

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAÍRA THEISEN

DESENVOLVIMENTO DE UM NANOMATERIAL HÍBRIDO RESPONSIVO À  
TEMPERATURA PARA A MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE DE *CANDIDA*  
*ANTARCTICA* FRAÇÃO B (CALB)

CURITIBA

2024

MAÍRA THEISEN

DESENVOLVIMENTO DE UM NANOMATERIAL HÍBRIDO RESPONSIVO À  
TEMPERATURA PARA A MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE DE *CANDIDA*  
*ANTARCTICA* FRAÇÃO B (CALB)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, no Setor de Ciências Exatas, da Universidade  
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Izabel C. Riegel-Vidotti

Coorientadores: Dra. Heloíse R. de Barros

Prof. Dr. Leandro Piovan

Área de concentração: Físico-Química

Linha de Pesquisa: Físico-Química de  
Macromoléculas

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Theisen, Maíra

Desenvolvimento de um nanomaterial híbrido responsivo à temperatura para a modulação da atividade da lipase de *candida antarctica* fração B (CALB). / Maíra Theisen. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Profa . Dra. Izabel Cristina Riegel-Vidotti Miyata

Coorientadora: Dra. Heloise Ribeiro de Barros

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Piovan

1. Nanopartículas de ouro. 2. Nanomaterias. 3. Temperatura. 4. Enzimas. I. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. II. Miyata, Izabel Cristina Riegel-Vidotti. III. Barros, Heloise Ribeiro de. IV. Piovan, Leandro. V. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -  
40001016026P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de MAIRA THEISEN intitulada: DESENVOLVIMENTO DE UM NANOMATERIAL HÍBRIDO RESPONSIVO À TEMPERATURA PARA A MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE DE CANDIDA ANTARCTICA FRAÇÃO B (CALB), sob orientação da Profa. Dra. IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Fevereiro de 2024.

Assinatura Eletrônica  
27/05/2024 11:13:28.0

IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
27/05/2024 10:13:26.0

MARCOS ANTÔNIO VILLETTI

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

Assinatura Eletrônica  
29/05/2024 06:25:13.0

JORGE PÉREZ-JUSTE

Avallador Externo (UNIVERSIDADE DE VIGO)

Assinatura Eletrônica  
27/05/2024 08:45:34.0

DIOGO SILVA PELLOSI

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
27/05/2024 14:56:16.0

PAMELA TAISSINE BANDEIRA

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

---

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 81531-990 - Tel: (41) 0000-00000 - E-mail: cpqquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte Identificação Única: 368588

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 368588

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Izabel Riegel-Vidotti por sua receptividade desde o nosso primeiro contato no final de 2017, tendo acreditado no meu potencial e neste projeto. Agradeço a orientação, o apoio e os ensinamentos durante todos esses anos. Obrigada por proporcionar diversas oportunidades ao longo destes anos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Leandro Piovan pela coorientação, cafés e conversas filosóficas no LaSQuE. Obrigada pelo tempo dedicado a conversar sobre os experimentos e resultados, pela preocupação comigo e por ter aberto as portas da síntese orgânica para mim. Tu esteves sempre aberto a discutir ideias e ajudar no que pudesse.

À Dra. Heloise Ribeiro de Barros pela coorientação, conversas e discussões sobre este trabalho. Obrigada por compartilhar seu conhecimento sobre AuNPs e a CALB, pelas discussões que tivemos para entender meus resultados e por todo incentivo ao longo destes anos, sem os quais não teria sido possível concluir esta tese.

À Prof. Katharina Landfester pela oportunidade de ser aluna em seu grupo, no qual tive uma ótima experiência e conheci pessoas maravilhosas.

Ao Dr. Kai Zhang (*in memoriam*), meu líder de projeto durante a minha estadia no MPIP, pelas discussões, aprendizado e por ter me apresentado novas áreas de pesquisa. A experiência que tive durante este período certamente contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos professores Leandro Barbosa e Lizandra Zimmermann por terem me recebido em seus laboratórios, nos quais tive a oportunidade de trabalhar brevemente. Obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar e pelas discussões sobre o trabalho, os quais foram importantes para o desenvolvimento desta tese e minha formação.

À Prof. Daiani Leite pela participação em minha banca de qualificação e por todas as contribuições que fez a este trabalho. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos sobre o PNIPAm, por sempre estar disposta a discutir os meus resultados e por toda a ajuda durante os dias que estive na UFSM.

À Prof. Juliete Silva Neves pela participação em minha banca de qualificação e pelos questionamentos levantados durante a qualificação, que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Diego Guedes Sobrinho pela participação em minha banca de qualificação de Doutorado e pelas discussões durante a qualificação, os quais contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Marco Antônio Villetti pela participação em minha banca de defesa do Doutorado, pelas discussões e por ter me recebido em seu laboratório, onde pude realizar experimentos que contribuíram para o entendimento dos materiais deste trabalho.

Ao Prof. Jorge Pérez-Juste pela disponibilidade em participar em minha banca de defesa do Doutorado.

Ao Prof. Diogo Silva Pellosi pela participação em minha banca de defesa do Doutorado.

À Prof. Pamela Taisline Bandeira pela participação em minha banca de defesa de Doutorado.

Aos amigos do GPMIn pela convivência, aprendizado, ajuda com as disciplinas e experimentos. Dividir o laboratório com vocês foi uma experiência maravilhosa. Obrigada por todos os momentos dentro e fora dele, vocês tornarem estes anos de Doutorado mais leves. Talvez vocês não saibam o quanto isso foi importante para mim.

Aos amigos do LaSQuE pela convivência, conversas, café e fofocas. Obrigada por sempre estarem disponíveis para me ajudar nas questões do laboratório, pelos momentos de descontração e por tornarem o ambiente do laboratório tão acolhedor. Em especial, agradeço a Maria Clara Durigon, minha companheira de síntese, inúmeras horas de reações enzimáticas e batalhas com o GC. Obrigada por toda ajuda com os experimentos, minhas dúvidas sobre química orgânica e por ter sido sempre tão otimista quanto aos meus resultados.

Agradeço também aos amigos que fiz durante a graduação em Porto Alegre, aos amigos que fiz durante esses anos em Curitiba, dentro e fora do DQUI e ao grupo do vôlei, que me fez relembrar o carinho que tenho por este esporte. Ao João Paludo, pelas inúmeras conversas sobre a vida, o universo e tudo mais, além de me dar abrigo nas minhas vindas para Curitiba. Ao Kalel Rossi por estar ao meu lado durante boa parte do Doutorado, ter me

apoiado durante o período mais difícil destes anos e ter me ajudado muito durante o período na Alemanha. Todos vocês tiveram alguma participação para que eu estivesse aqui. Obrigada.

Aos amigos e colegas do MPIP, pela ajuda com os experimentos, discussões e momentos de descontração.

À Tamie, Aya e Michael, que a muitos anos tem estado ao meu lado nos melhores e piores momentos, me incentivado e apoiado minhas decisões. Não importa o que aconteça, vocês sempre serão minha segunda família.

Aos professores e funcionários do DQUI/UFPR e ao PPGQ/UFPR.

Aos meus pais Estela e Eloie e meu irmão William, por sempre acreditarem em mim, mesmo que nem sempre entendessem o que eu fazia durante o Doutorado. Às minhas primas Indjara, Letícia e Camila, por serem minhas confidentes, me apoiarem em tudo e serem minhas companheiras de viagem. Agradeço também aos demais tios e primos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui. Obrigada a todos por sempre torcerem por mim e me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos. Sem o apoio de vocês tudo isso não seria possível.

À CAPES pela bolsa de Doutorado, auxílio PROEX e pela bolsa de Doutorado-Sanduíche.

*“Leaves are falling all around  
it’s time I was on my way  
Thanks to you, I’m much obliged  
For such a pleasant stay  
But now it’s time for me to go...”*

*(Ramble On – Led Zeppelin)*

## RESUMO

O desenvolvimento de nanomateriais híbridos é uma área de pesquisa empolgante e inovadora com potencial para impactar diferentes áreas. Neste trabalho, foi desenvolvido um nanomaterial híbrido composto por nanopartículas de ouro (AuNP), a lipase de *Candida antarctica* fração B (CALB) e o polímero poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAm). Foram realizadas as sínteses das AuNPs e do PNIPAm, o estudo de suas propriedades e da interação entre AuNP e CALB. Inicialmente foram sintetizadas AuNPs estáveis e com tamanho aproximado de 5 nm (determinado por MET), nas quais foi imobilizada a enzima. A enzima foi inserida durante e após a síntese das AuNPs e em ambos os casos a CALB foi adsorvida na superfície, atuando como um bom agente estabilizante. Uma das preocupações ao se realizar este tipo de procedimento, é de que a imobilização leve a perda de algumas propriedades da enzima, como sua atividade catalítica. Espectroscopia de fluorescência foi empregada para estudar a estrutura tridimensional na enzima, a qual mostrou que a estrutura se manteve após a imobilização. Foram propostas duas sínteses (PNI1 e PNI2) para o PNIPAm e suas propriedades foram determinadas utilizando diversas técnicas de análise e o comportamento termorresponsivo foi estudado por DLS, espectroscopia de fluorescência e UV-Vis. Por meio da análise de turbidimetria foram determinadas as temperaturas de transição do polímero, sendo 31,5 °C (PNI1) e 33,5 °C (PNI2). O método utilizado para a elaboração dos nanomateriais híbridos (MHs) se mostrou eficiente, uma vez que a estrutura proposta foi observada nas imagens de MET. O estudo da atividade enzimática demonstrou que abaixo da temperatura de transição do polímero os MHs atuam na modulação da atividade enzimática, uma vez que a conversão obtida pelos MHs é muito menor do que da enzima em sua forma livre. Enquanto com o aumento da temperatura os MHs apresentam um comportamento similar ao da CALB livre. A investigação da atividade enzimática em uma reação com mudança de temperatura também evidenciou este aspecto dos MHs. Além disso, um aumento da termoestabilidade da CALB foi observado quando a enzima estava imobilizada em AuNPs para reações realizadas a 65 °C. Assim, os nanomateriais híbridos desenvolvidos durante este trabalho oferecem uma possibilidade para a modulação da atividade enzimática da CALB, combinando estabilidade térmica com a regulação da atividade em resposta à temperatura.

Palavras-chaves: Nanopartículas de ouro; CALB; PNIPAm; Nanomateriais híbridos; Atividade enzimática; Temperatura.

## ABSTRACT

The development of hybrid nanomaterials is an exciting and innovative area of research with the potential to impact different areas. In this work, a hybrid nanomaterial was developed composed of gold nanoparticles (AuNPs), *Candida antarctica* lipase fraction B (CALB) and the polymer poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAm). Syntheses of AuNPs and PNIPAm were conducted, and their properties, as well as the interaction between AuNPs and CALB, were studied. Initially, stable AuNPs with a size of approximately 5 nm (determined by TEM) were synthesized, and the Enzyme was immobilized on them. The enzyme was introduced during and after the synthesis of AuNPs and in both cases, CALB was adsorbed on the surface, acting as a good stabilizing agent. One concern in carrying out this type of procedure is that immobilization may lead to the loss of some enzyme properties, such as its catalytic activity. Fluorescence spectroscopy was employed to study the three-dimensional structure of the enzyme, revealing that the structure remained after immobilization. Two syntheses (PNI1 and PNI2) were proposed for PNIPAm, and their properties were determined using various analysis techniques. Thermoresponsive behavior was studied by DLS, fluorescence spectroscopy, and UV-Vis. Turbidimetry analysis determined the polymer's transition temperatures as 31.5 °C (PNI1) and 33.5 °C (PNI2). The method used for the fabrication of the hybrid nanomaterials (MHs) proved to be efficient, as the proposed structure was observed in the TEM images. The study of enzymatic activity revealed that below the polymer's transition temperature, the MHs act to modulate the enzymatic activity since the conversion obtained by the MHs is much lower than that of the free enzyme. However, with increasing temperature, MHs exhibit behavior similar to that of free CALB. The investigation of enzymatic activity in a temperature-changing reaction also highlighted this aspect of MHs. Additionally, an increase in CALB's thermostability was observed when the enzyme was immobilized on AuNPs for reactions carried out at 65 °C. Thus, the hybrid nanomaterials developed during this work offer a possibility for modulating CALB's enzymatic activity, combining thermal stability with activity regulation in response to temperature.

Keywords: Gold nanoparticles; CALB; PNIPAm; Hybrid nanomaterials; Enzymatic activity; Temperature.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A taça de Licurgo (Lycurgus Cup) apresenta coloração esverdeada quando é iluminada por uma fonte de luz externa (esquerda) e vermelha (direita) quando a iluminação é feita internamente .....	20
FIGURA 2 – Esquema mostrando a estrutura de bandas eletrônicas para o material bulk e nanomateriais nos quais é evidenciado o aumento da distância entre as bandas de valência (BV) e banda de condução (BC) com a diminuição do tamanho da partícula. ....	23
FIGURA 3 - Ilustração dos processos top-down e bottom-up para a obtenção de nanomateriais.....	24
Figura 4 – Esquema representativo da síntese de nanopartícula na qual são mostradas (a) as etapas envolvidas na formação de NPs, (b) o caso em que as etapas de nucleação e crescimento ocorrem separadamente e (c) o caso mais realista no qual a nucleação e crescimento ocorrem simultaneamente .....	26
FIGURA 5 - Representação do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR).....	27
FIGURA 6 – Imagens (a-c) de dispersões de diferentes nanoestruturas de ouro (nanoesferas, nanobastões e nanopartículas de Au e Ag) nas quais são observadas as variações de cor das dispersões em função de alguma de suas propriedades. A seta indica o aumento (a) do tamanho das nanoesferas, (b) da razão entre as dimensões longitudinal e transversal do nanobastão e (c) da quantidade de ouro presente na liga que forma as nanopartículas. Nos espectros de UV-Vis (d-f) as setas indicam o deslocamento para o vermelho que ocorre em decorrência da propriedade que está sendo variada em a-c.....	27
FIGURA 7 - Algumas aplicações de AuNPs em diversas áreas .....	28
FIGURA 8 - Os quatro níveis de organização da estrutura da proteína .....	31
FIGURA 9 - Organização do sítio ativo de uma enzima, no qual são mostrados o sítio de ligação (azul), sítio catalítico (vermelho) e o substrato (preto).....	31
FIGURA 10 - Esquema mostrando que a superfície de uma enzima é capaz de interagir com o (R)-gliceraldeído em três sítios de ligação (esquerda), mas interage com o (S)-gliceraldeído em apenas dois dos três sítios .....	32
FIGURA 11 - Fatores que afetam a atividade de uma enzima. ....	37
FIGURA 12 - Estrutura cristalina da CALB (PDB ID 1TCA) (esquerda) com destaque para o sítio ativo no qual são evidenciados os aminoácidos da tríade catalítica (Ser105, His224 e Asp187). Na imagem também é destacado o buraco de oxianion (Thr40 e Gin106), uma região eletrofílica que auxilia na estabilização do intermediário tetraédrico do substrato que possui uma carga negativa em torno do oxigênio.....	38
FIGURA 13 - Etapas do processo de polimerização via radicais livres.....	40
FIGURA 14 – Estruturas do monômero NIPAm (esquerda) e do polímero PNIPAm (direita) .....	41
FIGURA 15 - Esquema mostrando as transições de fase (LCST e UCST) que um polímero pode apresentar devido ao seu comportamento termorresponsivo. A linha azul dos diagramas representa o limite de separação de fase, o qual produz o ponto de nuvem (do inglês, cloud point) em solução .....	43

FIGURA 16 - (a) Perfil de absorção das bandas SPR no espectro de UV-Vis para as amostras AuNP/citrato, AuNP@CALB e $s_A$ CALB/AuNP e (b) imagens das três amostras logo após as respectivas sínteses.....	61
FIGURA 17 - Imagens de MET e histogramas das distribuições de tamanho das amostras (a-c) AuNP/citrato, (d-f) AuNP@CALB e (g-i) $s_A$ CALB/AuNP .....	62
FIGURA 18 - Valores de potencial zeta obtidos para CALB livre, AuNP/citrato, AuNP@CALB e $s_A$ CALB/AuNP .....	63
FIGURA 19 - Espectro de FTIR do citrato de sódio, CALB e AuNPs (AuNP/citrato, AuNP@CALB e $s_A$ CALB/AuNP). .....	64
FIGURA 20 - Emissão de fluorescência do Trp para CALB em diferentes temperaturas. (a) Espectro de emissão de fluorescência e (b) intensidade máxima de emissão em função da temperatura. A seta na imagem indica o sentido do aumento da temperatura. ....	66
FIGURA 21 - Diferença no espectro de emissão de fluorescência do Trp para CALB a 40 °C (curva azul), 50 °C (curva preta) e 60 °C (curva vermelha). ....	68
FIGURA 22 - (a) Curva de desnaturação por nanoDSF da enzima CALB no intervalo entre 20 °C e 95 °C. (b) Primeira derivada da curva de nanoDSF na qual é evidenciada a temperatura de desnaturação da enzima. ....	69
FIGURA 23 - Espectro de emissão de fluorescência do Trp para (a) $s_A$ CALB/AuNP e (b) AuNP@CALB em diferentes temperaturas. A seta na imagem indica o sentido do aumento da temperatura. ....	70
FIGURA 24 - Espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) obtido para o NIPAm (preto), PNI1 (verde) e PNI2 (azul). ....	72
FIGURA 25 - Perfil cromatográfico obtido por SEC para os polímeros (a) PNI1 e (b) PNI2. A linha verde corresponde ao detector de índice de refração (RI) e a linha azul ao detector de espalhamento de luz a ângulo reto (RALS). ....	74
FIGURA 26 - Determinação da temperatura de transição ( $T_{cp}$ ) para os polímeros (a) PNI1 e (b) PNI2. A linha em azul corresponde à curva de transmitância em função da temperatura e a linha laranja à primeira derivada calculada. As medidas de turbidimetria foram realizadas em $\lambda = 600$ nm. ....	77
FIGURA 27 - Transição coil-to-globule do polímero PNIPAm. (a) Esquema mostrando a mudança de conformação das cadeias poliméricas com a temperatura e (b) visualização macroscópica da transição de fase do PNIPAm .....	78
FIGURA 28 - Curvas de turbidimetria obtidas para os polímeros termorresponsivos (a) PNI1 e (b) PNI2 após dois ciclos de aquecimento-resfriamento. ....	79
FIGURA 29 – Estudo do diâmetro hidrodinâmico do PNI2 em função da temperatura. (a) Variação do tamanho hidrodinâmico no intervalo de temperatura entre 25 °C e 40 °C. Distribuição de tamanho em função da intensidade quando a amostra está sendo analisada a (b) 25°C e (c) 40 °C. ....	81
FIGURA 30 - Valores de potencial zeta obtidos para o polímero PNI2 em diferentes temperaturas.....	82
FIGURA 31 - Curvas de turbidimetria de soluções com diferentes concentrações do polímero PNI2.....	83
FIGURA 32 - Variação do tamanho do polímero PNI2 em função da temperatura acompanhado por medidas de DLS. ....	84

FIGURA 33 - Esquema <i>ilustrativo do</i> arranjo dos nanomateriais híbridos responsivos ( $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ e $AuNP@CALB-PNI$ ) e a resposta do material à temperatura. Na figura é mostrado o comportamento esperado do material híbrido, no qual com o colapso das cadeias poliméricas (devido ao aumento da temperatura) pode ocorrer a reação que transforma o substrato (S) em produto (P) .....	85
FIGURA 34 - Imagens de MET obtidas para (a-c) $AuNP@CALB-PNI$ e (e-g) $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ . Histogramas da distribuição de tamanho associados aos nanomateriais híbridos (d) $AuNP@CALB-PNI$ e (h) $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ . .....	86
FIGURA 35 - Variação do tamanho dos nanomateriais híbridos (a) $AuNP@CALB-PNI$ e (b) $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ em função da temperatura acompanhada por medidas de DLS.....	88
FIGURA 36 - Análise de turbidimetria do nanomaterial híbrido $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ . (a) Curva de aquecimento-resfriamento e (b) determinação da $T_{cp}$ do material. As curvas em vermelho e azul representam a rampa de aquecimento e resfriamento, respectivamente ...	89
FIGURA 37 - Análise de turbidimetria do nanomaterial híbrido $AuNP@CALB-PNI$ . (a) Curva de aquecimento-resfriamento e (b) determinação da $T_{cp}$ do material. As curvas em vermelho e azul representam a rampa de aquecimento e resfriamento, respectivamente ...	90
FIGURA 38 - Espectro de emissão de fluorescência do Trp para $AuNP@CALB-PNI$ em diferentes temperaturas.....	91
FIGURA 39 - Espectro de emissão de fluorescência do Trp para $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ em diferentes temperaturas.....	91
FIGURA 40 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 0 °C utilizando a CALB livre e nanomateriais híbridos como catalisadores da reação.....	93
FIGURA 41 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 25 °C utilizando CALB livre, nanomateriais híbridos e AuNPs funcionalizadas como catalisadores da reação. ....	95
FIGURA 42 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 35 °C utilizando CALB livre, nanomateriais híbridos e AuNPs funcionalizadas como catalisadores da reação. ....	96
FIGURA 43 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 65 °C utilizando CALB livre, nanomateriais híbridos e AuNPs funcionalizadas como catalisadores da reação. ....	98
FIGURA 44 - Efeito da temperatura na formação de acetato de 1-feniletila utilizando CALB livre, $AuNP@CALB-PNI$ e $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ . As regiões marcadas em azul (T1 e T3) representam os intervalos nos quais a temperatura do meio reacional era de 25 °C, enquanto a região em vermelho (T2) corresponde ao intervalo em que a temperatura era de 45 °C. ....	99
FIGURA 45 - Estudo do controle da atividade enzimática por meio de mudanças na temperatura do meio reacional utilizando CALB livre, $AuNP@CALB-PNI$ e $S_{A}CALB/AuNP-PNI$ como catalisadores. Os intervalos T1 e T3 representam os intervalos nos quais a temperatura do meio reacional era de 25 °C e nos intervalos T2 e T4 a temperatura era de 45 °C. ....	100

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – Síntese do polímero PNIPAm pelo método descrito na síntese A.....	49
ESQUEMA 2 - Síntese do polímero PNIPAm pelo método descrito na síntese B.....	50
ESQUEMA 3 - Síntese do 1-feniletanol.....	56
ESQUEMA 4 – Síntese química do acetato de 1-feniletila.....	57
ESQUEMA 5 - Síntese do acetato de 1-feniltila catalisada por CALB.....	58

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS SEGUNDO O CÓDIGO EC E O TIPO DE REAÇÃO QUE CATALISAM.....	34
TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DAS PRINCIPAIS BANDAS DOS ESPECTROS DE FTIR ASSOCIADAS AS ESPÉCIES MOSTRADAS NA FIGURA 17. ....	65
TABELA 3 – ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS IDENTIFICADAS NOS ESPECTROS DE FTIR PARA OS COMPOSTOS NIPAM, PNI1 E PNI2.....	72
TABELA 4 – DADOS DAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO. ....	73
TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS PARA PNI1 E PNI2 QUANDO A $M_w$ , PDI E DP.....	76
TABELA 6 - DADOS DA REAÇÃO À 25 °C MOSTRANDO A EVOLUÇÃO DA % DE ACETATO DE 1-FENILETILA FORMADO AO LONGO DA REAÇÃO. ....	95
TABELA 7 - DADOS DA REAÇÃO À 35 °C MOSTRANDO A EVOLUÇÃO DA % DE ACETATO DE 1-FENILETILA FORMADO AO LONGO DA REAÇÃO. ....	96
TABELA 8 - DADOS DA REAÇÃO À 65 °C MOSTRANDO A EVOLUÇÃO DA % DE ACETATO DE 1-FENILETILA FORMADO AO LONGO DA REAÇÃO. ....	97
TABELA 9 - CONVERSÃO DAS REAÇÕES COM MUDANÇA DE TEMPERATURA MOSTRADAS NA FIGURA 42. ....	100
TABELA 10 – TAXA DE REAÇÃO CALCULADAS PARA TODAS AS REAÇÕES NOS INTERVALOS MOSTRADOS NA FIGURA 42. ....	100
TABELA 11 - CONVERSÃO DAS REAÇÕES COM MUDANÇA DE TEMPERATURA MOSTRADAS NA FIGURA 43FIGURA 42.....	101
TABELA 12 – TAXA DE REAÇÃO CALCULADAS PARA TODAS AS REAÇÕES NOS INTERVALOS MOSTRADOS NA FIGURA 43. ....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNP - Nanopartícula de ouro

AuNP@CALB – Nanopartículas de ouro com CALB adsorvida na superfície

CALB – Lipase de *Candida antarctica* fração B

CCD – Cromatografia de camada delgada

CG – Cromatografia a gás

CME – Centro de Microscopia Eletrônica

DCM – Diclorometano

$D_h$  – Diâmetro hidrodinâmico

DMAP – *N,N*-Dimetilaminopiridina

ICP-OES – Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

FID – Detector de ionização de chama (do inglês *Flame ionization detector*)

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier-transform Infrared spectroscopy*)

KPS – persulfato de potássio

LSPR – Ressonância plasmônica de superfície localizada (do inglês *Localized surface plasmon resonance*)

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MH – Nanomaterial híbrido

$M_n$  – Massa molar numérica média

$M_w$  – Massa molar ponderal média

NanoDSF – Fluorimetria de varredura diferencial em nanoescala (do inglês *Differential scanning fluorimetry*)

NIPAm – (*N*-isopropilacrilamida)

NP - Nanopartícula

PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate buffer saline*)

pI – ponto isoelétrico

PNIPAm – Poli(*N*-isopropilacrilamida)

*p*NPP – Palmitato de *p*-nitrofenila

PZ – Potencial Zeta

QCE – Efeito de confinamento quântico (do inglês *Quantum confinement effect*)

RALS – Detector de espalhamento de luz de ângulo reto (do inglês *Right angle light scattering*)

RI – Índice de refração

RMN – Ressonância magnética nuclear

<sub>S</sub>CALB/AuNP – Nanopartículas de ouro funcionalizadas com CALB atuando como agente estabilizante

SEC – Cromatografia por exclusão de tamanho (do inglês *Size exclusion chromatography*)

SPR – Ressonância plasmônica de superfície (do inglês *Surface plasmon resonance*)

TEMED - *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina

TMS - tetrametilsilano

Trp – Triptofano

UV-Vis – Espectrofotometria no ultravioleta visível

$\Phi$  – Rendimento quântico

$\lambda$  – Comprimento de onda

$\lambda_{em}$  – Comprimento de onda de emissão

$\lambda_{exc}$  – Comprimento de onda de excitação

$\lambda_{max}$  – Comprimento de onda máximo de absorção

$\zeta$  – Potencial zeta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	APRESENTAÇÃO E MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	19
1.2	NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNPS)	19
1.2.1	Histórico	19
1.2.2	Características das AuNPs	21
1.2.3	Síntese das AuNPs	23
1.2.4	Banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR)	26
1.2.5	Aplicações das AuNPs	28
1.3	ENZIMAS	30
1.3.1	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B (CALB)	33
1.3.2	Reações enzimáticas	36
1.4	POLÍMEROS	39
1.4.1	Poli( <i>N</i> -isopropilacrilamida) – PNIPAm	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	45
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	45
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
	<b>FLUXOGRAMA</b>	46
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	47
3.1	MATERIAIS	47
3.2	SÍNTESE DOS MATERIAIS	47
3.2.1	Síntese das AuNP	47
3.2.2	Síntese do polímero poli( <i>N</i> -isopropilacrilamida) (PNIPAm)	48
3.2.3	Formação do nanomaterial híbrido	50
3.3	CARACTERIZAÇÕES	51
3.3.1	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	51

3.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	51
3.3.3	Potencial Zeta .....	51
3.3.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	52
3.3.5	Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	52
3.3.6	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	52
3.3.7	Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) .....	53
3.3.8	Turbidimetria .....	53
3.3.9	Espectrofotometria de fluorescência .....	54
3.3.10	Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) .....	54
3.3.11	Cromatografia a gás (CG).....	55
3.3.12	Fluorimetria de Varredura Diferencial em nanoescala (nanoDSF).....	55
3.4	<b>REAÇÕES ENZIMÁTICAS</b> .....	56
3.4.1	Síntese química do 1-feniletanol .....	56
3.4.2	Síntese química do acetato de 1-feniletila .....	57
3.4.3	Reação de acilação do 1-feniletanol .....	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	60
4.1	AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA CALB EM NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	60
4.2	EFEITOS DA TEMPERATURA E DA IMOBILIZAÇÃO NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CALB .....	65
4.3	ESTUDO DAS PROPRIEDADES DO PNIPAM .....	71
4.4	FORMAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO NANOMATERIAL HÍBRIDO .....	84
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	92
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	103
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	105
	<b>ANEXO I</b> .....	123

<b>ANEXO II.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>127</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 APRESENTAÇÃO E MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

O desenvolvimento de materiais híbridos formados por nanopartículas metálicas, biomoléculas e polímeros termorresponsivos representa uma fascinante e versátil classe de materiais inteligentes com uma ampla gama de aplicações (DAS et al., 2021; MACCHIONE; BIGLIONE; STRUMIA, 2018). Este tipo de material combina as propriedades únicas de cada um de seus componentes, levando a formação de materiais com novas funcionalidades que podem ser orientadas para fins específicos (FERREIRA SOARES et al., 2020; KICKELBICK, 2014; SANCHEZ et al., 2011).

Neste contexto, este trabalho teve como intuito o desenvolvimento de um nanomaterial híbrido (MH) responsivo, visando a modulação da atividade enzimática por meio do controle da temperatura do meio reacional. Este material híbrido é composto por nanopartículas de ouro (AuNPs), uma enzima (lipase de *Candida antarctica* - CALB) e um polímero termorresponsivo (poli(*N*-isopropilacrilamida) – PNIPAm). O PNIPAm possui comportamento responsivo quanto à temperatura, ou seja, as cadeias poliméricas sofrem uma mudança de conformação quando uma certa temperatura é atingida. Assim, espera-se que por meio da variação da temperatura seja possível controlar a conformação do polímero e, conseqüentemente, a exposição da enzima imobilizada nas AuNP ao ambiente. Com este mecanismo, seria possível controlar se uma dada reação desempenhada pela enzima, ocorre ou não.

Pesquisas que envolvem o desenvolvimento destes nanomateriais híbridos continuam evoluindo, explorando novas combinações de materiais e otimizando a formulação destes MHs para melhorar seu desempenho em diversas aplicações. Sistemas como o desenvolvido durante este projeto tem potencial para ser aplicado na indústria química e/ou nas áreas biomédica e farmacêutica, utilizando uma molécula que tenha a função de interesse e permitindo o controle de determinadas propriedades por meio de variação de estímulos externos.

## 1.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNPS)

### 1.2.1 Histórico

A história das AuNPs estende-se por vários séculos, nos quais seu desenvolvimento e aplicação ocorreu em áreas como física, química e medicina. Os primeiros usos de AuNPs

estão relacionados a produção de vidros com coloração vermelha, sendo o exemplo mais conhecido a taça de Licurgo (do inglês, *Lycurgus Cup*) (FREESTONE et al., 2007). A taça (mostrada na FIGURA 1), datada do século IV, possui uma coloração esverdeada devido a difusão da luz quando o objeto é iluminado por uma fonte de luz externa. No entanto, quando ele é iluminado a partir de seu interior, apresenta coloração vermelho-rubi (BHAGYARAJ; OLUWAFEMI, 2018; GILJOHANN et al., 2010; LOUIS; PLUCHERY, 2012). Mas somente em análises feitas ao longo da segunda metade do século XX foi constatado que essa coloração característica era proveniente da presença de nanopartículas de prata e ouro com tamanho entre 50 e 100 nm na matriz vítrea (BARBER, 1990; BRILL, 1965; HORNYAK et al., 1997).



FIGURA 1 – A taça de Licurgo (*Lycurgus Cup*) apresenta coloração esverdeada quando é iluminada por uma fonte de luz externa (esquerda) e vermelha (direita) quando a iluminação é feita internamente. Fonte: (THE BRITISH MUSEUM, [s.d.]).

Durante os séculos XVII e XVIII diversos alquimistas demonstraram interesse em entender as propriedades do ouro e experimentaram diferentes sínteses para obtenção de soluções de ouro coloidal. No entanto, o conhecimento da época limitava o entendimento sobre nanopartículas e suas propriedades (LOUIS; PLUCHERY, 2012). A era moderna das AuNPs começou em meados do século XIX, com o trabalho de Michael Faraday em 1857, que fundamentou o entendimento sobre colóides (embora este termo tenha sido criado por Thomas Graham apenas em 1861). Faraday observou que uma solução de cloreto de ouro poderia ser reduzida por fósforo, levando a formação de uma solução vermelho-rubi, que

hoje sabemos se tratar de uma dispersão de nanopartículas de ouro. Também foi relatado que o material obtido possuía propriedades distintas do material *bulk* (EDWARDS; THOMAS, 2007; FARADAY, 1857; GILJOHANN et al., 2010).

O próximo avanço significativo ocorreu em meados do século XX com o desenvolvimento do método de síntese de AuNPs desenvolvidas por Turkevich em 1951. Este método possibilita a redução de sais de ouro na presença de citrato de sódio, resultando na formação de AuNPs estáveis e com tamanho controlado (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). A partir da década de 1980 observou-se um aumento notável nas pesquisas em nanotecnologia, à medida que as NPs começaram a ser estudadas para liberação de fármacos (DOUGLAS; DAVIS; ILLUM, 1987; KREUTER, 1988; OPPENHEIM, 1981), agricultura (LAWARE; RASKAR, 2014), detecção de compostos intra- e extracelulares, entre outros. A descoberta do efeito de ressonância plasmônica de superfície (SPR) apresentado pelas AuNPs, em particular, abriram novas possibilidades para aplicação deste tipo de material nas áreas de ótica e sensores (JANA; GANGULY; PAL, 2016a; KHURANA; JAGGI, 2021; MIYAZAKI; SHIMIZU; FERREIRA, 2017).

Ao longo do século XXI as AuNPs têm sido o foco de inúmeras pesquisas em áreas como a medicina, eletrônica e catálise. (HOMBERG; SIMON, 2010; LOPES et al., 2019; MADKOUR, 2018; PRIECEL et al., 2016; STRATAKIS; GARCIA, 2012) Em medicina, elas têm sido utilizadas para diagnóstico, *drug delivery* e tratamento de câncer (AMINA; GUO, 2020; SINGH et al., 2018). Além disso, tem crescido as pesquisas nas quais as AuNPs são funcionalizadas com biomoléculas para a entrega direcionada a tecidos ou células específicas (GULLA et al., 2019; TIWARI et al., 2011). As AuNPs têm sido continuamente estudadas devido ao potencial que apresentam e continuamente busca-se novas aplicações para este tipo de material em diferentes áreas. A história das AuNPs reflete a contínua exploração de suas propriedades únicas e das possíveis aplicações em uma gama de áreas científicas. É possível que as pesquisas atuais descubram ainda mais possibilidades para aplicação deste material no futuro.

### 1.2.2 Características das AuNPs

AuNPs surgiram como uma fascinante e versátil classe de nanomateriais. O ouro possui um conjunto particular de propriedades físicas e químicas, tanto no estado macroscópico quanto microscópico, que levam à ampla utilização deste material nestes dois estados (CHANG; GOLE; MURPHY, 2020; FATREKAR et al., 2021; LI; GUO; LI, 2013).

Quando o material está em nanoescala, devido à distribuição eletrônica na superfície das nanopartículas e ao seu tamanho extremamente pequeno, apresentam propriedades distintas do material “*bulk*”, como propriedades ópticas e eletrônicas (FAN; CHENG; SUN, 2020; LOUIS; PLUCHERY, 2012).

Estas propriedades provêm da elevada razão área/volume das nanopartículas, que leva ao aparecimento do efeito de confinamento quântico (QCE, do inglês *quantum confinement effect*). Em materiais *bulk*, as propriedades eletrônicas do metal podem ser descritas pela mecânica clássica, na qual o material exibe uma banda contínua de níveis de energia ocupados por elétrons (BERISO, 2019). No entanto, quando o material é reduzido até a nanoescala, o comportamento dos elétrons dentro deste material é descrito pela mecânica quântica. O QCE se refere ao fenômeno que ocorre quando o movimento de elétrons em um material torna-se restrito, pois o tamanho da partícula é da ordem do comprimento de onda de *de Broglie* do elétron (GAPONENKO; DEMIR, 2018; RAMALINGAM et al., 2020). Neste caso os níveis de energia eletrônica tornam-se quantizados (discretos), resultando em uma diferença de energia entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC). A energia necessária para mover um elétron da BV para a BC é conhecida como energia de *band gap*. Com a diminuição do tamanho da partícula, aumenta o grau de confinamento e conseqüentemente, observa-se o aumento da diferença entre BV e BC (RAMALINGAM et al., 2020; WOLF, 2006), como ilustrado na FIGURA 2. Então, com a diminuição do tamanho, uma quantidade maior de energia é necessária para realizar a transição de um elétron da BV para BC, o que implica em efeitos nas propriedades eletrônicas e ópticas do material, além de levar ao aumento de energia do sistema (KOOLE et al., 2014; LI et al., 2012).

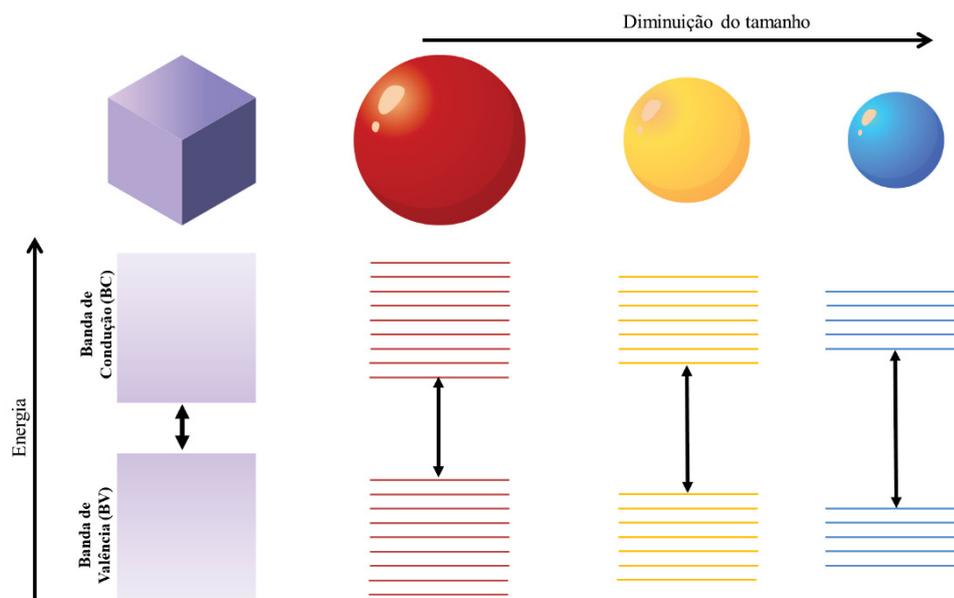


FIGURA 2 – Esquema mostrando a estrutura de bandas eletrônicas para o material bulk e nanomateriais nos quais é evidenciado o aumento da distância entre as bandas de valência (BV) e banda de condução (BC) com a diminuição do tamanho da partícula. Fonte: Adaptado de (RAMALINGAM et al., 2020).

São três as razões principais, entre muitas outras, que levaram ao sucesso na aplicação de AuNP: (i) a alta estabilidade química e física; (ii) a facilidade de funcionalização da superfície com moléculas biológicas e/ou orgânicas e (iii) a variedade de propriedades ópticas relacionadas ao efeito plasmônico de superfície. Além disso, sua versatilidade está associada com a variedade de formatos (esferas, cubos, prismas, entre outros), facilidade e métodos (químicos, físicos ou biológicos) com que podem ser obtidas (CHOKRIWAL; SHARMA; SINGH, 2014; HERIZCHI et al., 2016).

O entendimento e manipulação do QCE em nanopartículas é fundamental para projetar e otimizar o uso desses materiais com propriedades adaptadas para uma aplicação específica. Pesquisas continuam sendo realizadas a fim de explorar esse efeito quântico para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras em campos como a nanoeletrônica, fotônica e de conversão de energia (TOUDERT, 2021; ZHANG et al., 2013).

### 1.2.3 Síntese das AuNPs

A síntese de nanopartículas difere dos métodos de síntese de compostos mais tradicionais. Em inúmeros casos as reações ocorrem até que o equilíbrio seja atingido e como resultado tem-se a formação do produto termodinamicamente mais estável. No entanto, é preciso levar em consideração que a termodinâmica dos nanomateriais difere da do material

*bulk* (LAUFERSKY; NANN, 2019; MAJERIC; RUDOLF; ANZEL, 2022). Como já mencionado anteriormente, com a diminuição do tamanho do material para a nanoescala, tem-se um aumento na razão área superficial/volume, o que faz com que um número maior de átomos esteja presente na superfície, associados a uma energia de superfície. A energia livre de superfície é calculada pelo produto da área superficial ( $\sigma$ ) e tensão superficial ( $\gamma$ ), como mostrado na equação 1.

$$G_s = \sigma\gamma \quad (\text{Equação 1})$$

Visto que ambos ( $\sigma$  e  $\gamma$ ) são valores positivos, a criação de uma superfície leva a um valor positivo de energia. Como a formação de AuNPs leva a criação de uma grande superfície, a síntese de nanopartículas (NPs) é tida como um processo termodinamicamente desfavorável. Uma forma de diminuir a energia livre seria diminuir a superfície, o que poderia ser atingido por meio da formação de estruturas maiores (LAUFERSKY; NANN, 2019; WANG et al., 2015). No caso da síntese de NPs, ocorreria a agregação das partículas seguida da coalescência das NPs.

Existem duas abordagens principais para a síntese de nanomateriais: *top-down* e *bottom-up* (FIGURA 3). Na metodologia *top-down*, parte-se da estrutura *bulk* do material, a qual é fracionada por meio de ultrasonicação, ablação por laser e/ou decomposição térmica, por exemplo, até que se obtenha estruturas ou partículas de tamanho nanométrico. No método *bottom-up*, partindo-se de um material precursor que contenha a substância de interesse, são obtidos átomos/íons/moléculas por meio de reações químicas, que levam à formação de *clusters* e posterior formação das nanoestruturas (LU et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020).

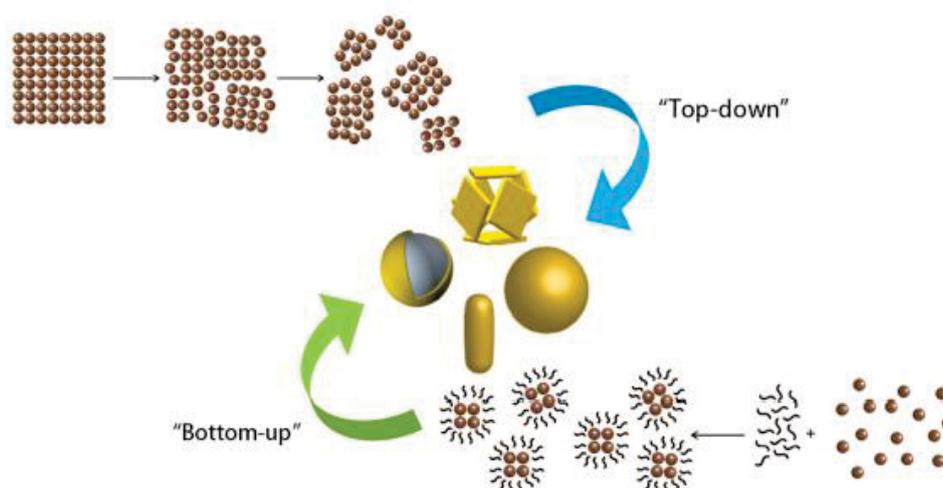


FIGURA 3 - Ilustração dos processos *top-down* e *bottom-up* para a obtenção de nanomateriais. Fonte: Adaptado de (GEONMONOND; DA SILVA; CAMARGO, 2018).

O processo de síntese química (*bottom-up*) costuma ser o mais utilizado, pela simplicidade no controle da síntese, estabilidade confiável e controle do tamanho e distribuição de tamanho das partículas. O método por reação química para formação de AuNP consiste em duas partes principais: (1) redução do precursor de ouro por um composto conhecido atuando como agente redutor; (2) estabilização das nanopartículas de ouro pela ação de agentes estabilizantes, evitando a formação de agregados por meio de repulsão eletrostática ou impedimento estérico (HERIZCHI et al., 2016; POLTE et al., 2010). Um dos métodos mais conhecidos para a produção de AuNP foi desenvolvido por Turkevich *et al.* (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951), na qual o composto  $\text{HAuCl}_4$  (precursor de ouro) foi reduzido por citrato de sódio, atuando de forma sinérgica como agente redutor e estabilizante.

Para a síntese de NPs podem ser utilizadas reações governadas estritamente pela cinética ou modelos termodinamicamente estáveis. A primeira costuma ser empregada na síntese de nanopartículas inorgânicas, enquanto a segunda atua em NPs orgânicas e inorgânicas. A síntese de NPs consiste em duas reações principais: os processos de nucleação e, de crescimento das partículas (TEIXEIRA et al., 2021; THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014). A primeira etapa consiste na formação de estruturas compostas por vários átomos (denominados como *seeds*), cuja taxa de formação é influenciada pela concentração dos reagentes e a temperatura da reação. Em uma segunda etapa tem-se o crescimento dessas estruturas para a formação de nanopartículas, processo que é influenciado pela supersaturação, temperatura, forma, tamanho, entre outros. Se estas reações ocorrerem simultaneamente, tem-se a formação de uma ampla variedade de tamanhos para as NPs (distribuição polidispersa). Se cada etapa ocorrer separadamente, como resultado tem-se uma distribuição monodispersa, com partículas com uma uniformidade de tamanhos (LAUFERSKY; NANN, 2019; POLTE, 2015), como mostrado na FIGURA 4.

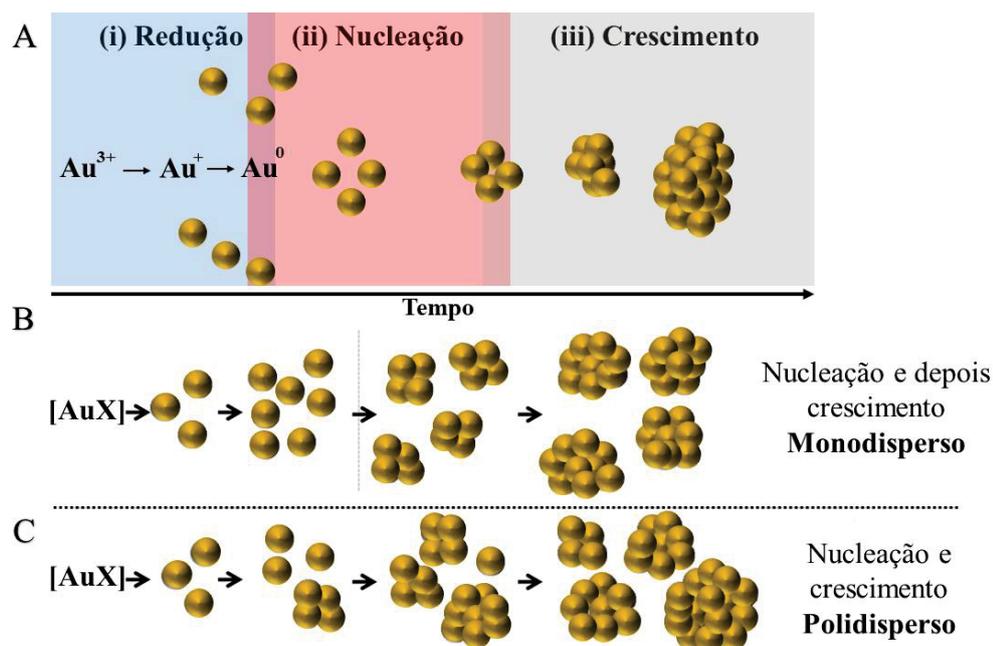


FIGURA 4 – Esquema representativo da síntese de nanopartícula na qual são mostradas (a) as etapas envolvidas na formação de NPs, (b) o caso em que as etapas de nucleação e crescimento ocorrem separadamente e (c) o caso mais realista no qual a nucleação e crescimento ocorrem simultaneamente.

Adaptado de (QUINSON; JENSEN, 2020).

É importante entender que a físico-química da síntese de nanopartículas é um tópico complexo e que pode ser influenciado por inúmeros fatores, como temperatura, pH, pressão, escolha de precursor e redutor, entre outros. Além disso, fatores cinéticos possuem um papel importante no tamanho, forma e propriedades das NPs formadas. Em geral, a síntese de NPs envolve um balanço entre a estabilidade termodinâmica do sistema e a cinética dos processos de nucleação e crescimento das partículas.

#### 1.2.4 Banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR)

As AuNP possuem um grande número de elétrons de condução que são facilmente polarizáveis, que ao interagirem com o campo elétrico de uma luz incidente, oscilam coletivamente em ressonância com o campo elétrico. Esse fenômeno é conhecido como ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR, *do inglês Localized Surface Plasmon Resonance*) (PETRYAYEVA; KRULL, 2011) e está representado na FIGURA 5. Para AuNPs esféricas com diâmetro menor (cerca de 20 nm) o efeito de LSPR leva à absorção de luz em comprimentos de onda menores, em torno de 450 nm (azul-verde). Portanto, a reflexão ocorre em comprimentos de onda em torno de 700 nm (vermelho), fazendo com que a solução contendo as AuNP apresente a coloração avermelhada (BADI;

AL-SHAKARCHI; AHMED, 2020). Caso as nanopartículas formadas sejam maiores, a absorção e reflexão de luz ocorrem em outros comprimentos de onda, levando à formação de dispersões que variam entre o lilás e azul. Esta mudança de coloração está relacionada com a composição, o tamanho e morfologia das nanopartículas formadas, além de poder ser proveniente da formação de agregados (AMENDOLA et al., 2017; JANA; GANGULY; PAL, 2016b; KOETZ; KOSMELLA, 2007). Na FIGURA 6 são mostrados alguns exemplos de como esses fatores influenciam na cor das dispersões.

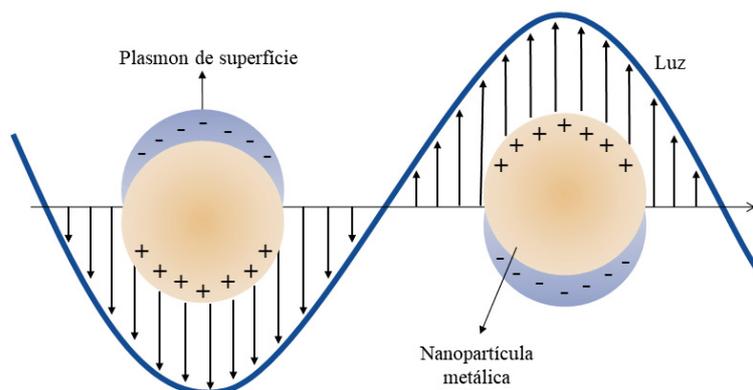


FIGURA 5 - Representação do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). Fonte: Adaptado de (IBRAHIM ZAMKOYE; LUCAS; VEDRAINE, 2023).

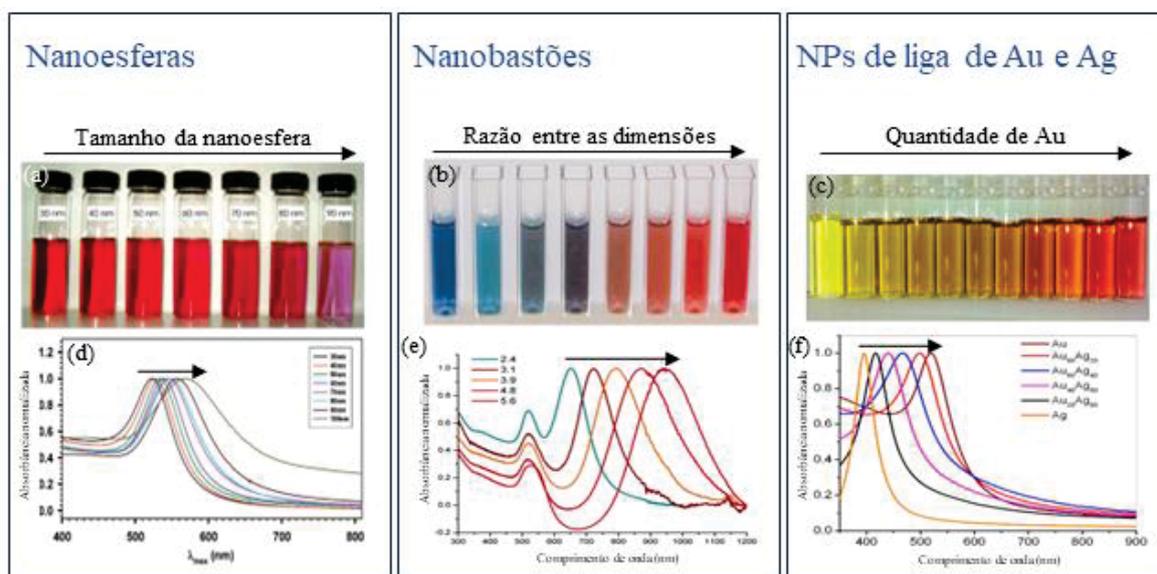


FIGURA 6 – Imagens (a-c) de dispersões de diferentes nanoestruturas de ouro (nanoesferas, nanobastões e nanopartículas de Au e Ag) nas quais são observadas as variações de cor das dispersões em função de alguma de suas propriedades. A seta indica o aumento (a) do tamanho das nanoesferas, (b) da razão entre as dimensões longitudinal e transversal do nanobastão e (c) da quantidade de ouro presente na liga que forma as nanopartículas. Nos espectros de UV-Vis (d-f) as setas indicam o deslocamento para o vermelho que ocorre em decorrência da propriedade que está sendo variada em a-c. Fonte: Adaptado de (DREADEN et al., 2012; HUANG et al., 2006; NJOKI et al., 2007a; REHBOCK et al., 2014; TANG et al., 2018).

### 1.2.5 Aplicações das AuNPs

As AuNP possuem propriedades únicas, fazendo com que elas sejam materiais atrativos para diferentes aplicações em medicina, sensores, indústria e tecnologia (como pode ser visto na FIGURA 7. A medicina é uma das áreas em que as AuNPs possuem diversas aplicações, como por exemplo, no diagnóstico por imagem. Neste tipo de aplicação as NPs podem ser utilizadas como agentes de contraste, aumentando a visibilidade de tecidos e a precisão do diagnóstico (DONG et al., 2019; LI et al., 2011). Uma aplicação similar pode ser encontrada quando as AuNPs são utilizadas para marcar e/ou rastrear células, o que permite monitorar o comportamento e migração celular (DE MARCHI et al., 2021; HUTTER; MAYSINGER, 2011). Esse tipo de marcação já foi empregado para o estudo de tumores, visando o entendimento do progresso da doença e os efeitos da terapia adotada (IZCI et al., 2022; LARA et al., 2020; MENK et al., 2011). No caso de algumas doenças, o tratamento é dificultado pois elas são identificadas apenas em estágios mais avançados. Nesse sentido, AuNPs tem sido aplicadas no diagnóstico e tratamento de câncer gastrointestinal (YANG et al., 2022) e doenças neurodegenerativas (SCARPA et al., 2023), mostrando resultados promissores.



FIGURA 7 - Algumas aplicações de AuNPs em diversas áreas. Fonte: Adaptado de (PANDEY et al., 2020).

A funcionalização de AuNPs com agentes terapêuticos ou fármacos pode levar ao desenvolvimento de dispositivos de entrega de fármacos que sejam mais seletivos, focando em células ou tecidos específicos. Com isso, é possível reduzir os efeitos colaterais e melhorar a eficácia do tratamento (AMINA; GUO, 2020; CHENG et al., 2013). Pesquisadores utilizaram AuNPs como carreador de um fármaco para o tratamento de células cancerosas. O estudo mostrou que a liberação completa do fármaco ocorreu após 72 h, levando ao aumento da eficácia do medicamento contra células de câncer de pâncreas, além da imobilização levar a diminuição dos efeitos colaterais em células normais (COELHO et al., 2018). Em outro trabalho, a funcionalização das AuNPs permitiu elaborar um imunoenensaio para a detecção da pneumolisina, a qual pode servir com um teste para o diagnóstico de pneumonia (BLANCO-COVIÁN et al., 2017).

A área de alimentos também pode se beneficiar do potencial das AuNPs, sem esquecer das preocupações quanto a segurança e da legislação que envolvem a utilização deste material em alimentos. A incorporação de AuNPs em materiais para embalagens de alimentos pode aumentar o tempo de prateleira dos produtos ou funcionar como um sensor para detectar alimentos estragados ou contaminados (DUNCAN, 2011; MUSTAFA; ANDREESCU, 2020). AuNPs funcionalizadas também tem sido aplicadas de forma eficaz na detecção e quantificação de contaminantes, aditivos e biomoléculas (FERNÁNDEZ-LODEIRO et al., 2024; LI; ZHANG; CHEN, 2020; LIU; DONG, 2023).

A aplicação de nanoestruturas de ouro e outros metais em catálise tem se mostrado uma área promissora. As AuNP podem tanto atuar como catalisadores em reações de oxidação e hidrogenação (CARABINEIRO, 2019; HARUTA et al., 1987; LI; JIN, 2013) quanto como suporte para biomoléculas capazes de desempenhar a função catalítica (BARROS et al., 2021; HEDDLE, 2013). As AuNPs podem ser funcionalizadas com diferentes biomoléculas, como peptídeos, proteínas, enzimas e DNA. A modificação da superfície das AuNP pode influenciar na estabilidade, biocompatibilidade ou direcionar o uso deste material para uma aplicação específica (DAS et al., 2011; GLOMM, 2005). A incorporação de polímeros e/ou biomoléculas à superfície das AuNPs pode inclusive levar à obtenção de um material com propriedades distintas. Esta abordagem tem sido estudada principalmente para aplicação nas áreas médica e farmacêutica, por exemplo na área de diagnóstico, atuando como detector ou sensor para biomarcadores de determinadas doenças (SIBUYI et al., 2021; ZHANG et al., 2019). Outra vertente para a aplicação de AuNPs está no tratamento de doenças (SILVEIRA et al., 2021; SZTANDERA; GORZKIEWICZ; KLAJNERT-MACULEWICZ, 2019), dentre as quais podem ser destacadas pesquisas que

visem tratar doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e a doença de Parkinson (KHAN et al., 2020). Na área farmacêutica, as AuNPs já foram empregadas em processos de encapsulação (KIM et al., 2019) e liberação controlada de fármacos (MITCHELL et al., 2021; PATRA et al., 2018). No trabalho desenvolvido por Chaudhary *et al.*, foi estudado o processo de encapsulação e liberação do resveratrol para o tratamento de câncer de próstata (CHAUDHARY et al., 2019).

A ampla gama de aplicações das AuNPs demonstra a versatilidade que essas NPs possuem em diferentes áreas, apontando seu potencial para o desenvolvimento de novas pesquisas e tecnologias. Prosseguir com as pesquisas em nanotecnologia com foco no aperfeiçoamento e expansão das aplicações de AuNPs, abre portas para que este material tenha novas possibilidades de aplicação em diferentes áreas.

### 1.3 ENZIMAS

As enzimas são macromoléculas pertencentes a uma classe especializada de proteínas, formadas por unidades menores (aminoácidos) ligados entre si por meio de ligações peptídicas (LEWIS; STONE, 2021; NELSON; COX, 2012). Enzimas são biocatalisadores, responsáveis por acelerar importantes reações químicas e biológicas, como a polimerização de nucleotídeos para a formação do DNA (POTNIS, 2020; ROBINSON, 2015). A forma e estrutura de uma enzima é descrita em termos de 4 níveis hierárquicos de organização (FIGURA 8). A estrutura primária compreende apenas a sequência de aminoácidos que compõem a enzima, enquanto as demais estruturas tratam das interações tridimensionais entre os aminoácidos. As estruturas secundária e terciária englobam as interações próximas e de longa distância dos aminoácidos, respectivamente (HARDIN; LODOLCE, 2022; NELSON; COX, 2012).

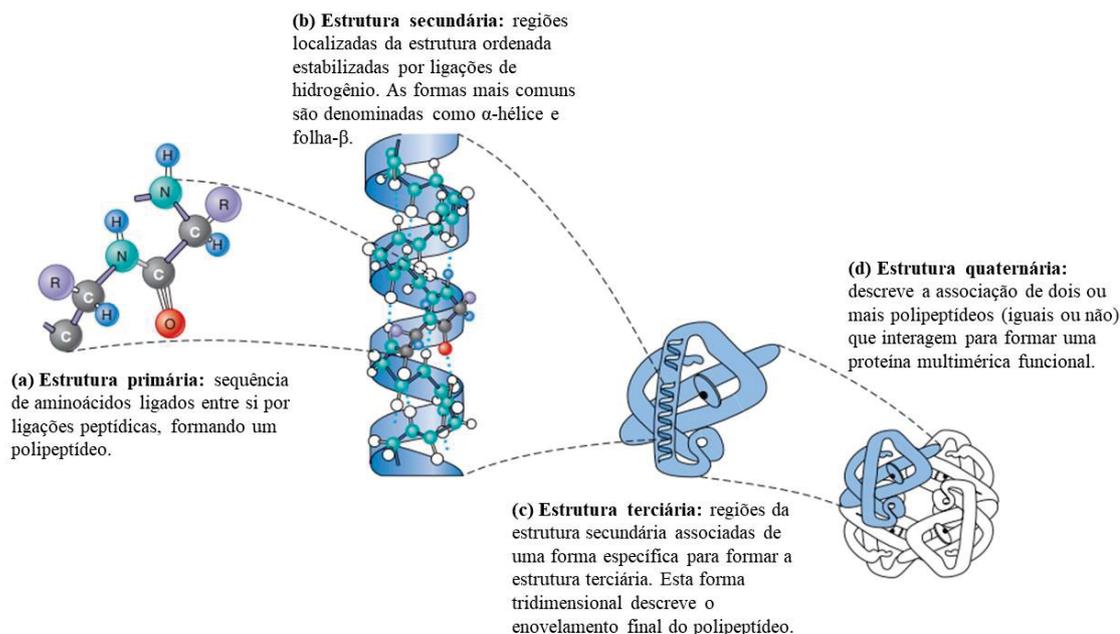


FIGURA 8 - Os quatro níveis de organização da estrutura da proteína. Fonte: Adaptado de (HARDIN; LODOLCE, 2022).

Quando se trata da estrutura tridimensional das enzimas, surge o conceito do sítio ativo, local na estrutura terciária da enzima composto por um conjunto de aminoácidos, no qual ocorre a ligação do substrato. O sítio ativo é formado por resíduos de aminoácidos que estabelecem ligações temporárias com o substrato (sítio de ligação) e resíduos que atuam na catálise da reação do substrato (sítio catalítico) (KAHRAMAN; THORNTON, 2008; NELSON; COX, 2012), como mostrado na FIGURA 9.

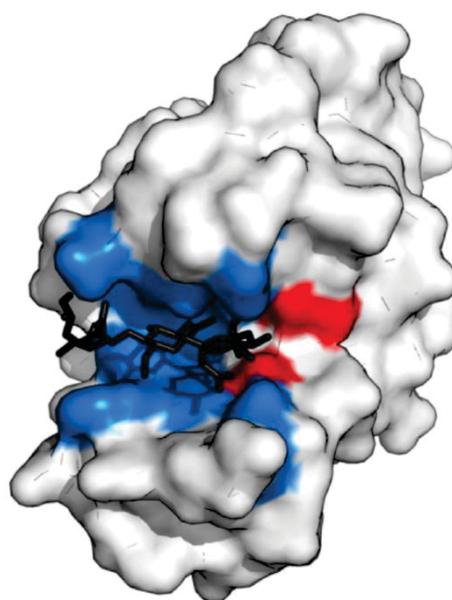


FIGURA 9 - Organização do sítio ativo de uma enzima, no qual são mostrados o sítio de ligação (azul), sítio catalítico (vermelho) e o substrato (preto). Fonte: Adaptado de (THOMAS SHAFEE, 2015).

O sítio ativo ocupa somente 10-20% do volume da enzima e seu arranjo permite que a ligação com o substrato ocorra de maneira específica, permitindo que ocorra a reação química desejada. Em muitos casos as enzimas exibem estereoespecificidade, permitindo que elas diferenciem entre estereoisômeros, incluindo enantiômeros, em função do arranjo tridimensional dos átomos. O arranjo espacial do sítio ativo desempenha um papel crucial, determinando qual dos enantiômeros a enzima é capaz de reconhecer e catalisar, como é mostrado para o exemplo gliceraldeído na FIGURA 10. Portanto, a atividade catalítica está diretamente relacionada com a estrutura tridimensional da enzima (BUGG, 2004; NELSON; COX, 2012)

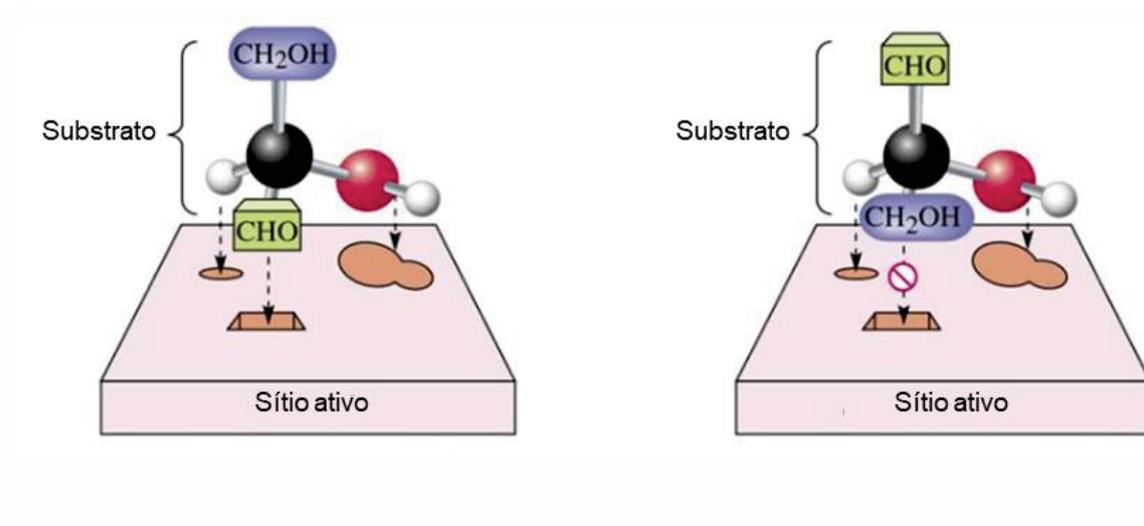


FIGURA 10 - Esquema mostrando que a superfície de uma enzima é capaz de interagir com o (*R*)-gliceraldeído em três sítios de ligação (esquerda), mas interage com o (*S*)-gliceraldeído em apenas dois dos três sítios. Adaptado de (BLACKMAN et al., 2012).

As condições do meio (como temperatura e pH) podem alterar a conformação da enzima e, conseqüentemente o sítio ativo também é alterado, de forma que o substrato desejado não se ligue adequadamente a ele e, portanto, a reação não ocorra como esperado. Solventes não-aquosos também podem ser utilizados com enzimas, no entanto, sua escolha deve levar em consideração a compatibilidade deste com a manutenção da atividade catalítica da enzima. Solventes não-aquosos podem ter uma variedade de efeitos em enzimas, podendo competir com a ligação do substrato, modificar o equilíbrio entre duas conformações da enzima, estabilizar ou desestabilizar a enzima, entre outros (BUTLER, 1979).

Cada enzima apresenta um conjunto de condições ideais, nas quais são obtidas as maiores taxas de reação. De forma geral, o aumento da temperatura dentro do intervalo ideal,

leva ao aumento da taxa de reação. No entanto, caso as condições utilizadas estejam acima desta faixa, as ligações intramoleculares podem ser afetadas, levando, como citado, a uma mudança de conformação da enzima. Caso as mudanças de temperatura e/ou pH sejam mais bruscas, podem inclusive levar a desnaturação da proteína, que no contexto das enzimas envolve o rompimento das estruturas de ordem maior da enzima (estrutura terciária e quaternária). A perda destas estruturas afeta o sítio ativo da enzima, que normalmente é formado por um arranjo tridimensional específico dos aminoácidos. Isso causa a perda da atividade catalítica, pois a enzima não consegue mais se ligar ao substrato de forma eficaz e catalisar a reação (NELSON; COX, 2012).

### 1.3.1 Lipase de *Candida antarctica* fração B (CALB)

As enzimas são classificadas de acordo as reações que elas catalisam. Para organizá-las, foi criado um sistema que fez a separação das enzimas em 7 grupos, como mostrado na TABELA 1 (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NC-IUBMB), [s.d.]). Uma dessas classes é a das enzimas hidrolases, na qual estão inseridas as lipases (SINDHU et al., 2021). Estas enzimas atuam na hidrólise de triacilglicerídeos levando ao glicerol e aos ácidos graxos correspondentes (hidrólise completa) ou na síntese de triacilglicerídeos a partir de glicerol e ácidos graxos (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004). Sob certas condições pode ocorrer a hidrólise incompleta, na qual a clivagem da ligação leva a formação de produtos parciais (mono- e diacilgliceróis) (HERMANSYAH et al., 2007) que podem ser de interesse para a indústria alimentícia (MOONEN; BAS, 2015) e a produção de biodiesel (BINHAYEEDING; KLOMKLAO; SANGKHARAK, 2017). As lipases são empregadas industrialmente na produção de detergentes, fabricação de queijos, cosméticos, indústria alimentícia, entre outros (PANDEY et al., 2006). Por possuírem maior especificidade e estabilidade (quando comparadas com outras enzimas), serem estáveis em solventes orgânicos e não requererem cofatores, as lipases são as enzimas mais empregadas em síntese orgânica (GODOY; PARDO-TAMAYO; BARBOSA, 2022; GOTOR-FERNÁNDEZ; VICENTE, 2007; PEREIRA et al., 2022; SHELDON; BRADY; BODE, 2020).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS SEGUNDO O CÓDIGO EC E O TIPO DE REAÇÃO QUE CATALISAM.

Classe	Tipo de reação catalisada	Reação
EC 1 Oxidoredutases	Reações de redução/oxidação; transferência de elétrons	<p>Álcool desidrogenase</p> <p>R = grupo alquil</p>
EC 2 Transferases	Transferência de um grupo funcional como amina, fosfato, acil e carboxil	<p>Aspartato transaminase</p>
EC 3 Hidrolases	Clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C e algumas outras ligações	<p>Lipase</p> <p>R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> = grupo alquil</p>
EC 4 Liasas	Clivagem de ligações C-C, C-O, C-N e outras ligações por eliminação; Adição de grupos a duplas ligações ou deixa ligações duplas ou anéis	<p>Glutamato descarboxilase</p>
EC 5 Isomerases	Reações de rearranjo intermolecular (mudanças geométricas ou estruturais)	<p>PDI</p> <p>Redução</p> <p>Oxidação</p>
EC 6 Ligases	Condensação de 2 molécula, sempre às custas de energia, geralmente do ATP	<p>Piruvato carboxilase</p> <p>ATP -&gt; ADP + Pi</p>
EC 7 Translocases	Catalisa o movimento de íons ou moléculas através de membranas ou sua separação dentro de membranas	<p>NAD<sup>+</sup> -&gt; NADH</p> <p>NADPH -&gt; NADP<sup>+</sup></p> <p>H<sup>+</sup></p>

Fonte: Adaptada de (ALI KHAN; MUTUS, 2014; MCDONALD; BOYCE; TIPTON, 2009; PADAYATTI et al., 2017).

Recentemente vem crescendo o interesse no estudo de materiais híbridos, que combinem nanoestruturas e biomoléculas. As enzimas se destacam, visto que o processo de catálise enzimática é vantajoso, pois é mais seletivo, produz menos resíduos e/ou subprodutos e envolve condições mais amenas de reação (PIZARRO; PARK, 2003; VASUDEVAN; BRIGGS, 2008). No entanto, a ampla utilização de enzimas pode enfrentar algumas limitações, como sua limitada termoestabilidade, especificidade de substrato, problemas com escalabilidade e alto custo. A fim de contornar esses problemas, pode-se recorrer a imobilização das biomoléculas por meio de adsorção, ligação covalente, encapsulamento ou aprisionamento em uma matriz polimérica ou gel. Diferentes materiais podem ser utilizados como suporte para as enzimas, como polímeros, minerais, carvão ativado, nanopartículas, entre outros (BRÍGDA et al., 2007; DUTTA et al., 2009; FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021; HOMAEI et al., 2013; VARTIAINEN; RÄTTÖ; PAULUSSEN, 2005).

A imobilização da enzima visa a obtenção de um biocatalisador com maior estabilidade, especificidade e atividade, quando comparado com a forma livre (não imobilizada) da enzima, propriedades que já foram observadas em diversos estudos. Além disso, este procedimento tende a facilitar a recuperação e reutilização da enzima por diversas vezes, melhorando o custo-benefício associado à sua utilização (PALOCCI et al., 2007; REETZ, 1997; XIE; WANG, 2014).

Uma nova linha de pesquisa em tecnologia de imobilização de enzimas pode se abrir ao incorporar polímeros responsivos a esse tipo de sistema (QI; QIAO, 2021). Essa abordagem pode oferecer o controle preciso sobre reações enzimáticas, na qual um ou mais polímeros podem ser utilizados para responder a um estímulo externo. Por exemplo, N-isopropilacrilamida, metacrilato de terc-butila e  $\epsilon$ -caprolactona já foram utilizados para a síntese de copolímeros responsivos a temperatura e luz na imobilização e regulação da atividade da enzima pectinase (GUO et al., 2017). Além disso, a combinação de polímeros responsivos em sistemas com enzimas imobilizadas pode ser empregada em outras funções, como em sistemas de liberação controlada (WANG et al., 2018) e biossensores (AGGAS; GUISEPPI-ELIE, 2020), evidenciando o potencial desse tipo de material híbrido.

A CALB está entre as enzimas mais utilizadas em biocatálise, devido à sua capacidade de atuar em diferentes reações (como esterificação e hidrólise) (CARNIEL et al., 2016; KUNDYS; BIAŁECKA; AGATA, 2018), estabilidade em solventes orgânicos, estereosseletividade (FORDE et al., 2010; RAZA; FRANSSON; HULT, 2001). Estruturalmente a CALB é formada por 317 resíduos de aminoácidos, possui massa molar

de 33 kDa (KUNDYS; BIAŁECKA; AGATA, 2018; UPPENBERG et al., 1994), o ponto isoelétrico (pI) é 6,0 (LIMA et al., 2019) e sua atividade ótima costuma ocorrer para pH em torno de 7 em reações como a hidrólise do azeite de oliva (YU et al., 2018). A utilização da CALB em sua forma livre torna-se limitada devido ao alto custo, impossibilidade de reaproveitamento e instabilidade frente a algumas condições do meio, como temperatura e pH. Por isso, diversos pesquisadores recorreram à imobilização da lipase por meio de encapsulação (SOUZA et al., 2012), ligação covalente (BEZBRADICA et al., 2005) ou adsorção em uma superfície sólida (ADEOGUN et al., 2017). Uma área promissora de pesquisa compreende a imobilização de enzimas, como a CALB, em suportes de ouro devido as propriedades únicas apresentadas por este material (VENDITTI et al., 2015). Esta superfície de ouro pode ser modificada para que vários tipos de morfologias possam ser exploradas, como nanopartículas (BARROS et al., 2024), nanobastões (WANG et al., 2022), nanofios (DIK et al., 2023) ou nanoestrelas (BARROS et al., 2021).

### 1.3.2 Reações enzimáticas

Reações enzimáticas são processos que envolvem a catálise de reações químicas por meio da utilização de catalisadores biológicos conhecidos como enzimas (ROBINSON, 2015). Algumas das principais características deste tipo de reação incluem a especificidade, eficiência e controle do processo. De maneira geral, devido à elevada seletividade da enzima, a ligação com o substrato ocorre por meio de interações específicas enzima-substrato em seu sítio ativo, sendo capazes de distinguir entre regioisômeros e enantiômeros (BUGG, 2004). Assim, a reação ocorre preferencialmente com um dos isômeros, resultando em um produto com alta pureza óptica. Esta especificidade é notoriamente evidenciada pela taxa de reação do substrato, a qual é regulada pelo sítio ativo e a estrutura tridimensional da enzima (HEDSTROM, 2010; POPJÁK, 1970). Enzimas podem catalisar reações a taxas superiores a um milhão de vezes maiores do que reações sem catalisador.

Para avaliar a eficiência de uma reação catalisada por uma enzima, emprega-se o parâmetro da atividade enzimática (YANG; WANG; DING, 2019). Esta medida é normalmente expressa em termos da taxa de reação ou taxa de *turnover*, a qual quantifica a quantidade de substrato que uma enzima consegue converter em produto em uma determinada unidade de tempo (LU; MIWA; WEST, 1980). A atividade enzimática é influenciada pela concentração de enzima, concentração do substrato, temperatura e pH do meio, sendo que mudanças na temperatura podem ter um impacto significativo na atividade da enzima. Esta relação com a temperatura pode ser descrita pelo conceito de “temperatura

ótima”, na qual a atividade da enzima é maior, fazendo com que a catálise ocorra na mais alta taxa de reação possível (DANIEL; DANSON; EISENTHAL, 2001; SANTOS; OLIVEIRA; MAUGERI, 2007). Na FIGURA 11 é mostrado como estes fatores afetam a taxa de uma reação catalisada por enzima.

De forma geral, com a elevação da temperatura, a atividade enzimática tende a aumentar devido a dois fatores: a conformação do sítio nesta torna-se mais favorável e o aumento da energia cinética das moléculas do substrato, o que acarreta a maior interação entre o sítio ativo e o substrato. No entanto, com o aumento da temperatura acima da “temperatura ótima”, observa-se uma diminuição da atividade enzimática devido a mudanças na conformação da estrutura tridimensional da enzima até sua desnaturação (GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015; SILVERSTEIN, 2012).

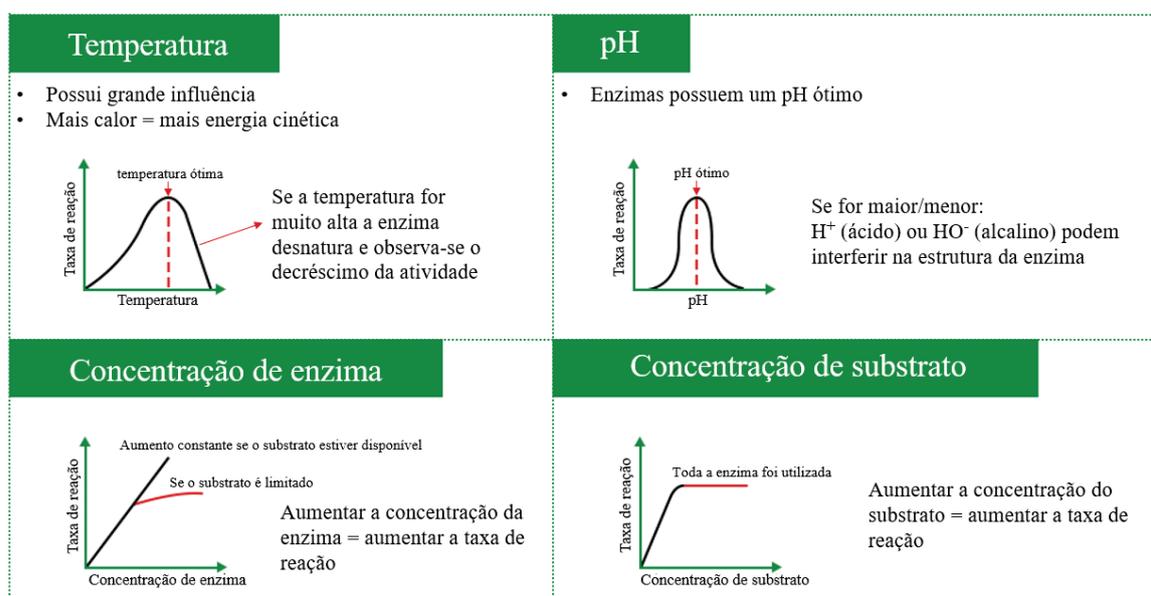


FIGURA 11 - Fatores que afetam a atividade de uma enzima. Fonte: Adaptado de (“Factors Affecting Enzyme Activity”, 2022).

Além disso, em diversos casos a presença de cofatores e inibidores podem desempenhar um papel crucial na modulação da atividade enzimática (LOPINA, 2017). Inibidores são moléculas que se ligam à enzima, reduzindo ou bloqueando a atividade catalítica. Esta ligação pode ocorrer no sítio ativo, impedindo que o substrato possa se ligar a esta parte da enzima (inibidores competitivos) ou a outra parte da molécula, levando a uma mudança de conformação da enzima (inibidores não-competitivos) (BISSWANGER, 2017). Algumas enzimas, como a álcool desidrogenase, requerem a presença de cofatores (coenzimas) para funcionar adequadamente (ST. CLAIR; WANG; MARGOLIN, 2000).

Uma das vantagens do emprego da CALB como biocatalisador é o fato desta enzima não necessitar a presença de coenzimas. Para realizar a função enzimática, a CALB utiliza a tríade catalítica (FIGURA 12), que consiste nos resíduos de aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp). O resíduo serina desempenha um papel crucial no mecanismo de reação, atuando como um nucleófilo durante a clivagem do substrato (HUNKAPILLER et al., 1973; SCHRAG et al., 1991).

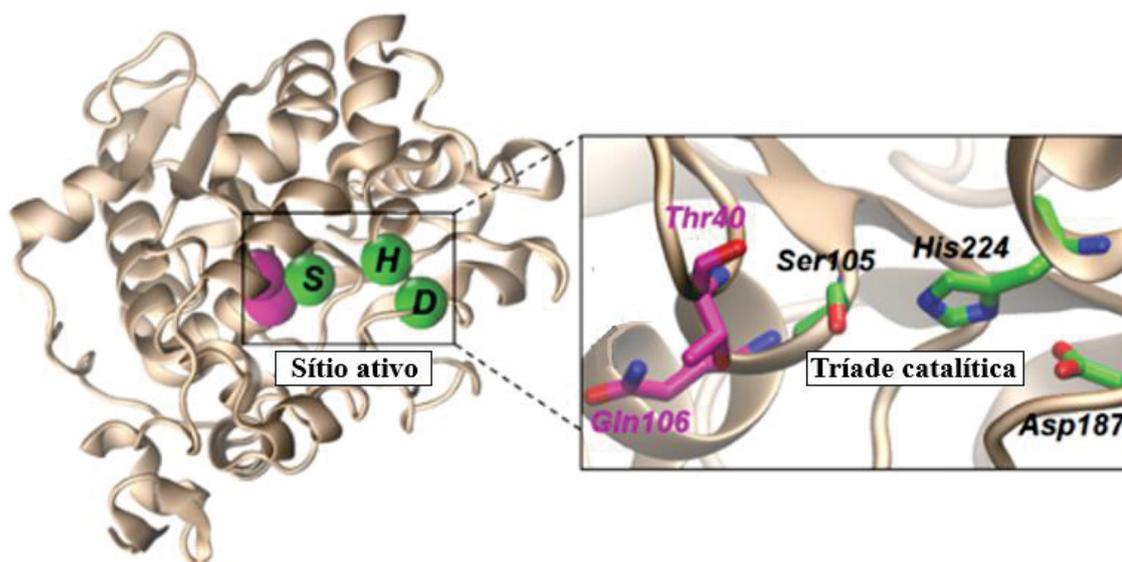


FIGURA 12 - Estrutura cristalina da CALB (PDB ID 1TCA) (esquerda) com destaque para o sítio ativo no qual são evidenciados os aminoácidos da tríade catalítica (Ser105, His224 e Asp187). Na imagem também é destacado o buraco de oxianion (Thr40 e Gln106), uma região eletrofílica que auxilia na estabilização do intermediário tetraédrico do substrato que possui uma carga negativa em torno do oxigênio. Fonte: Adaptado de (GALMÉS et al., 2020).

A cinética enzimática da CALB livre pode ser descrita pelo modelo cinético de Michaelis-Menten, o qual é um modelo amplamente utilizado em reações catalisadas por enzimas (BARROS et al., 2021; WALSH; MARTIN; DARVESH, 2010). Neste modelo aplica-se a Equação 2, a qual descreve a taxa de reação enzimática ao relacionar a taxa de formação de produto e a concentração do substrato. O mecanismo envolve duas reações, na qual numa primeira etapa o substrato liga-se reversivelmente à enzima, formando um complexo enzima-substrato. Na segunda, ocorre a reação irreversível deste complexo para a formação do produto e regenera-se o biocatalisador, que pode ser utilizado novamente (TOMCZAK; WĘGLARZ-TOMCZAK, 2019). A determinação dos parâmetros cinéticos utilizando a equação de Michaelis-Menten requer a determinação da velocidade inicial da

reação e análise com diferentes concentrações de substrato, para que os dados possam ser ajustados com a equação 2 (BEZERRA; DIAS, 2007).

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,  $V$  é a velocidade inicial da reação,  $V_{max}$  é a taxa de reação máxima atingida pelo sistema,  $[S]$  é a concentração inicial do substrato  $S$  e  $K_m$  é a constante de Michaelis.

Embora a CALB seja extensivamente empregada em inúmeras reações enzimáticas devido à sua notável versatilidade e especificidade, sua aplicação em alguns processos industriais frequentemente está condicionada à habilidade desta enzima operar sob condições específicas. Apesar disso, ainda há oportunidade para o desenvolvimento de pesquisas voltadas à exploração de estratégias que levem ao aprimoramento da eficiência e estabilidade catalítica em diversas aplicações. O contínuo desenvolvimento dessas estratégias poderá não apenas ampliar as fronteiras de aplicação da CALB, mas contribuir significativamente para a eficácia e sustentabilidade de processos industriais nos quais esta enzima desempenha um papel crucial.

#### 1.4 POLÍMEROS

Os polímeros são compostos de  $n$  unidades de repetição (monômeros), conhecido como o grau de polimerização (DP). Por se tratar de macromoléculas, o valor de  $n$  costuma ser grande (não é incomum encontrar polímeros com valores de  $n$  entre  $10^4$  e  $10^5$ ) (TERAOKA, 2002). Quanto a composição dos monômeros, os polímeros formados podem ser compostos apenas por um tipo de monômero (homopolímeros) ou mais de um tipo de monômero (copolímeros).

As reações de polimerização podem ocorrer segundo um dos dois tipos de mecanismo: em cadeia (também conhecida como polimerização de adição) ou em etapas (também chamada de polimerização de condensação). O método mais importante da polimerização de adição é a polimerização radicalar, sendo o método responsável pela síntese de cerca de 40% dos polímeros e borrachas sintéticas no início do século XXI (BRAUN, 2009). O método via formação de radicais consiste em três etapas cinéticas: iniciação, propagação e terminação (SPERLING, 2006). Na primeira etapa da reação ocorre a decomposição (por meio de aquecimento, absorção de radiação UV, entre outros métodos) das moléculas do iniciador, que levam à formação de dois radicais ( $I\cdot$ ). Ainda na primeira

etapa ocorre o ataque do radical formado a uma das moléculas do monômero (FIGURA 13). Com isso, a ligação  $\pi$  do monômero é quebrada e ocorre a formação de um novo radical. Na etapa de propagação ocorre a adição sucessiva de moléculas do monômero, levando à formação de longas cadeias, mas que ainda mantêm o radical. Durante a etapa de terminação, dois radicais reagem entre si, levando à perda do centro ativo e, conseqüentemente, encerrando o processo de polimerização. A terminação pode ocorrer por combinação, na qual duas porções de cadeias longas se adicionam e formam uma única molécula. Ou pode ocorrer por desproporção, na qual um hidrogênio é transferido de uma das espécies para a outra, levando a formação de duas moléculas (BEYAZIT et al., 2016; SPERLING, 2006).

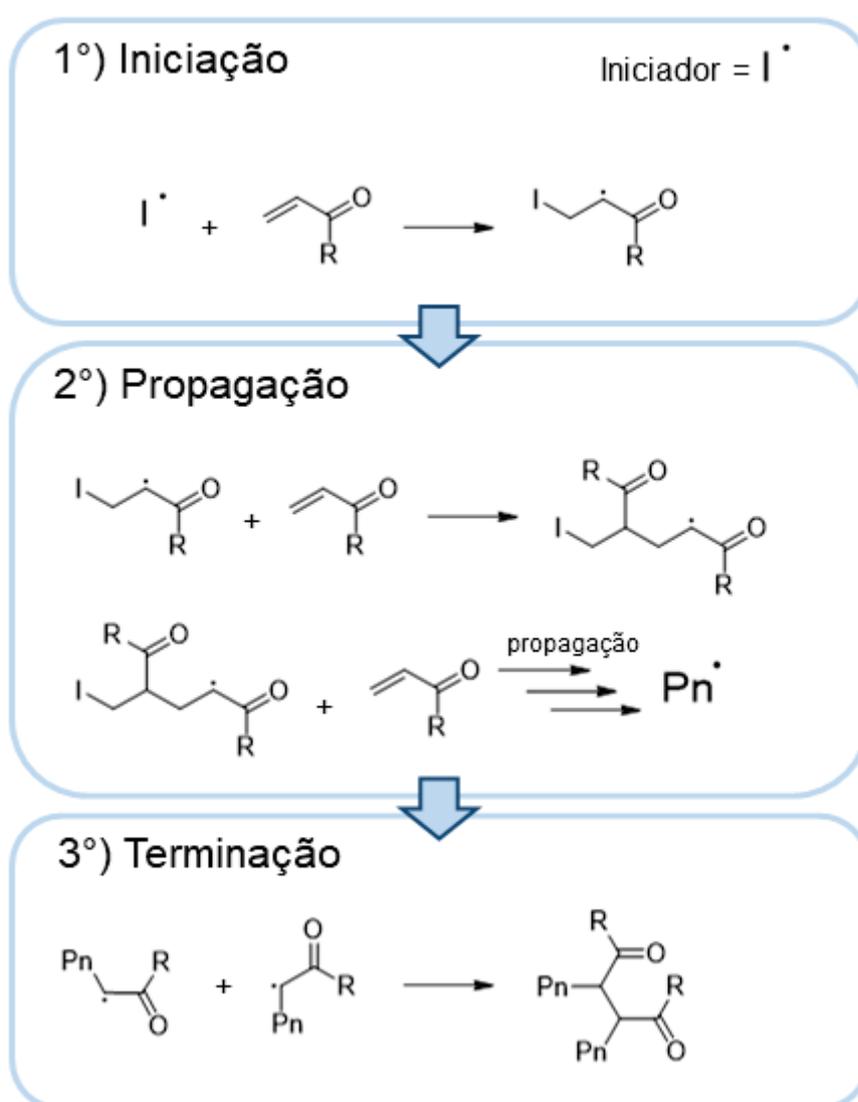


FIGURA 13 - Etapas do processo de polimerização via radicais livres. Fonte: Adaptado de (BEYAZIT et al., 2016).



2013; STUBENRAUCH et al., 2009). O efeito do estímulo sobre o polímero pode ser observado por meio de mudanças na solubilidade, cor, condutividade elétrica, estado físico, entre outros.

O PNIPAm está entre os polímeros inteligentes mais estudados e é o mais pesquisado entre os polímeros que respondem às mudanças de temperatura. O interesse neste polímero decorre do fato de sua temperatura de transição ocorrer próxima a condições fisiológicas, tornando-o um polímero atraente para aplicações biotecnológicas. Embora a LCST dependa de alguns fatores como a taticidade do polímero, presença e tipo de copolímero, massa molar, concentração, entre outros, a temperatura de transição costuma ser referenciada como  $\sim 32^{\circ}\text{C}$  (HALPERIN; KRÖGER; WINNIK, 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

Os polímeros termorresponsivos são aqueles que possuem a habilidade de responder a mudanças de temperatura do meio. Eles podem ser empregados em diferentes áreas, como na liberação controlada de fármacos e/ou moléculas (MUNICOY et al., 2020; RUIZ; RAMIREZ; MCENNIS, 2022), na engenharia de tecidos (KNIPE; PEPPAS, 2014; MIAO et al., 2016), em superfícies inteligentes (SHEN et al., 2015; WISCHERHOFF et al., 2011), entre outros. Nos polímeros termorresponsivos, a uma dada temperatura, ocorre uma transição de fase ( $T_{cp}$ ), resultante de uma mudança no estado de solvatação deste polímero em um determinado solvente. Dependendo do polímero, um dos dois tipos de transição pode ser observado (FIGURA 15): i) o polímero torna-se insolúvel com o aumento da temperatura, apresentando a chamada temperatura crítica inferior de solução (*Lower Critical Solution Temperature* – LCST); ii) o polímero torna-se solúvel com o aumento da temperatura, apresentando a chamada temperatura crítica superior de solução (*Upper Critical Solution Temperature* – UCST) (CLARK; LIPSON, 2012; SEURING; AGARWAL, 2013; ZHANG et al., 2017). Os polímeros responsivos mais estudados costumam apresentar a temperatura de transição na faixa entre  $30$  e  $40^{\circ}\text{C}$ , visando aplicações médicas e/ou farmacêuticas (GANDHI et al., 2015). O interesse nestes polímeros está no fato da faixa de temperatura em que ocorre a transição ser próxima a temperatura fisiológica do corpo humano (a qual é aproximadamente  $37^{\circ}\text{C}$ ).

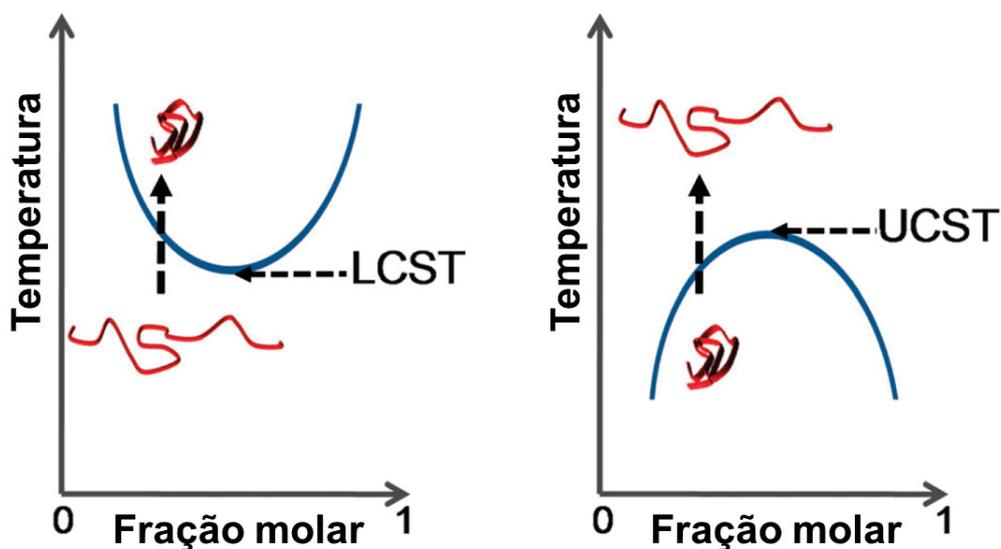


FIGURA 15 - Esquema mostrando as transições de fase (LCST e UCST) que um polímero pode apresentar devido ao seu comportamento termorresponsivo. A linha azul dos diagramas representa o limite de separação de fase, o qual produz o ponto de nuvem (do inglês, cloud point) em solução. Fonte: Adaptado de (GIBSON; O'REILLY, 2013).

Durante o processo de transição de fase há um balanço entre o aumento de entropia (aumento do número de microestados possíveis para esse sistema) e a mudança de entalpia do sistema. Com a transição do polímero de uma fase para outra, como no caso da transição *coil-to-globule*, normalmente é observado um aumento na entropia. Isso ocorre, pois, a transição leva ao aumento da aleatoriedade desse sistema, permitindo uma maior liberdade de movimento das cadeias poliméricas. Enquanto a entalpia está relacionada à formação e rompimento de ligações intermoleculares (FRENKEL, 1999; KANTARDJIEV; IVANOV, 2020; KAUFMAN, 2018). No caso dos polímeros termorresponsivos, a transição de fase é frequentemente conduzida por mudanças nas ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e/ou interações eletrostáticas, entre cadeias poliméricas e do polímero com o solvente. Em uma transição do tipo *coil-to-globule* a mudança na entalpia pode ser associada com a quebra de ligações de hidrogênio na conformação estendida e formação de novas interações intermoleculares na conformação colapsada do polímero (DAHANAYAKE; DORMIDONTOVA, 2021; LI et al., 2015).

Para os polímeros que possuem LCST, abaixo da temperatura de transição a estrutura se encontra relaxada e apresenta boa solubilidade no solvente. Com o aumento da temperatura (acima da temperatura de transição), as interações polímero-polímero passam a ser mais intensas, levando ao enovelamento das cadeias e à expulsão do solvente da estrutura polimérica, tornando o sistema bifásico (SIMMONS, 2009). A agregação das cadeias

poliméricas, resultante das interações hidrofóbicas, leva à precipitação do polímero, fato este que pode ser observado macroscopicamente por meio da turbidez da solução.

## 2 OBJETIVOS

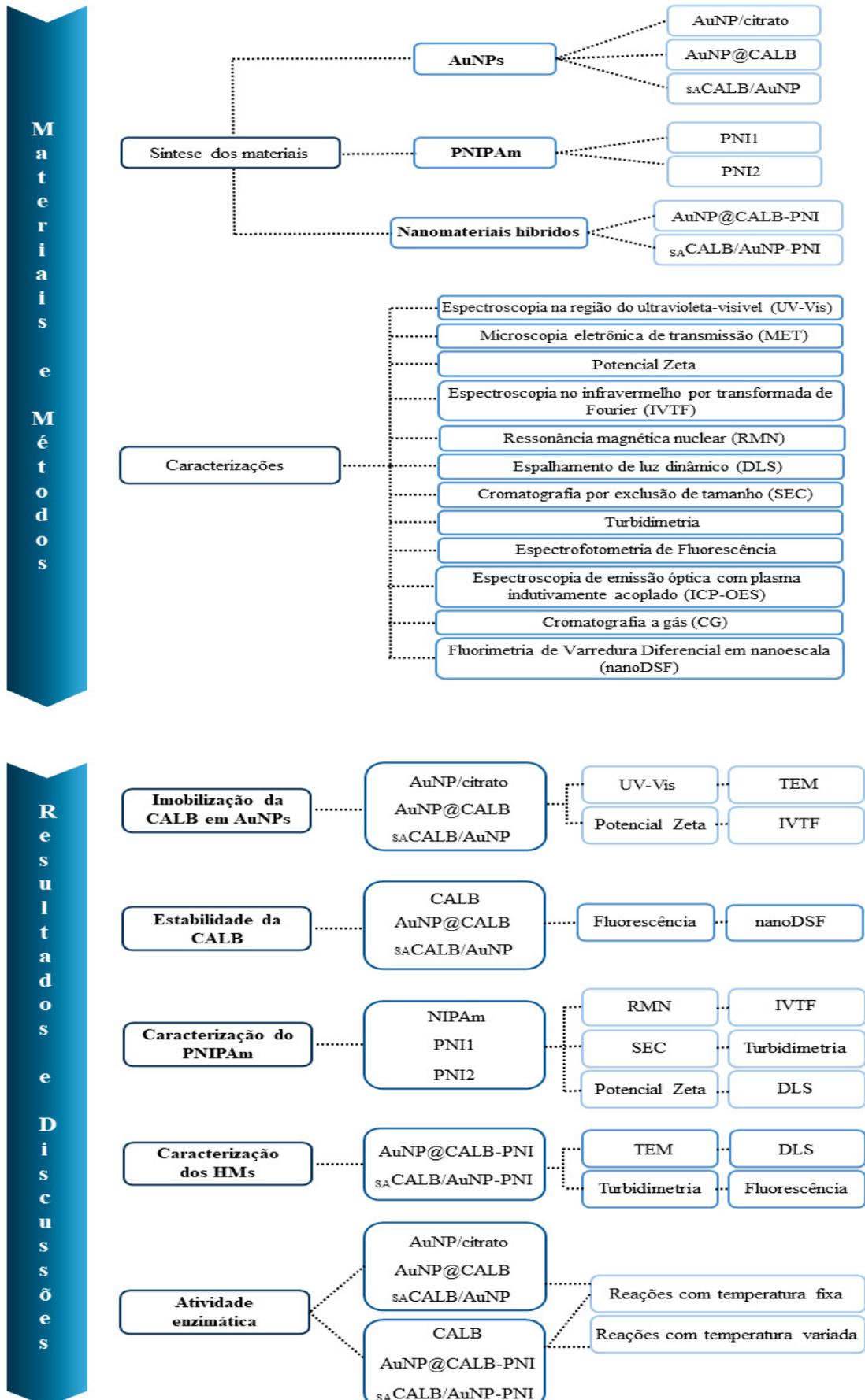
### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Obtenção de um bionanomaterial híbrido (composto de AuNP, CALB e o polímero PNIPAm), que seja responsivo à temperatura e cujas propriedades físico-químicas sirvam para a regulação para atividade de uma enzima modelo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização das AuNP esféricas, obtidas por síntese química, para uso como suporte da enzima CALB.
- Síntese do polímero termorresponsivo PNIPAm, utilizando o método de polimerização via formação de radicais.
- Caracterizar o polímero PNIPAm por meio de técnicas que evidenciem sua formação e que permitam determinar as propriedades do polímero.
- Avaliar o efeito da temperatura no material híbrido, quanto às mudanças no valor da LCST e comparar com os resultados obtidos para o PNIPAm.
- Avaliar a atividade da enzima CALB imobilizada nas nanopartículas e comparar com a sua forma livre.
- Avaliar o efeito da temperatura na disponibilidade da lipase no material proposto, avaliando a ocorrência da lipase protegida/desprotegida pelo polímero.
- Avaliação das diferentes formas de funcionalizar as AuNP, tanto quanto ao método de inserção da CALB, quanto pelo uso do PNIPAm.

## FLUXOGRAMA



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

A solução de  $\text{HAuCl}_4$  ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi preparada a partir da diluição de  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma-Aldrich, 30% em  $\text{HCl}$  diluído) em quantidade adequada de água Milli-Q ( $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ). Os compostos utilizados para a redução do precursor de ouro (citrato de sódio, ácido tânico,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaBH}_4$ ) foram preparados em água Milli-Q, para obter as concentrações desejadas. Foi utilizada a lipase de *Candida antarctica* (CALB) (Sigma-Aldrich, L3170) sem nenhuma purificação prévia. Em todos os casos as amostras de CALB foram diluídas em solução tampão fosfato-salino (PBS) ( $\text{NaCl } 140 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KCl } 27 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  tampão fosfato; pH 7,2) ou água Milli-Q. O monômero N-isopropilacrilamida (Sigma Aldrich, 97%) foi inicialmente purificado por um processo de recristalização, utilizando hexano como solvente e seco à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  antes de ser utilizado na polimerização. Durante as sínteses dos polímeros foram utilizadas água de grau Milli-Q ( $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) e água destilada. Para purificação do polímero após a síntese, foi realizada diálise utilizando uma membrana de diálise Spectra/Por® com  $\text{MWCO}=2000$  ou  $\text{MWCO}=6000-8000$  (molecular weight cut-off).

#### 3.2 SÍNTESE DOS MATERIAIS

##### 3.2.1 Síntese das AuNP

Dois métodos distintos foram empregados na síntese das AuNP, nos quais foram variadas as condições de síntese das nanopartículas, como temperatura, agente redutor e agente estabilizante, descritas abaixo. Com isso, foi possível comparar as características das AuNP formadas e a interação entre as nanopartículas e a enzima.

##### 3.2.1.1 Síntese das AuNP estabilizadas por citrato de sódio (AuNP/citrato)

Foi seguido o protocolo de redução do ouro por uma solução redutora descrito por Piella *et al* (PIELLA; BASTÚS; PUNTES, 2016). Em um reator de vidro (50 mL) conectado a um banho termostático foi preparada uma solução redutora, contendo citrato de sódio ( $15 \text{ mL}$ ;  $2,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ácido tânico ( $5 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ). O sistema foi mantido sob agitação magnética e aquecido até  $70^\circ\text{C}$  com o auxílio do banho termostático. Quando a temperatura de  $70^\circ\text{C}$  foi atingida, uma solução de  $\text{HAuCl}_4$  ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi adicionada ao meio reacional e a reação foi mantida por 10 min. A formação das AuNPs é observada pela mudança de cor da dispersão de transparente para vermelho.

Parte do material obtido foi utilizado para a adsorção da CALB à superfície e o restante foi armazenado para posterior caracterização. A concentração de AuNPs foi de  $1 \text{ nmol L}^{-1}$  que é equivalente a  $6 \times 10^{14}$  partículas  $\text{L}^{-1}$ , determinado por ICP-OES.

### 3.2.1.2 Adsorção da CALB em AuNP/citrato (Preparo das partículas AuNP@CALB)

A adição da enzima CALB às nanopartículas estabilizadas por citrato de sódio (sintetizadas previamente) seguiu o protocolo descrito por Barros *et al.* (BARROS et al., 2019). Em um béquer foram adicionados 2 mL das AuNP estabilizadas por citrato de sódio e uma solução contendo a enzima CALB (2 mL; 0,1% v/v). A reação foi mantida sob agitação magnética a  $25^\circ\text{C}$  e por 30 min para garantir a adsorção da CALB à superfície das AuNP. O material foi armazenado para posterior caracterização. Para as amostras AuNP@CALB utilizadas nas reações enzimáticas a concentração utilizada foi de 3  $\mu\text{L}$  (da solução comercial) por mL de dispersão de AuNP, a fim de obter a mesma concentração da síntese de  $_{\text{SA}}\text{CALB}/\text{AuNP}$ . A purificação do material foi obtida por meio de centrifugação a  $12100 \times g$  por 30 min. A concentração final das AuNPs foi determinada por ICP-OES como sendo igual a  $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$ , o que equivale a  $3 \times 10^{14}$  partículas  $\text{L}^{-1}$ .

### 3.2.1.3 Síntese das AuNP estabilizadas por CALB ( $_{\text{SA}}\text{CALB}/\text{AuNP}$ )

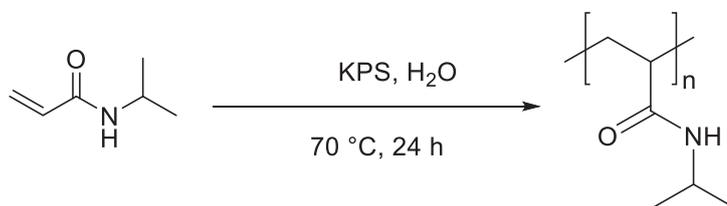
O procedimento seguido foi adaptado de síntese desenvolvida anteriormente pelo nosso grupo (BARROS et al., 2016). Em um balão de fundo redondo (25 mL) foram adicionados 10 mL de solução de tampão fosfato-salino (PBS) e  $\text{HAuCl}_4$  (150  $\mu\text{L}$ ; 25 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). O meio reacional foi mantido sob agitação magnética a  $25^\circ\text{C}$ . Em seguida, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  da enzima CALB pura. Por fim, foi adicionado o agente redutor  $\text{NaBH}_4$  (10  $\mu\text{L}$ ; 1 mol  $\text{L}^{-1}$ ). A reação foi mantida por 10 min para garantir a formação das nanopartículas e a adsorção da CALB à superfície das AuNP. A purificação do material foi obtida por meio de centrifugação a  $12100 \times g$  por 30 min. A concentração final de AuNPs foi de  $2 \text{ nmol L}^{-1}$  que equivale a  $1,2 \times 10^{15}$  partículas  $\text{L}^{-1}$ , determinado por ICP-OES.

### 3.2.2 Síntese do polímero poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAm)

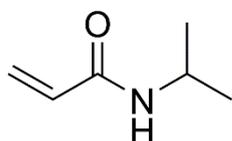
Foram seguidos dois métodos distintos (denominados sínteses A e B) para obtenção do polímero PNIPAm (PNI1 e PNI2), apresentadas abaixo. As sínteses variaram quanto à temperatura, quantidade de monômero utilizada, tempo de reação e utilização de acelerador.

## 3.2.2.1 Síntese A

A síntese seguiu o procedimento descrito na literatura (CAO-LUU et al., 2019). Em um balão de uma boca (100 mL) foram adicionados 5 g de água. Em seguida, foi acoplado um condensador de refluxo e o sistema foi mantido sob uma atmosfera de N<sub>2</sub> para evitar a interferência do oxigênio na polimerização. Foram adicionados ao balão o monômero *N*-isopropilacrilamida (NIPAm; 0,5 g; 0,867 mol L<sup>-1</sup>) purificado e 0,02 g do iniciador persulfato de potássio (KPS). A reação foi mantida por 24 h a 70°C com o auxílio de um banho de óleo. A solução obtida foi lavada com água a 50°C (acima da LCST do polímero) para eliminar monômero e iniciador remanescentes na solução. O produto seco (denominado PNI1) foi obtido por meio de secagem em forno à temperatura de 50°C (CAO-LUU et al., 2019).

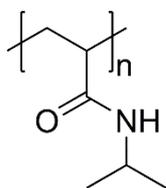


ESQUEMA 1 – Síntese do polímero PNIPAm pelo método descrito na síntese A.

C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NOM.M. 113,16 g mol<sup>-1</sup>***N*-isopropilacrilamida**

**RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz, D<sub>2</sub>O, TMS), δ (ppm): 1,17 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H); 3,99 (sept, 1H); 5,73 (dd, *J* = 8,5; 3,2 Hz, 1H); 6,18 (t, *J* = 1,5 Hz, 1H); 6,23 (s, 1H)

**RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 21,3; 41,8; 126,8; 130,3; 167,4

[C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO]<sub>n</sub>M.M. 1,05 × 10<sup>6</sup> g mol<sup>-1</sup>**Poli(*N*-isopropilacrilamida)**

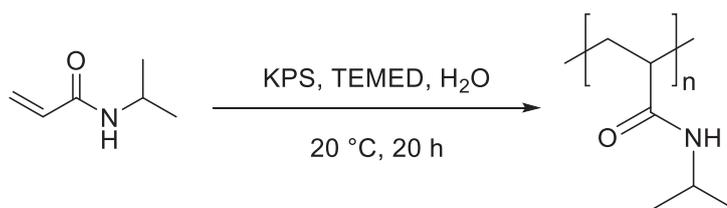
Rendimento: 78%, sólido branco

**RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz, D<sub>2</sub>O, TMS), δ (ppm): 1,20 (s, 6H); 1,64 (s, 2H); 2,07 (s, 1H); 3,95 (s, 1H)

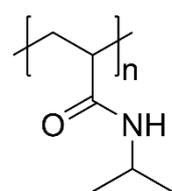
**RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 21,6; 41,8; 175,4

### 3.2.2.2 Síntese B

A síntese B seguiu um procedimento descrito na literatura (HARAGUCHI; XU, 2012). Em um balão de duas bocas (250 mL) foram adicionados água (95 mL), o monômero NIPAm (0,1073 g;  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ), iniciador persulfato de potássio (5 mL;  $3,7 \times 10^{-4} \text{ mol}$ ) e o acelerador *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED) ( $5,34 \times 10^{-4} \text{ mol}$ ). O meio foi inicialmente preparado em um banho de gelo e, com o aumento da temperatura para  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , o processo de polimerização foi iniciado e mantido por 20 h, também sob atmosfera de  $\text{N}_2$ . A quantidade de monômero utilizado na síntese B foi escolhida de modo a não ultrapassar  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$  para evitar a formação de gel, como relatado por (XU; LI; HARAGUCHI, 2010). A purificação do produto foi obtida por meio do processo de diálise, realizado por quatro dias e cujo progresso foi acompanhado por espectroscopia no UV-Vis. Por fim, para obter o material seco (denominado PNI2) foi realizada liofilização por 48 h do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.



ESQUEMA 2 - Síntese do polímero PNIPAm pelo método descrito na síntese B.



#### Poli(*N*-isopropilacrilamida) – PNI2

Rendimento: 95%, sólido branco

**RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 1,00 (s, 6H);  
1,42 (s, 2H); 1,86 (s, 1H); 3,75 (s, 1H)

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 21,6; 41,8; 175,2

**IV** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3076, 2976, 2937, 2877, 1650, 1548, 1459,  
1388, 1368, 1172, 1130

### 3.2.3 Formação do nanomaterial híbrido

A adição do polímero às nanoestruturas de AuNP funcionalizadas com CALB foi adaptado de um procedimento descrito na literatura (GARCIA-HERNANDEZ et al., 2019). Em um béquer, 1 mL de amostra ( $s_{\text{A}}\text{CALB}/\text{AuNP}$  ou  $\text{AuNP}@\text{CALB}$ ) foi adicionado gota a gota à solução aquosa contendo PNIPAm, sob agitação e a temperatura ambiente. A reação

foi mantida por 1 h a 25 °C. O PNIPAm utilizado para a elaboração dos MHs foi apenas o PNI2 e a concentração na solução final foi de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Os nanomateriais híbridos formados foram denominados *s*<sub>A</sub>CALB/AuNP-PNI e AuNP@CALB-PNI. O material híbrido purificado foi obtido por centrifugação a 6025 × g por 15 min.

### 3.3 CARACTERIZAÇÕES

#### 3.3.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Para a caracterização das AuNPs foi analisado o perfil de absorção da banda LSPR, que para as AuNP que ocorre em torno de  $\lambda = 520$  nm. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Agilent Cary 60 no Departamento de Química da UFPR. Para a avaliação da estabilidade das dispersões após 6 meses, as amostras foram mantidas refrigeradas (~ 4 °C) até a análise.

#### 3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para as amostras contendo AuNP uma alíquota das amostras (~10 µL) foram depositadas em grades de cobre e deixadas secar ao ar. As análises foram realizadas utilizando um microscópio JEOL 1200EX-II, operando a 80 kV ou 120 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica (CME/UFPR), e no IQ-USP utilizando um equipamento JEOL JEM 2100, operando com tensão de 200 kV. O tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas foram determinados utilizando o software ImageJ.

#### 3.3.3 Potencial Zeta

Os valores de potencial zeta foram obtidos por meio da medida da mobilidade eletroforética das partículas, utilizando a equação de Henry (equação 3).

$$U_E = \frac{2\epsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Equação 3})$$

Na qual  $\zeta$  é o potencial zeta,  $U_E$  é a mobilidade eletroforética,  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio,  $\eta$  é a viscosidade da amostra e  $f(ka)$  é a chamada função de Henry, que está relacionado com a espessura da dupla camada elétrica e ao raio da partícula. Como todas as amostras que medidas foram preparadas em água, foi utilizada a aproximação de Smoluchowski ( $f(ka) = 1,5$ ), que é a mais adequada quando as amostras analisadas estão em um meio polar. As análises foram realizadas a 25°C e 40 °C, utilizando os valores de 1,333

para o índice de refração e 78,2 para a constante dielétrica. As medidas foram realizadas nos equipamentos Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) no Departamento de Química da UFPR e Zetasizer LAB (Malvern Panalytical) no Departamento de Química da UFSM, utilizando amostras com  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de concentração. Foram utilizadas células do tipo DTS1070 e os valores de potencial zeta foram determinados pela média de 3 medidas para cada amostra.

### 3.3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Vertex 70 (Bruker), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) com 1% (m/m) de amostra. As análises foram realizadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , em janela de número de onda de 4000 a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando 32 acumulações e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Todas as medidas foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

### 3.3.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker DPX200 de 4,7 Tesla, operando em 200 MHz para o núcleo de hidrogênio e 50 MHz para o de carbono. As medidas foram realizadas no Departamento de Química da UFPR. Os valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram expressos em relação ao solvente  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta_{\text{D}_2\text{O}} = 4,80$ ) ou do TMS ( $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ) como referência. Os deslocamentos ( $\delta$ ) nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram expressos em relação ao TMS ( $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ) ou ao clorofórmio ( $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,2$ ). Os dados de RMN foram relatados segundo o deslocamento químico (em ppm), a multiplicidade dos sinais (s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, sept = septeto, m = multiplete) e a constante de deslocamento (Hz). Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram relatados segundo o deslocamento químico em ppm.

### 3.3.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para as medidas de DLS, foi preparada uma dispersão polimérica com concentração de 0,5% (m/m) de PNI2, preparada em água destilada (filtrada previamente em membrana de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ ). A amostras foi então filtrada em membrana de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  para evitar que contaminantes e agregados prejudicassem as análises. As análises foram realizadas no Nano S90 (Malvern Panalytical) no Max Planck Institute for Polymer Research (MPIP). Foi utilizada uma célula ZEN040, 1,333 como índice de refração, comprimento de onda de 632,8

nm e ângulo de 173°. As medidas foram realizadas em triplicata e cada amostra foi analisada em diferentes temperaturas (entre 20 e 40°C). Para garantir o equilíbrio de temperatura da amostra foi definido um tempo de equilíbrio de 3 min antes de cada medida. Amostras com concentração de 0,5% (m/m) dos materiais híbridos (AuNP@CALB-PNI e  $S_{A}CALB/AuNP$ -PNI) foram analisadas por DLS. As análises foram realizadas em diferentes temperaturas (entre 20 °C e 40 °C), utilizando ângulos de 13° e 173° e comprimento de onda de 632,8 nm. As análises foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) no Departamento de Farmácia da UFPR. Medidas de DLS foram realizadas em equipamento de espalhamento de luz multiângulo (*Brookhaven Instruments*) com goniômetro BI-200SM e  $\lambda = 632,8$  nm no Centro de Ciências Naturais e Exatas da UFSM.

### 3.3.7 Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)

Para determinação da massa molar dos produtos PNI1 e PNI2 foi realizada a análise de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). As análises foram realizadas no laboratório Biopol do Departamento de Química da UFPR em um equipamento Viscotek com sistema múltiplo de detecção, operando com coluna Shodex SB-806M HQ e empregando o poli(óxido de etileno) (PEO - 24200 Da) como amostra padrão de massa conhecida. As amostras foram preparadas na concentração 0,50 mg mL<sup>-1</sup> e as análises foram realizadas a 20°C. A amostra PNI2 também foi analisada por esta técnica em equipamento contendo detector MALS (*multiangle light scattering*) no *Max Planck Institute for Polymer Research* (MPIP).

### 3.3.8 Turbidimetria

Para determinar a temperatura de transição ( $T_{cp}$ ) do PNIPAm foram realizadas medidas de turbidimetria para as amostras PNI1 e PNI2 com concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Cada amostra foi acompanhada durante 2 ciclos de aquecimento-resfriamento, na faixa de temperatura entre 20 e 40°C, com incrementos de 0,5°C (durante o primeiro ciclo) e 1,0°C (durante o segundo ciclo). Posteriormente foram realizadas medidas de turbidimetria para PNI2 com diferentes concentrações de polímero. Medidas de turbidimetria para as amostras  $S_{A}CALB/AuNP$ -PNIPAm e AuNP@CALB-PNIPAm foram realizadas com o intuito de observar se haveria influência das AuNP e CALB sobre o  $T_{cp}$  do polímero. As amostras foram acompanhadas durante um ciclo de aquecimento-resfriamento, na faixa de temperatura entre 20 e 40°C, com incremento de 0,5°C (entre 25 e 35°C) e 1,0°C (no restante

do intervalo). Em todos os casos as amostras foram preparadas com concentração de 0,1 wt% em água destilada. Todas as medidas foram realizadas em  $\lambda = 600$  nm. Para o controle da temperatura, foram utilizados dois acessórios Peltier PCB1500 (resfriamento) e PTP (aquecimento). As análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR em um espectrofotômetro UV-VIS-NIR Lambda 1050 da Perkin Elmer. A avaliação da concentração da solução na T<sub>cp</sub> do polímero foi avaliada por este mesmo método em um espectrofotômetro Agilent Cary 60 com controle de temperatura feito por Peltier PCB1500 no Max Planck *Institute for Polymer Research* (MPIP).

### 3.3.9 Espectrofotometria de fluorescência

A investigação das diferenças no espectro de emissão de fluorescência da CALB foi realizada utilizando a fluorescência do aminoácido triptofano (Trp), o qual costuma apresentar uma banda característica de emissão com  $\lambda_{\text{máx}}$  que pode ocorrer entre 308 nm e 355 nm (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; VIVIAN; CALLIS, 2001). O aminoácido Trp foi excitado em 280 e 295 nm e o espectro foi obtido para a faixa entre 300 e 500 nm. As análises foram realizadas com dois tamanhos de cubetas de quartzo, com caminho óptico 4x10 mm e 10x10 mm.

Em alguns casos, podem estar presentes na amostra partículas que absorvam no mesmo comprimento de onda de excitação, levando a um espectro de emissão que pode não corresponder a realidade da amostra. Para corrigir o espectro nestes casos, utiliza-se a correção de filtro interno (equação 4) (WEITNER; FRIGANOVIC; ŠAKIĆ, 2022).

$$F = F_0 \cdot 10^{(A_{ex} \cdot l_{ex})} \cdot 10^{(A_{em} \cdot l_{em})} \quad (\text{Equação 4})$$

Na qual  $F_0$  e  $F$  são a fluorescência adquirida e corrigida, respectivamente,  $A_{ex}$  e  $A_{em}$  são as absorbâncias de excitação e emissão no mesmo  $\lambda$ , e  $l_{ex}$  e  $l_{em}$  são os respectivos caminhos ópticos em centímetros. A abertura de fenda utilizada foi de 5 nm. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse Varian no Instituto de Física da USP e no Centro de Ciências Naturais e Exatas da UFSM.

### 3.3.10 Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

A técnica de ICP-OES foi utilizada para realizar a quantificação de ouro nas amostras, as quais foram calculadas a partir de uma curva analítica em diferentes

concentrações (em mg L<sup>-1</sup>) de ouro. Para obter a concentração de AuNPs nas dispersões, foi utilizado além da concentração de ouro obtida por ICP-OES, o diâmetro médio das AuNPs determinado pelo software Image J com base nas imagens obtidas por MET. Como as partículas sintetizadas são esféricas, foi utilizada a fórmula do volume uma esfera (equação 5), na qual R é raio da AuNP, para calcular o volume de uma AuNP. Multiplicando o valor encontrado pela densidade do ouro (19,3 g cm<sup>-3</sup>) é encontrada a massa de ouro contida em uma AuNP ( $m_{np}$ ), como mostrado na equação 6. A concentração de nanopartículas L<sup>-1</sup> é obtida multiplicando o valor de  $m_{np}$  e a concentração de ouro (em mg L<sup>-1</sup>) obtida por ICP-OES. Por fim, a concentração de AuNPs em mol L<sup>-1</sup> foi determinada pela relação deste valor e o número de Avogadro (LUKACH, 2015). As análises de ICP-OES foram realizadas em um espectrofotômetro iCAP 6500 (Thermo Fischer Scientific) no Departamento de Química da UFPR.

$$Volume = \frac{4}{3} \pi R^3 \quad (Equação 5)$$

$$m_{np} = \rho_{Au} \cdot V_{np} \quad (Equação 6)$$

### 3.3.11 Cromatografia a gás (CG)

As reações enzimáticas foram acompanhadas por cromatografia em fase gasosa, com injeção de 1 µL de amostra, utilizando um cromatógrafo Shimadzu GC-17A com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada uma coluna aquiral DB-1, com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro. As reações com mudança de temperatura foram acompanhadas em um equipamento GC-MS Shimadzu TQ8040A, utilizando uma coluna DB 5MS (5% fenilmetilpolisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno. A fim de observar a separação entre os picos correspondentes ao 1-feniletanol e o acetato de 1-feniletila foi criada uma rampa de temperatura de 100 °C a 115 °C, com taxa de aquecimento de 2 °C min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor e do detector foram de 220 °C. Todas as análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

### 3.3.12 Fluorimetria de Varredura Diferencial em nanoescala (nanoDSF)

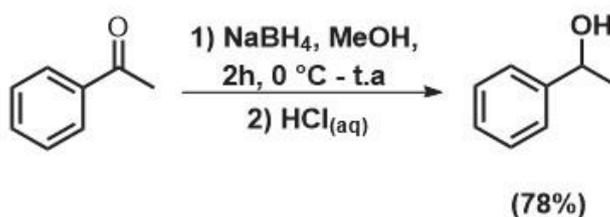
Com a finalidade de avaliar a estabilidade da enzima CALB com a temperatura, foi realizado o ensaio de nanoDSF, no qual a amostra é submetida a um gradiente de temperatura, na forma de uma curva de aquecimento/resfriamento. Este método avalia a

fluorescência de aminoácidos presentes na enzima e é capaz de determinar como a estrutura tridimensional da proteína é afetada pela temperatura, se esse processo é reversível, e em caso negativo, permite determinar a temperatura de desnaturação da proteína (LISINA et al., 2023). Para o estudo da estabilidade da CALB a análise foi realizada utilizando uma rampa de temperatura entre 20 °C e 95 °C, com incrementos de 0,05 °C. Esta análise foi realizada no equipamento Prometheus NT.84 (*NanoTemper Technologies*) no Max Planck Institute for Polymer Research (MPIP).

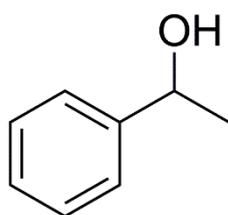
### 3.4 REAÇÕES ENZIMÁTICAS

#### 3.4.1 Síntese química do 1-feniletanol

A reação de redução da acetofenona para obtenção do 1-feniletanol (foi adaptada do procedimento da literatura (ESQUEMA 3) (GÓMEZ, 2014). Em um balão de 250 mL foram adicionados a acetofenona (12,0 g; 100 mmol) e 100 mL de metanol. O meio reacional foi resfriado até 0 °C com o auxílio de um banho de gelo e então, foi adicionado o redutor  $\text{NaBH}_4$  (4,1 g; 110 mmol) em pequenas porções. Após a adição do  $\text{NaBH}_4$ , a temperatura foi elevada até a temperatura ambiente para que a reação ocorresse. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), na qual é possível diferenciar as bandas referentes a acetofenona e ao 1-feniletanol. Após 2 h de reação não foi mais observado o sinal da acetofenona, sendo constatado que todo o material de partida havia sido consumido. O solvente foi então evaporado em um rotaevaporador e foi adicionada solução de HCl até que o pH 6 fosse atingido. Foi feita a extração com DCM, em seguida foi adicionado  $\text{MgSO}_4$  para secar a solução, o material foi filtrado e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto obtido foi analisado por RMN, onde foi constatado que não seria necessário realizar outro processo para purificação do álcool.



ESQUEMA 3 - Síntese do 1-feniletanol.



$C_8H_{10}O$

M.M. 122,17 g mol<sup>-1</sup>

### 1-feniletanol

Rendimento: 78%, líquido amarelado

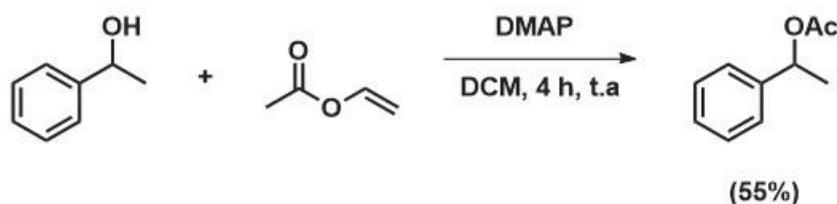
**RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 1,50 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 1,99 (s, 1H); 4,90 (q, *J* = 6,5 Hz, 1H); 7,20-7,40 (m, 5H)

**RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 25,2; 70,5; 125,5; 127,6; 128,6; 145,8

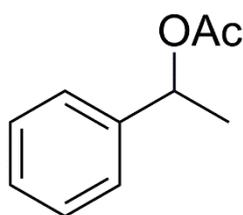
**IV** (cm<sup>-1</sup>): 3348, 3086, 3030, 2974, 2928, 2880, 1951, 1810, 1604, 1494, 1451, 1369, 1302, 1203, 1098, 1075, 1030, 1010, 996, 900, 759, 697

#### 3.4.2 Síntese química do acetato de 1-feniletila

A síntese química do éster a partir do respectivo álcool foi adaptada da literatura (THOMAS et al., 2017). Em um balão de 250 mL foi adicionado o 1-feniletanol (2,44 g, 20 mmol), acetato de vinila (3,8 mL, 40 mmol), DMAP (1 cristal) e DCM (100 mL). O meio reacional foi deixado a temperatura ambiente e sob agitação magnética. O progresso da reação foi acompanhado por CCD e após 4 h de reação concluiu-se que todo o álcool havia sido consumido. O meio reacional foi então filtrado em sílica, utilizando DCM como eluente e posteriormente o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Após analisar o produto por RMN, foi constatada a presença de contaminante e o produto foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna, na qual a fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano/acetato de vinila (9:1).



ESQUEMA 4 – Síntese química do acetato de 1-feniletila.



$C_{10}H_{12}O_2$

M.M. 164,08 g mol<sup>-1</sup>

### Acetato de 1-feniletila

Rendimento: 55%, líquido translúcido

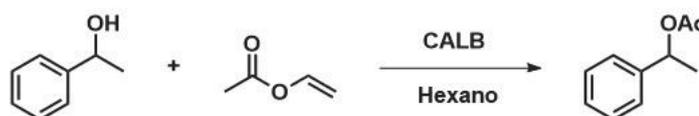
**RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 1,53 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 2,01 (s, 3H); 5,88 (q, *J* = 6,6 Hz, 1H); 7,25-7,40 (m, 5H)

**RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 21,4; 22,2; 72,3; 126,2; 128,0; 128,6; 141,7; 170,4

**IV** (cm<sup>-1</sup>): 3088, 3064, 3034, 2983, 2935, 1737, 1494, 1451, 1372, 1242, 1211, 1064, 1024, 943, 762, 699

### 3.4.3 Reação de acilação do 1-feniletanol

Em um vial foram adicionados 1-feniletanol (0,012 g, 0,1 mmol), acetato de vinila (0,034 g, 0,4 mmol) e hexano (1 mL) (ESQUEMA 5). Os vials foram colocados em um suporte com controle de temperatura e sob agitação magnética. Em seguida, 50 μL de amostra contendo a enzima CALB (1 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados a cada vial e a reação foi monitorada por até 24 h. A concentração de CALB nas amostras foi determinada indiretamente por meio de medidas de espectroscopia no UV-Vis. Tendo uma curva de calibração para várias concentrações de CALB foi possível calcular a concentração de CALB no sobrenadante das amostras após a centrifugação. Isso permitiu estimar a concentração da CALB imobilizada nas AuNPs. Também foram realizadas reações sem a presença da CALB (controle). Esta reação trata-se de uma resolução cinética de um racemato, na qual envolve cada enantiômero interage de maneira distinta com a enzima. Como resultado, obtém-se um produto enantiomericamente puro, mas com conversão limitada a 50% (KIRILIN et al., 2010). Em intervalos determinados, alíquotas foram retiradas do meio reacional e injetadas no cromatógrafo para acompanhar o progresso da reação. O cálculo da conversão de produto foi feito comparando-se os valores obtidos com uma curva de calibração construída utilizando 7 concentrações diferentes de acetato de 1-feniletila. O cromatograma do 1-feniletanol e acetato de 1-feniletila (Figura S15) é mostrado no material suplementar.



ESQUEMA 5 - Síntese do acetato de 1-feniltila catalisada por CALB.

Para avaliar o efeito da temperatura tanto na estabilidade da enzima quanto na sua disponibilidade (para as amostras do material híbrido), e como isso afetaria a cinética da reação, a reação de acilação do 1-feniletanol foi realizada em diferentes temperaturas, que variaram entre 0 °C e 65 °C. Para avaliar o comportamento responsivo e reversível do PNIPAm nas amostras de material híbrido, e como isso afetaria a reação, também foi realizada a mesma reação com mudança de temperatura (entre 25 °C e 45 °C).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA CALB EM NANOPARTÍCULAS DE OURO

Foram seguidos 2 protocolos para obtenção das AuNP, nos quais foram utilizados agentes redutores e estabilizantes distintos, a fim de comparar as propriedades das AuNPs formadas e sua interação com a CALB. A interação entre as AuNPs e uma enzima é um processo complexo, podendo ser influenciado por diversos fatores. Quando a enzima CALB é adsorvida na superfície da AuNP, os grupos tiol (-SH) presentes nos resíduos cisteína da enzima podem formar ligações covalentes com o ouro presente na superfície. A força e estabilidade deste tipo de interação contribui para uma resistente adsorção da enzima na superfície da nanopartícula. Além disso, os grupos amino e carboxila presentes nos resíduos de aminoácidos da enzima podem estar envolvidos nas interações entre a enzima e a superfície das AuNPs (BARROS et al., 2021). Interações como forças de van der Waals e eletrostática e interações hidrofóbicas podem contribuir para a interação entre a enzima e a AuNP (BARROS et al., 2019; CÁRDENAS et al., 2006; REIMERS et al., 2017; ZHU et al., 1999).

Em uma das sínteses foi utilizado citrato de sódio como agente estabilizante, metodologia bastante empregada, por levar a formação de AuNPs esféricas e com controle de tamanho (DANIEL; ASTRUC, 2004; PIELLA; BASTÚS; PUNTES, 2016). As partículas obtidas por esta síntese foram nomeadas como AuNP/citrato. Em uma segunda etapa, a CALB foi adicionada as AuNP/citrato, levando a formação das partículas nomeadas como AuNP@CALB. Alternativamente, foi seguido um outro procedimento para a síntese de AuNPs, o qual utilizou a CALB como agente estabilizante, na qual a enzima foi adicionada durante a etapa de formação das AuNPs ( $s_{A}CALB/AuNP$ ).

A caracterização das bandas LSPR foi realizada por meio da análise de espectroscopia no UV-Vis (FIGURA 16(a)), a qual mostrou um perfil característico para nanopartículas esféricas, com  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 510 nm para AuNP/citrato. Para as amostras contendo CALB, AuNP@CALB e  $s_{A}CALB/AuNP$ , apresentaram deslocamento para  $\lambda$  maiores, 519 nm e 526 nm, respectivamente. Essas diferenças no  $\lambda_{m\acute{a}x}$  confirmam a presença da CALB na superfície da AuNP, visto que o perfil de distribuição eletrônica na superfície da nanopartícula foi alterado (BARROS et al., 2019; PIELLA; BASTÚS; PUNTES, 2016). Além disso, a banda LSPR mais larga observada para  $s_{A}CALB/AuNP$  é um indício de que a adsorção da enzima neste caso pode ter ocorrido de forma distinta a das AuNP/CALB (BARROS et al., 2019), podendo levar a mudanças na conformação da enzima. Visto que na

abordagem adotada para  $s_{A}CALB/AuNP$  a CALB foi empregada como agente estabilizante durante a síntese das AuNPs, desempenhando um papel nas fases de nucleação e crescimento das NPs. Por outro lado, na segunda abordagem ( $AuNP@CALB$ ), a estabilização foi alcançada previamente pela utilização do citrato de sódio, a qual possibilitou que a interação ocorresse entre os grupos funcionais da CALB (como os grupos amino) e o citrato presente na superfície das AuNPs. A formação das AuNPs esféricas pode ser observada durante a síntese devido a mudança de cor da solução, passando de incolor para vermelho ou roxo (NJOKI et al., 2007b), normalmente. Na FIGURA 16(b) podem ser observadas as dispersões obtidas para  $AuNP/citrato$ ,  $AuNP@CALB$  e  $s_{A}CALB/AuNP$ .

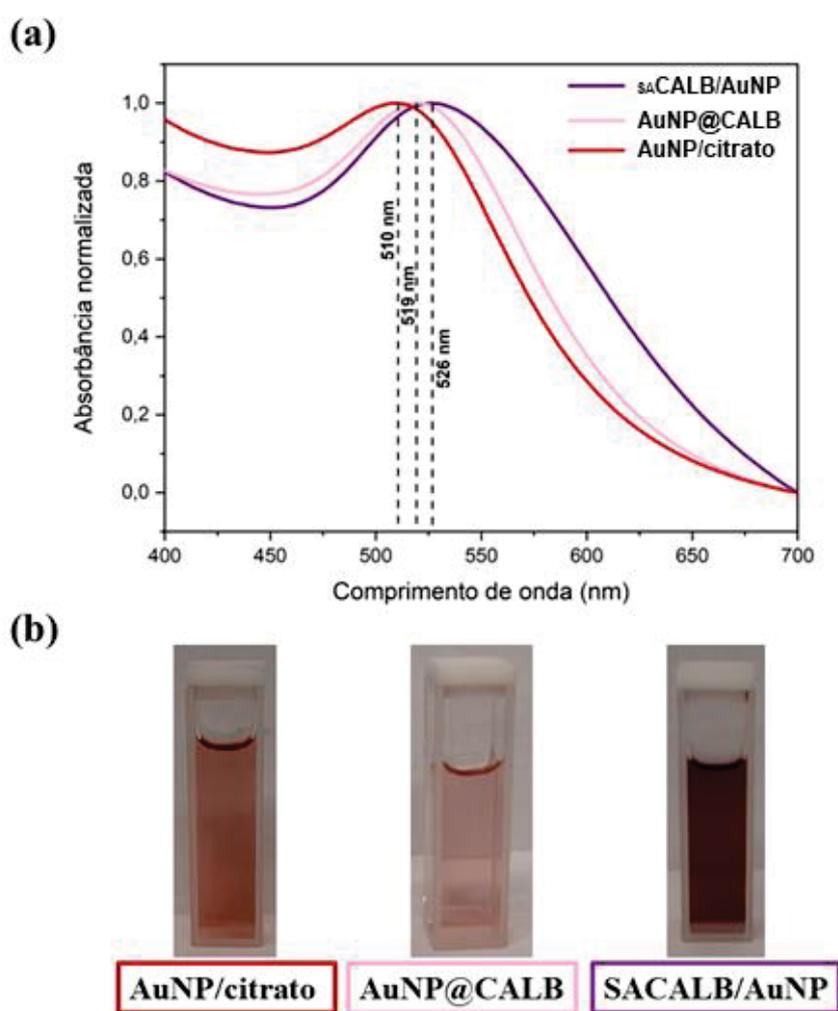


FIGURA 16 - (a) Perfil de absorção das bandas SPR no espectro de UV-Vis para as amostras  $AuNP/citrato$ ,  $AuNP@CALB$  e  $s_{A}CALB/AuNP$  e (b) imagens das três amostras logo após as respectivas sínteses.

As imagens obtidas por MET (FIGURA 17) confirmam que a síntese com citrato de sódio levou a formação de nanopartículas predominantemente esféricas, com tamanho médio de  $5,0 \pm 0,9$  nm ( $AuNP/citrato$ ). Após a adição da CALB foi encontrado um

valor de tamanho médio de  $5,3 \pm 1,3$  nm para AuNP@CALB. Enquanto a síntese das  $s_A$ CALB/AuNP embora também tenha levado a formação de partículas esféricas, apresentou uma quantidade maior de partículas anisotrópicas, mas com tamanho médio das partículas parecido, sendo este de  $4,9 \pm 1,1$  nm. Em termos da polidispersividade das amostras, ambas apresentaram valores em torno de 20%, podendo ser consideradas moderadamente monodispersas. Os valores encontrados estão de acordo com o que já foi relatado para este tipo de síntese (BARROS et al., 2019; PIELLA; BASTÚS; PUNTES, 2016). A ausência de agregados nas imagens da FIGURA 17 denotam que ambos os agentes estabilizantes (citrato de sódio e CALB) escolhidos se mostraram eficientes na estabilização das AuNPs e que a adição da enzima não afetou as propriedades das partículas. Além disso, as duas sínteses propostas, levaram a formação de nanopartículas esféricas com tamanho inferior a 10 nm.

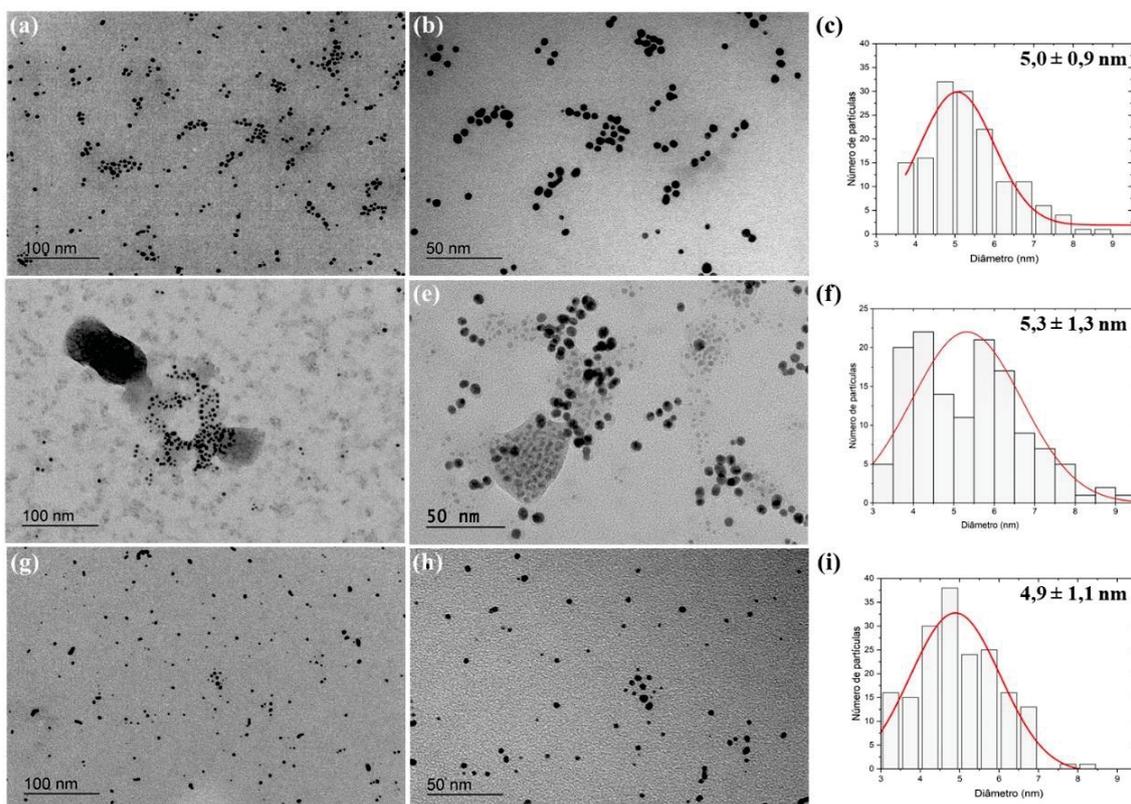


FIGURA 17 - Imagens de MET e histogramas das distribuições de tamanho das amostras (a-c) AuNP/citrato, (d-f) AuNP@CALB e (g-i)  $s_A$ CALB/AuNP.

Para avaliar a estabilidade das dispersões AuNP/citrato, AuNP@CALB e  $s_A$ CALB/AuNP estas foram acompanhadas por UV-Vis e se mostraram relativamente estáveis mesmo 6 meses após as sínteses (Figura S16). Outra forma de avaliar a estabilidade das estruturas formadas e que pode trazer informações sobre a interação enzima-AuNP é a medida de potencial zeta (PZ) destas amostras (FIGURA 18). Para efeito de comparação,

também foi avaliada a enzima CALB livre em solução, a qual apresentou valor de PZ igual a  $-5,3 \pm 0,8$  mV. Para as AuNPs estabilizadas por citrato (AuNP/citrato) o valor foi de  $-45,1 \pm 1,9$  mV, o qual provém dos íons citrato (negativos) presentes da superfície da nanopartícula, e que levam a repulsão entre as nanopartículas, prevenindo que ocorra a formação de agregados (HORSKÁ; ŠEVČÍK; PETR, 2018; SUJITHA; KANNAN, 2013). O potencial para a amostra AuNP@CALB foi de  $-24,2 \pm 1,7$  mV e para  $s_{A}CALB/AuNP$   $-41,5 \pm 1,2$  mV. A redução do valor (módulo) de PZ de  $-45,1 \pm 1,9$  mV (AuNP/citrato) para  $-24,2 \pm 1,7$  mV (AuNP@CALB) demonstra que ocorreu a adsorção da CALB na superfície das AuNP. Comparando os valores de potencial zeta das AuNPs funcionalizadas (AuNP@CALB e  $s_{A}CALB/AuNP$ ) com o da enzima livre, observa-se que ocorreu a adsorção da CALB em ambos os casos. O processo de imobilização da enzima em AuNPs indicam uma maior estabilidade da CALB, visto que os valores de PZ encontrados foram mais negativos ( $-24,2$  e  $-41,5$  mV). As amostras de AuNPs funcionalizadas com CALB foram também analisadas a  $40$  °C, temperatura que está acima da LCST do PNIPAm, para que seja possível fazer a comparação com o material híbrido. O aumento na temperatura resultou em uma pequena redução nos valores de PZ, mostrando que nesta faixa de temperatura esse parâmetro tem pouca influência no valor de potencial para estas estruturas, o que indica que a superfície e as moléculas contidas nela se mantem estáveis com este aumento de temperatura.

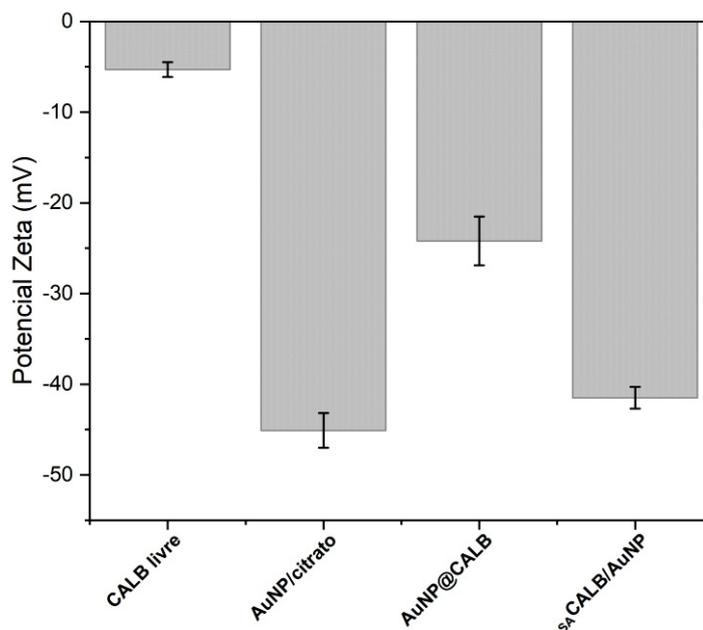


FIGURA 18 - Valores de potencial zeta obtidos para CALB livre, AuNP/citrato, AuNP@CALB e  $s_{A}CALB/AuNP$ .

A fim de estudar as interações entre a CALB e as AuNPs também foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho (FTIR). Na FIGURA 19 são mostrados os espectros de FTIR das AuNPs e dos agentes estabilizantes utilizados (citrato de sódio e CALB). Para o citrato de sódio, as principais bandas que caracterizam esta substância são os estiramentos simétrico ( $1395\text{ cm}^{-1}$ ) e assimétrico ( $1590\text{ cm}^{-1}$ ) do  $\text{COO}^-$ . Quando a citrato de sódio interage com as AuNPs, atuando como agente estabilizantes das nanopartículas, ocorre um deslocamento destas bandas para valores menores de número de onda. A interação entre citrato de sódio e AuNPs faz com que as bandas de estiramento do  $\text{COO}^-$  apareçam em  $1384\text{ cm}^{-1}$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando a funcionalização das AuNPs (PARK; SHUMAKER-PARRY, 2014).

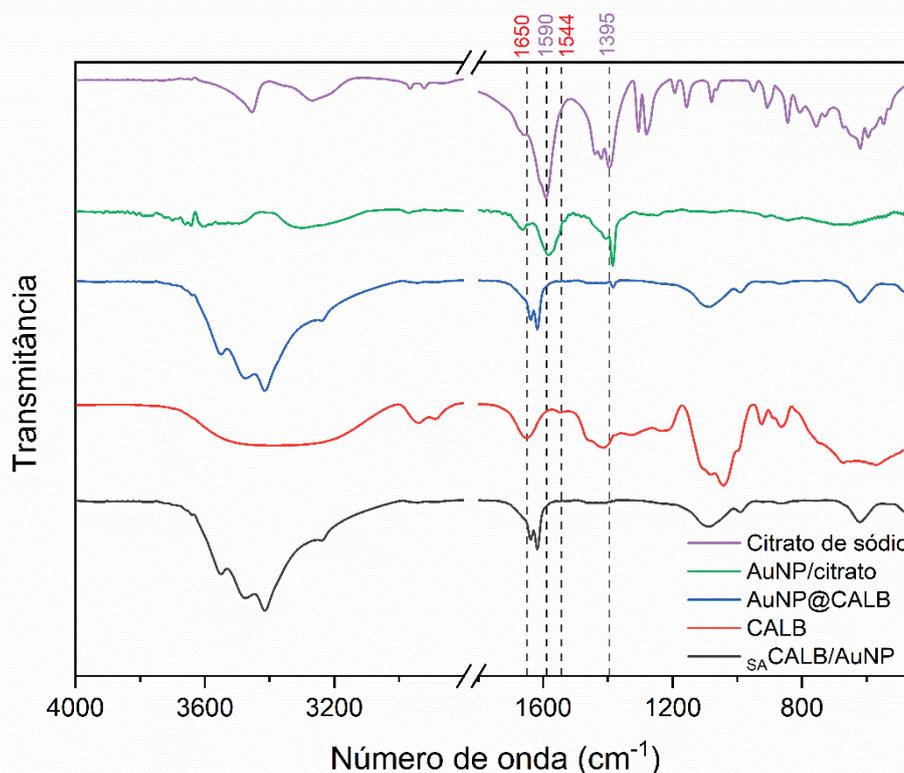


FIGURA 19 - Espectro de FTIR do citrato de sódio, CALB e AuNPs (AuNP/citrato, AuNP@CALB e  $\text{SA CALB/AuNP}$ ).

No espectro da CALB são observadas as bandas características referentes aos grupos amida presentes na enzima. O estiramento  $\text{-C=O}$  (amida I) em  $1650\text{ cm}^{-1}$  e o dobramento do grupo  $\text{-NH}$  (amida II) em  $1544\text{ cm}^{-1}$  são as duas bandas características associadas à CALB. Nos espectros de AuNP@CALB e  $\text{SA CALB/AuNP}$ , a imobilização da enzima na superfície das AuNPs é evidenciado pelo deslocamento para o vermelho (valores menores de número de onda) de  $\nu(\text{-C=O})$ . Nestes dois materiais também são evidenciadas as bandas acima de

3200  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do N-H (BARTH, 2007; KRIKORIAN; MAHPOUR, 1973). Além disso, no espectro de AuNP@CALB é observado que em 1384  $\text{cm}^{-1}$  está presente uma banda com pouca intensidade e que foi associada ao estiramento do  $\text{COO}^-$  do citrato de sódio. A presença desta banda para AuNP@CALB sugere a persistência do citrato de sódio mesmo após a adição da CALB, mostrando que continua ocorrendo a interação entre citrato de sódio e a AuNP. Os deslocamentos e desaparecimento das bandas características do citrato de sódio e da CALB reflete que esses grupos estão envolvidos na interação com as AuNPs. Também foi observado que mesmo que AuNP@CALB e  $s_A$ CALB/AuNP tenham seguido protocolos de síntese e de adição da CALB diferentes, os espectros de ambos apresentam o mesmo perfil. As principais atribuições relatadas acima estão sumarizadas na TABELA 2.

TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DAS PRINCIPAIS BANDAS DOS ESPECTROS DE FTIR ASSOCIADAS AS ESPÉCIES MOSTRADAS NA FIGURA 19.

Atribuições	Comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )				
	Citrato de sódio	CALB	AuNP/citrato	AuNP@CALB	$s_A$ CALB/AuNP
$\nu_s(\text{COO}^-)$	1395		1384	1384	
$\nu_{as}(\text{COO}^-)$	1590		1580		
$\nu(-\text{C}=\text{O})$		1650		1639	1639
$\delta(-\text{NH})$		1544		-	-

#### 4.2 EFEITOS DA TEMPERATURA E DA IMOBILIZAÇÃO NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CALB

A estabilidade da estrutura terciária da CALB foi estudada pelo acompanhamento da fluorescência do aminoácido triptofano (Trp) (FIGURA 20). O Trp possui uma banda característica de emissão, com  $\lambda_{\text{max}}$  que pode variar entre  $\sim 308$  nm (azurina) até  $\sim 355$  nm (glucagon), em virtude da sensibilidade ao seu ambiente local e relacionada com o grau de exposição ao solvente (VIVIAN; CALLIS, 2001). Na FIGURA 20(a) é mostrado o espectro de emissão de fluorescência para a CALB em diferentes temperaturas (entre 20 °C e 50 °C), no qual é observado que o máximo de fluorescência ocorre em 323 nm, que é característico para resíduos deste aminoácido localizados no interior da estrutura da enzima (RABBANI et al., 2015).

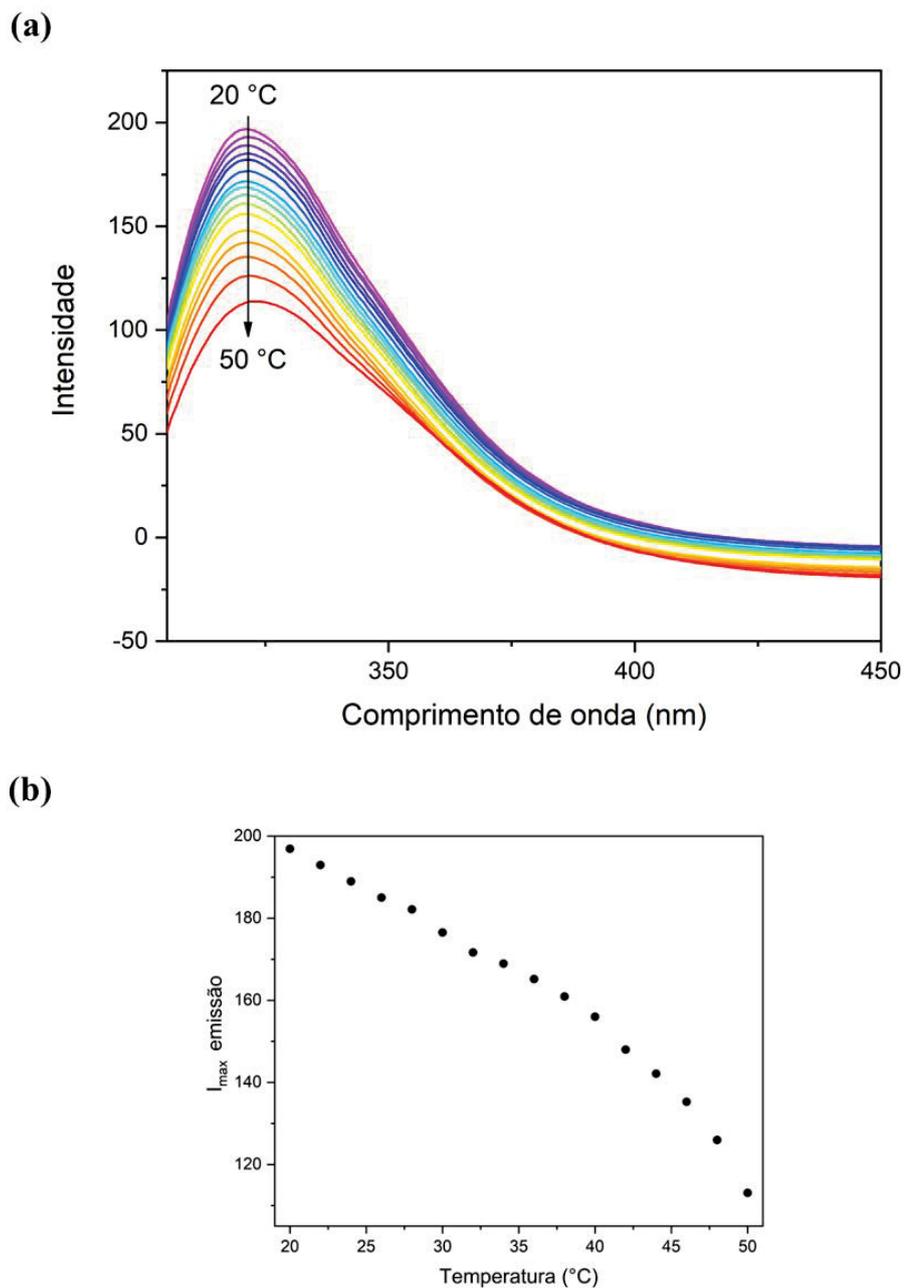


FIGURA 20 - Emissão de fluorescência do Trp para CALB em diferentes temperaturas. (a) Espectro de emissão de fluorescência e (b) intensidade máxima de emissão em função da temperatura. A seta na imagem indica o sentido do aumento da temperatura.

Percebe-se que com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência, que está associada com a eficiência de emissão de fótons, sendo este parâmetro conhecido como rendimento quântico ( $\Phi$ ). Esta é uma quantidade adimensional, que representa a razão entre um número de eventos (como reações química, fluorescência ou fosforescência) pelo número de fótons absorvidos. Na espectroscopia de fluorescência o  $\Phi$  descreve a eficiência do fluoróforo em emitir luz após a absorção de fótons (RUBIN;

BRASLAVSKY, 2010). A temperatura pode afetar o  $\Phi$  por meio de diversos processos, como a relaxação vibracional, extinção colisional, mudanças conformacionais e estabilidade térmica (LAKOWICZ, 2006). No entanto, como o perfil da curva e o valor de  $\lambda_{\max}$  permanecem inalterados com o aumento da temperatura, entende-se que neste caso não ocorreram mudanças na estrutura tridimensional da enzima. Assim, este fenômeno está associado com fatores como a dissipação do excesso de energia por meio de vibrações moleculares (relaxação vibracional) e o aumento da extinção colisional, por exemplo. A avaliação dos valores de intensidade para a faixa de temperatura estudada mostram que houve uma diminuição de 42% na intensidade de fluorescência entre as temperaturas de 20 °C e 50 °C (FIGURA 20(b)). A diminuição da fluorescência com o aumento da temperatura já foi relatada diversas vezes na literatura, sendo um fenômeno comum e que ocorre em diversas proteínas (DEEPA; THIPPERUDRAPPA; SURESH KUMAR, 2020; GALLY; EDELMAN, 1962; VÄRKONYI; KABÓK, 1975).

As características da fluorescência dos resíduos triptofano costumam ser mais sensíveis a mudanças da estrutura da proteína. Por isso, costumam ser utilizados em estudos que analisam os processos de desnaturação/enovelamento de proteínas, que ocorrem pela ação de desnaturação química, temperatura ou pH (ROYER, 1995). Na FIGURA 20 foi observado que para um intervalo de temperatura (20 °C até 40 °C), a enzima mantém o perfil de emissão com  $\lambda_{\max}$  em torno de 325 nm. Na FIGURA 21 é feita a comparação entre os perfis de emissão de fluorescência para a CALB em 40 °C, 50 °C e 60 °C. A diferença na intensidade observada entre as FIGURA 20 e FIGURA 21 é atribuída a diferença na concentração de CALB nas amostras analisadas, visto que a intensidade de fluorescência está relacionada com a concentração do fluoróforo. Com o aumento da temperatura a curva se torna mais alargada (50 °C) e posteriormente, é observada uma mudança no perfil da curva. Essas alterações são acompanhadas do deslocamento do  $\lambda_{\max}$  para 337 nm (50 °C) e 347 nm (60 °C). Esse efeito batocrômico é resultado de mudanças na estrutura terciária que ocorrem devido ao aumento da temperatura e que culminam na desnaturação da CALB.

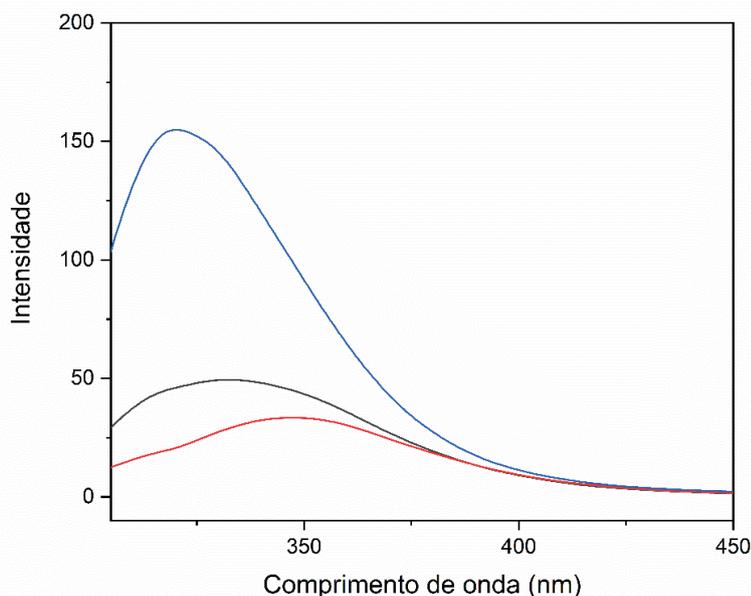


FIGURA 21 - Diferença no espectro de emissão de fluorescência do Trp para CALB a 40 °C (curva azul), 50 °C (curva preta) e 60 °C (curva vermelha).

Diferentes técnicas podem ser empregadas no estudo das enzimas, dependendo da aplicação e da natureza das informações desejadas. Tanto a espectroscopia de fluorescência quanto a técnica de nanoDSF são utilizadas para a análise de enzimas, no entanto, divergem quanto aos princípios fundamentais da técnica e ao tipo de informação que pode ser obtida. Na espectroscopia de fluorescência, um fluoróforo é excitado por uma fonte de luz, e a subsequente emissão de luz é monitorada. Esta técnica é empregada na investigação de alterações conformacionais na estrutura terciária de enzimas, bem como interações enzima-substrato e enzima-inibidor. Em contraste, a nanoDSF é uma combinação entre calorimetria de varredura diferencial (DSC) e espectroscopia de fluorescência em microescala, com foco na análise das variações do sinal de fluorescência em função da temperatura. A nanoDSF é particularmente valiosa para o estudo de estabilidade térmica e dos processos de desnaturação/enovelamento de proteínas (LAKOWICZ, 2006; MAGNUSSON et al., 2019).

A fim de determinar a temperatura em que ocorre a desnaturação da CALB foi empregada a técnica de nanoDSF (FIGURA 22). A curva de desnaturação obtida por nanoDSF mostra um ponto de inflexão que ocorre entre 50 °C e 60 °C, indicando que a enzima desnatura nesta temperatura. Por meio do cálculo da primeira derivada desta curva, foi obtido que este ponto de inflexão ocorre em 58,4 °C e esta é tida como a temperatura em que ocorre essa mudança brusca de conformação da CALB.

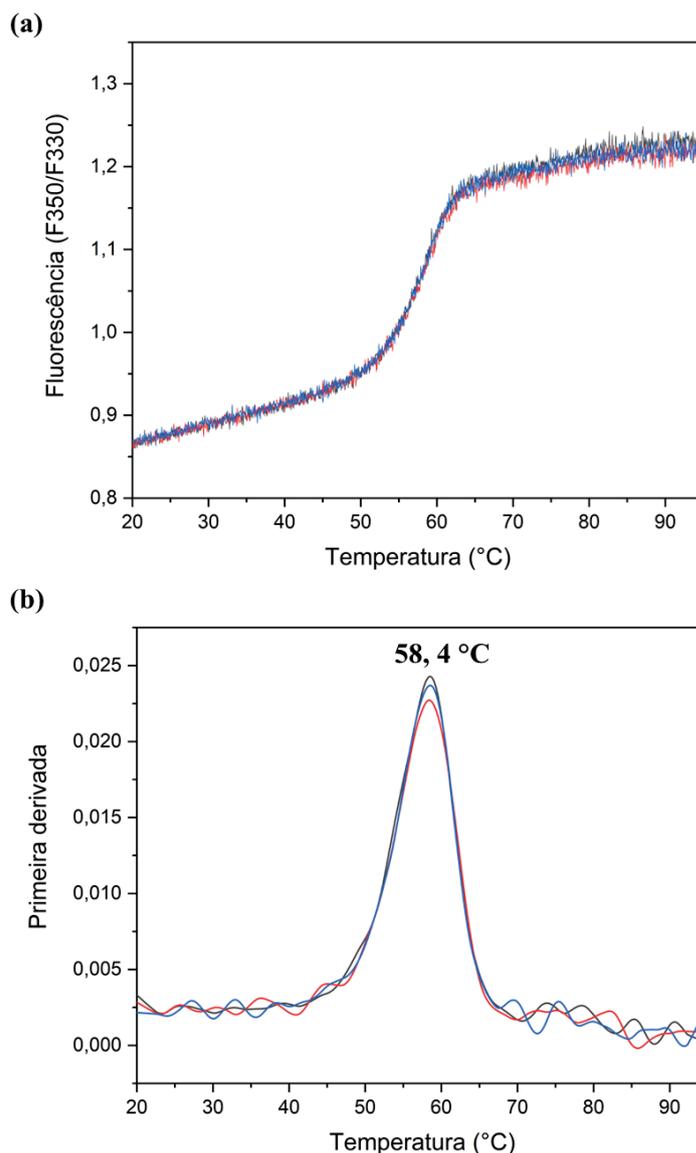


FIGURA 22 - (a) Curva de desnaturação por nanoDSF da enzima CALB no intervalo entre 20 °C e 95 °C. (b) Primeira derivada da curva de nanoDSF na qual é evidenciada a temperatura de desnaturação da enzima.

Quando a enzima é imobilizada na superfície das AuNPs ocorre a interação entre a cadeia polipeptídica (por meio dos grupos amino) e as nanopartículas, o que pode levar a mudanças na estrutura da enzima. Na FIGURA 23 é mostrado que tanto para  $SA_{CALB}/AuNP$  quanto para  $AuNP@CALB$  ocorre um deslocamento do  $\lambda_{m\acute{a}x}$  para 329 nm. Esse deslocamento, mesmo que pequeno, é um indício da interação entre os resíduos de Trp da CALB com as nanopartículas. O deslocamento para o vermelho (*redshift*) também pode estar associado a uma maior exposição dos resíduos de Trp ao meio aquoso como consequência da interação com as AuNPs (CAIRES; COSTA; FERNANDES, 2013; FENG et al., 2019).

Além disso, foi observado que até a temperatura de 80 °C o perfil de emissão do Trp e o valor de  $\lambda_{\text{máx}}$  se mantem o mesmo em ambos os casos. Essa análise preliminar infere que a imobilização da CALB em AuNPs pode levar a melhora da estabilidade térmica da enzima, permitindo que ela seja empregada em temperaturas maiores que a temperatura em que ocorre desnaturação, como determinado por nanoDSF.

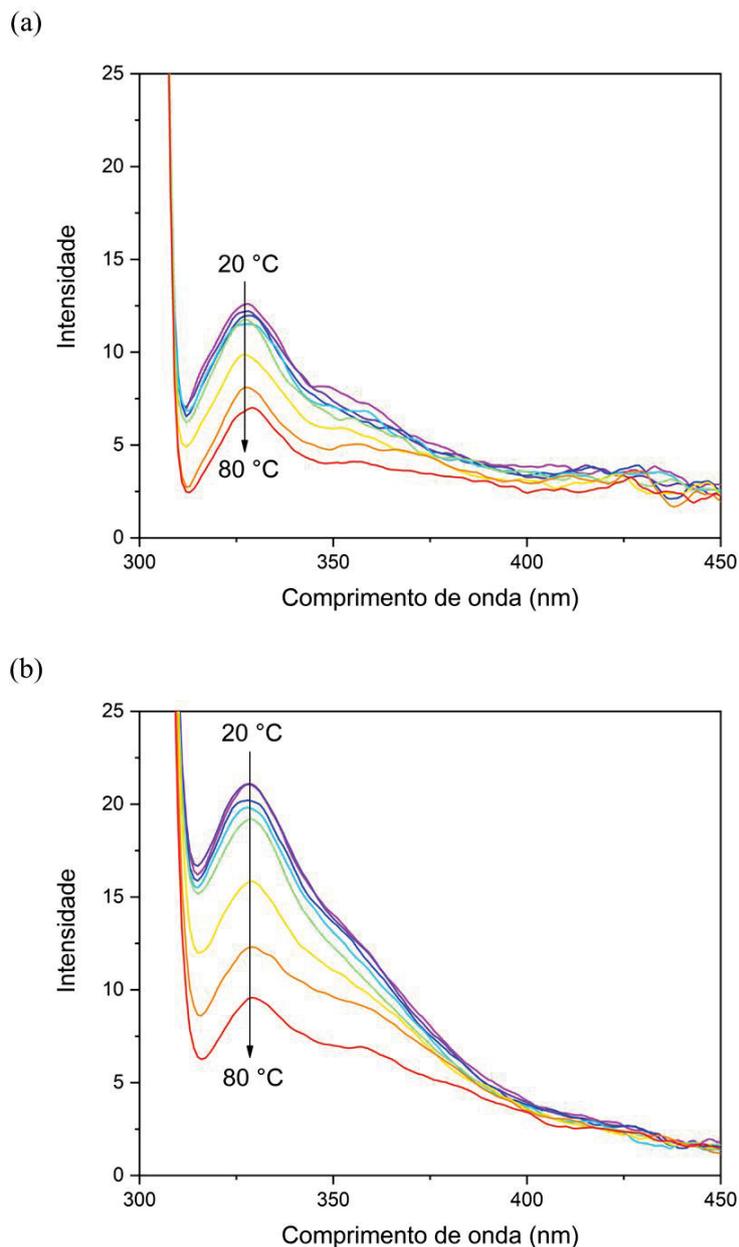


FIGURA 23 - Espectro de emissão de fluorescência do Trp para (a)  $\text{SA-CALB/AuNP}$  e (b)  $\text{AuNP@CALB}$  em diferentes temperaturas. A seta na imagem indica o sentido do aumento da temperatura.

### 4.3 ESTUDO DAS PROPRIEDADES DO PNIPAM

A confirmação da formação do polímero foi realizada por meio das análises de RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e FTIR (FIGURA 24), nas quais foram comparados os espectros obtidos para os produtos das 2 polimerizações com o monômero NIPAm. A formação do PNIPAm foi evidenciada nos espectros de RMN pela ausência dos sinais referentes aos hidrogênios adjacentes aos carbonos de uma dupla ligação ( $\text{C}=\text{C}$ ), que aparecem entre 5,0 e 6,5 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Os sinais correspondentes aos carbonos insaturados do NIPAm aparecem entre 120 e 130 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ , mas nenhum sinal é observado neste intervalo nos espectros de PNI1 e PNI2. Os espectros de RMN são apresentados no Anexo III.

No espectro de FTIR do NIPAm são observadas três bandas de amida: amida I (referente ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$ ), amida II (referente ao dobramento  $\text{N}-\text{H}$ ) e amida III (referente ao estiramento  $\text{C}-\text{N}$ ) (BARBOSA, 2013), as quais foram observadas em  $1655\text{ cm}^{-1}$  (amida I) e  $1546\text{ cm}^{-1}$  (amida II e III acopladas). Na região acima de  $2800\text{ cm}^{-1}$  foram observados os estiramentos das ligações  $\text{N}-\text{H}$  e  $\text{C}-\text{H}$ . A banda observada acima de  $3200\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento  $\text{N}-\text{H}$  é um indício da presença de amida  $\text{N}$ -substituída na molécula (PAVIA et al., 2010; UROŠEVIĆ et al., 2020). Ainda na região próxima a  $3000\text{ cm}^{-1}$  foram analisadas as bandas correspondentes ao estiramento assimétrico ( $2970\text{ cm}^{-1}$ ) e simétrico ( $2876\text{ cm}^{-1}$ ) dos grupos metila e do estiramento assimétrico ( $2934\text{ cm}^{-1}$ ) do grupo isopropila (PAVIA et al., 2010; RUSSELL; THOMPSON, 1956). Como estes sinais são característicos de ligações que permanecem na estrutura do polímero, as referidas bandas são observadas para as amostras PNI1 e PNI2. As estruturas do NIPAm e PNIPAm diferem quanto a presença de insaturação, que ocorre apenas no primeiro caso. No espectro do NIPAm a presença do grupo vinila pode ser caracterizada pelas bandas em  $1620\text{ cm}^{-1}$  (referente ao estiramento  $\text{C}=\text{C}$ ),  $1410\text{ cm}^{-1}$  (referente a deformação no plano do grupo vinílico) e duas bandas em  $988$  e  $915\text{ cm}^{-1}$  (deformação fora do plano ( $=\text{C}-\text{H}$ )) (UROŠEVIĆ et al., 2020). Como estas bandas aparecem apenas no espectro do NIPAm, pode-se inferir que a perda da insaturação ocorreu devido a reação de polimerização e que, ambas as sínteses possivelmente levaram a formação do PNIPAm. Na TABELA 3 são mostradas as bandas identificadas para as três espécies (NIPAm, PNI1 e PNI2), suas atribuições e os valores de referência (BARBOSA, 2013; PAVIA et al., 2010; UROŠEVIĆ et al., 2020; YAM et al., 2016).

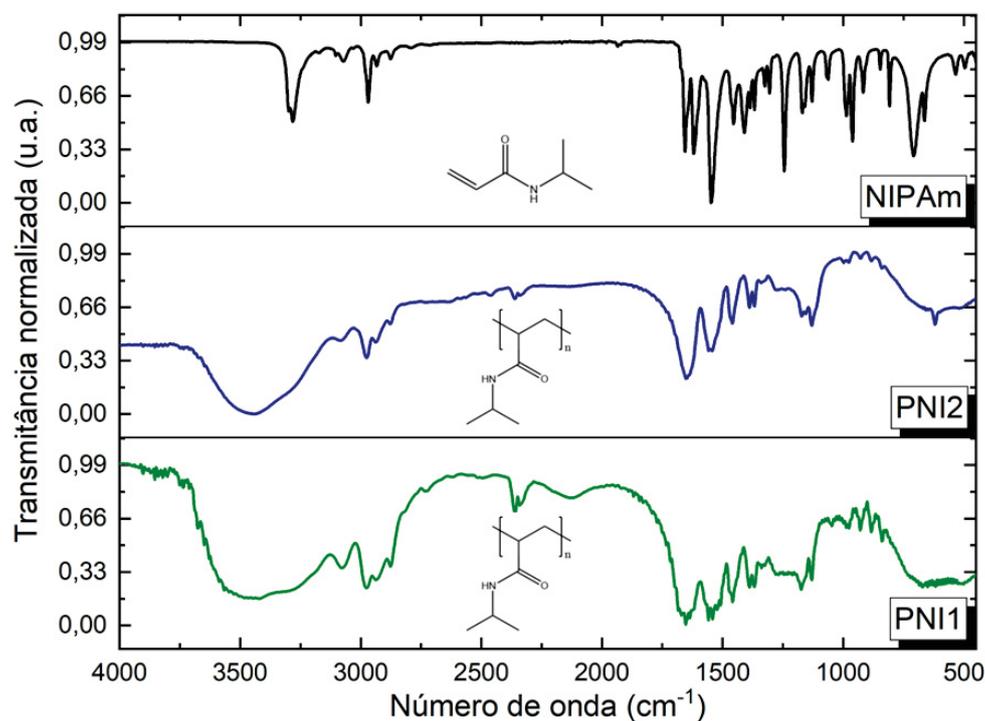


FIGURA 24 - Espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) obtido para o NIPAm (preto), PNI1 (verde) e PNI2 (azul).

TABELA 3 – ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS IDENTIFICADAS NOS ESPECTROS DE FTIR PARA OS COMPOSTOS NIPAM, PNI1 E PNI2.

Atribuição	Valor observado (cm <sup>-1</sup> )			Valor de Referência (cm <sup>-1</sup> )
	NIPAm	PNI1	PNI2	
<b>v(N-H)</b>				
Estiramento do grupo amino secundário	3282	-	-	3475-3150
Harmônica da banda de amida II	3104	3075	3081	~ 3100
<b>v<sub>as</sub>(=C-H)</b>				
Estiramento assimétrico do grupo vinila	3072	3074	3076	3100-3000
<b>v<sub>as</sub>(C-H)</b>				
Estiramento assimétrico do grupo metila	2970	2977	2976	3100-2850
<b>v<sub>as</sub>(C-H)</b>				
Estiramento assimétrico C-H do grupo isopropila	2934	2935	2937	3100-2850
<b>v<sub>s</sub>(C-H)</b>				
Estiramento simétrico do grupo metila	2876	2876	2877	3100-2850

CO <sub>2</sub>	-	2361	2361	2350
	-	2338	2339	2350
<b>v(C=O)</b>				
Banda de amida I – estiramento C=O	1656	1653	1650	1700-1640
<b>v(C=C)</b>				
Estiramento C=C grupo vinila	1620	-	-	1680-1600
<b>δ(N-H)</b>				
Banda de amida II – dobramento N-H	1546	1559	1548	1640-1550
<b>δ(C-H)</b>				
Dobramento -CH <sub>2</sub>	1453	1458	1459	1465
<b>δ(=C-H)</b>				
Deformação no plano do grupo vinílico	1410	-	-	1417
<b>δ(C-H)</b>				
Dobramento -CH <sub>3</sub> grupo isopropila	1386	1388	1388	1390-1365
	1368	1369	1368	1390-1365
Evidência de existência do grupo isopropila	1169	1174	1172	
	1129	1130	1130	
<b>δ(=C-H)</b>				
Deformação fora do plano	987	-	-	
	916	-	-	

Fonte: Valores de referência retirados de (PAVIA et al., 2010; UROŠEVIĆ et al., 2020).

Com base na massa de produto obtido após cada síntese, foram calculados os rendimentos de 77,5% para a síntese do produto PNI1 e 95% para o produto PNI2. Os dados das reações são mostrados na TABELA 4. O rendimento obtido para a reação que levou a formação do PNI2, quando a quantidade de monômero utilizado é de 0,01 mol L<sup>-1</sup>, foi superior (95%) ao rendimento de 61% informado no artigo de referência (XU; LI; HARAGUCHI, 2010). Ambas a sínteses levaram ao polímero de interesse, por meio de sínteses simples, com fácil purificação do produto e com bons rendimentos de reação.

TABELA 4 – DADOS DAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO.

	PNI1	PNI2
Quantidade de monômero utilizado (g)	0,5010	0,1069
Concentração do monômero no meio reacional (mol L <sup>-1</sup> )	0,867	0,010
Quantidade de produto obtido (g)	0,388	0,101
Rendimento da reação (%)	77,5	95

A fim de determinar a massa molar e dispersividade das amostras PNI1 e PNI2 foi utilizada a técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). O perfil cromatográfico das amostras é mostrado na FIGURA 25, na qual é observado que foram empregados dois detectores (índice de refração – RI e espalhamento de luz de ângulo reto – RALS) para determinar a massa molar ponderal ( $M_w$ ) dos polímeros.

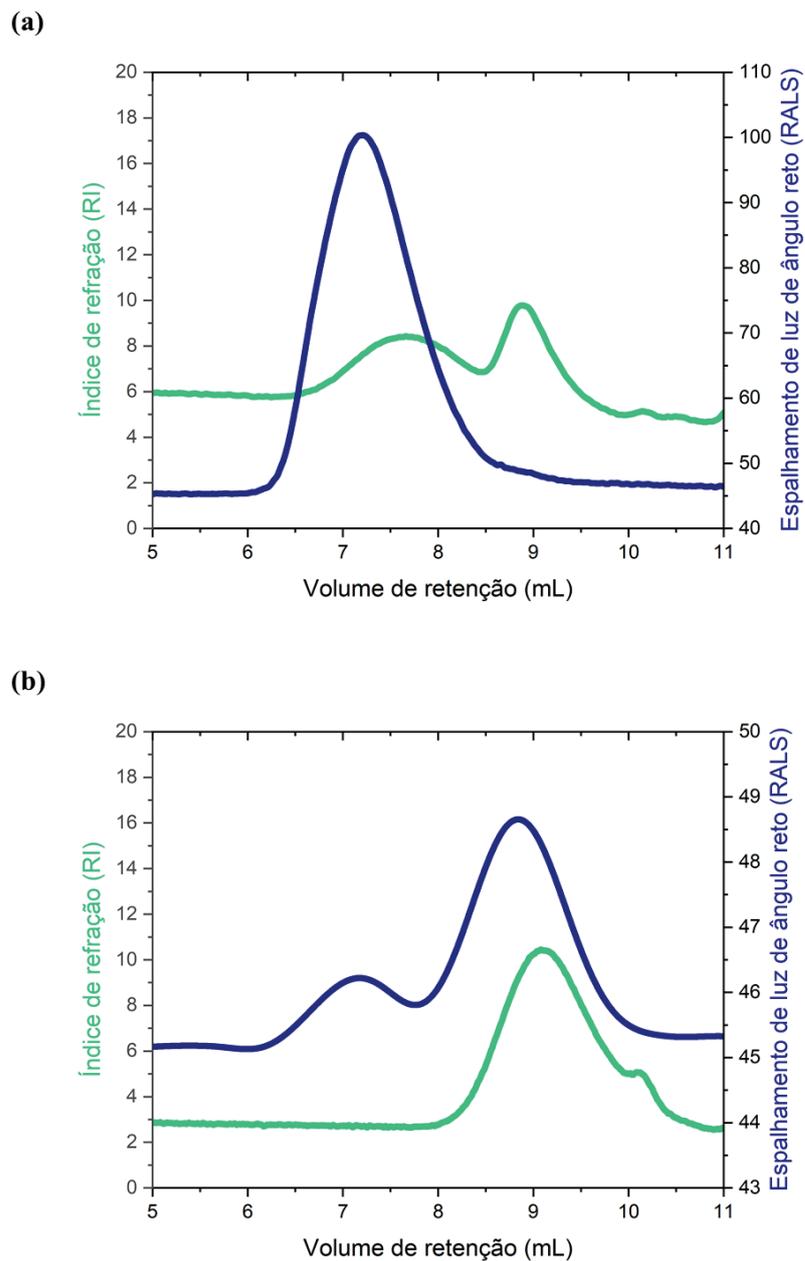


FIGURA 25 - Perfil cromatográfico obtido por SEC para os polímeros (a) PNI1 e (b) PNI2. A linha verde corresponde ao detector de índice de refração (RI) e a linha azul ao detector de espalhamento de luz a ângulo reto (RALS).

Por meio da comparação com um polímero padrão de massa conhecida, foram calculados os valores presentes na TABELA 5 de  $1,05 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  para o PNI1 e  $4,87 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  para o PNI2. Ao analisarmos a polidispersividade (PDI) das amostras, foram encontrados os valores de 5,35 para PNI1 e 1,42 para PNI2. Na FIGURA 25 pode ser observada a ocorrência de dois sinais para os detectores de RI (PNI1) e RALS (PNI2), que podem indicar a presença de espécies com diferentes massas molares. No caso do polímero PNI1, o alto valor de PDI desta amostra indica a presença de uma ampla faixa de  $M_w$ , o que pode ser descrito como a ocorrência de diferentes populações.

Para verificar esta informação, os parâmetros ( $M_w$ ,  $M_n$  e *recovery*) foram calculados novamente, considerando as amostras como sendo compostas por duas populações com  $M_w$  diferentes ( $M_1$  e  $M_2$ ). Por meio destes novos cálculos, foram obtidas duas populações para o polímero PNI1, a primeira com  $1,1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  ( $PDI = 1,56$ ) e a segunda com  $8,7 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ . Ao realizar o mesmo procedimento para PNI2, apenas uma população foi encontrada. A ocorrência de dois picos cromatográficos para o PNI2 foi observada no detector de RALS, que possui uma sensibilidade maior para cadeias de maior tamanho. O primeiro pico ( $\sim 7 \text{ mL}$ ) representa macromoléculas com massa molar maior e não foi observado um pico no detector de RI para este mesmo volume de eluição. Com isso, concluiu-se que uma quantidade pequena de PNIPAm com  $M_w$  maior pode estar presente nesta amostra, no entanto, a quantidade não foi suficiente para ser detectada por RI, e a amostra pode ser considerada como sendo composta por apenas uma população.

Então, caso exista uma parcela de polímero com  $M_w$  diferente presente nesta amostra, esta quantidade é tão pequena que pode ser desconsiderada. Com os valores de  $M_w$  e massa molar numérica ( $M_n$ ) obtidos foi possível calcular o grau de polimerização (DP) dos polímeros, ou seja, o número de unidades de NIPAm presentes nas macromoléculas. O grau de polimerização foi calculado como a razão entre a massa molar numérica ( $M_n$ ) e a massa molar do monômero NIPAm. A síntese de PNI1 levou à formação de polímeros maiores, com DP entre 990 e 15200, enquanto as cadeias de PNI2 possuem em média 430 unidades de NIPAm. Também foi calculada a concentração estimada da amostra, que foi comparada com o valor de concentração informado ao realizar a injeção no equipamento, sendo esta relação denominada *recovery*. O valor obtido para o polímero PNI2 foi superior a 85%. Por outro lado, o valor para PNI1 estava abaixo de 65%. Um valor baixo de *recovery* pode indicar que polímeros com  $M_w$  ainda maiores do que as calculadas podem ter sido sintetizados, mas estes ficaram retidos durante a filtração antes da injeção da amostra. A TABELA 5 apresenta os dados obtidos para PNI1 e PNI2 e mostra a comparação entre os valores obtidos

inicialmente com os do tratamento para 2 populações (2P) distintas. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que a síntese de PNI1 levou a formação de 2 populações com  $M_w$  distintas, enquanto PNI2 é formado por apenas 1 população.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS PARA PNI1 E PNI2 QUANDO A  $M_w$ , PDI E DP.

	PNI1		PNI2
	M1	M2	
<b>Massa molar ponderal (<math>M_w</math>) (g mol<sup>-1</sup>)</b>	$1,72 \times 10^6$	$1,12 \times 10^5$	$4,87 \times 10^4$
<b>Massa molar numérica (<math>M_n</math>) (g mol<sup>-1</sup>)</b>	$1,10 \times 10^6$	$8,67 \times 10^4$	$3,44 \times 10^4$
<b>Polidispersividade (PDI)</b>	1,56	1,29	1,42
<b>Grau de polimerização (DP)</b>	15200	990	430
<b>Recovery (%)</b>	36,7	28,0	85,5

A temperatura de transição ( $T_{cp}$ ) dos polímeros foi determinada por meio do método turbidimétrico, no qual é observada a diminuição na intensidade de luz transmitida com o aumento da temperatura. Quando a temperatura da solução está abaixo da temperatura de transição do polímero, as cadeias poliméricas estão hidratadas e adotam uma conformação flexível e expandida (denominada *random coil*) em água. Durante este processo, com o aumento da temperatura (acima da temperatura de transição), ocorre a desidratação das cadeias de PNIPAm, que colapsam em uma conformação empacotada (globular). Com o aumento da temperatura, ocorre a agregação das cadeias poliméricas, que leva a um aumento da turbidez da solução contendo o PNIPAm. A  $T_{cp}$  é atingida quando a transmitância atinge 50% do valor da medida inicial (que neste experimento foi de 20 °C). Na FIGURA 26 são mostrados os dados obtidos por turbidimetria para as amostras PNI1 e PNI2, na qual a  $T_{cp}$  é determinada pela análise da primeira derivada, gerada a partir dos valores de transmitância medidos durante a variação da temperatura. Para a amostra PNI1, a  $T_{cp}$  para esta concentração foi 31,5°C e para o PNI2 33,5°C. Os dois valores encontrados estão dentro do intervalo esperado para este polímero (SCHMALJOHANN, 2006). A diferença entre os dois valores era esperada, visto que PNI1 e PNI2 possuem algumas propriedades diferentes, como a massa molar (determinadas por SEC). Na FIGURA 27 é mostrada mudança de conformação sofrida pelo polímero abaixo e acima da temperatura de transição, além do aspecto visual da amostra no início (20°C) e no fim (40°C) da primeira rampa de aquecimento durante as medidas de turbidimetria.

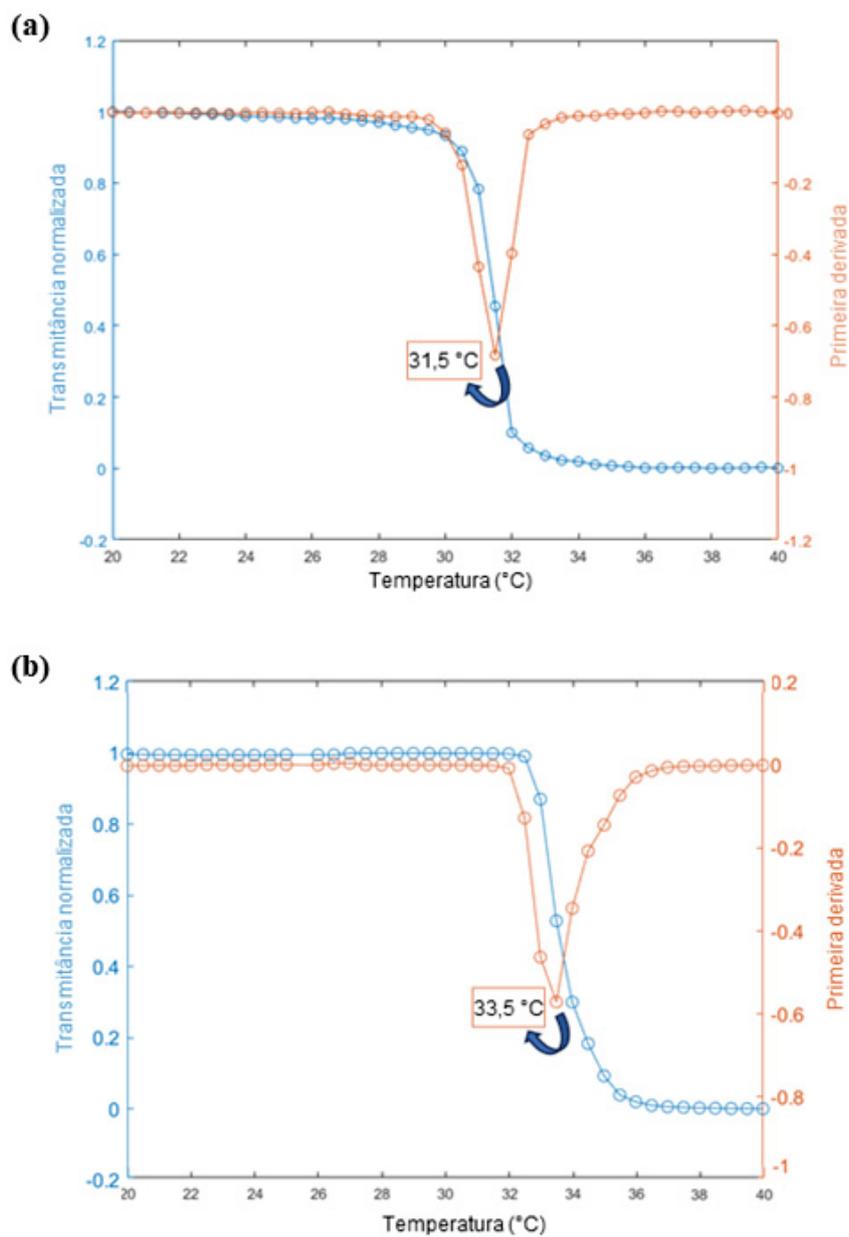


FIGURA 26 - Determinação da temperatura de transição ( $T_{cp}$ ) para os polímeros (a) PNI1 e (b) PNI2. A linha em azul corresponde à curva de transmitância em função da temperatura e a linha laranja à primeira derivada calculada. As medidas de turbidimetria foram realizadas em  $\lambda = 600$  nm.

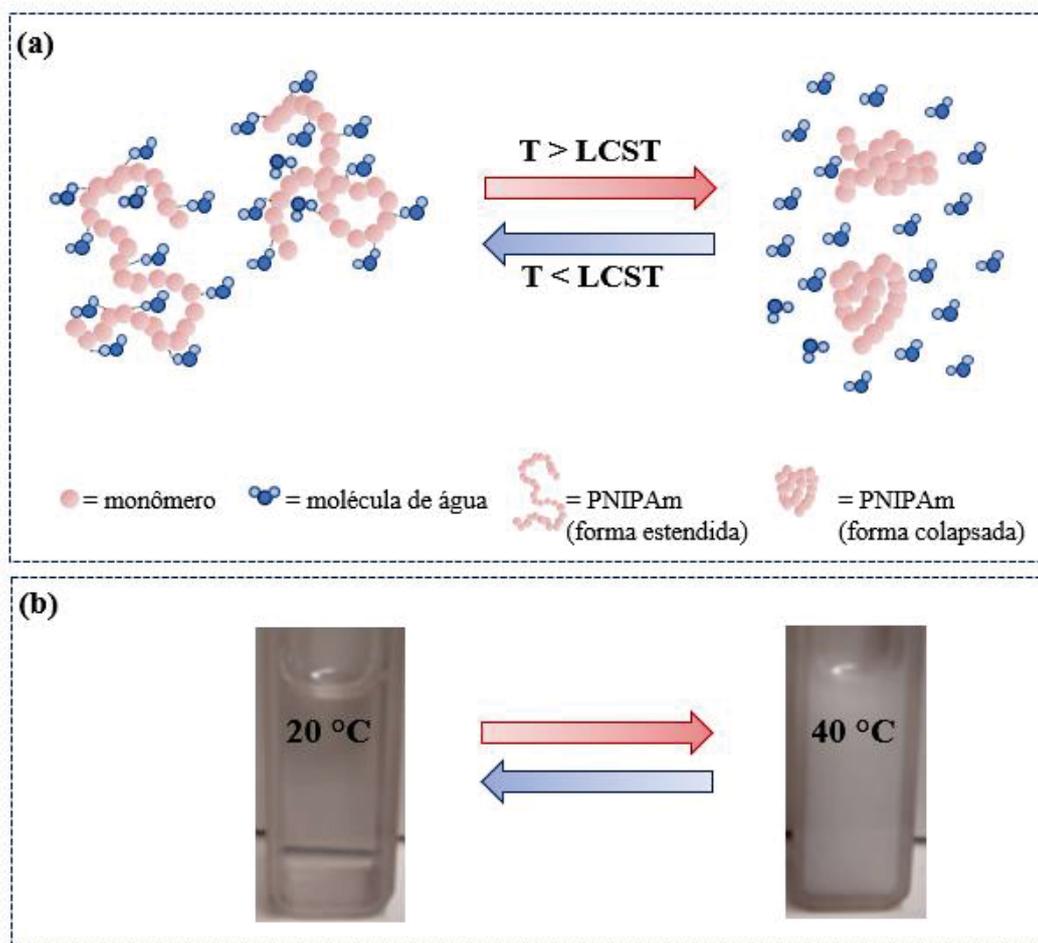


FIGURA 27 - Transição coil-to-globule do polímero PNIPAm. (a) Esquema mostrando a mudança de conformação das cadeias poliméricas com a temperatura e (b) visualização macroscópica da transição de fase do PNIPAm. Fonte: A autora (2023).

Um aspecto importante a ser considerado quando se trabalha com polímeros responsivos é a reversibilidade da transição de fase e possibilidade de reutilização do material. Portanto, os polímeros PNI1 e PNI2 foram analisados por turbidimetria durante dois ciclos de aquecimento-resfriamento (FIGURA 28). É observada a histerese entre as curvas de aquecimento e resfriamento para um mesmo ciclo, fato este que é esperado e já foi relatado na literatura (HAMAMURA et al., 2019). Os resultados obtidos por esta técnica permitiram mostrar que o polímero apresenta reversibilidade da transição de fase e mantém o comportamento por mais de um ciclo de aquecimento-resfriamento. Por meio de análises de DLS este aspecto também foi observado, visto que após o aquecimento das soluções de PNI1 e PNI2 até  $40\text{ }^\circ\text{C}$  seguido do resfriamento para  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , os valores de diâmetro hidrodinâmico medidos retornam a valores similares aos obtidos no início das análises (Figura S17). Inicialmente ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) PNI1 apresentou diâmetro hidrodinâmico de  $73,6 \pm 0,6\text{ nm}$  e ao retornar a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  o valor medido foi de  $78 \pm 1,9\text{ nm}$ . O polímero PNI2 apresentou

valor inicial de  $149,4 \pm 2,4$  nm a  $25$  °C e após o ciclo de aquecimento-resfriamento, ao voltar a temperatura de  $25$  °C o valor medido foi de  $157,4 \pm 1,2$  nm.

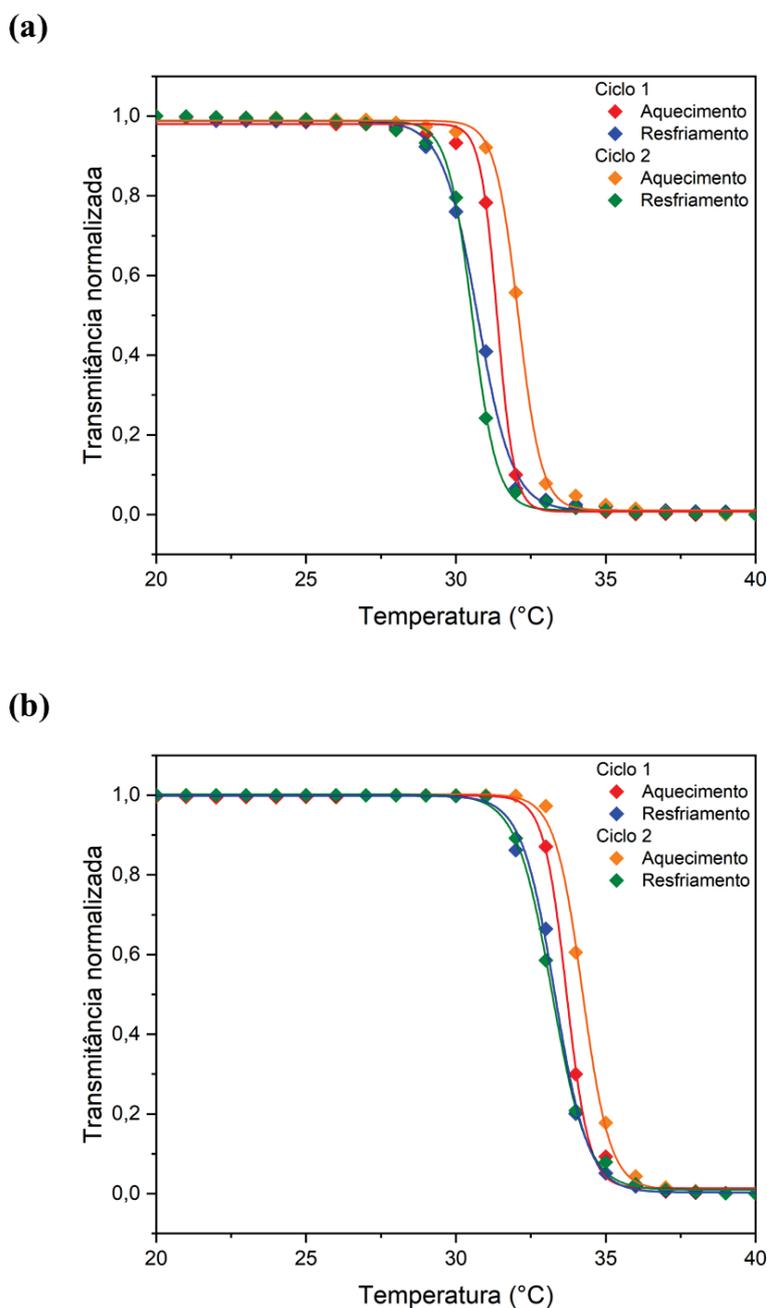


FIGURA 28 - Curvas de turbidimetria obtidas para os polímeros termorresponsivos (a) PN11 e (b) PN12 após dois ciclos de aquecimento-resfriamento.

Assim, o PNIPAm sintetizado pode ser reutilizado, sendo uma boa opção para realizar o efeito de proteção da CALB e regulação da atividade enzimática. Após a caracterização de ambos os produtos (PN11 e PN12) por diferentes técnicas, foram avaliadas

suas propriedades e optou-se por empregar apenas o polímero PNI2 no nanomaterial híbrido. O maior rendimento da reação, a formação de cadeias poliméricas com maior uniformidade ( $PDI = 1,42$ ) e o valor de  $M_w$  do PNI2 foram as características determinantes para esta escolha. Foi feita uma nova síntese para produção do polímero PNI2, o qual foi submetido as mesmas técnicas de caracterização apresentadas anteriormente. O novo polímero PNI2 foi analisado por DLS a fim de verificar se era possível estimar a temperatura de transição do PNI2 por meio da variação do diâmetro hidrodinâmico. Na FIGURA 29 são mostrados os valores obtidos para esta amostra no intervalo de temperatura entre 25 °C e 40 °C.

Em uma típica transição to tipo *coil-to-globule* é esperado que haja a diminuição do tamanho das cadeias poliméricas com o aumento da temperatura acima da temperatura de transição do polímero. Para PNI2 ocorreu o aumento do tamanho hidrodinâmico com o aumento da temperatura no intervalo entre 30 °C e 34 °C, seguido da diminuição do tamanho para temperaturas maiores do que 34 °C. No DLS, o diâmetro hidrodinâmico é calculado por meio da análise das flutuações de intensidade da luz espalhada causada pelo movimento Browniano das partículas. O tamanho aparente destas partículas em solução é influenciado não somente pelo seu tamanho real, mas também pelo formato, estrutura e interações com o solvente. A diferença de conformação sofrida pelo polímero pode ser a responsável pelo aumento do diâmetro hidrodinâmico determinado por DLS. A variação no tamanho hidrodinâmico observado para o PNI2 é um indício do comportamento responsivo deste polímero. Por meio da análise realizada não foi possível determinar a temperatura na qual ocorre a transição, mas ela deve ocorrer entre 30 °C e 34 °C. Na FIGURA 29(b-c) é observado que a amostra é mais uniforme quando a temperatura do meio é maior que a  $T_{cp}$ , o que é constatado pela presença de macromoléculas com apenas uma distribuição de tamanho.

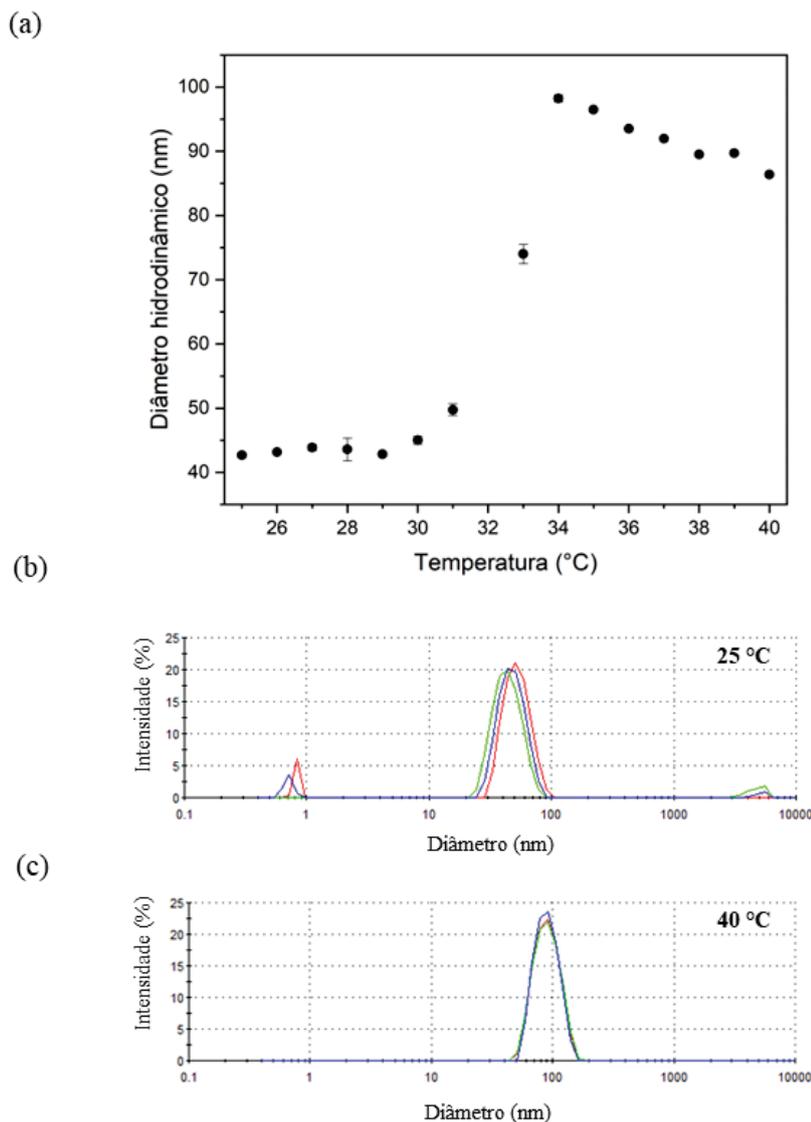


FIGURA 29 – Estudo do diâmetro hidrodinâmico do PNI2 em função da temperatura. (a) Variação do tamanho hidrodinâmico no intervalo de temperatura entre 25 °C e 40 °C. Distribuição de tamanho em função da intensidade quando a amostra está sendo analisada a (b) 25°C e (c) 40 °C.

A influência da temperatura também foi analisada por PZ (FIGURA 30), na qual é observada que abaixo da LCST do polímero existe pouca influência da temperatura no valor calculado de PZ. No entanto, para as medidas acima da LCST é observado um aumento da amplitude do valor de PZ (valores mais negativos). Para o caso do polímero PNIPAm sintetizado utilizando KPS como iniciador já foi observado que os valores de PZ são negativos no intervalo de temperatura entre 25 °C (em torno de -3 mV) e 40 °C (aproximadamente -30 mV). Este fato é atribuído a carga superficial negativa proveniente

dos resíduos de iniciador que permaneceram na extremidade da cadeia do polímero (UTASHIRO; TAKIGUCHI; SATOH, 2017). Com o aumento da temperatura, tem-se uma diminuição no volume da partícula e conseqüentemente, um aumento na densidade de carga superficial (CONSTANTIN et al., 2014). Além disso, a diminuição do tamanho da partícula (acima da  $T_{cp}$ ) resulta em uma maior mobilidade eletroforética, que está diretamente relacionada com o valor de PZ. Então, os fatores mencionados acima acarretam nos valores mais negativos de PZ para o PNIPAm em 35 °C e 40 °C.

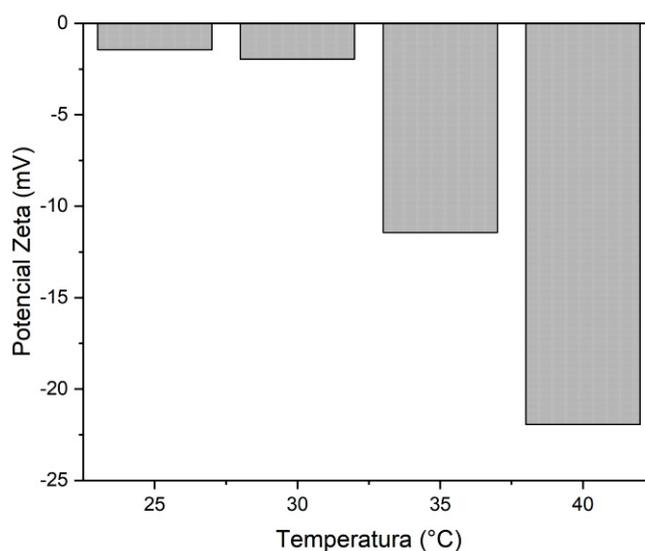


FIGURA 30 - Valores de potencial zeta obtidos para o polímero PN12 em diferentes temperaturas.

As análises de turbidimetria realizadas anteriormente foram realizadas apenas com soluções contendo  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de polímero. Embora esta concentração seja empregada em diversos artigos, outras concentrações também podem ser analisadas, podendo levar a valores diferentes de  $T_{cp}$  para um mesmo polímero (GREIN-IANKOVSKI et al., 2021; KOLOUCHOVÁ et al., 2021; OTULAKOWSKI et al., 2021). Então, foram realizadas medidas de turbidimetria para soluções contendo diferentes concentrações do polímero PN12 (FIGURA 31) com o objetivo de avaliar o quanto a concentração do polímero poderia afetar no valor da temperatura de transição. Foram analisadas soluções contendo entre  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  até  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . É observado que para as concentrações menores ( $0,1$  e  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) não foi possível determinar a  $T_{cp}$ , pois possivelmente a quantidade de polímero presente não foi suficiente para promover as interações entre as cadeias poliméricas e formação de agregados que levam ao aumento da turbidez da solução e permitem determinar o valor de  $T_{cp}$ . Entre

1 mg mL<sup>-1</sup> e 10 mg mL<sup>-1</sup> houve apenas 1,0 °C de diferença entre os valores determinados para  $T_{cp}$ . Assim, foi concluído que para o PNIPAm preparado em água, dentro da faixa de concentração que foi analisada, a concentração possui pouca influência no valor da temperatura de transição.

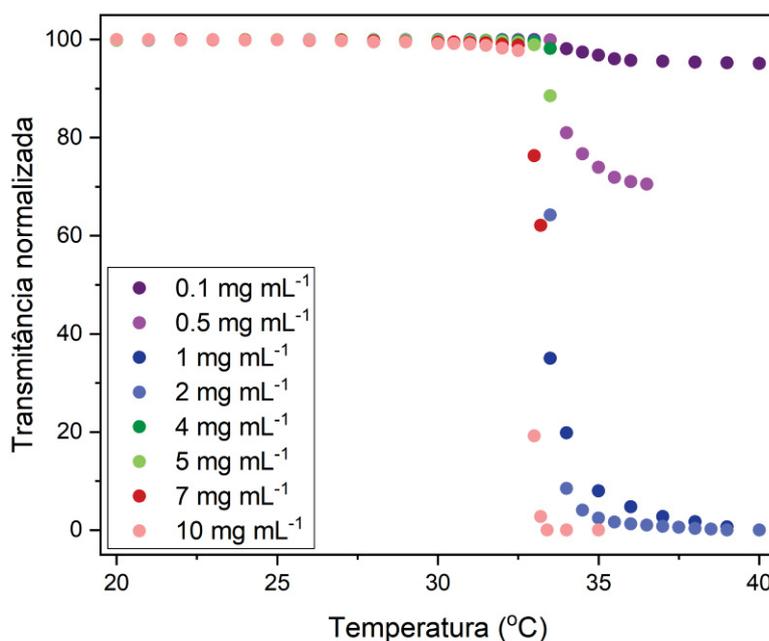


FIGURA 31 - Curvas de turbidimetria de soluções com diferentes concentrações do polímero PNI2.

Na FIGURA 32 é mostrada a análise de DLS em ângulo de 90° realizada para PNI2, na qual novamente é observado um aumento acentuado no diâmetro hidrodinâmico do polímero entre 32 °C e 35 °C, que corresponde ao momento em que ocorre a transição de temperatura, levando ao favorecimento das interações polímero-polímero e que pode levar a formação de agregados de cadeias poliméricas. Na FIGURA 32 é mostrado o desvio padrão em relação as três medidas feitas em cada temperatura. Pode ser observado que a amostra tem como característica uma uniformidade de tamanho (nas três medidas), exceto durante a faixa de temperatura em que ocorre a transição. Acredita-se que ao se aproximar da temperatura de transição, as cadeias de PNIPAm começam o processo de mudança de conformação e as cadeias poliméricas começam a interagir entre si, resultando em uma maior disparidade entre os valores medidos para uma mesma temperatura, como pode ser visto na FIGURA 32. Uma vez que se ultrapasse a temperatura de transição, volta-se a ter estruturas com tamanho bastante uniforme. Como o valor de temperatura observado em que isso ocorre

estava um pouco acima do esperado, foram realizadas medidas da temperatura diretamente dentro do vial, a fim de obter a temperatura correta dentro da amostra. Foi constatado que havia uma diferença entre a temperatura da solução e a informada no banho termostático. Assim, a temperatura de 36 °C (mostrada na FIGURA 32), primeiro ponto em que se tem uma uniformidade de tamanho após a transição, corresponde na verdade a 33 °C. Este resultado está de acordo com o que foi observado nas medidas de turbidimetria, nas quais a  $T_{cp}$  determinada ocorre entre 32,7 °C e 33,7 °C.

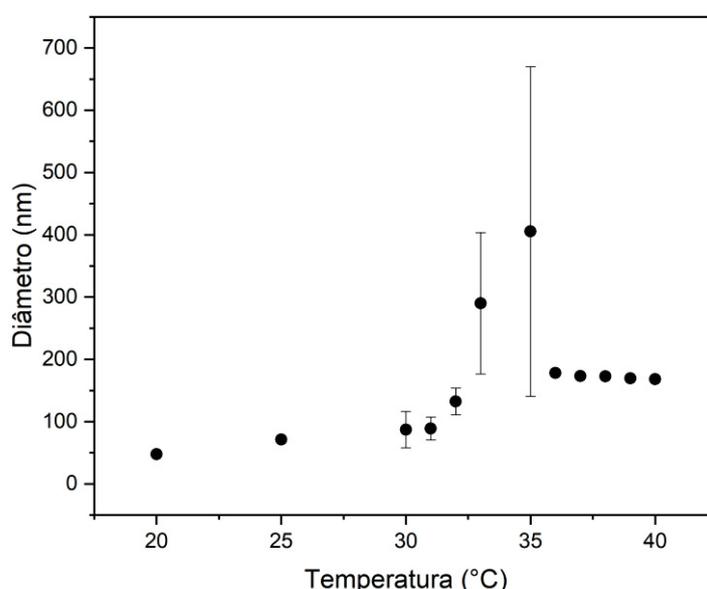


FIGURA 32 - Variação do tamanho do polímero PNI2 em função da temperatura acompanhado por medidas de DLS.

#### 4.4 FORMAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO NANOMATERIAL HÍBRIDO

Foi proposto o desenvolvimento de 2 nanomateriais híbridos inteligentes por meio da associação entre as AuNPs funcionalizadas com CALB e o polímero termorresponsível PNIPAm (PNI2). Devido a forma como foi realizada a adição dos materiais para formar o material híbrido (adição das NPs funcionalizadas em uma solução de PNIPAm), acredita-se que o polímero crie uma espécie de camada ao redor das nanopartículas funcionalizadas ( $_{SA}CALB/AuNP$  e  $AuNP@CALB$ ), como é mostrado na FIGURA 33. Então, para temperaturas abaixo da temperatura de transição do polímero ( $T_{cp} \sim 33,5$  °C) as cadeias poliméricas se encontram em sua forma estendida, exercendo um efeito protetor sobre a

CALB. Com isso, a enzima se encontra protegida do meio externo e o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima é impedido e a reação catalisada pela CALB não ocorre. Quando a temperatura é elevada acima da temperatura de transição, as cadeias poliméricas mudam de conformação, adotando a forma colapsada, a qual permite que ocorra a ação da enzima, como pode ser visto na FIGURA 33.

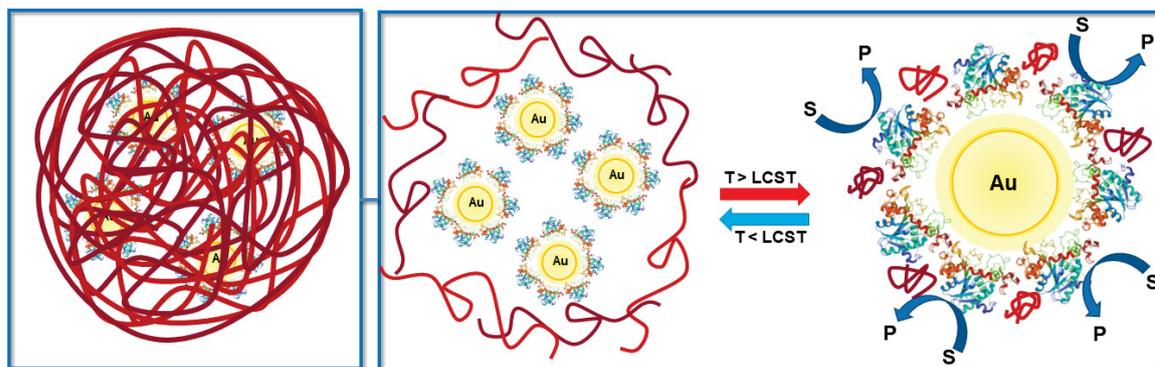


FIGURA 33 - Esquema *ilustrativo do* arranjo dos nanomateriais híbridos responsivos ( ${}_{SA}CALB/AuNP-PNI$  e  $AuNP@CALB-PNI$ ) e a resposta do material à temperatura. Na figura é mostrado o comportamento esperado do material híbrido, no qual com o colapso das cadeias poliméricas (devido ao aumento da temperatura) pode ocorrer a reação que transforma o substrato (S) em produto (P). Fonte: A autora (2024).

A fim de observar se a estrutura proposta para o nanomaterial híbrido havia sido formada como é mostrado na FIGURA 33, os materiais  ${}_{SA}CALB/AuNP-PNI$  e  $AuNP@CALB-PNI$  foram analisadas por MET. Na FIGURA 34 pode ser observado que os dois nanomateriais híbridos formaram estruturas arredondadas, nas quais o polímero envolve as AuNPs funcionalizadas com a enzima. As estruturas formadas possuem tamanho consideravelmente maior que o das  $AuNP/citrato$ ,  $AuNP@CALB$  e  ${}_{SA}CALB/AuNP$ . Aumentando-se a magnificação das imagens (FIGURA 34(c) e 34(g)) é observado que várias nanopartículas estão contidas dentro de cada uma destas estruturas. O tamanho médio dos nanomateriais híbridos foram estimados utilizando-se o software *ImageJ*, no qual foram calculados os valores de  $148.2 \pm 32.2$  nm para  $AuNP@CALB-PNI$  e  $46.1 \pm 7.7$  nm para  ${}_{SA}CALB/AuNP-PNI$ .

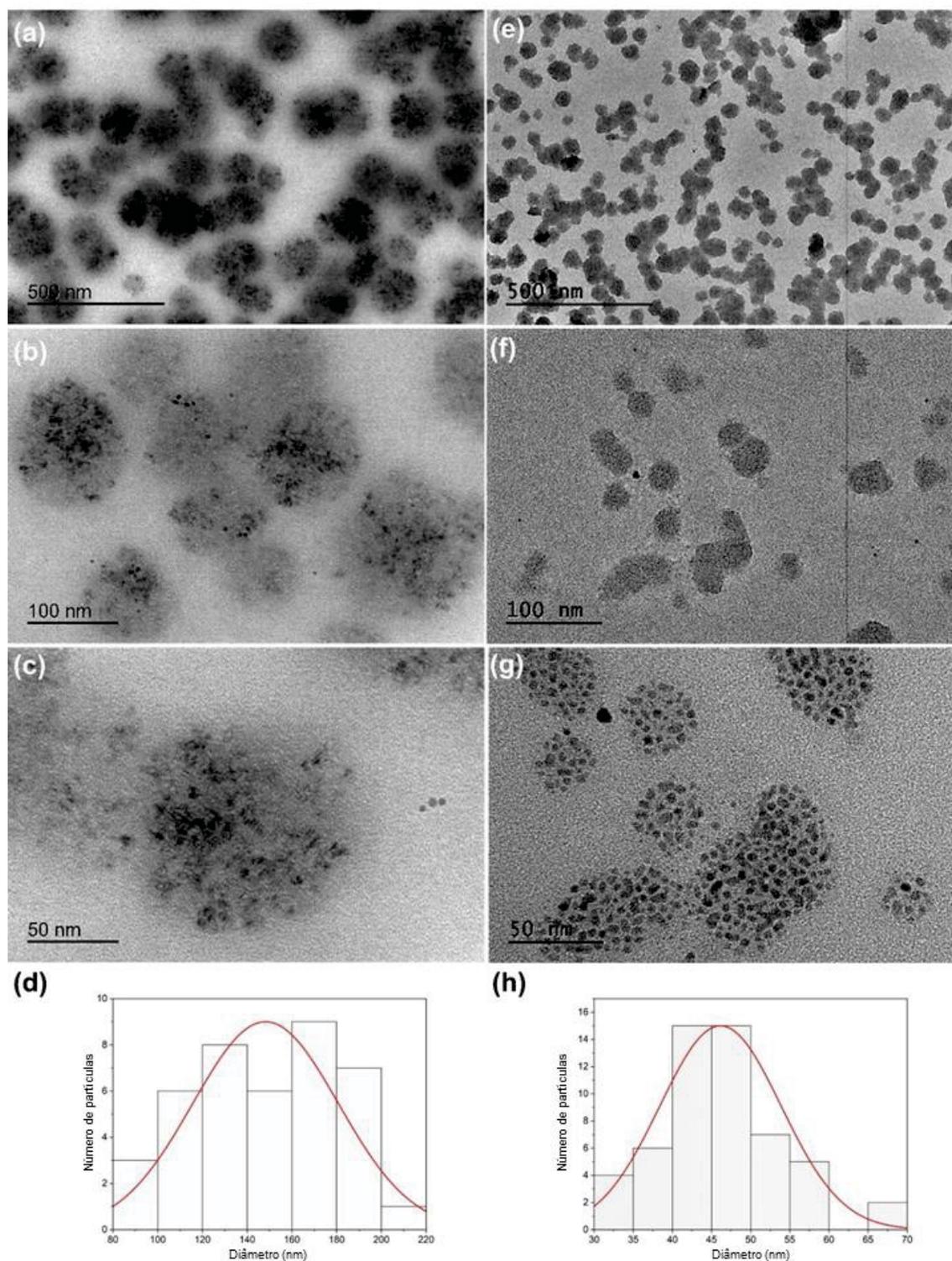


FIGURA 34 - Imagens de MET obtidas para (a-c) AuNP@CALB-PNI e (e-g)  $S_A$ CALB/AuNP-PNI. Histogramas da distribuição de tamanho associados aos nanomateriais híbridos (d) AuNP@CALB-PNI e (h)  $S_A$ CALB/AuNP-PNI.

Não foram observados agregados de nanopartículas nem excesso de nenhum dos materiais no exterior das estruturas definidas como nanomaterial híbrido. A utilização de concentrações menores de PNIPAm ou de um polímero com massa molar inferior ( $M_w \sim$

2500 g mol<sup>-1</sup>) com o propósito de obter nanomateriais híbridos (exemplificado na Figura S18) revelou-se insuficiente para induzir a formação de estruturas análogas às apresentadas nas FIGURA 33 e FIGURA 34. Esse fenômeno provavelmente decorreu do tamanho/concentração das cadeias poliméricas serem inadequados para conferir o recobrimento adequado às NPs funcionalizadas. Adicionalmente, a incorporação do polímero durante a síntese das AuNPs não conduziu à formação de um material conforme ilustrado na FIGURA 33. Ao invés disso, propiciou a formação de estruturas morfologicamente caracterizadas como sendo do tipo verme (“*worm-like*”), nas quais ocorre a coalescência parcial das nanopartículas. Imagens de MET referentes a estes casos são apresentadas como material suplementar (Figuras S18 e S19). Portanto, pode-se inferir que o protocolo estabelecido para o desenvolvimento do material híbrido mostrou-se apropriado, culminando no material híbrido de interesse, cuja estrutura é mostrada na FIGURA 33.

A análise do tamanho dos nanomateriais híbridos (AuNP@CALB-PNI e <sub>SA</sub>CALB/AuNP-PNI) e sua variação com a temperatura foi conduzida por meio de medidas de DLS. Essa técnica possibilita a obtenção do diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) de partículas em uma dispersão. O  $D_h$  refere-se ao tamanho aparente de uma partícula ou molécula em um fluido, levando-se em consideração seu tamanho, formato, movimento e interação com o meio (MAGUIRE et al., 2018). Dessa forma, o tamanho hidrodinâmico obtido pode ser maior que o tamanho real da partícula (determinado por outras técnicas) (TUORINIEMI et al., 2014). Na FIGURA 35 são mostradas as variações nos diâmetros hidrodinâmicos dos dois nanomateriais híbridos com a temperatura (no intervalo entre 20 °C e 40 °C). Em ambos os casos se observou uma redução do tamanho das estruturas quando a temperatura ultrapassa a temperatura de transição do PNIPAm. Esse fenômeno evidencia o comportamento responsivo do polímero, resultando na diminuição do tamanho devido ao colapso das cadeias poliméricas. Os valores obtidos em 40 °C são significativamente superiores ao tamanho das AuNPs funcionalizadas com a CALB, indicando que a mudança de conformação do polímero não resulta na eliminação do nanomaterial híbrido. Essa constatação é corroborada ao avaliar a redução da temperatura para 25 °C, na qual é observada que o AuNP@CALB-PNI retorna a um tamanho semelhante ao medido a 25 °C durante o aquecimento.

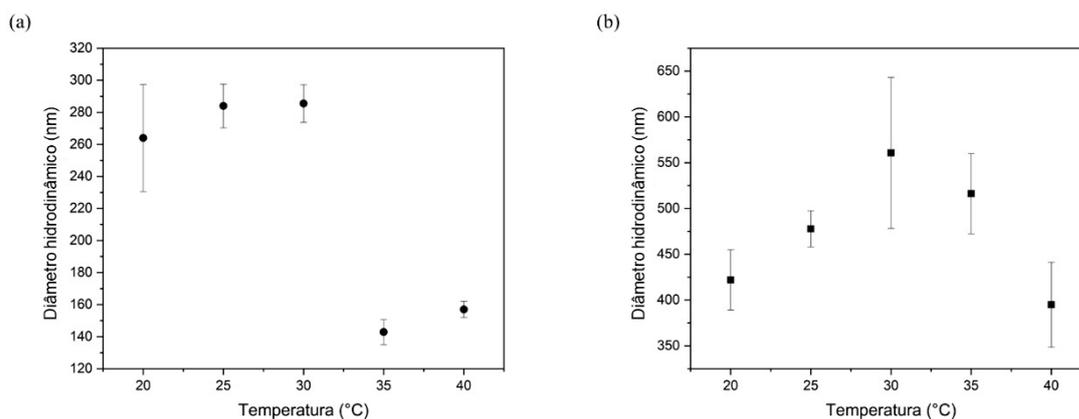


FIGURA 35 - Variação do tamanho dos nanomateriais híbridos (a) AuNP@CALB-PNI e (b)  $SA$ CALB/AuNP-PNI em função da temperatura acompanhada por medidas de DLS.

A formação do material híbrido pode afetar a temperatura de transição do polímero termorresponsivo. Para verificar se a presença dos outros componentes (AuNP e CALB) levaram a alguma mudança no  $T_{cp}$  do PNIPAm, foi realizada a análise por turbidimetria do  $SA$ CALB/AuNP-PNI (FIGURA 36) e AuNP@CALB-PNI (FIGURA 37). Para cada uma das amostras foi realizado um ciclo de aquecimento-resfriamento e determinação da  $T_{cp}$  da mesma forma que foi feito para o PNIPAm. Houve uma pequena diminuição nos valores da  $T_{cp}$ , sendo encontrados os valores de 32,5 °C ( $SA$ CALB/AuNP-PNI) e 33,0 °C (AuNP@CALB-PNI), em relação ao valor de 33,5 °C obtido para o PNIPAm. Portanto, pode ser inferido que a formação do nanomaterial híbrido não influenciou significativamente no valor da  $T_{cp}$  do PNIPAm, não levando ao impedimento do uso destes materiais para o estudo da catálise enzimática.

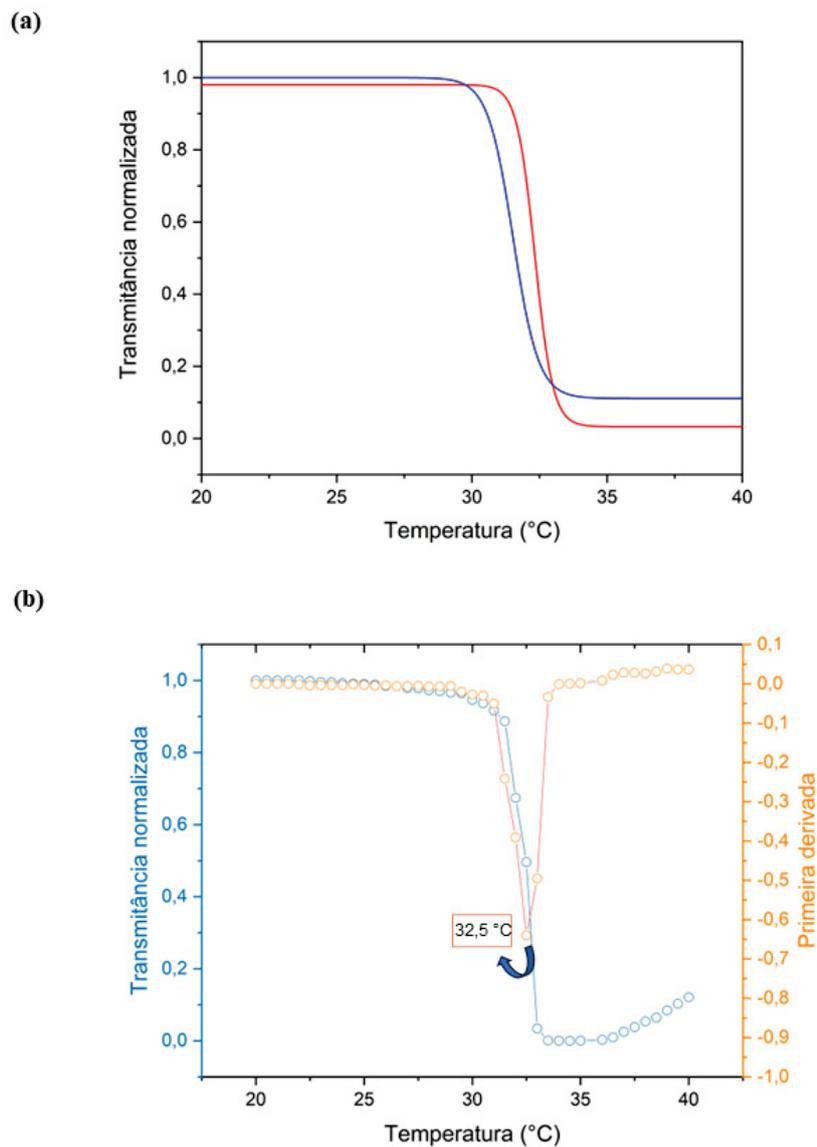


FIGURA 36 - Análise de turbidimetria do nanomaterial híbrido  $s_A$ CALB/AuNP-PNI. (a) Curva de aquecimento-resfriamento e (b) determinação da  $T_{cp}$  do material. As curvas em vermelho e azul representam a rampa de aquecimento e resfriamento, respectivamente.

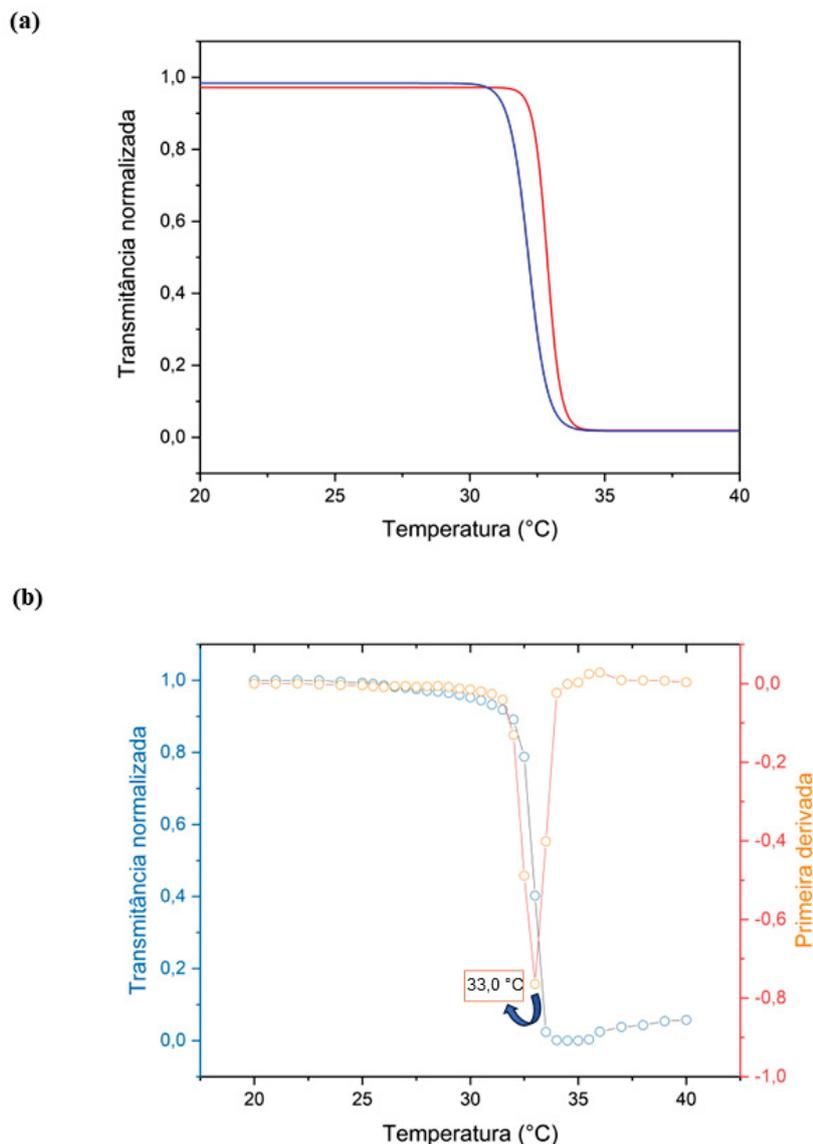


FIGURA 37 - Análise de turbidimetria do nanomaterial híbrido AuNP@CALB-PNI. (a) Curva de aquecimento-resfriamento e (b) determinação da  $T_{cp}$  do material. As curvas em vermelho e azul representam a rampa de aquecimento e resfriamento, respectivamente.

Outra forma utilizada para verificar o efeito da temperatura sob o nanomaterial híbrido foi o acompanhamento da fluorescência dos resíduos Trp da enzima com o aumento da temperatura. Na FIGURA 38 é possível observar que o  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de emissão dos resíduos de Trp para AuNP@CALB-PNI sofre um deslocamento para  $\lambda$  menores (*blueshift*), o que pode ser interpretado como um indício de que os resíduos de Trp estão menos expostos ao meio, provavelmente pela ação do polímero no nanomaterial híbrido. É interessante observar que com o aumento da temperatura, entre as medidas a 30 °C e 35 °C, ocorre um aumento da intensidade de fluorescência. Como foi observado que o PNIPAm sofre uma mudança de conformação em 33,5 °C, esse aumento na intensidade está associado a forma colapsada das

cadeias, o que leva a uma maior exposição da enzima ao meio. Para o caso do nanomaterial híbrido  $s_A$ CALB/AuNP-PNI (FIGURA 39) também é observado um deslocamento de  $\lambda_{\text{máx}}$  para  $\lambda$  menores (entre 317 e 319 nm). De forma análoga ao relatado para AuNP@CALB-PNI, esse deslocamento está associado à exposição da enzima ao meio.

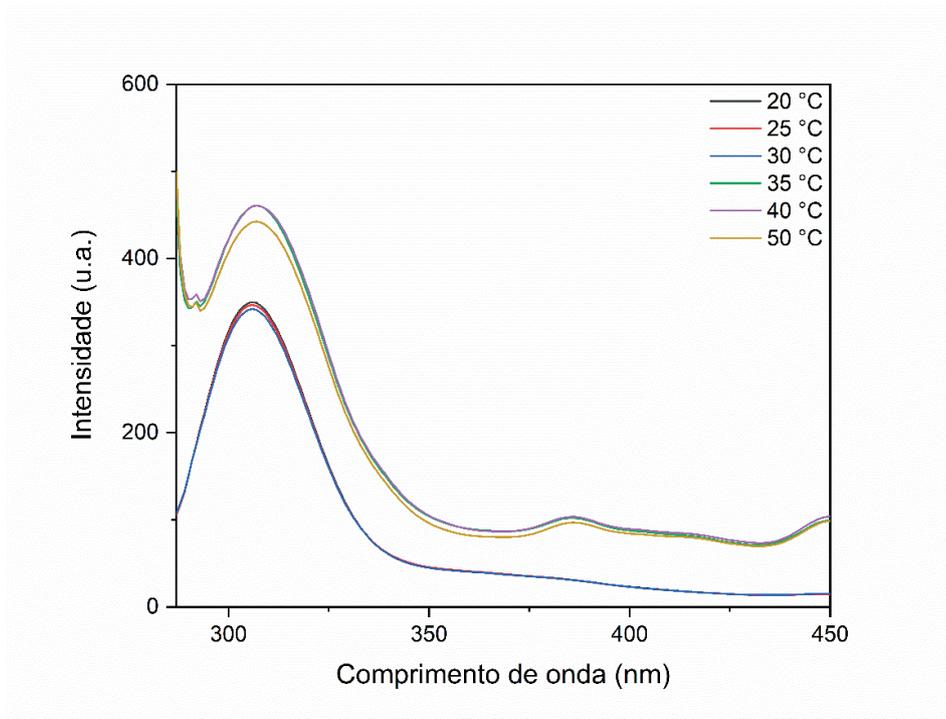


FIGURA 38 - Espectro de emissão de fluorescência do Trp para AuNP@CALB-PNI em diferentes temperaturas.

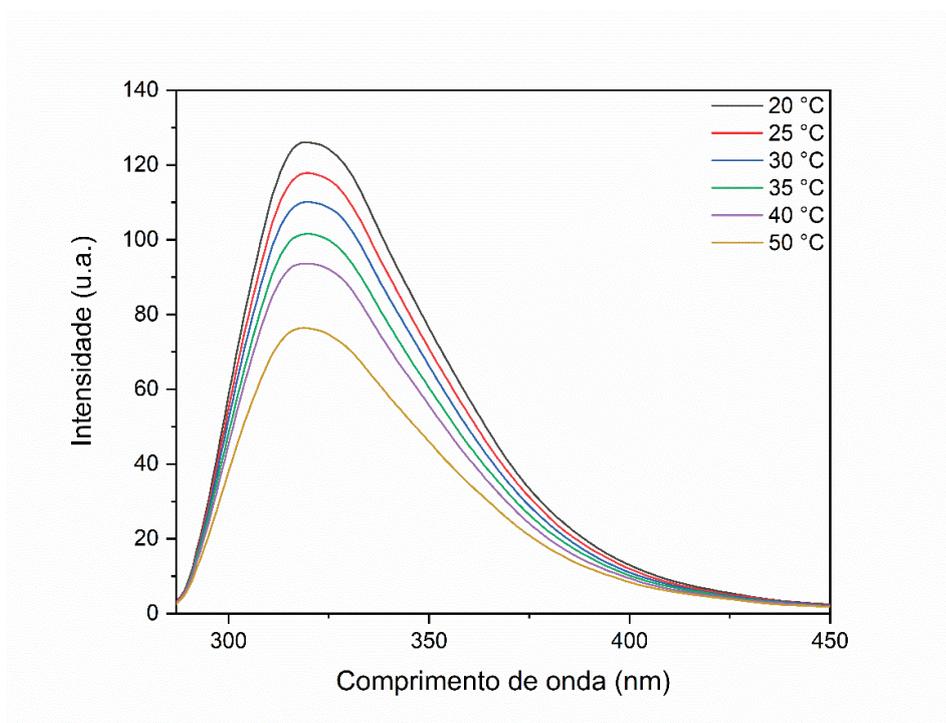


FIGURA 39 - Espectro de emissão de fluorescência do Trp para  $s_A$ CALB/AuNP-PNI em diferentes temperaturas.

A partir da caracterização dos nanomateriais híbridos (AuNP@CALB-PNI e  $_{SA}$ CALB/AuNP-PNI), observa-se que sua formação ocorreu de maneira eficiente, sem prejudicar as características de cada um dos materiais e sem afetar a estrutura terciária da enzima. Por meio da comparação entre as características dos materiais isolados e dos MH, foi constatado um aumento significativo do tamanho dos MH por meio da técnica de DLS, o que também foi visualizado por imagens de MET. A interação entre a CALB e as AuNPs foi estudada por diferentes técnicas, as quais mostraram que a interação entre os dois não foi afetada pela mudança de temperatura às quais foram submetidos. As análises de espectroscopia de fluorescência também mostraram que em torno da T<sub>cp</sub> do PNIPAm ocorrem mudanças da fluorescência do MH. Como a mudança de conformação do polímero é um ponto importante deste trabalho, também houve a preocupação de garantir que a T<sub>cp</sub> nos MH ocorresse em valores próximos a do PNIPAm. Foi confirmado que a transição para estes materiais ocorre em temperaturas próximas a do PNIPAm (0,5 °C e 1,0 °C menores do que no polímero sozinho). De forma geral, o estudo das características dos nanomateriais AuNP@CALB-PNI e  $_{SA}$ CALB/AuNP-PNI mostraram que eles são adequados para os estudos de atividade enzimática e comparação entre a enzima livre, imobilizada nas AuNPs e no nanomaterial híbrido.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o estudo da atividade enzimática da CALB foi escolhida a reação de acilação do 1-feniletanol, pois este é um substrato modelo bastante comum em reações empregando lipases, sendo já bem descrito na literatura (BANDEIRA et al., 2017; DE LOS RÍOS; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2012; HOFFMANN; SILVA; NASCIMENTO, 2011; MÄKI-ARVELA et al., 2010). Como a temperatura é um dos fatores que influencia a atividade enzimática, a reação de acilação foi executada em diferentes temperaturas, entre 0 °C e 65 °C, a fim de comparar a reação da enzima na forma livre e imobilizada nas AuNPs. Como já relatado anteriormente, as enzimas possuem uma “temperatura ótima”, na qual a atividade enzimática é mais eficiente. No caso da CALB é relatado na literatura que a “temperatura ótima” ocorre em torno de 40 °C (TAMBUNAN; RANDY; PARIKESIT, 2014), no entanto, esse valor pode variar dependendo das condições da reação. Por exemplo, para uma reação de hidrólise do *p*NPP em tampão PBS a temperatura ótima determinada foi 45 °C (SHANGGUAN et al., 2020). Espera-se que por meio da imobilização da CALB nas

AuNPs, a atividade enzimática seja mantida. Além disso, para temperaturas superiores à temperatura ótima, a imobilização da enzima pode resultar em uma melhora na estabilidade, refletindo na quantidade de produto formado.

É amplamente conhecido que, dentro de uma faixa de temperatura específica, o aumento da temperatura está associado ao aumento da taxa de reação e, conseqüentemente, da atividade enzimática. Em temperaturas mais baixas, a atividade enzimática diminui devido à reduzida movimentação das moléculas. Portanto, em temperaturas menores, tanto o substrato quanto a enzima possuem menor mobilidade, resultando em uma diminuição na frequência de colisões bem-sucedidas. Essas colisões são cruciais para a interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima, levando a formação do produto desejado. Com a diminuição da temperatura a tendência é que a atividade enzimática também diminua e, eventualmente a enzima torna-se inativa. Para CALB imobilizada em NPs de sílica já foi relatado que a atividade enzimática diminui para aproximadamente 0,2 U quando a temperatura é 0 °C (GIUNTA et al., 2023). Como pode ser visto na FIGURA 40, isso é observado tanto para o CALB livre quanto para os MH. Para os MH, a reação não era esperada a essa temperatura devido à conformação estendida do polímero e à sua posição no MH, que poderiam dificultar ou impedir a aproximação entre substrato e enzima, especialmente considerando que a temperatura da reação é inferior à temperatura de transição do polímero.

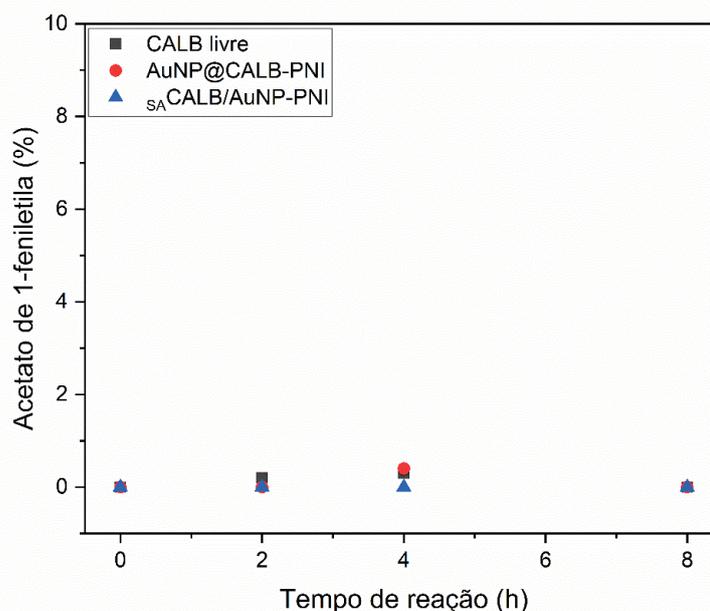


FIGURA 40 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 0 °C utilizando a CALB livre e nanomateriais híbridos como catalisadores da reação.

Por isso, optou-se por realizar a mesma reação em uma temperatura maior (25 °C), mas que ainda fosse inferior a  $T_{cp}$  do PNIPAm, a fim de observar a reação catalisada pela enzima livre. Além da CALB em sua forma livre e dos nanomateriais híbridos (AuNP@CALB-PNI e  $_{SA}CALB/AuNP-PNI$ ) e demais materiais com CALB imobilizada (AuNP@CALB e  $_{SA}CALB/AuNP$ ) foram estudados como possibilidades para a catálise desta reação. Na FIGURA 41 são mostradas as curvas obtidas para os materiais utilizados nestas reações. AuNP/citrato e PNIPAm foram utilizados como controles para esta reação, uma vez que ambos não possuem a CALB presente, mostrando que nestes casos a reação não ocorre, mesmo após 8 h. Para o cálculo da conversão das reações foi utilizada uma curva de calibração do acetato de 1-feniletila (Figura S20), a qual permitiu calcular a quantidade de produto formado em cada uma das reações com base na intensidade do sinal observado em 7,1 min no cromatograma. Quando se analisa a curva da CALB livre, observa-se um aumento quase constante durante as primeiras 4 h, nas quais a produção de acetato de 1-feniletila atinge 4,4% após 4 h. Isso ocorre devido a disponibilidade do sítio ativo das enzimas neste momento da reação. Com o progresso da reação, o substrato vai sendo consumido, e a taxa de reação diminui, uma vez que os sítios ativos das enzimas vão sendo saturados.

Ao dirigir o foco da análise para as duas espécies de AuNPs funcionalizadas com a enzima (AuNP@CALB e  $_{SA}CALB/AuNP$ ), observa-se que a taxa de reação durante a primeira metade do tempo de reação analisado é bem menor que ao da enzima livre. Os valores de conversão para as reações à 25 °C são mostrados na TABELA 6. A imobilização da CALB na superfície das AuNPs pode ter um impacto na acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima. Mas, ao final do tempo de reação (8 h) a quantidade de produto formado é superior a 6%, sendo levemente superior àquela observada para a CALB livre, mostrando que após o processo de imobilização a atividade desta enzima é mantida. Por fim, a formação de produto quando é utilizado algum dos MHs é bem inferior à dos análogos (AuNP@CALB e  $_{SA}CALB/AuNP$ ) que não contém o polímero. Assim, foi observado que ambos os MHs demonstram controle sob a atividade da CALB, quando a reação é realizada em temperaturas menores que a  $T_{cp}$  do PNIPAm. As reações que utilizaram AuNP@CALB-PNI e  $_{SA}CALB/AuNP-PNI$  tiveram conversão de 2,4% e 0,8%, respectivamente.

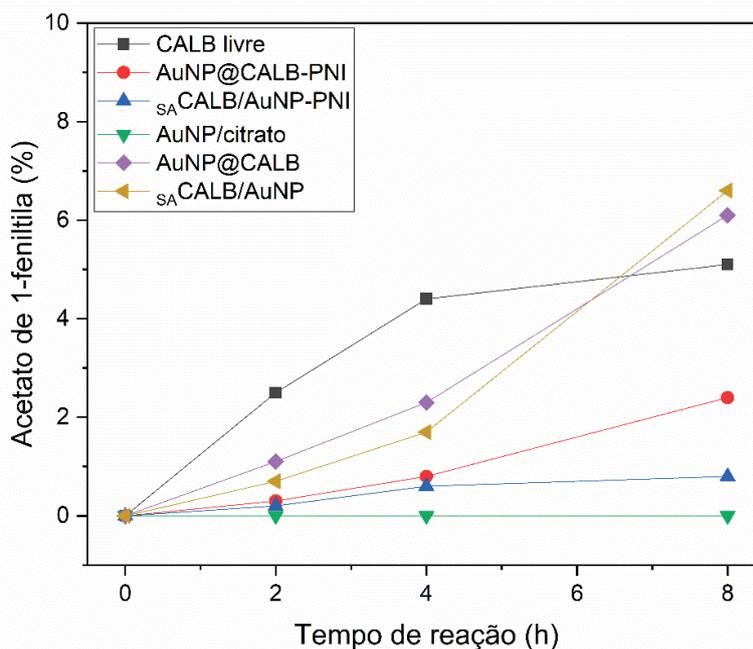


FIGURA 41 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 25 °C utilizando CALB livre, nanomateriais híbridos e AuNPs funcionalizadas como catalisadores da reação.

TABELA 6 - DADOS DA REAÇÃO À 25 °C MOSTRANDO A EVOLUÇÃO DA % DE ACETATO DE 1-FENILETILA FORMADO AO LONGO DA REAÇÃO.

Catalisador	Conversão (%)		
	2 h	4 h	8 h
CALB livre	2,5	4,4	5,1
AuNP@CALB-PNI	0,3	0,8	2,4
SA-CALB/AuNP-PNI	0,2	0,6	0,8
AuNP/citrato	0	0	0
AuNP@CALB	1,1	2,3	6,1
SA-CALB/AuNP	0,7	1,7	6,6

Quando os mesmos sistemas são mantidos a 35 °C (uma temperatura logo acima da  $T_{cp}$  determinada para o PNIPAm), como é mostrado na FIGURA 42, percebe-se que ocorre uma mudança no comportamento dos MHs. A reação feita utilizando o controle (AuNP/citrato) permanece não levando a formação do acetato de 1-feniletila, como esperado. A enzima livre mantém um perfil de reação similar ao observado à 25 °C. Neste caso teve-se um aumento de conversão durante o tempo em que a reação foi analisada, levando a formação de 7,5% de acetato de 1-feniletila após 8 h. Na TABELA 7 estão compilados os valores de conversão observados para todas as reações realizadas à 35 °C. Quando se avalia o progresso da reação para os 2 MHs, observa-se que no caso do AuNP@CALB-PNI, o comportamento segue o mesmo perfil observado para a CALB livre,

levando a 7,9% de conversão ao final da reação. Para  $s_A$ CALB/AuNP-PNI o início da reação parece ocorrer mais lentamente, tendo formado apenas ~1% de produto após 2 h. Entre 2 e 8 h de reação tem-se um aumento contínuo de formação de produto, atingindo 6,3% de conversão ao final da reação. Em ambos os casos, ao final da reação, a conversão das reações que utilizaram os MHs é próxima à da CALB livre. Quando são analisadas as reações catalisadas pela CALB imobilizada nas AuNPs, temos um perfil semelhante, com um aumento da taxa de reação mais acentuado para AuNP@CALB. No entanto, enquanto a reação catalisada por AuNP@CALB leva a formação de 6,7% de produto após 8 h, a reação com  $s_A$ CALB/AuNP resulta em apenas 2,5%.

TABELA 7 - DADOS DA REAÇÃO À 35 °C MOSTRANDO A EVOLUÇÃO DA % DE ACETATO DE 1-FENILETILA FORMADO AO LONGO DA REAÇÃO.

Catalisador	Conversão (%)		
	2 h	4 h	8 h
CALB livre	3,9	4,9	7,5
AuNP@CALB-PNI	3,8	5,4	7,9
$s_A$ CALB/AuNP-PNI	0,9	3,1	6,3
AuNP/citrato	0	0	0
AuNP@CALB	0,6	5,6	6,7
$s_A$ CALB/AuNP	0,7	1,9	2,5

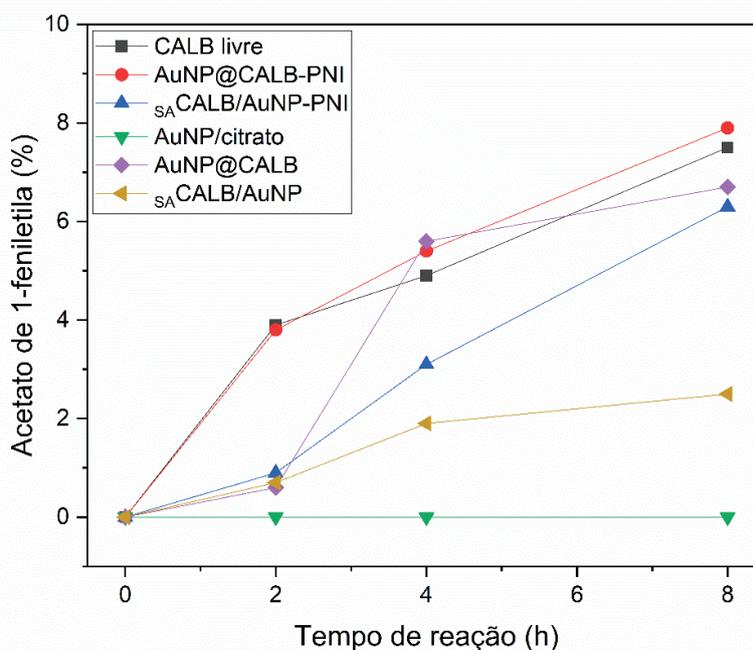


FIGURA 42 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 35 °C utilizando CALB livre, nanomateriais híbridos e AuNPs funcionalizadas como catalisadores da reação.

A incorporação de enzimas em AuNPs pode levar a maior estabilidade térmica destas enzimas, conferindo-lhes proteção contra a desnaturação. Com o intuito de investigar o impacto da imobilização da CALB nas AuNPs sobre a atividade enzimática em reações realizadas acima da temperatura de desnaturação da CALB, a mesma reação foi conduzida à 65 °C (FIGURA 43). A escolha desta temperatura baseou-se no valor da temperatura de desnaturação previamente determinada por nanoDSF (estabelecida em 58,4 °C para a CALB). Dessa maneira, ao realizar a reação a 65 °C, acreditava-se que devido a temperatura, as mudanças estruturais sofridas pela enzima impossibilitariam a formação de produto. Para a CALB livre, uma quantidade muito pequena (inferior a 1%) de conversão foi observada ao término da reação, indicando que a mudança conformacional sofrida pela enzima impediu a interação efetiva com o substrato. Notavelmente, em todos os casos nos quais a CALB estava imobilizada em AuNPs, observou-se uma quantidade considerável de produto formado, evidenciando a melhora na estabilidade térmica decorrente da imobilização da enzima. Na TABELA 8 são mostradas as conversões para todas as reações realizadas 65 °C. Novamente, é observado que a reação que utilizou AuNP@CALB-PNI leva a maior conversão (entre todos os catalisadores testados), sendo este valor de 8,5% após 8 h. As outras 3 espécies contendo a CALB imobilizada apresentaram valores parecido ao final da reação, um pouco abaixo de 5%.

TABELA 8 - DADOS DA REAÇÃO À 65 °C MOSTRANDO A EVOLUÇÃO DA % DE ACETATO DE 1-FENILETILA FORMADO AO LONGO DA REAÇÃO.

Catalisador	Conversão (%)		
	2 h	4 h	8 h
CALB livre	0	0,5	0,7
AuNP@CALB-PNI	4,5	5,2	8,5
<sub>sA</sub> CALB/AuNP-PNI	1,4	2,1	4,9
AuNP/citrato	0	0	0
AuNP@CALB	0,2	4,3	4,6
<sub>sA</sub> CALB/AuNP	0,8	1,2	4,6

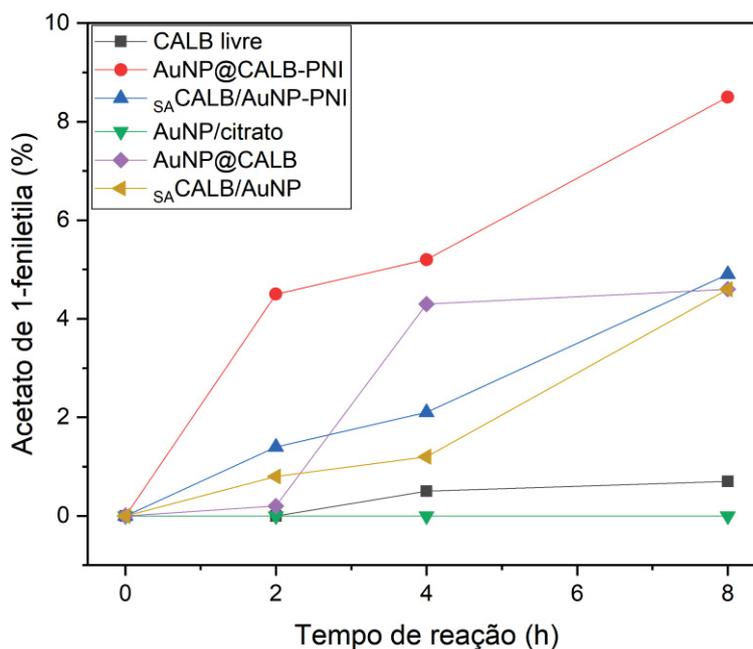


FIGURA 43 - Acompanhamento da formação de acetato de 1-feniletila nas reações realizadas a 65 °C utilizando CALB livre, nanomateriais híbridos e AuNPs funcionalizadas como catalisadores da reação.

Com o intuito de verificar como a transição de temperatura afetaria a reação, implementou-se um sistema no qual as reações foram mantidas inicialmente a 25 °C por 4 h (T1). Posteriormente, a temperatura foi elevada para 45 °C (T2), permanecendo nesta temperatura por 4 h, antes de ser reduzida novamente para 25 °C (T3), completando um tempo total de reação de 24 h. Os resultados desta análise para a CALB livre e MHs são apresentados na FIGURA 44. Conforme antecipado, a formação do produto é evidenciada desde o primeiro ponto analisado para a CALB livre. O aumento da temperatura para 45 °C resulta em um aumento na inclinação da curva (em comparação com os dois pontos analisados em T1). Ao retornar para 25 °C, a reação continua ocorrendo, tendo uma taxa de reação semelhante a observada para o intervalo T2. Porém, ao examinar ambos os MHs, nenhum produto é detectado durante o intervalo T1, mostrando que existe o controle da atividade para esta temperatura. Com o aumento da temperatura para 45 °C (em T2), a reação ocorre com um perfil e conversão semelhantes ao da enzima livre (neste mesmo intervalo). Com isso, evidencia-se que a elevação na temperatura (acima da  $T_{cp}$  do PNIPAm) desencadeia uma mudança de conformação no nanomaterial híbrido, a qual permite que a reação ocorra. Ao diminuir a temperatura novamente para 25 °C (intervalo T3), observa-se a redução na taxa de reação tanto para AuNP@CALB-PNI quanto SA-CALB/AuNP-PNI,

evidenciando que uma nova mudança de conformação ocorreu, a qual interfere na interação enzima-substrato. É evidente que o controle da atividade enzimática continua ocorrendo em T3 para as reações que utilizaram MHs, especialmente para AuNP@CALB-PNI, mesmo após a reação ser mantida a 25 °C por 16 h. Nas TABELA 9 e TABELA 10 são mostrados os valores de conversão e de taxa de reação de cada uma das reações em cada intervalo, calculadas conforme a Equação 7.

$$T = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \quad (\text{Equação 7})$$

Em que [P] é a concentração de produto formado e t representa um tempo de reação. Assim, é possível determinar a taxa de reação (T) como a razão entre a variação da concentração de produto que é formado ao longo de um intervalo de tempo.

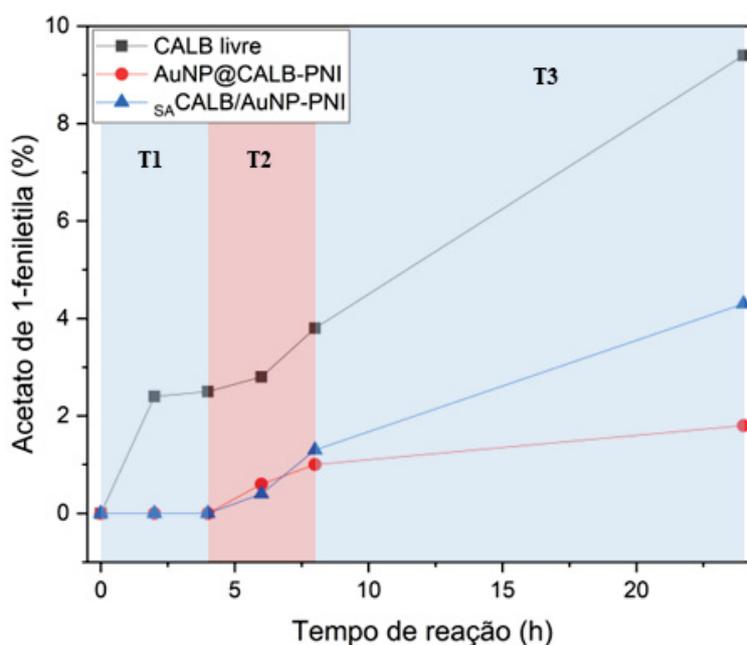


FIGURA 44 - Efeito da temperatura na formação de acetato de 1-feniletila utilizando CALB livre, AuNP@CALB-PNI e SA CALB/AuNP-PNI. As regiões marcadas em azul (T1 e T3) representam os intervalos nos quais a temperatura do meio reacional era de 25 °C, enquanto a região em vermelho (T2) corresponde ao intervalo em que a temperatura era de 45 °C.

TABELA 9 - CONVERSÃO DAS REAÇÕES COM MUDANÇA DE TEMPERATURA MOSTRADAS NA FIGURA 44.

Catalisador	Conversão (%)				
	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h
CALB livre	2,4	2,5	2,8	3,8	9,4
AuNP@CALB-PNI	0	0	0,6	1,0	1,8
<sub>SA</sub> CALB/AuNP-PNI	0	0	0,4	1,3	4,3

TABELA 10 – TAXA DE REAÇÃO CALCULADAS PARA TODAS AS REAÇÕES NOS INTERVALOS MOSTRADOS NA FIGURA 44.

Catalisador	Taxa de reação (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		
	T1	T2	T3
CALB livre	0,347	0,199	0,184
AuNP@CALB-PNI	0	0,115	0,023
<sub>SA</sub> CALB/AuNP-PNI	0	0,156	0,092

Este resultado mostrou o efeito da temperatura sob as reações utilizando os MHs e que é possível visualizar mudanças na atividade enzimática por meio da alteração da temperatura da reação. Foram então propostas as reações apresentadas na FIGURA 45. Para esta análise o tempo total de reação foi de 8 h, com intervalos de 2 h, nos quais a temperatura era de 25 °C ou 45 °C.

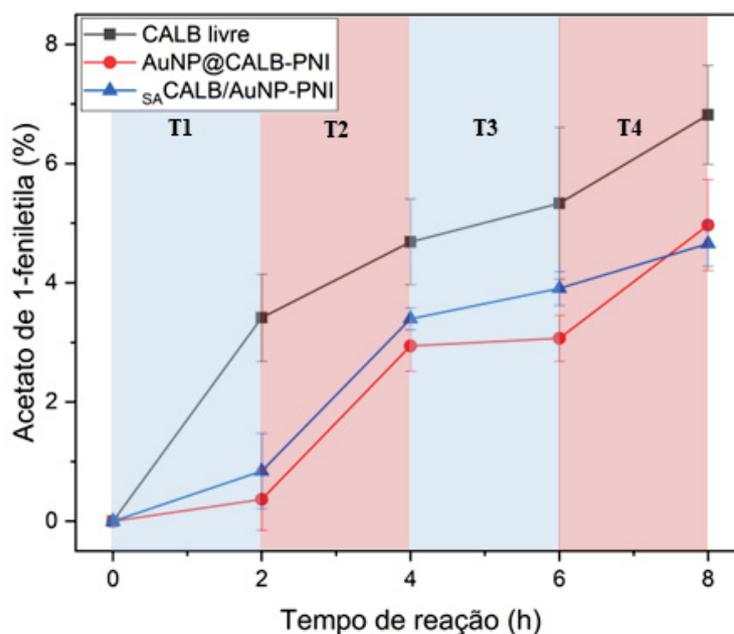


FIGURA 45 - Estudo do controle da atividade enzimática por meio de mudanças na temperatura do meio reacional utilizando CALB livre, AuNP@CALB-PNI e <sub>SA</sub>CALB/AuNP-PNI como catalisadores. Os intervalos T1 e T3 representam os intervalos nos quais a temperatura do meio reacional era de 25 °C e nos intervalos T2 e T4 a temperatura era de 45 °C.

Como esperado, a curva da reação da CALB livre apresentou uma velocidade inicial maior e, ao longo da reação manteve a conversão similar ao observado para este biocatalisador nos ensaios anteriores (conversão de 6,8% após 8 h de reação), como pode ser visto na TABELA 11. Quando se analisa as curvas obtidas para AuNP@CALB-PNI e  $s_{A}CALB/AuNP-PNI$ , observa-se que inicialmente a reação praticamente não ocorre, visto que a temperatura do meio reacional é inferior a  $T_{cp}$  do PNIPAm. No intervalo T2 (45 °C) observou-se o aumento da taxa de reação, indicando a mudança de conformação do polímero, que permitiu a interação da CALB com o substrato. Durante este intervalo ambos os MHs apresentaram valores semelhantes de conversão de  $\sim 2,5\%$ . Ao diminuir a temperatura em T3 (25 °C), foi observada uma diminuição na inclinação das retas para as reações com os MHs, mostrando que a diminuição da temperatura levou a mudanças no MHs que possibilitaram a controle da reação. Com o aumento da temperatura para 45 °C (T4), a reação do MH AuNP@CALB-PNI apresentou um aumento mais acentuado da taxa de reação, similar ao observado para a CALB livre neste mesmo intervalo. No entanto, o MH  $s_{A}CALB/AuNP-PNI$  apresentou um aumento menos pronunciado neste intervalo, mostrando que performance deste MH foi de alguma forma afetada pela variação da temperatura.

Com base nestes resultados pode-se confirmar que para ambos os MHs ocorreu a modulação da atividade enzimática com a temperatura. No entanto, para o  $s_{A}CALB/AuNP-PNI$  a modulação funcionou durante o primeiro aquecimento (até o final do intervalo T2 na FIGURA 45) apenas, enquanto para o AuNP@CALB-PNI o controle continuou ocorrendo durante T3 e T4. Na TABELA 12 são mostrados os valores das taxas de reação das reações mostradas na FIGURA 45.

TABELA 11 - CONVERSÃO DAS REAÇÕES COM MUDANÇA DE TEMPERATURA MOSTRADAS NA FIGURA 45.

Catalisador	Conversão (%)			
	2 h	4 h	6 h	8 h
CALB livre	3,4	4,7	5,3	6,8
AuNP@CALB-PNI	0,4	2,9	3,1	5,0
$s_{A}CALB/AuNP-PNI$	0,8	3,4	3,9	4,7

TABELA 12 – TAXA DE REAÇÃO CALCULADAS PARA TODAS AS REAÇÕES NOS INTERVALOS MOSTRADOS NA FIGURA 45.

Catalisador	Taxa de reação (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			
	T1	T2	T3	T4
CALB livre	1,6018	0,5725	0,2998	0,5113
AuNP@CALB-PNI	0,1876	1,0477	0,1365	0,6603
<sub>s</sub> A CALB/AuNP-PNI	0,4652	0,9562	0,1827	0,2652

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Por meio da utilização de uma metodologia simples foi possível obter AuNPs estáveis e que foram empregadas como suporte para a enzima CALB, a qual atuou também como agente estabilizante das NPs. O processo de adsorção se mostrou eficiente, fazendo com que AuNPs e CALB tivessem uma boa interação sem que a imobilização da CALB levasse a perda de suas propriedades. A manutenção da estrutura tridimensional da enzima após a imobilização foi verificada, não tendo sido constatadas mudanças mesmo com a elevação da temperatura.

O polímero PNIPAm foi sintetizado com bons rendimentos e a análise das propriedades de PNI1 e PNI2 levaram à conclusão de que as diferenças entre eles tem relação com a temperatura em que as sínteses foram realizadas. As caracterizações do polímero tiveram um foco especial em seu comportamento termorresponsivo, que se manteve, sendo observada apenas uma pequena diferença no valor de  $T_{cp}$  ( $\sim 32$  °C), após a formação dos nanomateriais híbridos.

Na caracterização dos nanomateriais híbridos propostos (AuNP@CALB-PNI e SA<sub>CALB</sub>/AuNP-PNI) foram visualizadas as estruturas formadas, que condizem com a estrutura que havia sido proposta inicialmente. As características apresentadas pelos MHs apontaram que estes materiais tinham potencial para atuarem na regulação da atividade enzimática da CALB. Estudos da atividade enzimática revelaram uma melhora na termoestabilidade da CALB quando ela está imobilizada nas AuNPs, mantendo a atividade catalítica mesmo em temperaturas acima da temperatura de desnaturação da enzima. A realização da reação de acilação do 1-feniletanol em diferentes temperaturas permitiu averiguar o efeito termorresponsivo do polímero (presente nos MHs). Foi demonstrado que para temperaturas abaixo da  $T_{cp}$  do PNIPAm a atividade enzimática é controlada, sendo menor do que da enzima em sua forma livre. No entanto, quando a temperatura é elevada acima da  $T_{cp}$ , os MHs apresentam maior atividade, exibindo um perfil mais parecido com o da CALB livre nas mesmas condições. Com a variação da temperatura durante as reações foi observada a influência da temperatura sob a conversão das reações que utilizaram MHs, evidenciando a modulação da atividade enzimática. Em especial o MH AuNP@CALB-PNI demonstrou ser capaz de modular a atividade enzimática reversivelmente por mais de uma variação de aquecimento-resfriamento. Dessa forma, os nanomateriais híbridos desenvolvidos neste trabalho mostraram-se como uma promissora alternativa para a regulação da atividade enzimática da CALB.

Com base nos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, abre-se um vasto horizonte de possibilidades para pesquisas futuras dentro deste tópico. Uma das direções que pode ser explorada é a utilização de diferentes polímeros ou copolímeros responsivos a temperatura ou outros tipos de estímulos externos. Além disso, há a possibilidade de investigar a variação de alguns parâmetros relevantes da síntese, como o tempo de reação, temperatura, quantidade de enzima e substrato, visando um maior entendimento e otimização das reações enzimáticas. Outra linha de pesquisa promissora consiste na avaliação desses materiais híbridos em diferentes reações químicas, como, por exemplo, a reação de hidrólise do éster (reação inversa à realizada neste trabalho) ou a utilização de outros substratos. Adicionalmente, a exploração da aplicação de outras enzimas neste tipo de material também representa uma área de estudo relevante. Em síntese, os nanomateriais híbridos são promissores e apresentam um vasto potencial para contribuir para o avanço científico nas áreas de biocatálise e nanotecnologia.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADEOGUN, A. I. et al. Comparative adsorption of amylase, protease and lipase on ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: kinetics, isothermal and thermodynamics studies. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, 1 jul. 2017.
- AGGAS, J. R.; GUISEPPI-ELIE, A. Responsive Polymers in the Fabrication of Enzyme-Based Biosensors. Em: **Biomaterials Science**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1267–1286.
- ALI KHAN, H.; MUTUS, B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, 26 ago. 2014.
- AMENDOLA, V. et al. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 29, n. 20, 2017.
- AMINA, S. J.; GUO, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 9823–9857, dez. 2020.
- ANSARI, M. J. et al. **Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review of the State-of-the-Art**. GelsMDPI, , 1 jul. 2022.
- BADI, S. J.; AL-SHAKARCHI, E. K.; AHMED, S. J. The Effect of Gold Salt Concentration in the Production of Gold Nanospheres. **Journal of Applied Mathematics and Physics**, v. 08, n. 08, p. 148–1495, 2020.
- BANDEIRA, P. T. et al. Lipase-Mediated Kinetic Resolution: An Introductory Approach to Practical Biocatalysis. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 6, p. 800–805, 13 jun. 2017.
- BARBER, D. J. An Investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. **Archaeometry**, v. 32, n. 1, p. 33–45, 1990.
- BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho**. 1<sup>o</sup> ed. Viçosa: Editota UFV, 2013.
- BARROS, H. R. et al. Stability of gum Arabic-gold nanoparticles in physiological simulated pHs and their selective effect on cell lines. **RSC Advances**, v. 6, n. 12, p. 9411–9420, 2016.
- BARROS, H. R. et al. Physicochemical study of the interaction between gold nanoparticles and lipase from *Candida* sp. (CALB): Insights into the nano-bio interface. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2231–2242, 2019.
- BARROS, H. R. et al. Mechanistic Insights into the Light-Driven Catalysis of an Immobilized Lipase on Plasmonic Nanomaterials. **ACS Catal.**, v. 11, n. 1, p. 414–423, 2021.
- BARROS, H. R. et al. Unraveling the Nano–Bio Interface Interactions of a Lipase Adsorbed on Gold Nanoparticles under Laser Excitation. **Langmuir**, v. 40, n. 11, p. 5663–5672, 19 mar. 2024.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, set. 2007.

- BERISO, A. Determination of Size-Dependent Energy Bandgap of Germanium (Ge) nanostructure. **Advances in Physics Theories and Applications**, v. 77, 2019.
- BERTRAND, O.; GOHY, J. F. Photo-responsive polymers: Synthesis and applications. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 52–73, 7 jan. 2017.
- BEYAZIT, S. et al. Molecularly imprinted polymer nanomaterials and nanocomposites by controlled/living radical polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 62, n. May, p. 1–21, 2016.
- BEZBRADICA, D. et al. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit®. **Acta Periodica Technologica**, n. 36, p. 179–186, 2005.
- BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A. Utilization of integrated Michaelis-Menten equation to determine kinetic constants. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 35, n. 2, p. 145–150, 8 mar. 2007.
- BHAGYARAJ, S. M.; OLUWAFEMI, O. S. Nanotechnology: The Science of the Invisible. Em: BHAGYARAJ, S. M. et al. (Eds.). **Synthesis of Inorganic Nanomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1–18.
- BINHAYEEDING, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Utilization of Waste Glycerol from Biodiesel Process as a Substrate for Mono-, Di-, and Triacylglycerol Production. **Energy Procedia**, v. 138, p. 895–900, out. 2017.
- BISSWANGER, H. **Enzyme Kinetics**. [s.l.] Wiley, 2017.
- BLACKMAN, A. et al. **Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons Australia Ltd, 2012.
- BLANCO-COVIÁN, L. et al. Au@Ag SERRS tags coupled to a lateral flow immunoassay for the sensitive detection of pneumolysin. **Nanoscale**, v. 9, n. 5, p. 2051–2058, 2017.
- BRAUN, D. Origins and Development of Initiation of Free Radical Polymerization Processes. **International Journal of Polymer Science**, v. 2009, p. e893234/1-10, 2009.
- BRÍGDA, A. I. S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 67–80, 2007.
- BRILL, R. H. **Interlaboratory Comparison Experiments on the Analysis of Ancient Glass**. 7th International Congress on Glass. **Anais...**1965.
- BUGG, T. D. H. **Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry**. 2nd ed. ed. Oxford: Blackwell, 2004.
- BUTLER, L. G. Enzymes in non-aqueous solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 1, n. 4, p. 253–259, out. 1979.
- CAIRES, A. R. L.; COSTA, L. R.; FERNANDES, J. A close analysis of metal-enhanced fluorescence of tryptophan induced by silver nanoparticles: Wavelength emission dependence. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 111–115, jan. 2013.
- CAO-LUU, N. H. et al. Synthesis and characterization of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) mesoglobule core–silica shell nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 536, p. 536–547, 15 fev. 2019.

CARABINEIRO, S. A. C. Supported Gold Nanoparticles as Catalysts for the Oxidation of Alcohols and Alkanes. **Front. Chem.**, v. 7, n. November, p. 702, 2019.

CÁRDENAS, M. et al. Thiol-Specific and Nonspecific Interactions between DNA and Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 22, n. 7, p. 3294–3299, 1 mar. 2006.

CARNIEL, A. et al. Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 84–90, 2016.

CHANG, H.-H.; GOLE, M. T.; MURPHY, C. J. A golden time for nanotechnology. **MRS Bulletin**, v. 45, n. 5, p. 387–393, 7 maio 2020.

CHAUDHARY, Z. et al. Encapsulation and Controlled Release of Resveratrol Within Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Prostate Cancer Therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 225, 2019.

CHEN, Y. et al. Resolving Optical and Catalytic Activities in Thermoresponsive Nanoparticles by Permanent Ligation with Temperature-Sensitive Polymers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 34, p. 11910–11917, 19 ago. 2019.

CHENG, J. et al. Surface Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1362–1369, 1 ago. 2013.

CHOKRIWAL, A.; SHARMA, M. M.; SINGH, A. Biological Synthesis of Nanoparticles Using Bacteria and Their Applications. **Am. J. Pharm. Tech. Res.**, v. 4, n. 6, p. 38–61, 2014.

CLARK, E. A.; LIPSON, J. E. G. LCST and UCST behavior in polymer solutions and blends. **Polymer**, v. 53, n. 2, p. 536–545, 24 jan. 2012.

COELHO, S. et al. Gold Nanoparticles for Targeting Varlitinib to Human Pancreatic Cancer Cells. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 91, 12 jul. 2018.

CONSTANTIN, M. et al. Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) pH/thermo-responsive porous hydrogels as self-regulated drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 86–95, 1 out. 2014.

DAHANAYAKE, R.; DORMIDONTOVA, E. E. Hydrogen Bonding Sequence Directed Coil-Globule Transition in Water Soluble Thermoresponsive Polymers. **Physical Review Letters**, v. 127, n. 16, p. 167801, 12 out. 2021.

DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

DANIEL, R. M.; DANSON, M. J.; EISENTHAL, R. The temperature optima of enzymes: a new perspective on an old phenomenon. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 4, p. 223–225, abr. 2001.

DAS, M. et al. Review on gold nanoparticles and their applications. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, n. 4, p. 193–205, 1 dez. 2011.

DAS, P. P. et al. Advancement in hybrid materials, its applications and future challenges: A review. **Materials Today: Proceedings**, v. 47, p. 3794–3801, 2021.

DE LOS RÍOS, A. P.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Effective resolution of 1-phenyl ethanol by *Candida antarctica* lipase B catalysed acylation with vinyl acetate in protic ionic liquids (PILs). **Green Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 1584, 2012.

DE MARCHI, S. et al. Plasmonic Au@Ag@mSiO<sub>2</sub> Nanorattles for In Situ Imaging of Bacterial Metabolism by Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 51, p. 61587–61597, 29 dez. 2021.

DEEPA, H. R.; THIPPERUDRAPPA, J.; SURESH KUMAR, H. M. Effect of temperature on fluorescence quenching and emission characteristics of laser dyes. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1473, n. 1, p. 012046, 1 fev. 2020.

DIK, G. et al. Propelling of Enzyme Activity by Using Different Triggering Strategies: Applications and Perspectives. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 62, n. 36, p. 14111–14129, 13 set. 2023.

DONG, Y. C. et al. Effect of Gold Nanoparticle Size on Their Properties as Contrast Agents for Computed Tomography. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14912, 17 out. 2019.

DOUGLAS, S. J.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Nanoparticles in drug delivery. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 3, n. 3, p. 233–261, 1987.

DREADEN, E. C. et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1–24, nov. 2011.

DUTTA, S. et al. Removal of mercury from its aqueous solution using charcoal-immobilized papain (CIP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2–3, p. 888–896, dez. 2009.

EDWARDS, P. P.; THOMAS, J. M. Gold in a metallic divided state - From Faraday to present-day nanoscience. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 29, p. 5480–5486, 2007.

**Factors Affecting Enzyme Activity**. Disponível em: <[geeksforgeeks.org/factors-affecting-enzyme-activity/](https://www.geeksforgeeks.org/factors-affecting-enzyme-activity/)>. Acesso em: 7 jan. 2024.

FAN, J.; CHENG, Y.; SUN, M. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. **The Chemical Record**, v. 20, n. 12, p. 1474–1504, 2020.

FARADAY, M. **Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light**. The Bakerian Lecture. **Anais...**1857.

FATREKAR, A. P. et al. Delineating the Role of Tailored Gold Nanostructures at the Biointerface. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 12, p. 8172–8191, 20 dez. 2021.

FEDERSEL, H.; MOODY, T. S.; TAYLOR, S. J. C. Recent Trends in Enzyme Immobilization — Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox. **Molecules**, v. 26, p. 2822, 2021.

- FENG, T. et al. Fluorescence red-shift of gold-silver nanoclusters upon interaction with cysteine and its application. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 206, p. 97–103, jan. 2019.
- FERNÁNDEZ-LODEIRO, C. et al. Au@Ag Core–Shell Nanoparticles for Colorimetric and Surface-Enhanced Raman-Scattering-Based Multiplex Competitive Lateral Flow Immunoassay for the Simultaneous Detection of Histamine and Parvalbumin in Fish. **ACS Applied Nano Materials**, v. 7, n. 1, p. 498–508, 12 jan. 2024.
- FERREIRA SOARES, D. C. et al. Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110695, nov. 2020.
- FORDE, J. et al. Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 203–209, 1 set. 2010.
- FRAZAR, E. M. et al. Multifunctional temperature-responsive polymers as advanced biomaterials and beyond. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 25, 5 jul. 2020.
- FREESTONE, I. et al. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 270–277, dez. 2007.
- FRENKEL, D. Entropy-driven phase transitions. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 263, n. 1–4, p. 26–38, fev. 1999.
- GALLY, J. A.; EDELMAN, G. M. The effect of temperature on the fluorescence of some aromatic amino acids and proteins. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 60, n. 3, p. 499–509, 16 jul. 1962.
- GALMÉS, M. À. et al. Exploring the Origin of Amidase Substrate Promiscuity in CALB by a Computational Approach. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 3, p. 1938–1946, 7 fev. 2020.
- GANDHI, A. et al. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 99–107, 1 abr. 2015.
- GAO, F. **Advances in Polymer Nanocomposites: Types and Applications**. 1st. ed. [s.l.] Woodhead Publishing, 2012.
- GAPONENKO, S. V.; DEMIR, H. V. **Applied Nanophotonics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2018.
- GARCIA-HERNANDEZ, C. et al. In situ synthesis, stabilization and activity of protein-modified gold nanoparticles for biological applications. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 6, p. 2511–2519, 2019.
- GEONMONOND, R. S.; DA SILVA, A. G. M.; CAMARGO, P. H. C. Controlled synthesis of noble metal nanomaterials: Motivation, principles, and opportunities in nanocatalysis. **An Acad Bras Cienc.**, v. 90, n. 1, p. 719–744, 2018.
- GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22518–22538, 5 dez. 2014.

GIBSON, M. I.; O'REILLY, R. K. To aggregate, or not to aggregate? Considerations in the design and application of polymeric thermally-responsive nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 17, p. 7204–7213, 5 ago. 2013.

GILJOHANN, D. A. et al. Gold nanoparticles for biology and medicine. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 19, p. 3280–3294, 26 abr. 2010.

GIUNTA, C. I. et al. Plasmonic photothermal activation of an organosilica shielded cold-adapted lipase co-immobilised with gold nanoparticles on silica particles. **Nanoscale Advances**, v. 5, n. 1, p. 81–87, 2023.

GLOMM, W. R. Functionalized gold nanoparticles for applications in bionanotechnology. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 389–414, 2005.

GODOY, C. A.; PARDO-TAMAYO, J. S.; BARBOSA, O. Microbial Lipases and Their Potential in the Production of Pharmaceutical Building Blocks. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9933, 1 set. 2022.

GÓMEZ, A. Synthesis of 4,5-disubstituted 2-aminothiazoles from  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones: Preparation of 5-benzyl-4-methyl-2-aminothiazolium hydrochloride salt. **Organic Syntheses**, v. 91, p. 185–200, 2014.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; VICENTE, G. Use of lipases in Organic Synthesis. Em: POLAINA, J.; MACCABE, S. P. (Eds.). **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 301–315.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. Em: **Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 11–55.

GREIN-IANKOVSKI, A. et al. Stimuli-responsive assembly of iron oxide nanoparticles into magnetic flexible filaments. **Emergent Materials**, v. 4, p. 1351–1362, 2021.

GULLA, S. K. et al. In vivo targeting of DNA vaccines to dendritic cells using functionalized gold nanoparticles. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 3, p. 773–788, 1 mar. 2019.

GUO, Y. et al. Synthesis of stimuli-responsive support material for pectinase immobilization and investigation of its controllable tailoring of enzymatic activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 188–195, maio 2017.

HALPERIN, A.; KRÖGER, M.; WINNIK, F. M. Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty years of Research. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 54, p. 15342–15367, 2015.

HAMAMURA, K. et al. Relationship between the phase diagram and hysteresis in demixing and remixing for atactic and meso-rich Poly ( N -isopropylacrylamide ) s in water. **Polymer**, v. 161, n. October 2018, p. 92–100, 2019.

HARAGUCHI, K.; XU, Y. Thermal analyses of poly(N-isopropylacrylamide) in aqueous solutions and in nanocomposite gels. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 16, p. 1627–1636, 7 nov. 2012.

HARDIN, J.; LODOLCE, J. P. **Becker's World of the Cell**. 10th. ed. [s.l.] Pearson, 2022.

- HARUTA, M. et al. Novel gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far Below 0 °C. **Chemistry Letters**, v. 16, n. 2, p. 405–408, 1987.
- HEDDLE, J. G. Gold Nanoparticle-Biological Molecule Interactions and Catalysis. **Catalysts**, v. 3, p. 683–708, 2013.
- HEDSTROM, L. Enzyme Specificity and Selectivity. Em: **Encyclopedia of Life Sciences**. [s.l.] Wiley, 2010.
- HERIZCHI, R. et al. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 596–602, 2016.
- HERMANSYAH, H. et al. Kinetic Model for Triglyceride Hydrolysis using lipase: A Review. **Makara Journal of Technology**, v. 11, n. 1, p. 30–35, 2007.
- HOFFMANN, I.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. DA G. Enantioselective resolution of (R,S)-1-phenylethanol catalyzed by lipases immobilized in starch films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1559–1567, ago. 2011.
- HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: an update. **J. Chem. Biol.**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.
- HOMBERG, M.; SIMON, U. On the application potential of gold nanoparticles in nanoelectronics and biomedicine. **Phil. Trans. R. Soc. A**, v. 368, p. 1405–1453, 2010.
- HORNYAK, G. L. et al. Effective medium theory characterization of Au/Ag Nanoalloy-porous alumina Composites. **Nanostructured Materials**, v. 9, n. 1–8, p. 571–574, 1997.
- HORSKÁ, J.; ŠEVČÍK, J.; PETR, J. Determination of citrate released from stabilized gold nanoparticles by capillary zone electrophoresis. **Chemical Papers**, v. 72, n. 2, p. 419–424, 1 fev. 2018.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1–3, p. 155–170, 2004.
- HUANG, X. et al. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 6, p. 2115–2120, 1 fev. 2006.
- HUNKAPILLER, M. W. et al. Carbon nuclear magnetic resonance studies of the histidine residue in  $\alpha$ -lytic protease. Implications for the catalytic mechanism of serine proteases. **Biochemistry**, v. 12, n. 23, p. 4732–4743, 1 nov. 1973.
- HUTTER, E.; MAYSINGER, D. Gold nanoparticles and quantum dots for bioimaging. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 7, p. 592–604, 9 jul. 2011.
- IBRAHIM ZAMKOYE, I.; LUCAS, B.; VEDRAINE, S. Synergistic Effects of Localized Surface Plasmon Resonance, Surface Plasmon Polariton, and Waveguide Plasmonic Resonance on the Same Material: A Promising Hypothesis to Enhance Organic Solar Cell Efficiency. **Nanomaterials**, v. 13, n. 15, 1 ago. 2023.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NC-IUBMB). **Classification and Nomenclature of Enzymes by the Reactions they Catalyze**. Disponível em: <<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/rules.html>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

- IZCI, M. et al. Gold nanoparticle delivery to solid tumors: a multiparametric study on particle size and the tumor microenvironment. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2022.
- JADHAV, S. A. et al. Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide) by distillation precipitation polymerization and quantitative grafting on mesoporous silica. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 44, 20 nov. 2016.
- JANA, J.; GANGULY, M.; PAL, T. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. **RSC Advances**, v. 6, n. 89, p. 86174–86211, 2016a.
- JANA, J.; GANGULY, M.; PAL, T. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. **RSC Advances**, v. 6, n. 89, p. 86174–86211, 2016b.
- KAHRAMAN, A.; THORNTON, J. M. Methods to Characterize the Structure of Enzyme Binding Sites. Em: **Computational Structural Biology**. [s.l.] World Scientific, 2008. p. 189–221.
- KANTARDJIEV, A.; IVANOV, P. M. Entropy Rules: Molecular Dynamics Simulations of Model Oligomers for Thermoresponsive Polymers. **Entropy**, v. 22, n. 10, p. 1187, 21 out. 2020.
- KAUFMAN, M. Entropy Driven Phase Transition in Polymer Gels: Mean Field Theory. **Entropy**, v. 20, n. 7, p. 501, 30 jun. 2018.
- KHAN, A. et al. Neuroprotection: Targeting Multiple Pathways by Naturally Occurring Phytochemicals. **Biomedicines**, v. 8, n. 8, p. 284, 12 ago. 2020.
- KHURANA, K.; JAGGI, N. Localized Surface Plasmonic Properties of Au and Ag Nanoparticles for Sensors: a Review. **Plasmonics**, v. 16, n. 4, p. 981–999, 2 ago. 2021.
- KICKELBICK, G. Hybrid Materials – Past, Present and Future. **Hybrid Materials**, v. 1, n. 1, 1 jan. 2014.
- KIM, M. R. et al. Co-Encapsulation and Co-Delivery of Peptide Drugs via Polymeric Nanoparticles. **Polymers**, v. 11, n. 2, p. 288, 8 fev. 2019.
- KIRILIN, A. et al. Kinetics and modeling of (R,S)-1-phenylethanol acylation over lipase. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 42, n. 10, p. 629–639, 9 out. 2010.
- KNIPE, J. M.; PEPPAS, N. A. Multi-responsive hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. **Regen. Biomater.**, v. 1, n. 1, p. 57–65, 2014.
- KOETZ, J.; KOSMELLA, S. **Polyelectrolytes and Nanoparticles**. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- KOLOUCHOVÁ, K. et al. Thermoresponsive properties of polyacrylamides in physiological solutions. **Polymer Chemistry**, v. 12, n. 35, p. 5077–5084, 21 set. 2021.
- KOOLE, R. et al. Size Effects on Semiconductor Nanoparticles. Em: DONEGÁ, C. M. (Ed.). **Nanoparticles**. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. p. 13–51.

- KREUTER, J. Possibilities of using nanoparticles as carriers for drugs and vaccines. **J. Microencapsul.**, v. 5, n. 2, p. 115–127, 1988.
- KRIKORIAN, S. E.; MAHPOUR, M. The identification and origin of N-H overtone and combination bands in the near-infrared spectra of simple primary and secondary amides. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 29, n. 7, p. 1233–1246, jul. 1973.
- KUNDYS, A.; BIAŁECKA, E.; AGATA, F. Candida antarctica Lipase B as Catalyst for Cyclic Esters Synthesis , Their Polymerization and Degradation of Aliphatic Polyesters. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 1, p. 396–407, 2018.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [s.l.] Springer, 2006.
- LANZALACO, S.; ARMELIN, E. Poly(N-isopropylacrylamide) and copolymers: A review on recent progresses in biomedical applications. **Gels**, v. 3, n. 4, p. 36, 1 dez. 2017.
- LARA, P. et al. Gold nanoparticle based double-labeling of melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, 23 jan. 2020.
- LAUFERSKY, G.; NANN, T. Physical chemistry of nanoparticle syntheses. Em: **Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2019. v. 1–5p. 1–16.
- LAWARE, S. L.; RASKAR, S. Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on Hydrolytic and Antioxidant Enzymes during Seed Germination in Onion. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 3, n. 7, p. 749–760, 2014.
- LEWIS, T.; STONE, W. Biochemistry, Proteins Enzymes. Em: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2023.
- LI, G.; JIN, R. Catalysis by gold nanoparticles: carbon-carbon coupling reactions. **Nanotechnology Reviews**, v. 2, n. 5, p. 529–545, 2013.
- LI, J.; GUO, H.; LI, Z.-Y. Microscopic and macroscopic manipulation of gold nanorod and its hybrid nanostructures. **Photonics Research**, v. 1, n. 1, p. 28–41, 1 jun. 2013.
- LI, L.; ZHANG, M.; CHEN, W. Gold nanoparticle-based colorimetric and electrochemical sensors for the detection of illegal food additives. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 28, n. 4, p. 642–654, 2 dez. 2020.
- LI, M. et al. Size and dimension effect on volume plasmon energy of nanomaterials. **Solid State Communications**, v. 152, n. 16, p. 1564–1566, ago. 2012.
- LI, W. et al. Gold nanocages as contrast agents for photoacoustic imaging. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 6, n. 5, p. 370–377, 25 set. 2011.
- LI, Z. et al. Mesoscale modeling of phase transition dynamics of thermoresponsive polymers. **Chemical Communications**, v. 51, n. 55, p. 11038–11040, 2015.
- LIMA, R. N. et al. Versatility of Candida antarctica lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, v. 466, p. 75–105, abr. 2019.

- LISINA, S. et al. Nano Differential Scanning Fluorimetry as a Rapid Stability Assessment Tool in the Nanoformulation of Proteins. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, p. 1473, 11 maio 2023.
- LIU, D.-M.; DONG, C. Gold nanoparticles as colorimetric probes in food analysis: Progress and challenges. **Food Chemistry**, v. 429, p. 136887, dez. 2023.
- LOPES, T. S. et al. Advances and potential application of gold nanoparticles in nanomedicine. **Journal of Cellular Biology**, v. 120, n. 10, p. 16370–16378, 2019.
- LOPINA, O. D. Enzyme Inhibitors and Activators. Em: **Enzyme Inhibitors and Activators**. [s.l.] InTech, 2017.
- LOUIS, C.; PLUCHERY, O. **Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology**. 1st. ed. London: Imperial College Press, 2012.
- LU, A. Y. H.; MIWA, G. T.; WEST, S. B. On the Stimulatory role of Phosphatidylcholine in a cytochrome P-450-containing reconstituted hydroxylation system. **Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis**, p. 59–66, 1980.
- LU, H. et al. Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis- A Review. **Biosensors**, v. 10, n. 11, p. 1–34, 2020.
- LUKACH, A. **Structure and Properties of Nano- and Meso-Scale Materials Prepared by Designed Self-Assembly of Nanoparticles**. [s.l.] University of Toronto, 2015.
- MACCHIONE, M.; BIGLIONE, C.; STRUMIA, M. Design, Synthesis and Architectures of Hybrid Nanomaterials for Therapy and Diagnosis Applications. **Polymers**, v. 10, n. 5, p. 527, 14 maio 2018.
- MADKOUR, L. H. Applications of gold nanoparticles in medicine and therapy. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 6, n. 3, 8 maio 2018.
- MAGNUSSON, A. O. et al. nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 1, p. 184–204, 3 jan. 2019.
- MAGUIRE, C. M. et al. Characterisation of particles in solution – a perspective on light scattering and comparative technologies. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 732–745, 31 dez. 2018.
- MAJERIC, P.; RUDOLF, R.; ANZEL, I. Thermodynamics of nanoparticles. **Anali PAZU**, v. 4, n. 1, p. 28–33, 2022.
- MÄKI-ARVELA, P. et al. Acylation of (R,S)-1-phenylethanol with ethyl acetate over an immobilized enzyme. **Research on Chemical Intermediates**, v. 36, n. 3, p. 245–252, 10 abr. 2010.
- MARQUES, N. DO N. et al. Temperature and pH effects on the stability and rheological behavior of the aqueous suspensions of smart polymers based on N -isopropylacrylamide, chitosan, and acrylic acid. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 1, p. 334–345, 5 jul. 2013.
- MCDONALD, A. G.; BOYCE, S.; TIPTON, K. F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database, p. D593–D597, 1 jan. 2009.

- MENK, R. H. et al. Gold nanoparticle labeling of cells is a sensitive method to investigate cell distribution and migration in animal models of human disease. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 5, p. 647–654, out. 2011.
- MIAO, S. et al. Four-Dimensional Printing Hierarchy Scaffolds with Highly Biocompatible Smart Polymers for Tissue Engineering Applications. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 22, n. 10, p. 952–963, 1 out. 2016.
- MITCHELL, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 101–124, 2021.
- MIYAZAKI, C. M.; SHIMIZU, F. M.; FERREIRA, M. Surface Plasmon Resonance (SPR) for Sensors and Biosensors. Em: **Nanocharacterization Techniques**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 183–200.
- MOONEN, H.; BAS, H. Mono- and Diglycerides. Em: NORN, V. (Ed.). **Emulsifiers in Food Technology**. 2nd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2015. p. 73–92.
- MUNICOY, S. et al. Stimuli-Responsive Materials for Tissue Engineering and Drug Delivery. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 13, p. 4724, 2020.
- MUSTAFA, F.; ANDREESCU, S. Nanotechnology-based approaches for food sensing and packaging applications. **RSC Advances**, v. 10, n. 33, p. 19309–19336, 2020.
- NAGASE, K. Thermoresponsive interfaces obtained using poly(N-isopropylacrylamide)-based copolymer for bioseparation and tissue engineering applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 295, p. 102487, set. 2021.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th. ed. New York: W. H. Freeman, 2012.
- NJOKI, P. N. et al. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 40, p. 14664–14669, 1 out. 2007a.
- NJOKI, P. N. et al. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 40, p. 14664–14669, 11 out. 2007b.
- OLIVEIRA, P. F. M. et al. Challenges and opportunities in the bottom-up mechanochemical synthesis of noble metal nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 8, n. 32, p. 16114–16141, 2020.
- OLIVEIRA, T. E. et al. Effects of stereochemistry and copolymerization on the LCST of PNIPAm. **Journal of Chemical Physics**, v. 146, n. 3, p. 034904, 21 jan. 2017.
- OPPENHEIM, R. C. Solid colloidal drug delivery systems: Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 217–234, 1981.
- OTULAKOWSKI, Ł. et al. Thermal behaviour of common thermoresponsive polymers in phosphate buffer and in its salt solutions. **Polymers**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 1 jan. 2021.
- PADAYATTI, P. S. et al. Critical Role of Water Molecules in Proton Translocation by the Membrane-Bound Transhydrogenase. **Structure**, v. 25, n. 7, p. 1111- 1119.e3, jul. 2017.

- PALOCCHI, C. et al. Lipolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 10, p. 3047–3053, out. 2007.
- PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. 1st. ed. New York: Springer-Verlag, 2006.
- PANDEY, V. et al. Gold nanoparticles: An advanced drug delivery and diagnostic tool. Em: TEKADE, R. (Ed.). **The Future of Pharmaceutical Product Development and Research**. 1st. ed. London: Academic Press Inc., 2020. p. 976.
- PARK, J. W.; SHUMAKER-PARRY, J. S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 5, p. 1907–1921, 5 fev. 2014.
- PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4a ed ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEREIRA, A. DA S. et al. Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. **Catalysts**, v. 12, n. 1, p. 88, 13 jan. 2022.
- PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 7 nov. 2011.
- PIELLA, J.; BASTÚS, N. G.; PUNTES, V. Size-Controlled Synthesis of Sub-10-nanometer Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 4, p. 1066–1075, 2016.
- PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1077–1082, 2003.
- POLTE, J. et al. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation Citrate Synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, n. 4, p. 1296–1301, 2010.
- POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective. **CrystEngComm**, v. 17, n. 36, p. 6809–6830, 22 jun. 2015.
- POPJÁK, G. 3 Stereospecificity of Enzymic Reactions. Em: BOYER, P. D. (Ed.). **The Enzymes**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 115–215.
- POTNIS, S. Role of enzymes in molecular biology. **Journal of Genetics and Molecular Biology**, v. 4, p. 1–2, 2020.
- PRIECEL, P. et al. Anisotropic gold nanoparticles: Preparation and applications in catalysis. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 10, p. 1619–1650, 2016.
- QI, L.; QIAO, J. Design of Switchable Enzyme Carriers Based on Stimuli-Responsive Porous Polymer Membranes for Bioapplications. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 6, p. 4706–4719, 21 jun. 2021.

QUINSON, J.; JENSEN, K. M. Ø. From platinum atoms in molecules to colloidal nanoparticles: A review on reduction, nucleation and growth mechanisms. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 286, p. 102300, dez. 2020.

RABBANI, G. et al. Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CaLB): In relation to pH, chemical and thermal denaturation. **RSC Advances**, v. 5, n. 26, p. 20115–20131, 2015.

RAMALINGAM, G. et al. Quantum Confinement Effect of 2D Nanomaterials. Em: DIVSAR, F. (Ed.). **Quantum Dots - Fundamental and Applications**. [s.l.] IntechOpen, 2020. p. 1–12.

RANA, M. M.; DE LA HOZ SIEGLER, H. Tuning the properties of pnipam-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. **Polymers**, v. 13, n. 18, 1 set. 2021.

RAZA, S.; FRANSSON, L.; HULT, K. Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. **Protein Science**, v. 10, n. 2, p. 329–338, 1 fev. 2001.

REETZ, M. T. Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. **Advanced Materials**, v. 9, n. 12, p. 943–954, 1 out. 1997.

REHBOCK, C. et al. Current state of laser synthesis of metal and alloy nanoparticles as ligand-free reference materials for nano-toxicological assays. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, p. 1523–1541, 12 set. 2014.

REIMERS, J. R. et al. Competition of van der Waals and chemical forces on gold–sulfur surfaces and nanoparticles. **Nature Reviews Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 0017, 8 fev. 2017.

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

ROYER, C. A. Fluorescence Spectroscopy. Em: SHIRLEY, B. A. (Ed.). **Protein Stability and Folding: Theory and Practice**. Totowa, NJ: Humana Press, 1995. p. 65–89.

RUBIN, M. B.; BRASLAVSKY, S. E. Quantum yield: the term and the symbol. A historical search. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 670–674, 12 maio 2010.

RUIZ, A. L.; RAMIREZ, A.; MCENNIS, K. Single and Multiple Stimuli-Responsive Polymer Particles for Controlled Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 421, 2022.

RUSSELL, R. A.; THOMPSON, H. W. Vibrational spectra and geometrical isomerism in amides. **Spectrochimica Acta**, v. 8, n. 3, p. 138–141, set. 1956.

SANCHEZ, C. et al. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 2, p. 696, 2011.

SANTOS, A. M. P.; OLIVEIRA, M. G.; MAUGERI, F. Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3142–3148, nov. 2007.

SCARPA, E. et al. Gold and silver nanoparticles in Alzheimer’s and Parkinson’s diagnostics and treatments. **Ibrain**, v. 9, n. 3, p. 298–315, 14 set. 2023.

SCHMALJOHANN, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1655–1670, 30 dez. 2006.

SCHRAG, J. D. et al. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 761–764, jun. 1991.

SEURING, J.; AGARWAL, S. Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution: Unexpected properties from known building blocks. **ACS Macro Letters**, v. 2, n. 7, p. 597–600, 2013.

SHANGGUAN, H. et al. Synthesis of lutein esters using a novel biocatalyst of *Candida antarctica* lipase B covalently immobilized on functionalized graphitic carbon nitride nanosheets. **RSC Advances**, v. 10, n. 15, p. 8949–8957, 2020.

SHELDON, R. A.; BRADY, D.; BODE, M. L. The Hitchhiker's guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. **Chemical Science**, v. 11, n. 10, p. 2587–2605, 2020.

SHEN, Y. et al. Smart surfaces based on thermo-responsive polymer brushes prepared from l-alanine derivatives for cell capture and release. **Soft Matter**, v. 11, n. 38, p. 7502–7506, 5 ago. 2015.

SIBUYI, N. R. S. et al. Multifunctional Gold Nanoparticles for Improved Diagnostic and Therapeutic Applications: A Review. **Nanoscale Research Letters**, v. 16, p. 174, 2021.

SILVEIRA, G. DE B. et al. Advance in the use of gold nanoparticles in the treatment of neurodegenerative diseases: new perspectives. **Neural Regen Res**, v. 16, n. 12, p. 2425–2426, 2021.

SILVERSTEIN, T. P. Falling Enzyme Activity as Temperature Rises: Negative Activation Energy or Denaturation? **Journal of Chemical Education**, v. 89, n. 9, p. 1097–1099, 14 ago. 2012.

SIMMONS, D. S. **Phase and Conformational Behavior of LCST-Driven Stimuli Responsive Polymers**. Austin: University of Texas, 2009.

SINDHU, R. et al. Enzyme Technology in Food Processing: Recent Developments and Future Prospects. Em: **Innovative Food Processing Technologies: A Comprehensive Review**. Victoria: Elsevier, 2021. v. 3p. 191–215.

SINGH, P. et al. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1979, 6 jul. 2018.

SOUZA, R. L. et al. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 152–159, 1 dez. 2012.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. 4TH. ed. Hoboken: New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

ST. CLAIR, N.; WANG, YF.; MARGOLIN, A. L. Cofactor-Bound Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of Alcohol Dehydrogenase. **Ang. Chem. Int. Ed.**, v. 39, n. 2, p. 380–383, 2000.

STRATAKIS, M.; GARCIA, H. Catalysis by supported gold nanoparticles: Beyond aerobic oxidative processes. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 8, p. 4469–4506, 8 ago. 2012.

STUBENRAUCH, K. et al. pH and ionic strength responsive polyelectrolyte block copolymer micelles prepared by ring opening metathesis polymerization. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1178–1191, 15 fev. 2009.

SUJITHA, M. V.; KANNAN, S. Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (Citrus limon, Citrus reticulata and Citrus sinensis) aqueous extract and its characterization. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 102, p. 15–23, fev. 2013.

SZTANDERA, K.; GORZKIEWICZ, M.; KLAJNERT-MACULEWICZ, B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. **Molecular Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 1–23, 7 jan. 2019.

TAMBUNAN, U. S. F.; RANDY, A.; PARIKESIT, A. A. Design of Candida antarctica Lipase B thermostability improvement by introducing extra disulfide bond into the enzyme. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 2, p. 108–118, 1 fev. 2014.

TANG, H. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering Sensors for Food Safety and Environmental Monitoring. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 8, p. B3098–B3118, 21 abr. 2018.

TEIXEIRA, W. S. R. et al. Nanomateriais Plasmônicos: Parte III. **Preprint**, 2021.

TERAOKA, I. **Polymer Solutions: An introduction to physical properties**. 1st. ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 2002.

THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7610–7630, 13 ago. 2014.

THE BRITISH MUSEUM. **The Lycurgus Cup**. Disponível em: <[www.britishmuseum.org/collection/object/H\\_1958-1202-1](http://www.britishmuseum.org/collection/object/H_1958-1202-1)>. Acesso em: 15 jan. 2024.

THOMAS, J. C. et al. Biocatalysis in continuous-flow mode: A case-study in the enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols via acylation and deacylation reactions mediated by Novozym 435®. **Biocatalysis**, v. 3, n. 1, 28 fev. 2017.

THOMAS SHAFEE. **Enzyme Structure**. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enzyme\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enzyme_structure.svg)>. Acesso em: 22 jan. 2024.

TIWARI, P. M. et al. Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 1, n. 1, p. 31–63, 1 dez. 2011.

TOMCZAK, J. M.; WĘGLARZ-TOMCZAK, E. Estimating kinetic constants in the Michaelis–Menten model from one enzymatic assay using Approximate Bayesian Computation. **FEBS Letters**, v. 593, n. 19, p. 2742–2750, 21 out. 2019.

TOUDERT, J. Quantum nanostructures for plasmonics and high refractive index photonics. **Journal of Physics: Photonics**, v. 3, n. 1, p. 011003, 1 jan. 2021.

TUORINIEMI, J. et al. Intermethod comparison of the particle size distributions of colloidal silica nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 15, n. 3, p. 035009, 14 jun. 2014.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLIER, J. Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discuss Faraday Soc.**, v. 11, p. 55–75, 1951.

UPPENBERG, J. et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 15, n. 2, p. 293–308, 1994.

UROŠEVIĆ, M. Z. et al. Synthesis and characterization of poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N-isopropylacrylamide) copolymers. **Hem. Ind.**, v. 74, n. 2, p. 103–117, 2020.

UTASHIRO, Y.; TAKIGUCHI, M.; SATOH, M. Zeta potential of PNIPAM microgel particles dispersed in water — effects of charged radical initiators vs. OH<sup>-</sup> ion adsorption. **Colloid and Polymer Science**, p. 45–52, 2017.

VÄRKONYI, Z.; KABÓK, K. Effect of temperature on light-absorption and fluorescence of the peroxidase. **Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung**, v. 10, n. 1–2, p. 129–137, 1975.

VARTIAINEN, J.; RÄTTÖ, M.; PAULUSSEN, S. Antimicrobial activity of glucose oxidase-immobilized plasma-activated polypropylene films. **Packaging Technology and Science**, v. 18, n. 5, p. 243–251, set. 2005.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production - Current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421–430, maio 2008.

VENDITTI, I. et al. *Candida rugosa* lipase immobilization on hydrophilic charged gold nanoparticles as promising biocatalysts: Activity and stability investigations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 131, p. 93–101, jul. 2015.

VIVIAN, J. T.; CALLIS, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 5, p. 2093–2109, 2001.

WALSH, R.; MARTIN, E.; DARVESH, S. A method to describe enzyme-catalyzed reactions by combining steady state and time course enzyme kinetic parameters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1800, n. 1, p. 1–5, jan. 2010.

WANG, F. et al. Current Strategies for Real-Time Enzyme Activation. **Biomolecules**, v. 12, n. 5, p. 599, 19 abr. 2022.

WANG, J. et al. Enzyme-responsive polymers for drug delivery and molecular imaging. Em: **Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 101–119.

WANG, Y. et al. Thermodynamics versus kinetics in Nanosynthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 7, p. 2022–2051, 9 fev. 2015.

WEITNER, T.; FRIGANOVIĆ, T.; ŠAKIĆ, D. Inner Filter Effect Correction for Fluorescence Measurements in Microplates Using Variable Vertical Axis Focus. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 19, p. 7107–7114, 17 maio 2022.

WISCHERHOFF, E. et al. Smart Polymer Surfaces: Concepts and Applications in Biosciences. **Adv. Polym. Sci.**, v. 240, p. 1–33, 2011.

WOLF, E. L. **Nanophysics and nanotechnology : an introduction to modern concepts in nanoscience**. [s.l.] Wiley-VCH, 2006.

XIE, W.; WANG, J. Enzymatic Production of Biodiesel from Soybean Oil by Using Immobilized Lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> / Poly ( styrene-methacrylic acid ) Magnetic Microsphere as a Biocatalyst. **Energy and Fuels**, v. 28, p. 2624–2631, 2014.

XU, Y.; LI, G.; HARAGUCHI, K. Gel formation and molecular characteristics of poly(N-isopropylacrylamide) prepared by free-radical redox polymerization in Aqueous Solution. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, n. 9, p. 977–987, 2010.

YAM, C. H. et al. Synthesis of dual stimuli-responsive amphiphilic particles through controlled semi-batch emulsion polymerization. **Polymer**, v. 106, p. 294–302, 2016.

YANG, C.; WANG, Q.; DING, W. Recent progress in the imaging detection of enzyme activities *in vivo*. **RSC Advances**, v. 9, n. 44, p. 25285–25302, 2019.

YANG, Z. et al. The Applications of Gold Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Gastrointestinal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 19 jan. 2022.

YU, D. et al. Immobilized CALB Catalyzed Transesterification of Soybean Oil and Phytosterol. **Food Biophysics**, v. 13, n. 6, 2018.

ZHANG, Q. et al. Nanomaterials for energy conversion and storage. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 7, p. 3127–3171, 11 mar. 2013.

ZHANG, Q. et al. Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: From fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions. **Materials Horizons**, v. 4, n. 2, p. 109–116, 1 mar. 2017.

ZHANG, Y. et al. Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. **J. Hematol. Oncol.**, v. 12, p. 137, 2019.

ZHU, T. et al. pH-Dependent Adsorption of Gold Nanoparticles on *p* -Aminothiophenol-Modified Gold Substrates. **Langmuir**, v. 15, n. 16, p. 5197–5199, 1 ago. 1999.

# ANEXOS

## ANEXO I

## Informações Acadêmicas

*Disciplinas cursadas no PPGQ-UFPR*

<b>Código</b>	<b>Nome da disciplina</b>	<b>Período</b>	<b>Conceito</b>	<b>Créditos</b>
QUIM-7038	Seminários D1	1/2019	B	1
QUIM-7021	Métodos Físico-Químicos de Caracterização de Macromoléculas e Colóides	1/2019	B	4
QUIM-7045	Tópicos especiais em Química I – Riscologia química e boas práticas laboratoriais	2/2019	A	2
QUIM-7039	Seminários D2	2/2019	A	1
QUIM-7003	Colóides e Química de superfícies	2/2019	A	4
QUIM-7033	Química Quântica e espectroscopia	1/2020	A	4
QUIM-7048	Tópicos especiais em Química IV – Determinação estrutural de compostos orgânicos – Módulo I: espectroscopia de infravermelho	2/2020	A	1
QUIM-7045	Tópicos especiais em Química I – Determinação estrutural de compostos orgânicos – Módulo III: espectroscopia de RMN 1D	2/2020	B	2
QUIM-7010	Físico-Química avançada	2/2020	A	4
QUIM-7024	Prática de docência em Química (Disciplina: CQ115 - Química Quântica)	1/2021	A	1
<b>Total de créditos cursados</b>				<b>24</b>

*Disciplinas cursadas em outros Programas de Pós-Graduação\**

<b>Código</b>	<b>Nome da disciplina</b>	<b>Período</b>	<b>Conceito</b>	<b>Créditos</b>
CBIO-7030	Química e Físico-Química de Carboidratos	2/2019	B	1
CBIO-7062	Tópicos avançados em Bioquímica – Análise Físico-Química de Biomoléculas	2/2019	A	2
DIP-031	Enzyme Kinetics	1/2021	A	6
CFAR-7048	Tópicos especiais em ciências farmacêuticas – Introduction to rheology: fundamentals and contributions to the study of soft matter	2/2023	A	1
CFAR-7049	Tópicos especiais em ciências farmacêuticas II – Nanotechnology and Microtechnology for drug delivery	2/2023	A	2
<b>Total de créditos cursados</b>				<b>12</b>

CBIO – Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica (UFPR); DIP – Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (UFSCar); CFAR – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPR)

\*Apenas o crédito da disciplina Química e Físico-Química de Carboidratos foi integralizado.

*Disciplinas validadas* (cursadas durante o Mestrado em Ciência dos Materiais na Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

<b>Nome da disciplina</b>	<b>Créditos</b>
Química Orgânica Avançada	3
A ciência forense e a ciência dos materiais	4
Termodinâmica dos Materiais	3
Introdução a ciência dos materiais	1
Metodologia da pesquisa científica	2
Propriedades dos materiais I	2
Propriedades dos materiais II	2
<b>Total de créditos</b>	<b>17</b>

*Atividades de extensão*

<b>Atividade</b>	<b>Período</b>
Rede de combate ao Covid-19 Projeto: produção de álcool gel	ABR/20 – ABR/21
Representação discente - PPGQ	JUN/20 – MAI/21

*Doutorado Sanduíche*

Bolsista CAPES-PrInt de Doutorado Sanduíche no exterior (Número do processo: 88887.694787/2022-00).

Período da bolsa: 01/09/2022 – 28/02/2023

Instituição: Max Planck Institute for Polymer Research (MPIP) – Mainz/Alemanha

Orientadora: Profa. Dra. Katharina Landfester

Líder de Projeto: Dr. Kai Zhang

## ANEXO II

### Participação em Cursos e Eventos

- XVIII Brazilian MRS Meeting, Balneário Camboriú/SC, setembro de 2019.
- 1ª Escola de Verão em Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, Curitiba/PR, dezembro de 2019.
- 7ª Escola de Coloides e Superfícies, São Paulo/SP, janeiro de 2020.
- IV Escola de Inverno em Física Aplicada à Medicina e Biologia – Universidade de São Paulo, online, julho de 2020.
- 14ª Semana de Polímeros Professora Eloisa Mano – Instituto de Macromoléculas Prof. Eloisa Mano (UFRJ), online, outubro de 2020.
- II Sinano – Simpósio de Nanotecnologia do DF, online, maio de 2021.
- 10ª EMMSB – Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos – Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), online, maio de 2021.
- 16ª CBPol – Congresso Brasileiro de Polímeros, online, outubro de 2021.
- 31st LNLS Annual Users' Meeting (RAU), online, novembro de 2021.
- XXVII Encontro de Química da Região Sul – SBQ-Sul, online, novembro de 2021.
- Escola Ricardo Rodrigues de Luz Síncrotron (ER2LS), Campinas/SP, julho de 2022.

### Trabalhos apresentados em eventos

THEISEN, M., BARROS, H. R., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Tuning enzyme exposition to the environment in a smart hybrid material (poster). XIX Brazilian MRS Meeting, online, setembro de 2021.

THEISEN, M., BARROS, H. R., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Development of a smart hybrid material for use in enzymatic reactions (poster). LatinXChem, online, setembro de 2021.

THEISEN, M., BARROS, H. R., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Development of a thermoresponsive nanobiohybrid material to control enzymatic activity (oral). XXI Brazilian MRS Meeting, Maceió/AL, outubro de 2023.

THEISEN, M., BARROS, H. R., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. The influence of synthesis conditions on the characteristics of poly(N-isopropylacrylamide) (poster), Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPol), Joinville/SC, novembro de 2023.

## Produção científica

### Capítulo de Livro

Pesqueira, C.; Alvarenga, G.; Jasper, I.; Theisen, M.; Valério, T. L.; Leite, D. C.; Barros, H. R.; Vidotti, M.; Riegel-Vidotti, I. C.; Hryniewicz, B. M. POLYMER NANOCOMPOSITES BASED ON GOLD NANOPARTICLES: SYNTHESIS, PROPERTIES AND APPLICATIONS. In: Pasha, S. K. K.; Deshmukh, K.; Hussain, C. M. (eds.) **Gold Nanoparticles, Nanomaterials and Nanocomposites**. 1<sup>st</sup> ed. [S.l.]: Elsevier, 2024. ISBN 9780443158971.

### Artigos

Theisen, M.; Durigon, M. C. S.; Barros, H. R.; Leite, D. C.; Piovan, L.; Riegel-Vidotti, I. C. *Using a thermoresponsive nanohybrid material to modulate the enzymatic activity of Candida antarctica fraction B Enzyme* (em preparação).

Barros, H. R.; Theisen, M.; Durigon, M. C.; Leite, D. C.; Piovan, L.; Riegel-Vidotti, I. C. *Smart Materials for Biocatalysis Regulation through Thermoresponsive Polymers* (em preparação).

**ANEXO III**

Material suplementar

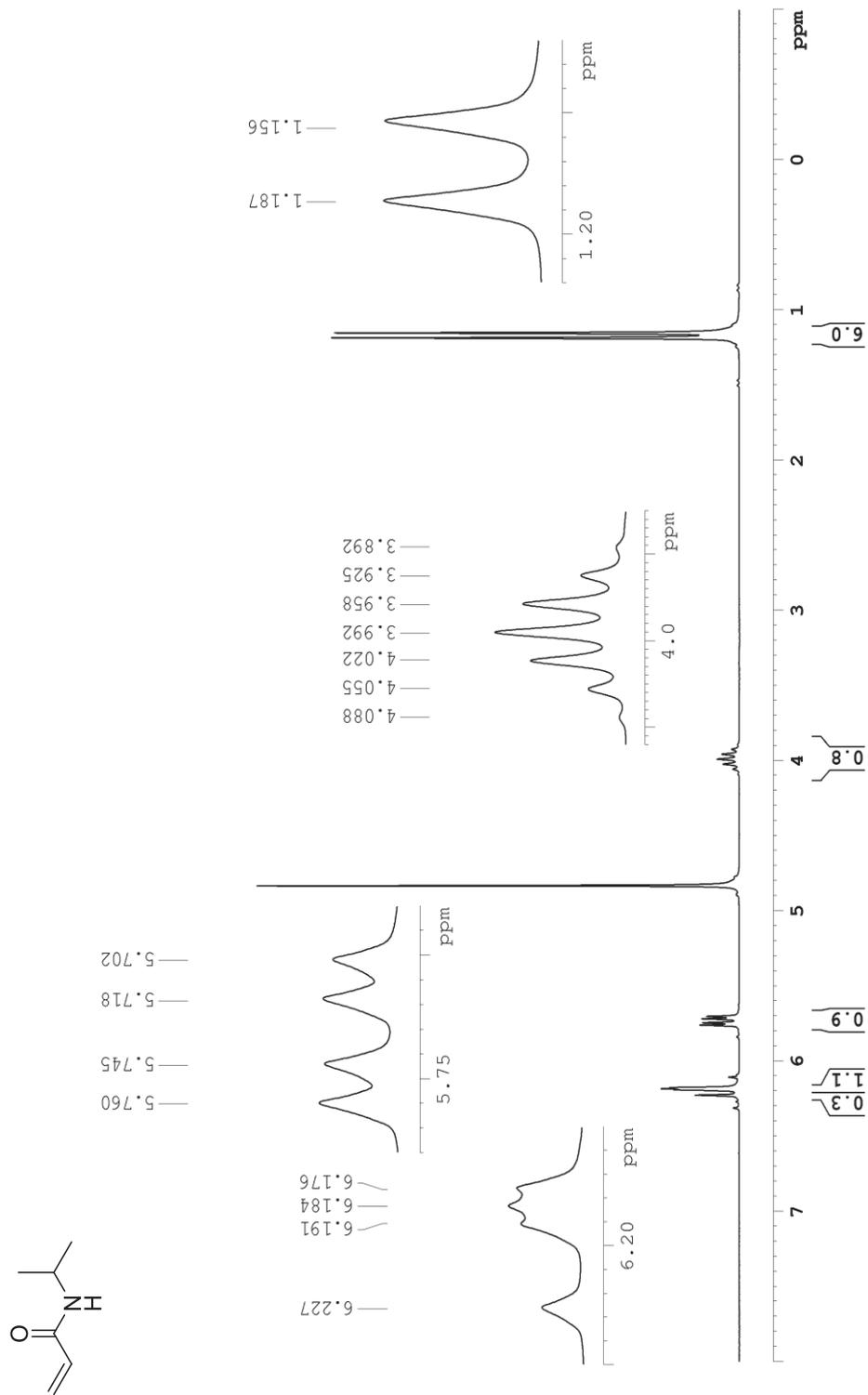


Figura S1. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O, TMS) do NIPAm.

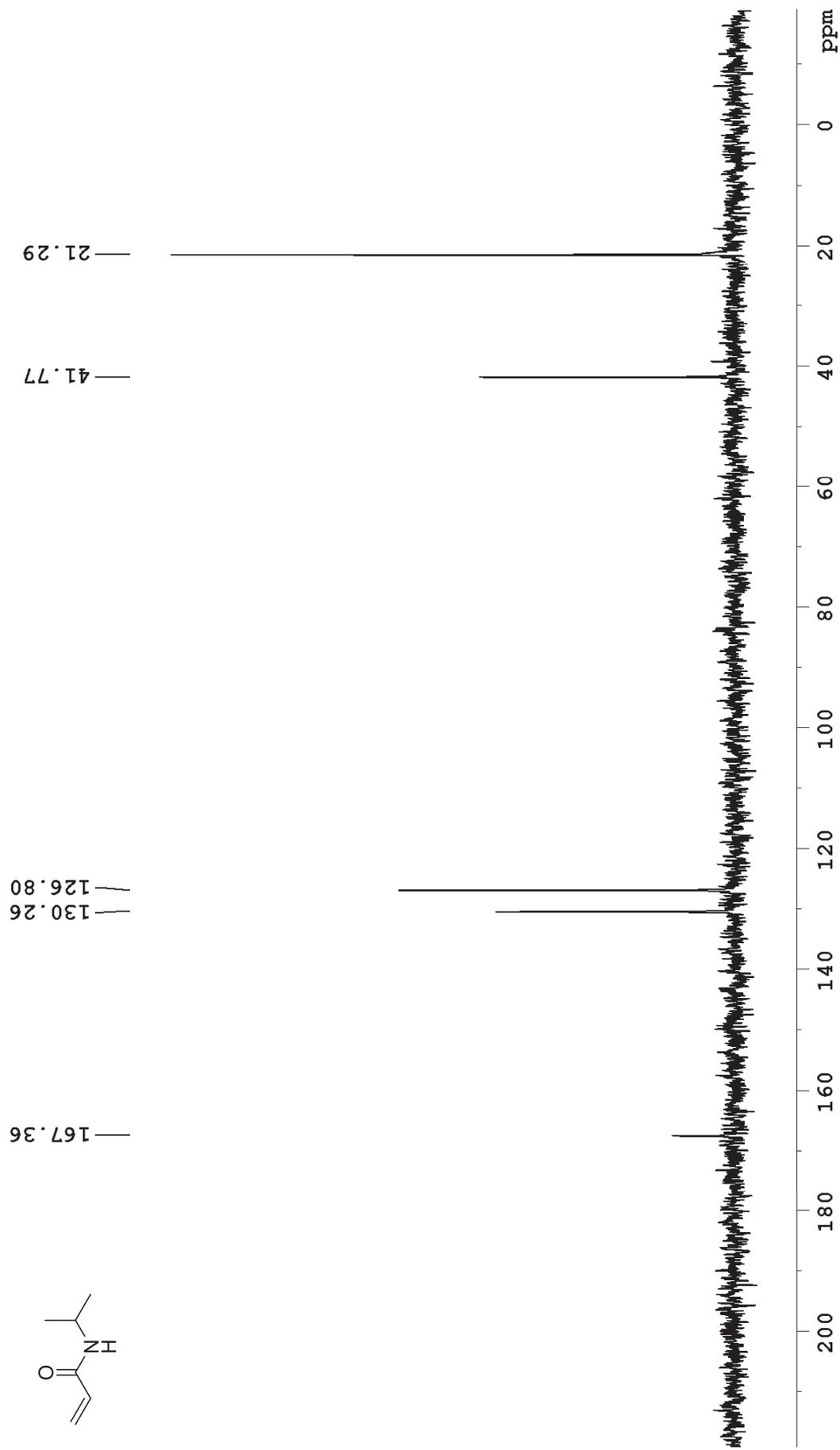
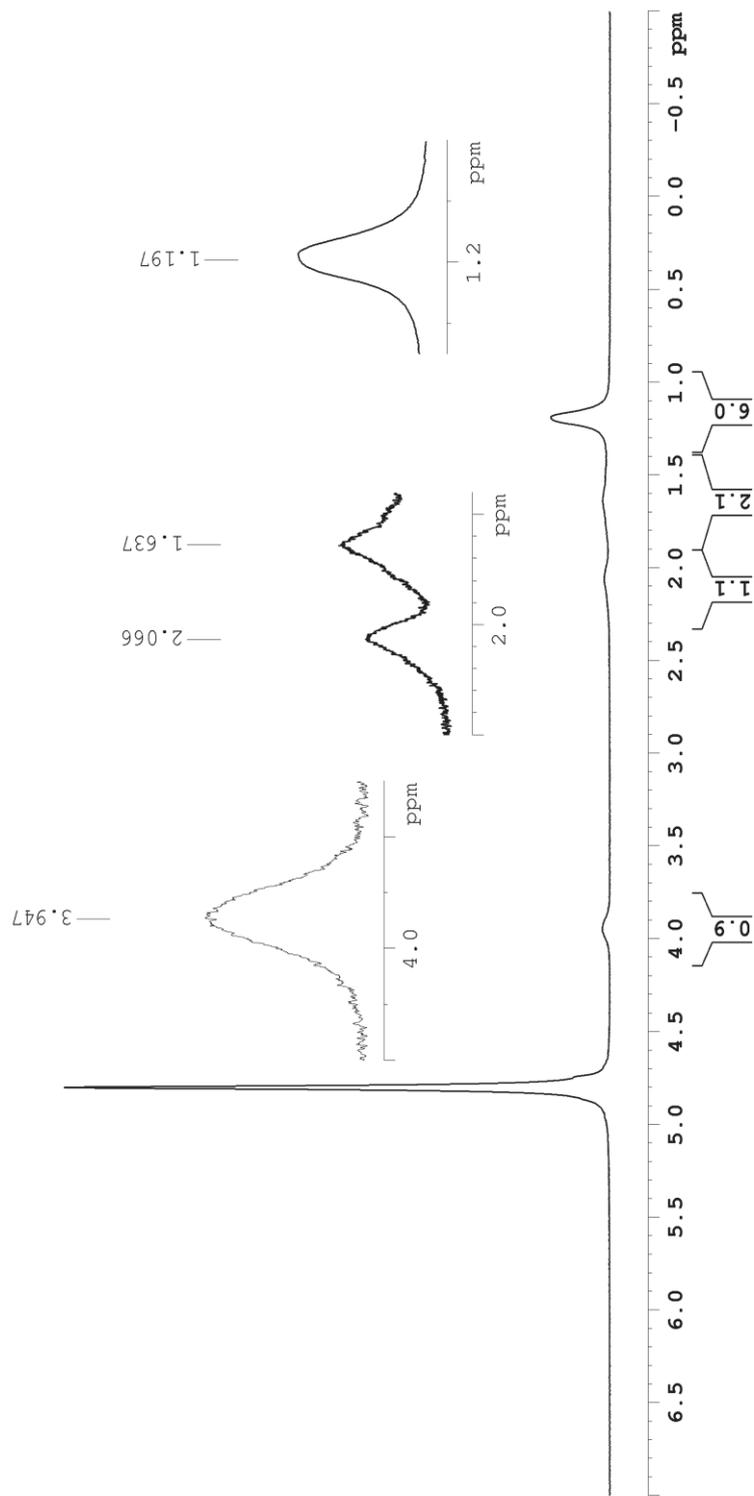
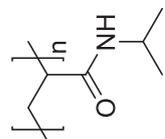


Figura S2. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$  (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do NIPAm.



**Figura S3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TMS) do PNII.

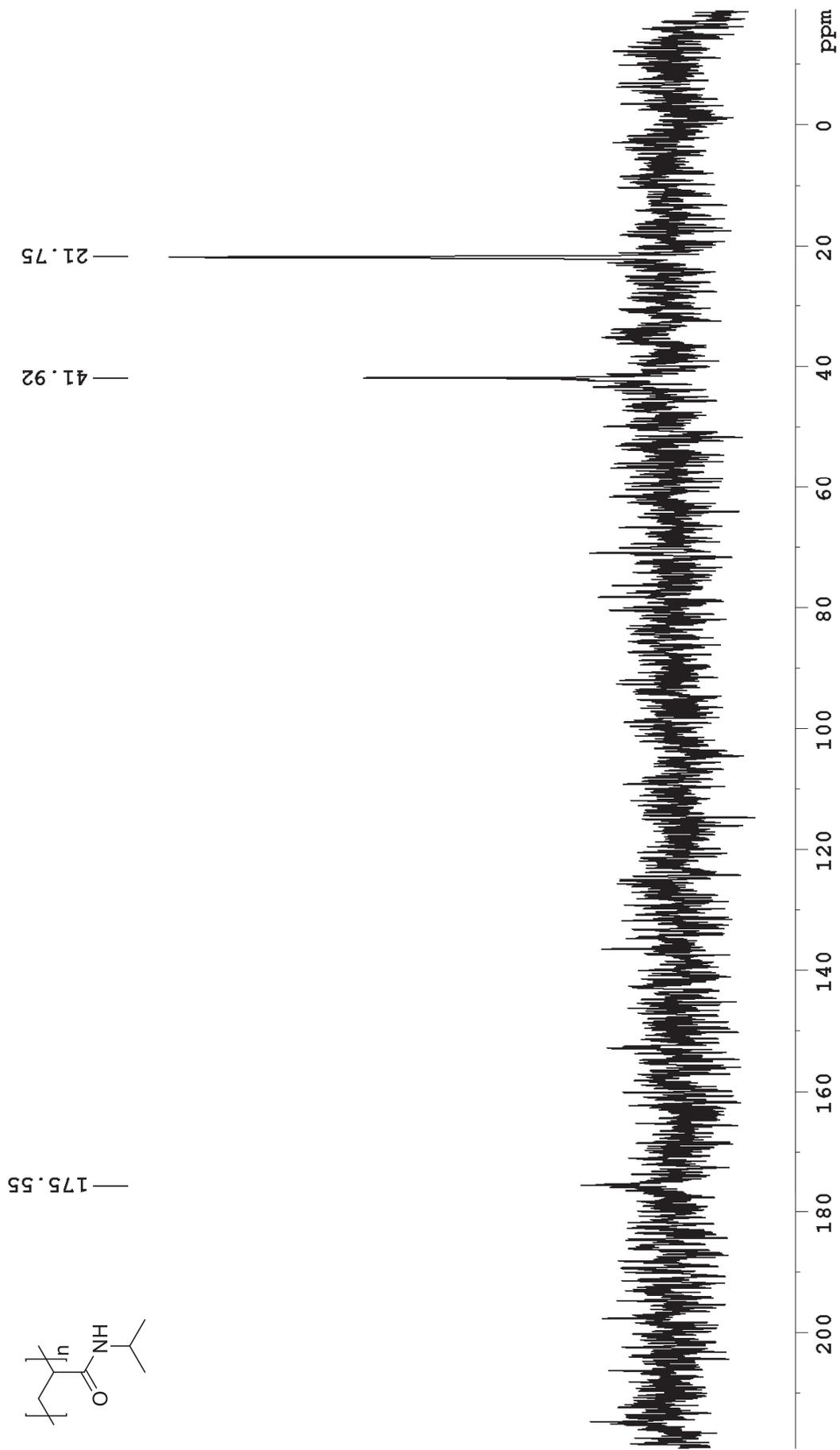
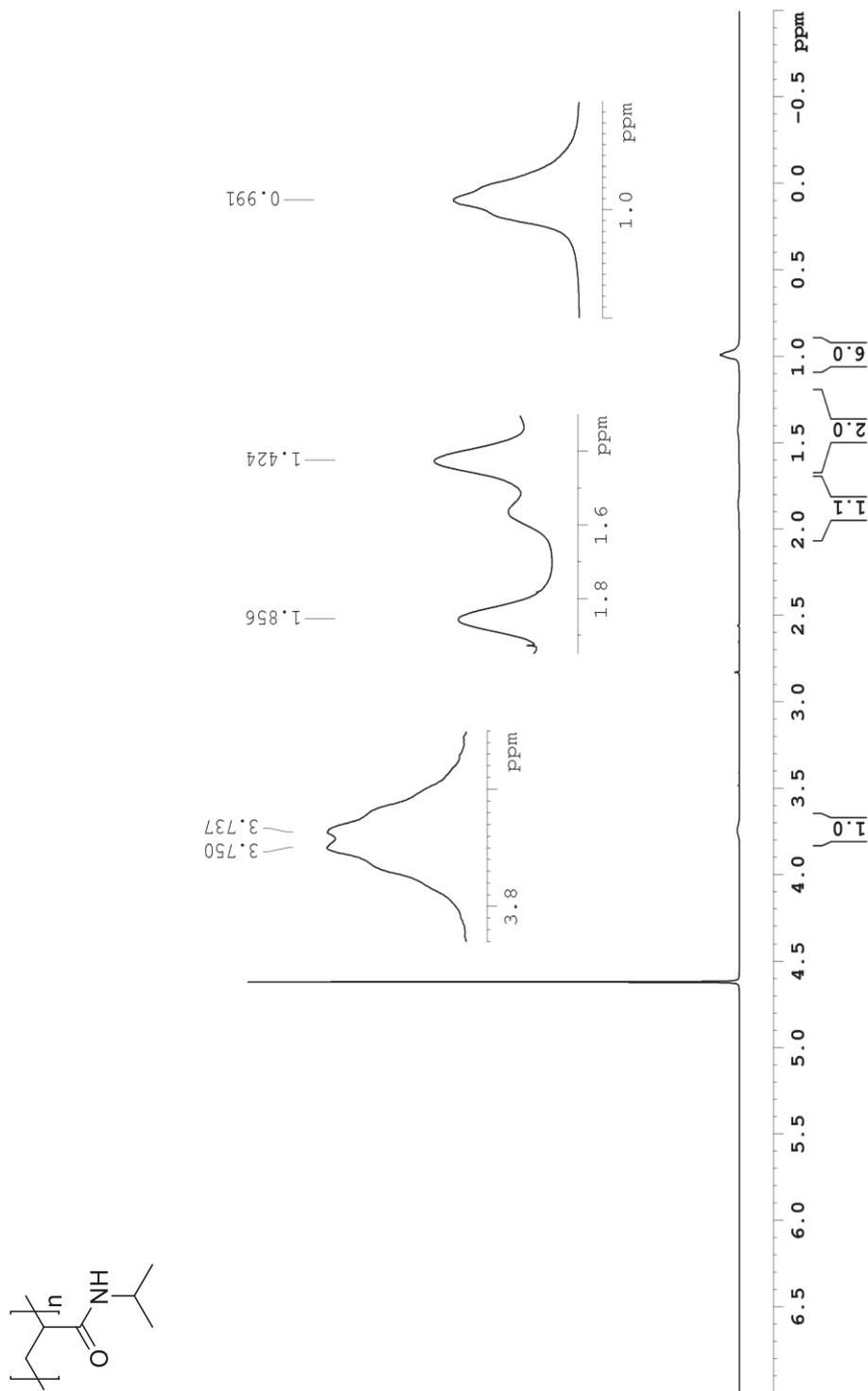


Figura S4. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  {H} (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do PNII.



**Figura S5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do PNIZ.

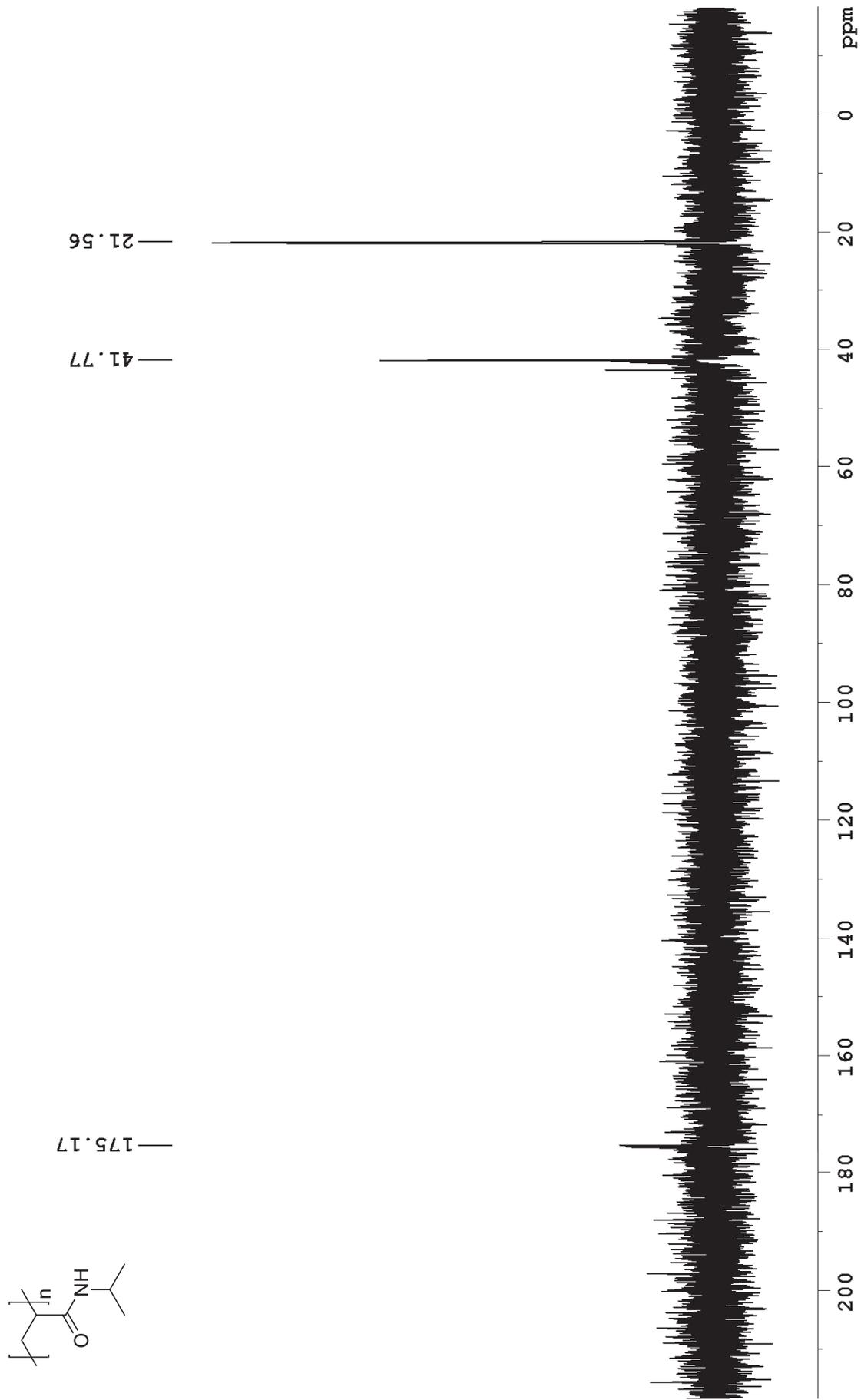
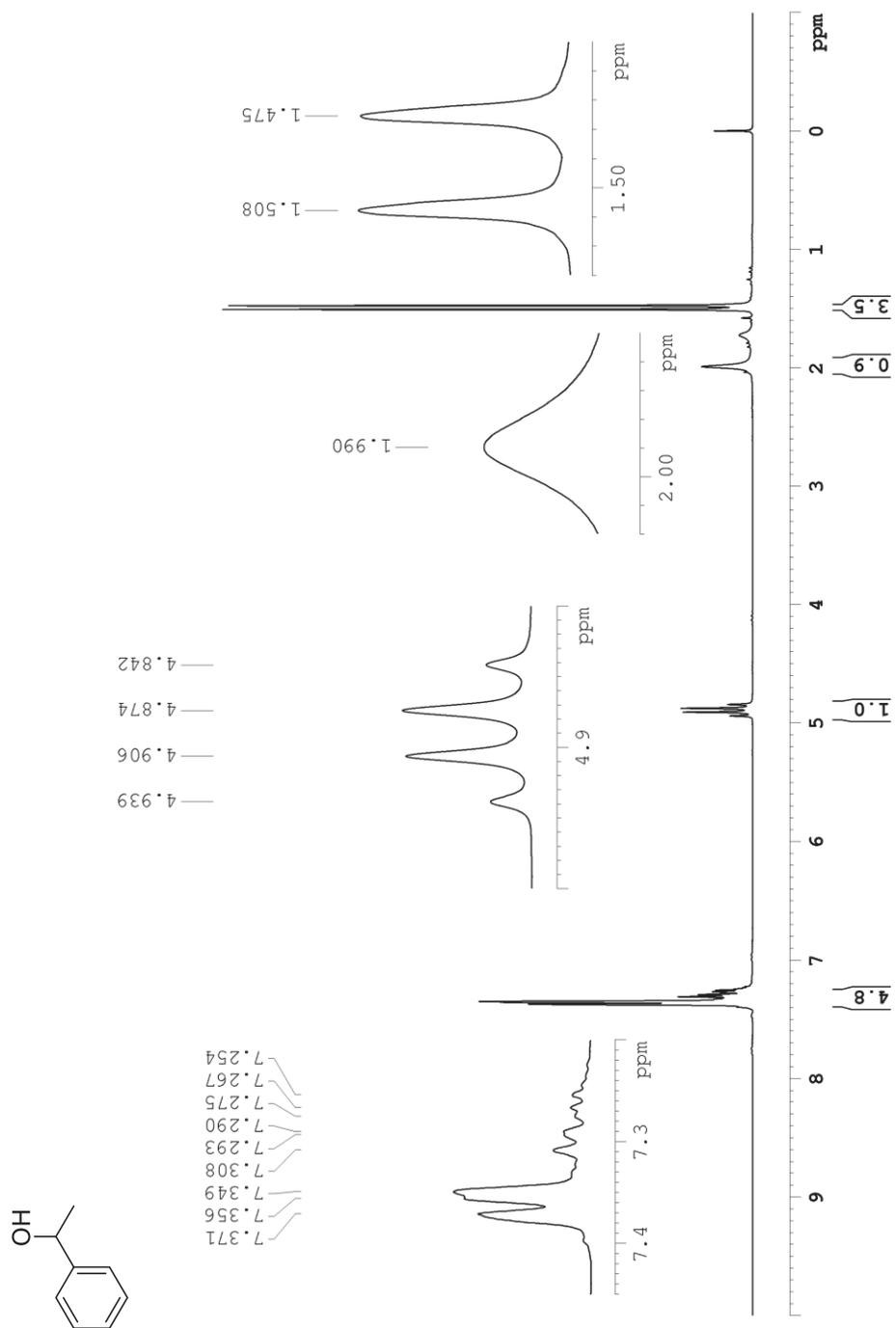


Figura S6. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do PNIZ.



**Figura S7.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) do 1-feniletanol.

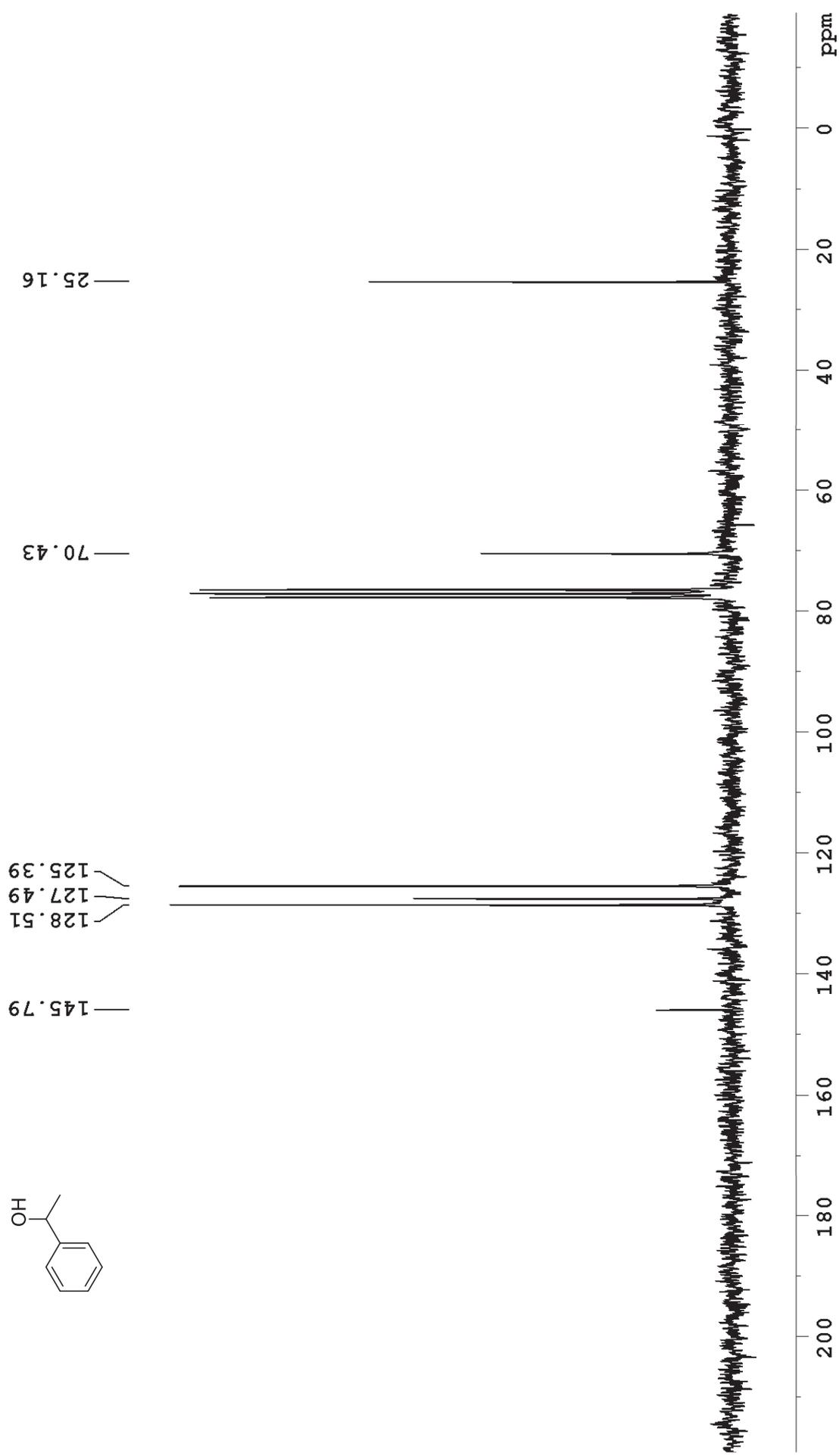
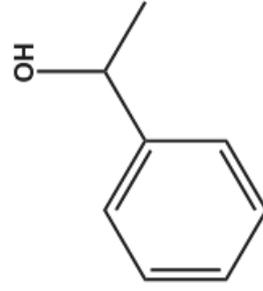


Figura S8. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do 1-feniletanol.



1-feniletanol

GC-MS, m/z (intensidade relativa): 122 (30%); 107 (96%); 79 (100%); 77 (55%); 51 (18%)

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 1,50 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H); 1,99 (s, 1H); 4,90 (q,  $J = 6,5$  Hz, 1H); 7,20-7,40 (m, 5H)

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 25,2; 70,5; 125,5; 127,6; 128,6; 145,8

IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3348, 3086, 3030, 2974, 2928, 2880, 1951, 1810, 1604, 1494, 1451, 1369, 1302, 1203, 1098, 1075, 1030, 1010, 996, 900, 759, 697

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$

M.M. 122,07  $\text{g mol}^{-1}$

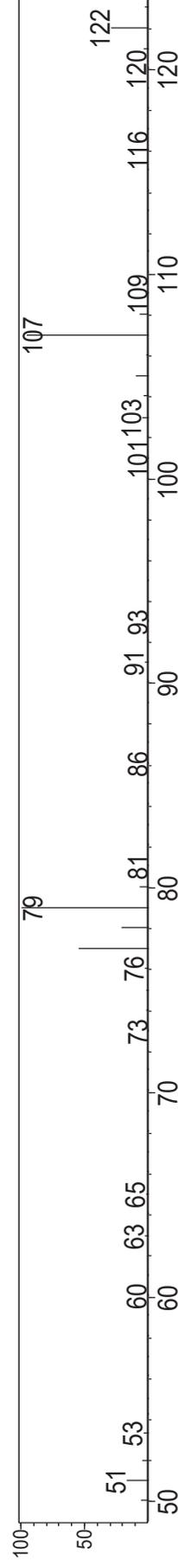


Figura S9. Espectro de massas do 1-feniletanol.

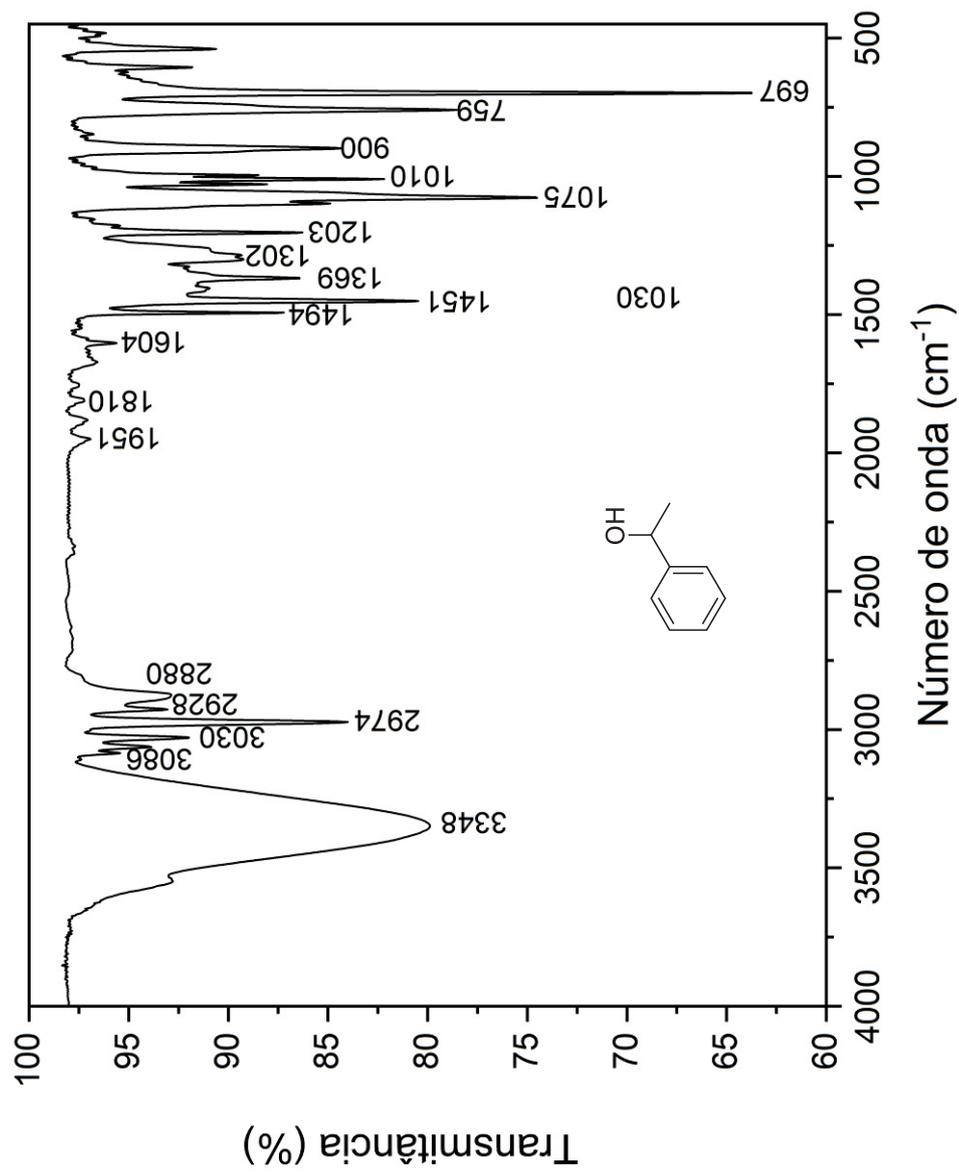


Figura S10. Espectro no IV do 1-feniletanol.

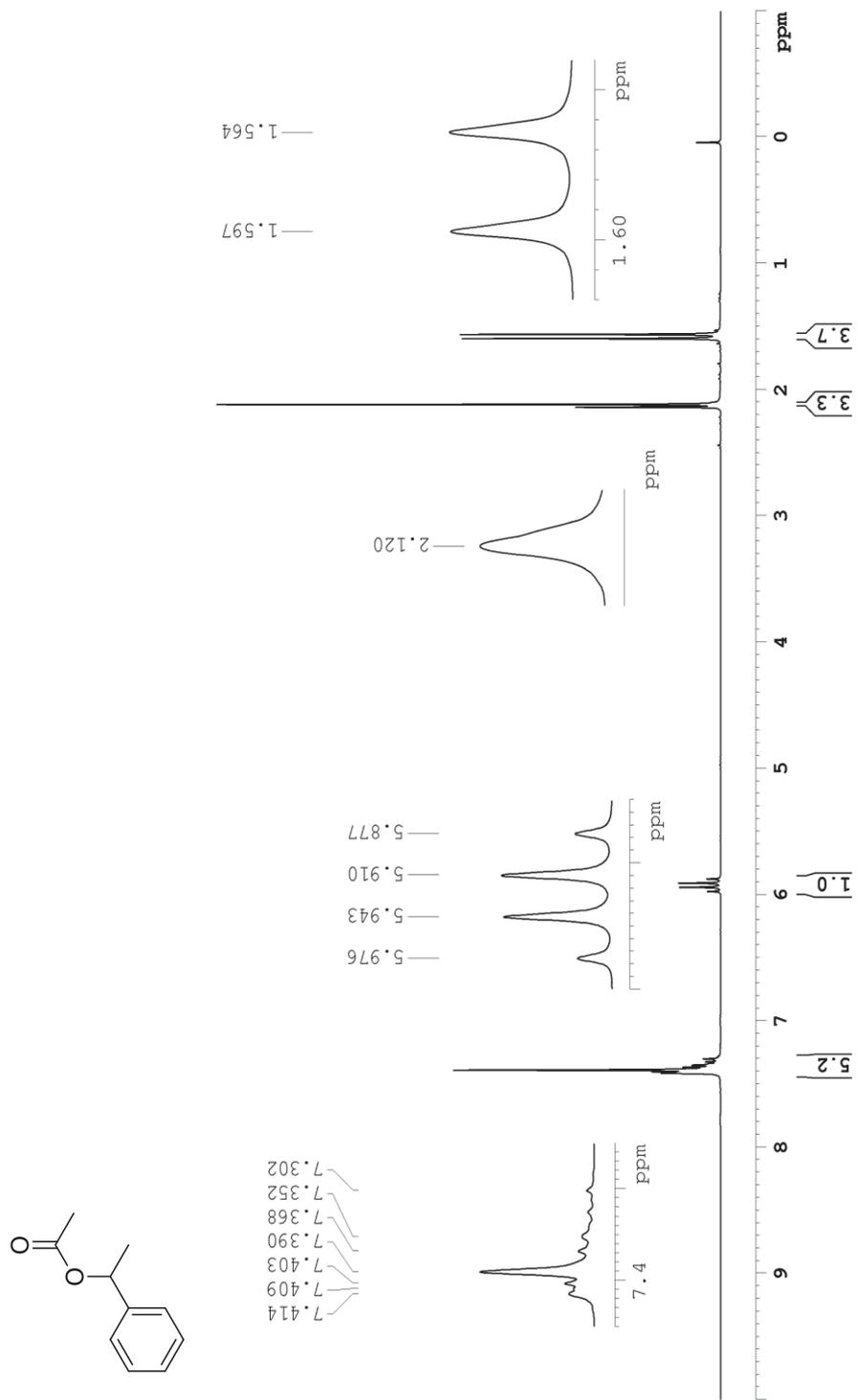


Figura S11. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do acetato de feniletila.

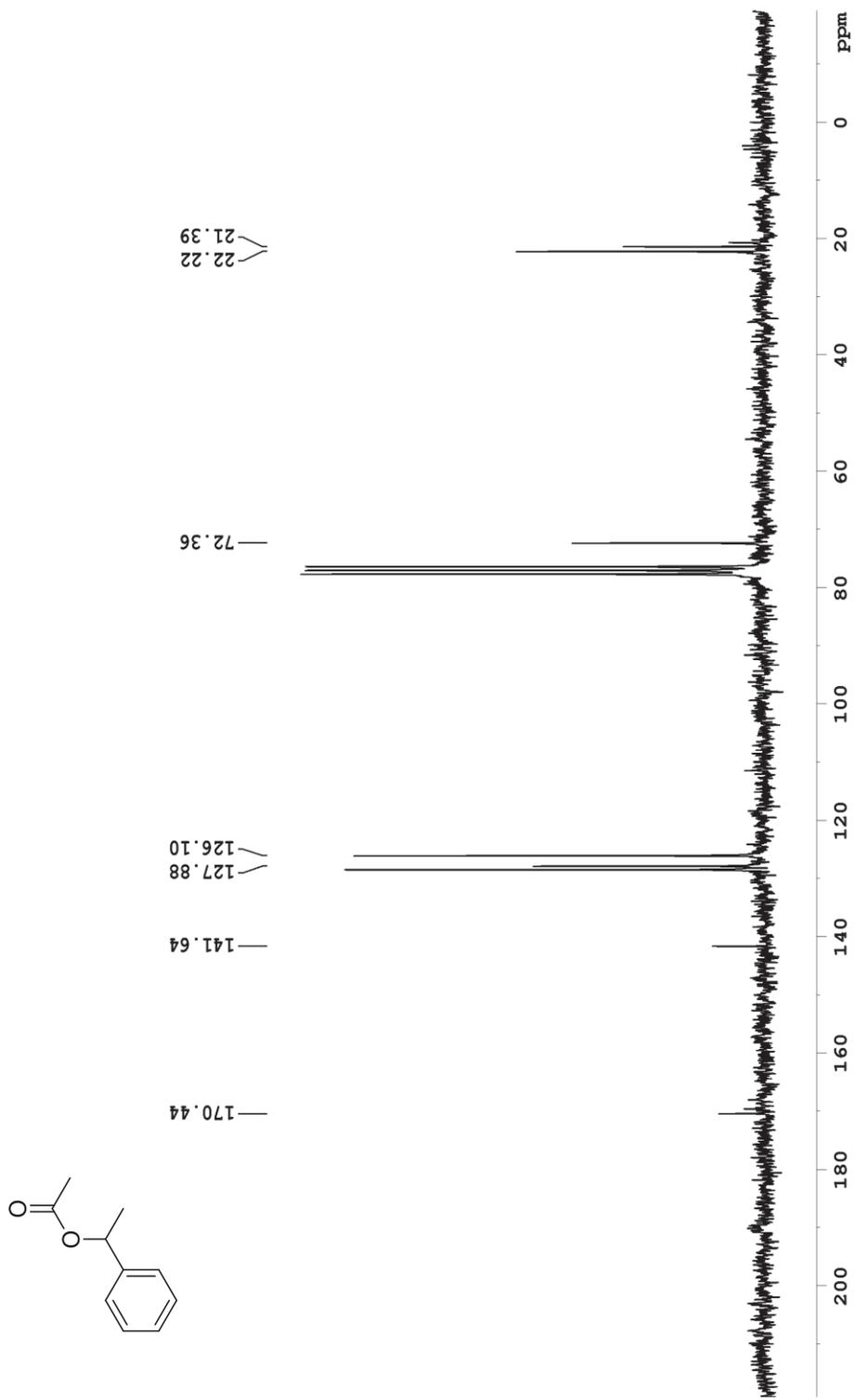
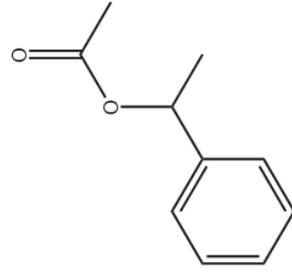


Figura S12. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do acetato de feniletila.



Acetato de 1-feniletila

GC-MS, m/z (intensidade relativa): 164 ( $M^+$ , 16%); 122 (100%); 105 (63%); 104 (85%); 78 (40%); 51 (15%)

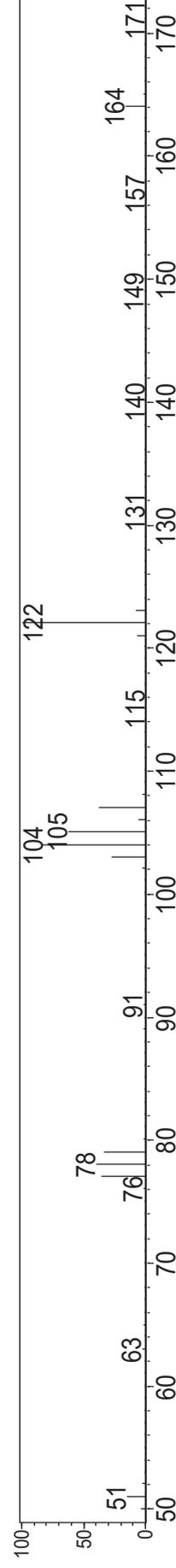
RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 1,53 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H); 2,01 (s, 3H); 5,88 (q,  $J = 6,6$  Hz, 1H); 7,25-7,40 (m, 5H)

RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 21,4; 22,2; 72,3; 126,2; 128,0; 128,6; 141,7; 170,4

$C_{10}H_{12}O_2$

M. M. 164,08 g mol $^{-1}$

IV ( $cm^{-1}$ ): 3088, 3064, 3034, 2983, 2935, 1737, 1494, 1451, 1372, 1242, 1211, 1064, 1024, 943, 762, 699



**Figura S13.** Espectro de massas do acetato de 1-feniletila.

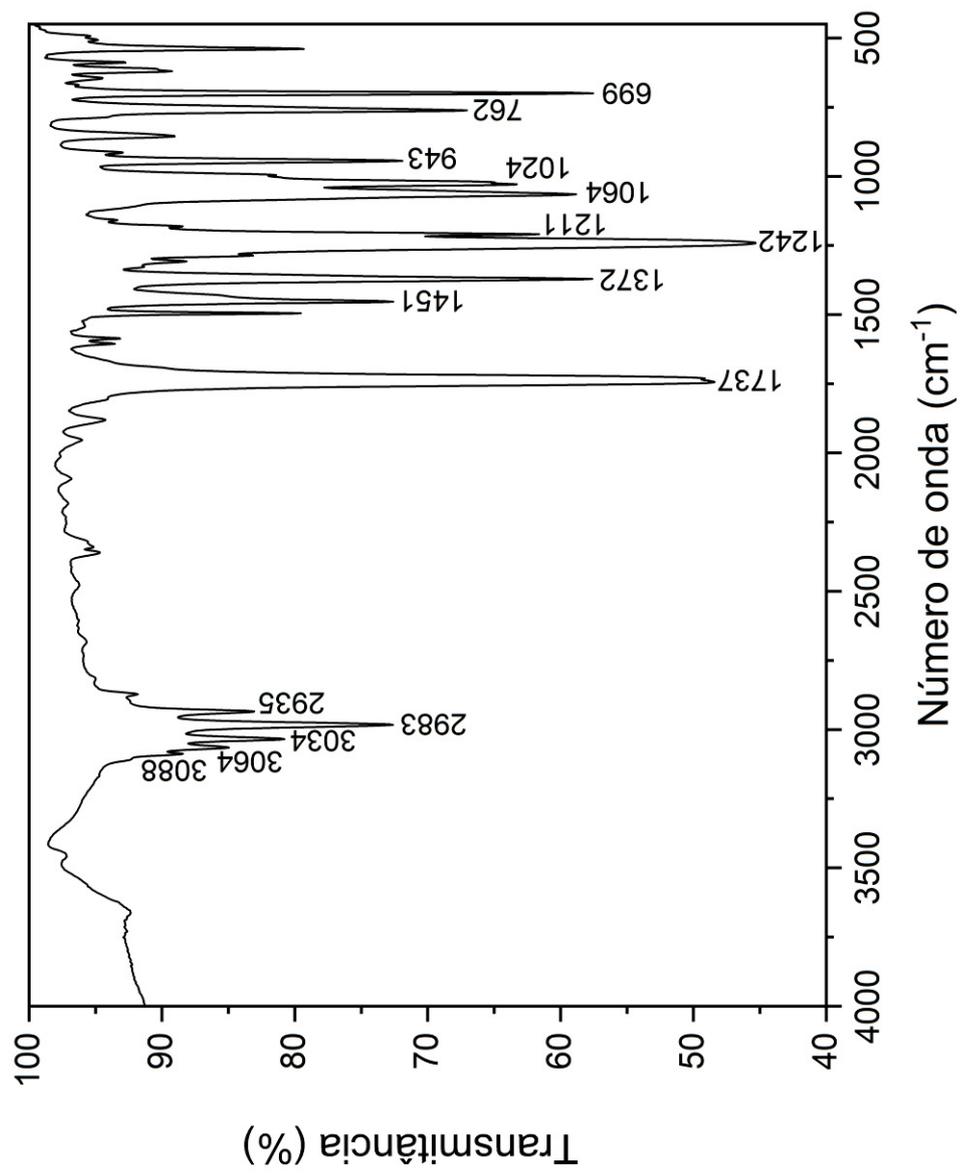
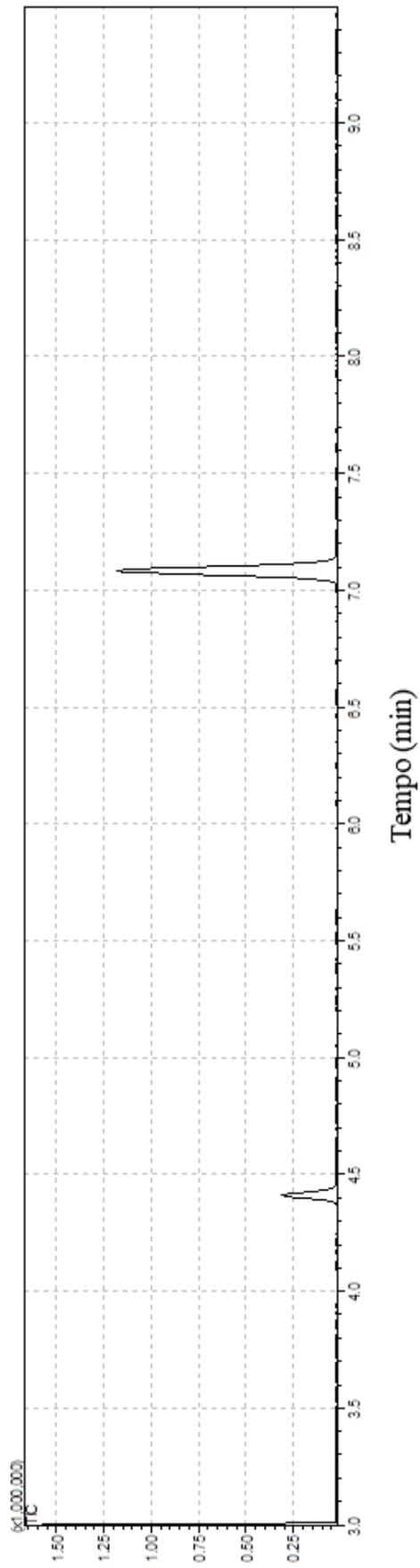
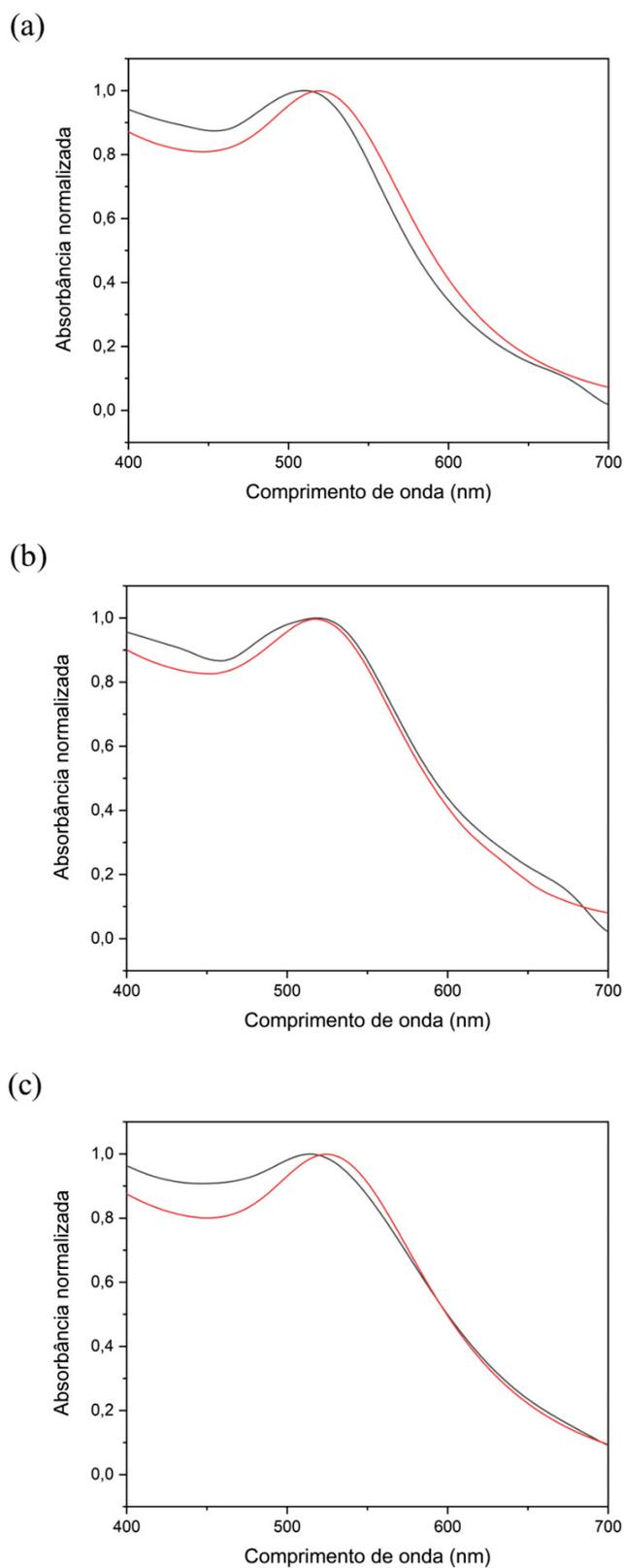


Figura S14. Espectro no IV do acetato de 1-feniletila.

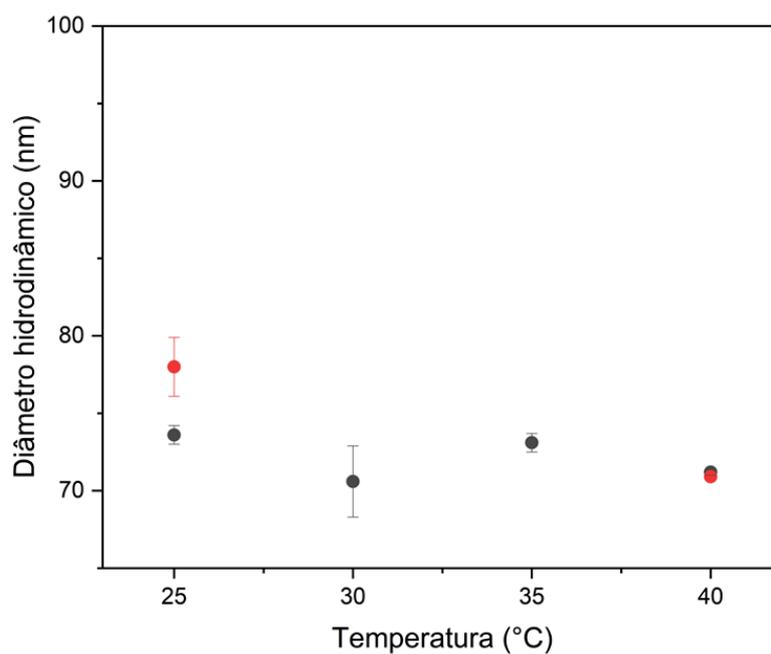


**Figura S15.** Cromatograma mostrando a separação entre os sinais do 1-feniletanol (4,4 min) e acetato de 1-feniletila sintetizado quimicamente (7,1 min).

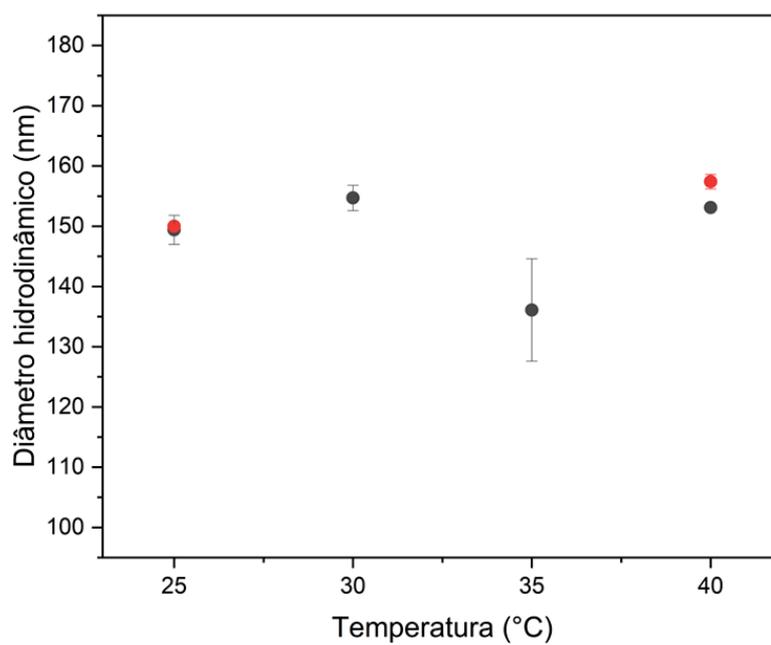


**S16.** Perfil de absorção das bandas LSPR no espectro de UV-Vis para as amostras (a) AuNP/citrato, (b) AuNP@CALB e (c)  $sA/CALB/AuNP$  mostrando a estabilidade das dispersões após 6 meses. A linha preta refere-se as dispersões analisadas no dia da síntese das AuNPs e a linha vermelha após 6 meses.

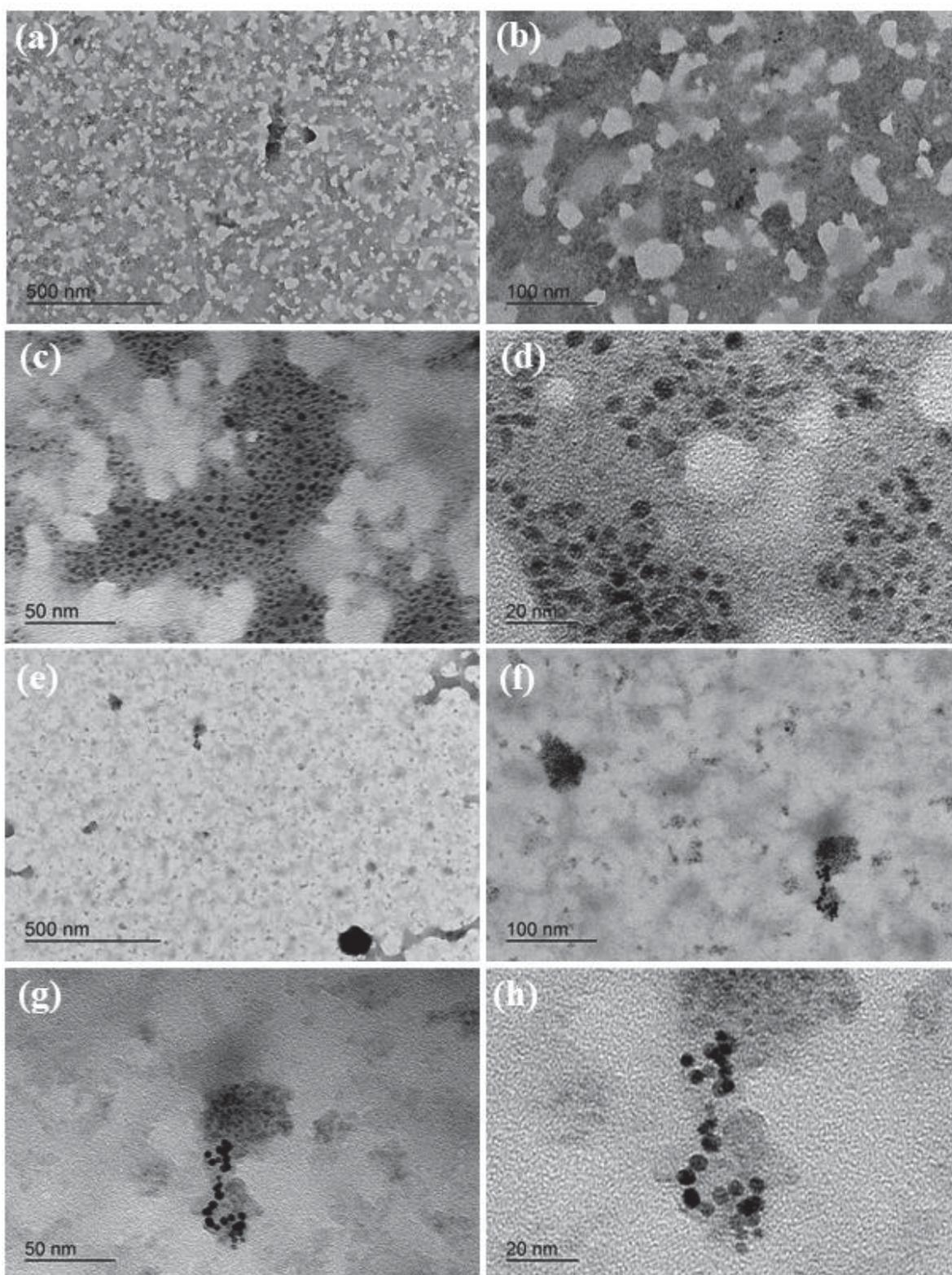
(a)



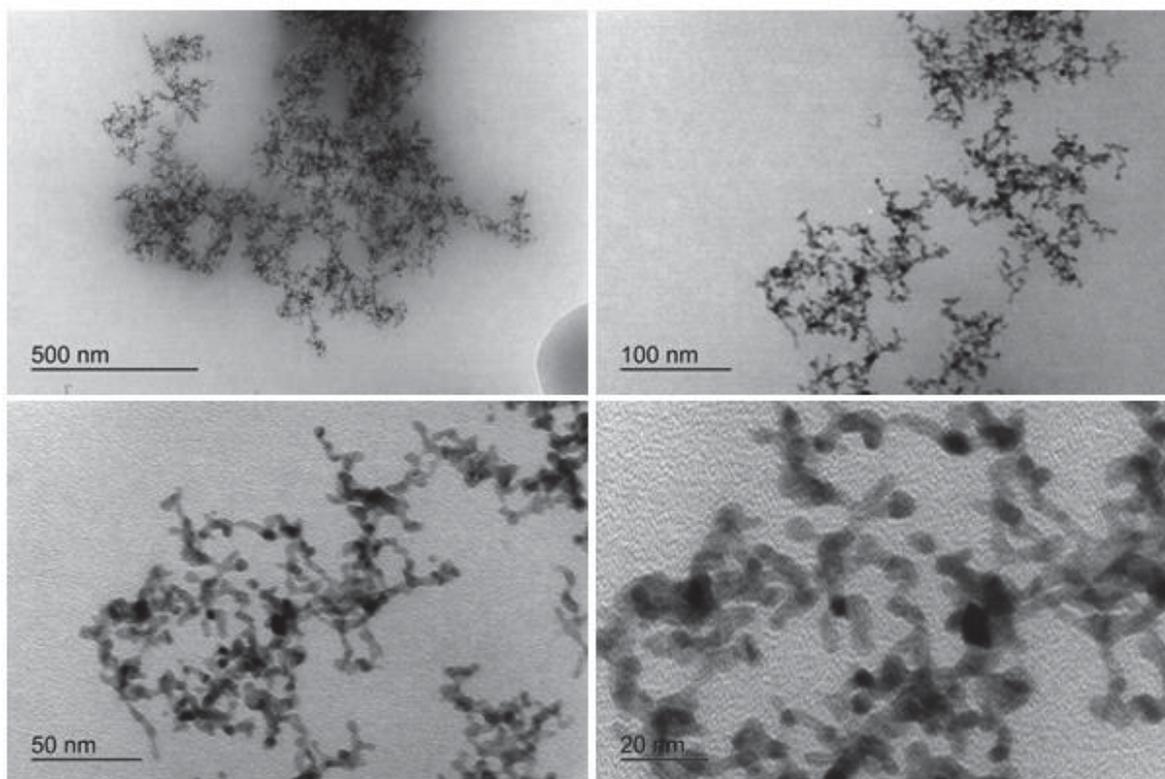
(b)



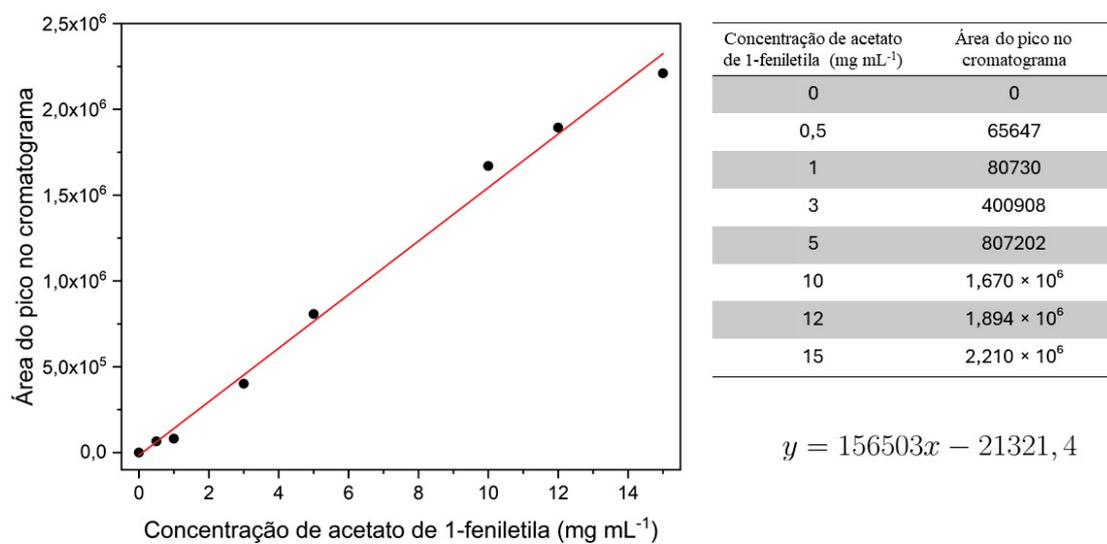
**S17.** Variação do diâmetro hidrodinâmico dos polímeros (a) PNI1 e (b) PNI2 no intervalo de temperatura entre 25 °C e 40 °C. Os círculos pretos são referentes ao aquecimento e os vermelhos são referentes ao resfriamento.



**Figura S18.** Imagens de MET para (a-d)  $s_A$ CALB/AuNP-PNI e (e-h) AuNP@CALB-PNI utilizando concentração inferior a  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  de PNIPAm.



**Figura S19.** Imagens de MET evidenciando a formação das estruturas conhecidas como *worm-like* formadas quando o PNIPAm foi adicionado durante a síntese das AuNPs.



**Figura S20.** Curva de calibração do acetato de 1-feniletila.