Attachment on AgAu-Functionalized NSs. To a 2 mL microtube (Eppendorf) containing AgAu-functionalized NSs (AgAu-CIS-GLU, AgAu-MAC-EDC, AgAu-PROP-EDC, and AgAu-UND-EDC (3 mg), section 2.4.) was added 1 mL of lipase solution (50 mg/mL BCL solution or 45 mg/mL PPL solution) in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). The resulting mixture was stirred at 32 °C for 1 h and 800 rpm (Thermomixer). The functionalized NSs loaded with lipases were removed from the reaction mixture by centrifugation and then washed with water (4×2 mL). The AgAu-lipase systems (attached to BCL: AgAu-CIS-GLU-BCL, AgAu-MAC-BCL, AgAu-PROP-BCL or AgAu-UND-BCL; attached to PPL: AgAu-CIS-GLU-PPL, AgAu-MAC-PPL, AgAu-PROP-PPL, or AgAu-UND-PPL) were maintained in phosphate buffer (pH 7.0, 1 mL) for further studies.

2.6. Measurements and Characterization. Field-emission scanning electron microscopy (FEG-SEM) images were obtained with an FEG-SEM JSM 6330F Jeol microscope operated at 5 kV. The samples were prepared by drop-casting an aqueous suspension of the washed nanostructures over a silicon wafer, followed by drying under ambient conditions. Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained with a Jeol 1010 microscope operated at 80 kV. The samples were prepared by drop-casting an aqueous suspension containing the nanomaterials over a carbon-coated copper grid, followed by drying under ambient conditions. The IR spectra were recorded at room temperature on a BOMEM MB-100 (Hartman–Braun) FTIR spectrometer equipped with a standard DTGS/KBr detector in the range of 4000–400 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} by Win-Bomem Easy software. The samples were prepared in a microtube (Eppendorf) where they were dried in a vacuum pump and subjected to analysis.

2.7. Enzyme Activity: Kinetic Resolution of (*R,S*)-1-(Phenyl)-ethanol via a Transesterification Reaction with Vinyl Acetate. In a 2 mL microtube (Eppendorf) containing the AgAu-lipase systems (3 mg), (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol (0.002 mmol) and vinyl acetate (0.07

mmol) were dispersed in toluene (1 mL) and stirred at 32 °C, 800 rpm (Thermomixer) for the appropriate time as indicated in Tables 2 and 3.

2.8. Recycling Studies. For the recycling studies with immobilized *Burkholderia cepacia* lipase, the same reaction protocol described in section 2.7 was employed. After each reaction cycle, the AgAu-functionalized-BCL systems were removed by centrifugation and then washed with toluene (3×2 mL) and used for the next cycle.

2.9. GC Analysis for the Determination of the Enantiomeric Excess. The enantiomeric excesses of (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol and (*R*)-1-(phenyl)ethyl acetate were analyzed by CG/FID in a chiral capillary column (Chirasil-Dex CB-Varian). CG conditions: injector, 220 °C; detector, 110 °C; pressure, 100 kPa; column temperature, 120 °C; 1 °C/min up to 200 °C. Retention times for (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol: (*R*) = 5.8 min, (*S*) = 6.0 min. Retention times for (*R,S*)-1-(phenyl)ethyl acetate: (*R*) = 4.3 min, (*S*) = 3.7 min.

2.10. Protein Determination. The protein content was determined by the Bradford method.²⁹ A calibration curve was obtained at 595 nm in a spectrophotometer (Biospectro, sp-220) by the use of bovine serum albumin (BSA) as a standard protein solution at different concentrations.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Synthesis of Gold–Silver Nanoshells (AgAu NSs).

The synthesis of AgAu NSs was performed by a galvanic replacement reaction between spherical Ag NPs and AuCl_4^- .²⁴ The galvanic reaction represents a simple and versatile strategy for the one-step, aqueous-phase synthesis of bimetallic nanostructures having hollow interiors and ultrathin walls. Figure 1 shows SEM and TEM (inset) images of AgAu NSs

Figure 1. SEM and TEM (inset) images for AgAu NSs with a 44.5 ± 8.2 nm outer diameter and ~ 7 nm shell thickness. The scale bar in the inset corresponds to 15 nm.

obtained by this approach. It can be observed that the AgAu NSs were uniform and spherical. They were 44.5 ± 8.2 nm in diameter and ~ 7 nm in shell thickness. Also, the formation of the hollow interiors can be clearly visualized as dark spots at the center of each AgAu NSs in the SEM image as well as the difference in mass–thickness contrast in the TEM image (inset) in which the border of the AgAu NSs is darker relative to the interior. Owing to their hollow interiors and ultrathin walls, which enable high surface to volume ratios, the obtained AgAu NSs were then employed as supports for lipase attachment.

3.2. Functionalization of AgAu NSs with Organic Thiols (AgAu-Functionalized). AgAu NSs were functionalized with cysteamine, mercaptoacetic acid, mercaptopropionic acid, and mercaptoundecanoic acid in order to include free amino and carboxyl functional groups at the surface of the AgAu NSs (AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP, and AgAu-UND) (Scheme 1). These groups are essential for further

Scheme 1. Functionalization of AgAu NSs with Cysteamine, Mercaptoacetic Acid, Mercaptopropionic Acid, and Mercaptoundecanoic Acid

Figure 2. Molecules employed to functionalize the AgAu NSs. The sizes of the molecules were determined by ChemBio3D Ultra 12.0 software according to its most stable conformation.

covalent lipase attachment. The different carbon chain sizes and functional groups of the organic thiols were selected to evaluate their influence on enzyme activity after lipase attachment.

To estimate the difference between these spacers, a computational illustration for each thiol structure is presented in Figure 2. The size of the spacers was modeled by using ChemBio 3D Ultra version 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA) following energy minimization with MM2.³⁰

It can be observed that mercaptoacetic acid has the smallest chain size, 3.19 Å, whereas mercaptoundecanoic acid has the largest one, 16.59 Å. However, mercaptopropionic acid and cysteamine have similar sizes, corresponding to 4.85 and 4.68 Å, respectively. In spite of the size similarity, these two spacers provided different approaches for lipase attachment because the functionalization of AgAu NSs with cysteamine afforded nanoparticles containing free amino groups, and those that were functionalized with carboxylic acids afforded nanoparticles containing free carboxylic groups. Then, lipase attachment to

these nanoparticles by using different protocols can result in different enzyme activities (section 3.4).

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to identify the organic functionalization of the AgAu NSs. The spectra for AgAu NSs before and after functionalization are presented in Figure 3A–C. Several differences can be observed in the FTIR spectra for Ag–Au NSs functionalization. For the AgAu NSs functionalized with cysteamine (NAgAu-CIS, Figure 3B), the characteristic bands at 3435 cm^{-1} attributed to the in-plane bending vibrations of N–H from NH_2 groups could be clearly detected. The spectra for AgAu NSs functionalized with mercaptoacetic acid, mercaptopropionic acid, and mercaptoundecanoic acid showed bands in the $1648\text{--}1687$ and $3434\text{--}3435\text{ cm}^{-1}$ ranges that correspond to the C=O stretching modes and OH stretching vibrations, respectively (FTIR spectrum of mercaptopropionic acid-functionalized AgAu NSs, Figure 3C. (For complete characterization, see the Supporting Information.)

Figure 3. FTIR spectra for (A) AgAu, (B) AgAu-CIS, and (C) AgAu-MAC.

Figure 4A–D displays TEM images for the functionalized AgAu NSs (AgAu-CIS, AgAu-MAC, AgAu-PROP, and AgAu-UND, respectively). In all cases, the spherical shape and nanoshell morphology were maintained, indicating that the functionalization step did not lead to structural changes in the AgAu NSs. Also, it is possible to observe in the images the presence of a thin organic layer at the surface of the AgAu NSs as a result of surface functionalization (details in the Supporting Information).

3.3. Attachment of Lipases to AgAu-Functionalized NSs.

Because the AgAu-functionalized NSs have free amino and carboxyl groups, the lipases (BCL and PPL) were attached to those nanoparticles by covalent methods as depicted in Scheme 2. Initially, the AgAu-CIS NSs were treated with glutaraldehyde to afford AgAu-CIS-GLU (Scheme 2A). This system, now containing the aldehyde function, can react with the free amino group from the lipase (BCL or PPL) to give AgAu-lipase systems (AgAu-CIS-GLU-LIPASE) via imine formation. However, the AgAu-functionalized NSs with carboxyl groups (AgAu-MAC, AgAu-PROP, and AgAu-UND) were treated with EDC (1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide hydrochloride). This step involves the conversion of the carboxyl group to an active ester, allowing the binding of the lipase to the nanoparticles via amide formation (Scheme 2B).

The amount of lipase attached to the AgAu NSs as a function of time was evaluated by the Bradford method, and the results are shown in Table 1. Immobilization of the lipase can also be confirmed by FTIR experiments (details in Supporting Information).

As can be seen in Table 1, there was no significant difference in the amount of immobilized lipase as a function of the immobilization time. On the basis of these results, an immobilization time of 1 h was selected for further studies. TEM images for the AgAu-lipase systems are shown in Figure 4E–L. As previously mentioned, it can be observed that the functionalization process did not lead to structural changes in the AgAu NSs morphology. Also, the presence of an organic layer over the surface of the AgAu NSs can be detected, which is in agreement with lipase immobilization.

Figure 4. TEM images of functionalized AgAu NSs: (A) AgAu-CIS, (B) AgAu-MAC, (C) AgAu-PROP, and (D) AgAu-UND. TEM images of functionalized AgAu NSs after enzyme immobilization: (E) AgAu-CIS-GLU-BCL, (F) AgAu-MAC-BCL, (G) AgAu-PROP-BCL, (H) AgAu-UND-BCL, (I) AgAu-CIS-GLU-PPL, (J) AgAu-MAC-PPL, (K) AgAu-PROP-PPL, and (L) AgAu-UND-PPL.

Scheme 2. Lipase Attachment to AgAu-Functionalized NSs via the (A) Glutaraldehyde and (B) EDC Methods^a

^a(i) Glutaraldehyde (25% v/v). (ii) Lipase (BCL or PPL), 800 rpm, 1 h, 32 °C. (iii) EDC, 0.5 h, 25 °C.

Table 1. Amount of Lipase Attached to AgAu NSs by Using Different Immobilization Times

AgAu-functionalized	lipase amount (mg)			
	BCL (1 h)	BCL (2 h)	PPL (1 h)	PPL (2 h)
AgAu-CIS-GLU	0.275	0.282	0.035	0.042
AgAu-MAC	0.278	0.275	0.035	0.038
AgAu-MAP	0.152	0.155	0.037	0.035
AgAu-UND	0.190	0.186	0.050	0.048

3.4. Investigation of the Enzyme Activity for the AgAu-Lipase Systems. The lipase activity for each AgAu NS system as a function of the nature of the spacer and for each free lipase was evaluated in the kinetic resolution (KR) of (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol **1** via a transesterification reaction, according to Scheme 3. The results are shown in Tables 2 and 3.

Scheme 3. Kinetic Resolution of (*R,S*)-1-(Phenyl)ethanol **1** by a Lipase-Catalyzed Transesterification Reaction

Free enzyme BCL was able to catalyze the formation of (*R*)-1-(phenyl)ethyl acetate **2** with 12% conversion after 6 h (Table 2, entry 5). As we can see in this table, we have shown reaction times of only 6 and 12 h, in which the complete conversion of substrate **R** to its acetylated form (50%) was achieved.

For example, AgAu-Cis-GLU-BCL was able to catalyze the conversion of enantiomer (*R*)-1-(phenyl)ethanol into (*R*)-1-(phenyl)ethyl acetate in 6 h (Table 2, entry 1), whereas free BCL at the same time showed only 12% conversion (Table 2, entry 5). The reaction time for achieving 50% conversion was different for immobilized and free lipase. The immobilized lipase was able to convert the substrate faster than the free

Table 2. Kinetic Resolution of (*R,S*)-1-(Phenyl)ethanol by Free and Immobilized BCL^a

entry	AgAu-lipase	e.e.s. (%) ^b	e.e.p. (%) ^c	conv (%) ^d	time (h)	<i>E</i> ^e
1	AgAu-CIS-Glu-BCL	>99	>99	50	6	>200
2	AgAu-MAC-BCL	>99	>99	50	6	>200
3	AgAu-PROP-BCL	>99	>99	50	12	>200
4	AgAu-UND-BCL	>99	>99	50	12	>200
5	BCL free	13.7	>99	12	6	>200

^aReaction conditions: (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol (0.002 mmol), lipase, vinyl acetate (0.07 mmol), toluene (1 mL), 32 °C, and 800 rpm. ^be.e.s.: enantiomeric excess substrate was determined by chiral GC analysis. ^ce.e.p.: enantiomeric excess product was determined by chiral GC analysis. ^dconv = conversion = e.e.s/(e.e.s + e.e.p). ^e*E* = {ln[e.e.p(1 - e.e.s)]/(e.e.p + e.e.s)}/{ln[e.e.p(1 + e.e.s)]/(e.e.p + e.e.s)}.

Table 3. Kinetic Resolution of (*R,S*)-1-(Phenyl)ethanol by Free and Immobilized PPL^a

entry	AgAu-lipase	e.e.s. (%) ^b	e.e.p. (%) ^c	conv (%) ^d	time (h)	<i>E</i> ^e
1	AgAu-CIS-Glu-PPL		>99	1	72	
2	AgAu-MAC-PPL				72	
3	AgAu-PROP-PPL		>99	0.5	72	
4	AgAu-UND-PPL	4	>99	4	72	207
5	PPL free				72	

^aReaction conditions: (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol (0.002 mmol), lipase, vinyl acetate (0.07 mmol), toluene (1 mL), 32 °C, and 800 rpm. ^be.e.s.: enantiomeric excess substrate was determined by chiral GC analysis. ^ce.e.p.: enantiomeric excess product was determined by chiral GC analysis. ^dconv = conversion = e.e.s/(e.e.s + e.e.p). ^e*E* = {ln[e.e.p(1 - e.e.s)]/(e.e.p + e.e.s)}/{ln[e.e.p(1 + e.e.s)]/(e.e.p + e.e.s)}.

enzyme (Tables 2 and 3). An explanation of this behavior is that the immobilization step can provide greater rigidity to the enzyme, which can result in more enzyme stability with respect to the organic solvent. This behavior has been observed on several immobilized enzymes. Because several substrates for enzymatic reactions are very soluble in organic solvent, the

immobilization approach has also been used to ensure the application of enzymatic reactions on organic synthesis.³¹

For all AgAu NSs, lipase immobilization did not cause any changes in the enantioselectivity of the lipase (Table 2). The free and immobilized lipase converted substrate (*R*)-1-(phenyl)ethanol exclusively to its acetylated form.

The main difference that could be observed between the lipase immobilized on AgAu NSs using different “spacers” was on product conversion. BCL attached to AgAu NSs with a spacer containing short carbon chains was able to convert the substrate faster than BCL attached with a larger spacer. In this case, the lipase attachment on functionalized AgAu NSs using smaller spacers can provide more rigidity to the enzyme, causing more stability in an organic solvent, which would explain the benefits obtained in substrate conversion by the immobilized enzyme.

In an attempt to apply PPL to the transesterification reaction, this lipase was immobilized on AgAu NSs. Free PPL was not able to afford the product, showing no activity for this reaction, even with a long reaction time of 72 h (Table 3, entry 5).

However, when the AgAu-PPL systems were used as biocatalysts, interesting results were obtained and product formation was achieved (4%, Table 3, entry 4). However, in an attempt to increase the product formation, the kinetic resolution was extended to 24 and 48 h but no increase in conversion was observed. Temperatures of 40 and 28 °C were tested, but no conversion was observed in these cases. As previously mentioned, PPL did not convert substrate (*R,S*)-1-(phenyl)ethanol, but our purpose was to improve the enzyme activity by lipase covalent attachment to AgAu NSs. In fact, an increase in the conversion values for the immobilized porcine lipase was observed. Despite low values, immobilized PPL in three different functionalized AgAu NSs exhibited activity with great selectivity, showing that the immobilized lipase was a good alternative to improving its activity. Because enzymes are organic polymers, the environment in which they can be maintained, such as the presence of organic solvents, different pH values and temperatures, and even attachment to some supporting material, is very important to enzyme activity. These external factors can cause very small structural modifications, which can provide the enzyme active site at the right position to act as a catalyst for the desired reaction.³¹

The kinetic study with *Burkholderia cepacia* lipase also was carried out and compared to the free enzyme. The conversion of substrate (*R*)-1-(phenyl)ethanol to (*R*)-1-(phenyl)ethyl acetate was followed by GC analysis (Figure 5).

Figure 5 shows that in the first 6 h of reaction the immobilized enzymes almost completely converted the

Figure 5. Kinetic study of immobilized *Burkholderia cepacia* lipase.

substrate whereas in 6 h free enzyme converted 12% of the substrate at the same reaction time.

After 2 h of reaction with AgAu-CIS-GLU-BCL, AgAu-MAC-BCL, and AgAu-UND-BCL, high values of conversion were reached. Those systems showed 28, 30, and 33% conversions, respectively, whereas free enzyme converted only 2% of the substrate. When the reaction was around 4 h, AgAu-CIS-GLU-BCL and AgAu-UND-BCL reached conversions of 44 and 43% whereas the AgAu-BCL-MAC system showed 35% conversion, exhibiting a slight lower enzyme activity. System AgAu-PROP-BCL had the slowest rate of substrate conversion, 22%; however, after 12 h, high conversion was achieved. In comparison to free BCL, the lipase attached to AgAu NSs using a small spacer such as cysteamine or mercaptoacetic acid, with the largest spacer mercaptoundecanoic acid, had the fastest conversion rate.

The results described herein show that the size of the spacer plays an important role in optimizing lipase activities in metallic nanoshells as solid supports.

3.5. Recycling of Immobilized *Burkholderia cepacia* Lipase. The recycling of immobilized BCL was explored, and all systems could be reused at least three times (Figure 6).

Figure 6. Recycling *Burkholderia cepacia* lipase. The lipase activity was calculated by the ratio of the maximum KR conversion (50%).

Systems AgAu-CIS-GLU-BCL and AgAu-UND-BCL in the second cycle converted the entire substrate and maintained the maximum activity, whereas systems AgAu-MAC-BCL and AgAu-PROP-BCL in the second cycle had decreases of 3 and 20% in their enzymatic activity, respectively. Systems AgAu-CIS-GLU-BCL, AgAu-MAC-BCL, and AgAu-UND-BCL maintained a high enzymatic activity between 96 and 98% after the third cycle. System AgAu-PROP-BCL showed a loss of activity of 33%.

4. CONCLUSIONS

Two different lipases were attached to AgAu NSs by using different organic thiols as spacers. Depending on the size of the spacer, the enzyme activity could be tuned. In fact, our results showed that the enzyme immobilization on AgAu NSs represented a good strategy for increasing the enzyme activity. The BCL immobilized on AgAu-CIS-GLU showed better results as a biocatalyst in the model reaction (50% conversion in 6 h) than did free enzyme. Immobilized PPL on AgAu NSs had better results than free PPL and showed great selectivity. After support modification and lipase attachment, it was possible to confirm the hollow structures of these new materials and the immobilization of enzymes with techniques such as TEM, MEV, FT-IR, and the Bradford method. The recycling of

BCL was elucidated, and the AgAu-BCL systems can be efficiently used three times by maintaining a high enzyme activity (90%).

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Investigation of the AgAu NSs morphology. Characterization of functionalized AgAu NSs and BCL immobilized in AgAu NSs via FT-IR. Morphology investigation of AgAu NSs containing immobilized BCL. Assay of lipase activity for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: camargo@iq.usp.br.

*E-mail: leandroh@iq.usp.br.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to FAPESP and CNPq for financial support (FAPESP grant numbers 2011/06847-0, 2012/11201-4, and 2012/14196-1; CNPq grant number 471245/2012-7).

■ REFERENCES

- (1) Buthe, A.; Recker, T.; Heinemann, M.; Hartmeier, W.; Buchs, J.; Ansorge-Schomacher, M. B. pH-optima in lipase-catalysed esterification. *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 307–314.
- (2) Borowiecki, P.; Fabisiak, M.; Ochal, Z. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-(1,3-benzothiazol-2-ylsulfanyl)propan-2-ol with antifungal activity: a comparative study of transesterification versus hydrolysis. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4597–4602.
- (3) Attya, M.; Russo, A.; Perri, E.; Sindona, G. Endogenous lipase catalyzed transesterification of olive oil fats. The formation of isomeric and oligomeric triacylglycerols. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1247–1253.
- (4) Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E.; Miller, R. Lipases at interfaces: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147*, 237–250.
- (5) Bellusci, M.; Francolini, I.; Martinelli, A.; D'Ilario, L.; Piozzi, A. Lipase immobilization on differently functionalized vinyl-based amphiphilic polymers: influence of phase segregation on the enzyme hydrolytic activity. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 805–813.
- (6) Mala, J. G. S.; Takeuchi, S. Understanding structural features of microbial lipases-an overview. *Anal. Chem. Insights* **2008**, *3*, 9–19.
- (7) Ge, J.; Lu, D.; Wang, J.; Liu, Z. Lipase nanogel catalyzed transesterification in anhydrous dimethyl sulfoxide. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1612–1618.
- (8) Handayani, N.; Loos, K.; Wahyuningrum, D.; Ali Zulfikar, B.; Ali Zulfikar, M. Immobilization of *Mucor miehei* lipase onto macroporous aminated polyethersulfone membrane for enzymatic reactions. *Membranes* **2012**, *2*, 198–213.
- (9) Goldberg, M.; Thomas, D.; Legoy, M. D. The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *190*, 603–609.
- (10) Mahapatro, A.; Johnson, D. M.; Patel, D. N.; Feldman, M. D.; Ayon, A. A. A.; Agrawal, C. M. Surface modification of functional self-assembled monolayers on 316L stainless steel via lipase catalysis. *Langmuir* **2006**, *22*, 901–905.
- (11) Li, Q.; Fan, F.; Wang, Y.; Feng, W.; Ji, P. Enzyme immobilization on carboxyl-functionalized graphene oxide for catalysis in organic solvent. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 6343–6348.
- (12) Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnology* **2013**, *3*, 1–9.

- (13) Idris, A.; Bukhari, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 550–563.
- (14) Netto, C. G. C. M.; Toma, H. E.; Andrade, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J. Mol. Catal. B* **2013**, *85*–86, 71–92.
- (15) Gomes, F. M.; Pereira, E. B.; Castro, F. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 17–23.
- (16) Scherer, R.; Oliveira, J. V.; Pergher, S.; Oliveira, D. Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase. *Mater. Res.* **2011**, *14*, 483–492.
- (17) Malcata, F. X.; Reyes, H. R.; Garcia, H. S.; Hill, C. G.; Amundson, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 890–909.
- (18) Xun, E.; Lv, X.; Kang, W.; Wang, J.; Zhang, H.; Wang, L.; Wang, Z. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase onto magnetic nanoparticles for resolution of 2-octanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 697–707.
- (19) Ansari, S. A.; Husain, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotech. Adv.* **2012**, *30*, 512–523.
- (20) Malmiri, H. J.; Jahanian, M. A-G.; Berenjian, A. Potential of applications of chitosan nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *8*, 203–219.
- (21) Lee, J.; Mahendra, S.; Alvarez, P. J. J. Nanomaterials in the construction industry: a review of their applications and environmental health and safety considerations. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3580–3590.
- (22) Palocci, C.; Chronopoulou, L.; Venditti, I.; Cernia, E.; Diociaiuti, M.; Fratoddi, I.; Russo, M. V. Lipolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3047–3053.
- (23) Xia, B.; He, F.; Li, L. Preparation of bimetallic nanoparticles using a facile green synthesis method and their application. *Langmuir* **2013**, *29*, 4901–4907.
- (24) Petri, M. V.; Ando, R. A.; Camargo, P. H.C. Tailoring the structure, composition, optical properties and catalytic activity of Ag–Au nanoparticles by the galvanic replacement reaction. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *531*, 188–192.
- (25) Hegde, S.; Joshi, S.; Mukherjee, T.; Kapoor, S. Formation of gold nanoparticles via a thiol functionalized polyoxometalate. *Mater. Sci. Eng.* **2013**, *33*, 2332–2337.
- (26) Lee, S. Y.; Ahn, C. Y.; Lee, J.; Lee, J. H.; Chang, J. H. Rapid and selective separation for mixed proteins with thiol functionalized magnetic nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*, 279–284.
- (27) Kokkinou, M.; Theodorou, L. G.; Papamichael, E. M. Aspects on the catalysis of lipase from porcine pancreas (type VI-s) in aqueous media: development of ion-pairs. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2012**, *55*, 231–236.
- (28) Tomic, S.; Ramek, M. Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B* **2006**, *38*, 139–147.
- (29) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (30) Cha, K.; Cho, K.; Kim, M.; Kim, J.; Park, H. J.; Park, J.; Cho, W.; Park, J. Enhancement of the dissolution rate and bioavailability of fenofibrate by a melt-adsorption method using supercritical carbon dioxide. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 5565–5575.
- (31) Haouz, A.; Glandieres, J. M.; Alpert, B. Involvement of protein dynamics in enzyme stability: the case of glucose oxidase. *FEBS Lett.* **2001**, *506*, 216–220.