



Universidade do Algarve

Formação de camadas de biosílica ou dióxido de titânio
em nanopartículas de Fe_3O_4 a partir da imobilização de
Glu-tag silicateína- α

Juaci João de Souza Neto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor Werner E.G. Müller e
coorientado pelo Professor Doutor José M. Leitão

2014

Formação de camadas de biosílica ou dióxido de titânio em nanopartículas de Fe_3O_4 a partir da imobilização de Glu-tag silicateína- α

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © **2014**, por _____

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“Não pergunte se somos capazes, dai-nos a missão”

(63º Batalhão de Infantaria, Exército Brasileiro)

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Werner E.G. Müller pela oportunidade de poder trabalhar no seu grupo de investigação e por todo o apoio prestado ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor José M. Leitão gostaria de expressar o meu agradecimento pelos ensinamentos e disponibilidade demonstrada durante a orientação desta dissertação de mestrado. Pela oportunidade e conhecimentos exprimo a minha gratidão.

Ao Doutor Thorben Link agradeço imensamente por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e pelos bons momentos passados nestes seis meses.

Aos colegas Maria Blazina, Dayane Sereno, Mirta Smodlaka, Emad Tolba e Alberto Manfrin agradeço ao acolhimento no laboratório, pela ajuda disponibilizada e conhecimentos transmitidos.

À minha família, mãe, pai e irmãos gostaria de agradecer o apoio dado em todos estes anos, pela paciência e pela confiança depositada.

À minha amiga e namorada Margarida Carvalheira, por toda a ajuda, paciência, e compreensão. Agradeço também a tua família por todo o carinho.

Ao Joaquim Madeira pelas incontáveis horas passadas nas salas de estudo, à Ana Raquel Porfírio pela amizade e humor negro nas horas necessárias e ao Flávio Abreu por mostrar-me que é possível fazer um relatório trabalhando dois dias seguidos.

Na impossibilidade de agradecer a todos os meus amigos, expresso a minha gratidão.

RESUMO

A síntese de revestimentos como biosílica ou TiO₂ em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ é de grande interesse no que diz respeito em manter as características intrínsecas do compósito, concedendo deste modo estabilidade e dispersão em meios aquosos, possibilitando inúmeras aplicações. Neste trabalho é apresentada uma estratégia de funcionalização de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ através da enzima Glu-tag silicateína- α , para posterior síntese de camadas de biosílica ou dióxido de titânio.

As nanopartículas de Fe₃O₄ monodispersas foram sintetizadas pelo método de decomposição térmica e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A camada de ácido oleico que confere estabilidade e propriedades hidrofóbicas às nanopartículas foi comprovada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com as bandas em 2923cm⁻¹, 1462cm⁻¹ e 2859cm⁻¹ das ligações C-H dos grupos CH₂ que são presentes no ácido oleico e também pela banda em 1378cm⁻¹ que é atribuída à vibração da ligação C=O do grupo carboxilato (COO⁻).

A funcionalização das nanopartículas de Fe₃O₄ foi realizada através da substituição da camada de ácido oleico das nanopartículas pela enzima Glu-tag silicateína- α (203 μ g/mL), expressa pelo vetor pBAD/gIII A, inserido na estirpe *E. coli* TOP10, e induzida por L-arabinose (0,2%). O resultado desta funcionalização, determinado por coloração de anticorpo, foi satisfatório.

Para a síntese das camadas de biosílica e TiO₂, através da Glu-tag silicateína- α imobilizada, as nanopartículas foram incubadas com os substratos TEOS (250 μ M) e Ti-BALDH (250 μ M). As camadas de biosílica e TiO₂ foram analisadas por MET e caracterizadas quimicamente por EDX.

Palavras-Chave: Nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄, Biosílica, Dióxido de titânio, Silicateína- α .

ABSTRACT

Coating Fe_3O_4 nanoparticles with biosilica or TiO_2 is great interest regarding the maintenance of the inherent characteristics of the composite thereby providing stability and dispersion in aqueous medium and allowing for countless applications. In this study a strategy was presented to functionalize magnetic nanoparticles through Glu-tag silicatein- α enzyme, for subsequent synthesis of biosilica or titanium dioxide layers.

Monodisperse Fe_3O_4 nanoparticles were synthesized by the thermal decomposition method and characterized by transmission electron microscopy (TEM). The oleic acid layer which lends stability and hydrophobic properties of the nanoparticles was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) with a band wavenumber at 2923cm^{-1} , 1462cm^{-1} e 2859cm^{-1} due to C-H bonds of the CH_2 groups present in oleic acid and also by the band at 1378cm^{-1} which is attributed to the stretching vibration of C=O bond of the carboxylate group (COO^-).

Functionalization of Fe_3O_4 nanoparticles was carried out through substitution of oleic acid layer of Fe_3O_4 nanoparticles by Glu-tag silicatein- α ($203 \mu\text{g/mL}$) enzyme, expressed by pBAD/gIII A vector, inserted into *E. coli* TOP10 strain, and induced with L-arabinose (0.2%). The result of this functionalization, determined by antibody staining, was satisfactory.

For the synthesis of TiO_2 and biosilica layers by immobilized Glu-tag silicatein- α , nanoparticles were incubated with the TEOS ($250 \mu\text{M}$) and Ti-BALDH ($250\mu\text{M}$) substrates. Biosilica and TiO_2 layers were analyzed by TEM and chemically characterized by EDX.

Keywords: Magnetic Fe_3O_4 Nanoparticles, Biosilica, Titanium Dioxide, Silicatein- α .

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanopartículas Magnéticas	1
1.2. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro	2
1.2.1. Co-precipitação	3
1.2.2. Decomposição térmica	3
1.2.3. Microemulsão	4
1.2.4. Síntese hidrotermal	4
1.2.5. Síntese sonoquímica	4
1.3. Funcionalização da superfície das nanopartículas	5
1.4. Silicateína	5
1.5. Silicateína - Uma enzima polimerizadora de sílica	6
1.6. Mecanismo de atividade da silicateína- α	7
1.7. Biocatálise de óxidos metálicos	8
1.8. Estratégias de imobilização da Silicateína- α	9
1.9. Potenciais aplicações da Silicateína- α	10
1.9.1. Aplicações Biotecnológicas	10
1.9.2. Aplicações Biomédicas	11
1.10. Objetivos	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. Materiais	13
2.1.1. Vetor de expressão e Linha celular	13
2.1.2. Anticorpos	13
2.2. Métodos	13
2.2.1. Expressão e purificação da Glu-tag silicateína- α	13
2.2.1.1. Expressão da Glu-tag silicateína- α	13

2.2.1.2.	Extração da Glu-tag silicateína- α	14
2.2.1.3.	Purificação da Glu-tag silicateína- α	14
2.2.1.4.	Quantificação da Glu-tag silicateína- α	15
2.2.1.5.	SDS-PAGE	15
2.2.1.6.	Western-Blotting	16
2.2.2.	Síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 com camada de ácido oleico	16
2.2.2.1.	Caracterização das nanopartículas Fe_3O_4	17
2.2.2.1.1.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	17
2.2.2.1.2.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	18
2.2.3.	Funcionalização das nanopartículas de Fe_3O_4	18
2.2.4.	Renaturação da Glu-tag silicateína- α imobilizada	19
2.2.5.	Síntese das camadas de biosílica e dióxido de titânio (TiO_2)	19
2.2.5.1.	Síntese da camada de biosílica	20
I.	Pré-hidrólise do TEOS	20
II.	Incubação com TEOS.....	20
2.2.5.2.	Síntese da camada de TiO_2	20
I.	Incubação com Ti-BALDH.....	20
2.2.6.	Caracterização da síntese de camadas de biosílica e TiO_2	20
I.	Análise por MET.....	21
II.	Caracterização por EDX	21
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1.	Expressão e Purificação da Glu-tag silicateína- α	23
3.1.1.	Gel de Purificação	23
3.1.2.	Caracterização da Glu-tag silicateína- α	24
3.2.	Síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 com camada de ácido oleico	25
3.2.1.	Caracterização da camada de ácido oleico por FTIR.....	27
3.3.	Funcionalização das nanopartículas de Fe_3O_4	28
3.3.1.	<i>Antibody staining</i> e microscopia de fluorescência	30
3.4.	Formação de camadas de biosílica e de TiO_2	31
3.4.1.	Síntese da camada de biosílica	32
3.4.2.	Síntese da camada de TiO_2	33
4.	CONCLUSÕES.....	36
5.	PERSPETIVAS FUTURAS.....	37
	BIBLIOGRAFIA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Exemplos de possíveis aplicações de nanopartículas magnéticas (adaptado [8]).....2
- Figura 1.2.** Modelo tridimensional da silicateína- α (*Suberites domuncula*). (A) Elementos da estrutura secundária estão marcados em vermelho (α -hélices) e azul (folhas β). O centro ativo (cc) da enzima compreendendo os aminoácidos (Ser), (His), e (Asn) estão apresentados em amarelo e os resíduos de Serina estão marcados na cor verde. (B) Distribuição de carga eletrostática da enzima: as manchas vermelhas representam as cargas positivas e as azuis as cargas negativas. O branco representa as áreas hidrofóbicas (adaptado [22]).....7
- Figura 1.3.** Mecanismo de polimerização catalisada pela silicateína partir do substrato ortossilicato. Passo 1: Ataque nucleófilo do átomo do oxigénio da Ser ao átomo de silício do substrato e transferência de um próton a partir do azoto da molécula de imidazol da His a um ligando de OH do ácido silícico. Passo 2: Libertação de uma molécula de água a partir do intermediário pentavalente formado. Passo 3: Ataque nucleófilo do átomo de oxigénio a partir de um dos ligandos OH da molécula de ácido silícico à uma segunda molécula de ácido silícico facilitado pela formação de pontes de hidrogénio entre o ácido silícico e o azoto do imidazol. Passo 4: Libertação de uma molécula de água após a transferência de prótons a partir do grupo imidazol. Ataque nucleófilo do átomo de oxigénio de um ligando OH da primeira molécula de ácido silícico, após rotação da ligação Si-O-C entre esta molécula e a Ser, ao átomo de silício de uma terceira molécula de ácido silícico, novamente facilitada pela ponte de hidrogénio com o azoto da molécula imidazol. Passo 5: Ciclização do ácido trissilícico e posterior libertação do anel trisiloxano da silicateína (adaptado [36]).....8
- Figura 2.1.** Imagem ilustrativa de um grid cobre de 3,05mm de diâmetro com uma camada de carbono e 200 poros, para análise por MET (A). Aplicação da amostra (imagem B) no grid para análise por MET.....21
- Figura 2.2.** Imagem ilustrativa de um Pin de alumínio com 12mm de diâmetro coberto com camada de carbono de 40 μ m para análise por EDX. A imagem B apresenta a amostra aplicada sobre a camada de carbono.....22
- Figura 3.1.** Gel de 12% de acrilamida relativo a purificação da enzima Glu-tag silicateína- α por cromatografia de afinidade por metal imobilizado. No gel, (1) o flow-through. (2) e (3) Fração de eluição 2; (4) e (5) Fração de eluição 1. (M) Marcador de peso molecular em kDa.....23
- Figura 3.2.** Reconhecimento da proteína Glu-tag silicateína- α por análise Western blot. Linha 1 representa uma amostra contendo a fração de eluato do processo de purificação. (M) representa o marcador de peso molecular em kDa.....24
- Figura 3.3.** Imagem por MET onde é possível visualizar a morfologia e dispersibilidade das nanopartículas de Fe₃O₄ com uma camada de ácido oleico, sintetizadas pelo método de decomposição térmica.....26
- Figura 3.4.** Espectro resultante da análise por FTIR para caracterização da camada de ácido oleico das nanopartículas de Fe₃O₄.....27
-

-
- Figura 3.5.** Representação esquemática da Glu-tag silicateína- α com destaque da cauda N-terminal com os 8 *tags* glutamato (esquema não representa a escala real) (adaptado [48])28
- Figura 3.6.** Imagem (A): frascos contendo as nanopartículas antes e depois da reação de imobilização da Glu-tag Silicateína- α . O frasco da esquerda contém na parte superior as nanopartículas dispersas em hexano enquanto a enzima de interesse encontra-se em tampão de eluição na parte inferior. O frasco da direita (imagem A) contém a amostra após a reação de imobilização da enzima na superfície das nanopartículas. A parte superior da mistura contém hexano. Na imagem (B), uma seta indica a interface entre as duas misturas onde ocorre a reação de troca do ácido oleico pelas enzimas nas nanopartículas.....29
- Figura 3.7.** Nanopartículas de Fe_3O_4 com a enzima Glu-tag silicateína- α imobilizada na sua superfície dispersas em água destilada (A). Na imagem (B) é efetuado um teste para verificar as propriedades magnéticas das nanopartículas. Utilizou-se um íman de neodímio para efetuar o teste.....30
- Figura 3.8.** Imagens de microscopia para verificar a imobilização da Glu-tag silicateína- α nas nanopartículas de Fe_3O_4 por fluorescência do 2º anticorpo com o fluoróforo conjugado. As imagens (A) e (B) representam a amostra tratada com os anticorpos. Na imagem (B) é possível observar a emissão de fluorescência do 2º anticorpo na amostra quando excitado com um comprimento de onda de 492nm. As imagens (C) e (D) representam o controlo onde é possível verificar a ausência de fluorescência na imagem (D). As escalas das imagens são 200 μm 31
- Figura 3.9.** Imagens por MET das amostras incubadas com o substrato TEOS por 5 dias. Imagem (A) representa o controlo (nanopartículas sem a enzima imobilizada na sua superfície). (B) Formação de biosílica a volta das nanopartículas.....32
- Figura 3.10.** Imagem feita por MET (A) e caracterização da mesma amostra por EDX (B), onde é possível verificar o pico referente a silício (Si), confirmando a formação de biosílica ao redor das nanopartículas.....33
- Figura 3.11.** Imagens por MET das amostras incubadas com o substrato Ti-BALDH durante 5 dias. Imagem (A) representa o controlo (nanopartículas sem a enzima imobilizada na sua superfície). (B) Formação de TiO_2 a volta das nanopartículas.....34
- Figura 3.12.** Imagem obtida por MET (A) e caracterização da mesma amostra por EDX (B), onde é possível verificar o pico referente ao titânio (Ti), confirmando a formação de TiO_2 ao redor das nanopartículas.....34
-

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 3.1. Histograma com a distribuição de diâmetros e curva normal, construído através do *software* estatístico SPSS com valores referentes ao diâmetro das nanopartículas de Fe₃O₄ coletados através do software de imagem do MET.....26

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1. Exemplos de metodologias de imobilização da silicateína- α baseado em doze artigos publicados [1][37][40][42]-[51]. A imobilização da silicateína em superfícies sólidas baseia-se na modificação genética da sequência da silicateína nativa para se obter uma proteína híbrida que transporta um ou dois marcadores de afinidade: (i) uma cauda C-terminal compostas por Histidinas; (ii) uma cauda N-terminal composta por *tags* Glutamato; ou (iii) ambos. Foram utilizados também grupos amina de resíduos de Lisina da própria enzima para efetuar a sua imobilização. As esferas na imagem representam vários óxidos metálicos ou semimetais que são sintetizados enzimaticamente através da silicateína recombinante, como biosílica (SiO₂), dióxido de titânio (TiO₂), óxido de zircônio (ZrO₂) e dióxido de estanho (SnO₂) (adaptado [41]).....10

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Anticorpos utilizados para caracterização da Glu-tag silicateína- α e para verificação da enzima imobilizada nas nanopartículas de Fe_3O_4 com respectivas espécies de produção e fornecedores.....13

LISTA DE ABREVIÇÕES

- aa - aminoácido
Abs - Absorvância
acac - Acetilacetato
Asn - Asparagina
BCIP - 5-Bromo-4-Cloro-Indolil-Fosfato
BSA - Albumina de soro bovino
cc - centro ativo
CHAPS - (3- [(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfanado
cup - *N*-Nitroso-*N*-fenil-hidroxilamina
Cys - Cisteína
D.O. - Densidade Ótica
EDX - Espectroscopia de Raio-X por dispersão de Energia
EVAR - Poli (etileno-co-acetato de vinila)
FDA - *Food and Drug Administration*
Fe₃O₄ - Magnetita
FTIR - Infravermelho por Transformada de Fourier
Glu - Glutamato
GSH - Glutathiona reduzida
GSSG - Glutathiona oxidada
His - Histidina
IMAC - Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado
IRM - Imagem por Ressonância Magnética
kDa - KiloDalton
keV – Kilo elétron-volt
kV - Quilovolt
LB - Luria Bretani
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFH - Hipertermia por Fluido Magnético
MPa - Mega Pascal
M_s - Saturação de Magnetização
NBT - Nitroazul de tetrazólio
NTA - Acido Nitrilotriacético

PEG - Polietileno glicol

PLGA - Poli (ácido lático-co-ácido glicólico)

PVA - Álcool polivinílico

PVP - Polivinilpirrolidona

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida-deodecil-sulfato de sódio

Ser - Serina

SPION - Nanopartícula de óxido de ferro superparamagnética

T_B - Temperatura de bloqueio

TEOS - Tetraetilortosilicato

Ti-BALDH - dihidroxidodilactatotitanato(IV) de amónio

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

1. INTRODUÇÃO

A importância de nanocompósitos construídos em diferentes componentes inorgânicos ou orgânicos é cada vez mais reconhecida, pois podem adquirir propriedades multifuncionais que podem ser adaptadas e ajustadas. Nanopartículas magnéticas estão emergindo como uma nova tecnologia em aplicações biotecnológicas e biomédicas para diagnósticos clínicos e em aplicações *in vivo*. Os revestimentos conferem, às nanopartículas, proteção de reações com o ambiente externo e simultaneamente servem como um meio para a funcionalização da partícula tornando-as quimicamente funcional e fisiologicamente compatíveis para inúmeras aplicações [1].

Um dos principais desafios para as futuras bioaplicações dos nanomateriais será o desenvolvimento de versatilidade química na sua superfície que forneça estabilidade e solubilidade em condições fisiológicas e simultaneamente facilite a sua detecção e a sua utilização [1].

1.1. Nanopartículas Magnéticas

Uma nanopartícula pode ser definida como qualquer partícula produzida com uma dimensão característica de 1 a 100nm, que possua propriedades não partilhadas por partículas de escala não nanométrica com a mesma composição química [2].

O magnetismo é uma propriedade de materiais que respondem a um campo magnético aplicado. As propriedades magnéticas de nanomateriais são de grande interesse em diversas áreas devido às suas propriedades como superparamagnetismo, alta coercividade, alta suscetibilidade magnética e baixa temperatura de Curie [3]. Estas propriedades permitem a sua utilização em áreas de estudo como fluidos magnéticos, armazenamento de dados e catálise [4]. Atualmente, as nanopartículas magnéticas são utilizadas em aplicações biológicas como biosseparação magnética e detecção de entidades biológicas (células, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, bactérias, vírus, etc.) [5], procedimentos de diagnósticos como imagem por ressonância magnética (IRM) [3], hipertermia por fluido magnético (MFH) e transportadores magnéticos de fármacos [6][7].

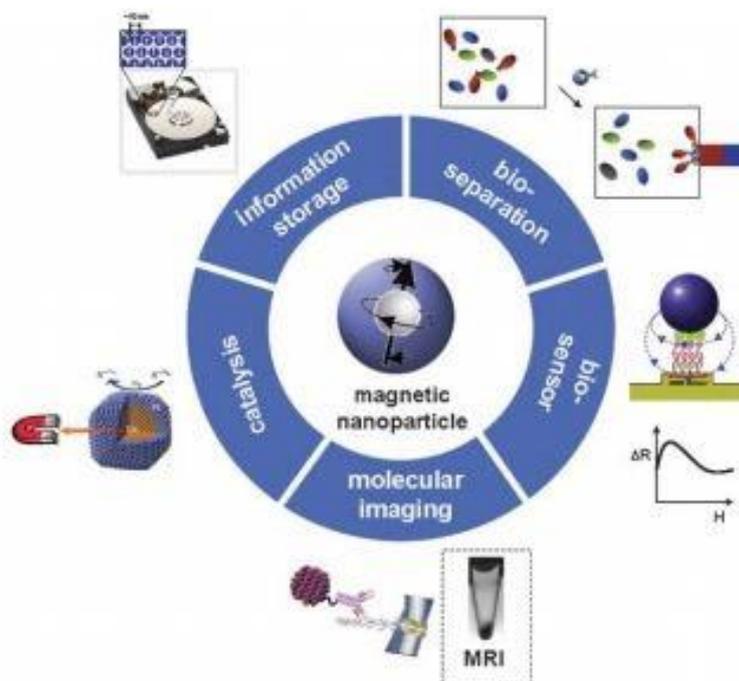


Figura 1.1. Exemplos de possíveis aplicações de nanopartículas magnéticas (adaptado [8]).

Entre a ampla variedade de materiais magnéticos que podem ser utilizados sob a forma de nanopartículas, os óxidos de ferro são certamente os mais intensamente estudados. Entre estes últimos, devido principalmente à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade, a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são os candidatos mais promissores [5]. A *Food and Drug Administration* (FDA) já aprovou o uso de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) como agente de contraste em ressonância magnética por imagem [5][9].

1.2. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro

Nas últimas décadas, tem sido desenvolvida muita investigação sobre a síntese de nanopartículas monodispersas de óxido de ferro e muitos estudos têm descrito abordagens de sínteses para produzir nanopartículas de forma eficiente, controlada, estáveis e biocompatíveis. Os métodos mais utilizados são co-precipitação, decomposição térmica, microemulsão, síntese hidrotermal e síntese sonoquímica [3]. As nanopartículas de óxido de ferro podem também ser sintetizadas por outros métodos menos convencionais como síntese eletroquímica [10], técnicas de pirólise a laser [11], por bactérias magnetotáticas e bactérias redutoras [3][12].

1.2.1. Co-precipitação

O método mais convencional para a obtenção de nanopartículas Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ é a co-precipitação. Este método consiste na mistura de íons férricos (Fe^{3+}) e ferrosos (Fe^{2+}) numa proporção molar de 1:2 em soluções altamente básicas à temperatura ambiente [3][14]. O tamanho e forma das nanopartículas dependem do tipo de sal utilizado (ex.: cloretos, sulfatos, nitratos e percloratos), da proporção de íons férricos e ferrosos, da temperatura da reação, valor do pH, força iónica do meio e outros parâmetros da reação como taxa de agitação e velocidade de adição da solução básica [13]. Este método tem como vantagem a facilidade de serem produzidas grandes quantidades de partículas numa única reação, existindo por outro lado literatura substancial sobre as possíveis modificações químicas que podem ser introduzidas na superfície das nanopartículas [13].

Apesar de ser amplamente utilizado, a co-precipitação pode afetar negativamente as propriedades físicas e químicas das nanopartículas de óxido de ferro, incluindo a saturação de magnetização (M_s) cujos valores são inferiores aos apresentados pelos mesmos materiais em escala não nanométrica [3].

Outras desvantagens deste método são: (i) o elevado valor de pH da mistura reativa que tem de ser ajustado nos passos de síntese e de purificação; (ii) a síntese de partículas com uma ampla distribuição de tamanhos, frequentemente requerendo uma segunda seleção, que apresentando uma ampla gama de temperaturas de bloqueio (T_B) dificulta a sua utilização em muitas aplicações [3]. (iii) Necessidade de tratamento dos resíduos gerados durante a produção para evitar poluição ambiental [3].

1.2.2. Decomposição térmica

Este método baseia-se na decomposição de um precursor organometálico: $\text{Fe}(\text{cup})_3$ (cup = *N*-Nitroso-*N*-fenil-hidroxilamina), $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (acac = acetilacetato), ou pentacarbonilo de ferro ($\text{Fe}(\text{CO})_5$), na presença de tensioativos, seguido de oxidação [3][14].

Este método permite a obtenção nanopartículas de magnetite monodispersas de alta qualidade, com diâmetros até 20nm, dispersas em solventes apolares. Este processo não necessita de um procedimento de seleção de tamanho, é facilmente adaptado para produção industrial e pode ser ajustado para síntese de nanopartículas de MFe_2O_4 (com $\text{M} = \text{Co}, \text{Mn}$ ou Fe) [7][15].

No entanto este método tem a desvantagem de as nanopartículas se encontrarem geralmente dispersas em solventes apolares [3].

1.2.3. Microemulsão

A microemulsão é uma dispersão isotrópica termodinamicamente estável, de duas fases imiscíveis (água e óleo) sob o tensoativo presente na mistura. As moléculas de tensoativo formam uma monocamada na interface entre o óleo e a água, com as caudas hidrofóbicas dissolvida na fase oleosa e os grupos de cabeça hidrofílica na fase aquosa. Nos sistemas binários (água/surfactantes ou óleo/surfactantes), podem ser formadas estruturas auto-organizadas de diferentes tipos, variando desde micelas esféricas e cilíndricas invertidas a fases lamelares e a microemulsões bi-contínuas. Neste sentido, os métodos de microemulsão e micelas invertidas são utilizados para obtenção de nanopartículas de óxido de ferro com tamanho e forma controlados através de uma monocamada de tensoativo. Apesar deste método resultar em nanopartículas de óxido de ferro com altos valores de M_S e com uma boa distribuição de tamanhos, a agregação das nanopartículas ocorre normalmente, apesar da presença de agentes tensoativos, sendo necessários vários processos adicionais de lavagem e tratamentos para a sua estabilização [3].

1.2.4. Síntese hidrotermal

Este método consiste na cristalização de precursores (ex.: nitrato de ferro (III) ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) e sulfato de ferro (III) ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)) sob uma atmosfera inerte a partir duma solução aquosa com altas temperaturas (numa gama de 130-250°C) e à pressão de vapor elevada (valores entre 0,3-4,0 MPa). Esta técnica também pode ser combinada com outros métodos, utilizando-se o método hidrotermal para estabilizar as nanopartículas com o uso de tensoativos. Através da síntese hidrotermal é possível obter nanopartículas de óxido de ferro com grau de pureza e cristalinidade superiores aos outros métodos descritos, além de valores de M_S semelhantes aos valores encontrados nos materiais em escala não nanométrica [3][16][17]. No entanto, as condições necessárias de pressão e temperatura tornam este método não acessível a todos os laboratórios [3][16].

1.2.5. Síntese sonoquímica

Este método de síntese permite preparar uma grande variedade de nanocompósitos através da irradiação do ultrassom. Os efeitos químicos do ultra-som surgem a partir da cavitação acústica (formação, crescimento e colapso de bolhas num líquido). A reação com o precursor (ex.: ($\text{Fe}(\text{CO})_5$)) ocorre na fase gasosa, no interior da bolha que colapsa formando nanopartículas amorfas. A razão para a obtenção de nanopartículas amorfas é devido as grandes

velocidades de arrefecimento obtidas quando a bolha colapsa, fazendo com que os tamanhos das partículas não variem, formando apenas materiais nanométricos [18]. Este método tem sido comprovado como uma via confiável, reprodutível e relativamente fácil de sintetizar nanomateriais tanto com e sem tensioativos *in situ* [3][19]. As condições extremas do ponto de aquecimento no interior da bolha são consideradas benéficas pois reduzem a formação de aglomerados de nanopartículas, possibilitando a aplicação deste método para a síntese de vários nanocompósitos com propriedades incomuns, sendo a sua versatilidade sido demonstrada com sucesso na preparação de nanopartículas de óxido de ferro [3][19].

1.3. Funcionalização da superfície das nanopartículas

O grande desafio tecnológico da síntese de nanopartículas de óxido de ferro está no controle do tamanho, forma, estabilidade e dispersibilidade em solventes desejados. Isto porque nanopartículas de óxidos de ferro magnéticas apresentam uma grande relação superfície/volume e portanto possuem energias de superfície elevadas. Consequentemente, elas tendem a agregar-se para minimizar as suas energias superficiais. Além que, nanopartículas sem qualquer revestimento de proteção possuem grande atividade química e são facilmente oxidáveis ao contacto com o ar, especialmente magnetita, resultando na perda de magnetismo e de dispersibilidade [3].

Existem estratégias que envolvem o revestimento com moléculas orgânicas, incluindo tensioativos (ácido oleico, ácido láurico, ácidos alquilsulfônicos e ácidos alquilfosfônicos) [20], polímeros (polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), poli(etileno-*co*-acetato de vinilo) (EVAR), poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico) (PLGA), e álcool polivinílico (PVA) [21], biomoléculas e revestimento com uma camada de material inorgânico, tal como sílica, metal ou substância elementar semimetal, óxido de metal ou sulfureto de metal. Em muitos casos, estas proteções não apenas estabilizam as nanopartículas de óxido de ferro magnético mas também podem ser utilizados para posterior funcionalização [3].

1.4. Silicateína

A descoberta de enzimas que catalisam a formação de sílica, um material polimérico inorgânico, através de precursores inorgânicos solúveis em água foi um grande avanço nas áreas de química inorgânica e bioquímica, possibilitando novas oportunidades para a área de ciências de materiais [22].

As silicateínas foram inicialmente descritas pelo grupo de Morse [23][24], no qual descobriram que os filamentos axiais dos espículos de esponjas marinhas *Tethya aurantium* são compostas por uma enzima denominada silicateína (proteína de sílica) envolvida na formação de biossílica [25].

Posteriormente foi demonstrado que a silicateína não existe apenas no canal axial, mas também no espaço extra espicular e extracelular das esponjas [26]. Apesar do mesmo autor ter proposto um mecanismo de reação enzimática da silicateína, somente recentemente foi possível confirmarem experimentalmente as propriedades detalhadas das cinéticas de reação [27].

Recentemente foi mostrado que a silicateína compreende uma função enzimática dupla, atuando como polimerase de sílica e sílica-esterase [27]. A identificação duma enzima que degrada biossílica suportou a opinião de que os componentes siliciosos em espículos são processos dinâmicos de ciclos de construção-dissolução-construção, de forma semelhante a outros biominerais tais como ossos e dentes [22].

1.5. Silicateína - Uma enzima polimerizadora de sílica

O polipeptídeo correspondente à silicateína compreende cerca de 325 aminoácidos (aa) com um peso molecular de 35 kDa. Durante a maturação, a pró-enzima sofre uma clivagem do peptídeo sinal (aa1 a aa17; *Suberites domuncula* [demosponge] silicateína- α) e do pro-peptídeo adjacente (aa18 ao aa112), resultando na enzima madura de 23-24 kDa [26].

As silicateínas consistem em três isoformas, silicateína- α , silicateína- β e silicateína- γ , onde foram classificadas através de análises filogenéticas como pertencentes à superfamília de proteases de cisteínas semelhantes à catepsinas L [25][27].

A silicateína- α é a mais abundante das subunidades de silicateínas nos filamentos axiais dos espículos de esponjas marinhas *Suberites domuncula*, sendo similar em sequência à protease catepsina L com uma identidade de 52% e similaridade de 65% nos resíduos de aminoácidos [28].

As diferenças entre estas duas enzimas estão nos seus centros ativos. Na silicateína este é formado por três aminoácidos, Histidina (His), Serina (Ser) e Asparagina (Asn), enquanto na catepsinas-L esta apresenta uma Cisteína que substitui a Serina da silicateína. Este aminoácido é essencial para o mecanismo de catálise da silicateína. Além desta diferença, as silicateínas apresentam um aglomerado de resíduos de Serinas próximo ao centro ativo da enzima podendo atuar como um molde para a deposição de biossílica [22], [24], [28], [29].

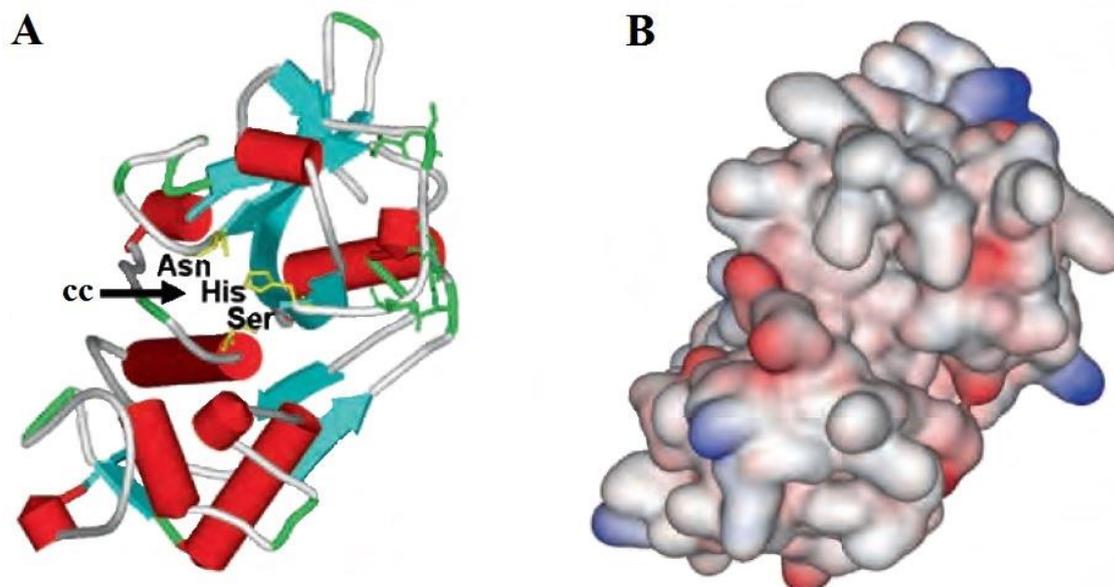


Figura 1.2. Modelo tridimensional da silicateína- α (*Suberites domuncula*). (A) Elementos da estrutura secundária estão marcados em vermelho (hélices- α) e azul (folhas- β). O centro ativo (cc) da enzima compreendendo os aminoácidos (Ser), (His), e (Asn) estão apresentados em amarelo e os resíduos de Serina estão marcados na cor verde. (B) Distribuição de carga eletrostática da enzima: as manchas vermelhas representam as cargas positivas e as azuis as cargas negativas. O branco representa as áreas hidrofóbicas (adaptado [22]).

Além destas, silicateínas têm sido isoladas e caracterizadas a partir de esponjas de água doce *Ephydatia fluviatilis* [22] e *Lubomirskia baicalensis* [30][31]. Nas esponjas *L. baicalensis*, pelo menos quatro isoformas de silicateína- α (silicateína a1-a4) existem [31][32]. Recentemente, silicateínas também foram descobertas e isoladas de esponjas hexactinélidas, *Crateromorpha meyeri* [33]. Estes resultados demonstraram que estas enzimas não estão restritas a *demosponges*, mas são uma característica geral de esponjas siliciosas [22].

1.6. Mecanismo de atividade da silicateína- α

As enzimas são catalisadores surpreendentes que atuam através de substratos específicos para formar produtos sob condições fisiológicas que normalmente suprimem a reatividade química como por exemplo de água, eletrólitos, pH, temperatura e pressão em condições normais. A maioria dos catalisadores sintéticos é menos eficiente aos catalisadores biológicos em pelo menos quatro aspectos [34]: (i) não são tão eficazes à temperatura fisiológica, baixa pressão e pH neutro; (ii) são pouco seletivos; (iii) raramente exibem reconhecimento quiral, uma propriedade que limita bastante a utilização na preparação de biomoléculas opticamente ativas; e (iv) não são regulados por ativadores e/ou inibidores.

A especificidade da enzima-substrato e a formação do complexo intermediário são características comuns em todas as enzimas. As silicateínas são enzimas que possuem uma

ampla especificidade de substrato, podendo atuar sobre uma gama relativamente ampla de diferentes substratos para a produção de diversos metais óxidos, o que pode ser atribuído ao seu centro ativo e à similaridade no tamanho e carga dos centros eletrofílicos das moléculas do substrato [35].

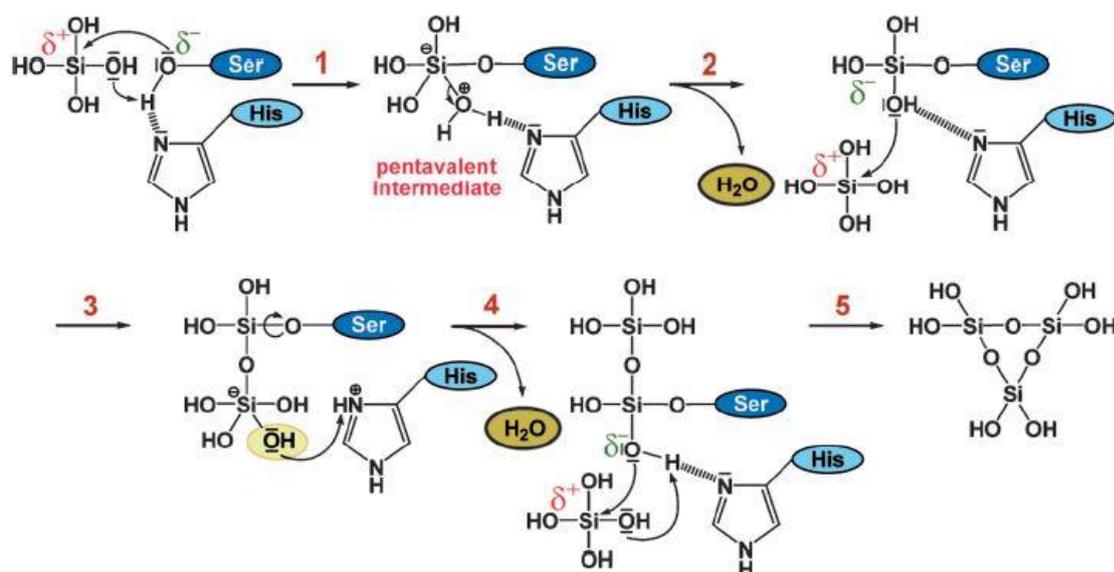


Figura 1.3. Mecanismo de polimerização catalisada pela silicateína partir do substrato ortosilicato. Passo 1: Ataque nucleofílico do átomo do oxigênio da Ser ao átomo de silício do substrato e transferência de um próton a partir do azoto da molécula de imidazol da His a um ligando de OH do ácido silícico. Passo 2: Libertação de uma molécula de água a partir do intermediário pentavalente formado. Passo 3: Ataque nucleofílico do átomo de oxigênio a partir de um dos ligandos OH da molécula de ácido silícico à uma segunda molécula de ácido silícico facilitado pela formação de pontes de hidrogênio entre o ácido silícico e o azoto do imidazol. Passo 4: Libertação de uma molécula de água após a transferência de prótons a partir do grupo imidazol. Ataque nucleofílico do átomo de oxigênio de um ligando OH da primeira molécula de ácido silícico, após rotação da ligação Si-O-C entre esta molécula e a Ser, ao átomo de silício de uma terceira molécula de ácido silícico, novamente facilitada pela ponte de hidrogênio com o azoto da molécula imidazol. Passo 5: Ciclização do ácido trissilícico e posterior libertação do anel trisiloxano da silicateína (adaptado [36]).

1.7. Biocatálise de óxidos metálicos

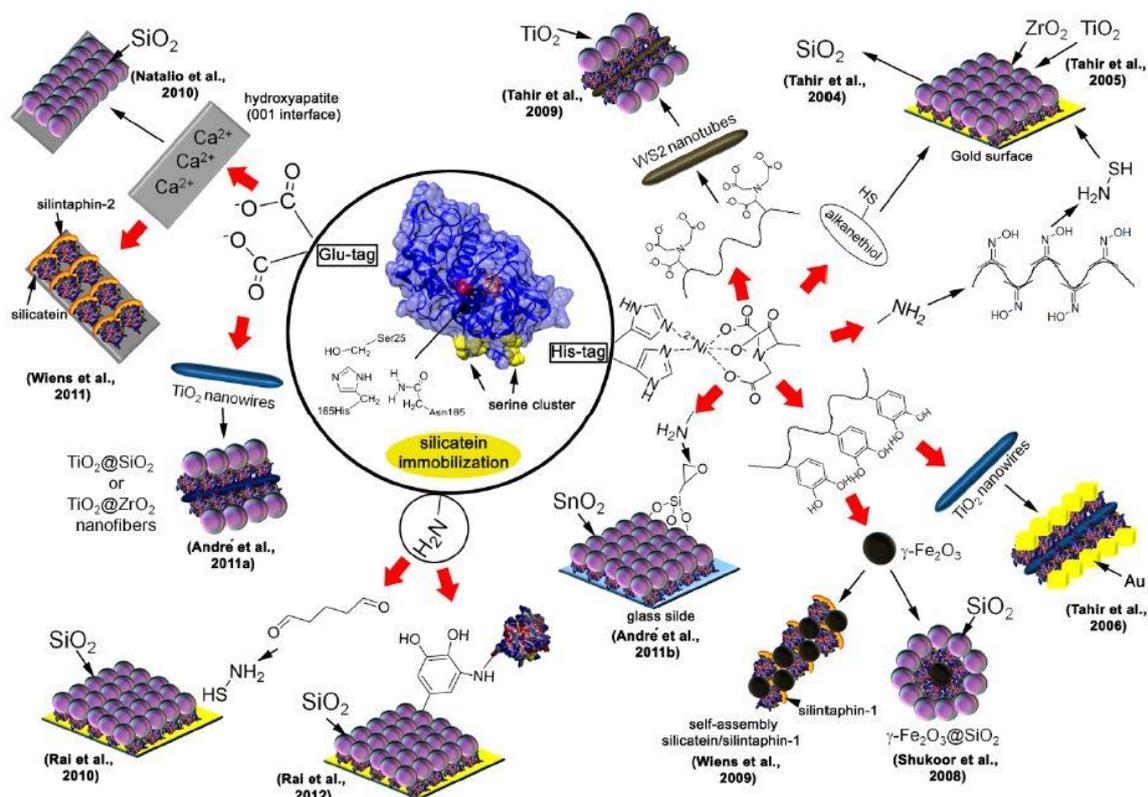
As silicateínas não só medeiam a síntese de biosilica (figura 1.3) mas também a formação de outros óxidos metálicos, tais como dióxido de titânio (TiO_2) [37][38] e dióxido de zircônio (ZrO_2) [38] a partir de precursores estáveis em meios aquosos à temperatura ambiente e pH neutro. Esta capacidade da silicateína é atribuída à semelhança em tamanho e carga dos centros eletrofílicos das moléculas de substrato e da tolerância estereoquímica do centro ativo da silicateína [35]. Estes óxidos de metal são conhecidos por exibirem propriedades semicondutoras, piezoelétricas, dielétricas e/ou eletro-ópticas. O dióxido de titânio (TiO_2), um semicondutor de largura de banda proibida, é usado em optoelectrónica, células solares, e fotocatalise. O dióxido de zircônio (ZrO_2) é aplicado para a fabricação de piezoelétrico, dielétrica e materiais eletro-ópticos. A síntese química destes óxidos requer condições de pH e

de temperatura extremas, enquanto a silicateína é capaz de formar esses óxidos metálicos enzimaticamente utilizando substratos estáveis em meio aquoso [22].

1.8. Estratégias de imobilização da Silicateína- α

Na indústria biotecnológica a imobilização de enzimas em superfícies de materiais é útil em termos de catalisação de reações químicas versáteis em condições normais de pH, temperatura e pressão. A imobilização de enzimas é possível apenas sobre uma superfície que tenha locais capazes de formar ligações químicas com a proteína de interesse. Por este motivo, muitas vezes são necessárias modificações na superfície da matriz para introduzir grupos funcionais ou camadas reativas extras, que podem ser obtidas por *grafting*, *etching and coating* [39].

Por outro lado, enzimas recombinantes podem ser geneticamente modificadas por meio de técnicas de engenharia genética, de maneira a introduzir sequências polipeptídicas (*tags* de afinidade) que podem ser resíduos ricos em Cisteína, Glutamato ou Arginina para imobilização por afinidade direta em diferentes materiais sem efetuar modificações nas suas superfícies antes da imobilização enzimática [40].



Esquema 1.1. Exemplos de metodologias de imobilização da silicateína- α baseado em doze artigos publicados [1][37][40][42]-[51]. A imobilização da silicateína em superfícies sólidas baseia-se na modificação genética da sequência da silicateína nativa para se obter uma proteína híbrida que transporta um ou dois marcadores de afinidade: (i) uma cauda C-terminal compostas por Histidinas; (ii) uma cauda N-terminal composta por *tags* Glutamato; ou (iii) ambos. Foram utilizados também grupos amina de resíduos de Lisina da própria enzima para efetuar a sua imobilização. As esferas na imagem representam vários óxidos metálicos ou semimetais que são sintetizados enzimaticamente através da silicateína recombinante, como biossílica (SiO_2), dióxido de titânio (TiO_2), óxido de zircônio (ZrO_2) e dióxido de estanho (SnO_2) (adaptado [41]).

1.9. Potenciais aplicações da Silicateína- α

A Silicateína- α nativa ou recombinante é capaz de converter um amplo espectro de precursores metais, semimetais e alcóxidos, que catalisam a formação de metais ou semimetais óxidos [22]. Após a catálise, a silicateína permanece encaixada dentro da matriz inorgânica, proporcionando sítios de reconhecimento específicos que promovem a montagem da estrutura altamente ordenada. Para além do versátil potencial das partículas inorgânicas enzimaticamente formadas que podem ser exploradas para diversas aplicações biotecnológicas e biomédicas, uma vantagem particular da silicateína imobilizada é que esta oferece pontos de nucleação, o que pode reduzir a barreira de ativação para nucleação heterogênea (solução-sólido) [22][35].

1.9.1. Aplicações Biotecnológicas

As aplicações biotecnológicas da silicateína são altamente dependentes do tipo de substrato e do produto resultante. Por exemplo, TiO_2 (anatase) sintetizada por silicateína recombinante a

partir do precursor de TiO_2 , dihidroxidodilactatotitanato(IV) de amônio (Ti-BALDH) é importante para aplicações ambientais, com a produção de energia através de células solares, para fotocatalise, sensores e suportes de catalíticos [52]. A síntese de ZrO_2 mediada pela silicateína dá-se através do precursor hexafluorozirconato aniônico (ZrF_6^{2-}) [38] que é aplicado na fabricação de piezoelétricos, dielétricos e materiais eletro-óticos [22].

Por outro lado, a biosílica sintetizada pela silicateína a partir do precursor de sílica, tetraetilortosilicato (TEOS), apresenta propriedades isolantes, servindo como camada dielétrica para microeletrônica [53]. Além disso, partículas de óxido de estanho transparentes (SnO_2) obtidas através da silicateína com o precursor de estanho hexafluoroestanoato de sódio em lâminas de vidro apresentam potencial aplicação na optoeletrônica, devido à sua elevada condutividade elétrica e alta transparência ótica no espectro visível [35].

Diferentes revestimentos multifuncionais foram sintetizados por meio da imobilização de silicateína recombinante num núcleo inorgânico como nanopartículas de óxido de ferro [1] ou nanofios de titânio [49]. A enzima após ser imobilizada, é direcionada para a formação de diferentes camadas inorgânicas usando diferentes substratos. Por fim, as enzimas recombinantes silicateína- α e silintaphin-1 foram empregues em *self-assembly* direcional de estruturas 3D que modela a deposição de várias nanopartículas inorgânicas em micro espículos artificiais [45].

1.9.2. Aplicações Biomédicas

As aplicações da silicateína na área biomédica incluem engenharia de tecido ósseo, materiais à base de sílica incluindo vidro bioativo, cerâmica de silicato bioativo, compósitos polimérico de sílica, fibras de colagénio com sílica, sílica substituindo hidroxiapatite e sílica biogênica [53]-[58].

A partir de diferentes abordagens foi demonstrado que a biosílica apresenta potencial para atuar como aditivo ou camada de revestimento em muitos *scaffolds* de biomateriais melhorando a formação óssea [57].

No que se refere à biosílica enzimaticamente sintetizada, vários estudos demonstraram que esta aumenta a adesão, proliferação, diferenciação e a expressão dos genes em células de osteoblastos [58]. O efeito osteogénico de partículas de sílica sobre células de osteoblastos e da formação óssea está bem estabelecido *in vivo* e *in vitro* [60]. A capacidade da silicateína de mediar a formação de sílica em condições fisiológicas e de interação simultânea com a biosílica

pode criar uma camada de proteína na superfície das partículas, favorecendo a capacidade de mineralização das células formadoras de ossos [57].

A síntese de nanocompósitos magnéticos encapsulados com sílica é uma alternativa atraente no estudo de sistemas de liberação de fármacos com características bioativas sob um campo magnético externo, uma vez que a camada protetora proporcionada pela sílica impede a atração magnética dipolar entre as partículas magnéticas e, conseqüentemente, proporciona a sua dispersão uniforme [61].

1.10. Objetivos

A síntese de revestimentos como biossílica ou TiO_2 em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 é de especial interesse em materiais onde as propriedades de superfície em escala nano são de vital importância para manter as características intrínsecas do compósito, outorgando estabilidade e a sua dispersão em meios aquosos, possibilitando assim inúmeras aplicações.

Este trabalho teve como objetivo principal, estabelecer um protocolo de uma via simples e versátil de funcionalização de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 hidrofóbicas que permita a substituição das moléculas de ácido oleico pela enzima Glu-tag silicateína- α na superfície das nanopartículas por um procedimento de troca de ligando. A partir de substratos específicos solúveis em água, proceder a síntese de camadas sob condições de pressão e temperatura normais de forma a obter nanopartículas encapsuladas com biossílica ou TiO_2 . Estes revestimentos conferem proteção às nanopartículas de reações com o ambiente externo e simultaneamente servem como um meio para a subsequente funcionalização, tornando as partículas quimicamente e fisiologicamente compatíveis para aplicações biotecnológicas e biomédicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Vetor de expressão e Linha celular

Neste trabalho foi utilizado o gene da Glu-tag silicateína- α sob o controle do promotor P_{BAD} inserido no vetor de expressão pBAD/gIII A (Invitrogen) na estirpe de *E. Coli* TOP10 (Invitrogen). Esta estirpe encontrava-se preservada num *kit* criogénico da Roth (Roti[®]-Store cryo-vials).

2.1.2. Anticorpos

Para caracterização da Glu-tag silicateína- α por *Western blot* e para verificação da ligação da enzima nas nanopartículas foram utilizados os anticorpos descritos na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Anticorpos utilizados para caracterização da glu-tag silicateína- α e para verificação da enzima imobilizada nas nanopartículas de Fe_3O_4 com respetivas espécies de produção e fornecedores.

Anticorpo	Função	Espécie	Diluição	Fornecedor
Anti-His (C-terminal) /fosfatase alcalina conjugada	Caracterização da enzima por <i>Western blot</i>	Rato	1:2000	Invitrogen
Anti-His (C-terminal) Primário	Verificação da ligação da enzima nas nanopartículas	Rato	1:5000	Invitrogen
Anti-rato cy2 Secundário	Verificação da ligação da enzima nas nanopartículas	Burro	1:3000	Dianova

2.2. Métodos

2.2.1. Expressão e purificação da Glu-tag silicateína- α

Neste capítulo será explicado o processo de expressão, purificação, quantificação e caracterização da enzima cuja função é essencial para a formação das camadas de biosílica ou dióxido de titânio (TiO_2) a volta das nanopartículas de Fe_3O_4 .

2.2.1.1. Expressão da Glu-tag silicateína- α

Para iniciar a cultura foi preparado o pré-inoculo adicionando um *glass bead* com células *E. coli* imobilizadas em 20 mL de meio Luria Bretani (LB) (Carl Roth, Alemanha) contendo

ampicilina na concentração final de 0,1mg/mL. A cultura foi incubada *overnight* numa incubadora com agitação orbital (WiseCube Wis-20, Wisd Lab instruments) a 180 rpm e 37°C. Para iniciar a expressão da enzima de interesse, os 20 mL de pré-inoculo foram adicionados em 1 litro de meio LB contendo a ampicilina mantendo-se a cultura nas mesmas condições durante 4 horas.

Ao atingir uma D.O. ($_{600\text{nm}}$) entre 0,4 - 0,6 adicionou-se L-arabinose numa concentração de 0,2% (w/v) para induzir a expressão da enzima. Manteve-se a cultura na incubadora com agitação *overnight* e após este período as células foram recuperadas por centrifugação a 6000 rpm (Sorvall RC 5B, DuPont), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi mantido durante 24h a -20°C para promover a ruptura celular para posterior extração da enzima.

2.2.1.2. Extração da Glu-tag silicateína- α

Após descongelamento, o *pellet* foi pesado e ressuspenso com tampão Tris, pH8, utilizando a proporção aproximada de 10mL de tampão por grama de *pellet*. Uma vez que a enzima Glu-tag Silicateína- α é de origem intracelular e encontra-se em corpos de inclusão, foi necessário proceder a vários passos para realizar a ruptura celular.

A solução foi centrifugada durante 25 minutos a 6000 rpm a uma temperatura de 10°C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso sucessivamente no reagente de lise CellLytic™ B, primeiro diluído 1:10 e depois 1:100 em tampão Tris na proporção de 10mL de solução por grama de *pellet*. Entre cada ressuspensão a solução foi centrifugada durante 25 minutos a 6000 rpm e a uma temperatura de 10°C. Ressuspendeu-se o *pellet* em tampão Tris numa proporção de 10mL por grama de *pellet* e centrifugou-se com as mesmas condições anteriores. Após centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em tampão de lise (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 8M ureia, 10 mM imidazol) na proporção de 10mL de tampão por grama de *pellet*. De seguida a solução foi submetida a 2 ciclos de sonicação (Branson B-12, Heinemann, Alemanha) de 1 minuto numa potência de 50% e com intervalos de 30 segundos. Por fim, a solução foi centrifugada a 6000 rpm durante 25 minutos a uma temperatura de 10°C, o sobrenadante foi mantido em gelo e o *pellet* foi descartado.

2.2.1.3. Purificação da Glu-tag silicateína- α

O *kit* de purificação utilizado foi o da Thermo Scientific. Foi utilizado o protocolo de purificação sob condições de desnaturação da Quiagen®.

A purificação da Glu-tag silicateína- α foi realizada através do método de cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC). Na preparação da resina de afinidade Ni²⁺-NTA (Quiagen[®]), 15mL da resina foram centrifugados (Rotofix 32, Hettich, Alemanha) durante 2 minutos para remoção do excesso de etanol na resina. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e foi adicionado o dobro da quantidade de tampão de lise (em relação a resina) para uma nova centrifugação durante 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se tampão de lise até perfazer o volume de 15mL. Adicionou-se o lisado bacteriano clarificado a mistura de agarose Ni²⁺-NTA obtendo-se assim uma proporção de 4:1. A mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente durante 60 minutos para promover a ligação da enzima de interesse ao metal da matriz. Por fim, as colunas foram devidamente posicionadas e carregadas com 5 mL da mistura e mantidas fechadas até a sedimentação da resina. Após esta fase as colunas foram abertas e o *flow-through* foi recolhido. As colunas foram de seguida carregadas com 5mL de tampão de lavagem 1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 8M ureia, 20 mM imidazol) seguido de 5mL de tampão de lavagem 2 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 4M ureia, 50 mM imidazol). Por último, as enzimas são eluídas duas vezes com tampão de eluição 1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 8M ureia, 100 mM imidazol) seguido do tampão de eluição 2 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 8M ureia, 250 mM imidazol). As frações recolhidas foram identificadas e mantidas em tubos para posterior análise por SDS-PAGE.

2.2.1.4. Quantificação da Glu-tag silicateína- α

Para quantificação da enzima de interesse recorreu-se ao método de Bradford. Utilizou-se o corante Coomassie Brilliant Blue Dye-G250 (Roth, Alemanha).

As mostras foram preparadas com o corante diluído em água destilada numa proporção de 1:5. A reta de calibração foi preparada em triplicado a partir da solução com corante diluída com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA) fração V (Thermo Scientific, Alemanha). Para determinar a concentração das amostras através da leitura de Abs_(595nm) foi utilizado o leitor multimodo Varioskan Flash 100-240V (Thermo Scientific, Alemanha).

2.2.1.5. SDS-PAGE

Devido ao peso molecular da enzima de interesse, 29 kDa, foram utilizados géis da NuPAGE[®] Bis-Tris com 12% de resolução conforme recomendado pelo fabricante utilizando o sistema de eletroforese vertical XCell SureLock[™] Mini-Cell, (Novex[®], Alemanha). Para

preparação das amostras retirou-se 12µL de cada fração recolhida durante a purificação para tubos de microcentrifuga e adicionou-se 4µL de *loading buffer* (4x) Roti[®]-Load 1 (Carl Roth, Alemanha). Num dos poços foi carregado o marcador de peso molecular Sharp Pre-Stained Protein Standard (Novex[®], Alemanha).

A eletroforese realizou-se a uma diferença de potencial de 120V (Power Pac 200, Bio-Rad). Após eletroforese o gel foi lavado três vezes com água destilada e incubado em solução de coloração Gel Code[™] Blue Safe (Thermo Scientific, Alemanha) durante 14 horas sob agitação. Após lavagem em água destilada, o gel foi fotografado utilizando o sistema de imagem infravermelho Odyssey B446 (Li-Cor[®], Alemanha).

2.2.1.6. Western-Blotting

Para caracterização da Glu-tag silicateína- α foi utilizado o método *Western blot* utilizando o equipamento iBlot[®] *dry blotting system* da Novex[®] e o *kit* de transferência (iBlot[®] *Western Detection stacks*).

A transferência para a membrana de nitrocelulose efetuou-se a uma diferença de potencial de 20V durante os primeiros 2 minutos seguido de um aumento de 3V nos 2 minutos seguintes finalizando com um aumento de 5V nos restantes 2 minutos.

Após a transferência incubou-se a membrana com reagente de bloqueio Western (10x) (Roche, Alemanha) diluído com água destilada numa proporção de 1:10 durante 14 horas. Terminada a incubação a membrana foi lavada 2 vezes com 25mM Tris-HCl (pH8) e incubada durante 10 minutos com o anticorpo Anti-His (C-Terminal) conjugada com fosfatase alcalina, diluído na solução de bloqueio numa proporção de 1:2000. O sobrenadante foi descartado e a membrana foi lavada 3 vezes com tampão Tris.

Para deteção da enzima a membrana foi pré-incubada durante 10 minutos em tampão NBT/BCIP pH9,5 (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, 0,005M MgCl₂). De seguida foi preparada uma solução diluída de 1:50 de NBT/BCIP (Roche, Alemanha) em tampão NBT/BCIP onde a membrana foi incubada durante aproximadamente 1 minuto até que as bandas aparecessem. Por último, a reação foi interrompida descartando o sobrenadante e lavando a membrana várias vezes com água destilada.

2.2.2. Síntese de nanopartículas de Fe₃O₄ com camada de ácido oleico

As nanopartículas de Fe₃O₄ monodispersas foram sintetizadas pelo método de decomposição térmica descrito em Sun *et al.* (2004) [7] com algumas modificações.

Inicialmente pesou-se (R200D Sartorius) 706mg de acetilacetonato de ferro (III) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 2,5g de 1,2-hexadecanediol (Sigma-Aldrich, Alemanha), ambos foram adicionados num balão de fundo redondo de 3 bocas angulares de 100mL. De seguida, pipetou-se 2mL de ácido oleico, 2mL de oleilamina e 20mL de éter benzílico para o mesmo balão que foi posteriormente colocado numa manta de aquecimento conectada a um controlador de temperatura programável (K40 Philips, Alemanha). A reação foi realizada sob fluxo de argon e para controlar a alimentação de gás o balão estava conectado a uma linha de Schlenk, fazendo com que a reação ocorresse sob fluxo de gás inerte. Durante a reação, a mistura foi constantemente agitada por um agitador mecânico conectado a uma haste de agitação de vidro. Então com o controlador de temperatura, esta foi programada para que durante 40 minutos a temperatura subisse gradualmente até 200°C e assim permanecesse durante duas horas. Após este período a mistura foi aquecida até 300°C em 10 minutos e mantida por uma hora a esta temperatura para promover o refluxo da solução. Por fim a solução foi retirada da manta de aquecimento e mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente.

Para precipitar a amostra, foi adicionado etanol em excesso na solução e esta foi centrifugada à 12000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pó negro resultante (nanopartículas de Fe₃O₄ hidrofóbicas) foi disperso em hexano para preservação e posterior caracterização.

2.2.2.1. Caracterização das nanopartículas Fe₃O₄

De forma a verificar a distribuição de tamanho, morfologia e homogeneidade das nanopartículas de Fe₃O₄, foram efetuadas análises por microscopia eletrónica de transmissão (MET). Para caracterização da camada de ácido oleico que confere estabilidade e propriedades hidrofóbicas às nanopartículas, foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

2.2.2.1.1. Microscopia Eletrónica de Transmissão

Para efetuar a análise por MET, foram pipetados 15µL da solução de nanopartículas dispersas em hexano num *grid* de cobre de 3,05mm de diâmetro com uma camada de carbono (PLANO GmbH, Alemanha), próprio para análise por MET. O *grid* com a amostra foi incubado a 37°C para evaporação do hexano e fixação das nanopartículas no *grid*. A análise foi realizada num microscópio eletrónico de transmissão Philips EM420 com uma operação de aceleração de voltagem entre 60 a 120 kV.

A distribuição de diâmetros das nanopartículas foi analisada com o *software* de imagem do próprio MET. Foram coletados dados de 160 nanopartículas e com o auxílio do *software* estatístico SPSS, foi construído um histograma e a correspondente curva normal com a gama de diâmetros das partículas sintetizadas.

2.2.2.1.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Para análise por FTIR, 20 μ L da amostra contendo as nanopartículas dispersas em hexano foram incubadas numa *hotte* a temperatura ambiente durante 12 horas para evaporação do hexano. A análise da amostra foi realizada com o espectrofotômetro FT-IR Varian 660-IR e os espectros foram registrados num intervalo de 500 a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} .

2.2.3. Funcionalização das nanopartículas de Fe₃O₄

O protocolo utilizado para substituição da camada de ácido oleico das nanopartículas de Fe₃O₄ pelo *tag* Glutamato da proteína Glu-tag silicateína- α foi baseado no artigo de Palma *et al.* (2007) [15] no qual os autores utilizaram o ácido acético para catalisar uma reação de troca de ligando. Inicialmente 10mg de nanopartículas de Fe₃O₄ hidrofóbicas foram ressuspensas em 5mL de hexano contendo 0,1% (v/v) de ácido acético, a solução foi agitada suavemente e então adicionou-se 5mL do eluato contendo a enzima Glu-tag silicateína- α formando duas fases distintas. O tubo contendo a mistura foi posto numa agitadora orbital a 250rpm, a uma temperatura de 25°C durante 72 horas. Após este período a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 12000 rpm, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em tampão Tris (pH8), então submeteu-se a amostra a 1 ciclo de sonicação por 10 segundos com 25% de potência do equipamento. Devido ao caráter magnético das nanopartículas, os tubos contendo a mistura foram transferidos para um rack magnético (Magna RackTM CS15000, InvitrogenTM, Alemanha), possibilitando assim a separação magnética das nanopartículas do sobrenadante. As nanopartículas foram lavadas 2 vezes com tampão Tris e uma vez com água destilada para remover qualquer resíduo de hexano. A solução foi agitada e as nanopartículas foram separadas do meio, o sobrenadante foi descartado e as nanopartículas foram dispersas adicionando 1mL de água destilada em cada tubo de reação. Por fim os tubos com as nanopartículas foram armazenados a temperatura de 4°C para posterior análise microscópica de fluorescência da enzima imobilizada.

2.2.3.1. *Antibody staining e microscopia de fluorescência*

Para efetuar o *antibody staining*, 100µL duma suspensão de nanopartículas com a enzima imobilizada foram pipetadas para um tubo de reação. Paralelamente, como controlo foi utilizado um tubo contendo nanopartículas sem a enzima imobilizada. Os tubos foram colocados no rack magnético, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1mL de solução de bloqueio. Os tubos foram postos em agitação suave durante 2 horas, após este período adicionou-se 1µL do 1º anticorpo (anti-His/C-terminal), os tubos foram protegidos para evitar qualquer contato com luz e voltaram a ser postos em agitação durante 14 horas a temperatura de 4°C. Após este período o sobrenadante foi separado e removido com auxílio do rack magnético e as amostras foram lavadas 3 vezes com tampão Tris. Adicionou-se 1mL de solução de bloqueio e em seguida foi adicionado 1µL do 2º anti corpo (anti-rato cy2), as amostras foram protegidas para evitar contato com a luz e postos em agitação suave por 2 horas. Após este período, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado 3 vezes com tampão Tris. Por fim, foram pipetadas 50µL das amostras em lâminas de vidro para microscopia, a amostra foi coberta por uma lamela de vidro e estas foram analisadas com um microscópio digital invertido de fluorescência EVOS XL (AMG, Alemanha) por emissão de fluorescência do 2º anticorpo a um comprimento de onda de 540nm.

2.2.4. **Renaturação da Glu-tag silicateína- α imobilizada**

Para promover a renaturação da enzima imobilizada na superfície das nanopartículas, os tubos contendo a enzima imobilizada dispersas em água destilada foram colocados no rack magnético para remoção do sobrenadante. Adicionou-se 2 mL de tampão de renaturação (pH8) (0,7M L-arginina, 0,1% (v/v) CHAPS, 10 mM GSH_{red}, 1mM GSSG_{oxid}), e os tubos foram postos em agitação por 24 horas a 4°C. Após este período as amostras foram novamente separadas do sobrenadante, adicionou-se 2mL de tampão de renaturação e foram colocados em agitação por mais 3 horas a 4°C. Após a fase de renaturação as amostras foram separadas do sobrenadante e lavadas 2 vezes com água destilada. Por fim, as nanopartículas com a enzima imobilizada foram dispersas em água destilada e armazenadas a 4°C.

2.2.5. **Síntese das camadas de biosílica e dióxido de titânio (TiO₂)**

Para a síntese das camadas de biosílica e TiO₂ pela Glu-tag silicateína- α imobilizada na superfície das nanopartículas, as amostras distintas foram incubadas respetivamente com os

substratos tetraetilortossilicato (TEOS) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e dihidroxidodilactatotitanato(IV) de amônio (Ti-BALDH) (Sigma-Aldrich, Alemanha).

2.2.5.1. Síntese da camada de biosílica

I. Pré-hidrólise do TEOS

Antes de utilizar o substrato TEOS foi necessário proceder a pré-hidrólise deste substrato devido as características hidrofóbicas que o mesmo apresenta.

Para a pré-hidrolise do TEOS, 5mL de água destilada, 25 μ L de 2M HCl e 12 μ L de 4,48M TEOS foram colocados num tubo Falcon e postos numa agitadora orbital a 250rpm durante 30 minutos. Para neutralizar a solução (pH=7,0) adicionou-se 25 μ L de 2M NaOH. Após 15 minutos de agitação verificou-se o pH e a solução foi armazenada a 4°C.

II. Incubação com TEOS

A um tubo contendo a enzima imobilizada na superfície das nanopartículas dispersas em 500 μ L de água destilada adicionou-se 12,5 μ L 10mM de TEOS (concentração final de 250 μ M). Após adição do substrato, o tubo foi colocado em agitação suave a 4°C durante 24h. Após este período, utilizando o rack magnético, procedeu-se a remoção do sobrenadante e à sua substituição por nova solução de TEOS e o tubo colocado novamente a agitar a 4°C durante 24h. Procedeu-se a nova substituição da solução de TEOS nos três dias subsequentes. Como controlo, submeteu-se ao mesmo procedimento nanopartículas com a camada de ácido oleico.

2.2.5.2. Síntese da camada de TiO₂

I. Incubação com Ti-BALDH

O procedimento para formação da camada de TiO₂ foi idêntico ao utilizado para a formação da camada de biosílica. Durante 5 dias foram adicionados soluções renovadas de 250 μ M Ti-BALDH. Como controlo foram também utilizadas nanopartículas com uma camada de ácido oleico.

2.2.6. Caracterização da síntese de camadas de biosílica e TiO₂

No sentido de analisar a morfologia das camadas de biosílica e TiO₂, foram efetuadas análises por TEM e caracterização química por espectroscopia de raios-X por dispersão em

energia (EDX). Amostras tratadas com TEOS e Ti-BALDH foram analisadas de forma a confirmar a formação das camadas ao redor da enzima imobilizada na superfície das nanopartículas.

I. Análise por MET

Para análise das amostras individuais de nanopartículas com uma camada de biosílica e de TiO_2 , as amostras foram separadas magneticamente do sobrenadante para remoção de qualquer resíduo de substrato, sendo novamente ressuspensas em água destilada. Então foram pipetados $15\mu\text{L}$ de cada amostra em *grids* de cobre de 3,05mm de diâmetro com uma camada de carbono e com 200 poros. Os *grids* com as amostras foram incubados a 37°C durante 24 horas para evaporação da água e fixação das nanopartículas nos *grids*. O equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM420 com uma operação de aceleração de voltagem de 120 kV.

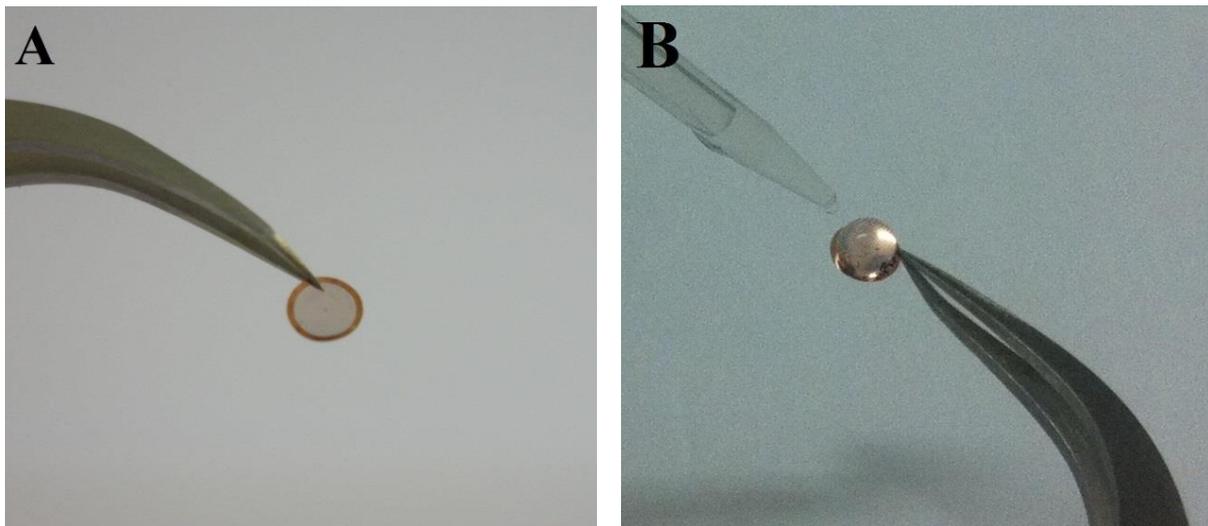


Figura 2.1. Imagem ilustrativa de um grid cobre de 3,05mm de diâmetro com uma camada de carbono e 200 poros para análise por MET (A). Aplicação da amostra (imagem B) no grid para análise por MET.

II. Caracterização por EDX

Para caracterização química das amostras contendo a camada de biosílica e TiO_2 ao redor das nanopartículas, foi realizada uma análise por EDX. Inicialmente, as amostras foram separadas do sobrenadante para remoção de qualquer resíduo do substrato e ressuspensas em água destilada. Após este passo, foram pipetados $15\mu\text{L}$ das amostras em *pins* de alumínio de 12mm de diâmetro cobertas com um disco de carbono de $40\mu\text{m}$ (PLANO GmbH), adequados

para análise por EDX. As amostras foram incubadas numa *hotte* durante 48 horas para evaporação da água da amostra e fixação das mesmas na camada de carbono. As análises foram realizadas com o microscópio eletrônico de transmissão TECNAI F30 com uma operação de aceleração de voltagem de 20 keV.

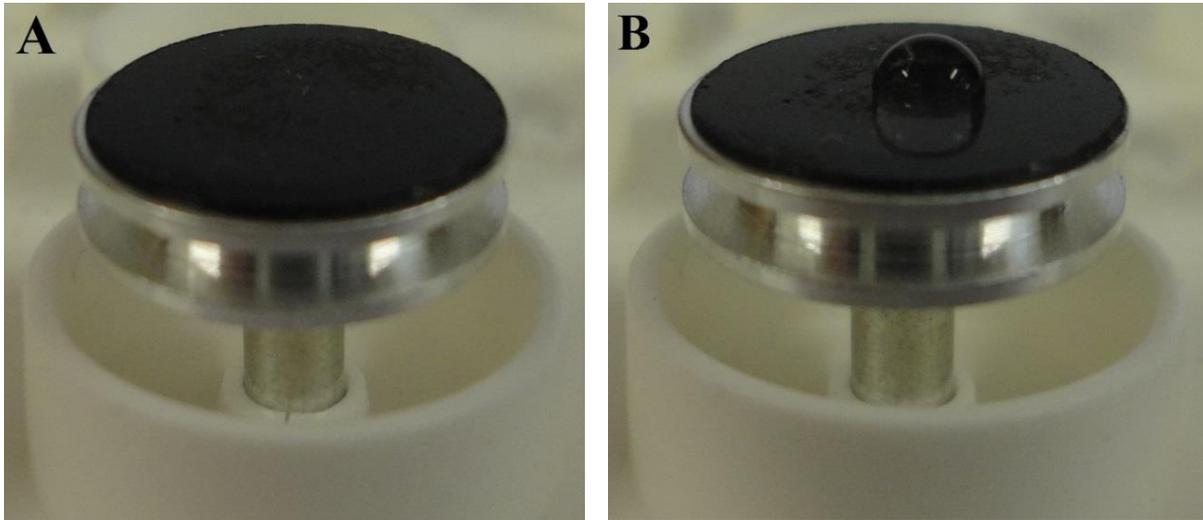


Figura 2.2. Imagem ilustrativa de um Pin de alumínio com 12mm de diâmetro coberto com camada de carbono de 40 μ m para análise por EDX. A imagem B apresenta a amostra aplicada sobre a camada de carbono.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Expressão e Purificação da Glu-tag silicateína- α

A enzima utilizada para ser imobilizada na superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 foi expressa através de processos fermentativos utilizando células de *E. coli*. Quando a confluência celular das culturas em crescimento atingiu uma D.O. (600nm) entre 0,4 - 0,6 foi adicionado o indutor de expressão proteica L-arabinose que promove um aumento da expressão dos genes regulados por promotores P_{BAD} .

A purificação da enzima foi feita por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) de acordo com o manual da QIAGEN® e o processo de purificação sob condições de desnaturação.

Após ser purificada a enzima Glu-tag silicateína- α foi quantificada pelo método de *Bradford*, apresentando uma concentração de 203 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.1.1. Gel de Purificação

O processo de purificação da enzima Glu-tag silicateína- α , descrito no capítulo de Materiais e Métodos, foi avaliado através de géis SDS-PAGE de amostras recolhidas durante o processo cromatográfico (figura 3.1).

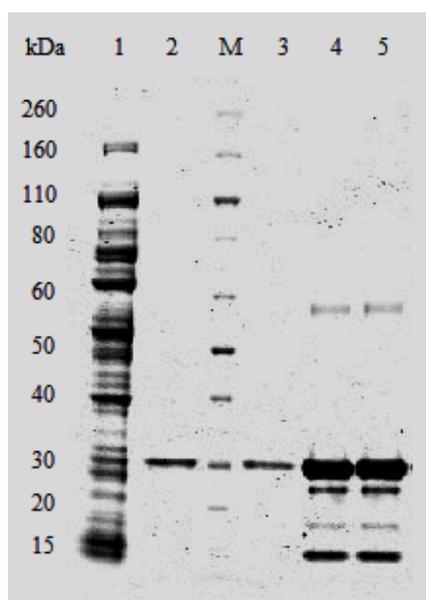


Figura 3.1. Gel de 12% de acrilamida relativo a purificação da enzima Glu-tag silicateína- α por cromatografia de afinidade por metal imobilizado. No gel, (1) o flow-through. (2) e (3) Fração de eluição 2; (4) e (5) Fração de eluição 1. (M) Marcador de peso molecular em kDa.

Por análise do gel representado na figura 3.1, permite-nos verificar a eficácia da técnica cromatográfica utilizada na purificação da Glu-tag silicateína- α ao comparar o poço 1, referente ao *flow-through* com os poços 2 e 3 referentes a fração de eluição 2.

Utilizando como referência a banda de 30 kDa do marcador, é possível notar uma banda nos poços 2 e 3 com um peso molecular aproximado de 29 kDa [42], referente à enzima de interesse.

Ao analisar as bandas referentes aos poços 4 e 5, é possível visualizar uma banda intensa nos 30 kDa que corresponde à enzima de interesse, porém abaixo desta observa-se outras bandas, possivelmente referentes a resíduos da enzima. Estes resíduos podem estar relacionados com os inúmeros passos de lise do processo de extração da enzima ou ainda à ação proteásica proveniente da própria célula como mecanismo de defesa. Também se verificou uma banda imediatamente abaixo dos 60 kDa que pode estar relacionada à presença de dímeros da enzima de interesse, visto terem aproximadamente o dobro do peso molecular da enzima em questão. Embora o *loading buffer* utilizado apresente β -mercaptoetanol na sua composição, estes dímeros podem ter ocorrido devido não ter sido efetuado um processo de aquecimento das enzimas antes de ter-se corrido o gel.

3.1.2. Caracterização da Glu-tag silicateína- α

Para a caracterização da Glu-tag silicateína- α referente as frações do eluato resultante do processo de purificação, ensaios de reconhecimento por *Western blot* foram efetuados.

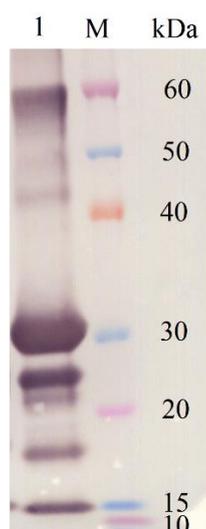


Figura 3.2. Reconhecimento da enzima Glu-tag silicateína- α por análise *Western blot*. Linha 1 representa uma amostra contendo a fração de eluato do processo de purificação. (M) representa o marcador de peso molecular em kDa.

Para realizar o reconhecimento da Glu-tag silicateína- α através da sua cauda de histidinas foi utilizado o anticorpo Anti-His (C-terminal) conjugada com fosfatase alcalina.

Por análise da figura 3.2 é possível avaliar a especificidade de reconhecimento das enzimas expressas. Usando como referência a banda de 30 kDa é possível visualizar uma banda intensa, referente à enzima produzida para com o anticorpo de reconhecimento Anti-His (C-terminal) /fosfatase alcalina conjugada. No topo da membrana nota-se uma banda próxima dos 60 kDa, provavelmente referente a dímeros da enzima de interesse. Também é possível notar outras bandas significativas abaixo da banda de 30 kDa. Estas bandas podem ser resíduos da Glu-tag silicateína- α que não apresentam a sua estrutura completa devido ação proteásica como mecanismo de defesa celular ou aos inúmeros processos de lise, porém mantiveram a cauda C-terminal com as histidinas e assim foram imobilizadas no processo de purificação.

3.2. Síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 com camada de ácido oleico

O processo de síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 utilizado foi o de decomposição térmica. Este método proporciona nanopartículas com uma variação pequena de diâmetros e não apresenta a necessidade de ajustes de pH nas fases de formação e estabilização além de não serem necessários procedimentos adicionais para a seleção e controle de tamanho [7]. Além de produzir nanopartículas dentro duma gama de diâmetros onde as características superparamagnéticas em temperatura ambiente são mantidas [7][15].

A síntese das nanopartículas foi realizada com uma modificação, no que diz respeito ao fluxo de gás em que ocorreu a reação. No processo de síntese, os autores realizaram a reação sob fluxo de azoto enquanto para a síntese efetuada neste estudo, foi utilizado o gás árgon por se tratar também de um gás inerte.

Amostras foram analisadas por MET, onde foi possível avaliar a morfologia e dispersibilidade das nanopartículas. Com base nas imagens da figura 3.3 é possível constatar a formação de nanopartículas de Fe_3O_4 dispersas e com morfologia esférica regulares.

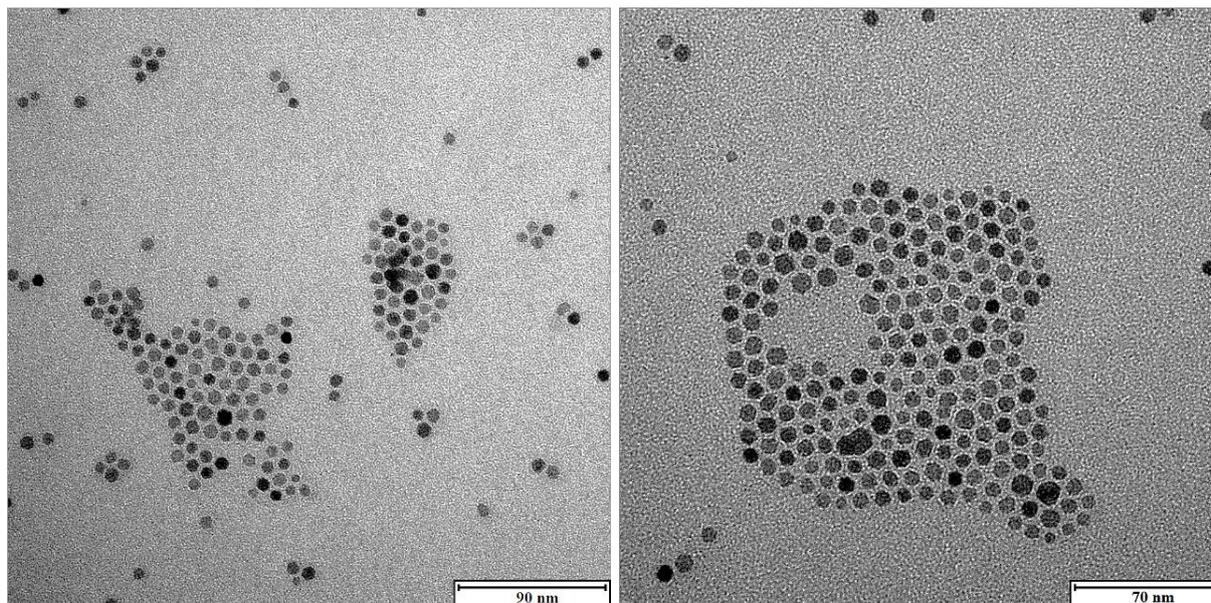
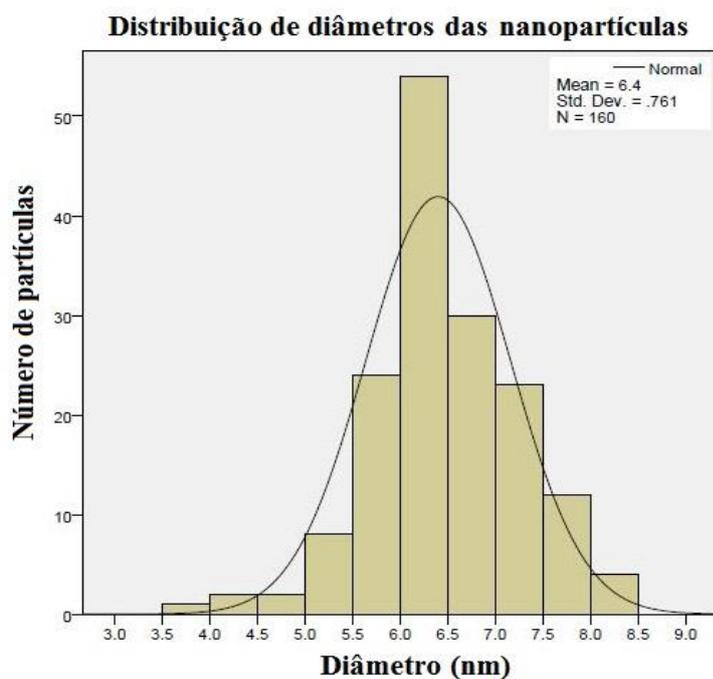


Figura 3.3. Imagem por MET onde é possível visualizar a morfologia e dispersibilidade das nanopartículas de Fe_3O_4 com uma camada de ácido oleico, sintetizadas pelo método de decomposição térmica.

Para análise da distribuição de tamanho das nanopartículas foi utilizado o *software* de imagem do MET. Com os dados de 160 nanopartículas, foi criado um histograma e respectiva curva normal utilizando o *software* SPSS (gráfico 3.1), de forma a avaliar a distribuição de tamanhos das nanopartículas e o respectivo desvio padrão. Estes valores são importantes pois definem se o método de síntese pode ou não ser utilizado em aplicações biomédicas [7].

Gráfico 3.1. Histograma com a distribuição de diâmetros e curva normal, construído através do *software* estatístico SPSS com valores referentes ao diâmetro das nanopartículas de Fe_3O_4 coletados através do *software* de imagem do MET.



Com 95% de confiança, obteve-se o intervalo de valores com uma média de diâmetro de 6,4nm e um desvio padrão de 0,761, sendo o menor valor 6,28nm e o maior valor 6,52nm. Os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com outras publicações [1][5][62].

3.2.1. Caracterização da camada de ácido oleico por FTIR

Para caracterização da camada de ácido oleico das nanopartículas foi efetuada uma análise por FTIR. O espectro resultante da análise duma amostra (Figura 3.4) apresenta fortes bandas em 2923cm^{-1} e 1462cm^{-1} (alongamento assimétrico) e 2859cm^{-1} (alongamento simétrico) das ligações C-H dos grupos CH_2 que são presentes no ácido oleico [15][63]. A banda em 2957cm^{-1} refere-se ao alongamento assimétrico das ligações C-H do grupo CH_3 [15][63]. Outra informação importante que caracteriza o ácido oleico é revelada pela presença da banda em 1378cm^{-1} que é atribuído à vibração da ligação C=O do grupo carboxilato (COO^-) [62]. A banda de absorção em 704cm^{-1} é atribuída ao movimento de balanço C-H do grupo ($-\text{CH}=\text{}$) [64][65] enquanto a banda de absorção de 627cm^{-1} é atribuído as ligações entre o grupo carboxilato e a nanopartícula de Fe_3O_4 [15]. Por último, a banda de absorção em 533cm^{-1} corresponde a vibração de ligação Fe-O relacionado a fase magnética [62].

Com base nos resultados obtidos por MET e FTIR pode-se concluir que o processo de síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 com uma camada de ácido oleico foi bem-sucedido.

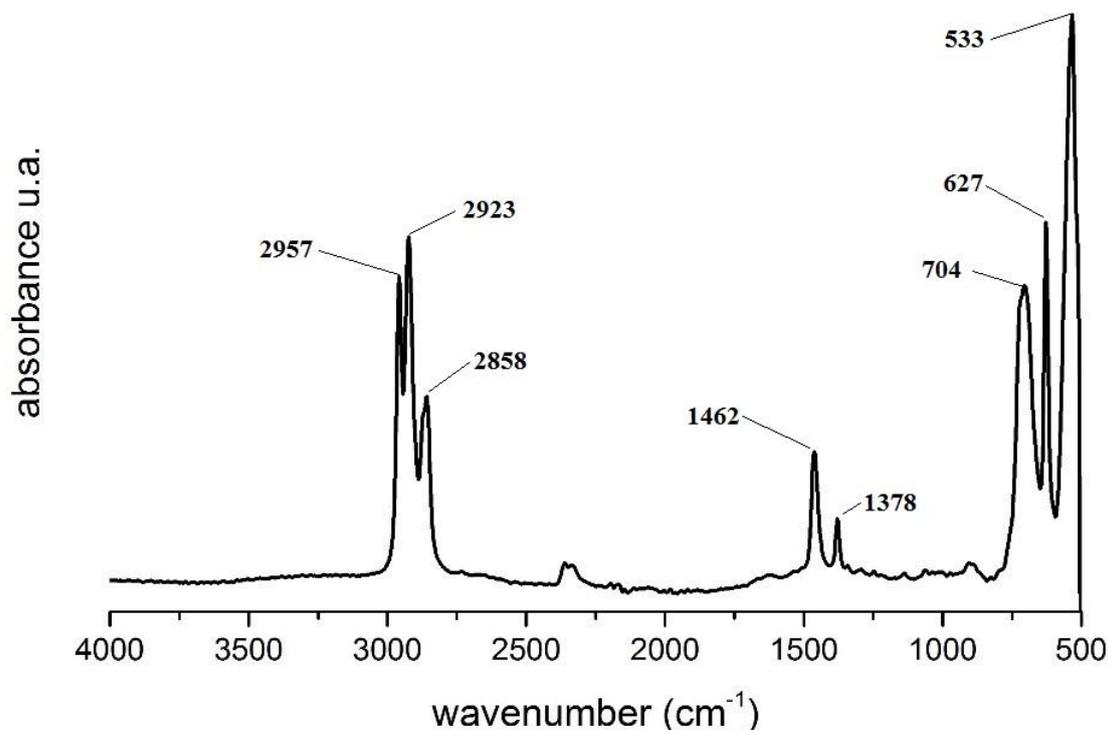


Figura 3.4. Espectro resultante da análise por FTIR para caracterização da camada de ácido oleico das nanopartículas de Fe_3O_4 .

3.3. Funcionalização das nanopartículas de Fe₃O₄

A substituição da camada protetora de ácido oleico que proporciona o caráter hidrofóbico das nanopartículas, pela enzima Glu-tag silicateína- α na superfície da nanopartícula, permite a solubilidade do complexo nanopartícula-enzima em meios aquosos.

Sendo previamente demonstrado [30] que a silicateína- α recombinante retém a sua atividade biocatalítica após imobilização em superfícies de metais óxidos, foi delineado um procedimento de imobilização da enzima na superfície das nanopartículas de Fe₃O₄ pela imobilização dos aminoácidos glutamatos presente na cauda N-terminal da enzima de interesse. Através do grupo carboxilato destes aminoácidos, substituir as moléculas de ácido oleico presente na superfície das nanopartículas.

Apesar de existir uma diversidade de metodologias que possibilitam a dispersão de nanopartículas, antes hidrofóbicas, em meios aquosos utilizando tensioativos, foi delineado um procedimento simples que se baseia na substituição direta da camada de ácido oleico da superfície das nanopartículas de Fe₃O₄ pela enzima de interesse sem o auxílio de moléculas intermediárias.

Este procedimento possibilita a dispersão destas nanopartículas em meio aquoso para posterior formação de camadas de biosílica ou TiO₂ através do uso de substratos específicos e estáveis em água. Uma vez que para a síntese destes materiais por vias sintéticas são necessárias elevadas temperaturas e pH ácido, este procedimento reduz o número de reações consideradas pouco biocompatíveis [50].

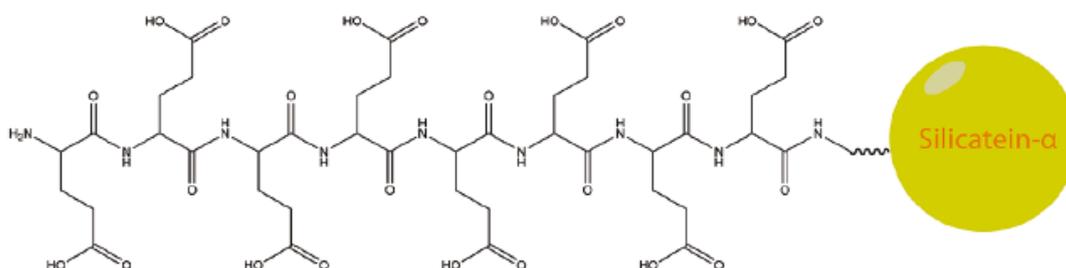


Figura 3.5. Representação esquemática da Glu-tag Silicateína- α com destaque da cauda N-terminal com os 8 tags glutamato (esquema não representa a escala real) (adaptado [48]).

Para que houvesse a substituição da camada de ácido oleico pela enzima, foi utilizado ácido acético como catalisador da reação [15]. De forma a reduzir a formação de agregados e evitar a oxidação das nanopartículas devido estas não apresentarem a camada de ácido oleico durante

a troca do revestimento [3], a adição do ácido acético procedeu-se seguida da adição da enzima em tampão de eluição.

Devido às suas características hidrofílicas e hidrofóbicas, a enzima e as nanopartículas respetivamente, formaram uma mistura heterogénea. Porém na interface hidrofóbica-hidrofílica da mistura existe o contacto entre as nanopartículas com as enzimas permitindo assim a sua imobilização na superfície das nanopartículas.

O processo de agitação foi importante pois promoveu a circulação das nanopartículas e enzimas nas suas respetivas fases, possibilitando um maior contacto entre estas na interface da mistura e assim a passagem das nanopartículas funcionalizadas para a fase aquosa.

Na imagem (3.6A) é possível observar que no frasco da direita, contendo a enzima imobilizada na superfície das nanopartículas, existem aglomerações. Ao efetuar a centrifugação após a reação de imobilização da enzima, estas foram compactadas formando um *pellet* denso dificultando a sua dispersão, podendo estar relacionado com a agregação das enzimas.

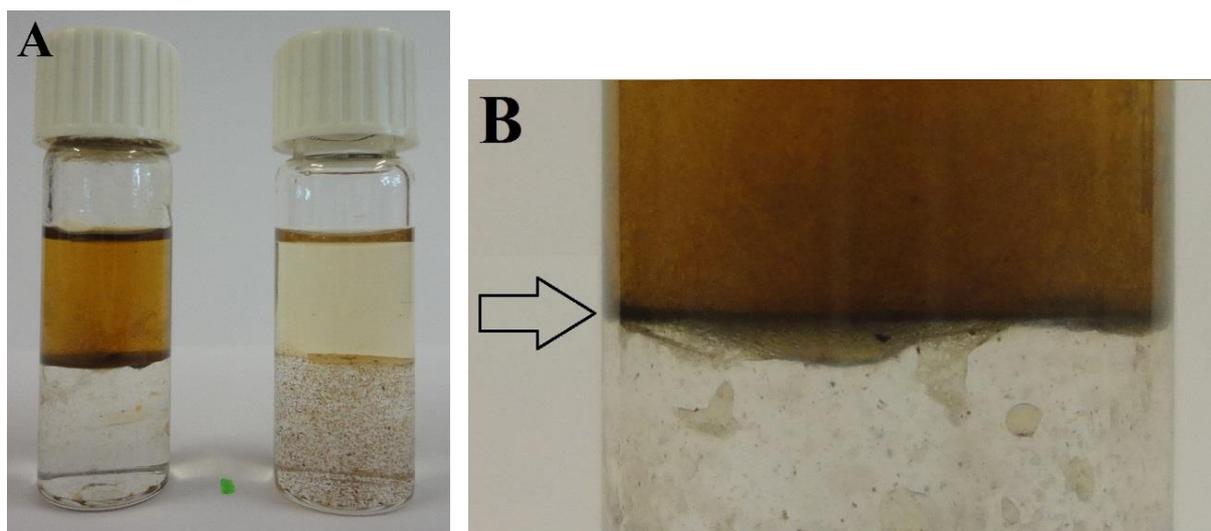


Figura 3.6. Imagem (A): frascos contendo as nanopartículas antes e depois da reação de imobilização da Glu-tag silicateína- α . O frasco da esquerda contém na parte superior as nanopartículas dispersas em hexano enquanto a enzima de interesse encontra-se em tampão de eluição na parte inferior. O frasco da direita (imagem A) contém a amostra após a reação de imobilização da enzima na superfície das nanopartículas. A parte superior da mistura contém hexano. Na imagem (B), uma seta indica a interface entre as duas misturas onde ocorre a reação de troca do ácido oleico pelas enzimas nas nanopartículas.

Efetuuou-se uma agitação rigorosa da suspensão seguido de sonicação com baixa intensidade apenas por alguns segundos para dispersar as enzimas de modo que não ocorressem possíveis desprendimentos da enzima imobilizada na superfície da nanopartícula. Na figura 3.7A é possível verificar o resultado deste procedimento, a solução apresenta uma dispersão

visivelmente superior apesar de ainda haver algumas aglomerações. Na figura 3.7B é realizado um teste para verificar as propriedades magnéticas das nanopartículas após o processo.

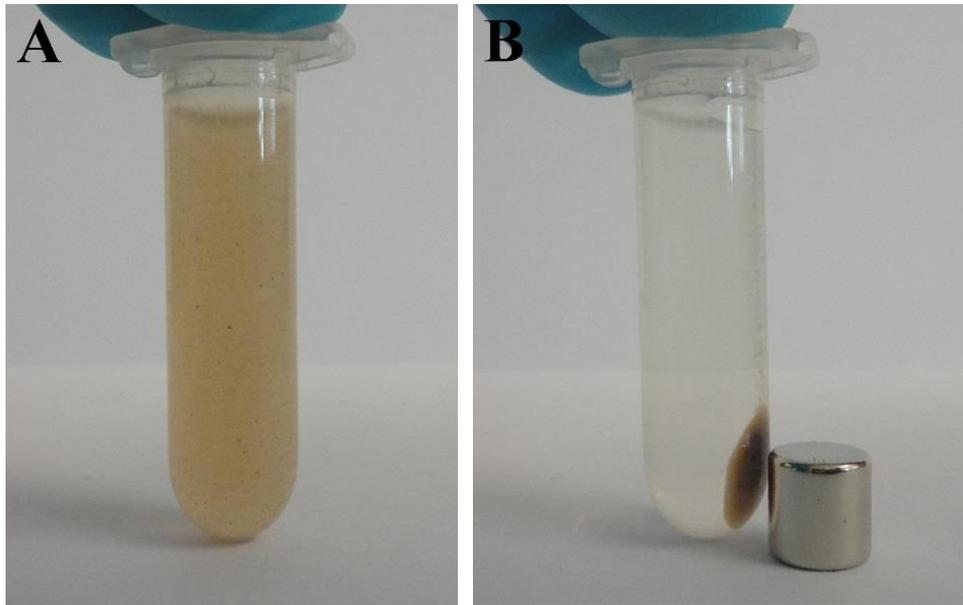


Figura 3.7. Nanopartículas de Fe_3O_4 com a enzima Glu-tag silicateína- α imobilizada na sua superfície dispersas em água destilada (A). Na imagem (B) é efetuado um teste para verificar as propriedades magnéticas das nanopartículas. Utilizou-se um ímã de neodímio para efetuar o teste.

3.3.1. *Antibody staining* e microscopia de fluorescência

De modo a determinar a eficiência de imobilização da Glu-tag silicateína- α na superfície das nanopartículas foi realizado um ensaio de *antibody staining* e visualização por microscopia de fluorescência. As amostras foram incubadas com os anticorpos Anti-His (C-terminal) para efetuar a ligação específica na enzima de interesse seguindo da incubação com anticorpos Anti-rato Cy2 com fluoróforo conjugado. As imagens (figura 3.8A e 3.8B) representam as enzimas imobilizadas. A visualização na figura 3.8B é possível devido a emissão de fluorescência verde emitida a um comprimento de onda a 540nm pelo fluoróforo conjugado com o segundo anticorpo quando excitado a um comprimento de onda de 492nm. Como controlo (figura 3.8C e 3.8D), apenas nanopartículas sem a enzima imobilizada foram incubadas com os anticorpos.

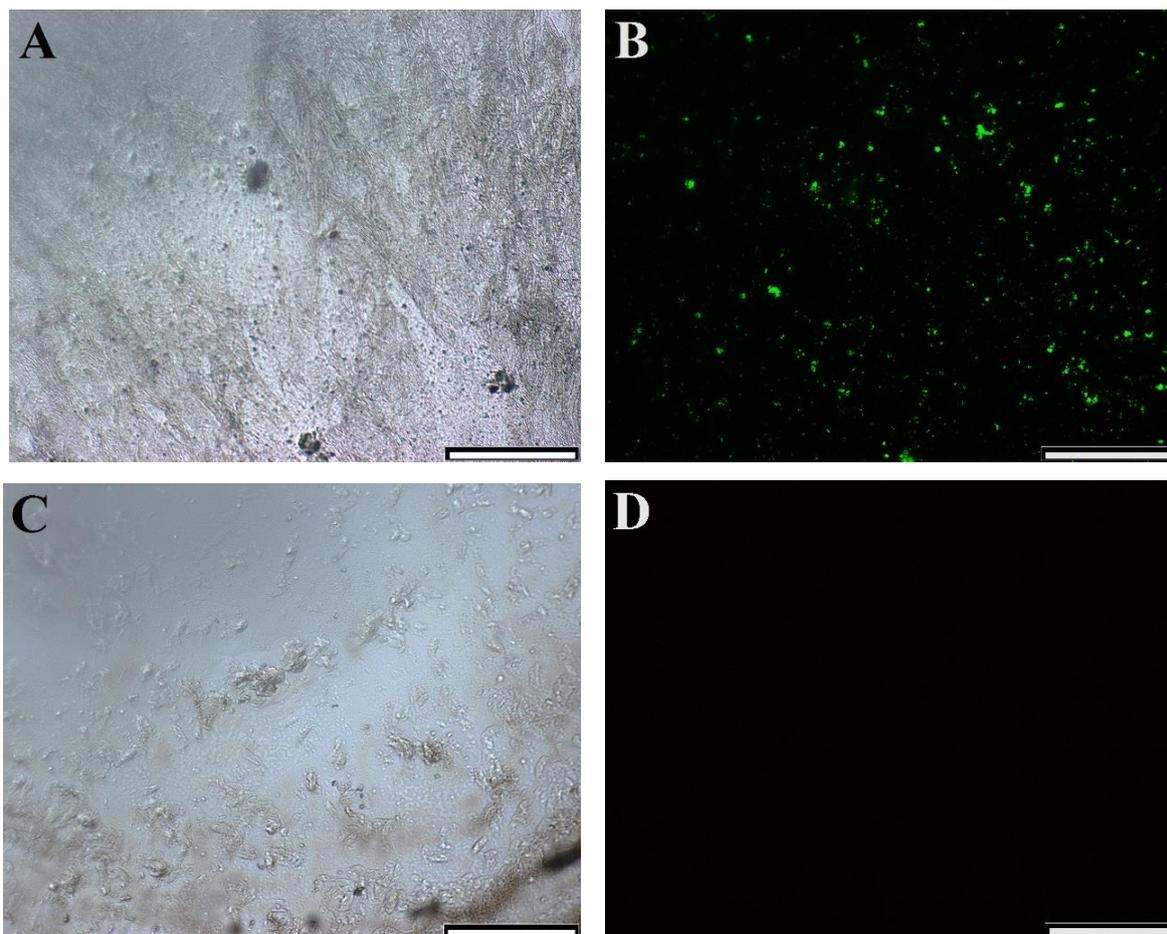


Figura 3.8. Imagens de microscopia para verificar a imobilização da Glu-tag silicateína- α nas nanopartículas de Fe_3O_4 por fluorescência do 2º anticorpo com o fluoróforo conjugado. As imagens (A) e (B) representam a amostra tratada com os anticorpos. Na imagem (B) é possível observar a emissão de fluorescência do 2º anticorpo na amostra quando excitado com um comprimento de onda de 492nm. As imagens (C) e (D) representam o controle onde é possível verificar a ausência de fluorescência na imagem (D). As escalas das imagens são 200 μm .

Na imagem 3.8B é possível verificar aglomerações, representado pelos grandes pontos fluorescentes, possivelmente relacionado com a formação de agregados de enzimas [49]. É possível verificar também que o processo de imobilização foi bem-sucedido devido aos inúmeros pontos fluorescentes das imagens. Uma possível via para contornar este obstáculo seria o uso de concentrações menores da enzima e evitar o uso de centrifugações antes do processo de incubação com os substratos.

3.4. Formação de camadas de biosílica e de TiO_2

Após o processo de renaturação das enzimas imobilizadas na superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 referido no capítulo do Materiais e Métodos, iniciou-se o processo de incubação com os substratos específicos tendo como objetivo a formação das camadas de biosílica e TiO_2 e

assim confirmar se as proteínas mantiveram a capacidade catalítica após imobilização e renaturação.

As amostras incubadas com os substratos TEOS e Ti-BALDH foram analisadas por MET e caracterizadas quimicamente por EDX, a fim de verificar a composição da camada ao redor das nanopartículas.

3.4.1. Síntese da camada de biosílica

Após o período de incubação com o substrato TEOS, para confirmar se houve a formação da camada de biosílica a volta das nanopartículas de Fe_3O_4 , foi realizada uma análise por MET.

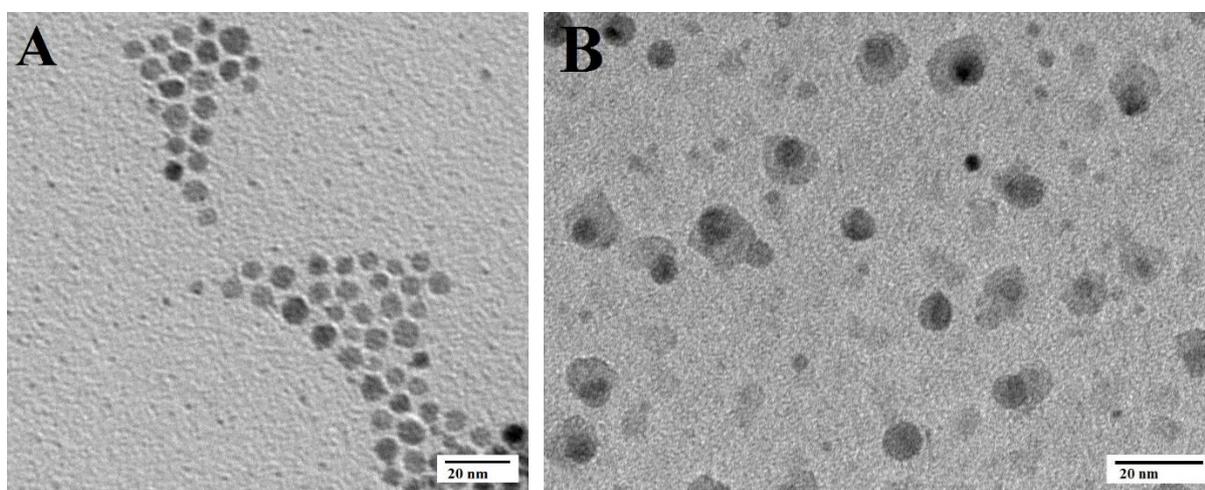


Figura 3.9. Imagens por MET das amostras incubadas com o substrato TEOS por 5 dias. Imagem (A) representa o controlo (nanopartículas sem a enzima imobilizada na sua superfície). (B) Formação de biosílica a volta das nanopartículas.

Através da análise das imagens (3.9A) e (3.9B), é possível observar a formação de uma camada a volta das nanopartículas na imagem (3.9B) enquanto na imagem (3.9A), referente ao controlo, é possível observar apenas as nanopartículas com morfologia esférica e tamanhos regulares sem qualquer tipo de camada. Na imagem (3.9B) observa-se que houve formação de uma camada irregular e que as nanopartículas apresentam tamanhos diferentes, devido provavelmente, ao processo de substituição da camada de ácido oleico pela enzima de interesse e por esta razão ter ocorrido a agregação das nanopartículas. Também é possível observar que a camada das nanopartículas é irregular, talvez devido ao procedimento de substituição da camada de ácido oleico pela enzima, algumas moléculas de ácido oleico não foram completamente substituídas, impossibilitando a imobilização das enzimas naquela parte da partícula, e por conseguinte, a formação de biosílica naquela área. Também pode estar relacionado com o facto de a enzima servir como molde para a formação de biosílica [22]

fazendo com que a camada não seja regular. Algumas nanopartículas não apresentam uma camada visível ao seu redor, talvez pelas enzimas não terem tido acesso ao substrato ou por apresentarem enzimas não funcionais imobilizadas em sua superfície.

Após a análise da amostra por MET, efetuou-se uma análise por EDX a fim de caracterizar quimicamente as nanopartículas e confirmar o processo de formação de biosílica.

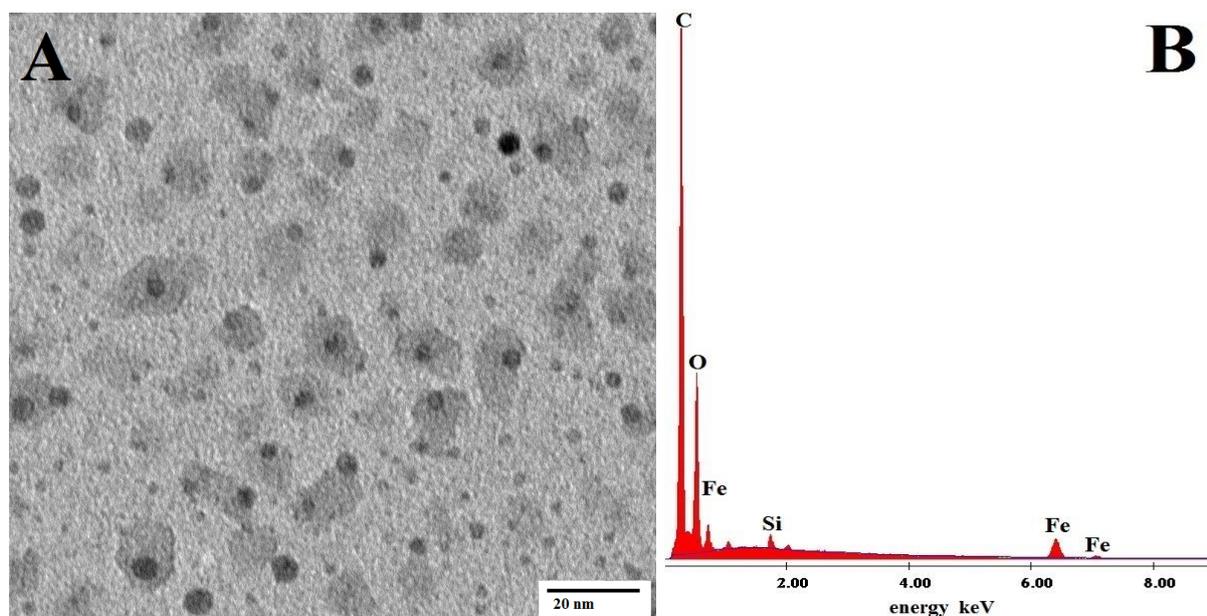


Figura 3.10. Imagem feita por MET (A) e caracterização da mesma amostra por EDX (B), onde é possível verificar o pico referente a silício (Si), confirmando a formação de biosílica ao redor das nanopartículas.

A amostra utilizada para análise por MET (imagem 3.10A) foi também utilizada para análise por EDX (imagem 3.10B). O pico de silício (Si) próximo de 2keV da imagem 3.10B confirma a formação de biosílica a volta das nanopartículas. Também são notórios os picos referentes aos compostos oxigênio e ferro, que representam as nanopartículas de Fe_3O_4 .

3.4.2. Síntese da camada de TiO_2

Após o período de incubação com o substrato Ti-BALDH, foi realizada uma análise por MET para avaliar a formação da camada de TiO_2 a volta das nanopartículas de Fe_3O_4 .

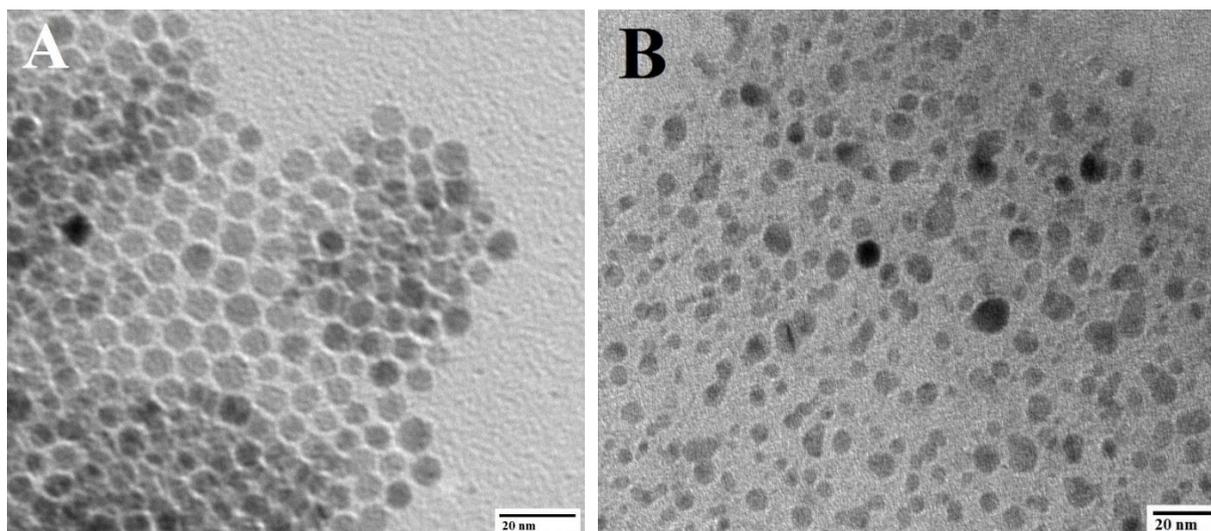


Figura 3.11. Imagens por MET das amostras incubadas com o substrato Ti-BALDH durante 5 dias. Imagem (A) representa o controlo (nanopartículas sem a enzima imobilizada na sua superfície). (B) Formação de TiO_2 a volta das nanopartículas.

Na figura (3.11), (A) representa o controlo e (B) a amostra com a enzima imobilizada nas nanopartículas. É possível verificar a morfologia irregular das nanopartículas da imagem (3.11B) comparativamente com a imagem (3.11A). A morfologia irregular das nanopartículas modificadas esta relacionada com a formação da camada de TiO_2 . Devido ao titânio ser um elemento com massa atómica próxima ao do elemento ferro, a visualização da camada não é tão evidente como na camada de biosilica devido ao contraste entre a camada de TiO_2 e a nanopartícula serem menores.

Efetou-se uma análise por EDX de modo a caracterizar quimicamente a camada a volta das nanopartículas tratadas com o substrato Ti-BALDH.

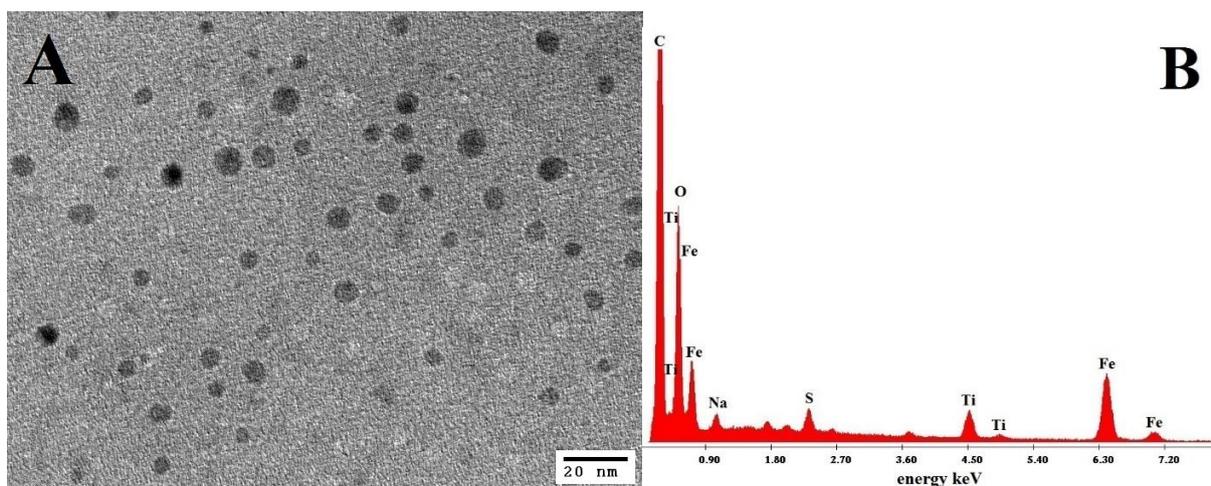


Figura 3.12. Imagem obtida por MET (A) e caracterização da mesma amostra por EDX (B), onde é possível verificar o pico referente ao titânio (Ti), confirmando a formação de TiO_2 ao redor das nanopartículas.

A figura 3.12 apresenta uma imagem de MET (3.12A) e o espectro de EDX (3.12B) da mesma amostra. Por análise do espectro de EDX é possível confirmar a formação de TiO_2 a volta das nanopartículas pela observação de um pico próximo de 0,90keV e dois picos entre 4,0 e 5,40keV.

4. CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma via simples de imobilização da enzima Glu-tag silicateína- α na superfície de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , efetuando um procedimento de substituição direta do tensoativo pela enzima em questão. Foi utilizado os princípios de funcionalização de superfícies, *self-assembly* e catálise enzimática de forma a obter-se nanopartículas de Fe_3O_4 com revestimentos de biosílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$) e dióxido de titânio ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{TiO}_2$).

Neste trabalho demonstrou-se que a imobilização direta da enzima Glu-tag silicateína- α utilizando *tags* específicos incorporados por meio de engenharia genética é um simples e eficiente método de funcionalização *one-step* sob condições fisiológicas suaves (solução tampão à pH neutro e temperatura ambiente).

Com os processos utilizados para a expressão e purificação da enzima Glu-tag silicateína- α , obteve-se a concentração de $203\mu\text{g/mL}$. Algumas melhorias no processo poderiam ter sido efetuadas como o pré-aquecimento das enzimas antes de correr o gel e a utilização de agentes inibidores de proteases no processo de expressão. Estes simples procedimentos aumentariam o grau de purificação melhorando a qualidade da enzima.

Os resultados obtidos por TEM e por FTIR juntamente com o tratamento estatístico demonstraram que o método de síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 através da decomposição térmica constitui um método eficiente. Com um diâmetro médio de partícula de $6,4\text{nm}$ e um desvio padrão de $0,761$ não são necessários procedimentos extras de seleção de tamanhos. Além de obter uma boa dispersão, é um método de síntese relativamente simples quando comparado com outros processos.

A imobilização da enzima foi confirmada por técnicas de *Antibody staining* e microscopia de fluorescência, onde verificou-se que o procedimento foi bem-sucedido devido aos inúmeros pontos fluorescentes da imagem de microscopia. Apesar da formação de agregados, pode-se concluir que o processo de imobilização foi satisfatório.

Os resultados obtidos por TEM e EDX da análise das amostras tratadas com os substratos específicos confirmaram a formação de camadas de biosílica e dióxido de titânio, caracterizando a formação de nanopartículas magnéticas encapsuladas com compostos óxidos que normalmente só são obtidos por vias químicas.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

O procedimento de imobilização da enzima Glu-tag silicateína- α em nanopartículas de Fe_3O_4 constitui um ponto de partida para a formação de novos materiais nanoestruturados magnéticos com características ímpares.

Devido a impossibilidade de tempo e acesso a equipamentos para efetuar importantes testes e de forma a completar e clarificar alguns pontos deste trabalho, seria importante:

- Efetuar análises de espectroscopia de Mössbauer às nanopartículas de Fe_3O_4 , antes do processo de substituição da camada de ácido oleico, de modo a complementar as análises de MET para confirmar a distribuição de tamanhos das nanopartículas;

- Determinar a estrutura cristalina das nanopartículas através de análises de microscopia eletrónica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e por difração de Raios-X antes e depois do processo de formação das camadas de biosílica e TiO_2 de modo a confirmar se houve oxidação das nanopartículas;

- Efetuar análises de comportamento magnético de forma a verificar os valores de M_s , temperatura de bloqueio (T_B) e o ciclo de histerese;

- Estudar as características fotocatalíticas das nanopartículas encapsuladas com TiO_2 efetuando a calcinação das nanopartículas, e então proceder a caracterização por espectrofotometria via degradação do azul-de-metileno.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Shukoor, M. I., Natalio, F., Therese, H. A., Tahir, M. N., Ksenofontov, V., Pantho, M., Eberhardt, M., Theato, P., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. e Tremel, W., Fabrication of a Silica Coating on Magnetic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles by an Immobilized Enzyme. *Chem. Mater* 20:3567–3573, 2008.
- [2] Auffan, M., Rose, J., Bottero, J., Lowry, G. V., Jolivet, J., Wiesner e M. R., Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.*, 4 (10) : 634–41, 2009.
- [3] Wu, W., He, Q. e Jiang, C., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.*, 3 (11): 397–415, 2008.
- [4] Dong, A., Ye, X., Chen, J., Kang, Y., Gordon, T., Kikkawa, J. M., e Murray, C. B., A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (4): 998–1006, 2011.
- [5] Lattuada, M. e Hatton, T. A., Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles. *Langmuir*, 23 (4): 2158–68, 2007.
- [6] Cristina, K., Souza, D., Della, N. e Mohallem, S., Nanocompósitos Magnéticos: Potencialidades de Aplicações em Biomedicina, *Quimica Nova*, 34(10): 1692–1703, 2011.
- [7] Sun, S., Zeng, H., Robinson, D. B., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X. e Li, G., Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *J Am Chem Soc.*, 4 (1):126–132, 2004.
- [8] Jun, Y., Choi, J. e Cheon, J., Heterostructured magnetic nanoparticles: their versatility and high performance capabilities. *Chem. Commun. (Camb).*, 12:1203–14, 2007.
- [9] Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F. e Sun, M., Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization. *Molecules*, 19 (8):11465–86, 2014.
- [10] Pascal, C., Pascal, J. L. e Favier F., Electrochemical Synthesis for the Control of γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chem. Mater*, 17: 141–147, 1999.
- [11] Bomati-Miguel, O., Mazeina, L., Navrotsky, A. e Veintemillas-Verdaguer, S., Calorimetric Study of Maghemite Nanoparticles Synthesized by Laser-Induced Pyrolysis. *Chem. Mater.*, 20 (2): 591–598, 2008.
- [12] Bharde, A. A., Parikh, R. Y., Baidakova, M., Jouen, S., Hannoyer, B., Enoki, T., Prasad, B. L. V., Shouche, Y. S. e Ogale, S., Bacteria-Mediated Precursor-Dependent Biosynthesis of Superparamagnetic Iron Oxide and Iron Sulfide Nanoparticles. *J Am Chem Soc.*, 16:5787–5794, 2008.

-
- [13] Latorre, M. D. e Rinaldi, C., Applications of Magnetic Nanoparticles in Medicine : Magnetic Fluid Hyperthermia. *PRHSJ*, 28 (3): 227–238, 2009.
- [14] Hyeon, T., Lee, S. S., Park, J., Chung, Y. e Na, H. B., Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process. *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (51): 12798–12801, 2001.
- [15] De Palma, R., Peeters, S., Van Bael, M. J., Van Den Rul, H., Bonroy, K., Laureyn, W., Mullens, J., Borghs, G. e Maes, G., Silane Ligand Exchange to Make Hydrophobic Superparamagnetic Nanoparticles Water-Dispersible. *Chem. Mater.*, 10: 1821–1831, 2007.
- [16] Kawai-Nakamura, A., Sato, T., Sue, K., Tanaka, S., Saitoh, K., Aida, K. e Hiaki, T., Rapid and continuous hydrothermal synthesis of metal and metal oxide nanoparticles with a microtube-reactor at 523 K and 30 MPa. *Mater. Lett.*, 62 (19): 3471–3473, 2008.
- [17] Wang, X., Zhou, J., Miao, C., Wang, Y., Wang, H., Ma, C. e Sun, S., Synthesis and size control of ferric oxide nanoparticles via a hydrothermal stripping route. *J. Nanoparticle Res.*, 14 (4): 783, 2012.
- [18] Susiik, K. S., Choet, S., Cichowlass, A. A. e Grinstaff, M. W., Sonochemical synthesis of amorphous iron. *Nature*, 353: 414–416, 1991.
- [19] Vijayakumar, R., Kolytyn, Y., Felner, I. e Gedanken, A., Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles. *Materials Science and Engineering*. 286:101–105, 2000.
- [20] Sahoo, Y., Pizem, H., Fried, T., Golodnitsky, D., Burstein, L., Sukenik, C. N., Markovich, G. e Gan, R., Alkyl Phosphonate / Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles : A Comparison with Fatty Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 23: 7907–7911, 2001.
- [21] Lee, H., Lee, E., Kim, D. K., Jang, N. K., Jeong, Y. Y. e Jon, S., Antibiofouling Polymer-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Potential Magnetic Resonance Contrast Agents for in Vivo Cancer Imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 19: 7383–7389, 2006.
- [22] Schröder, H. C., Schloßmacher, U., Boreiko, A., Natalio, F., Baranowska, M., Brandt, D., Wang, X., Tremel, W., Wiens, M. e Müller, W. E. G., Silicatein: Nanobiotechnological and Biomedical Applications. *Springer*, 47:251–273, 2009.
- [23] Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G. D. e Morse, D. E., Silicatein alpha : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95 (11): 6234–6238, 1998.
- [24] Ha, J. E. N. C., Himizu, K. A. S., Hou, Y. A. N. Z., Hristiansen, S. E. A. N. C. C. e Hmelka, B. R. F. C., Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 361–365, 1999.

-
- [25] Wang, X., Schloßmacher, U., Wiens, M., Batel, R., Schröder, H. C. e Müller, W. E. G., Silicateins, silicatein interactors and cellular interplay in sponge skeletogenesis: formation of glass fiber-like spicules. *FEBS J.*, 279 (10): 1721–36, 2012.
- [26] Müller, W. E. G., Rothenberger, M., Boreiko, A., Tremel, W., Reiber, A. e Schröder, H. C., Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *Cell Tissue Res.*, 321(2):285–97, 2005.
- [27] Müller, W. E. G., Schloßmacher, U., Wang, X., Boreiko, A., Brandt, D., Wolf, S. E., Tremel, W. e Schröder, H. C., Poly(silicate)-metabolizing silicatein in siliceous spicules and silicasomes of demosponges comprises dual enzymatic activities (silica polymerase and silica esterase). *FEBS J.*, 275 (2): 362–70, 2008.
- [28] Fairhead, M., Johnson, K., Kowatz, T., McMahon, S., Carter, L. G., Oke, M., Liu, H., Naismith, J. H. e van der Walle, C. F., Crystal structure and silica condensing activities of silicatein alpha-cathepsin L chimeras. *Chem. Commun. (Camb)*., 15:1765–7, 2008.
- [29] Schröder, H. C., Brandt, D., Schloßmacher, U., Wang, X., Tahir, M. N., Tremel, W., Belikov, S. I. e Müller, W. E. G., Enzymatic production of biosilica glass using enzymes from sponges: basic aspects and application in nanobiotechnology (material sciences and medicine). *Naturwissenschaften*, 94 (5): 339–59, 2007.
- [30] Belikov, S. I., Kaluzhnaya, O. V., Schröder, H. C., Krasko, A., Müller, I. M. e Müller, W. E. G., Expression of silicatein in spicules from the Baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis*. *Cell Biol. Int.*, 29 (11): 943–51, 2005.
- [31] Kaluzhnaya, O. V., Belikov, S. I., Schröder, H. C., Wiens, M., Giovine, M., Krasko, A., Müller, I. M. e Müller, W. E. G., Dynamics of skeleton formation in the Lake Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. Part II. Molecular biological studies. *Naturwissenschaften*, 92 (3): 134–8, 2005.
- [32] Wiens, M., Belikov, S. I., Kaluzhnaya, O. V., Krasko, A., Schröder, H. C., Perovic-Ottstadt, S. e Müller, W. E. G., Molecular control of serial module formation along the apical-basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: silicateins, mannose-binding lectin and mago nashi. *Dev. Genes Evol.*, 216 (5): 229–42, 2006.
- [33] Müller, W. E. G., Wang, X., Kropf, K., Boreiko, A., Schloßmacher, U., Brandt, D., Schröder, H. C. e Wiens, M., Silicatein expression in the hexactinellid *Crateromorpha meyeri*: the lead marker gene restricted to siliceous sponges. *Cell Tissue Res.*, 333 (2): 339–51, 2008.
- [34] Purich, D. L., *Enzyme kinetics: catalysis & control: a reference of theory and best-practice methods*. Elsevier Inc., p. 7, 2010.
- [35] Andre, R., Tahir, M. N., Natalio, F. e Tremel, W., Bioinspired synthesis of multifunctional inorganic and bio-organic hybrid materials. *FEBS J.*, 279 (10): 1737–49, 2012.
- [36] Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Burghard, Z., Pisignano, D. e Wang, X., Silicateins-- a novel paradigm in bioinorganic chemistry: enzymatic synthesis of inorganic polymeric silica. *Chemistry*, 19 (19): 5790–804, 2013.

- [37] Sumerel, J. L., Yang, W., Kisailus, D., Weaver, J. C., Choi, J. H. e Morse, D. E., Biocatalytically Templated Synthesis of Titanium Dioxide. *Chem Mater*, 13: 4804–4809, 2003.
- [38] M. N. Tahir, P. Théato, W. E. G. Müller, H. C. Schröder, A. Borejko, S. Faiss, A. Janshoff, J. Huth, and W. Tremel, “Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein.” *Chem. Commun. (Camb)*., no. 44, pp. 5533–5, Nov. 2005.
- [39] P. Jochems, Y. Satyawali, L. Diels, and W. Dejonghe, “Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs),” *Green Chem.*, vol. 13, no. 7, p. 1609, 2011.
- [40] M. Wiens, T. Link, T. A. Elkhooly, S. Isbert, and W. E. G. Mu, “Formation of a micropatterned titania photocatalyst by microcontact printed silicatein on gold surfaces w,” pp. 11331–11333, 2012.
- [41] Elkhooly, T.A., Coating of surfaces of composite materials with enzymatically formed biosilica, PhD Thesis, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Germany, 2014.
- [42] Natalio, F., Link, T., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Cui, F.Z., Wang, X. e Wiens, M., Bioengineering of the silica-polymerizing enzyme silicatein-alpha for a targeted application to hydroxyapatite. *Acta Biomater.*, 6 (9): 3720–8, 2010.
- [43] Tahir, M. N., Natalio, F., Therese, H. A., Yella, A., Metz, N., Shah, M. R., Mugnaioli, E., Berger, R., Theato, P., Schröder, H.C., Müller, W. E. G. e Tremel, W., Enzyme-Mediated Deposition of a TiO₂ Coating onto Biofunctionalized WS₂ Chalcogenide Nanotubes. *Adv. Funct. Mater.*, 19 (2): 285–291, 2009.
- [44] Tahir, M. N., Theato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Janshoff, A., Zhang, J., Huth, J., Tremel, W., Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. *The Royal Society of Chemistry*, 111: 2848–2849, 2004.
- [45] Tahir, M. N., Eberhardt, M., Therese, H. A., Kolb, U., Theato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H.C. e Tremel, W., From single molecules to nanoscopically structured functional materials: Au nanocrystal growth on TiO₂ nanowires controlled by surface-bound silicatein. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45 (29): 4803–4809, 2006.
- [46] Wiens, M., Bausen, M., Natalio, F., Link, T., U. Schloßmacher e Müller, W. E. G., The role of the silicatein-alpha interactor silintaphin-1 in biomimetic biomineralization. *Biomaterials*, 30 (8): 1648–1656, 2009.
- [47] Andre, R., Tahir, M. N., Schöder, H. C., Müller, W. E. G. e Tremel, W., Enzymatic Synthesis and Surface Deposition of Tin Dioxide using Silicatein- α , *Chemistry Of Materials*, 23(24): 5358-5365, 2011.
- [48] Rai A. e Perry, C. C., Mussel adhesive protein inspired coatings: a versatile method to fabricate silica films on various surfaces. *J. Mater. Chem.*, 22 (11): 4790, 2012.

- [49] A. Rai and C. C. Perry, "Facile fabrication of uniform silica films with tunable physical properties using silicatein protein from sponges.," *Langmuir*, vol. 26, no. 6, pp. 4152–4159, Mar. 2010.
- [50] André, R., Tahir, M. N., Link, T., Jochum, F. D., Kolb, U., Theato, P., Berger, R., Wiens, M., Schröder, H.C., Müller, W. E. G. e Tremel, W., Chemical mimicry: hierarchical 1D TiO₂@ZrO₂ core-shell structures reminiscent of sponge spicules by the synergistic effect of silicatein- α and silintaphin-1. *Langmuir*, 27 (9): 5464–5471, 2011.
- [51] Wiens, M., Schröder, H.C., Wang, X., Link, T., Steindorf, D. e Müller, W. E. G., Isolation of the silicatein- α interactor silintaphin-2 by a novel solid-phase pull-down assay. *Biochemistry*, 50 (12): 1981–1990, 2011.
- [52] Liu, S., Yu, J. e Jaroniec, M., Anatase TiO₂ with Dominant High-Energy { 001 } Facets : Synthesis , Properties , and Applications. *Chemistry of Materials*, 23 (8): 4085–4093, 2011.
- [53] Pagliara, S., Polini, A., Camposeo, A., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. e Pisignano, D., Electrical properties of in vitro biomineralized recombinant silicatein deposited by microfluidics. *Appl. Phys. Lett.*, 101 (19): 193702, 2012.
- [54] Heinemann, S., Coradin, T. e Desimone, M. F., Bio-inspired silica–collagen materials: applications and perspectives in the medical field. *Biomater. Sci.*, 1 (7): 688, 2013.
- [55] Hoppe, A., Güldal, N. S. e Boccaccini, A. R., A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32 (11): 2757–2774, 2011.
- [56] Pietak, A. M., Reid, J. W., Stott, M. J. e Sayer, M., Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 28 (28): 4023–4032, 2007.
- [57] Arcos, D. e Vallet-Regí, M., Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomater.*, 6 (8): 2874–88, 2010.
- [58] Wang, X., Schröder, H. C., Wiens, M., Ushijima, H. e Müller, W. E. G., Bio-silica and bio-polyphosphate: applications in biomedicine (bone formation). *Curr. Opin. Biotechnol.*, 23 (4): 570–8, 2012.
- [59] Wiens, M., Wang, X., Schröder, H. C., Kolb, U., Schloßmacher, U., Ushijima, H. e Müller, W. E. G., The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 31 (30): 7716–25, 2010.
- [60] Beck, G. R., Ha, S.W., Camalier, C. E., Yamaguchi, M., Li ,Y., Lee, J.K. e Weitzmann, M. N., Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine*, 8 (6): 793–803, 2012.

-
- [61] Souza, K. C., Ardisson, J. D., Sousa, E. M. B., Study of mesoporous silica/magnetite systems in drug controlled release. *Journal of Materials Science-materials in Medicine*, 20 (2): 507–512, 2009.
- [62] Mahdavi, M., Bin Ahmad, M., Haron, M. J., Namvar, F., Nadi, B., Rahman, M. Z. A. e Amin, J., Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Molecules*, 18 (7): 7533–48, 2013.
- [63] Coates, J., *Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach*. Ed, R. A. M. pp. 10815–10837, 2000.
- [64] Lee, G.J., Kim, C. K., Lee, M. K. e Rhee, C. K., Facile synthesis of surface oxide free copper nanoparticles by in-situ coating with oleic acid. *Powder Technol.*, 261: 143–146, 2014.
- [65] Stuart, L., John Wiley, B. & Sons, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 2004.