

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE LEVANA-MAGNETITA E SUA
UTILIZAÇÃO COMO MATRIZ PARA IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA

JACKELINE DA COSTA MACIEL

Profa. Dra. MARIA DA PAZ CARVALHO DA SILVA
Orientadora

Profa. Dra. GLÍCIA MARIA TORRES CALAZANS
Co-orientadora

Prof. Dr. JOSÉ ALBINO OLIVEIRA DE AGUIAR
Co-orientador

RECIFE, 2008.

JACKELINE DA COSTA MACIEL

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE LEVANA-MAGNETITA E SUA
UTILIZAÇÃO COMO MATRIZ PARA IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA**

Dissertação apresentada como cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada por:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Departamento de Bioquímica – UFPE

Data: 26/02/2008

Maciel, Jackeline da Costa

Síntese e caracterização de partículas de levana-magnetita e sua utilização como matriz para imobilização de tripsina. / Jackeline da Costa Maciel. – Recife: A Autora, 2008.

77 fls. .: il.

**Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – UFPE.
CCB**

**1. Bioquímica 2. Polissacarídeo 3. Tripsina 4. Enzima
I.Título**

**577.1
572**

**CDU (2ª. Ed.)
CDD (22ª. Ed.)**

**UFPE
CCB – 2008 – 36**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Jackeline da Costa Maciel**, realizada em 26 de fevereiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 09:30 horas, do dia vinte e seis de fevereiro de 2008, foi aberto, na Sala de Aulas do LIKA UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Jackeline da Costa Maciel** aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior** fez a apresentação da aluna, de sua orientadora Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva, dos co-orientadores Professores Doutores Glícia Maria Torres Calazans e José Albino Oliveira de Aguiar, bem como da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Ele próprio, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia e Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, ambos do Depto. de Bioquímica/UFPE. Após as apresentações, o Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **“Síntese e Caracterização de Partículas de Levana-Magnetita e sua Utilização como Matriz para Imobilização de Tripsina”**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em **35 (trinta e cinco) minutos**. Após a apresentação da mestranda, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra a primeira examinadora, Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Logo após, o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para agradecer o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual permaneceu no local. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **“Aprovada com Distinção”**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 26 de fevereiro de 2008.

Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Maria Tereza dos Santos Correia
Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Glícia Maria Torres Calazans
José Albino Oliveira de Aguiar
Glícia M. T. Calazans
[Assinatura]

“Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo. E você pode evitar que ela vá à falência. Há muitas pessoas que precisam, admiram e torcem por você. Gostaria que você sempre se lembrasse de que ser feliz não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem decepções. Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza. Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos. Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples que mora dentro de cada um de nós. É ter maturidade para falar "eu errei". É ter ousadia para dizer "me perdoe". É ter sensibilidade para expressar "eu preciso de você". É ter capacidade de dizer "eu te amo". É ter humildade e receptividade. Desejo que a vida se torne um canteiro de oportunidades para você ser feliz... E, quando você errar o caminho, recomece. Pois assim você descobrirá que ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência. Jamais desista de si mesmo. Jamais desista das pessoas que você ama. Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um obstáculo imperdível, ainda que se apresentem dezenas de fatores a demonstrarem o contrário. Pedras no Caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Há quase seis anos tive a oportunidade de conhecer o outro lado da vida acadêmica. Um lado diferente daquele repleto de aulas e provas que eu conhecia. Um lado de descobertas e cheio de magia. Exatamente isso, magia! “Fazer pesquisa” é algo mágico mesmo, pois nos impulsiona a conhecer um mundo novo repleto de possibilidades. Ser pesquisador é muito mais do que estar em um laboratório de pesquisa. Ser pesquisador é ter um olhar crítico e curioso para tudo àquilo que o cerca. Ser pesquisador não é um trabalho, mas uma escolha. Dentre as muitas escolhas que já fiz até hoje, essa foi uma das mais acertadas. Ter conhecido esse “mundo mágico” foi muito importante pra mim e por diversas razões. Aprendi que posso conseguir respostas pra quase tudo, mas sempre haverá algo sem resposta ou cuja resposta talvez não exista, mas será justamente essa incerteza que me fará prosseguir na minha caminhada. Não que a pesquisa seja apenas um caminho de flores, pelo contrário, é bem difícil, pois exige dedicação extrema e compromisso. Respeito a todos aqueles que dedicaram e dedicam suas vidas em nome de um objetivo maior. Todos devem ser sempre lembrados como grandes desbravadores da busca pelo conhecimento. E que essa busca seja sempre renovada. Esse “mundo mágico” me foi apresentado por uma pessoa muito querida, meu amigo Ian Porto. Sua paixão pela pesquisa, em especial pela Bioquímica, despertou em mim uma grande curiosidade e foi assim que tudo começou. Seguindo os passos do Ian, fui em busca das minhas próprias respostas. A partir de então, minha vida mudou e hoje tenho minhas próprias histórias para contar.

Na Bioquímica, a Profa. Maria da Paz me fez dar os primeiros passos. Desde o início ela se mostrou bastante confiante e depositou em mim credibilidade. Serei eternamente grata por tal confiança, pelos conselhos e até mesmo pelas “brincas”, que seguramente não acreditamos nunca merecer, mas que quase sempre se mostram construtivas posteriormente. A Profa. Maria da Paz, que além de orientadora se tornou uma amiga e que nos momentos mais difíceis esteve presente, sentirei saudades de trabalharmos juntas e de toda a liberdade que me concedeu no ambiente de trabalho. Também tive a feliz oportunidade de conhecer outros grandes profissionais, que despertaram minha curiosidade e admiração. O elegantíssimo Prof. Luiz Carvalho cuja simpatia e compromisso com sua função de educador me fazem admirá-lo a cada dia. A querida Profa. Glícia Calazans cuja

simplicidade e dedicação rendo meus elogios. A bela Profa. Tereza Correia pela pessoa encantadora que é. O descontraído Prof. José Albino cuja espontaneidade permitiu que eu me sentisse “em casa” mesmo estando em um ambiente tão diferente daquele que estava acostumada. O empreendedor Prof. Ranilson Bezerra, o bem-humorado Prof. Giovani Bertani, a gentil Profa. Elizabeth Chaves, o amável Prof. Francisco Amâncio e a amiga Profa. Ana Maria Mendonça. Muitos outros poderiam ser mencionados, por isso deixo aqui minha gratidão por tudo que pude aprender com cada um deles e até mesmo pelas coisas que fiz questão de não aprender!

Além dos mestres, conheci pessoas maravilhosas e algumas delas tenho a sorte de chamar de amigos. Ter trabalhado no setor de Bioquímica do LIKA foi gratificante, pois pude conviver com algumas figuras inesquecíveis, como Givanildo Bezerra, Luciana da Matta e Luciana Alves cujas lutas por um ambiente de trabalho amigável e por uma pesquisa de qualidade me fizeram enxergar com outros olhos. Jamais esquecerei das boas risadas e dos momentos de descontração vividos na companhia de pessoas muito queridas como Érika Maria, Danielle Santos, Michele Alves, Helena Nascimento, Marina Marcuschi, Talita Espósito, Elaine Virgínia, Daniela Viana, Ricardo Souza, Mariane Lira, Marcela Outtes, Islene, Júlio César Nascimento, Dayse Vasconcelos, Fábio, Thiago, Patrícia D’Emery... Não esquecendo de todos os colegas e amigos da turma de mestrado, Ana Luíza Ramos, Adriana Andrade, Ariele Milet, Carolina Lima, Cleideana Bezerra, Helane Costa, José Olivá, Milena Sales, Marília Coriolano, Maria Catarina Gadêlha, Priscila Rodrigues e Rodrigo Ferreira, dos quais sempre me lembrarei. Em especial aos meus amigos Ian Porto cuja generosidade e singularidade jamais esquecerei; Roberto Afonso cujo senso crítico e companheirismo despertaram minha admiração; Ana Carina Cavalcanti cuja meiguice e inteligência rendo meus sinceros elogios; Mariana Cristina Cabral cuja honestidade, beleza e determinação admiro demais; Diego Buarque cuja bondade e simpatia o tornam uma pessoa especial e Valdeene Albuquerque cuja delicadeza, paciência, companheirismo e parceria permitiram reforçar nossos laços de amizade.

Em minhas andanças, conheci a querida amiga Priscyla Andrade que me ajudou na realização de parte deste trabalho e cuja dedicação e empenho jamais serei capaz de agradecer o suficiente. Deixo também meus sinceros agradecimentos aos meus novos

amigos farmacêuticos Larissa Parra, Anne Cecília Nascimento, Willams Leal, Albert Rocha e Cybelle Alves que me apoiaram durante a etapa final deste trabalho.

Gostaria de agradecer a todos os profissionais que colaboraram na realização deste trabalho, a João do Departamento de Física pelas análises de Raio-X, a Sérgio do setor de Microscopia Eletrônica do Aggeu Magalhães pelas imagens de MEV, ao Prof. Cláudio Cardoso da Universidade Federal de São Carlos pelas medidas de magnetização e aos técnicos do Departamento de Química Fundamental pelas análises de infravermelho; a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica pela educação e bom-humor de sempre; aos funcionários do LIKA pela boa vontade na realização de seus serviços; ao diretor do LIKA, Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por ceder as instalações e ao CNPq, pela bolsa de mestrado fornecida.

Atravessando as fronteiras do meu ambiente de trabalho, existem algumas pessoas que estão ao meu lado há muito tempo e pelas quais agradeço todos os dias ter encontrado. Minhas amigas Emilena Pina, Cynara Medeiros, Geórgia Gomes, Ethiene Estevam, Karla Cajueiro, Patrícia Santos, Solange Maria, Alice Cristiane Rangel e Kríssia Rayane.

Posso ter aprendido muito sobre as coisas do homem, mas nada disso teria valor se eu não tivesse aprendido sobre as coisas da vida, como ser quem sou e no que acredito. Posso ter defeitos. Ora, quem não os tem? Mas agradeço pela oportunidade de ter a família que tenho. Imperfeita, mas minha. E foi nas suas imperfeições que aprendi a procurar a perfeição. E foi nessa busca que pude lapidar o que havia de bom em mim. E já que seria difícil fazer isso sozinha contei com a ajuda toda especial de cada um deles, meus pais, Márcia e Ronaldo, meus irmãos, Roberta, Bruno e Fábio, meus tios, meus avós, meus primos e minha queridíssima sobrinha Brenda Laryssa. Agradeço a cada um pelo amor compartilhado, pelo incentivo constante, pela ajuda sincera, pela paciência, e sem cujo apoio incondicional nada disso teria sido possível.

Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. REVISÃO DA LITERATURA	
1.1. Introdução ao magnetismo e aos materiais magnéticos.....	01
1.2. Superparamagnetismo.....	04
1.3. Partículas magnéticas.....	06
1.4. Ferrofluidos.....	08
1.5. Aplicações de partículas magnéticas na área biomédica e biotecnológica.....	09
1.5.1. Imagem por Ressonância Magnética (IRM).....	09
1.5.2. Magnetohipertermia.....	10
1.5.3. Separação magnética.....	12
1.5.4. Carreador de fármacos.....	13
1.5.5. Imobilização de enzimas.....	14
1.6. Estabilização de partículas magnéticas.....	15
1.7. Levana: polifrutósídeo.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
4. OBJETIVOS.....	35
5. CAPÍTULO I:	
Preparation and characterization of levan-coated magnetite particles.....	36
Abstract.....	38
Introduction.....	39
Materials and Methods.....	
Materials.....	40
Methods	
Preparation of levan-coated magnetite particles.....	40
Size and morphology.....	40
X-ray analysis.....	41
Magnetization measurements.....	41
Functional groups.....	41
	vii

Results and discussion	
Preparation, size and morphology of the magnetic particles.....	41
Magnetization measurements.....	42
X-ray analysis.....	42
Functional groups.....	43
Application of the particles-coated for bioprocess.....	44
Conclusions	45
Acknowledgements	45
Appendices	46
References	49
Figure captions	51
6. CAPÍTULO II:	
Levan-coated magnetite particles as support for enzyme immobilization	53
Abstract	54
Introduction	55
Materials and Methods	
Materials	56
Methods	
Preparation of levan-coated magnetite particles.....	57
Oxidation of levan-coated magnetite particles.....	57
Immobilization of trypsin.....	58
Enzymatic activity and protein determination.....	58
Immobilized trypsin characterization.....	59
Results and discussion	
Preparation of levan-coated magnetite particles.....	59
Immobilization of trypsin.....	59
Properties of immobilized trypsin.....	61
Acknowledgements	62
References	63
Figures	66
7. ANEXOS	
7.1. Instruções para autores.....	72
7.2. Trabalhos apresentados em congressos.....	77

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

1. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Movimentos do elétron.....	01
Figura 2. Diferentes tipos de comportamento magnético. As setas na figura representam o <i>spin</i> do átomo (ou molécula). <i>Reproduzido a partir de Harris, 2002</i>	03
Figura 3. Barreira de energia que o momento magnético deve ultrapassar para sofrer reversão. $K_A V$ é a barreira de potencial de altura e θ é o ângulo entre o vetor momento magnético e o eixo de fácil magnetização. <i>Fonte: Nobel, 2000</i>	04
Figura 4. Estrutura molecular da magnetita em meio aquoso.....	06
Figura 5. Representação esquemática de uma nanopartícula magnética constituída pelo núcleo (material magnético) e pelo revestimento (polímero ou surfactante). <i>Fonte: www.ipfdd.de/Hybrid-Nanomaterials.193.0.html</i>	07
Figura 6. Relação entre o diâmetro da partícula e o vetor magnetização. D_c : diâmetro a partir do qual a partícula será multidomínio; M e m : vetor magnetização. <i>Fonte: http://www.if.ufrgs.br/~magusmao/FIP10604/rafael.pdf</i>	11
Figura 7. Ilustração esquemática do uso de partículas magnéticas na terapêutica. As nanopartículas magnéticas se acumulam nos tecidos tumorais via sistema de liberação de drogas. Elas também podem ser usadas para o diagnóstico do câncer por Imagem de Ressonância Magnética (IRM) e podem ser utilizadas na terapêutica do câncer por meio da indução do calor (Hipertermia). Sensor de IM: Sensor de Imagem Magnética. <i>Fonte: Ito et al., 2005</i>	12
Figura 8. Separação magnética de DNA. 1. Homogeneização do material. 2. Ligação de ácidos nucleicos às partículas magnéticas e separação. 3. Lavagem dos ácidos nucleicos capturados com tampão. 4. Lavagem com etanol 70% para remoção de contaminantes. 5. Eluição dos ácidos nucleicos das partículas magnéticas. <i>Fonte: http://www.agencourt.com/products/spri_reagents/chloropure/</i>	13
Figura 9. Estabilização da superfície da magnetita. Ligação entre a magnetita e o revestimento polimérico. <i>Reproduzido a partir de Harris, 2002</i>	15
Figura 10. Estrutura química da levana. <i>Fonte: Barros, 2002</i>	17
5. CAPÍTULO I: Preparation and characterization of levan-coated magnetite particles	37

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of uncoated magnetite (A) and levan-coated magnetite (B).....	46
Fig. 2. Magnetization curves of uncoated magnetite (A) and levan-coated magnetite (B) at 293 K and 313 K.....	46
Fig. 3. X-ray powder diffraction patterns of uncoated and levan-coated magnetite.....	47
Fig. 4. FTIR spectra of the levan polysaccharide (A), levan-coated magnetite (B) and uncoated magnetite (C).....	47
Fig. 5. Reused of immobilized trypsin on uncoated (○) and levan-coated (●) magnetite particles. The bigger specific activity of enzyme (100 %) was 20.65 ± 0.69 mU/mg for trypsin immobilized on particles-coated and 18.59 ± 0.08 mU/mg for trypsin immobilized on particles-uncoated.....	48
6. CAPÍTULO II: Levan-coated magnetite particles as support for enzyme immobilization	53
Fig. 1. (A) The amounts of trypsin immobilized on levan-coated magnetite. The immobilized trypsin (mg) per g-dry weight magnetic matrix is plotted. (B) Effect of immobilized protein amount on the activities of immobilized trypsin measured by BAPNA (4 mM). The bigger specific activity of enzyme (100 %) was 57.92 ± 1.30 mU/mg. The content of added protein varied between 50 and 800 µg.....	66
Fig. 2. Reused of immobilized trypsin on uncoated (○) and levan-coated (●) magnetite. The immobilized enzyme on matrix (uncoated and coated magnetite) was incubated with a 4 mM initial concentration of BAPNA and 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. The bigger specific activity of enzyme (100 %) was 20.65 ± 0.69 mU/mg.....	67
Fig. 3. Effect of pH on the activities of soluble trypsin (—■—) and immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles (---□---). Assay: 10 mg of magnetic immobilized and 30 µL soluble (6.0 µg) trypsin were incubated with 4 mM BAPNA and 0.1 M buffer at 25°C and shaken for 15 min. The absorbance of formed product was measured at 405 nm. Buffers used: sodium phosphate (6.0-7.0) and Tris-HCl (7.5-9.0). The obtained activities were referred to the highest activity (100%) for immobilized and soluble enzyme.....	68
Fig. 4. Effect of temperature on the activities of soluble trypsin (—■—) and immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles (---□---). Assay: 10 mg of magnetic immobilized and 30 µL soluble (6.0 µg) trypsin were incubated with 4 mM BAPNA and 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 buffer at temperature different (25-70°C) and shaken for 15 min. The absorbance of formed product was measured at 405 nm. The obtained activities were referred to the highest activity (100%) for immobilized and soluble enzyme.....	69

Fig. 5. Thermal stability of soluble trypsin (—■—), immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles (---□---) and immobilized trypsin on uncoated magnetite (—★—). Assay: 10 mg of magnetic immobilized and 30 µL soluble (6.0 µg) trypsin were incubated in temperature differentials (25-70°C) for 30 min. Thereafter were incubated with 4 mM BAPNA and 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 buffer at 25°C and shaken for 15 min. The absorbance of formed product was measured at 405 nm. The obtained activities were referred to the highest activity (100%) for immobilized and soluble enzyme..... 70

Table 1. Kinetic parameters for soluble and immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

χ	Susceptibilidade magnética	MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
T_c	Temperatura de Curie	SEM	Scanning Electron Microscopy
μ_{at}	Momento magnético atômico	IV	Infravermelho
τ	Tempo de relaxação	IR	Infrared
k_B	Constante de Boltzmann	K_m	Constante de Michaelis-Menten
T	Temperatura	V_{max}	Velocidade máxima
E	Barreira efetiva de energia que separa dois estados de equilíbrio	KDa	kilodalton
V	Volume da partícula	2θ	Ângulo de espalhamento (graus)
T_B	Temperatura de bloqueio	λ	Comprimento de onda
M	Magnetização	$\text{\AA}$	angstrom
H	Campo magnético	K	kelvin
B_0	Campo magnético estático	KOe	kilooersted
T	tesla	FTIR	Fourier Transform Infrared
MHz	megahertz	cm^{-1}	número de ondas
T₁	Relaxação longitudinal	mg	miligrama
T₂	Relaxação transversa	atm	atmosfera
nm	nanômetro	emu	unidade eletromagnética
μm	micrômetro	g	grama
$^{\circ}\text{C}$	grau celsius	min	minuto
D	Diâmetro da partícula	h	hora
D_c	Diâmetro crítico da partícula	M	molar
pH	Potencial hidrogeniônico	mM	milimolar
M_r	Relação molecular	mL	mililitro
M_w	Peso molecular	μL	microlitro
DRX	Difração de raios-X	mU	miliunidade
XDR	X-ray Diffractometry	μmol	micromol

RESUMO

O polissacarídeo levana foi utilizado como revestimento de partículas de magnetita, as quais foram obtidas pelo método de co-precipitação de uma solução contendo íons de Fe(II) e Fe(III) em meio aquoso alcalino. As partículas de levana-magnetita foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), magnetometria, difração de Raios-X (DRX) e espectroscopia na região do infravermelho (IV). As partículas de magnetita, não-revestidas e revestidas, foram ambas heterogêneas na forma sendo as partículas revestidas de tamanhos maiores. As partículas revestidas exibiram uma magnetização dez vezes menor comparada àquelas não-revestidas provavelmente devido à camada de revestimento. O difratograma de raios X mostrou que a magnetita é a fase dominante nas partículas revestidas e a espectroscopia no infravermelho mostrou bandas de absorção características do polissacarídeo levana e da magnetita presentes nas partículas com revestimento (O–H, C–O–C, e Fe–O). As partículas de levana-magnetita foram ativadas com periodato de sódio e utilizadas como matriz para imobilização da enzima proteolítica tripsina. A quantidade de proteína imobilizada foi de 79,66 % e sua atividade específica variou com a quantidade de enzima imobilizada. A tripsina imobilizada foi reutilizada dez vezes seguidas e apresentou uma atividade específica média igual a $17,41 \pm 0,53$ mU/mg correspondendo a $84,43 \pm 5,42$ % da atividade específica inicial. Após estocagem por 30 dias a 4 °C e 25 °C, a tripsina imobilizada mostrou uma perda de 40,69 % e 41,47 % da atividade inicial, respectivamente. Em relação ao tempo de prateleira, uma perda de 70,56 % da atividade inicial foi observada depois de estocada por 21 dias e reutilizada cinco vezes durante este período. Ela mostrou significativamente uma maior estabilidade em condições de aumento da temperatura (40°C e 50°C) quando comparada à enzima solúvel. A faixa de pH para atividade ótima da tripsina imobilizada foi de 8,5–9,0 e para tripsina solúvel foi de 8,0–9,0. A tripsina imobilizada apresentou um K_m aparente ($0,257 \pm 0,04$ mM) aproximadamente 2 vezes menor que aquele encontrado para a enzima solúvel ($0,528 \pm 0,26$ mM). As partículas de magnetita revestidas mostraram boa capacidade para serem usadas como matriz para imobilização de enzimas, em especial sua capacidade para retenção de proteína, reuso e estabilidade térmica.

Palavras chaves: levana, polissacarídeo, magnetita, enzima, tripsina.

ABSTRACT

Levan polysaccharide was used to coat magnetite particles obtained by co-precipitation process from a solution contain Fe(II) and Fe(III) ions in alkaline aqueous medium. The levan-coated magnetite particles were characterized by scanning electron microscopy (SEM), magnetization measurements, X-ray diffractometry (XRD) and infrared spectroscopy (IR). The uncoated and levan-coated magnetite particles were heterogeneous both in shape and particles-coated presented bigger sizes as compared to that uncoated in accord obtained SEM images. The particles-coated exhibited a magnetization ten fold lower as compared to uncoated probably due to coating layer. XRD of diffractogram showed that magnetite is the dominant phase in the particles-coated and infared spectroscopy showed characteristics absorption bands from levan polysaccharide and magnetite present in the particles-coated (O–H, C–O–C, and Fe–O bond). Levan-coated magnetite particles were activated by sodium periodate method and utilized as matrix for immobilization of the proteolytic enzyme trypsin. The levan-coated magnetite particles were activated by sodium periodate method. These activated magnetic particles were utilized as matrix for immobilization of the proteolytic enzyme trypsin. The amount of protein immobilized was of 79.66 % and its specific activity varied depending on the immobilized enzyme. The immobilized trypsin was reused for ten times and presented a mean specific activity equal to 17.41 ± 0.53 mU/mg corresponding to 84.43 ± 5.42 % of the initial specific activity. After 30 days of storage at 4 °C and 25 °C, immobilized trypsin showed a loss of 40.69 % and 41.47 % of the initial activity, respectively. In relation to shelf life, a loss of 70.56 % of the initial activity was observed after stored for 21 days and reused five times during this period. It showed significantly higher stability in conditions of increased temperature (40°C and 50°C) as compared to soluble enzyme. The pH range for optimal activity of immobilized trypsin was of 8.5–9.0 and for soluble trypsin was of 8.0–9.0. Using a substrate of low molecular weight, the immobilized trypsin presented an apparent K_m (0.257 ± 0.04 mM) approximately 2 fold lower than that found for the soluble enzyme (0.528 ± 0.26 mM). The levan-coated magnetite particles showed good capacity for are used as matrix for immobilization of enzymes, in special their capacity for protein retention, reused and thermal stability.

Keywords: levan, polysaccharide, magnetite, enzyme, trypsin.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Introdução ao magnetismo e aos materiais magnéticos

O magnetismo surge por causa do movimento de cargas elétricas. Existem duas origens atômicas possíveis para o magnetismo – o movimento orbital dos elétrons em torno do núcleo e o *spin* dos elétrons (movimento intrínseco ou angular dos elétrons). Um átomo que tem um momento magnético¹ provocado pelo *spin* ou pelo movimento orbital, ou por ambos, designa-se por átomo magnético [1] (**Figura 1**).

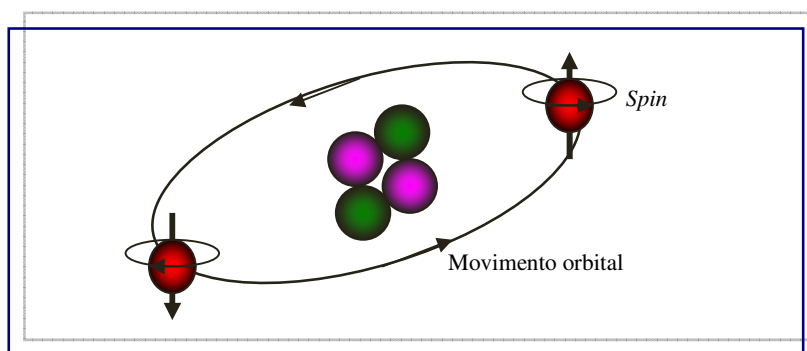


Figura 1. Movimentos do elétron.

Todas as substâncias, sólidas, líquidas ou gasosas, mostram alguma característica magnética. Dessa forma, o magnetismo é uma propriedade básica de qualquer material. Ele pode aparecer de diversas formas; e os materiais, classificados pela maneira como estes respondem a um campo magnético aplicado, de acordo com sua susceptibilidade magnética². A susceptibilidade, assim como a permeabilidade³ são parâmetros importantes que descrevem o comportamento magnético dos materiais [2].

¹**Momento magnético:** também denominado momento de dipolo magnético ou momento eletromagnético, consiste na geração de um campo magnético por um corpo, o qual aumenta com a força dos pólos e com a distância entre eles.

²**Susceptibilidade magnética:** consiste na susceptibilidade de um material à magnetização. A intensidade da magnetização induzida a um ponto qualquer em um corpo é proporcional à força do campo aplicado. Ela é uma característica intrínseca de cada material e sua identidade está relacionada com a estrutura atômica e molecular.

³**Permeabilidade:** é o grau de magnetização de um material em resposta a um campo magnético.

A maioria dos materiais exibe magnetismo reduzido, e somente quando estão na presença de um campo magnético externo é que se pode classificá-los quanto aos tipos de interação e alinhamento entre os seus momentos de dipolo magnético. Os materiais diamagnéticos, paramagnéticos e antiferromagnéticos não possuem magnetização espontânea, ao contrário dos ferromagnéticos e ferrimagnéticos que possuem magnetização espontânea abaixo da temperatura de Curie⁴ [2].

O Diamagnetismo (**Figura 2a**) consiste numa resposta magnética fraca na qual a magnetização induzida pelo campo magnético é oposta à direção desse campo. A susceptibilidade é negativa e normalmente da ordem de 10^{-6} . A origem deste magnetismo reside na alteração do movimento orbital dos elétrons que tendem a produzir um outro campo que se opõe ao campo indutor. Nestas substâncias, o campo exterior não tem efeito sobre o *spin* dos elétrons. Isto sucede porque os átomos destes materiais têm um número par de elétrons e os campos magnéticos devidos ao *spin* compensam-se dois a dois. O diamagnetismo é um fenômeno comum a todas as substâncias, embora não possa ser normalmente observado devido a outras formas de magnetismo mais intensas que a ele se sobrepõem [3,4].

No Paramagnetismo (**Figura 2b**), a susceptibilidade é positiva, mas fraca. A ordem de grandeza de susceptibilidade varia entre 10^{-4} e 10^{-6} . Nos materiais paramagnéticos, os orbitais estão incompletos e os momentos dos *spins* resultantes podem ser alinhados ligeiramente de modo a produzir uma magnetização induzida paralela ao campo aplicado. Devido à agitação térmica, o alinhamento dos momentos magnéticos é função da temperatura, razão porque o paramagnetismo depende (inversamente) da temperatura a que a substância se encontra [4].

O Antiferromagnetismo (**Figura 2c**) é um magnetismo fraco semelhante ao paramagnetismo no sentido de exibir uma pequena susceptibilidade positiva. Nestes minerais, estabelece-se um arranjo antiparalelo em que os *spins* “positivos” e “negativos” se anulam mutuamente [4].

⁴**Temperatura de Curie:** foi descoberta por Pierre Curie (1859 - 1906) quando efetuava estudos sobre o estado cristalino. Um imã, quando aquecido, perde as suas propriedades magnéticas pois o calor provoca um desarranjo na disposição das suas partículas. Como consequência, acima de uma determinada temperatura os condutores perdem suas propriedades magnéticas. Essa temperatura crítica T_c para a qual a magnetização espontânea desaparece, isto é, ocorre a transição entre "ordem" e "desordem", é chamada Temperatura de Curie. Ela é constante para cada substância.

No Ferromagnetismo (**Figura 2d**), que ocorre em algumas substâncias com organização cristalina, os *spins* desemparelhados (nos orbitais de cada átomo) estão alinhados paralelamente uns aos outros, como resultado de uma forte interação positiva, que atua entre os átomos vizinhos. A susceptibilidade destes materiais é cerca de 10^6 vezes maior que a dos diamagnéticos e paramagnéticos. Devido à agitação térmica, o ferromagnetismo também decresce com a temperatura, desaparecendo à chamada temperatura de Curie. As substâncias ferromagnéticas incluem o ferro, o cobalto e o níquel, que raramente ocorrem sob forma natural [4].

Os materiais Ferrimagnéticos (**Figura 2e**) apresentam forças entre os átomos adjacentes que forçam os momentos atômicos a se alinharem de modo antiparalelo, porém os momentos não são iguais. Este tipo de material apresenta uma forte resposta a campos magnéticos externos, como é o caso da magnetita e do óxido de ferro [5].

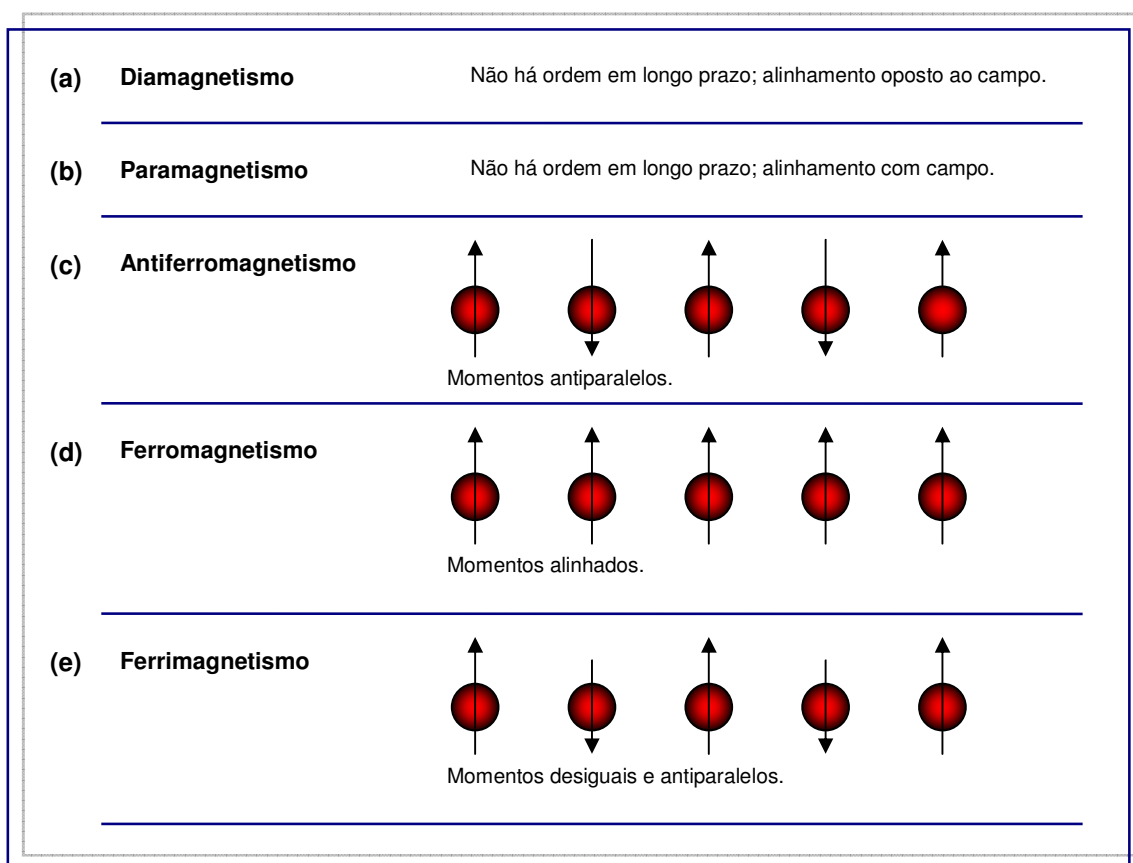


Figura 2. Diferentes tipos de comportamento magnético. As setas na figura representam o *spin* do átomo (ou molécula). Reproduzido a partir de Harris, 2002.

1.2. Superparamagnetismo

A primeira suposição da teoria superparamagnética é considerar que os momentos magnéticos atômicos no interior de uma partícula se movam coerentemente, isto é, que o momento magnético total possa ser representado por um único vetor clássico de magnitude $\mu = \mu_{\text{at}}N$, onde μ_{at} é o momento magnético atômico e N é o número de átomos magnéticos na partícula [6].

Cada partícula tem um tempo de relaxação característico, que é essencialmente o tempo médio para reverter o momento magnético de um estado de equilíbrio até outro. O tempo de relaxação τ é determinado por uma frequência de tentativas de saltos (da ordem de 10^{10} Hz), e por um fator de Boltzmann, $\exp[-E/k_B T]$, onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, e E é a barreira efetiva de energia que separa os dois estados de equilíbrio. A barreira de energia é dada pelo produto do volume da partícula V pela densidade de energia de anisotropia⁵ K_a da partícula. Se $k_B T \gg E$ (altas temperaturas ou pequenos volumes), τ tende a ser muito menor que o tempo característico de uma medida, e a partícula se encontra no estado superparamagnético (**Figura 3**). Por outro lado, se $k_B T \ll E$, τ pode ser muito maior que qualquer tempo de observação, e a magnetização da partícula permanece bloqueada no mesmo mínimo local de energia, e portanto a partícula é dita bloqueada. Desse modo, diz-se que uma partícula é superparamagnética a uma dada temperatura se o seu tempo característico, ou tempo de relaxação, for menor que o tempo necessário para realizar a medida (τ_m) [6].

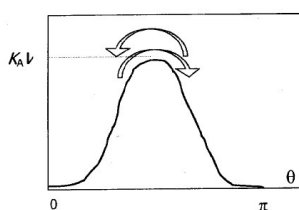


Figura 3. Barreira de energia que o momento magnético deve ultrapassar para sofrer reversão. $K_A V$ é a barreira de potencial de altura e θ é o ângulo entre o vetor momento magnético e o eixo de fácil magnetização.
Fonte: Knobel, 2000.

⁵**Anisotropia:** característica de uma substância em que certa propriedade física varia com a direção. Costuma-se designar qual a propriedade em que existe a anisotropia, por exemplo, anisotropia elétrica, óptica, magnética. Em relação à anisotropia magnética, no caso mais simples, é essencialmente a preferência que as amostras apresentam por se magnetizarem numa determinada direção.

Se, por outro lado, τ for maior que τ_m , a partícula se encontra no chamado estado bloqueado⁶. É importante destacar que se uma partícula é superparamagnética ou não vai depender do tempo necessário para realizar as medidas [6].

O volume crítico para o superparamagnetismo é diretamente proporcional à temperatura. Para altas temperaturas ou pequeníssimas partículas, o tempo característico τ da relaxação térmica resulta ser muito menor que qualquer tempo utilizado para realizar as medidas, e, portanto o momento magnético fica pulando de um vale para outro muitas vezes durante uma medida, e o sistema está no chamado estado superparamagnético. Por outro lado, quando a temperatura é suficientemente baixa, ou as partículas são um pouco maiores, a escala temporal τ se torna muito grande, muito maior que qualquer tempo de observação, e, portanto o momento magnético permanece parado em um vale durante a medida, e o sistema está no chamado estado bloqueado. O critério para caracterização do superparamagnetismo é: ausência de histerese⁷ acima da sua temperatura de bloqueio⁸ (T_B) e M (magnetização)⁹ vs. T deve sobrepor M vs. H/T , onde H se refere ao campo magnético. Como nos outros materiais magnéticos, o comportamento de magnetização das nanopartículas superparamagnéticas pode ser influenciado por fatores anisotrópicos [6].

Partículas finas superparamagnéticas podem ser encontradas em diversos sistemas artificiais, tais como sólidos granulares, compósitos metal-isolante, compostos híbridos, ferrofluidos congelados, e até mesmo muitos sistemas biológicos e geológicos, como solos, pedras, sangue [6]. A propriedade superparamagnética dessas partículas, por exemplo, é muito importante do ponto de vista prático porque essas partículas podem ser transportadas, posicionadas e controladas em determinadas partes dos vasos sanguíneos ou órgãos com a ajuda de um campo magnético externo [7].

⁶**Estado bloqueado:** ou seja, existe claramente uma transição entre um comportamento estável (bloqueado) e um comportamento superparamagnético, onde o momento magnético gira quase que aleatoriamente em diversas direções espaciais.

⁷**Histerese:** é a tendência de um material ou sistema conservar suas propriedades na ausência de um estímulo que as gerou. Histerese magnética: quando o campo magnético aplicado em um material for aumentado até a saturação e em seguida for diminuído, a densidade de fluxo não diminui tão rapidamente quanto o campo H . Dessa forma quando H chega a zero, ainda existe uma densidade de fluxo remanescente.

⁸**Temperatura de bloqueio:** é a temperatura abaixo da qual as flutuações térmicas da magnetização se estabilizam.

⁹**Magnetização:** pode ser definida como a soma de todos os momentos magnéticos elementares divididos pelo volume que ocupa.

Por sua biocompatibilidade, a magnetita, incluindo outras formas de nanopartículas de óxido de ferro, tem sido ressaltada para aplicações biomédicas [11,12]. Para tais propostas, nanopartículas de magnetita têm sido estabilizadas por dextrana desde 1978 por Syusaburo e Masalatsu [13]. O tamanho das partículas usualmente se refere ao diâmetro total destas incluindo o núcleo de ferro e o revestimento [14]. Partículas com tamanhos maiores e/ou agregados de partículas pequenas podem ser aprisionadas, causando embolia dentro dos capilares pulmonares [15]. Em nanopartículas com diâmetro menor que 100 nm, o revestimento é provavelmente o fator mais importante e determina muita das propriedades das partículas [7]. O tamanho da partícula é um fator importante no desempenho destas e uma redução neste tamanho assegura uma maior magnetização quando aplicado um campo magnético externo [16].

No caso de micropartículas magnéticas com diâmetro próximo de 10 μm , a partícula tem uma maior influência sobre reações nos tecidos. As micropartículas grandes também podem irritar fisicamente ao redor do tecido ou ainda causar embolia em pequenos vasos sanguíneos e capilares, efeitos os quais devem ser levados em consideração para aplicações específicas [17].

As partículas magnéticas são, em geral, formadas por um material biológico (proteínas, ácidos nucleicos, células, etc.) conectado a um núcleo magnético por meio de um revestimento polimérico inorgânico ou orgânico (**Figura 5**) [18].

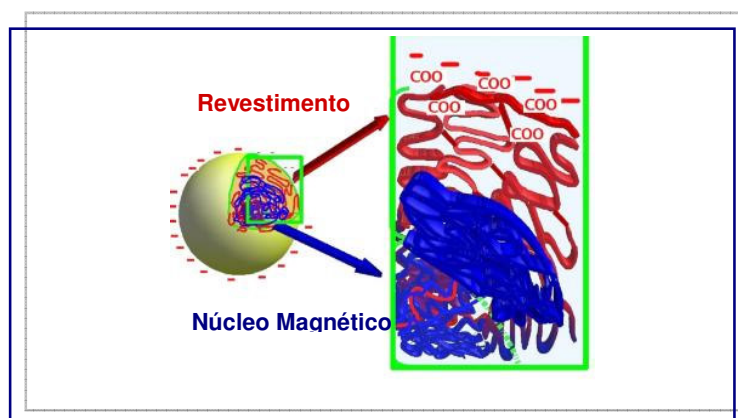


Figura 5. Representação esquemática de uma nanopartícula magnética constituída pelo núcleo (material magnético) e pelo revestimento (polímero ou surfactante). Fonte: www.ipfdd.de/Hybrid-Nanomaterials.193.0.html.

Os carreadores magnéticos sintetizados com materiais inorgânicos apresentam alta resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes e ao ataque microbiano, fácil síntese e excelente tempo de prateleira (tempo de vida útil); no entanto, eles têm grupos funcionais limitados. Por outro lado, a produção de tais carreadores utilizando polímeros orgânicos produz uma variedade de grupos funcionais de superfície que podem ser modificados para aplicações específicas [19].

Uma forma de minimizar os efeitos tóxicos e aumentar o tempo de liberação (permanência) dessas partículas magnéticas no corpo é a sua encapsulação em polímeros biodegradáveis. Um polímero biocompatível comumente usado é o poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA [20]. A pesquisa e a análise de efeitos em materiais magnéticos nanoestruturados tem permitido a melhoria do estudo das propriedades magnéticas da magnetita [21] e o maior interesse nesses materiais é determinado pelas possibilidades para diferentes aplicações em eletrônica (gravação magnética) e medicina (meios de contraste para imagem de ressonância magnética ou agentes terapêuticos para o tratamento do câncer, etc.). Cada aplicação requer materiais com diferentes propriedades – térmica, química, estabilidade coloidal, características magnéticas, forma e tamanho da partícula, ou não-toxicidade [22].

1.4. Ferrofluidos

Os ferrofluidos (líquidos/fluidos magnéticos) são partículas superparamagnéticas, de cerca de 10 nm, dispersas em um líquido, geralmente, um solvente orgânico ou água. Essas nanopartículas superparamagnéticas são revestidas com tensoativos (ou surfactantes) para impedir sua aglomeração devido ao efeito das forças magnéticas e de van der Waals [23–25]. A agitação térmica mantém as partículas suspensas e a separação entre elas é conservada pelas forças de repulsão eletrostática ou química. A suspensão das nanopartículas superparamagnéticas deve ser estável no tempo, inclusive, quando submetida a forças magnéticas [24,25].

Para muitas das aplicações in vivo, as nanopartículas magnéticas são geralmente usadas na forma de fluidos magnéticos. A biocompatibilidade desses fluidos é determinada pelo material que forma o núcleo e o revestimento [3]. A maioria dos fluidos magnéticos

utilizados possui como núcleo a magnetita [4] e como revestimentos (surfactantes e polímeros) citam-se o citrato, o ácido poliaspártico e a dextrana [26].

1.5. Aplicações de partículas magnéticas na área biomédica e biotecnológica

Em biomedicina, o revestimento polimérico confere estabilidade às partículas magnéticas, em meio fisiológico, fornecendo não-toxicidade por evitar a ligação do ferro a componentes biológicos e permite também a modificação química deste para ligar componentes biologicamente ativos. Não somente as características da superfície, mas primariamente o tamanho das partículas, são fatores cruciais que determinam o sucesso das partículas *in vivo* [27].

Em biotecnologia, essas partículas magnéticas têm encontrado aplicações em diagnósticos médicos como pesquisa genética [28] e tecnologias baseadas em separação magnética de células, proteínas, DNA/RNA, bactérias, vírus e outras biomoléculas [29], como adsorventes de bioafinidade, tratamento de água poluída via adsorção eletrostática, suportes para imobilização ou adsorção de enzimas e proteínas [30–34].

1.5.1. Imagem por Ressonância Magnética (IRM)

A Imagem por Ressonância Magnética é baseada em sinal de Ressonância Magnética Nuclear de prótons através do efeito combinado de um forte campo magnético estático B_0 até 2 T, em aparelhos clínicos atuais, e um campo de radiofrequência transversal (5–100 MHz) [35]. Após a radiofrequência, o vetor de magnetização líquida é mais uma vez influenciado pelo B_0 e leva ao realinhamento com ele, ao longo do eixo longitudinal, como prótons tentando retornar ao estado de equilíbrio. Este fenômeno de relaxação pode ser dividido em dois diferentes processos: relaxação longitudinal¹¹ (é o retorno da magnetização longitudinal em alinhamento com B_0 e é denominado T_1) e relaxação transversal¹² (é o desaparecimento da magnetização transversal e é denominado T_2).

¹¹**Relaxação longitudinal:** ou processo de *spin-rede*, envolve a transferência de energia do núcleo que está no estado de maior energia (“excitado”) para as moléculas mais próximas que estão vibrando nas frequências apropriadas.

¹²**Relaxação transversal:** ou relaxação *spin-spin*, envolve transferência de energia de um núcleo para outro, tendo como resultado o espalhamento (defasagem), que causa perda de sinal e alargamento do sinal de absorção.

Para correlacionar o sinal a sua origem espacial, pelo menos um dos dois campos (B_0 ou radiofrequência) tem que variar. Os dados de relaxação são coletados por um computador que amplifica para dar amplitudes de sinais de Ressonância Magnética Nuclear e permite reconstruir as imagens tridimensionais. Devido a suas diferentes relaxações T_1 e T_2 , os tecidos podem ser diferenciados, mas em muitas situações clínicas, essas diferenças intrínsecas são pequenas e meios de contraste exógenos são utilizados para uma melhor delimitação dos tecidos [36].

As partículas magnéticas encurtam os tempos de relaxação (T_1 e T_2); agindo, desse modo, como agentes de contraste negativo e escurecendo a imagem de Ressonância Magnética [37–40]. Esses agentes de contraste podem ser administrados por diferentes vias (aérea, oral, intersticial ou intravenosa) [41]. Em comparação aos íons paramagnéticos, partículas de óxido de ferro superparamagnéticas têm relaxatividades molares maiores [42,43]. Os ferrofluidos, usados como contrastes para IRM, são formados por magnetita e estabilizados mais comumente por um polissacarídeo (dextrana, por exemplo). O diâmetro médio desses agentes varia de 10 nm a 1 μ m [37–40].

1.5.2. Magnetohipertermia

A hipertermia é uma abordagem promissora para a terapia do câncer [12]. Ela consiste no aumento de temperatura em uma região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia, com o objetivo de causar a lise das células cancerosas. Seu funcionamento se baseia no fato de que a temperatura de 41°– 42°C tem o efeito de destruir diretamente as células tumorais, uma vez que estas são menos resistentes a aumentos bruscos de temperatura do que as células normais circunvizinhas [48]. No entanto, um dos maiores problemas para sua aplicação é a dificuldade em aquecer o local da região do tumor, com a temperatura desejada, sem danos ao tecido normal.

Sistemas hipertérmicos convencionais são utilizados para aquecer o tecido em torno de 42,5°C a 44,0°C [41]. Esse aumento de temperatura requerido pela hipertermia pode ser atingido, entre outros métodos [44], pelo uso de nanopartículas magnéticas. Quando submetidas à ação de um campo magnético externo de frequência alternada, as nanopartículas magnéticas são aquecidas [44].

O uso de nanopartículas magnéticas (monodomínios magnéticos) é preferível às micropartículas (multidomínios magnéticos) porque as nanopartículas magnéticas respondem mais eficientemente a campos externos de frequência alternada e absorvem destes mais energia [44] (**Figura 6**). Ito et al. [8] observaram que o tamanho da partícula é um fator crítico na velocidade de absorção de energia, que é devido ao seu comportamento superparamagnético.

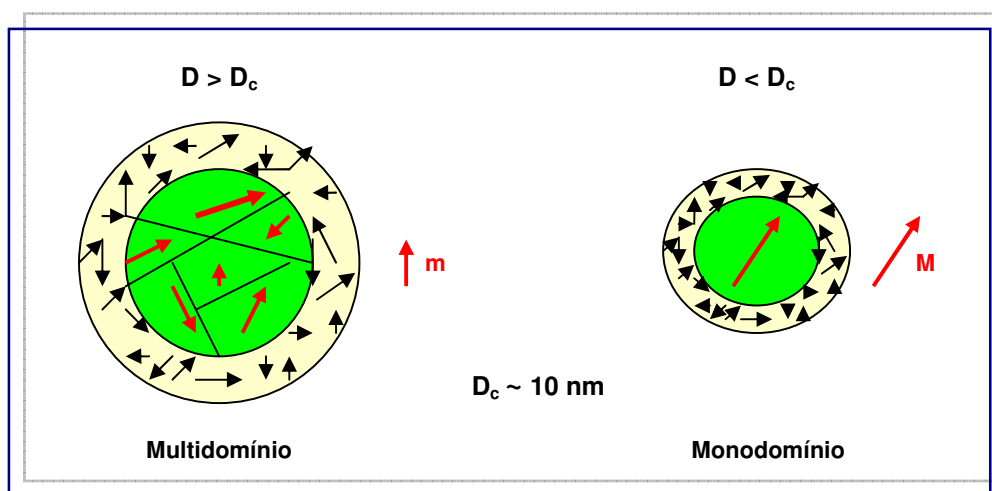


Figura 6. Relação entre o diâmetro da partícula e o vetor magnetização. D_c : diâmetro a partir do qual a partícula será multidomínio; M e m : vetor magnetização. Fonte: <http://www.if.ufrgs.br/~magusmao/FIP10604/rafael.pdf>.

No processo de magnetohipertermia (ou magnetotermocitólise), as nanopartículas magnéticas biocompatíveis são associadas a anticorpos monoclonais específicos para proteínas da membrana de células tumorais. Após absorção pelas células cancerígenas, as nanopartículas magnéticas são submetidas a um campo magnético externo de frequência alternada, o que resulta na elevação local da temperatura e subsequente lise da célula tumoral. Alternativamente, as nanopartículas magnéticas podem ser atraídas e retidas na região do tumor pelo uso de gradientes de campo magnético externo ou ainda serem injetadas diretamente no tumor. Qualquer que seja a forma de condução das nanopartículas magnéticas ao tumor, é viável a localização do aquecimento ao tecido tumoral, minimizando danos aos tecidos normais circunvizinhos, o que faz da magnetohipertermia uma técnica promissora para tratamento de cânceres diversos (**Figura 7**) [44].

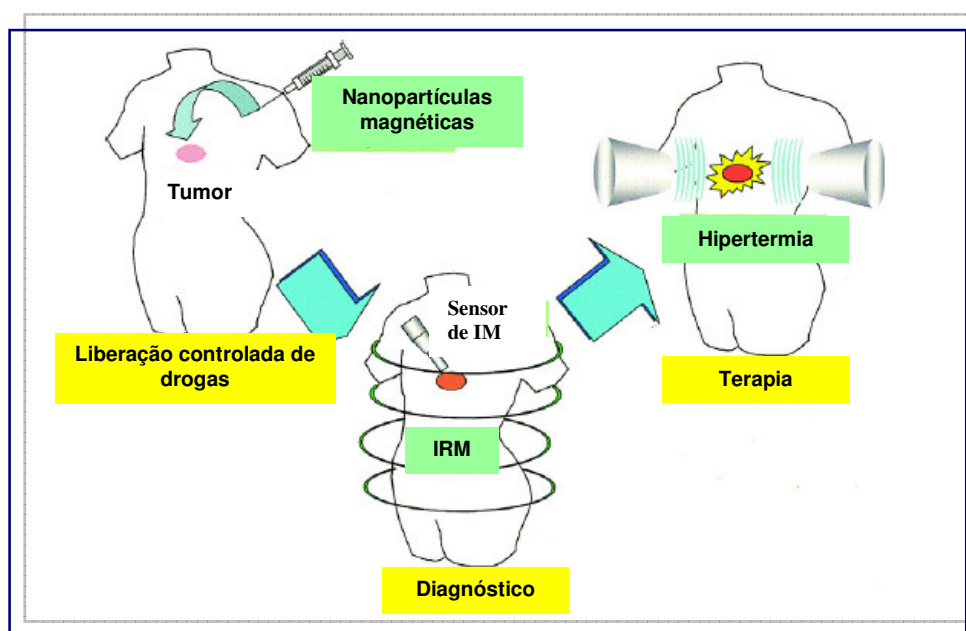


Figura 7. Ilustração esquemática do uso de partículas magnéticas na terapêutica. As nanopartículas magnéticas se acumulam nos tecidos tumorais via sistema de liberação controlada de drogas. Elas também podem ser usadas para o diagnóstico do câncer por Imagem de Ressonância Magnética (IRM) e podem ser utilizadas na terapêutica do câncer por meio da indução do calor (Hipertermia). Sensor de IM: Sensor de Imagem Magnética. *Fonte: Ito et al., 2005.*

1.5.3. Separação magnética

As técnicas de separação magnética possibilitam a separação de compostos alvo biologicamente ativos e células de uma variedade de materiais (extratos brutos, meios de cultivo, sangue, fluidos corporais, amostras ambientais, etc.) [45,46].

Adsorventes de afinidade têm sido usados para a separação de proteínas (enzimas, anticorpos, antígenos, receptores, etc.), ácidos nucleicos (DNA, RNA, etc.), compostos biologicamente ativos de baixo peso molecular (drogas) e xenobióticos (corantes solúveis em água, metais pesados, radionuclídeos, etc.) [45]. O uso de colunas cromatográficas convencionais pode consumir muito tempo e é neste campo que o uso de adsorventes magnéticos ou magnetizáveis ganha importância. Neste procedimento, o adsorvente magnético é adicionado a uma solução ou suspensão com o analito alvo. Este se liga ao adsorvente magnético e o complexo é recolhido da suspensão por meio de um sensor magnético apropriado. O analito é eluído do adsorvente e analisado (**Figura 8**) [46].

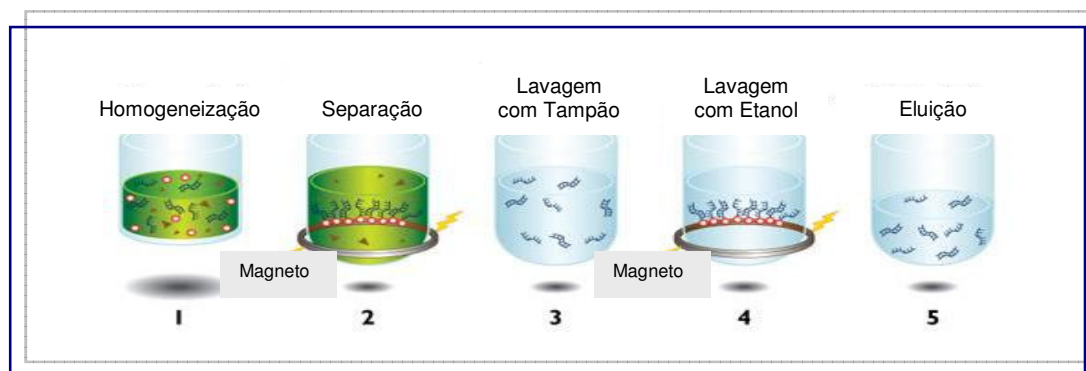


Figura 8. Separação magnética de DNA. **1.** Homogeneização do material. **2.** Ligação de ácidos nucleicos às partículas magnéticas e separação. **3.** Lavagem dos ácidos nucleicos capturados com tampão. **4.** Lavagem com etanol 70% para remoção de contaminantes. **5.** Eluição dos ácidos nucleicos das partículas magnéticas. *Fonte:* http://www.agencourt.com/products/spri_reagents/chloropure/.

1.5.4. Carreador de fármacos

O transporte direcionado (guiado) de substâncias biologicamente ativas a órgãos alvo permite criar uma concentração terapêutica ótima da droga no local desejado, ao mesmo tempo em que diminui a dose administrada [47], podendo evitar os efeitos colaterais e reações por corpo estranho.

A tecnologia de liberação controlada caracteriza o sistema capaz de prover algum controle terapêutico, seja de natureza temporal, espacial ou ambos. Os sistemas de liberação de droga (*drug delivery systems*) oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional, tais como: maior eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação, diminuição do número de doses devido à liberação progressiva e possibilidade de direcionamento a alvos específicos são alguns exemplos [48].

Muitos sistemas nanoparticulados estão sendo usados atualmente e, entre eles, os baseados nas nanopartículas magnéticas assumem um papel importante devido à propriedade de serem conduzidas e retidas em uma região específica do corpo por meio de gradiente de campo magnético externo. Com o objetivo de aumentar a especificidade, o

conjugado nanopartícula magnética-droga pode ser associado com uma outra molécula capaz de reconhecer e se ligar especificamente ao sítio alvo. Tais moléculas podem ser anticorpos, proteínas, lectinas, hormônios, entre outros [44].

1.5.5. Imobilização de enzimas

A susceptibilidade das enzimas à ação de fatores externos e às dificuldades de regeneração catalítica limitam a aplicação das mesmas em larga escala. Alguns métodos de estabilização são comumente empregados para preservar a atividade da enzima, incluindo técnicas de imobilização física e/ou química, que abrem possibilidades para aplicações industriais. Entre estes, a ligação covalente de enzimas em matrizes insolúveis em água é o método mais atrativo para estabilização, reuso e recuperação de enzimas [49–52]. As enzimas imobilizadas podem substituir as enzimas nativas em vários processos, resultando em reações mais rápidas, menor contaminação da amostra e melhorando o interfaciamento para procedimentos modernos, como espectrometria de massa [53].

Imobilização é um termo geral utilizado para descrever a retenção de um catalisador biologicamente ativo dentro de um sistema reator ou analítico. O biocatalisador (uma única enzima, uma mistura de enzimas ou enzimas contidas dentro de uma célula viva) está confinado dentro ou sobre a matriz. A imobilização proporciona um complexo insolúvel em um meio especializado dentro do qual fluidos podem passar facilmente, transformando substrato em produto numa reação enzimática controlada e facilitando a remoção do catalisador e produto [54]. A imobilização depende do tipo de suporte, método de ativação e procedimento de ligação [55,56]. A escolha da matriz (propriedades químicas e magnéticas, tamanho da partícula e distribuição, porosidade) é um fator chave que influencia na qualidade da imobilização e na conquista das aplicações finais [57]. Matrizes (suportes) convencionais podem ser magnetizadas pelo tratamento com materiais magnéticos sem qualquer perda de atividade da ligação subsequente. Uma variedade de materiais magnéticos tem sido usada para produzir partículas magnéticas [30,33,58–60]. A imobilização de enzimas e componentes biológicos tem grande importância devido a sua ampla variedade de aplicações nas indústrias de alimento e farmacêutica e também suas aplicações biomédicas [61–64].

1.6. Estabilização de partículas magnéticas

A modificação da superfície por moléculas orgânicas tem diferentes objetivos, entre eles, estabilizar as partículas magnéticas em uma suspensão biológica com um pH em torno de 7,4 e uma alta concentração de sal, prover grupos funcionais à superfície para favorecer a derivação e finalmente evitar a captação (*uptake*) imediata pelo sistema reticuloendotelial (SER) [65]. A camada de polímero garante a estabilidade das partículas magnéticas em meio fisiológico (**Figura 9**), porque prover não-toxicidade por evitar a ligação do ferro a componentes do sangue e possibilitar a modificação química para ligação de componentes biologicamente ativos. Não somente as características de superfície, mas primariamente o tamanho da partícula, são fatores cruciais que determinam o sucesso das partículas *in vivo*. Seus tamanhos devem ser suficientemente uniformes para proporcionar uma probabilidade igual de captura para todas as partículas magnéticas a um conteúdo constante de biomoléculas [27].

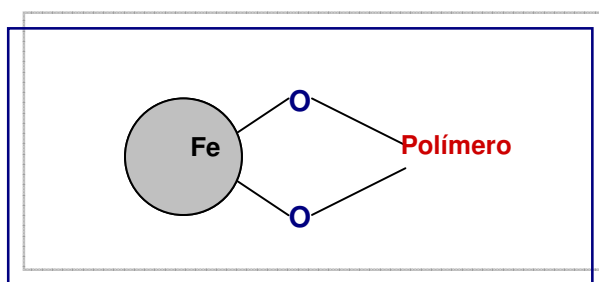


Figura 9. Estabilização da superfície da magnetita. Ligação entre a magnetita e o revestimento polimérico. Reproduzido a partir de Harris, 2002.

Para aplicações magnéticas *in vivo*, por exemplo, liberação de droga e detoxicação do sangue, os carreadores magnéticos devem ter um tamanho entre 200 nm e 3 μ m e altas magnetizações para permitir que estes sejam guiados dentro dos vasos sanguíneos por meio de campos magnéticos externos. A faixa de tamanho específica é necessária para evitar a rápida captação pelo SRE (Sistema Retículo Endotelial) bem como oclusões capilares [66]. Partículas magnéticas com tamanhos ainda menores (5–20 nm) apresentam um maior momento magnético [67], sendo por isso mais fortemente atraídas por um campo magnético externo.

A presença de uma camada, constituída de diferentes tipos de polímeros contribui para o aumento da dispersão, da estabilidade química, da biocompatibilidade e, sobretudo, aumenta as possibilidades de funcionalização das superfícies [68]. Essas nanopartículas magnéticas são geralmente usadas na forma de fluidos magnéticos. Sendo a biocompatibilidade desses fluidos determinada pelo material que forma o núcleo e o revestimento. A maioria deles é constituída por magnetita (Fe_3O_4). Vários revestimentos (surfactantes e polímeros) como citrato, ácido poliaspártico, dextrana têm sido testados para biocompatibilidade. A dextrana tem sido usada principalmente por causa de sua biocompatibilidade [69].

1.7. Levana: polifrutosídeo

Os polissacarídeos de origem microbiana, chamados biopolímeros, apresentam algumas vantagens para sua obtenção em relação às outras gomas¹³, tais como: não dependência das condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de menor espaço físico das instalações fabris. Além disso, os polissacarídeos de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas, devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura. Os exopolissacarídeos como a xantana, dextrana, gelana e ácido hialurônico, por exemplo, são utilizados em diferentes aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. Apesar de todos estes apresentarem propriedades funcionais atrativas, a pesquisa por novos polissacarídeos bacterianos continua a ser realizada. Destes a levana (β -D-frutana) tem-se destacado como uma boa fonte de frutose [70]; embora não possa ser definida como uma goma convencional, já que não forma géis altamente viscosos em baixas concentrações.

¹³**Gomas ou hidrocolóides:** correspondem a uma classe de polissacarídeos cuja característica mais importante, sob o ponto de vista tecnológico, é sua capacidade de determinar ou modificar a estrutura de um alimento.

Dois tipos de polímeros de frutose são encontrados na natureza: inulina e levana. A inulina é um polissacarídeo linear, constituída por resíduos de D-frutose unidos por ligações $\beta(2\rightarrow1)$ e encontrada em muitas plantas. A levana (**Figura 10**) é um polissacarídeo extracelular, constituída por resíduos de D-frutose unidos por ligações $\beta(2\rightarrow6)$ podendo apresentar pontos de ramificação $\beta(2\rightarrow1)$ e ser produzida por diversas espécies de plantas e de bactérias [71]. Estes polímeros ainda podem ser produzidos por síntese química [72].

A levana é formada através de reações de transfrutossilação (catalisada pela levanassacarase) e é constituída, basicamente, de unidades de frutose ligadas em $\beta(2\rightarrow6)$. Pode ser sintetizada por vários grupos de bactérias, entre elas a *Zymomonas mobilis*, em um meio fermentativo à base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais. Segundo Swings e Deley (1977) [73], a levana é produzida a partir da sacarose e não da glicose, frutose ou misturas de ambas.

Segundo alguns autores [74–76], inulinas e levanas possuem uma unidade glicose terminal. No entanto, outros autores afirmam que levanas de origem vegetal têm uma glicose terminal, enquanto que as de origem bacteriana possuem unicamente unidades de frutose [77–81].

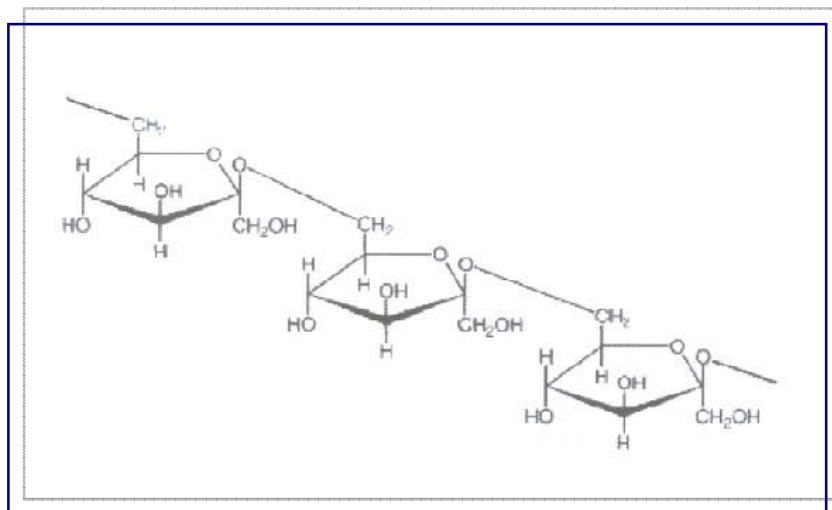


Figura 10. Estrutura química da levana. *Fonte:* Barros, 2002.

As levanas podem ser produzidas por diversas espécies de plantas e de bactérias, onde a distribuição do peso molecular e do grau de ramificação depende da fonte produtora deste biopolímero. Aquelas produzidas por vegetais apresentam baixo peso molecular e poucas ramificações; enquanto as produzidas por síntese microbiana ou enzimática exibem peso molecular elevado, da ordem de $2,5 \times 10^6$ daltons, e podem conter numerosas ramificações [82,83].

As levanas são um dos poucos polímeros naturais em que o carboidrato existe na forma de furanose. Esta característica estrutural tem um importante papel na conformação final das moléculas em solução [84]. Além disso, a maior flexibilidade do anel de furanose, em comparação com o relativamente rígido anel de piranose da maioria dos polissacarídeos de reserva, confere uma flexibilidade adicional à molécula de frutana inteira. As moléculas de levana são flexíveis e tendem a girar para esquerda, enquanto que a torção da inulina é para direita [85].

A composição e propriedades da levana dependem grandemente das condições do meio de cultura [86]. As propriedades gerais das levanas assemelham-se aquelas das dextranas. As levanas são levorotatórias, amorfas ou microcristalinas, de solubilidade variada em água fria, muito solúvel em água quente e insolúvel em álcool etílico absoluto. As levanas são geralmente mais solúveis do que a inulina, a qual é quase insolúvel ($< 0,5\%$) em água à temperatura ambiente [87]. A elevada solubilidade das levanas pode ser uma característica da ligação $\beta(2 \rightarrow 6)$ comparada à ligação $\beta(2 \rightarrow 1)$. A ramificação deve ser apenas um fator secundário. As levanas são não-redutoras, não-hidrolisadas por invertase de levedura e amilase, mas são muito susceptíveis à hidrólise por ácidos. Elas não são coradas por iodo, mas cloreto de hidrogênio confere uma cor púrpura que distingue a levana de outros polissacarídeos que não contém frutose [88]. O peso molecular e a viscosidade das levanas variam de acordo com a fonte produtora [89].

Certas propriedades biológicas da levana, tais como desenvolvimento de infecção e necrose [77], inibição e estimulação do tumor [90,91], e aumento da permeabilidade celular para um agente citotóxico [92] têm atraído atenção. Esses efeitos são parcialmente causados pela supressão da resposta inflamatória normal. Somente levana com $M_r > 10^7$ promove infecção; o efeito é perdido quando o polímero degrada [77].

A hidrólise ácida parcial de levana produz uma série de oligossacarídeos e levulanas (levanas degradadas) [77]. Levanas nativas de pesos moleculares elevados são sorologicamente ativas e estimulam a formação de anticorpos; aquelas hidrolisadas ou purificadas não são antigênicas [93,94]. A levana é eliminada do corpo lentamente e não é tóxica [95].

O Departamento de Bioquímica da UFPE em colaboração com o Laboratório de Processos Fermentativos do Departamento de Antibióticos também da UFPE vem desenvolvendo alguns projetos com este polissacarídeo e os resultados são promissores e podem ajudar a compreender melhor o comportamento deste biopolímero ao interagir com componentes biologicamente ativos como proteínas, enzimas e drogas, por exemplo. Dentre estes trabalhos, citam-se a utilização de levana como suporte carreador de gentamicina, cujo objetivo era diminuir os efeitos de oto e nefrotoxicidade causados pelo antibiótico [82], a utilização como suporte para imobilização covalente de tripsina [96] e para purificação por afinidade de lectinas [97].

2. JUSTIFICATIVA

Com base em todas as possibilidades de aplicações das partículas magnéticas, em especial as nanopartículas, o trabalho teve como objetivo produzir partículas magnéticas formadas por um núcleo de magnetita utilizando o polissacarídeo levana como revestimento. A magnetita foi escolhida como meio magnético devido a suas propriedades físico-químicas especiais e também pelas propriedades peculiares que apresenta quando atinge um tamanho dentro da escala nanométrica; além de sua estabilidade química e biocompatibilidade. A levana foi escolhida por apresentar propriedades gerais semelhantes aquelas da dextrana, tendo em vista toda a gama de aplicações deste polissacarídeo de glicose. A levana, no entanto, é constituída por resíduos de frutose os quais conferem maior flexibilidade a sua estrutura. Além de possuir uma estrutura relativamente mais flexível, apresenta propriedades biológicas importantes, tais como efeito anticarcinogênico e imunomodulador. O presente estudo teve como objetivo sintetizar as novas partículas magnéticas e realizar uma avaliação físico-química do material utilizando diferentes técnicas para que fosse possível obter um conhecimento da estrutura e do comportamento das partículas sintetizadas. Esse conhecimento permite o uso dessas partículas de forma mais eficiente e direcionada. Dentre as possibilidades de aplicações para tais partículas, inclusive na área biomédica, as partículas de magnetita revestidas por levana foram utilizadas como suporte (ou matriz) para imobilização de tripsina, por ser uma enzima de propriedades e aplicações bastante conhecidas seria interessante estudar seu comportamento e comparar com trabalhos existentes na literatura especializada. Os resultados obtidos podem servir de base para trabalhos futuros.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CHEN, C.-W. **Magnetism and Metalurgy of Soft Magnetic Materials**, Dover Publications, Inc., New York, (1986), 1.
- [2] LUQUEZE, R. C. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltrietoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais), **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Universidade de São Paulo**, SP, 2006.
- [3] RIBEIRO, G. A. P. As Propriedades Magnéticas da Matéria: um Primeiro Contato. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, 2000.
- [4] MÉTODOS MAGNÉTICOS. Levantamentos Magnéticos. **Universidade do Algarve**. Disponível em: http://w3.ualg.pt/~jluis/files/folhas_cap2.pdf. Acesso em 03 de setembro de 2007 às 19h10.
- [5] NOVAK, M. A. Magnetic relaxation in Molecular Nanostructures. **Journal of Magnetism and Materials Magnetism**, v. 1, 707–713, 2004.
- [6] KNOBEL, M. Partículas Finas: Superparamagnetismo e Magnetoresistência Gigante. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, 2000.
- [7] KONCRACKÁ, M.; KOPČANSKÝ, P.; TIMKO, M.; RAMCHAND, C.N. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 252, 409-411, 2002.
- [8] ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1–11, 2005.

- [9] RODRÍGUEZ, P. Y. L.; MONTOYA, M. M.; BERNAL, S. Y. C.; NAVARRO, M. A. G.; RIVERA, M. H.; GONZÁLEZ, V. G. Síntesis y caracterización de nanocompósitos magnéticos. **Ingenierías**, v. 8, n. 29, p. 47 – 51, 2005.
- [10] WALZ, F. The Verwey transition – a topical review. **Journal of Physics–Condensed Matter**, v. 14, p.285–340, 2002 em: WU, J-H.; KO, S. P.; KIM, S.; JU, J-S.; KIM, Y. K. Sub 5 nm magnetite nanoparticles: synthesis, microstructure, and magnetic properties. **Materials Letters**, v. 61, p. 3124–3129, 2007.
- [11] GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995–4021, 2005.
- [12] HUBER, D. L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. **Small**, v. 1, p. 482–501, 2005.
- [13] SYUSABURO, H.; MASALATSU, H. Magnetic iron oxide–dextran complex and process for its production, **US Patent 4 101 435** (1978) em: XU, X. Q.; SHEN, H.; XU, J. R.; XU, J.; LI, X. J.; XIONG, X. M. Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. **Applied Surface Science**, v. 252, p. 494–500, 2005.
- [14] SCHMIDT, R. F.; THEWS, G., **Physiologie des Menschen**, 26th ed., Springer, Berlin, p. 515, 1995 em: NEUBERGER, T.; SCHÖPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 483–496, 2005.
- [15] KREUTER, J. Evaluation of nanoparticles as drug delivery systems I: preparation methods. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 58, p. 196–209, 1983 em: NEUBERGER, T.; SCHÖPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; RECHENBERG, B. Superparamagnetic

nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 483–496, 2005.

[16] O'HANDLEY, R. C. Modern Magnetic Materials, **Principles and Applications**, New York: John Wiley & Sons, Inc., p. 303–308, 2000 em: RODRÍGUEZ, P. Y. L.; MONTOYA, M. M.; BERNAL, S. Y. C.; NAVARRO, M. A. G.; RIVERA, M. H.; GONZÁLEZ, V. G. Síntesis y caracterización de nanocompósitos magnéticos. **Ingenierías**, v. 8, n. 29, p. 47 – 51, 2005.

[17] HÄFELI, U. O.; PAUER, G. J. In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 76–82, 1999.

[18] MA, M.; ZHANG, Y.; YU, W.; SHEN, H.; ZHANG, H.; GU, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 212, p. 219-226, 2003.

[19] DENKBAŞ, E. B.; KILIÇAY, E.; BIRLIKSEVEN, C.; ÖZTÜRK, E. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. **Reactive & Functional Polymers**, v. 50, p. 225–232, 2002.

[20] WASSEL, R. A.; GRADY, B.; KOPKE, R. D.; DORMER, K. J. Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 292, p. 125–130, 2007.

[21] QUIN, D.-H.; ZHANG, H.-L.; XU, C.-L.; XU, T.; LI, H.-L., **Applied Surface Science**, v. 239, p. 279, 2005 em: SANTOYO-SALAZAR, J.; CASTELLANOS-ROMAN, M. A.; GÓMEZ, L. B. Structural and magnetic domains characterization of magnetite nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, p. 1317–1320, 2007.

- [22] NEDKOV, I.; MERODIISKA, T.; SLAVOV, L.; VANDENBERGHE, R. E.; KUSANO, Y.; TAKADA, J. Surface oxidation, size and shape of nano-sized magnetite obtained by co-precipitation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 300, p. 358–357, 2006.
- [23] ROSENSWEIG, R. E. **Ferrohydrodynamics**, Cambridge University Press, Cambridge, 1985 em: Tese de LINDA HARRIS, Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poly(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks. 2002. Tese (Doutorado) - **Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University**, Virginia.
- [24] KNOBEL, M.; GOYA, G. F. Ferramentas magnéticas na escala do átomo. **Scientific American Brasil**, p. 58–66, 2004.
- [25] HOLM, C., WEIS, J. –J. The structure of ferrofluids: A status report. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 133–140, 2005.
- [26] PRADHANA, P.; GIRIB, J.; BANERJEEA, R.; BELLAREA, J.; BAHADURB, D. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 282–287, 2007.
- [27] HORÁK, D.; PETROVSKÝ, E.; KAPIČKA, A.; FREDERICH, T. Synthesis and characterization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 500–506, 2007.
- [28] SCHERER, F.; ANTON, M.; SCHILLINGER, U.; HENKE J.; BERGEMANN C.; KRÜGER A.; GÄNSBACHER B.; PLANK C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. **Gene Therapy**, v. 9, p. 102–109, 2002 em: NEUBERGER, T.; SCHÖPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications:

Possibilities and limitations of new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 483–496, 2005.

[29] PRESTVIK, W. S.; BERGE, A.; MORK, P. C.; et al., em: NEUBERGER, T.; SCHÖPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 483–496, 2005.

[30] HALLING, P. J.; DUNNILL, P. Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, p. 2–10, 1980 em: TANYOLAÇ, D.; ÖZDURAL, A. R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 235-242, 2000.

[31] MOFFAT, G.; WILLIAMS, R. A.; WEBB, C.; STIRLING, R. Selective separations in environmental and industrial processes using magnetic carrier technology. **Minerals Engineering**, v. 7, p. 1039–1056, 1994 em: TANYOLAÇ, D.; ÖZDURAL, A. R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 235-242, 2000.

[32] DUNNILL, P.; LILLY, M. D. Purification of enzymes using magnetic bioaffinity materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, p. 987–990, 1974 em: TANYOLAÇ, D.; ÖZDURAL, A. R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 235-242, 2000.

[33] LEA, T.; VARTDAL, F.; DAVIES, C.; UGELSTAD, J. Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, Copenhagen, v.22, p. 207–216, 1985 em: TANYOLAÇ, D.; ÖZDURAL, A. R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 235-242, 2000.

[34] ANSELL, R. J.; MOSBACH, K. Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radioligand binding assay. **Analyst**, v. 123, p. 1611–1616.

[35] PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.36, p. 167, 2003 em: MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; VEVERKA, P.; GOGLIO, G.; DEMOURGUES, A.; PORTIER, J.; POLLERT, E.; DUGUET, E. Magnetic nanoparticle desing for medical applications. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 34, p. 237–247, 2006.

[36] MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; VEVERKA, P.; GOGLIO, G.; DEMOURGUES, A.; PORTIER, J.; POLLERT, E.; DUGUET, E. Magnetic nanoparticle desing for medical applications. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 34, p. 237–247, 2006.

[37] WEISSLEDER, R.; LEE, A. S.; FISCHMAN, A. J.; REIMER, P.; SHEN, T.; WILKINSON, R.; CALLAHAN, R. J.; BRADY, T. J. Polyclonal Human Immunoglobulin-G Labeled with Polymeric Iron- Oxide – Antibody Mr Imaging. **Radiology**, v. 181, n. 1, p. 245–249, 1991 em: PATRICK J. LEAMY, Preparation, characterization, and in vitro testing of poly (lactide-co-glycolide) and dextran magnetic microspheres for in vivo applications. Tese (Doutorado), **Graduate School of the University of Florida**, 2003.

[38] KRESSE, M.; WAGNER, S.; PFEFFERER, D.; LAWACZECK, R.; ELSTE, V.; SEMMLER, D. W. Targeting of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO) Particles to Tumor Cells In Vivo by Using Transferrin Receptor Pathways. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 40(2), p. 236-242, 1998 em: PATRICK J. LEAMY, Preparation, characterization, and in vitro testing of poly (lactide-co-glycolide) and dextran magnetic microspheres for in vivo applications. Tese (Doutorado), **Graduate School of the University of Florida**, 2003.

[39] BACHGANSMO, T. Ferrimagnetic Susceptibility Contrast Agents. **Acta Radiologica**, v. 34, p. 1-& em: PATRICK J. LEAMY, Preparation, characterization, and in vitro testing

of poly (lactide-co-glycolide) and dextran magnetic microspheres for in vivo applications. Tese (Doutorado), **Graduate School of the University of Florida**, 2003.

[40] WEISSLEDER, R.; LEE, A. S.; KHAW, B. A.; SHEN, T.; BRADY, T. J. Antimyosin-Labeled Monocrystalline Iron-Oxide Allows Detection of Myocardial Infarct – Mr Antibody Imaging. **Radiology**, v. 182, n. 2, p. 381-385, 1992 em: PATRICK J. LEAMY, Preparation, characterization, and in vitro testing of poly (lactide-co-glycolide) and dextran magnetic microspheres for in vivo applications. Tese (Doutorado), **Graduate School of the University of Florida**, 2003.

[41] SAIYED, Z. M.; TELANG, S. D.; RACNCHAND, C. N. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. **BioMagnetic Research and Technology**, v. 1, p. 23–33, 2003 em: ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1–11, 2005.

[42] SAINI, S.; STARK, D. D.; HAHN, P. F.; WITTENBERG, J.; BRADY, T. J.; FERRUCCI, J. T. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. **Radiology**, v. 162, p. 211–216, 1987 em: ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1–11, 2005.

[43] STARK, D. D.; WEISSLEDER, R.; ELIZONDO, G.; HAHN, P. F.; SAINI, S.; TODD, L. E.; WITTENBERG, J.; FERRUCCI, J. T. Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. **Radiology**, v. 168, p. 297 – 301, 1988 em: ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1–11, 2005.

- [44] LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas. Disponível em: <http://www.universia.com.br/html/materia/materia_fcif.html>. Acesso em: 19 jul. 2005.
- [45] ŠAFAŘÍK, I.; ŠAFAŘÍKOVÁ, M. One-step partial purification of *Solanum tuberosum* tuber lectin using magnetic chitosan particles. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 941–945, 2000.
- [46] ŠAFAŘÍK, I.; ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 33–53, 1999.
- [47] KUZNETSOV, A.; FILIPPOV, V. I.; KUZNETSOV, O. A.; GERLIVANOV, V. G.; DOBRINSKY, E. K.; MALASHIN, S. I., **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 22, 1999 em: KONCRACKÁ, M.; KOPČANSKÝ, P.; TIMKO, M.; RAMCHAND, C.N. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p. 409–411, 2002.
- [48] DURÁN, N.; AZEVEDO, M. M. M. O que é nanotecnologia? Atualidades e perspectivas. **Instituto de Química, UNICAMP**, 2003 em: RUTH LUQUEZE CAMILO, Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriethoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais), **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Universidade de São Paulo**, SP, 2006.
- [49] MARTINEK, K.; KLIBANOV, A. M.; GOLDMACHER, V. S.; BEREZIN, I. V. The principles of enzyme stabilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 485, p. 1–12, 1977.
- [50] ENGASSER, J. M.; COULET, P. R. Comparison of intrinsic stabilities of free and bound enzyme by graphical removal of diffusional effects. **Biochimica et Biophysica Acta**, 485, 29–36, 1977.

- [51] BRYJAK, J.; KOLARZ, B. N. Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 409–417, 1998.
- [52] XI, F.; WU, J.; JIA, Z.; LIN, X. Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2833–2840, 2005.
- [53] KROGH, T.N.; BERG, T.; HØJRUP, P. Protein analysis using enzymes immobilized to paramagnetic beads. **Analytical Biochemistry**, v. 274, p. 153–162, 1999.
- [54] HERMANSON, G.T. In: **Bioconjugate techniques**. New York: Academic Press, 134-185, 1996.
- [55] BÍLKOVÁ, Z.; SLOVÁKOVÁ, M.; LYČKA, A.; HORAK, D.; LENFELD, J.; TURKOVA, J.; CHURACEK, J. Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 770, p. 25–34, 2002.
- [56] TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 326–335, 1999 em: KORECKÁ, L.; JEŽOVÁ, J.; BÍLKOVÁ, Z.; BENES, M.; HORÁK, D.; HRADCOVÁ, O.; SLOVÁKOVÁ, M.; VIOVY, J. L. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 349–411, 2005.
- [57] BÍLKOVÁ, N. M.; STEFANESCU, R.; BENEŠ, M.; GABOYARD, M.; HORAK, D.; SLOVAKOVA, M.; VIOVY, J. –L.; PRZYBYLSKI, M. Microreactors for total and limited proteolysis based on magnetic nanoparticles developed for μ -chip application. **Proteomics**, 2005 em: KORECKÁ, L.; JEŽOVÁ, J.; BÍLKOVÁ, Z.; BENES, M.; HORÁK, D.; HRADCOVÁ, O.; SLOVÁKOVÁ, M.; VIOVY, J. L. Direct binding procedure of proteins

and enzymes to fine magnetic particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 349–411, 2005.

[58] LIU, Q.; FRIEDLAENDER, F. J. **Minerals Engineering**, v. 7, p. 449, 1998 em: TANYOLAÇ, D.; ÖZDURAL, A. R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 235-242, 2000.

[59] DASGUPTA, S., **Prog. Org. Coat.**, v. 28, p. 307, 1996 em: TANYOLAÇ, D.; ÖZDURAL, A. R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 235-242, 2000.

[60] WANG, Y. M.; WANG, Y. X.; FENG, L. X., **Journal of Applied Polymer Science**, v. 64, p. 1843, 1997 em: TANYOLAÇ, D.; ÖZDURAL, A. R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 235-242, 2000.

[61] BRYJAK, J.; KOLARZ, B. N. Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 409–417, 1998.

[62] CHELLAPANDIAN, M. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 169–173, 1998.

[63] MALMSTEN, M.; XING, K.; LJUNGLÖF, A. Confocal microscopy studies of trypsin immobilization on porous glycidyl methacrylate beads. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 220, p. 436–442, 1999.

[64] VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L.; GÓMEZ, L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 483–490, 2000.

- [65] FÜSSEL, F. **Dissertation**, Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, 1997 em: NEUBERGER, T.; SCHÖPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 483–496, 2005.
- [66] LIU, X.; KAMINSKI, M. D.; RIFFLE, J. S.; CHEN, H.; TORNO, M.; FINCK, M. R.; TAYLOR, L.; ROSENGART, A. J. Preparation and characterization of biodegradable magnetic carriers by single emulsion-solvent evaporation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 84–87, 2007.
- [67] GAMARRA, L. F.; BRITO, G. E. S.; PONTUSCHKA, W. M.; AMARO, E.; PARMA, A. H. C.; GOYA, G. F. Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 439–441, 2005.
- [68] WU, J-H.; KO, S. P.; LIU, H-L.; KIM, S.; JU, J-S.; KIM, Y. K. Sub 5 nm magnetite nanoparticles: Synthesis, microstructure, and magnetic properties. **Materials Letters**, v. 61, p. 3124–3129, 2007.
- [69] PRADHAN, P.; GIRI, J.; BANERJEE, R.; BELLARE, J.; BAHADUR, D. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 282-287, 2007.
- [70] ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 71–82, 2005.
- [71] KANG, S. K.; LEE, S. O.; LIM, Y. S.; JANG, K. L.; LEE, T. H. Purification and characterization of novel levanoctaoase-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 27, p. 159–166, 1998.

- [72] OSCARSON, S.; SEHGELMEBLE, F. W. Chemical syntheses of inulin and levan structures. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 8457–8462, 2002.
- [73] SWINGS, J.; DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 1–46, 1977.
- [74] VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D. G. Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 139–176, 1983.
- [75] FUCHS, A.; BRUIJN, J. M.; NIEDEVELD, C. J. Bacteria and yeasts as possible candidates for the production of inulinases and levanases. **Antonie van Leeuwenhoek, Delft, The Netherlands**, v. 5, p. 333–351, 1985.
- [76] FUCHS, A. Current and potencial food and non-food application of fructans. In: 686th **Meeting Reading of Biochemical Society Transactions**, v. 19, n. 3, p. 555–560, 1991.
- [77] FEINGOLD, D. S.; GEHATIA, M. The structure and properties of levan, a polymer of D- fructose produced by cultures and cell-free extracts of *Aerobacter levanicum*. **Journal of Polymer Science**, v. 23, p. 783–790, 1957.
- [78] RIBBONS, D. W.; DAWES, E. A.; REES, D. A. Levan formation by *Zymomonas mobilis* (*Pseudomonas lindneri*). **The Biochemical Journal**, v. 82, n. 3, p. 45, 1962.
- [79] BARROW, K. D.; COLLINS, J. G.; ROGERS, P. L.; SMITH, G. M. The structure of a novel polysaccharide isolated from *Zymomonas mobilis* determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **European Journal of Biochemistry**, v. 145, p. 173–179, 1984.
- [80] LIEPA, V.; ZAKENFELDS, G.; VOLPE, E.; KORONOVA, Z.; LAPSA, R.; LAIVENIEKS, M.; BEKERS, M.; POSPISHIL, I. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiated mice and enhances the antitumor activity of leukocytes. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences B**, v. 550, n. 5, p. 59–64, 1993.

- [81] CALAZANS, G. M. T. Produção de levana para uso clínico. 1997. Tese (Doutorado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) **Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro.
- [82] BARROS, V. V. R. Utilização de levana como suporte para imobilização de gentamicina. Recife, 2002. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), **Universidade Federal de Pernambuco**.
- [83] BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1535–1539, 2005.
- [84] MARCHESSAULT, R. H.; BLEHA, T.; DESLENDES, Y., REVOL, J. T. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 58, p. 2415–2417, 1980 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [85] FRENCH, A. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 125–136, 1989 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [86] STIVALA, S. S.; KHORMANIAN, B. A. **Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.**, n. 183, 1982 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [87] PHELPS, C. F. **Biochemical Journal**, v. 95, p. 41–47, 1965 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [88] PONTIS, H. G.; DEL CAMPILLO, E. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants (**P. M. Dey and R. A. Dixon, eds.**), p.205–227, 1985 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.

- [89] KANG, K. S.; COTTRELL, I. W. Microbial technology (**H. J. Pepler and D. Perlman, eds.**), 2nd Ed., v. 1, p. 417–481, 1979 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [90] LEIBOVICI, J.; STARK, Y.; WOLMAN, M. Combined effect of levan and cytotoxic agents on the growth of experimental tumours in mice. **British Journal Experimental Pathology**, v. 64, p. 239–244, 1983.
- [91] STARK, Y.; LEIBOVICI, J. Different effects of the polysaccharide levan on the oncogenicity of cells of two variants of Lewis lung carcinoma. **British Journal Experimental Pathology**, v. 67, p. 141–147, 1986.
- [92] LEIBOVICI, J.; STARK, Y. Slow citotoxicity of the polysaccharide levan on tumor cells in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 60, p. 191–200, 1986.
- [93] HEHRE, E. J. **Methods Enzymology**, v. 1, p. 178–192, 1955 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [94] AVIGAD, G. **Encyclopedia of polymer science and technology**, v. 8, p. 711–718, 1968 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [95] SCHECHTER, I.; HESTRIN, S. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 962, 1963 em: HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p. 171–194, 1990.
- [96] MACIEL, J. C. Levana ferromagnética como matriz para imobilização de tripsina. Recife, 2005. Monografia, **Universidade Federal de Pernambuco**.

[97] ANGELI, R. Levana ferromagnetizada: uma matriz de afinidade para purificar lectina de sementes de *Cratylia millis* (Cramoll 1). Recife, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), **Universidade Federal de Pernambuco**.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- Produzir e caracterizar partículas magnéticas de magnetita revestidas pelo polissacarídeo levana e utilizá-las como matriz para imobilização de tripsina.

4.2. Objetivos Específicos

- Produzir partículas de levana-magnetita pelo método de co-precipitação alcalina de sais de ferro (II) e (III);
- Caracterizar as partículas magnéticas por:
 - Difração de Raios-X (DRX);
 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV);
 - Magnetometria;
- Funcionalização do polissacarídeo levana por oxidação com metaperiodato de sódio para formar grupos carbonil para ligar os grupos amino da tripsina;
- Imobilização de tripsina nas partículas magnéticas.
- Caracterização da tripsina imobilizada:
 - Temperatura ótima;
 - Estabilidade térmica;
 - pH ótimo;
 - K_m aparente (Constante de Michaelis-Menten);
 - Reuso.

5. CAPÍTULO I:

Preparation and characterization of levan-coated magnetite particles

Trabalho a ser submetido ao periódico

JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS



Preparation and characterization of levan-coated magnetite particles

Jackeline C. Maciel^{a,d}, Priscyla L. Andrade^{b,d}, Glícia M.T. Calazans^{c,d},
Cláudio A. Cardoso^e, J. Albino Aguiar^{b,d}, Maria da Paz C. Silva^{a,d,*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Departamento de Bioquímica

^bLaboratório de Supercondutividade e Materiais Avançados, Departamento de Física

^cLaboratório de Processos Fermentativos, Departamento de Antibióticos

^dUniversidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife – PE CEP 50670–901, Brazil

^eUniversidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Física, Rodovia Washington Luís, 310, Km 235, São Carlos – SP CEP 13565–905, Brazil

Corresponding author

Maria da Paz Carvalho da Silva

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Phone/Fax: +55-81-21268485

E-mail address: mariapaz@gmail.com

Abstract

Levan polysaccharide was used to coat magnetite particles obtained by co-precipitation process from a solution contain Fe(II) and Fe(III) ions in alkaline aqueous medium. The levan-coated magnetite particles were characterized by scanning electron microscopy (SEM), magnetization measurements, X-ray diffractometry (XRD) and infrared spectroscopy (IR). The uncoated and levan-coated magnetite particles were heterogeneous both in shape and particles-coated presented bigger sizes as compared to that uncoated in accord obtained SEM images. The particles-coated exhibited a magnetization ten fold lower as compared to uncoated probably due to coating layer. XRD of diffractogram showed that magnetite is the dominant phase in the particles-coated and infrared spectroscopy showed characteristics absorption bands from levan polysaccharide and magnetite present in the particles-coated (O–H, C–O–C, and Fe–O bond). Levan-coated magnetite particles were activated by sodium periodate method and utilized as matrix for immobilization of the proteolytic enzyme trypsin. This immobilized enzyme was reused for ten times and presented a mean specific activity equal to 84 % of the initial specific activity. The produced magnetic particles showed good capacity for are used as matrix for immobilization of enzymes, in special its capacity for reused.

Keywords: levan; magnetite; magnetic particles; trypsin.

1. Introduction

Magnetic carrier technology has found its applications as bioaffinity adsorbents for selective recovery from liquors containing other suspended solids, wastewater treatment via electrostatic adsorption, magnetic supports for immobilized or adsorbed enzymes and proteins, and for use in the preparation of immunological assays [1]. In virtually all cases, the magnetic properties of these particles play an important role in the effectiveness of the application and affect the behavior of the particles and ferrofluids in applied fields [2].

In biomedicine, the polymer shell ensures stability of magnetic particles in physiological medium providing nontoxicity by avoiding leakage of iron and enables chemical modification for attachment of biologically active compounds. [3]. These magnetic particles are generally of core-shell type: biological species are connected to the magnetic core through an organic or polymeric shell. The shells are either biocompatible in general (such as dextran, xylan, chitosan, PEG, etc), or possessing active groups which can be conjugated to biomolecules such as proteins and enzymes [4].

Magnetic carriers can be manufactured using inorganic materials or polymers. However, magnetic carriers are most commonly manufactured from polymers, since they have a variety of surface functional groups which can be tailored to specific applications [5]. The utilization of polysaccharides presents advantages due to a large number of derivatizable groups, a wide range of molecular weights, low toxicity, biodegradability and high stability [6]. As the core of the supports, magnetic materials such as maghemite and magnetite are employed [7].

The purpose of this study was coat magnetite particles using levan polysaccharide. Here, we present in detail the preparation and characterization of coated magnetite particles. These magnetic particles were utilized to immobilization of a proteolytic enzyme.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Levan from *Zymomonas mobilis* strain ZAG-12 (Molecular Weight, $M_w = 300$ KDa) was precipitated by addition of ethanol to 70% (v/v) at low temperature according to Calazans et al. [8]. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of levan-coated magnetite particles

An aqueous mixture contain 5 mL of 1.1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 5 mL of 0.6 M $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ was added to 50 mL of 2.0 % w/v levan (prepared in distilled water) next of addition ammonium hydroxide to a final pH 11. The mixture was heated at 85 ± 3 °C for 30 min with vigorous stirring. The magnetic particles were thoroughly washed with distilled water until pH neutral. The material was dried and kept at room temperature. The procedure was realized in accord Carneiro Leão et al. [9], except by modifications in the incubation time (30 min) and temperature (85 °C).

2.2.2. Size and morphology

The particle size and morphology of the samples were determined by scanning electronic microscopy (SEM), JEOL Model JSN - 5900.

2.2.3. Magnetization measurements

Magnetization measurements were obtained at 293 K (20°C) and 313 K (40°C) in magnetic fields from 0 to 50 KOe (5.0 T) using a superconducting quantum interference device (SQUID) magnetometer (Quantum Design Model MPMS-5).

2.2.4. X-ray analysis

The structural properties of magnetic particles were characterized by X-ray powder diffraction, which was carried out in an X-ray diffractometer Siemens D5000. Representative powder samples were analyzed in the range $10^\circ < 2\theta < 90^\circ$ by using $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), in steps of 0.02° , and with a counting time of 1.0 s per step.

2.2.5. Functional groups

Fourier transform infrared (FTIR) spectrum from the KBr pellet method in the range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ with particles-coated was recorded in a BRUKER instrument model IFS 66. Two milligrams of uncoated magnetite, levan-coated magnetite and levan polysaccharide were mixed with 200 mg KBr and discs were pressed at 490 atm. Typically, 100 scans were recorded with a 4 cm^{-1} resolution.

3. Results and discussion

3.1. Preparation, size and morphology of the magnetic particles

The co-precipitation process to obtain levan-coated magnetite was carried out in an alkaline aqueous medium and the final product obtained from this process was dense, black and magnetic. These magnetic particles exhibited a magnetization in the presence of a

magnetic field 0.6 T. In relation to size and morphology, SEM images, shown in Fig. 1, reveal a heterogeneous morphology and without porosity for both uncoated and coated magnetite particles. However, coated magnetite presented size variation larger than uncoated magnetite, beyond presents bigger particles than that. The prepared magnetic particles can be considered as microparticles with sizes between 20–60 μm for uncoated magnetite and 100–200 μm for coated magnetite approximately. The coating produced changes in the size particle and in accord Silva et al. [11] these results suggesting that polymeric coating involved more than one particle, consisting of multi-core/shell structures. Since according to Pardoe et al. [2] polymer preparations have smaller particle sizes.

3.2. Magnetization measurements

The magnetization measurements to uncoated and coated (Fig. 2) magnetite particles indicated that there was neither remanent magnetization (Magnetization = 0 for Magnetic field = 0) nor coercivity. Concerning magnetization saturation, it was found to decrease ten times for coated magnetic particles as compared to uncoated magnetic particles. The coating decreased force exercised by applied magnetic field because difficult alignment of magnetic dominions in the material, producing a smaller magnetization than that exhibited by particles-uncoated as well as observed by Xu et al. [12] and Ramanujam and Yeow [13].

3.3. X-ray analysis

The Fig. 3 shows the XRD diffractograms for the uncoated and levan-coated magnetite particles. The magnetite was the dominant phase in the coated magnetic particles

with a primary scattering peak at around $2\theta = 35^\circ$. This result is in accord Chen and Hu [14]. The diffractograms show too small dislocation of the peaks as compared to XRD patterns of magnetite. These dislocations probably happened due to tensions in the crystalline structure from magnetite because of modifications occurred during synthesis of the material. Furthermore, Fig. 3 shows that coated magnetite do not present rise to sharp diffraction peaks. Instead, a broad band appears in each spectrum, which is characteristic for amorphous materials and also for the ultrafine crystalline particles in according Xu et al. [12]. It suggests the presence of levan polysaccharide in the coated magnetite particles. Characteristics peaks [11,15] of goethite (at $2\theta = 21.38^\circ$), hematite (at $2\theta = 33.15^\circ$), ferric hydroxide (at $2\theta = 26.38^\circ$) as well as other phases of iron oxide hydroxides were not detected.

3.4. Functional groups

Infrared spectroscopy (Fig. 4) showed that O–H groups are present in the levan polysaccharide, uncoated and coated magnetite near wavenumber of 3500 cm^{-1} with similar intensities. These O–H groups correspond to that present in organic compounds and to the OH^- groups adsorb on the particle surface. The magnetite particles can be coated with levan by chemical bond. This was proven by comparison of infrared spectra of the uncoated and coated magnetite and also of levan polysaccharide. The levan-coated magnetite presented absorption bands in 2935.1 and 2878.5 cm^{-1} due to stretching vibration of C–H bond, band in 1061.0 cm^{-1} due to stretching vibration of C–O–C bond. These bonds are also present in the levan polysaccharide with bands in 2940.2 and 2886.2 cm^{-1} (stretching vibration of C–H bond), band in 1059.0 cm^{-1} (stretching vibration of C–O–C) indicative of

the presence of polysaccharide in the particles-coated. According to Ma et al. [4], previous studies reported that the characteristic absorption bands of the Fe–O bond of bulk magnetite were in 570 and 375 cm^{-1} . However, Ma et al. [4] observed that these two bands shift of about 600 and 440 cm^{-1} respectively, and the band near 600 cm^{-1} is split into two peaks of 631.4 and 582.9 cm^{-1} . In our work, Fig. 6, we also found a band near 600 cm^{-1} split in two peaks of 631.2 and 565.6 cm^{-1} for uncoated magnetite. Note, however, that the levan-coated magnetite presented a single broad band at 583.6 cm^{-1} . This little difference can to indicate that the interactions between coating (levan polysaccharide) and magnetite were intermolecular interactions.

3.5. Application of the particles-coated for bioprocess

The proteolytic enzyme trypsin was covalently immobilized on levan-coated magnetite particles after oxidation of these particles by sodium periodate method. The amount of trypsin immobilized was found to be $16.0 \pm 2.8 \mu\text{g/mg}$ of matrix and the specific activity was $19.54 \pm 1.34 \text{ mU/mg}$ of protein when assayed under standard conditions using a low molecular weight substrate (BAPNA). The immobilized trypsin was reused ten times and presented a mean activity equal to $84.43 \pm 5.42 \%$ of the initial specific activity ($20.65 \pm 0.69 \text{ mU/mg}$). Similar results were obtained by Amaral et al. [16] to the reuse immobilized tilapia trypsin on ferromagnetic Dacron. These authors observed that after reuse by eight times immobilized tilapia trypsin, it presented a mean activity equal to $92.1 \pm 7.3 \%$ of the initial activity. The coating [10] represents a function important of the performance of enzyme because offer bigger stability to it. This stability was verified by immobilization of trypsin on uncoated magnetite. The immobilized trypsin on uncoated

magnetite showed, after reused ten times, a loss of 64.75 % in its specific activity. The immobilized trypsin on particles-coated was very more stable than immobilized trypsin on particles-uncoated (Fig. 5).

4. Conclusions

In this study, levan-coated magnetite particles were prepared by co-precipitation process. The coating produced changes in the size particle and particles-coated presented larger size variation than that uncoated. It was found to decrease ten times in the magnetization saturation for particles-coated as compared to that uncoated. The presence of levan polysaccharide in the coated magnetite is suggested by FTIR characteristic absorption bands and by a broad band in each spectrum obtained from XRD diffractograms. We conclude that the coating process was efficiency and that the obtained results permitted to identify the presence of polysaccharide in the particles-coated. The utilization of levan-coated magnetite particles showed is efficacious for immobilization of enzymes as trypsin that presented good capacity of reuse when immobilized. Then, these magnetic particles-coated can be proposed as an alternative matrix for immobilization of biomolecules in process different of separation in biotechnology.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and Capes.

Appendices

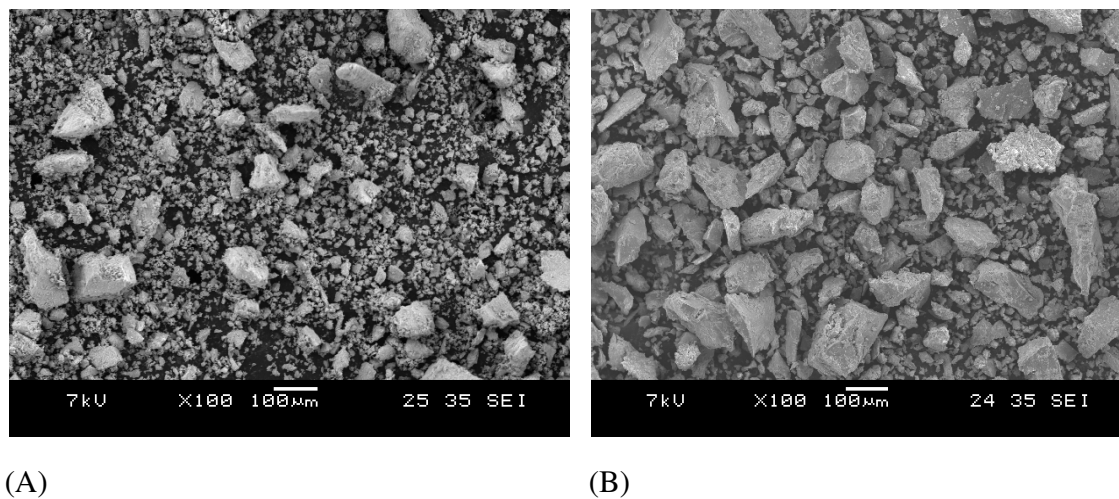


Fig. 1

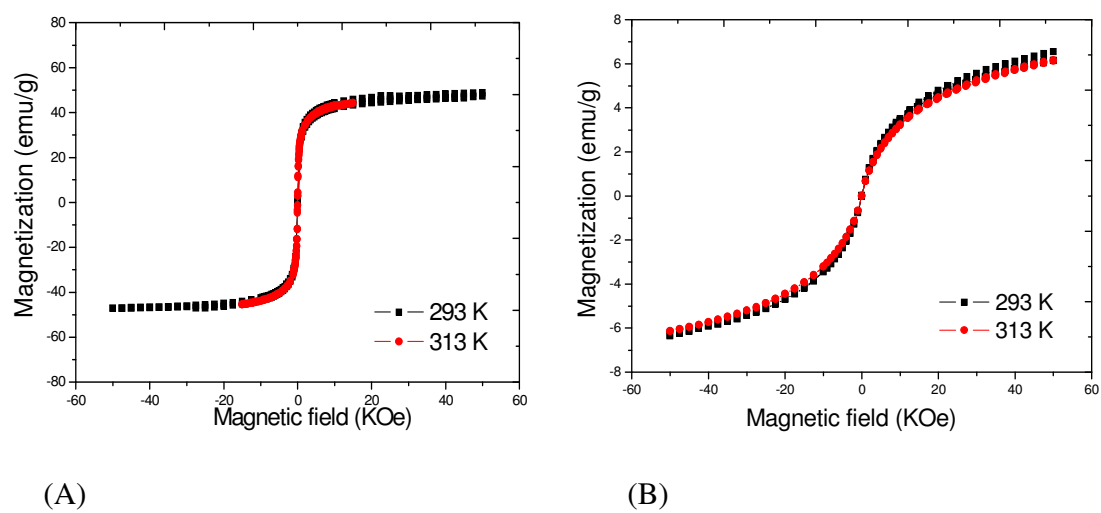
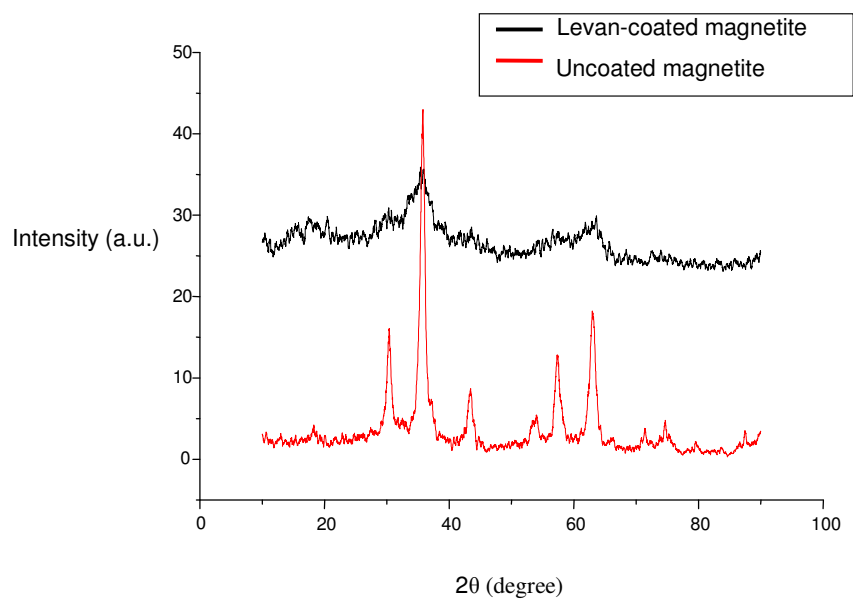
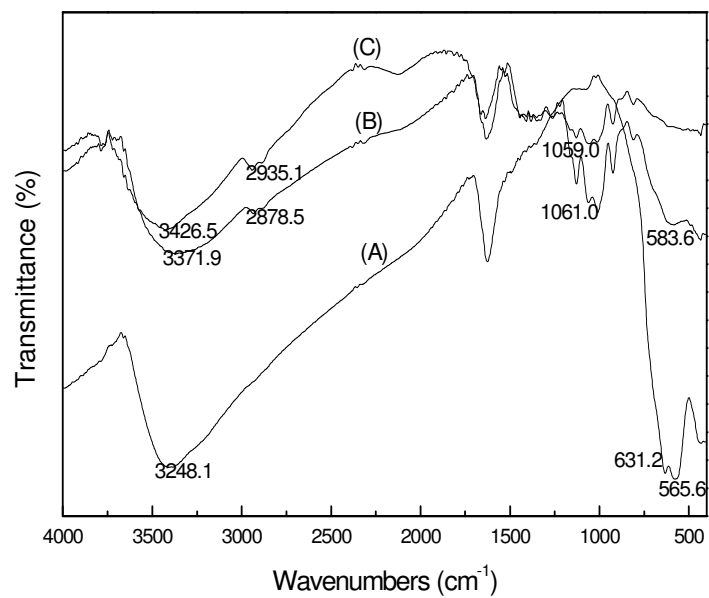


Fig. 2

**Fig. 3****Fig. 4**

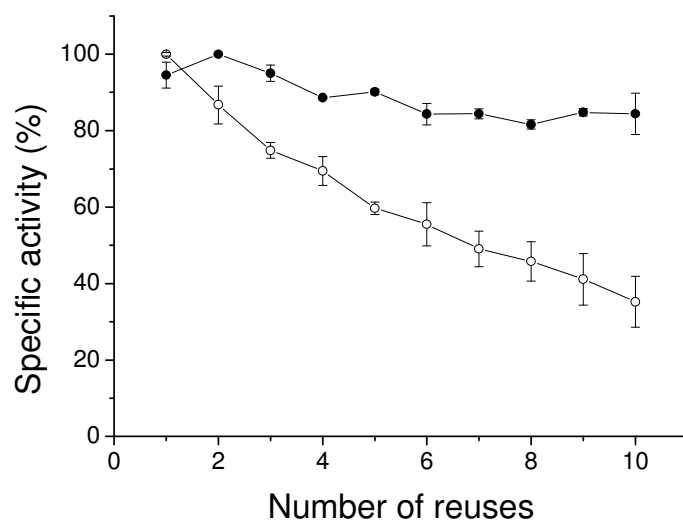


Fig. 5

References

- [1] D. Tanyolaç, A.G. Özdural, *React. Funct. Polym.* 45 (2000) 235–242.
- [2] H. Pardoe, W. Chua-Anusorn, T.G. St. Pierre, J. Dobson, *J. Magn. Magn. Mater.* 225 (2001) 41–46.
- [3] D. Horák, E. Petrovský, A. Kapička, T. Frederichs, *J. Magn. Magn. Mater.* 311 (2007) 500–506.
- [4] M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Shen, H. Zhang, N. Gu, *Colloid. Surface. Physicochem. Eng. Aspect.* 212 (2003) 219–226.
- [5] E.B. Denkbaş, E. Kiliçay, C. Birlikseven, E. Öztürk, *React. Funct. Polym.* 50 (2002) 225–232.
- [6] M.K. Chourasia, S.K. Jain, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 (2003) 33–66.
- [7] X. Li, L. Wang, C. Zhou, T. Guan, J. Li, Y. Zhang, *Clin. Chim. Acta.* 378 (2007) 168–174.
- [8] G.M.T. Calazans, R.C. Lima, F.P. França, C.E. Lopes, *Int. J. Biol. Macromol.* 27 (2000) 245–247.
- [9] A.M.A. Carneiro Leão, E.A. Oliveira, L.B. Carvalho Jr, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 32 (1991) 53–58.
- [10] I. Vina, A. Karsakevich, M. Bekers, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11 (2001) 551–558.
- [11] A.K.A. Silva, E.L. Silva, E.E. Oliveira, T. Nagashima Jr, L.A.L. Soares, A.C. Medeiros, J.H. Araújo, I.B. Araújo, A.S. Carriço, E.S.T. Egito, *Int. J. Pharmaceut.* 334 (2007) 42–47.
- [12] H. Xu, N. Tong, L. Cui, Y. Lu, H. Gu, *J. Magn. Magn. Mater.* 331 (2007) 125–150.
- [13] R.V. Ramanujan, Y.Y. Yeow, *Mater. Sci. Eng. C.* 25 (2005) 39–41.

- [14] J.C. Chen, C.C. Hu, *J. Cryst. Growth*. 249 (2003) 245–250.
- [15] M. Yamaura, R.L. Camilo, L.C. Sampaio, M.A. Macedo, M. Nakamura, H.E. Toma, J. *Magn. Magn. Mater.* 279 (2004) 210–217.
- [16] I.P.G. Amaral, M.G. Carneiro-da-Cunha, L.B. Carvalho Jr., R.S. Bezerra, *Pro. Biochem.* 41 (2006) 1213–1216.

Figure Captions

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of uncoated magnetite (A) and levan-coated magnetite (B).

Fig. 2. Magnetization curves of uncoated magnetite (A) and levan-coated magnetite (B) at 293 K and 313 K.

Fig. 3. X-ray powder diffraction patterns of uncoated and levan-coated magnetite.

Fig. 4. FTIR spectra of the levan polysaccharide (A), levan-coated magnetite (B) and uncoated magnetite (C).

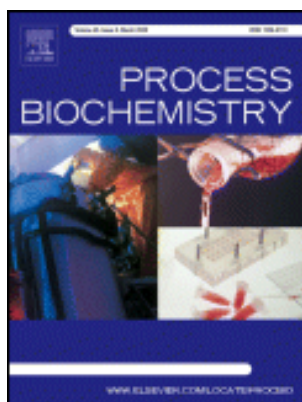
Fig. 5. Reused of immobilized trypsin on uncoated ($\circ$) and levan-coated ($\bullet$) magnetite particles. The bigger specific activity of enzyme (100 %) was 20.65 ± 0.69 mU/mg for trypsin immobilized on particles-coated and 18.59 ± 0.08 mU/mg for trypsin immobilized on particles-uncoated.

6. CAPÍTULO II:

Levan-coated magnetite particles as support for enzyme immobilization

Trabalho a ser submetido ao periódico

PROCESS BIOCHEMISTRY



Levan-coated magnetite particles as support for enzyme immobilization

Jackeline C. Maciel^a, Ian P.G. Amaral^a, Givanildo B. Oliveira^{a,b}, Glícia M.T. Calazans^c,

Luiz B. Carvalho Jr.^{a,b}, Maria da Paz C. Silva^{a*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife – PE CEP 50670-910, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Química Fundamental (DQF), Cidade Universitária, Recife – PE CEP 50740-906, Brazil

^cLaboratório de Processos Fermentativos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife – PE CEP 50670-910, Brazil

Corresponding author:

Maria da Paz Carvalho da Silva

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, 50670-910 Recife, PE, Brazil

Phone/Fax: +55-81-21268485

E-mail address: mariapaz@gmail.com

Abstract

Levan-coated magnetite particles were activated by sodium periodate method. The oxidated magnetic particles were utilized as matrix for immobilization of the proteolytic enzyme trypsin. The amount of protein immobilized was of 79.66 % and its specific activity varied depending on the immobilized enzyme. The immobilized trypsin was reused for ten times and presented a mean specific activity equal to 17.41 ± 0.53 mU/mg corresponding to 84.43 ± 5.42 % of the initial specific activity. After 30 days of storage at 4 °C and 25 °C, immobilized trypsin showed a loss of 40.69 % and 41.47 % of the initial activity, respectively. In relation to shelf life, a loss of 70.56 % of the initial activity was observed after stored for 21 days and reused five times during this period. It showed significantly higher stability in conditions of increased temperature (40°C and 50°C) as compared to soluble enzyme. The pH range for optimal activity of immobilized trypsin was of 8.5–9.0 and for soluble trypsin was of 8.0–9.0. Using a substrate of low molecular weight, the immobilized trypsin presented an apparent K_m (0.257 ± 0.04 mM) approximately 2 fold lower than that found for the soluble enzyme (0.528 ± 0.26 mM). The levan-coated magnetite particles showed good capacity for are used as matrix for immobilization of enzymes, in special their capacity for protein retention, reused and thermal stability.

Keywords: Levan; Magnetite; Immobilization; Enzyme; Trypsin.

1. Introduction

Magnetic particles, namely microspheres, nanospheres and ferrofluids, are widely studied for their applications in various fields in biology and medicine such as enzyme and protein immobilization, magnetic resonance imaging MRI, diagnostics, immunoassays, RNA and DNA purification, magnetic cell separation and purification, magnetically controlled transport of anti-cancer drugs as well as hyperthermia generation [1-4].

Modified magnetic materials are composed of an iron oxide core coated with organic or inorganic molecules, which form a chemical bond with the core surface [5]. The magnetic properties of these particles play an important role in the effectiveness of the application and affect the behavior of the particles and ferrofluids in applied fields [6]. Most of these applications require magnetic fluids to be chemically stable, biocompatible, water-soluble, biodegradable and nontoxic as polysaccharides for example. Magnetic polysaccharides such as magnetic dextran just meet these needs and have been used extensively. However, dextrans or other polysaccharides are inert to most direct reactions with proteins, and they must be chemically activated to conjugate to biomolecules. A common method which introduces active functional groups at random positions in dextran is based on the cleavage of the sugar rings with periodates to form magnetic polyaldehyde-dextran [7].

Many types of supports have been used for enzyme immobilization such as organic supports, biopolymer supports and inorganic supports [8]. Immobilization of enzymes and biological compounds is currently gaining importance due to its wide variety of applications in the food and pharmaceutical industries and also its biomedical applications [9]. Binding of enzymes on a solid support is an advantageous modification of their application in

biosciences and special diagnostic procedures. The enhanced stability, rapid and gentle separation of carrier with immobilized enzymes from the reaction media and significantly lower cost provide substantial reasons to utilize these enzyme reactors in clinical practice [10]. Mostly magnetic microspheres consist of a superparamagnetic core embedded in a polymer shell protecting the enzyme from contact with the metal (mostly iron) oxide [11]. A magnetic colloid (or ferrofluid) is an important starting component in the preparation of magnetic polymer nano- and microspheres. Various methods and materials were used for their synthesis. The factors such as type of carrier and immobilization procedure can be controlled [2]. The polysaccharide levan (fructose polymer of microbial origin composed of β -(2,6)-fructosyl-fructose linked molecules) [12] was utilized to improve enzymatic properties of the L-asparaginase immobilized in this oxidized polysaccharide with periodate [13]. The purpose of the study was to immobilize trypsin on levan-coated magnetite particles and to characterize the immobilized enzyme in relation to amount bound protein, capacity of reuse, optimal temperature, stability thermal, pH and substrate concentration.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Levan from *Zymomonas mobilis* strain ZAG-12 (Molecular Weight, $M_w = 300$ KDa) was precipitated by addition of ethanol to 70% (v/v) at low temperature according to Calazans et al. [14]. Trypsin (EC 3.4.21.4, DIFCO), N- α -benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA, Sigma), Sodium Periodate (Carlo Erba), Sodium Borohydride (NaBH_4 , Sigma), Ferric Chloride Hexahydrate (Merck, Germany), Ferrous Chloride

Tetrahydrate (Merck, Germany), Ammonium Hydroxide (NH_4OH , Vetec Chemical, Brazil; 30%) were used as received from manufactures. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Production of levan-coated magnetite particles

An aqueous mixture contain 5 mL of 1.1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 5 mL of 0.6 M $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ was added to 50 mL of 2.0 % w/v levan (prepared in distilled water) next of addition ammonium hydroxide to a final pH 11. The mixture was heated at 85 ± 3 °C for 30 min with vigorous stirring. The magnetic particles were thoroughly washed with distilled water until pH neutral. The material was dried and kept at room temperature. The procedure was realized in accord Carneiro Leão et al. [9], except by modifications in the incubation time (30 min) and temperature (85 °C).

2.2.2. Oxidation of levan-coated magnetite particles

Levan-coated magnetite particles (10 mg) and sodium periodate (10 mg) were mixed in distilled water [13]. The mixture obtained was constantly stirred in the dark at room temperature for 7 h. Oxidized coated magnetite was separated from the sodium periodate using a magnetic field (0.6 T) and washed with 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0 (1 mL, 10 times).

2.2.3. Immobilization of trypsin

Oxidized coated magnetite (10 mg) was incubated with trypsin (0.2 mg/mL, 1.0 mL) for 16 h at 4°C under mild stirring. The supernatant was removed using a magnetic field of 6.0 KOe (0.6 T) and kept at 4°C for protein determination. NaBH₄ (0.03 M, 1 mL) was added and slightly mixed for 2 h at 4°C. Then the solution of NaBH₄ was collected under magnetic field and magnetic particles were washed with 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0 (1.0 mL, 10 times) and kept at 4°C in this buffer.

2.2.4. Enzymatic activity and protein determination

The activity of trypsin was measured at 25°C by following the increase of absorbance at 405 nm with BAPNA as substrate. The activity was defined as $\mu\text{mol BAPNA hydrolyzed within 1 min}$ applying an absorption coefficient of $\epsilon_{405} 9,100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [16]. For activity of soluble trypsin 30 μL of a 4 mM solution of BAPNA in DMSO (Dimethyl sulfoxide) was added to 140 μL of 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. Then 30 μL of trypsin solution (0.2 mg/mL in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0) was added. For the activity of the immobilized trypsin 150 μL of 4 mM BAPNA in DMSO were mixed with 850 μL 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. The trypsin immobilized on coated magnetite (10 mg) was added in this mixture and shaken for 15 min at 25°C. Thereafter the absorbance was measured. Two repetitive values were determined and the mean value calculated. The Sedmak method [17] was applied to determine the amount of soluble protein and the amount protein retained (immobilized protein). Trypsin was utilized as standard.

2.2.5. Immobilized trypsin characterization

Kinetic parameters, K_m and V_{max} , for soluble and immobilized trypsin were calculated from initial rate data using BAPNA as substrate (0.03 - 0.6 mM). Values of K_m and V_{max} were estimated from double-reciprocal plots of the initial rate data. The effect of pH in the range of 6.0 – 9.0 on the activity of both soluble and immobilized trypsin was measured with 4 mM BAPNA as substrate in 0.1 M sodium phosphate (6.0 – 7.0) and 0.1 M Tris-HCl (7.2 – 9.0) buffers. The effect of temperature on trypsin activity was determined in the temperature range of 25 – 70°C with BAPNA as substrate. The immobilized trypsin was repeatedly used to hydrolyse BAPNA. The hydrolysis was carried out for 150 min (10 times, 15 min steps). After each run the immobilized enzyme was washed with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. A series of control blanks without enzyme were also assayed under identical conditions.

3. Results and Discussion

3.1. Production of levan-coated magnetite particles

The co-precipitation process to obtain composites of levan-coated magnetite was carried out in an aqueous medium. The final product obtained from the co-precipitation was dense, black and magnetic. The coated magnetite exhibited a magnetization in the presence of a magnetic field of 6.0 KOe (0.6 T) and a medium size of up to 250 μm (<) of diameter.

3.2. Immobilization of trypsin

The method of immobilization of trypsin on levan-coated magnetite particles using periodate involves covalent attachment of the amino groups to available aldehyde groups

present in the activated matrix. The amount of trypsin immobilized was found to be 16.0 ± 2.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of matrix and the specific activity was 19.54 ± 1.34 mU/mg of protein when assayed under standard conditions using a low molecular weight substrate (BAPNA). Fig. 1A presents the amount of protein immobilized per g-dry weight magnetic matrix in function of the amount of added protein. It's possible to observe that how more protein is added, more protein is bound. However, how to be more the amount of immobilized protein, smaller the specific activities (Fig. 1B). This study indicated that immobilized enzyme activities may vary widely depending on the protein content.

The immobilized trypsin was reused ten times and presented a mean activity equal to 84.43 ± 5.42 % of the initial specific activity (20.65 ± 0.69 mU/mg). Similar results were obtained by Amaral et al. [18] to the reuse immobilized tilapia trypsin on ferromagnetic Dacron. These authors observed that after reuse by eight times immobilized tilapia trypsin, it presented a mean activity equal to 92.1 ± 7.3 % of the initial activity. The coating [19] represents a function important of the performance of enzyme because offer bigger stability to it. This stability was verified by immobilization of trypsin on uncoated magnetite. The immobilized trypsin on uncoated magnetite showed, after reused ten times, a loss of 64.75 % in its specific activity. The immobilized trypsin on particles-coated was very more stable than immobilized trypsin on particles-uncoated (Fig. 2).

Samples of immobilized trypsin were stored at 4 °C and 25 °C for 30 days. Their enzymatic activities were measured after 30 days of storage presenting a reduction of 40.69 % and 41.47 % of the initial specific activity (21.09 ± 1.38 mU/mg and 18.11 ± 2.41 mU/mg) for immobilized trypsin at 4 °C and 25 °C, respectively. Any difference significant was observed between the immobilized enzymes after storage at different temperatures.

Also was verifying the shelf life of this immobilized enzyme. After be stored for 21 days and have its enzymatic activity measured by five times during this period, it was obtained a reduction of 70.56 % of the initial specific activity (19.48 ± 3.05 mU/mg). It's possible observe, in the Fig. 3, a reduction of 40 % of the initial activity of the immobilized enzyme after stored for seven days and reused three times during this period. However, the increase of storage period in a row of the reuse caused a considerable loss of the activity of immobilized enzyme. As can be seen from the results, the immobilized trypsin can be reused for several times (ten times, for example) without present an accentuated loss (Fig. 2). However, the storage procedure cause influence over activity of immobilized enzyme. Therefore, we deduce that storage of the conjugate enzyme-magnetic particles for subsequent to utilization is disadvantageous.

3.3. Properties of immobilized trypsin

Apparent kinetic constant for immobilized trypsin was determined from initial rate measurements with BAPNA as substrate (Table 1). Under identical assay conditions with BAPNA, values of K_m for soluble and immobilized trypsin were 0.528 mM and 0.257 mM, respectively. Thus, immobilization causes a 2-fold reduction in the K_m . The data indicate that the immobilization enhanced the affinity of the enzyme for BAPNA it could be attributed to negatively charged support attraction for the positively charged substrate BAPNA [8,20]. The optimum pH of the soluble and immobilized trypsin with BAPNA as substrate were obtained from the data shown in Fig. 3. Similar activity profiles were observed for both soluble and immobilized forms. However, the optimum pH for the immobilized trypsin (8.5 - 9.0) was higher than that found for the soluble trypsin (8.0 -

9.0). The behavior observed for trypsin immobilized on magnetic levan can be explained by the change in the microenvironmental of immobilized enzyme [9,21]. The effect of temperature on the activity of soluble and immobilized forms of trypsin is shown in the Fig. 4. The temperature-activity profile for trypsin-matrix is similar to that of soluble enzyme, suggesting an optimum of 50°C. The thermal stability of the immobilized trypsin showed a considerable increase when compared to the free enzyme (Fig. 5). The link of a molecule of an enzyme to rigid support by several strong chemical bonds makes the structure of the protein molecule much more rigid, and hence unfolding and inactivation (for example, on heating) of such immobilized enzyme will be much more difficult to occur than that of the starting, native enzyme [22]. The re-usability of trypsin immobilized on magnetic levan was also studied. The decrease in activity on repeated use is given in Fig. 6. The coated magnetite bound trypsin retained 89% of its initial activity after 10 repeated uses when compared with immobilized trypsin on bare magnetite. The immobilized enzyme on levan-coated magnetite showed great capacity for re-usability (a loss of 11% in the activity after 10 uses in a row). Different result was observed for immobilized trypsin on uncoated magnetite. In this case, the enzyme showed a loss of 38% in the activity after 10 uses. This result shows that the presence of a link between enzyme and polymer is important for stability of the enzyme.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Brazil).

References

- [1] Kawaguchi T, Hasegawa M. Structure of dextran-magnetite complex: relation between conformation of dextran chains covering core and its molecular weight. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2000; 11: 31-35.
- [2] Kawaguchi T, Hanaichi T, Hasegawa M, Maruno S. Dextran-magnetite complex: conformation of dextran chains and stability of solution. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2001; 12: 121-127.
- [3] Ma M, Zhang Y, Yu W, Shen H, Zhang H, Gu N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2003; 212: 219-226.
- [4] Yamaura M, Camilo RL, Sampaio LC, Macedo MA, Nakamura M, Toma HE. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal Magnetism and Magnetic Materials* 2004; 279: 210-217.
- [5] Paul KG, Frigo TB, Groman JY, Groman EV. Synthesis of ultrasmall superparamagnetic iron oxides using reduced polysaccharides. *Bioconjugate Chemistry* 2004; 15: 394-401.
- [6] Pardoe H, Chua-Anusorn W, St. Pierre TG, Dobson J. Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2001; 225: 41-46.
- [7] Hong X, Guo W, Yuan H, Li J, Liu Y, Ma L, Bai Y, Li T. Periodate oxidation of nanoscaled magnetic dextran composites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2004; 269: 95-100.

- [8] Huang XL, Catignani GL, Swaisgood HE. Comparison of the properties of trypsin immobilized on 2 CeliteTM derivatives. *Journal of Biotechnology* 1997; 53: 21-27.
- [9] Chellapandian M. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. *Process Biochemistry* 1997; 33: 169-173.
- [10] Korecká L, Ježová J, Bílková Z, Benes M, Horák D, Hradcová O, Slováková M, Viovy JL. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *Journal Magnetism and Magnetic Materials* 2005; 293: 349-411.
- [11] Tanyolaç D, Özdural AR. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. *React. Funct. Polym* 2000; 45: 235-242.
- [12] Bekers M, Upite D, Kaminska E, Laukevics J, Grube M, Vigants A, Linde R. Stability of levam produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* 2005; 40: 1535-1539.
- [13] Vina I, Karsakevich A, Bekers M. Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levam. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001; 11: 551-558.
- [14] Calazans GMT, Lima RC, França FP, Lopes CE. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levams. *International Journal of Biological Macromolecules* 2000; 27: 245-247.
- [15] Carneiro Leão AMA, Oliveira EA, Carvalho Jr LB. Immobilization of protein on ferromagnetic dacron. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1991; 32: 53-58.
- [16] Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1961; 95: 271-278.

- [17] Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry* 1977; 79: 544-552.
- [18] Amaral IPG, Carneiro-da-Cunha MG, Carvalho Jr. LB, Bezerra RS. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry* 2006; 41: 1213–1216.
- [19] Silva AKA, Silva EL, Oliveira EE, Nagashima Jr T, Soares LAL, Medeiros AC, Araújo JH, Araújo IB, Carriço AS, Egito EST. Synthesis and characterization of xylan-coated magnetite microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 334: 42–47.
- [20] Kumar A, Gupta MN. Immobilization of trypsin on as enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1998; 5: 289-294.
- [21] Perutz MF. Electrostatic effects in protein. *Science* 1978; 201: 1187-1191.
- [22] Martinek K, Klivanov AM, Goldmacher VS, Berezin IV. The principles of enzyme stabilization. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1977; 485: 1-12.

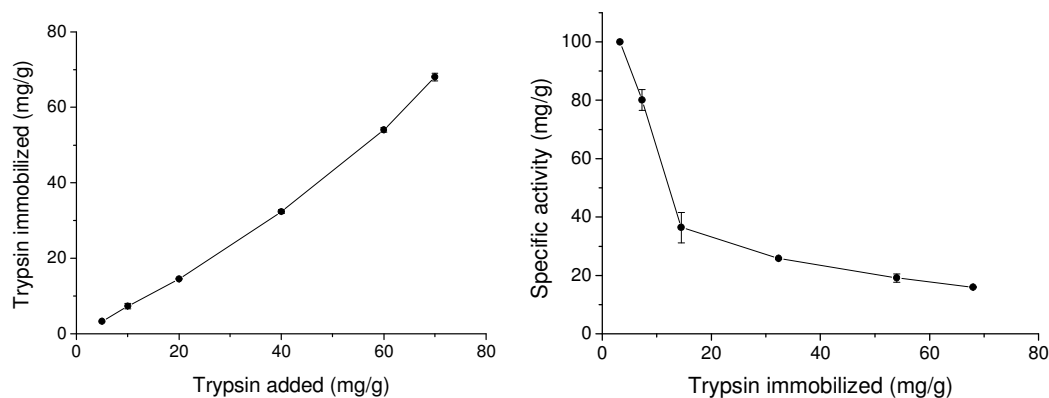
Figures

Fig. 1. (A) The amounts of trypsin immobilized on levam-coated magnetite. The immobilized trypsin (mg) per g-dry weight magnetic matrix is plotted. (B) Effect of immobilized protein amount on the activities of immobilized trypsin measured by BAPNA (4 mM). The bigger specific activity of enzyme (100 %) was 57.92 ± 1.30 mU/mg. The content of added protein varied between 50 and 800 μ g.

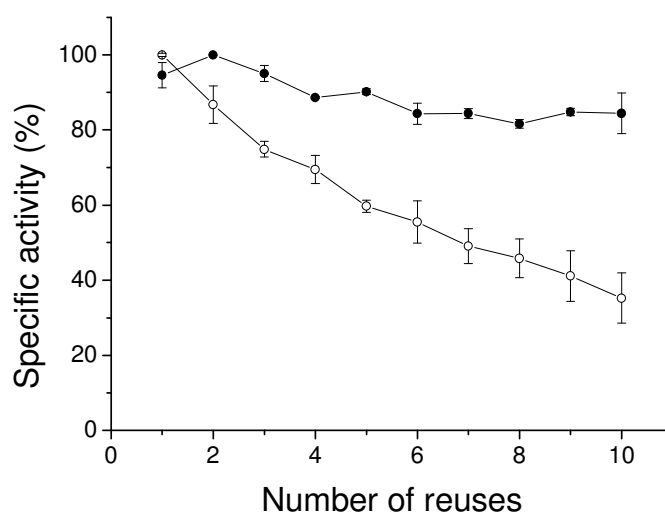


Fig. 2. Reused of immobilized trypsin on uncoated (○) and levan-coated (●) magnetite. The immobilized enzyme on matrix (uncoated and coated magnetite) was incubated with a 4 mM initial concentration of BAPNA and 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.0. The bigger specific activity of enzyme (100 %) was 20.65 ± 0.69 mU/mg.

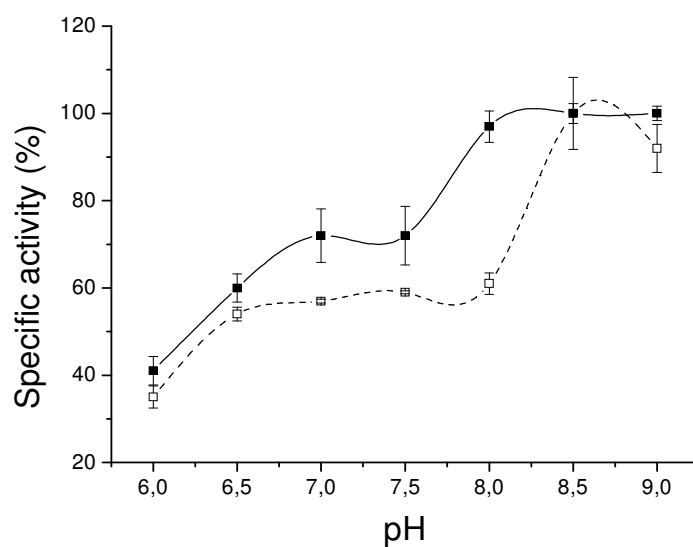


Fig. 3. Effect of pH on the activities of soluble trypsin (—■—) and immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles (---□---). Assay: 10 mg of magnetic immobilized and 30 μ L soluble (6.0 μ g) trypsin were incubated with 4 mM BAPNA and 0.1 M buffer at 25°C and shaken for 15 min. The absorbance of formed product was measured at 405 nm. Buffers used: sodium phosphate (6.0–7.0) and Tris-HCl (7.5–9.0). The obtained activities were referred to the highest activity (100%) for immobilized and soluble enzyme.

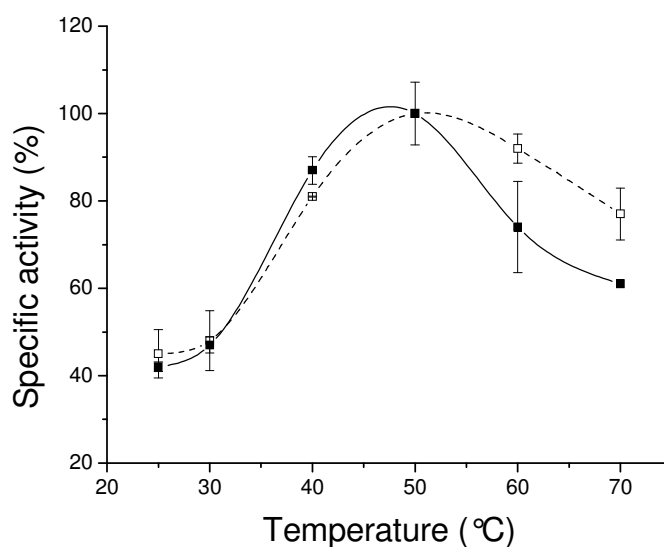


Fig. 4. Effect of temperature on the activities of soluble trypsin (—■—) and immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles (---■---). Assay: 10 mg of magnetic immobilized and 30 μ L soluble (6.0 μ g) trypsin were incubated with 4 mM BAPNA and 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 buffer at temperature different (25–70°C) and shaken for 15 min. The absorbance of formed product was measured at 405 nm. The obtained activities were referred to the highest activity (100%) for immobilized and soluble enzyme.

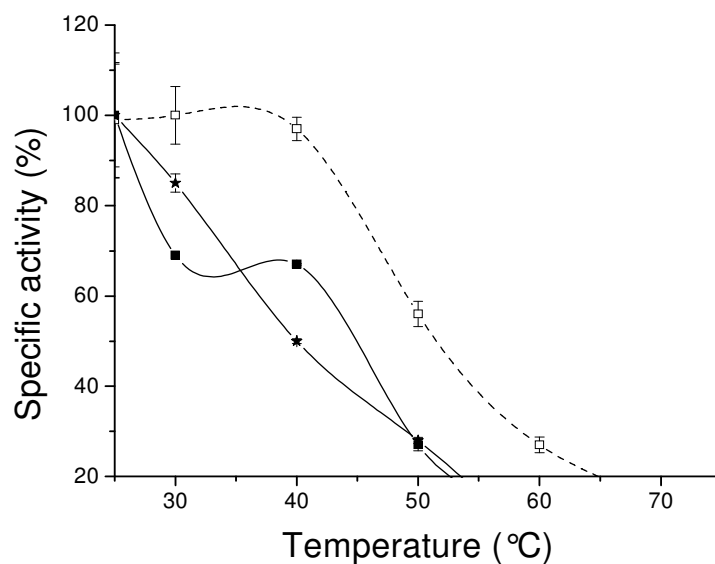


Fig. 5. Thermal stability of soluble trypsin (—■—), immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles (---□---) and immobilized trypsin on uncoated magnetite (—★—). Assay: 10 mg of magnetic immobilized and 30 μ L soluble (6.0 μ g) trypsin were incubated in temperature differentials (25–70°C) for 30 min. Thereafter were incubated with 4 mM BAPNA and 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 buffer at 25°C and shaken for 15 min. The absorbance of formed product was measured at 405 nm. The obtained activities were referred to the highest activity (100%) for immobilized and soluble enzyme.

Table 1. Kinetic parameters for soluble and immobilized trypsin on levan-coated magnetite particles.

Trypsin	K_m (mM)	V_{max} (10^{-3} $\mu\text{mol/min}$)
Soluble	0.528 ± 0.268	6.617 ± 2.120
Immobilized	0.257 ± 0.040	9.506 ± 0.650

*Reactions were in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 at 25°C with substrate (BAPNA) concentrations ranging from 0.03 – 0.6 mM.

7. ANEXOS

7.1. Instruções para autores

JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS

Guide for Authors

Submission of papers

Authors are encouraged to submit their papers using the Journal of Magnetism and Magnetic Materials online submission tool. Alternatively authors can submit by sending their manuscripts (one original + two copies), to one of the Editors. Papers for the section *Information Storage: Basic and Applied* should be submitted to R.W. Chantrell. *Letters to the Editor* should not exceed six pages when printed and will be given priority in both the refereeing and production processes. The faster production schedule may preclude sending proofs of letters to authors. *Original material*: Submission of a manuscript implies it is not being simultaneously considered for publication elsewhere and that the authors have obtained the necessary authority for publication.

Manuscript preparation

All manuscripts should be written in good English. The paper copies of the text should be prepared with double line spacing and wide margins, on numbered sheets. See notes opposite on the electronic version of manuscripts. *Structure*. Please adhere to the following order of presentation: Article title, Author(s), Affiliation(s), Abstract, PACS codes and keywords, Main text, Acknowledgements, Appendices, References, Figure captions, Tables. *Corresponding author*. The name, complete postal address, telephone and fax numbers and the e-mail address of the corresponding author should be given on the first page of the manuscript. *PACS codes/keywords*. Please supply one or more relevant PACS-1996 classification codes and about 5 keywords of your own choice for indexing purposes. *References*. References to other work should be consecutively numbered in the text using square brackets and listed by number in the Reference list. Please refer to recent issues for examples.

Illustrations

Illustrations should also be submitted in triplicate: one master set and two sets of copies. The *line drawings* in the master set should be original laser printer or plotter output or drawn in black india ink, with careful lettering, large enough (3-5 mm) to remain legible after reduction for printing. The *photographs* should be originals, with somewhat more contrast than is required in the printed version. They should be unmounted unless part of a composite figure. Any scale markers should be inserted on the photograph itself, not drawn below it. *Colour plates*. Figures may be published in colour, if this is judged essential by the Editor. The Publisher and the author will each bear part of the extra costs involved. Further information is available from the Publisher.

After acceptance

Notification. You will be notified by the Editor of the journal of the acceptance of your article and invited to supply an electronic version of the accepted text, if this is not already available. *Copyright transfer*. In the course of the production process you will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Electronic manuscripts

The Publisher heartily welcomes the receipt of an electronic version of your accepted manuscript. If there is not already a copy of this (on diskette) with the Journal Editor at the time the manuscript is being refereed, you will be asked to send a file with the text of the accepted manuscript directly to the Publisher by e-mail or on diskette to the address given below. (When e-mailing a non-ASCII word-processor file, you should encode it, e.g. with Uuencode or BinHex, so as to retain all formatting codes.) The name and version of the word-processing program and the type of operating system should always be indicated. Please note that no deviations from the version accepted by the Editor of the journal are permissible without the prior and explicit approval by the Editor. Such changes should be clearly indicated on an accompanying printout of the file.

Author benefits

No page charges. Publishing in the *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* is free. *Free offprints.* The corresponding author will receive 25 offprints free of charge. An offprint order form will be supplied by the Publisher for ordering any additional paid offprints. *Discount.* Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books.

PROCESS BIOCHEMISTRY

Guide for Authors

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles. Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; downstream processing; modeling, optimization and control techniques.

Submission of manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/prbi/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least two independent referees (up to five, outside their own institution) with their email addresses. But, the selection of the referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by two referees. Manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by one editor, generally it should not be resubmitted to another editor in its original version, and should be, unless specific problem, resubmitted after appropriate modifications, to the same editor. It is up to the discretion of the editors to reconsider such revised manuscripts as new

submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a revised manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press. Format and type of manuscripts Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: the first page includes the title, the authors' first and last names [with the corresponding author indicated by an asterisk*], addresses [with a superscript letter to indicate a different address], and corresponding author's fax and email; the second page includes the abstract and six key words; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), and References. Tables and figures are included after References with a separate page for each. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should then clearly motivate the reasons of the accelerated way in the cover letter.

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Colour illustrations in the print version are reproduced at the author's expense. The publisher will provide the author with a cost estimate upon receipt of the accepted paper. Colour illustrations in the online version are always at no cost to the authors.

References: References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications AND WEBSITE ADDRESSES should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494

[3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.

[4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.

[5] Curtin CD. Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.

[6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. *Jpn. Patent*. JP 05260-966. 92.03.24.

[7] Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.

[8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing :

For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information.

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript

will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at the prices shown on the price list which will be sent by the publisher to the author together with the offprint order form upon receipt of the accepted manuscript.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal homepage at <http://www.elsevier.com/locate/prbi>. The journal homepage also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Online manuscript tracking

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature. For more information, visit <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Process Biochemistry has no page charges.

2. Trabalhos apresentados em congressos

III Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – RN – 2006 e 3rd International Symposium in Biochemistry and Biotechnology
LEVAN-MAGNETITE COMPOSITE PARTICLES AS SUPPORT FOR ENZYME IMMOBILIZATION

Maciel, J.C.; Amaral, I.P.G.; Oliveira, G.B.; Calazans, G.M.T.; Carvalho Jr., L.B.; Silva, M.P.C.

XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – BA – 2007

UTILIZATION OF FUCAN-MAGNETITE COMPOSITES FOR IMMOBILIZATION OF MILK CLOTTING ENZYMES

Silva, V.A.J.; Maciel, J.C.; Filho, J.L.L.; Silva, M.P.C.

II Reunião Regional da FeSBE – PE – 2007

PURIFICAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE COAGULANTE DE QUIMOSINA DE FONTE MICROBIANA (HA-LA)

Silva, V.A.J.; Maciel, J.C.; Soares, M.T.C.V.; Lima Filho, J.L.; Silva, M.P.C.

II Reunião Regional da FeSBE – PE – 2007

INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ENZIMAS COAGULADORAS DO LEITE.

Silva, V.A.J.; Maciel, J.C.; Filho, J.L.L.; Silva, M.P.C.

VI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – RN – 2007

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LEVAN-COATED MAGNETITE PARTICLES

Maciel, J.C.; Andrade, P.L.; Calazans, G.M.T.; Aguiar, J.A.; Silva, M.P.C.

Process Biochemistry, 42 (2007) 429 – 433

IMMOBILIZATION OF UREASE ON VAPOUR PHASE STAIN ETCHED POROUS SILICON

Maia, M.M.D.; Vasconcelos, E.A.; Maia, P.F.C.D.; Maciel, J.C.; Cajueiro, K.R.R.; Silva, M.P.C.; Silva Jr., E.F.; Dutra, R.A.F.; Freire, V.N.; Lima Filho, J.L.