

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
VEGETAL E BIOPROCESSOS

IGOR NUNES TAVEIRA



Cultivo em batelada de *Magnetofaba australis* cepa IT-1 e aplicação de suas nanopartículas magnéticas de origem biológica: separação magnética de microalgas e base estrutural da degradação do corante azul de metila

RIO DE JANEIRO

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

IGOR NUNES TAVEIRA



Cultivo em batelada de *Magnetofaba australis* cepa IT-1 e aplicação de suas nanopartículas magnéticas de origem biológica: separação magnética de microalgas e base estrutural da degradação do corante azul de metila



Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, pertencente ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos).

Orientadora: Profa. Fernanda de Ávila Abreu

RIO DE JANEIRO

JANEIRO DE 2024

CIP - Catalogação na Publicação

T232d Taveira, Igor Nunes Cultivo em batelada de Magnetofaba australis cepa IT-1 e aplicação de suas nanopartículas magnéticas de origem biológica: separação magnética de microalgas e base estrutural da degradação do corante azul de metila/ Igor Nunes Taveira. -- Rio de Janeiro, 2021.
328 f.

Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, 2023.

1. azul de metila. 2. bactérias magnetotáticas. 3. floculação e separação magnética. 4. microalgas. 5. nanopartículas magnéticas de origem biológica. I. Abreu, Fernanda de Ávila, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE IGOR NUNES TAVEIRA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).

Aos trinta e um dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às 09 horas, reuniu-se no Anfiteatro do Instituto de Microbiologia Paulo Góes – Bloco I do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a Banca Examinadora abaixo discriminada para avaliação da Tese de Doutorado do aluno **Igor Nunes Taveira** intitulada "Cultivo em batelada de *Magnetofaba australis* cepa IT-1 e aplicação de suas nanopartículas magnéticas de origem biológica: separação magnética de microalgas e base estrutural da degradação do corante azul de metila", desenvolvida sob a orientação da Prof^a. **Fernanda de Ávila Abreu**. A apresentação feita pelo candidato foi acompanhada da arguição pelos componentes da Banca. Em seguida, esta se reuniu para sua avaliação e a defesa foi considerada (A) (inserir letra apropriada).

- A) Aprovado;
- B) Aprovado com pequenas modificações* a serem combinadas com o Presidente da Banca dentro de um mês;
- C) Não aprovado ainda, é necessária a apresentação das modificações/correções* em uma nova versão do documento para o Presidente da Banca e uma carta do Presidente com prazo de máximo 3 meses para ser aprovada; se não reprovada
- D) Não aprovado ainda, é necessária uma nova apresentação*, oral e escrita, para a mesma ou nova banca examinadora dentro de um prazo combinado com a comissão do Programa.
- E) Reprovado, razões da reprovação* escritas no espaço destinado.

*As modificações/correções/razões para reprovação precisam ser discriminadas e o Presidente da Banca e o(a) aluno(a) precisam estar cientes.

E, para constar, foi lavrada a presente ata que vai devidamente assinada pelo coordenador, pelos membros da Banca Examinadora, pelo Presidente da Banca Examinadora e pelo orientador do aluno, que ficará com uma via da ata e entregará outra para a secretaria do PBV.

Rio de Janeiro, 31 de janeiro de 2024.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE IGOR NUNES TAVEIRA COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
(BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).



Documento assinado digitalmente
BIANCA ORTIZ DA SILVA
Data: 02/02/2024 14:04:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Bianca Ortiz da Silva – Coordenadora

Dr^a. Lucy Seldin – PBV/UFRJ

Dr^a. Fernanda de Ávila Abreu – PBV/UFRJ

Dr^a. Dirlei Nico – IMPG/UFRJ

Dr. Anderson de Sá Pinheiro – IQ/UFRJ

Dr. André Linhares Rossi - CBPF

Dr^a. Fernanda de Ávila Abreu (Orientadora)

Igor Nunes Taveira (Doutorando)

LISTA DE MODIFICAÇÕES, CORREÇÕES OU RAZÕES PARA REPROVAÇÕES:

Ciente,

Ciente,

Presidente da Banca

Aluno

Resumo

Taveira, Igor Nunes. Cultivo em batelada de *Magnetofaba australis* cepa IT-1 e aplicação de suas nanopartículas magnéticas de origem biológica: separação magnética de microalgas e base estrutural da degradação do corante azul de metila. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2023.

Bactérias magnetotáticas (BMs) são procariotos Gram-negativos, aquáticos, flagelados, microaerófilos ou anaeróbios e filogeneticamente diversos. A assinatura estrutural deste grupo é o controle genético altamente regulado sobre a biomineralização de magnetossomos, que são compostos por um núcleo ferrimagnético de magnetita — *i.e.*, $\text{Fe(II)Fe}_2\text{(III)O}_4$ — ou greigita — *i.e.*, $\text{Fe(II)Fe}_2\text{(III)S}_4$ — envolto por membrana biológica com proteínas transmembrana espécie-específica. Magnetossomos têm sido empregados em Biotecnologia como nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs) devido às propriedades desejáveis destas nanopartículas, como presença de revestimento fosfolipídico, proteínas de membrana, boa dispersibilidade em meio aquoso, estabilidade térmica, perfeição cristalográfica, pureza química, forma e tamanho bem definidos, entre outros. Logo, o estudo e possibilidade de produção de uma variedade de NMOBs oriundas de diferentes BMs com propriedades ainda inexploradas é de grande importância para a Nanotecnologia. Nesse sentido, foi realizado o cultivo em batelada simples de *Mf. australis* cepa IT-1 sob microaerofilia (dO₂ 2,0%) em biorreator de bancada de 10 L. A partir do monitoramento do cultivo foi observado: (i) o tempo de geração de 6 h e 52 min \pm 3 h e 20 min; (ii) a chegada à fase estacionária no 5º dia, atingindo densidade celular de $3,18 \pm 2,05 \cdot 10^8$ células \cdot mL⁻¹; (iii) a maior taxa de crescimento e produtividade ($12,13 \pm 6,17$ Fe₃O₄ mg \cdot L⁻¹ \cdot dia⁻¹) concomitante ao maior consumo de Fe²⁺, NH₄⁺ e dO₂% nas primeiras 24 h; (iv) a liberação de Fe²⁺ e NH₄⁺ após a fase estacionária e alteração morfológica nas células (*i.e.*, redução de tamanho, arredondamento e ausência de NMOBs). Em seguida, as NMOBs negativamente carregadas de *Mf. australis* cepa IT-1 foram utilizadas em ensaios de separação magnética de microalgas suspensas em tampão citrato, objetivando-se a protonação da superfície das células, dado que estas espécies são de importância comercial para a produção de biodiesel de 3ª geração. Em condição de pH 3,1, foi possível flocular e separar magneticamente até $80,08 \pm 2,08\%$ e $75,26 \pm 2,45\%$ da biomassa de *Scenedesmus* sp. e *Desmodesmus* sp., respectivamente, dado o efeito pH-dependente. NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T foram utilizadas para validação do ensaio, obtendo $82,03 \pm$

6,55% de taxa de recuperação para *Scenedesmus* sp. em pH 3,1. As NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T também apresentaram boa taxa de recuperação (52,08%) quando desafiadas em condição hipersalina (40 g NaCl · L⁻¹) em pH 3,1 para a espécie *Nannochloropsis* sp., condição na qual nanopartículas de magnetita sintética e floculantes se mostram ineficazes na etapa de coleta da biomassa. Além disso, foi proposto que a degradação do corante azul de metila, efluente de alto impacto ecotoxicológico e de baixo percentual de detoxificação pela indústria têxtil, é relacionada ao domínio redutase, alocado entre $\alpha 17$ e $\alpha 22$, da proteína MamZ de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, dada a melhor pontuação de energia de interação (-9,6 kcal · mol⁻¹). É sugerido que dentre os oito resíduos do sítio de interação, quatro são conservados (S479, R483, W568 e H572) e que o sítio em MamZ de *Mf. australis* cepa IT-1 apresenta a manutenção de classe de três dos quatro aminoácidos alterados em relação à cepa MV-1^T (R573K, I575N, R573K, F618Y e T621S). Além disso, é sugerido que os resíduos conservados R483 e F618 e alteração de mesma classe em T621K compõe a área acessível ao solvente responsável pelo estabelecimento das primeiras interações intermoleculares, sendo composta por duas ligações de hidrogênio e uma ponte salina. Em suma, o desenvolvimento de bioprocessos para o cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 pavimenta estudos futuros relacionados à otimização da produtividade de magnetita bem como estabelece o primeiro bioprocessos nacional para produção de NMOBs, além promover nanoferramenta capaz de separar magneticamente microalgas utilizadas na produção de biodiesel e, somado isso, o entendimento da base molecular da degradação do corante azul de metila pode auxiliar em próximos estudos que estudem o potencial catalítico pouco caracterizado das proteínas transmembrana de NMOBs.

Palavras-chave: azul de metila; biocatálise; bactérias magnetotáticas; *Magnetofaba australis* cepa IT-1; microalgas; nanopartículas magnéticas de origem biológica; separação magnética; proteína MamZ.

Abstract

Taveira, Igor Nunes. Batch culturing of *Magnetofaba australis* strain IT-1 and application of its bacterial magnets: microalgae magnetic separation and structural basis of methyl blue dye degradation. Thesis (PhD at Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2023.

Magnetotactic bacteria (MTB) are Gram-negative, aquatic, flagellated, microaerophilic, or anaerobic prokaryotes that are phylogenetically diverse. The structural signature of this group is the genetically controlled process of biomineralization of magnetosomes, which are composed of a ferrimagnetic core of magnetite — *i.e.*, $\text{Fe(II)Fe}_2\text{(III)O}_4$ — or greigite — *i.e.*, $\text{Fe(II)Fe}_2\text{(III)S}_4$ — surrounded by a biological membrane with species-specific transmembrane proteins. Magnetosomes have been employed in biotechnology as bacterial magnets (BMs) due to their desirable properties, such as a phospholipid coating, membrane proteins, good dispersibility in aqueous media, thermal stability, crystallographic perfection, chemical purity, and well-defined shape and size, among others. Therefore, increasing the diversity of BMs derived from different MTBs with unexplored properties is very important for Nanotechnology. In this context, batch cultivation of *Magnetofaba australis* strain IT-1 was conducted under microaerophilic conditions (dO_2 2.0%) in a 10 L bioreactor. From the cultivation monitoring, the following observations were made: (i) a generation time of 6h and 52 min \pm 3h and 20 min; (ii) cells reached stationary phase on the 5th day, reaching a cell density of $3.18 \pm 2.05 \cdot 10^8$ cells \cdot mL⁻¹; (iii) the highest growth rate and productivity (12.13 ± 6.17 Fe₃O₄ mg \cdot L⁻¹ \cdot day⁻¹) concomitant with the highest consumption of Fe²⁺, NH₄⁺, and dO₂% in the first 24h; (iv) release of Fe²⁺ and NH₄⁺ after the stationary phase and morphological changes in cells (*i.e.*, size reduction, rounding, and absence of BMs). Subsequently, the negatively charged BMs from *Mf. australis* strain IT-1 were used in flocculation and magnetic separation assays of suspended microalgae in citrate buffer, aiming to protonate the cell surface, as these species are commercially important for third-generation biodiesel production. At pH 3.1, it was possible to flocculate and magnetically separate up to $80.08 \pm 2.08\%$ and $75.26 \pm 2.45\%$ of *Scenedesmus* sp. and *Desmodesmus* sp. biomass, respectively, due to the pH-dependent effect. BMs from *Mv. blakemorei* strain MV-1^T were used to validate the assay, achieving a recovery rate of $82.03 \pm 6.55\%$ for *Scenedesmus* sp. at pH 3.1. BMs also showed a good recovery rate (52.08%) when challenged under hypersaline conditions (40 g NaCl \cdot L⁻¹) at pH 3.1 for *Nannochloropsis* sp., a condition where synthetic magnetite nanoparticles and flocculants are ineffective in biomass

harvesting. Additionally, it was proposed that the degradation of methyl blue dye, a highly ecotoxicological and low-detoxification percentage dye from the textile industry, is related to the reductase domain, located between $\alpha 17$ and $\alpha 22$, of the MamZ protein from *Mv. blakemorei* strain MV-1^T, given the best interaction energy score (-9.6 kcal · mol⁻¹). It is suggested that among the 8 residues in the interaction site, 4 of these (S479, R483, W568, and H572) are conserved, and that the MamZ site in *Mf. australis* strain IT-1 maintains the class of 3 of the 4 altered amino acids (R573K, I575N, R573K, F618Y, and T621S). Furthermore, it is suggested that the conserved residues R483 and F618, and the same-class alteration at T621K, make up the solvent-accessible area responsible for establishing the first intermolecular interactions, comprising 2 hydrogen bonds and 1 salt bridge. In summary, the development of a bioprocess for the cultivation of *Mf. australis* strain IT-1 paves the way for future studies related to the optimization of magnetite productivity, establishes the first national bioprocess for the production of BMs, and promotes a nanotool capable of flocculating and magnetically separating microalgae used in biodiesel production. Moreover, understanding the molecular basis of methyl blue dye degradation may assist future studies exploring the little-characterized catalytic potential of transmembrane proteins from BMs.

Keywords: bacterial magnets; biocatalysis; magnetic separation; *Magnetofaba australis* strain IT-1; magnetotactic bacteria; MamZ protein; methyl blue; microalgae.

Dedicatória

À minha esposa Camila, por tudo e por tanto.
O amor é para quem tem coragem.

Agradecimentos

Ninguém faz nada sozinho, disso eu tenho certeza. Talvez meu maior aprendizado nos últimos anos tenha sido esse. Logo, tudo que eu pude conquistar foi devido ao sacrifício de muita gente que batalhou junto comigo essa caminhada e se frustrou a cada fracasso e reprovação até aqui. Hoje, após o passar dos anos, fico feliz por ter errado e fracassado bastante. Esses erros me tornaram quem eu sou. E, àqueles que me acompanharam até aqui, meus mais sinceros agradecimentos.

Portanto, em primeiro lugar, agradeço à minha mãe Denise e ao meu pai Alberto que não mediram esforços para que eu tivesse tudo que eles não tiveram. São exemplos de caráter, dedicação e trabalho duro que vou levar para minha vida. Se hoje estou aqui é por causa de muito sacrifício deles. Obrigado por tudo.

À minha vó Maria Helena pela minha criação e pelas boas memórias que vou guardar comigo para sempre. Não tem um dia que passa que eu não penso em você. Se estivesse em vida hoje em dia com certeza ficaria muito feliz com essa conquista. Ela é nossa.

À minha esposa Camila, por tudo e por tanto. Entre os encontros e desencontros que a vida nos proporcionou a gente lutou muito para chegar até aqui. Obrigado por acreditar em mim e em nós, por ser meu porto-seguro durante todas as tempestades e por ser o meu lar no mundo. Obrigado por chorar comigo em cada reprovação e não ter deixado eu desistir quando às vezes era impossível ver um novo horizonte. Eu amo você.

Ao meu tio avô Luís e ao meu avô Ary pelo carinho que sempre tiveram comigo, e à minha tia avó Maria pelas inúmeras risadas e conselhos. Vocês fazem falta nessa vida.

À minha prima Juliana e sua mãe Lucemir que cuidaram de mim quando era pequeno. Só tenho a agradecer por tudo que fizeram para que eu me tornasse o homem que sou hoje. Ao meu tio Ugo por me ensinar que o esporte salva vidas através da disciplina e respeito ao próximo.

À minha orientadora Fernanda, por ser referência não só como profissional, mas como pessoa. Fico feliz por toda confiança depositada em mim e pela liberdade de me deixar livre para dar vida aos meus sonhos na ciência. Obrigado por ser minha maior referência e pelo privilégio de trabalhar com você.

Agradeço aos colegas e às amígadas que fiz no LabMax durante esses anos dedicados a essa vida. Em especial a Tarcísio, Dirlei, Jefferson e Juliana, por me ensinarem que ter humildade é essencial para desempenhar uma função de alta competência. Não basta ser bom apenas, é preciso ser humano também. Obrigado por serem referências que eu quero seguir.

Ao meu compadre Felipe, por ser meu irmão de vida e por ter me proporcionado a honra de ser o padrinho do seu filho. Que honra a minha ter você em minha vida. Muito obrigado por todo companheirismo, pelas inúmeras “fobias” e pelo exemplo de integridade.

Aos meus amigos Biel, João, Pedro, Jorge, Eric e Julinha que estiveram comigo durante a maior parte da minha vida e em todas as aventuras de montanha. Com vocês a caminhada se tornou mais leve. Vocês fazem parte dessa história.

Aos amigos que fiz aqui no Fundão: Bruno, Isadora e Carolzinha. A amizade de vocês tornou os dias aqui bem mais fáceis. Obrigado por embarcarem nessa jornada comigo. E para o Bruno e Isadora que enfrentaram a vida acadêmica: qualquer dia vocês vão ser professores e pesquisadores aqui na UFRJ, é só dar tempo ao tempo.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPERJ pelo fomento à pesquisa.

Agradeço a UFRJ e ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes. Sou grato pela utilização de toda infraestrutura bem como o apoio de todo o corpo docente e técnico do Instituto de Microbiologia. Aqui fiz bons amigos e me sinto em casa. Quem sabe o futuro não está a reservar uma última surpresa.

Agradeço a UNIMICRO, ao CBPF, e ao CENABIO por toda infraestrutura e apoio técnico obtenção das imagens de microscopia.

Lista de abreviaturas

ANOVA: Análise de variância

a_s : área de superfície

ASA: área de superfície acessível, do inglês *accessible surface area*

ASW: água do mar artificial, do inglês *artificial seawater*

BMs: bactérias magnetotáticas

BM \times : quantidade equivalente para o cultivo de BMs

\vec{B}_T : campo magnético da Terra

C : coercividade

CNPE: Conselho Nacional de Política Energética

DIC: contraste interferencial diferencial, do inglês *differential interference contrast*

DO: densidade óptica

ΔG : Energia livre de Gibbs

dO₂%: saturação de O₂ dissolvido

EDS: espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, do inglês *energy dispersive X-ray spectroscopy*

FAN: nitrogênio amínico livre, do inglês *free aminic nitrogen*

FRS: do inglês *ferric reductase superfamily*

GMQE: do inglês *global model quality estimate*

\vec{H} : campo magnético externo

H-bonds: ligações de hidrogênio, do inglês *Hydrogen bonds*

$k_L a$: coeficiente de transferência de massa

\vec{m} : magnéticos internos do material

\vec{m}_r : momento magnético resultante

\vec{M} : magnetização

MAGs: genomas montados por metagenômica, do inglês *metagenome-assembled genome*

mam: do inglês *magnetosome membrane*

m_{cel} : massa magnetita média por célula

MFS: do inglês *major facilitator superfamily*

MGCs: agrupamento de genes do magnetossomo, do inglês *magnetosome gene cluster*

MMOs: Microrganismos magnetotáticos

MMPs: procariotos multicelulares magnetotáticos, do inglês *magnetotactic multicellular prokaryotes*

mms: do inglês *magnetic particle membrane specific*

m_{NMOB} : massa magnetita média por cada unidade de NMOB

μ : taxa de crescimento celular

NGSs: sequenciamento de última geração, do inglês *next generation sequencing*

NMOBs: nanopartículas magnéticas de origem biológica

NPs: nanopartículas

NPMs: nanopartículas magnéticas

NPMSs: nanopartículas de magnetita sintética

OTUs: unidades taxonômicas operacionais, do inglês *operational taxonomic units*

PBE: equação de Poisson- Boltzmann, do inglês *Poisson- Boltzmann equation*

$P_{desordem}$: probabilidade de desordem

pI: ponto isoelétrico, do inglês *isoelectric point*

PLL: poli-L-lisina

pLDDT: do inglês *predicted local distance difference test*

PLIP: do inglês *Protein-Ligand Interaction Profiler*

PNPB: Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

(p)ppGpp: pentafofato de guanosina

ppGpp: tetrafofato de guanosina

PTFE: politetrafluoroetileno

QMEANDisCo: do inglês *Qualitative Model Energy ANalysis with Distance Constraints*

R: remanência

RMSD: raiz quadrada do desvio quadrático médio, do inglês, *root mean square deviation*

RSA: acessibilidade relativa do solvente, do inglês *relative solvent accessibility*

S: saturação

SAS, superfície acessível ao solvente, do inglês *solvent-accessible surface*

STEM-HAADF: microscopia eletrônica de transmissão em modo varredura em campo escuro com detector anular de alto ângulo, do inglês *scanning transmission electron microscopy at high-angle annular dark-field*

TAGs: triacilgliceróis

TEM: microscopia eletrônica de transmissão, do inglês *transmission electron microscopy*

χ : permeabilidade magnética relativa

v: volume

Lista de figuras

Figura 1. Diversidade morfológica de BMs..	3
Figura 2. Modelos de absorção de Fe em BMs.	5
Figura 3. Modelo de invaginação da membrana do magnetossomo e recrutamento de proteínas..	5
Figura 4. Nanopartículas magnéticas: produção global e setorização.....	7
Figura 5. Diferença morfológica entre NMOBs e NPMSs observadas em TEM..	7
Figura 6. Representação do magnetossomo com possíveis funcionalizações e aplicações descritas na literatura.	9
Figura 7. Número de publicações por área que envolvem o uso de NMOBs..	10
Figura 8. Classificação e exemplificação da resposta de magnetização de diferentes classes materiais.	11
Figura 9. Domínios magnéticos distribuídos pelo tamanho da partícula e fator de forma.....	14
Figura 10. Curva de histerese de NPMs..	16
Figura 11. <i>Pipeline</i> de produção de biodiesel de 3ª geração a partir da extração de lipídeos neutros de microalgas.	19
Figura 12. Características desejáveis de microalgas utilizadas na produção de biodiesel..	20
Figura 13. Impacto ecotoxicológico do despejo de efluentes não tratados em corpos hídricos.	23
Figura 14. Funcionalizações propostas em NPs para remoção de corantes em corpos hídricos..	24
Figura 15. Propagação do inóculo de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	47
Figura 16. Indicação do monitoramento de parâmetros avaliados durante o bioprocessamento, numerados de 1 a 10..	48
Figura 17. Cálculo de transferência de massa de gases sobre diferentes agitações.	49
Figura 18. Monitoramento do crescimento celular, consumo de Fe^{2+} e produção e produtividade de magnetita.....	50
Figura 19. Caracterização morfológica da célula, de suas NMOBs e dimensões da NP..	52
Figura 20. Potencial Zeta em mV das NMOBs octaédricas alongadas extraídas de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1. As NMOBs apresentaram potencial zeta de $-20,93 \pm 1,01$ mV ($n=10$).....	53
Figura 21. Observação do comportamento magnetotático e morfologia cocóide-ovoide da BM <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 por microscopia óptica em DIC.....	55

Figura 22. Parâmetros morfológicos durante o cultivo, em que F_{log} representa o dia 1 e F_{est} o dia 5 ($n=100$ em cada condição).	56
Figura 23. Controle de qualidade das NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	58
Figura 24. Impacto morfológico sobre <i>Scenedesmus</i> sp. observado em DIC a partir das diferentes fontes de ferro e suas concentrações.....	59
Figura 25. Efeito da fonte e da concentração de Ferro sobre o diâmetro médio em <i>Scenedesmus</i> sp ($n=300$).	60
Figura 26. Efeito da fonte e da concentração de Ferro sobre o fator de forma em <i>Scenedesmus</i> sp ($n=300$).	60
Figura 27. Impacto morfológico sobre <i>Monoraphidium</i> sp. observado em DIC a partir das diferentes fontes de ferro e suas concentrações.....	61
Figura 28. Estabelecimento da taxa de crescimento em diferentes valores de pH.....	62
Figura 29. Modulação do teor de lipídeos neutros em condições de alteração de pH e concentração de Fe^{3+} disponível no meio ao longo do intervalo de 7 dias (t_0-t_F).	63
Figura 30. Taxa de recuperação magnética das espécies de microalgas utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	65
Figura 31. Taxa de recuperação magnética das espécies de microalgas utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 com resposta pH-dependente.....	66
Figura 32. Observação em DIC da resposta de floculação e concentração magnética de <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	67
Figura 33. Observação da resposta de floculação e concentração magnética de <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	68
Figura 34. Observação em DIC da resposta de floculação e concentração magnética de <i>Monoraphidium</i> sp. utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	68
Figura 35. Validação do ensaio de recuperação magnética para NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T ..	69
Figura 36. Caracterização em TEM e taxa de recuperação magnética das espécies de microalgas utilizando NPSs de Fe_3O_4	70
Figura 37. Observação da resposta de floculação e concentração magnética de <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando NPSs de Fe_3O_4	71
Figura 38. Desafio inicial sobre taxa de recuperação de microalgas do gênero <i>Nannochloropsis</i> sp. utilizando NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T , NPSs de Fe_3O_4 e floculante catiônico	72

Figura 39. Superfície de resposta da taxa de recuperação de <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando NMOBs variando as condições de pH e concentração de NaCl.....	73
Figura 40. Superfície de resposta da taxa de recuperação de <i>Nannochloropsis</i> sp. utilizando NMOBs variando as condições de pH e concentração de NaCl.....	75
Figura 41. Observação da flocculação e separação magnética após o desafio de <i>Nannochloropsis</i> em condições de salinidade crescente e pH fixado em 3,1.....	76
Figura 42. Impacto da alteração da concentração de NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T sobre a taxa de recuperação celular.	77
Figura 43. Modelagem molecular da proteína MamZ baseada na sequência de aminoácidos.	80
Figura 44. Base molecular <i>in silico</i> da interação do corante azul de metila com a proteína MamZ de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	81
Figura 45. Rede de interações intermoleculares do corante azul de metila com sítio de interação em MamZ..	82
Figura 46. Alinhamento da sequência de MamZ pertencente a <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T em relação a outras BMs cujas NMOBs podem ser utilizadas em biotecnologia, <i>i.e.</i> , <i>Mf. australis</i> cepa IT-1, <i>Ms.</i> cepa MSR-1 e cepa AMB-1.	84
Figura 47. Alinhamento estrutural do sítio de docagem referente às proteínas MamZ de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T (verde) e <i>Ms. magneticum</i> cepa AMB-1 (amarelo).	85
Figura 48. Alinhamento estrutural do sítio de docagem referente às proteínas MamZ de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T (verde) e <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 (rosa).....	86
Figura 49. Curva de solubilidade de gases em água de acordo com a temperatura.	91
Figura 50. Biomineralização de magnetossomos em <i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1.	94
Figura 51. Arquitetura do MGC em <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	96
Figura 52. Imagens obtidas em STEM-HAADF e mapa de elementos por EDS da cadeia de NMOBs de células de cultura de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 exibindo o acúmulo de ferro na matriz magnetossomal.	98
Figura 53. Desprotonação e constante de dissociação de ácidos em escala logarítmica (<i>pKa</i>) do ácido cítrico	100
Figura 54. Exemplo de revestimento sintético com o polímero catiônico quitosana e o agente de ligação cruzada Pluronic F-127 realizado em pH 9 sobre NPMSs. Figura retirada de Bae <i>et al.</i> (2008).	103
Figura 55. Estrutura química e padrão de absorvância do corante azul de metila.	106

Figura 56. Cinética da concentração de corante ao longo de tratamentos de 10 minutos.....	106
Figura 57. Imagem relativa ao espessamento de membrana de NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T de realizadas em TEM durante os ciclos de reuso das NPs.	107

Lista de tabelas

Tabela 1. Componentes da água do mar artificial.	32
Tabela 2. Componentes do meio semissólido para cultivo de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	32
Tabela 3. Componentes da solução de minerais.	33
Tabela 4. Componentes da solução de vitaminas.	33
Tabela 5. Qualidade do ajuste de regressão quadrática pelo valor de R^2	66
Tabela 6. Qualidade do ajuste de regressão quadrática pelo valor de R^2	70
Tabela 7. Características gerais das proteínas de membrana de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	78
Tabela 8. <i>Score</i> da interação proteína-ligante para o <i>docking</i> molecular do corante azul de metila e as proteínas de membrana das NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	80
Tabela 9. Espécies de BMs utilizadas em cultivo de larga escala descritos na literatura com seus respectivos valores de produção e produtividade de Fe_3O_4 . Adaptado de Correa (2021).	90

Lista de equações

Equação 1. Taxa de crescimento microbiano.....	35
Equação 2. Número de gerações (n).	35
Equação 3. Tempo de geração (g).....	35
Equação 4. Determinação da concentração de nitrogênio disponível no meio durante a batelada.	36
Equação 5. Cálculo da área de superfície da NMOB.	38
Equação 6. Cálculo do volume de magnetita da NMOB.....	38
Equação 7. Cálculo de massa de magnetita média por cada unidade de NMOB ($mNMOB$). 38	
Equação 8. Cálculo da massa de magnetita média por célula ($mccl$).....	38
Equação 9. Transferência de massa de gases (N_2 e O_2).	39
Equação 10. Polinômio do segundo grau utilizado para cálculo dos coeficientes e ajuste do modelo.	43
Equação 11. Modelo do polinômio com os coeficientes calculados que representa a superfície de resposta da taxa de recuperação para <i>Scenedesmus</i> sp.	73
Equação 12. Modelo do polinômio com os coeficientes calculados que representa a superfície de resposta da taxa de recuperação para <i>Nannochloropsis</i> sp.	74

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Microrganismos magnetotáticos	1
1.2. Biomineralização dos magnetossomos: genes e proteínas envolvidas no processo ..	3
1.4 Nanopartículas magnéticas em Biotecnologia	6
1.4.1 Propriedades de magnetização e dispersibilidade das nanopartículas magnéticas	11
1.2. Microalgas: importância biotecnológica na produção de biocombustíveis	17
1.3. Despejo e tratamento de efluentes da indústria têxtil: contexto atual e desenvolvimento de novas tecnologias	21
2. Justificativa	26
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
3.2.1. Caracterização do cultivo em batelada da BM <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e da produção de NMOBs octaédricas alongadas	29
3.2.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1^T	30
3.2.2. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1^T	30
4. Metodologia	32
4.1. Caracterização do cultivo da BM <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 em batelada e da produção de NMOBs octaédricas alongadas	32
4.1.1. Propagação do inóculo em meio semissólido heterotrófico com gradiente de O₂	32
4.1.2. Confeção do meio do biorreator e controle de parâmetros durante o bioprocessamento	33
4.1.3. Monitoramento do crescimento celular	34
4.1.4. Quantificação do consumo de nutrientes	35
4.1.5. Monitoramento das características morfológicas por DIC e TEM	36
4.1.6. Extração e purificação de NMOBs	37
4.1.6. Caracterização e controle de qualidade de NMOBs por TEM e potencial zeta	37
4.1.7. Determinação da transferência de massa dos gases N₂ e O₂	38
4.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1^T	39

4.2.1. Obtenção e controle de qualidade de NMOBs BMs <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	39
4.2.2. Caracterização do impacto da alteração de pH e da concentração de ferro no cultivo, nos parâmetros morfológicos de microalgas e no acúmulo de lipídeos neutros	40
4.2.3. Ensaio de separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T com variação de pH em tampão citrato	41
4.2.4. Desafio do ensaio de separação magnética utilizando NPMSs	42
4.2.5. Construção de superfície de resposta da separação magnética de microalgas variando condições de pH e salinidade	42
4.2.6. Avaliação do impacto da concentração de NMOBs sob a taxa de recuperação celular e desafio contra NPMSs e flocculante catiônico	43
4.3. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	44
4.3.1. Modelagem molecular de proteínas de membrana de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	44
4.3.2. Interação proteína-ligante por <i>docking</i> molecular e afinidade de ligação	45
4.3.3. Comparação estrutural do sítio de docagem do ligante em MamZ de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Ms. magneticum</i> cepa AMB-1	46
5. Resultados	47
5.1. Caracterização do cultivo da BM <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 em batelada e da produção de NMOBs octaédricas alongadas	47
5.1.1. Propagação do inóculo e controle de parâmetros durante o bioprocessamento	47
5.1.2. Monitoramento do crescimento celular, do consumo de nutrientes e da respiração de O ₂	50
5.1.3. Monitoramento das características morfológicas por DIC e TEM	54
5.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	57
5.2.1. Controle de qualidade de NMOBs utilizadas nos ensaios de separação magnética	57
5.2.2. Caracterização do impacto da alteração de pH e da concentração de ferro no cultivo e nos parâmetros morfológicos de microalgas	58
5.2.3. Ensaio de separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T com variação de pH em tampão citrato	63
5.2.4. Desafio do ensaio de separação magnética utilizando NPMSs	69

5.2.5. Construção de superfície de resposta da recuperação magnética de microalgas variando condições de pH e salinidade	71
5.3. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	78
5.3.1. Modelagem molecular de proteínas de membrana de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	78
5.3.2. Interação proteína-ligante por <i>docking</i> molecular e afinidade de ligação.....	81
5.3.3. Comparação estrutural do sítio de docagem do ligante em MamZ de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Ms. magneticum</i> cepa AMB-1	83
6. Discussão	88
6.1. Caracterização do cultivo em batelada da BM <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e da produção de NMOBs octaédricas alongadas	88
6.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	99
6.3. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T	105
7. Conclusão	111
8. Referências	113
9. Anexos.....	126

1. Introdução

1.1 Microrganismos magnetotáticos

Microrganismos magnetotáticos (MMOs) correspondem ao conjunto de organismos compostos por bactérias magnetotáticas (BMs) e por microeucariotos capazes de responder ao campo magnético da Terra (\vec{B}_T) (De Araújo *et al.*, 1986; Leão *et al.*, 2020). A assinatura estrutural de MMOs é a biomineralização dos magnetossomos (Bazylinski e Frankel, 2004; Leão *et al.*, 2020). O magnetossomo é um nanocristal ferromagnético envolto por uma bicamada lipídica ancorado ao corpo celular por proteínas do citoesqueleto, organizado em cadeias (Uebe e Schüler, 2016). O alinhamento passivo de MMOs, graças a soma dos momentos magnéticos de cada magnetossomo aliado à natação flagelar, permite que os MMOs naveguem por ambientes aquáticos quimicamente estratificadas, guiadas pelo \vec{B}_T . Este comportamento é conhecido como magnetotaxia (Bazylinski e Frankel, 2004).

As BMs são procariotos Gram-negativos, aquáticos e flagelados (Figura 1). Estes microrganismos possuem alta diversidade morfológica, filogenética e metabólica. Até o presente momento todas são microaerófilas ou anaeróbias (Bazylinski e Frankel, 2004) e possuem estilos de vida uni e multicelular. Para BMs unicelulares, foram descritas células com morfologia: (i) cocóide; (ii) ovóide; (iii) vibrióide; (iv) de espirilo; e (v) de bastonetes (Bazylinski e Frankel, 2004). BMs multicelulares com morfologias esféricas e elipsoides também foram reportadas (Abreu *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016) (Figura 1). BMs multicelulares são referidas como procariotos multicelulares magnetotáticos (MMPs, do inglês *magnetotactic multicellular prokaryotes*). BMs estão afiliadas aos filos Proteobacteria (nas classes Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- e *Ca. Etaproteobacteria*) (Abreu *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018), Nitrospirae (Lin *et al.*, 2018) e Omnitrophica (Kolinko *et al.*, 2012). Com o desenvolvimento de plataformas NGSs (do inglês *next generation sequencing*), dados metagenômicos de amostras do lago Sakinaw (British Columbia – Canadá) sugerem a presença de BMs pertencentes ao filo *Ca. Latescibacteria*. Entretanto, não há dados sobre o comportamento magnetotático ou presença de magnetossomos em bactérias desse filo (Lin e Pan, 2015). A partir de análises de dados metagenômicos de amostras coletadas na China e na Austrália foram reportados a presença de MGCs (do inglês *magnetosome gene cluster*), ou seja, agrupamentos de genes do magnetossomo, pertencentes a bactérias da classe Zetaproteobacteria, a classe candidata Lambdaproteobacteria e ao filo Planctomycetes (Lin *et al.*, 2018). No entanto, ainda

carecem estudos que comprovem o comportamento magnetotático ou a presença de magnetossomos em microrganismos pertencentes a estes filos.

BMs estão presentes em regiões costeiras (Abreu *et al.*, 2018) como também em sedimentos pelágicos e hemipelágicos no Oceano Atlântico (Stolz, Chang e Kirschvink, 1986; Petermann e Bleil, 1993). Evidências da presença de BMs, como a presença de magnetossomos de magnetita com monodomínio magnético depositados em sedimentos, também já foram encontradas em regiões profundas do Oceano Pacífico (Dong *et al.*, 2016). Magnetossomos e OTUs (unidades taxonômicas operacionais, do inglês *operational taxonomic units*) afiliadas aos gêneros *Magnetospira*, *Magnetovibrio*, *Magnetococcus* e *Ca.* Magnetananas estavam presentes em sedimentos de 4970 a 5620 m de profundidade (Dong *et al.*, 2016). Ademais, foi reportado um espirilo magnetotático redutor de sulfato associado a esteiras microbianas de sedimentos de carbonato com infiltrações de metano do Mar Negro (Reitner *et al.*, 2005a; Reitner *et al.*, 2005b). O espirilo magnetotático, afiliado ao gênero *Desulfosarcina* da classe Deltaproteobacteria, possui uma única cadeia de magnetossomos de greigita (Fe_3S_4) habitando colônias junto à arqueias metanogênicas em profundidades de 200 m (Reitner *et al.*, 2005a).

A maior parte das BMs são mesófilas e encontram-se em ambientes com pH próximo a neutralidade ($\text{pH} \approx 7,0$). No entanto existem exceções à regra, como BMs extremófilas já descritas na literatura. Exemplos de BMs extremófilas são: (i) o MMP de lagoa hipersalina ($\approx 74,5 \text{ ‰}$) costeira, *Ca.* Magnetoglobus multicellularis cepa Araruama pertencente à classe Deltaproteobacteria (Abreu *et al.*, 2007); (ii) *Ca.* Thermomagnetovibrio paiutensis cepa HSMV-1, BM moderadamente termofílica pertencente ao filo Nitrospirae que foi recuperada a partir de fontes termais com temperatura de 63°C (Lefèvre *et al.*, 2010); (iii) cepas de BMs obrigatoriamente alcalifílicas isoladas de diferentes *habitats* aquáticos na Califórnia, com crescimento ótimo em $\text{pH} >9,0$ (Lefèvre *et al.*, 2011); (iv) cocos magnetotáticos psicrófilicos que toleram temperaturas abaixo dos 4°C encontrados na Antártica (Abreu *et al.*, 2016); e (v) a cepa CLV-1, uma betaproteobactéria magnetotática encontrada em ambiente ácido ($\text{pH} \approx 4,4$) em uma lagoa costeira ($\text{pH} \approx 4,4$) (Abreu *et al.*, 2018).

Foi proposto que os diferentes ambientes naturais selecionam populações específicas de acordo com os parâmetros físico-químicos típicos que impõem pressões seletivas diferentes às populações de BMs (Faivre e Schüller, 2008). Em lagos eutrofizados ou águas com alto teor de matéria orgânica predominam formas cocóides e ovóides, enquanto em ambientes oligotróficos, as populações de BMs são mais diversificadas (Faivre e Schüller, 2008). Os fatores físico-

químicos estão relacionados à composição química da porção mineral dos magnetossomos. É sugerido que BMs produtoras de cristais de greigita estejam relacionadas a ambientes anaeróbios, onde esses microrganismos encontram condições mais redutoras (Bazylinski, Frankel e Jannasch, 1988; Simmons *et al.*, 2004). A salinidade é descrita como um dos fatores determinantes na localização de populações específicas de BMs (Spring *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2012). Discute-se que os cocos magnetotáticos sejam os mais abundantes nos diversos ambientes (Lin *et al.*, 2014). Estes apresentam alta diversidade relacionada ao tamanho, morfologia e a organização dos magnetossomos (Spring *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2012).

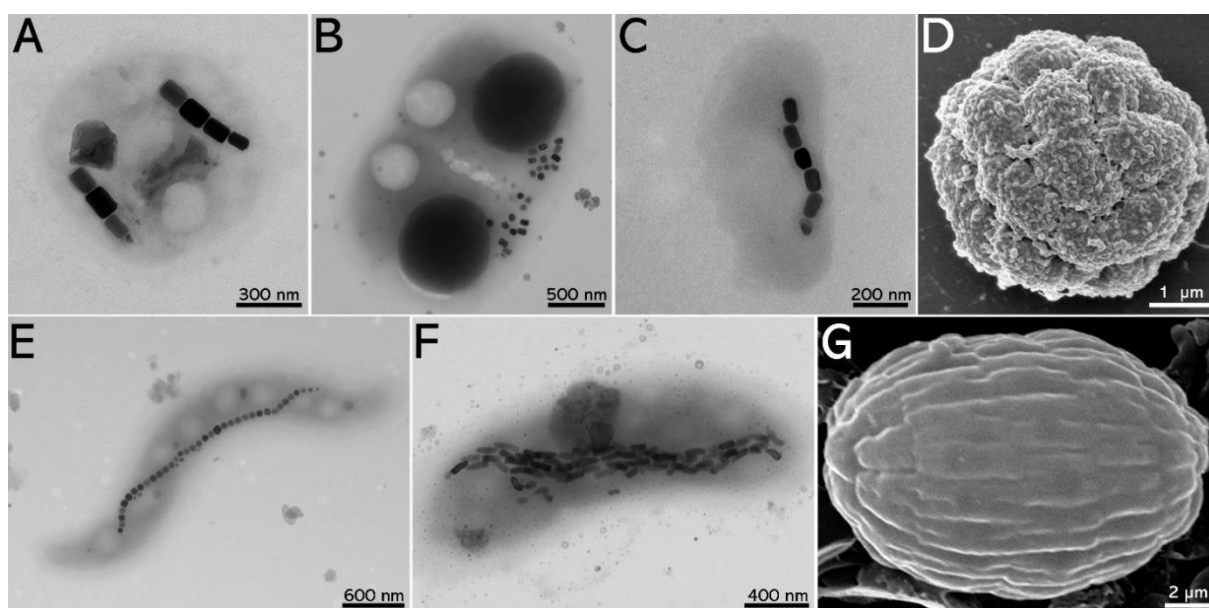


Figura 1. Diversidade morfológica de BMs. **A.** Coko não cultivado com 2 cadeias de magnetossomos octaédricos alongados (Paraty Mirim – RJ). **B.** Ovóide não cultivado de Gold Strike apresentando magnetossomos prismáticos desorganizados (Nevada – EUA). **C.** Vibrião não cultivado com magnetossomos prismáticos alinhados em cadeia (Paraty Mirim – RJ). **D.** MMP esférico não cultivado encontrado em lagoa hipersalina (Araruama – RJ). Retirado de Abreu *et al.* (2008). **E.** Espirilo não cultivado com uma única cadeia de magnetossomos cubo-octaédricos alinhados (Maricá – RJ). **F.** Bacilo não cultivado com magnetossomos anisotrópicos alinhados (Campos dos Goytacazes – RJ). **G.** MMP elipsoide não cultivado encontrado na China (Rongcheng City, China) (Leão *et al.*, 2017). Todas as imagens, exceto 2D e 2F, foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia no IMPG, UFRJ. **A., B., C., E. e F.** correspondem a BMs unicelulares observadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). **D. e G.** correspondem a MMPs observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

1.2. Biomineralização dos magnetossomos: genes e proteínas envolvidas no processo

A biomineralização do magnetossomo em BMs é altamente regulada a nível genético pela célula e os genes relacionados ao processo estão contidos no MGC (Lin *et al.*, 2018). Esses genes são chamados de genes *mam* (do inglês *magnetosome membrane*) e *mms* (do inglês *magnetic particle membrane specific*) (Uebe e Schüler, 2016). Dessa forma, a biomineralização

do magnetossomo obedece, obrigatoriamente, estas etapas: (i) o sequestro de ferro através de bombeamentos ativos para o citoplasma da célula; (ii) a invaginação da membrana citoplasmática a fim de formar a membrana do magnetossomo; (iii) a nucleação do mineral; (iv) o recrutamento de proteínas específicas para a membrana do magnetossomo; (v) controle do tamanho e balanço redox do nanocristal; e (iv) alinhamento e fixação da organela no citoesqueleto celular (Werckmann *et al.*, 2017) (Figura 2; Figura 3).

Grande parte da informação que se tem sobre o processo de biomineralização dos magnetossomos foi adquirida a partir de estudos realizados nas espécies *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (Taoka *et al.*, 2017) e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Murat *et al.*, 2010). Nesses estudos foram realizadas deleções de genes *mam* e *mms*, permitindo que, a partir de alterações fenotípicas nesses mutantes, a função do gene fosse inferida.

Dentre as proteínas relacionadas à produção dos magnetossomos, estas pertencem a famílias com características variadas que incluem: proteínas TPR (*tetratricopeptide repeat*: MamA), transportadores CDF (do inglês *cation diffusion facilitators*: MamB e MamM), serina proteases HtrA-like (MamE, MamP e MamO), proteínas actina-like (MamK), transportadores genéricos (MamH e MamN) e proteínas específicas de BMs sem homologia com outras proteínas em organismos não magnéticos (MamG, MamF, MamD, MamC, MamJ, MamW, MamX, MamY, Mms6, MtxA) (Uebe e Schüler, 2016). De forma geral, as proteínas Mam estão envolvidas em quatro funções principais na formação do magnetossomo: (i) formação da membrana do magnetossomo (MamI, MamL e MamAB); (ii) formação do cristal (MamE, Mms6, MamB e MamM); (iii) maturação do cristal (MamE, MmsF, MamGFDC e Mam P, S, T); e (iv) alinhamento do magnetossomo em cadeia (MamJ e MamK) (Murat *et al.*, 2010) (Figura 2; Figura 3).

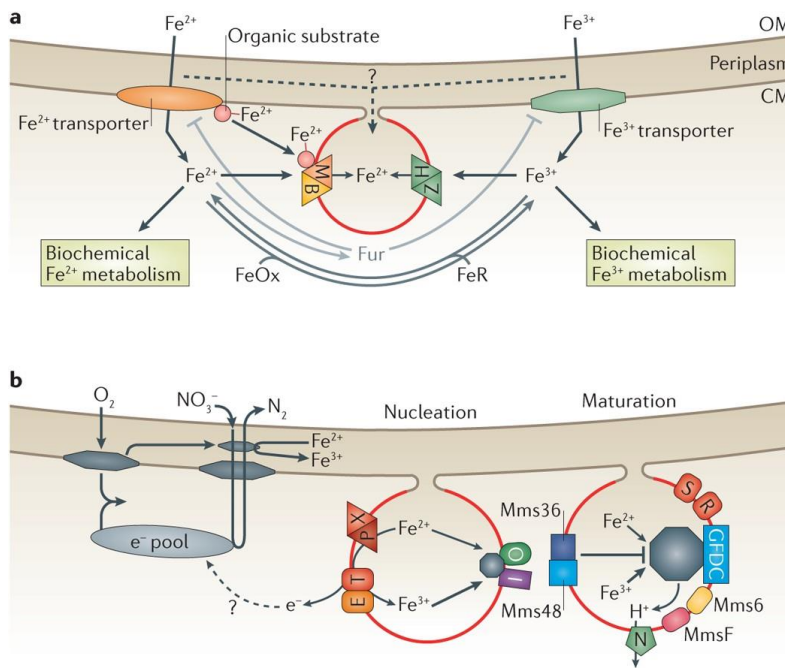


Figura 2. Modelos de absorção de Fe em BMs. **A.** O primeiro modelo sugerido de captação de ferro pelas vesículas do magnetossomo propõe que o ferro extracelular é importado para o citoplasma por transportadores da membrana citoplasmática e, posteriormente, é transportado para as vesículas da membrana do magnetossomo por transportadores específicos do magnetossomo (e.g., por MamB e MamM para Fe^{2+} , e MamH e MamZ para Fe^{3+}). **B.** O segundo modelo, o ferro é ligado a substratos orgânicos diretamente

após o transporte através da membrana citoplasmática e liberado no lúmen da vesícula sem o transporte de ferro livre através do citoplasma. Ademais, há um terceiro modelo propõe que a importação de ferro para as vesículas pode ocorrer diretamente a partir do periplasma de o envelope celular. O modelo propõe que a relação $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ intracelular é regulada por oxidases de ferro (FeOx) e redutases (FeR). O Fe^{2+} atua como co-repressor do regulador da captação férrica (Fur), que, por sua vez, é um regulador da transcrição de genes que codificam transportadores de ferro na membrana citoplasmática, mas não de genes com funções específicas relacionadas à biomineralização do magnetossomo. Figura retirada de Uebe e Schüler (2016).

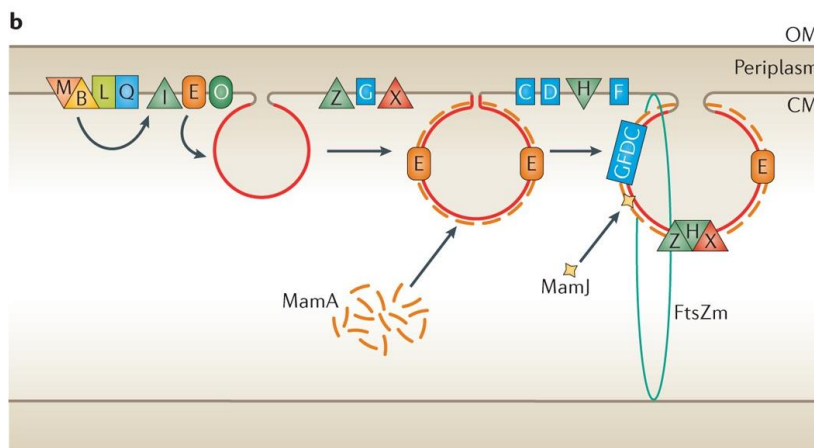


Figura 3. Modelo de invaginação da membrana do magnetossomo e recrutamento de proteínas. A presença e interação de diversas proteínas do magnetossomo são necessárias para induzir a curvatura da membrana e a formação de vesículas. Foi sugerido que MamB pode ser uma proteína de referência para a

formação de redes de interação proteica que induzem a curvatura da membrana. A montagem de complexos proteicos na membrana do magnetossomo e o direcionamento de proteínas adicionais para a membrana do magnetossomo são facilitados por MamA, MamE e possivelmente FtsZm. Figura retirada de Uebe e Schüler (2016).

1.4 Nanopartículas magnéticas em Biotecnologia

Antes de introduzirmos a importância das nanopartículas magnéticas na Biotecnologia, é preciso definir a Nanociência como a área do conhecimento que se dedica ao estudo de nanomateriais, isto é, materiais com dimensões na escala 10^{-9} m, ao passo que a Nanotecnologia é responsável pela fabricação e manipulação de tais dispositivos (Mitchell *et al.*, 2021). A partir do final do século XX os estudos de nanopartículas ganharam força à medida que os setores industriais e de saúde humana necessitavam novas soluções para superar as limitações encontradas à época. No campo da saúde a busca se iniciou com o propósito de desenvolver nanoferramentas biomédicas capazes de superar as limitações das terapias convencionais que pudessem transpassar as barreiras biológicas naturais, sejam elas sistêmicas, em microambientes ou ao nível celular (Chagri, Ng e Weil, 2021). Em paralelo a isso o emprego de nanopartículas viabilizaram novas possibilidades para os diferentes setores industriais, isto é, desde a fabricação de processadores e circuitos integrados, ambos baseados em nanomateriais como nanotubos e grafeno, pelas indústrias de computadores e engenharia até o setor de produtos alimentícios com o desenvolvimento de nanopartículas que aumentaram a produtividade e tempo de prateleira dos produtos (Bayda *et al.*, 2019).

Desta forma, é previsto que a indústria global de Nanotecnologia alcance o valor de US\$ 173 bilhões em 2025 conforme a taxa anual de crescimento de 18% (Gharailou, 2018). Neste cenário, encontram-se as nanopartículas magnéticas (NPMs), um dos pilares deste mercado, que crescem cerca de 11% ao ano, somando um crescimento de US\$ 5 bilhões no ano de 2023 (Figura 4A) (NanoPowder Factory, 2020). Até o presente momento, destacam-se as indústrias de sensores, cosméticos, materiais de construção, farmacêuticas e de tratamento de efluentes como sendo as que possuem o maior número de produtos e patentes registrados (Ali *et al.*, 2021). Outros setores, porém, em menor expressão, correspondem aos setores agrícola, de geração de energia, de recuperação de recursos naturais, biorremediação, desenvolvimento de sensores (Figura 4B) (Maine *et al.*, 2014).

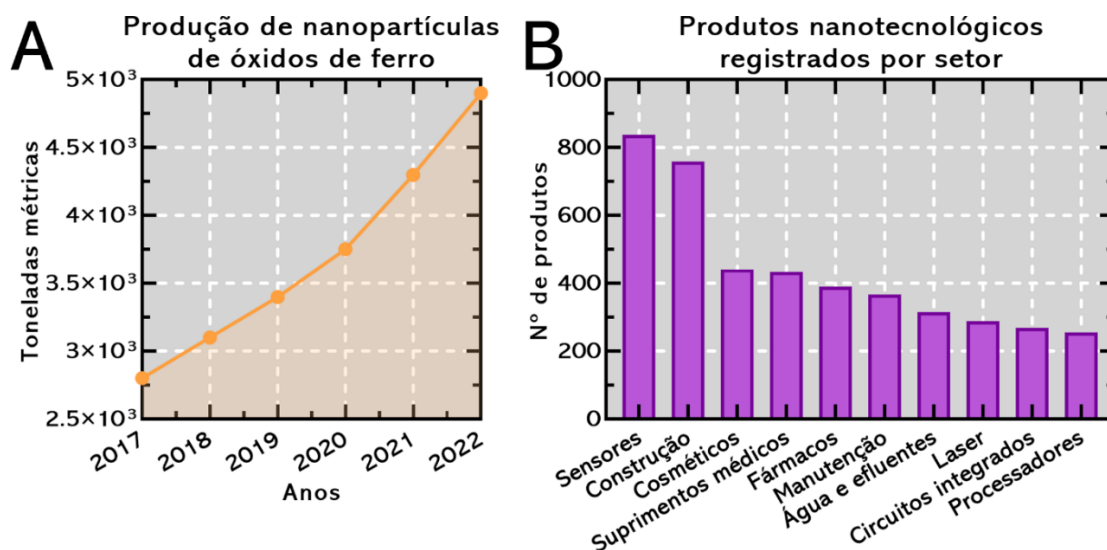


Figura 4. Nanopartículas magnéticas: produção global e setorização. **A.** Produção global de nanopartículas de óxidos de ferro através do recorte entre os anos de 2017 e 2022. Dados adaptados de Correa, Presciliano e Abreu, 2021. **B.** Produtos nanotecnológicos baseados em nanopartículas de óxidos de ferro estratificados por setores industriais que os utilizam. Adaptado de Correa (2021).

Há uma gama de aplicações biotecnológicas que exploram o uso das nanopartículas magnéticas (NPMs) uma vez que estas nanopartículas possuem faixa de tamanho nanométrica — isto é, de 1 a 100 nm — e que podem ser controladas e direcionadas com a aplicação de um campo magnético externo (Ali *et al.*, 2021). As NPMs mais empregadas são formadas por óxidos de ferro dentre os quais se destacam as nanopartículas de magnetita sintética superparamagnéticas (NPMSs) devido à sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade (Figura 5A) (Assa *et al.*, 2016). As NPMSs, muitas vezes, não apresentam uniformidade quanto à forma, composição química e nem quanto à morfologia cristalina da partícula ocasionando a ocorrência de diferentes populações cristalinas em uma mesma amostra. Outra problemática do ponto de vista da aplicação em nanomedicina é o seu potencial de aglomerar acarretando a formação de grumos (Sarikaya, 1994).

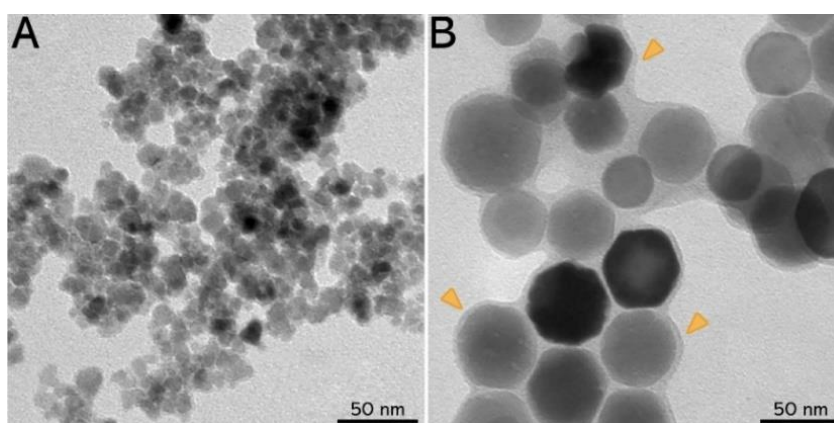


Figura 5. Diferença morfológica entre NPMSs e NMOBs observadas em TEM. **A.** NPMSs superparamagnéticas sem revestimento obtidas por coprecipitação. **B.** NMOBs cubo-octaédricas, em monodomínio magnético, extraídas da BM *Ms. magneticum* cepa AMB-1. A membrana biológica que reveste as NMOBs está destacada pela cabeça de seta laranja. Imagem

adaptada de Correa, Presciliano e Abreu (2021).

Desta forma, há diversos métodos físicos, químicos e biológicos atualmente empregados na produção de NPMs. Os métodos físicos e químicos geralmente produzem nanopartículas com tamanho irregular a baixo custo ou nanopartículas com forma e tamanho bem definidos a custos elevadíssimos (Correa, 2021). A síntese biológica de NPMs, o qual está apoiado na biomineralização de magnetossomos por BMs (Figura 5B) (Uebe e Schüler, 2016). Visto que a síntese destas nanopartículas por BMs obedecem a um rigoroso controle genético, os magnetossomos — daqui em diante descritos como nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs) — apresentam propriedades desejáveis para aplicações biotecnológicas que incluem: (i) a uniformidade da geometria da partícula e sua faixa estreita de distribuição de tamanho entre 30 a 120 nm (Bazylinski e Frankel, 2004); (ii) a sua permanente magnetização visto que estas partículas correspondem a monodomínios magnéticos (Ricci e Kirschvink, 1992); (iii) características de dispersibilidade desejáveis da nanopartícula em meio aquoso (Correa *et al.*, 2021); e (iv) a presença de membrana biológica que envolve o núcleo mineral do magnetossomo bem como a inserção de proteínas na membrana — envolvidas no processo de biomineralização do magnetossomo — que podem servir como alvo para ancoramento de fármacos, por exemplo (Deng *et al.*, 2013).

Conforme exposto anteriormente as NMOBs vem sendo utilizadas em diversos campos de aplicação, dos quais podemos citar alguns deles: (i) separação magnética de linfócitos em amostras de sangue (Wang *et al.*, 2018); (ii) hipertermia magnética aplicada ao tratamento de glioblastoma (Alphandéry *et al.*, 2017); (iii) transporte de fármacos para diferentes terapias (*e.g.*, NMOBs funcionalizadas com anfotericina B para o tratamento de infecções causadas por parasitos e fungos) (Correa *et al.*, 2021); (iv) análise da segurança alimentar de gêneros perecíveis a fim de detectar patógenos bacterianos como espécies de *Salmonella* e *Vibrio* (Li *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013); (v) detecção de antígenos (*e.g.*, detecção de antígenos do vírus da hepatite B) (Wacker *et al.*, 2007); (vi) biorremediação por meio da imobilização de enzimas de degradação de pesticidas (*e.g.*, paraoxon) (Ginet *et al.*, 2011); (vii) em exames diagnósticos de imagem tais como a ressonância magnética nuclear visto que atuam como agentes de contraste (Mériaux *et al.*, 2015) (Vargas *et al.*, 2018) (Figura 6; Figura 7).

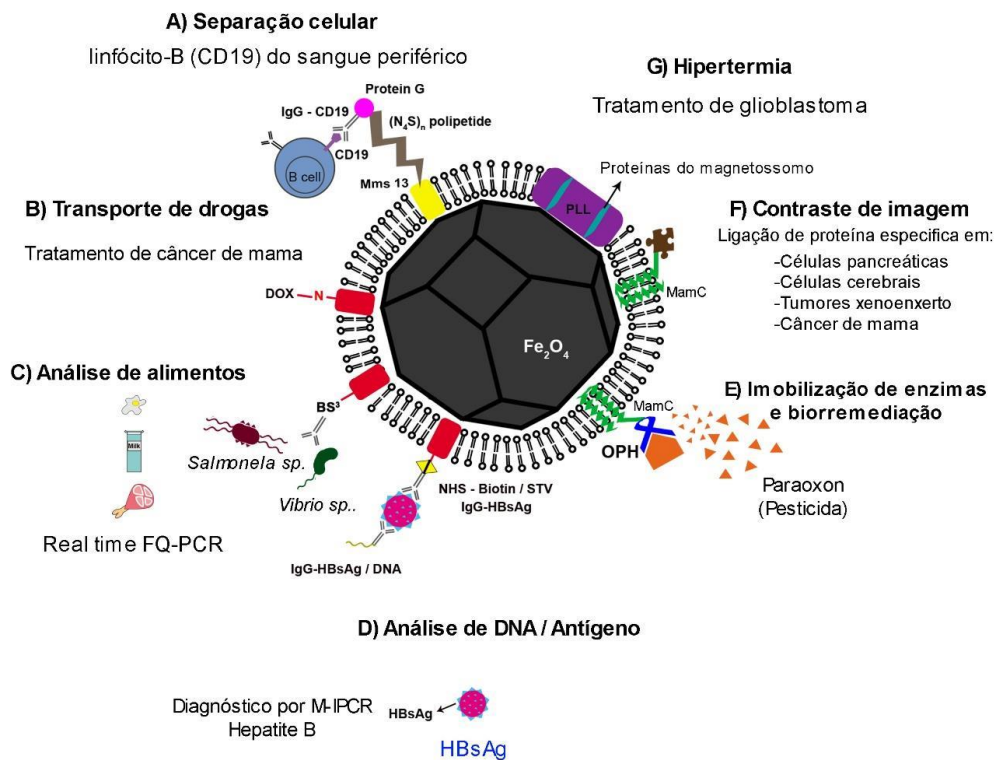


Figura 6. Representação do magnetossomo com possíveis funcionalizações e aplicações descritas na literatura. **A.** Separação celular: Magnetossomos modificados foram ligados a anticorpos anti-CD19 e usados para separar os linfócitos B das células do sangue periférico (Takahashi, Yoshino e Matsunaga, 2010). **B.** Transporte de drogas: Associação entre as proteínas de superfície do magnetossomo e doxorrubicina, uma droga contra o câncer de mama (Sun *et al.*, 2008). **C.** Análise de alimentos: Sistema de captura que utiliza as proteínas do magnetossomo fundidas com o reagente de ligação cruzada suberato de bissulfosuccinimidila para ligação de anticorpos a espécies de *Salmonella* e vibrião em amostras de alimentos (por exemplo, leite, ovo, carne de porco) (Li *et al.*, 2010). **D.** Análise de DNA / Antígeno: Magnetossomos funcionalizados com anticorpos foram usados para imobilização do HBsAg (antígeno da hepatite B) no soro humano e aumentar a sensibilidade do imunoensaio (Wacker *et al.*, 2007). **E.** Imobilização enzimática e biorremediação. Magnetossomos expressando MamC fusionado com organofosfodrolase de *Flavobacterium sp.* foram utilizados para a degradação de paraoxon (metabólito do inseticida Parathion) (Ginet *et al.*, 2011). **F.** Contraste de imagem: magnetossomos funcionalizados com proteínas específicas de alta afinidade com células-alvo foram utilizadas como agentes de contraste superparamagnéticos para ressonância magnética (Mériaux *et al.*, 2015). **G.** Hipertermia: Magnetossomos revestidos com poli-L-lisina (PLL) foram usados em hipertermia (Alphandéry *et al.*, 2017). Figura adaptada de Vargas *et al.* (2018).

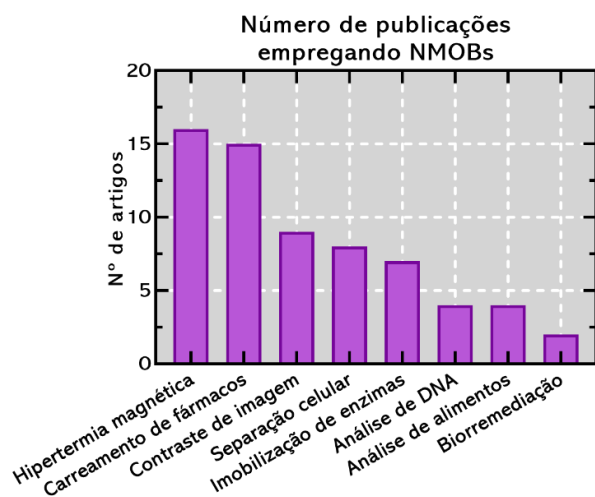


Figura 7. Número de publicações por área que envolvem o uso de NMOBs. A maior parte dos estudos está voltado à área da nanomedicina, dado que estas nanopartículas têm sido empregadas em tratamentos de hipertermia magnética e no carreamento de fármacos para sítios específicos através da aplicação de um campo magnético externo. As aplicações envolvendo biorremediação permanecem no menor patamar do uso de NMOBs. Figura adaptada de Vargas *et al.* (2018).

Em suma, esta diversidade de aplicações foi passível de ser explorada devido à química de superfície particular desta classe de NPMs. Desta forma, podemos citar a presença de grupamentos fosfato — integrantes dos fosfolipídeos da membrana que envolve o núcleo mineral — conferindo à nanopartícula carga global negativa (Alphandéry *et al.*, 2012; Correa *et al.*, 2021). Além disso, há diferentes proteínas embebidas na membrana, como por exemplo as que realizam a biomineralização do cristal, nas quais suas porções C- e N-terminal podem ser utilizadas para o ancoramento de fármacos, com e sem agentes de ligação cruzada, enzimas, anticorpos, entre outros (Vargas *et al.*, 2018). Embora as NMOBs apresentem esse grupo de características conservadas entre si, é importante lembrar que a morfologia das NMOBs bem como a composição de proteínas embebidas na membrana é espécie específica (Grünberg *et al.*, 2004). Dito isso, diferentes tipos de NMOBs — *e.g.*, cuboctaédricas, pseudo-hexagonais alongadas ou prismáticos alongados, octaédricas alongadas, entre outras — podem possuir proteínas que desempenham funções ainda não elucidadas (Correa, 2021). É sabido também que a maior parte das proteínas da membrana do magnetossomo apresenta aminoácidos com resíduos laterais acídicos ou sequências repetitivas, o que é compatível com diferentes sistemas de biomineralização em outros organismos (Grünberg *et al.*, 2004). Por último, a composição da membrana do magnetossomo é muito similar à composição da membrana citoplasmática da célula, incluindo o perfil de ácidos graxos e fosfolipídeos detectados, além de não conterem LPS (Grünberg *et al.*, 2004), um componente altamente imunogênico para aplicações em saúde humana (Takeuchi *et al.*, 1999; Lüderitz *et al.*, 1977).

1.4.1 Propriedades de magnetização e dispersibilidade das nanopartículas magnéticas

Do ponto de vista da aplicação biotecnológica, as propriedades de magnetização das nanopartículas interferem diretamente no resultado esperado, isto é, estas propriedades intrínsecas ao material determinam a área na qual melhor podem ser utilizadas. Portanto, há diferentes classificações que podem ser empregadas a estas partículas e propriedades que podem ser exploradas. Por exemplo, quanto ao magnetismo, as nanopartículas magnéticas podem ser classificadas em ferromagnéticas, ferrimagnéticas, antiferromagnéticas, paramagnéticas e diamagnéticas (Figura 8).

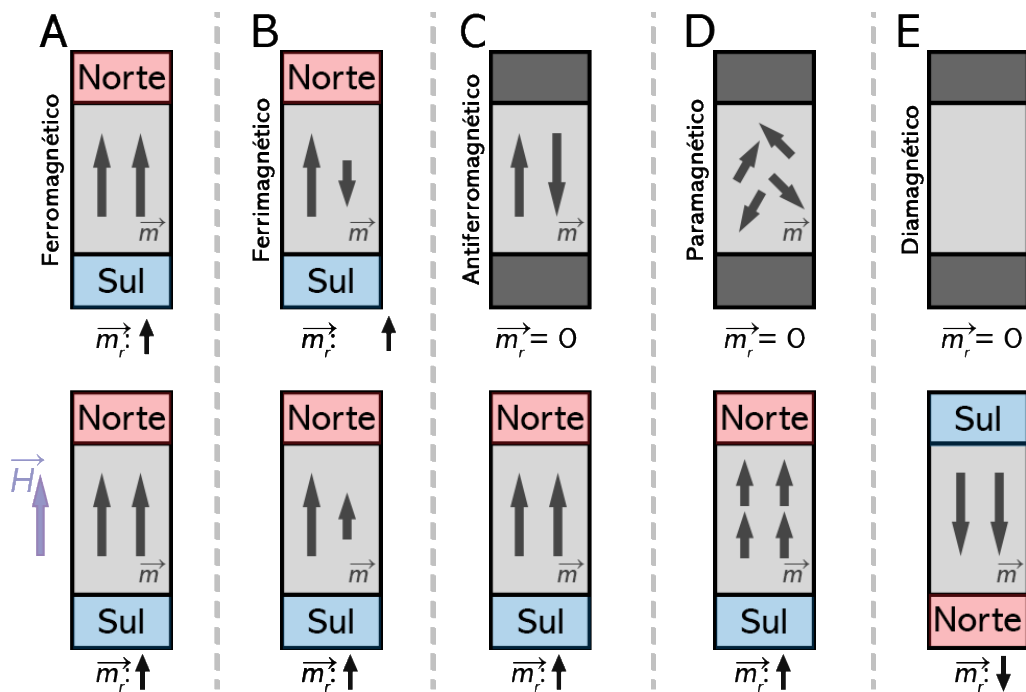


Figura 8. Classificação e exemplificação da resposta de magnetização de diferentes classes materiais. Na fileira de cima são exibidos os momentos magnéticos internos do material (\vec{m}) e o momento magnético resultante (\vec{m}_r) de cada material na ausência de um campo magnético externo (\vec{H}) enquanto na fileira de baixo estes momentos são representados durante a incidência de um \vec{H} . **A.** Material ferromagnético, isto é, permanentemente magnetizado com vetores \vec{m} de mesma direção, mesmo sentido e mesma magnitude. Os \vec{m} permanecem paralelos ao \vec{H} aplicado. **B.** Material ferrimagnético, isto é, também permanentemente magnetizado, porém com vetores \vec{m} de mesma direção, sentidos opostos e magnitudes diferentes. Os \vec{m} permanecem paralelos ao \vec{H} aplicado. **C.** Material antiferromagnético, isto é, não apresenta magnetização residual ($\vec{m}_r = 0$). Os vetores \vec{m} apresentam mesma direção, sentidos opostos e mesma magnitude. Os \vec{m} permanecem paralelos ao \vec{H} aplicado. **D.** Material paramagnético, isto é, sem magnetização residual ($\vec{m}_r = 0$). Os vetores \vec{m} apresentam direções e sentidos distintos. Os \vec{m} permanecem paralelos ao \vec{H} aplicado. **E.** Material diamagnético, isto é, sem magnetização residual ($\vec{m}_r = 0$). Os \vec{m} permanecem antiparalelos ao \vec{H} aplicado, ou seja, são repelidos pelo \vec{H} . Elaboração própria com referência em Hausoel *et al.* (2017).

O ferromagnetismo é a propriedade que confere a certos materiais a capacidade de se tornarem permanente magnetizáveis através da aplicação de um \vec{H} . Dessa forma, cessada a aplicação do \vec{H} o material permanece espontaneamente magnetizado (Tanabe e Ohe, 2021). O

ferromagnetismo é descrito pelo fato que todos os momentos magnéticos de cada átomo do material estão alinhados na mesma direção e sentido, consequentemente, produzindo uma resultante de mesma intensidade do momento magnético. NPs que apresentam tal propriedade são compostas por átomos como ferro, cobalto, níquel e alguns metais terra-rara (Rasaili, Sharma e Bhattarai, 2022) (Figura 8A).

O ferrimagnetismo, uma variação do ferromagnetismo, é explicado pela presença de populações distintas de átomos que possuem seus momentos magnéticos na mesma direção, porém em sentidos opostos e de magnitudes diferentes. Essa resultante, portanto, confere ao material uma magnetização permanente ao dipolo magnético. Contudo, durante a aplicação de um \vec{H} os momentos mantêm a direção e adquirem o mesmo sentido do \vec{H} , ocasionando num momento dipolo magnético resultante de maior magnitude quando comparado àquele na ausência do \vec{H} (Figura 8B). Esse fenômeno pode ser observado na magnetita, tanto biogênica quanto abiogênica, que é composta por átomos de Fe^{2+} e Fe^{3+} em sua estrutura cristalina (Banerjee e Moskowitz, 1985). Ambos os materiais ferro- e ferrimagnéticos apresentam alta susceptibilidade magnética e alta permeabilidade relativa (χ). A susceptibilidade é explicada pela capacidade de um material de se tornar magnetizável na presença de um \vec{H} , indicando, consequentemente, se o material será repelido ou atraído pelo campo gerado (Tanabe e Ohe, 2021). A χ é determinada pela capacidade de fluxo magnético que pode atravessar determinado material (Figura 8B).

Diferentemente do ferrimagnetismo, o antiferromagnetismo é descrito por populações de átomos ou moléculas nos quais os momentos magnéticos individuais não só apresentam mesma direção e sentidos opostos como também apresentam a mesma magnitude além de não se comportarem como dipolos magnéticos. Em vista disso, a resultante do momento dipolo do material é zero. No entanto, durante a aplicação de um \vec{H} os momentos mantêm a direção e a magnitude ao passo que adquirem o mesmo sentido do \vec{H} , conferindo um momento dipolo magnético resultante diferente de zero comparado àquele na ausência do \vec{H} (Železný *et al.*, 2018) (Figura 8C). Exemplos de materiais antiferromagnéticos são a hematita, a liga metálica ferro-mangânês, o cromo e óxidos de níquel (Holcomb *et al.*, 2010).

O diamagnetismo, por sua vez, é descrito pela ausência de momentos magnéticos individuais em populações de átomos ou moléculas junto ao fato que o material não se comporta como dipolo magnético. Tal propriedade faz com que esse tipo de material seja repelido na

aplicação de um \vec{H} , uma vez que é gerado um momento dipolo magnético de mesma direção e sentido oposto ao \vec{H} (Figura 8E). Embora o diamagnetismo esteja presente em todos os materiais, a sua contribuição para a resposta magnética é baixa e quando somente ele está presente então o material é considerado diamagnético (Essén e Fiolhais, 2012). Outra propriedade deste tipo de material é que sua χ é menor do que a permeabilidade do vácuo ($\overline{\mu_0}$). O diamagnetismo é comumente encontrado na água, lipídeos, tecidos biológicos, etc. (Gao *et al.*, 2021).

O paramagnetismo é composto pela presença de diferentes momentos magnéticos de um material que estão orientados em diferentes direções e sentidos, mas que dão origem a uma resultante de valor zero na ausência de \vec{H} . Na aplicação de um \vec{H} , os momentos são alinhados na mesma direção e sentido do vetor \vec{H} , conferindo uma resultante não nula (Figura 8D). Materiais paramagnéticos apresentam χ com valor ligeiramente superior a 1 (Martin-Hernández e Ferré, 2007). De forma simples, é possível determinar se um material é dia- ou paramagnético de acordo com o pareamento de seus *spins* eletrônicos. Caso todos os *spins* eletrônicos — isto é, paralelos e antiparalelos — estejam alinhados então o material é diamagnético, caso não estejam pareados, o material será paramagnético (Abrikosov *et al.*, 2016). Materiais paramagnéticos rotineiramente encontrados são o alumínio, oxigênio, titânio e óxido de ferro II (FeO) (Martin-Hernández e Ferré, 2007). Há também o superparamagnetismo que é encontrado em materiais de escala de tamanho nanométrica, isto é, as nanopartículas que possuem até 100 nm. O superparamagnetismo é caracterizado pelo agrupamento restrito a pequenos domínios independentes entre si que exibem comportamento ferro- ou ferrimagnético (Figura 9). Esta classe somente se torna magnetizada durante a aplicação do \vec{H} e, posteriormente, cessada a aplicação do campo o material não é capaz de reter a magnetização (Dulińska-Litewka *et al.*, 2017). Dado o fato de não serem permanentemente magnetizadas, NMSs superparamagnéticas não tendem a formar grumos e (Wu, Tang e Jensen, 2004), por conseguinte, têm sido utilizadas em nanomedicina como agentes de contraste em exames de imagem (Wang, Hussain e Krestin, 2001; Lee e Hyeon, 2012) e hipertermia magnética para o tratamento de câncer (Balivada *et al.*, 2010; Zahn *et al.*, 2022).

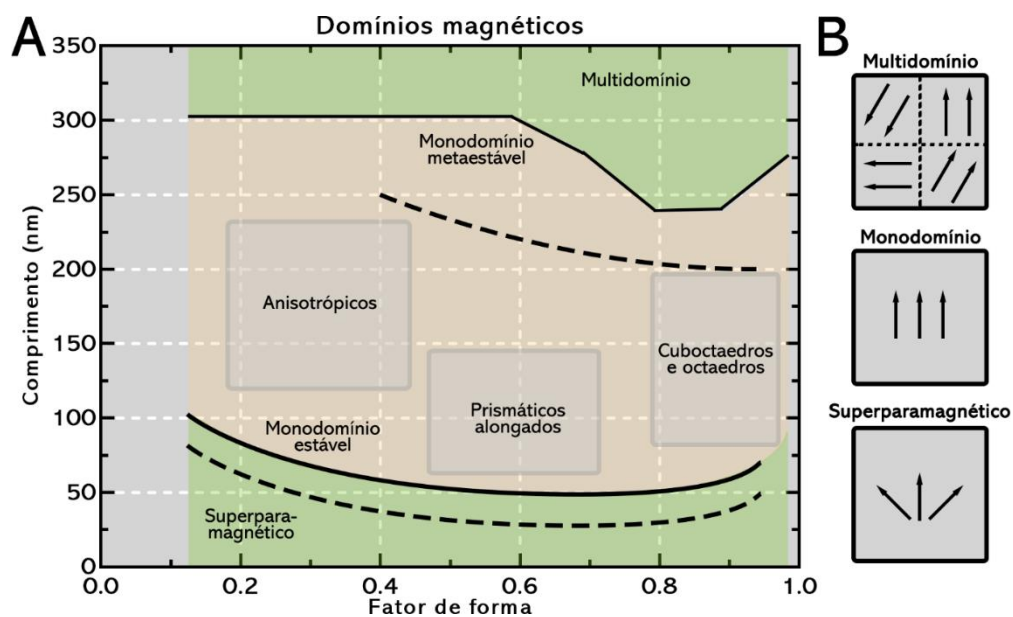


Figura 9. Domínios magnéticos distribuídos pelo tamanho da partícula e fator de forma. **A.** Gráfico de dispersão entre fator de forma e comprimento de NPMs. As NMOBs se encontram na região colorida de amarelo do gráfico a qual corresponde às partículas como monodomínio magnético. Três áreas de diferentes morfologias de NMOBs são exibidas, sendo estas: (i) anisotrópicas; (ii) prismáticas alongadas; e (iii) cuboctaedros e octaedros alongados. **B.** Representação esquemática do alinhamento dos \vec{m} entre os domínios magnéticos de cada grupo. Multidomínios apresentam diversos domínios magnéticos com \vec{m} em diferentes direções e sentidos. Monodomínios magnéticos possuem um único domínio no qual os \vec{m} encontram-se paralelos entre si, isto é, na mesma direção e também apresentam o mesmo sentido. Partículas superparamagnéticas apresentam também um único domínio magnético, no entanto, os \vec{m} apresentam diferentes direções e sentidos. Elaboração própria com referência em Kopp e Kirschvink (2008).

Dando sequência às propriedades magnéticas de nanopartículas, devemos compreender que as NMOBs, biomineralizadas por BMs, correspondem a monodomínios magnéticos estáveis segundo o diagrama de fase magnética da magnetita biogênica proposto por Butler e Banerjee (1975) (Figura 9). O monodomínio magnético corresponde à região delimitada do material na qual a magnetização é uniforme e não varia sob a incidência de um \vec{H} . Portanto, devido à estreita faixa de tamanho e a composição química da magnetita, as NMOBs mantêm-se permanentemente magnetizadas (Kopp e Kirschvink, 2008). Dessa forma, é discutido na literatura que essa característica conferiu uma vantagem evolutiva às BMs. Um exemplo claro é a estabilidade das propriedades magnéticas das NMOBs durante a evolução da biomineralização de MGCs e da magnetotaxia no domínio Bacteria. Diversas evidências paleoquímicas e filogenômicas sugerem que este comportamento pode ter originado durante o éon Arqueano há 2,7 bilhões de anos (Lin *et al.*, 2017). No decorrer da evolução das BMs, diversas inversões do campo geomagnético ocorreram e, por conseguinte, o fato das NMOBs possuírem um núcleo mineral permanentemente magnetizado pode ter permitido a perpetuação e espalhamento desse comportamento em outros representantes do domínio Bacteria (Gillet *et al.*, 2013; Amor *et al.*, 2022).

Por último, há uma região de transição no diagrama de fase magnética no qual nanopartículas de magnetita passam a compor multidomínios magnéticos (Figura 9). Essa transição ocorre em partículas que: (i) possuem fator de forma inferior a 0,6 e tamanho superior a 300 nm; e (ii) possuem fator de forma próximo a 0,8 e tamanho superior a 250 nm. Devido às dimensões da partícula esta passa a se organizar em diferentes regiões, isto é, domínios, que possuem momentos magnéticos em diferentes sentidos e direções (Ansari *et al.*, 2019). Devido às suas dimensões e tendência de agregação, nanopartículas multidomínio são pouco empregadas em nanomedicina e têm sido exploradas em áreas de catálise (Leslie-Pelecky e Rieke, 1996; Li *et al.*, 2017).

Uma vez contempladas as classificações e propriedades desses materiais quanto à organização dos *spins* eletrônicos e suas delimitações espaciais, abordaremos o último conceito importante deste bloco: a curva de histerese (Figura 10). A histerese é a tendência do sistema em conservar suas características na ausência de um estímulo que, neste caso, é a aplicação de um \vec{H} . Dessa forma, a curva de histerese é descrita pela relação entre a magnetização (\vec{M}) de um material — ou seja, a densidade de fluxo de campo magnético que o atravessa — e a aplicação de um \vec{H} com mesma direção e sentidos alternados em duas ocasiões distintas (Figura 10). Uma vez construída a curva de histerese é possível determinar três propriedades importantes, sendo estas a coercividade (C), a remanência (R) e saturação (S) (Frey *et al.*, 2009).

Em primeiro lugar, a coercividade retorna o valor de \vec{H} necessário durante a dessaturação para que o material seja complementa desmagnetizado, isto é, quando $\vec{M} = 0$. Em seguida, a remanência é a magnetização remanescente cessada a aplicação do \vec{H} , isso é, quando $\vec{H} = 0$. Por fim, há dois pontos de saturação — representados por S_1 e S_2 — que indicam o valor máximo de \vec{M} que um material pode receber sob aplicação de um determinado \vec{H} . Tanto em S_1 quanto em S_2 temos o alinhamento dos \vec{m} de cada domínio magnético do material de forma paralela ao \vec{H} aplicado, isto é, possuem mesma direção e sentido que \vec{H} (Figura 10). Em seguida, veremos algumas diferenças entre as curvas de histerese de nanopartículas que exibem superparamagnetismo, ferro- e ferrimagnetismo em mono- e multidomínios (Figura 10).

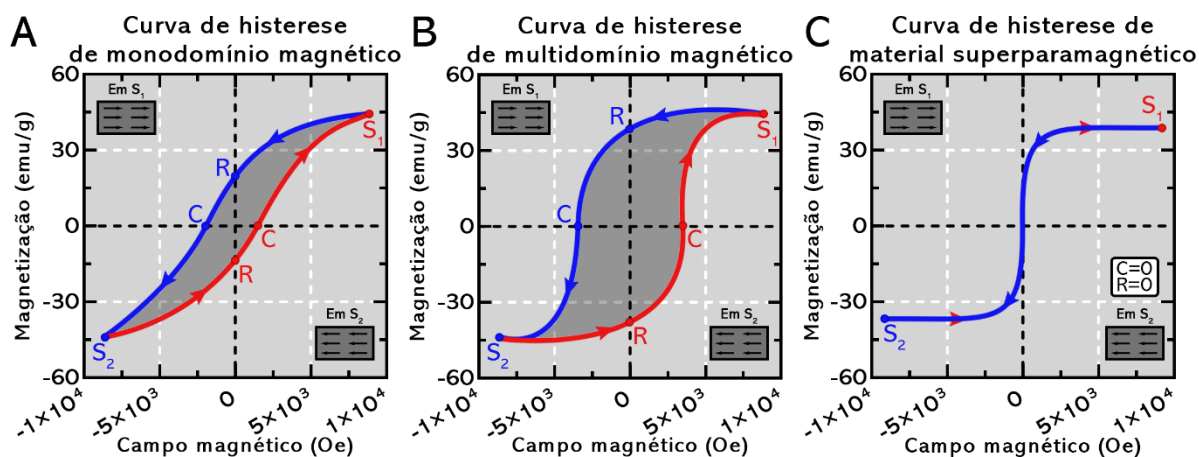


Figura 10. Curva de histerese de NPMs. Em vermelho está destacada a curva de saturação e em azul a curva de dessaturação magnética do material. As medidas de coercividade, remanência e saturação estão representadas pelas letras C, R e S, respectivamente. No interior dos gráficos encontram-se as direções e sentidos dos vetores \vec{H} nos pontos de saturação 1 e 2, isto é, S_1 e S_2 . **A.** Exemplo de curva de histerese hipotética para NMOBs de *Ms. magneticum* cepa AMB-1. **B.** Exemplo de curva de histerese para magnetita sintética que exibe multidomínios magnéticos. Valores superiores de coercividade e remanência são esperados em comparação aos valores obtidos par NMOBs. **C.** Exemplo de curva de histerese para NMSs superparamagnéticas. As curvas de saturação e dessaturação se sobrepõe ao passo que este tipo de material apresenta histerese e coercividade próximos a zero. Elaboração própria com referência em Hausoel *et al.* (2017).

Posto isso, na Figura 10 temos a representação de três curvas de histerese típicas para:

(i) NMOBs extraídas de *Ms. magneticum* cepa AMB-1, conforme adaptado de Alphandéry *et al.* (2008) (Figura 10A); (ii) NPMSs que extrapolam a zona de transição de monodomínio para multidomínio (Pike *et al.*, 2001) (Figura 10B); e (iii) NMSs superparamagnéticas com tamanho médio de 30 nm (González-Gómez *et al.*, 2019) (Figura 10C). Em primeiro lugar, é observado que as nanopartículas superparamagnéticas possuem valores de coercividade e remanência próximos a zero — isto é, na interseção dos eixos H e M — e alta saturação nos pontos S_1 e S_2 (Figura 10C). Portanto, a curva de histerese corrobora os conceitos trazidos anteriormente, definindo que essa classe de nanopartículas somente se torna magnetizada durante a aplicação de um \vec{H} e, cessada sua aplicação, não mantém a magnetização residual. Isso é explicado porque a soma vetorial dos \vec{m} na ausência de \vec{H} retornam um momento resultante igual a zero, ou seja, se $\vec{m}_r = 0$, consequentemente, $\vec{M} = 0$ (Figura 10D; Figura 10C).

Finalmente, ao comparamos a topografia da curva entre NMOBs e nanopartículas de magnetita que apresentam multidomínio, a diferença assinalada entre elas recai sobre os valores mensurados de coercividade e remanência. Deve-se lembrar que NMOBs exibem ferrimagnetismo, uma variação do ferromagnetismo, e, por conseguinte, são formadas por um monodomínio magnético o que garante sua permanente magnetização (Figura 8B; Figura 10A). A diferença entre os valores observados de coercividade e remanência entre essas duas classes de partículas é explicada pela organização dos *spins* eletrônicos, ou melhor dizendo, pela soma

vetorial dos \vec{m} de cada molécula. Logo, apresentam valores diferentes uma vez que NMOBs apresentam os \vec{m} emparelhados de forma antiparalela, ou seja, com mesma direção e sentidos opostos, e de magnitudes diferentes. Em consequência disso, na aplicação ou ausência de \vec{H} as partículas apresentarão \vec{m}_r distintos entre si, o que resultará em valores de coercividade e remanência diferentes entre ambas.

Em suma, tais propriedades determinam a melhor área de aplicação de cada nanopartícula, uma vez que partículas que toleram valores mais altos de \vec{M} são naturalmente mais responsivas a \vec{H} e a estímulos de temperatura. Conseqüentemente, NMOBs apresentam propriedades superiores às nanopartículas superparamagnéticas o que favorece seu emprego em ensaios de hipertermia magnética e ensaios de carreamento de fármacos *in vitro* e *in vivo* (Abenojar *et al.*, 2016; Alphanbéry *et al.*, 2017). Por fim, NMOBs apresentam valores de potencial zeta, de -38 a -25 mV (Wang *et al.*, 2019; Correa *et al.*, 2021), similares a nanopartículas de magnetita revestidas com ácido carboxílico, de -35 a -15 mV (Mandawala *et al.*, 2017). O potencial zeta é uma medida indireta da carga de superfície, o que reflete a estabilidade coloidal e a dispersibilidade em meio aquoso destas nanopartículas, ampliando, portanto, a gama de aplicações possíveis para as NMOBs.

1.2. Microalgas: importância biotecnológica na produção de biocombustíveis

A preocupação com o meio ambiente vem chamando mais atenção nos últimos anos devido às enormes mudanças climáticas globais (Jones *et al.*, 2012). Estas mudanças foram acompanhadas pelo aumento constante da população mundial, aumentando conseqüentemente a procura por combustíveis derivados do petróleo (Bowen *et al.*, 2012). Os combustíveis fósseis são formados por processos naturais, *e.g.*, decomposição anaeróbica de fito e zooplâncton durante a diagênese. Altas temperaturas e pressões durante a escala de tempo geológica da Terra são responsáveis pela conversão da matéria orgânica em matrizes fósseis como carvão, gás natural e petróleo. A combustão destes compostos com altas porcentagens de hidrocarbonetos libera alta quantidade de energia equivalente (Hubbert, 1949). A composição química específica dos hidrocarbonetos presentes em qualquer combustível fóssil confere as suas propriedades características. As principais propriedades específicas do combustível são densidade, viscosidade, ponto de ebulição, ponto de fusão, entre outras (Otto e Simoneit, 2001). Esta questão tem impulsionado, nos últimos anos, estudos que consideram as fontes renováveis

de energia como novas alternativas para a produção de combustíveis. Nesse cenário, os biocombustíveis surgem como uma alternativa positiva aos combustíveis fósseis, por serem uma fonte de energia sustentável, ou seja, seus resíduos são menos nocivos ao meio ambiente, principalmente porque seu balanço total reduz consideravelmente a emissão de dióxido de carbono (CO₂) e outros gases estufa na atmosfera (Bentsen, Larsen e Felby, 2014).

No contexto da busca por biocombustíveis, destacam-se as microalgas, microrganismos fototróficos unicelulares importantes no ciclo do carbono na natureza (*e.g.*, mitigação das emissões de CO₂ e produção de mais da metade do O₂ atmosférico disponível no globo) e que podem ser utilizadas para produção de biodiesel de 3ª geração, uma vez que acumulam inclusões de lipídeos neutros (*e.g.*, triacilgliceróis; TAGs) (Klok *et al.*, 2014). Logo, são consideradas uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biocombustíveis, em particular o biodiesel. Além disso, a produtividade desses microrganismos fotossintéticos na conversão de dióxido de carbono em lipídios ricos em carbono, excede em muito o das oleaginosas agrícolas, sem competir para terras aráveis (Bentsen, Larsen e Felby, 2014).

No entanto, a produção comercial de microalgas ainda é baseada em métodos e tecnologias tradicionais usando algumas cepas. Um dos principais gargalos na produção de grandes quantidades de biomassa de microalgas para produção de biodiesel é a necessidade da alta produtividade lipídica (Wijffels e Barbosa, 2010). Em algas em crescimento sem estresse, os lipídios estão presentes principalmente na forma de fosfolipídios nas membranas celulares, condição que não é interessante do ponto de vista biotecnológico. Algumas microalgas, no entanto, quando expostas a condições de estresse — *e.g.*, carência nutricional ou altas intensidades de luz — acumulam inclusões lipídicas na forma de TAGs. Esse acúmulo de TAGs demanda gasto de energético e, sucessivamente, leva à queda da taxa de crescimento e, por fim, à queda da produtividade (Klok *et al.*, 2014).

As principais etapas relacionadas à produção de biodiesel por microalgas são descrito por: (i) prospecção e seleção de espécies microalgas com alto teor de lipídeos neutros, característica desejável para o processo; (ii) o cultivo propriamente dito destes microrganismos em tanques do tipo *raceaway* ou fotobiorreatores com alta exposição à luz solar ou artificial; (iii) a coleta da biomassa; (iv) a extração do conteúdo lipídico da célula a partir de técnicas que lisem o microrganismo e purifiquem a biomolécula de interesse; (v) o processo transesterificação dos triacilgliceróis na fração de ésteres que irão compor o biodiesel; e (vi)

finalmente, a etapa de refino do biodiesel para separação de impurezas e comercialização do produto final (Figura 11) (Chhandama *et al.* (2021).

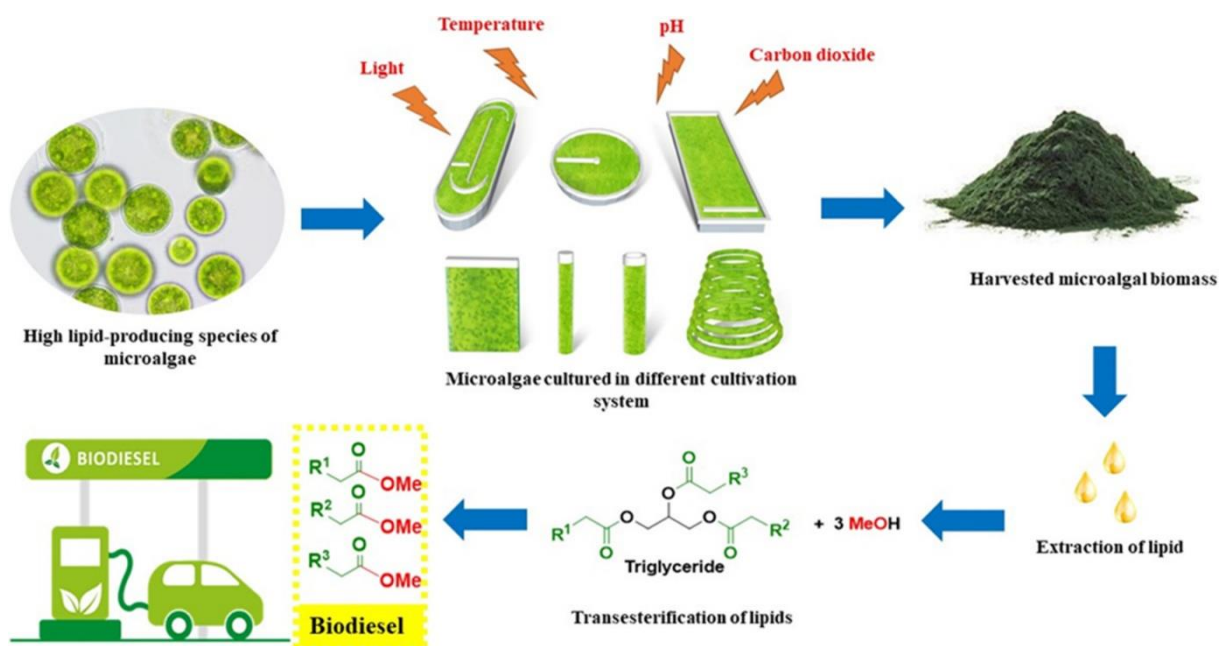


Figura 11. Pipeline de produção de biodiesel de 3ª geração a partir da extração de lipídeos neutros de microalgas. As principais etapas correspondem à prospecção e seleção de microalgas com alto teor de lipídeos neutros, o cultivo destes microrganismos em tanques do tipo *raceaway* ou fotobiorreatores, a coleta da biomassa, a extração do conteúdo lipídico da célula, o processo transesterificação dos triacilgliceróis e, finalmente, a etapa de refino do biodiesel para separação de impurezas. Figura retirada de Chhandama *et al.* (2021).

Dentre essas etapas, a coleta de microalgas são atualmente caras por causa de os altos requisitos de energia e custos de capital envolvidos. Isso ocorre uma vez que a maioria das espécies são pequenas células unitárias e, por sua vez, a centrifugação é frequentemente usada como método de coleta. No entanto, devido à baixa concentração de ($<3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), a centrifugação requer uma grande capacidade de processamento do material, o que torna o processo oneroso e aumenta a demanda de tempo necessária (Estime, Ren e Sureshkumar, 2017). Recentemente, tem-se investido em metodologias que utilizem a floculação, seguido de sedimentação, a fim de substancialmente reduzir os custos de coleta e as necessidades de energia operacional do processo (Chhandama *et al.*, 2021). Além disso, outro gargalo do processo é a extração dos óleos presentes nas inclusões lipídicas. A maioria das células são, em geral, relativamente pequenas e parede celular espessa. Por isso, geralmente condições muito adversas precisam a serem empregadas como a aplicação de tensão de cisalhamento sob o corpo celular (Wang e Lan, 2018).

Logo, é esperado que as espécies empregadas durante esse processo possuam algumas características desejáveis (Figura 12). São estas: (i) células devem apresentar tolerância a altas

concentração de oxigênio, uma vez que o oxigênio produzido durante da fotossíntese deve ser desgaseificado durante o bioprocessamento e concentrações que excedem a atmosfera suprimem a via fotossintética (Ku e Edwards, 1977); (ii) robustez durante o cultivo, *i.e.*, estabilidade e resistência a patógenos; (iii) a simultaneidade entre as etapas de crescimento e acúmulo de lipídeos neutros, dado que geralmente o acúmulo destes lipídeos leva à redução da taxa de crescimento; (iv) células com maior diâmetro médio com parede celular e membrana pouco robustas, a fim de facilitar o processo de liberação das inclusões lipídicas para a extração; e (v) a capacidade de formação de flocos a fim de facilitar a coleta final após o cultivo (Wijffels e Barbosa, 2010).

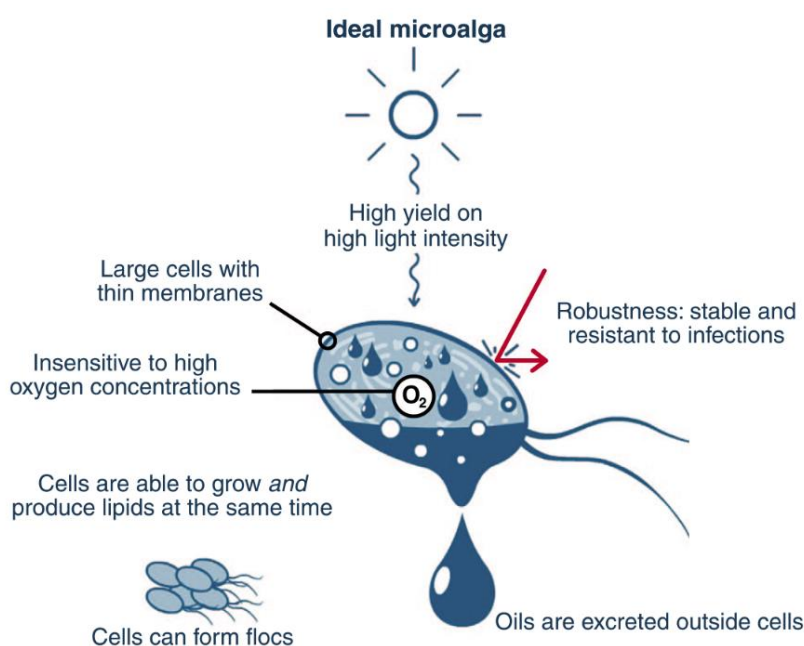


Figura 12. Características desejáveis de microalgas utilizadas na produção de biodiesel. É desejável que as células apresentem tolerância a altas concentrações de oxigênio, robustez durante o cultivo (*i.e.*, estabilidade e resistência a patógenos), a simultaneidade entre as etapas de crescimento e acúmulo de lipídeos neutros, células com maior diâmetro médio com parede celular e membrana

pouco robustas e a capacidade de formação de flocos a fim de facilitar a coleta final após o cultivo. Figura retirada de Wijffels e Barbosa (2010).

Dentro do cenário brasileiro, em 2005, foi promulgada a Lei nº 11.097/2005 (Brasil, 2005), conhecida como Lei do Biodiesel, que define biodiesel como qualquer combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores diesel e dispõe sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Nesse sentido, alguns países como o Brasil possuem programas de mistura obrigatória de biodiesel ao diesel em proporções. Em dezembro de 2004, o governo federal lançou, com base em decretos presidenciais anteriores, o Programa Nacional de Produção e Utilização de Biodiesel (PNPB), que estabeleceu as condições legais para a inclusão do biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2005, houve regulamentação pelo congresso nacional através da Lei 11.097/05 (Prates, Pierobon e Costa, 2007). Este regulamento estabeleceu que todo o diesel

comercializado em território nacional a partir de janeiro de 2008 deveria possuir 2% de biodiesel na sua composição até 2013, altura em que se previa que esta proporção passasse para 5%. Contudo, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) determinou que em julho de 2008 essa proporção aumentaria para 3% e, por fim, por motivos diversos, antecipou-se a partir de 2010 a utilização obrigatória na proporção de 5% que estava prevista para 2013 (Ramos e outros, 2011). Portanto, consolidou-se como marco estratégico, uma vez que garantiu que o Brasil iniciasse a produção de biodiesel, o que poderá gerar desenvolvimento, emprego e renda no campo. Atualmente, a Resolução CNPE nº 16, de 29 de outubro de 2018 e o Despacho ANP nº 621, de 06 de agosto de 2019 estabelecem que a proporção máxima de biodiesel no diesel deverá atingir 15% até 2024, sendo atualmente de 12%.

Logo, o desenvolvimento e a aplicação de nanoferramentas baseadas em NMOBs em etapas consideradas gargalos de produção pode contribuir para o melhoramento do processo e necessita ser avaliado em pontos críticos como a coleta de microalgas e a modulação do teor de lipídeos neutros por célula.

1.3. Despejo e tratamento de efluentes da indústria têxtil: contexto atual e desenvolvimento de novas tecnologias

Desde o patenteamento da produção e comercialização em larga escala da mauveína (*i.e.*, anilina púrpura ou malva de Perkin), descrita por William Perkin em 1857, os corantes sintéticos têm sido usados em diferentes indústrias, dada o retorno de mercado do produto. Desde então, os corantes sintéticos têm sido utilizados em diversas indústrias, incluindo tingimento de tecidos na indústria têxtil, a produção de alimentos e setor farmacêutico (Lin *et al.*, 2023). Dentro desse cenário, as indústrias têxteis são os maiores geradores de poluição aquática por esse tipo de substâncias (de Almeida *et al.*, 2014). Além disso, esta classe de poluentes é de alta importância para o Brasil, uma vez que nele está instalado o quarto maior parque produtivo do mundo, com uma produção média anual de 1,3 milhões de toneladas de tecidos (ABIT, 2019). Esse setor é, ainda, um forte segmento produtivo do Estado do Rio de Janeiro, contando com aproximadamente 330 indústrias instaladas (Firjan, 2018). No entanto, aproximadamente 80% das águas residuais contendo corantes produzidas são despejadas sem qualquer tipo de em cursos de água ou utilizadas diretamente para irrigação no setor agrícola, causando impactos prejudiciais na saúde humana e nos ecossistemas (Islam *et al.*, 2023).

Portanto, os corantes sintéticos não tratados causam diversos impactos ecotoxicológicos, sendo os principais: (i) a perda da capacidade fotossintetizante do zooplâncton e macrófitas pelo bloqueio da entrada de luz e, conseqüentemente, redução da taxa de crescimento destes microrganismos impactando a produtividade primária e, sucessivamente, toda a cadeia trófica em seqüência; (ii) a perda da coordenação de nado em peixes, além de problemas relacionados à disfunção fisiológica em diversos, a bioacumulação destes compostos, a redução do teor de proteína e lipídeos e, conseqüentemente, resultando em perdas de produtividade na piscicultura; (iii) a redução da fertilidade de solos, desestruturação da comunidade microbiana e redução do tamanho de plantas que são irrigadas por estas águas; e (iv) a toxicidade ao sistema nervoso, carcinogênese, a bioacumulação de corantes em tecido adiposo e o aumento da frequência de reações de hipersensibilidade em humanos (Figura 13) (Lin *et al.*, 2023). Logo, os impactos estão ligados à natureza química destes poluentes, tornando-os pouco biodegradáveis e com perfis complexos de toxicidade para organismos aquáticos (Cai *et al.*, 2020; Lellis *et al.*, 2019).

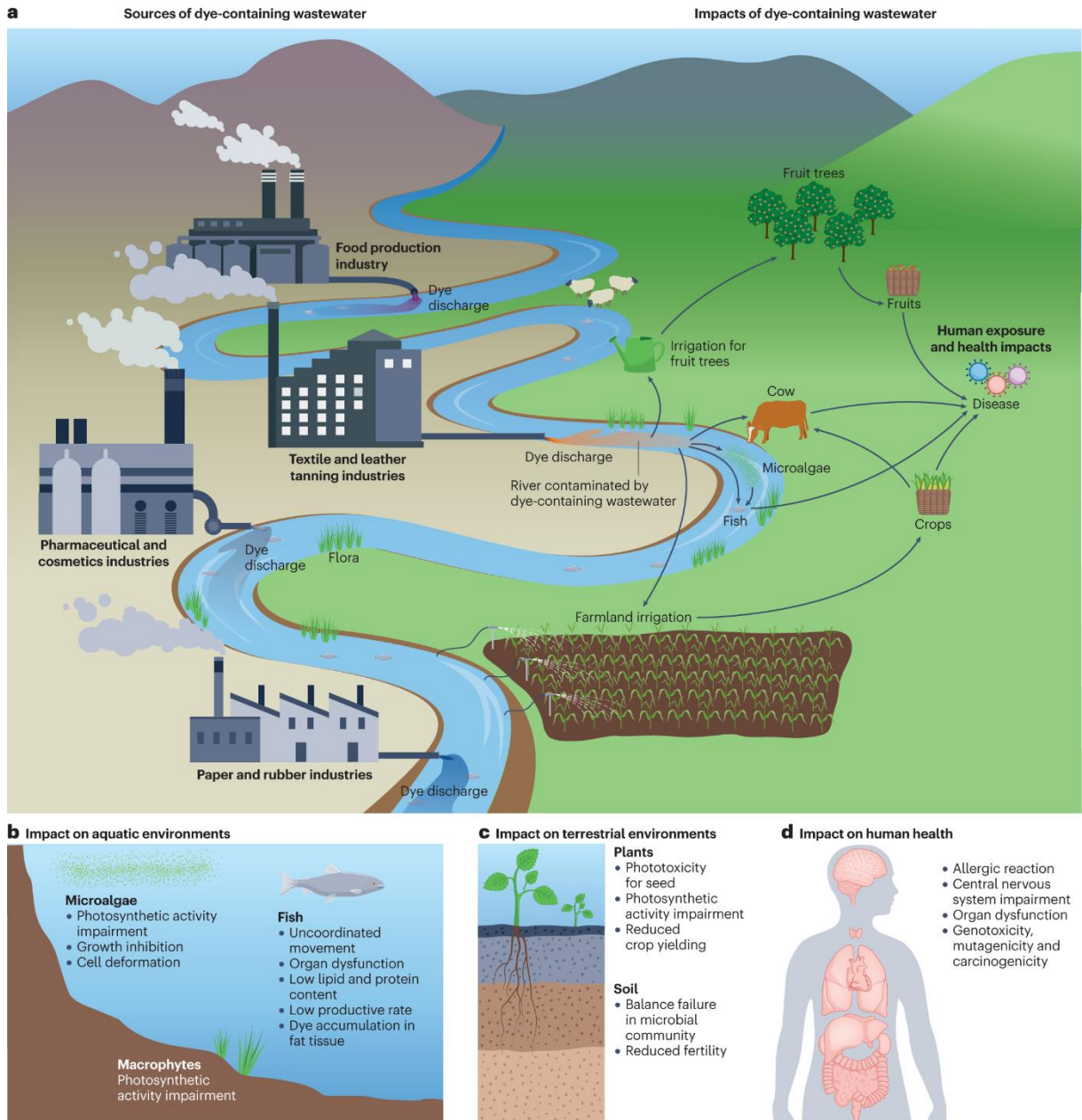


Figura 13. Impacto ecotoxicológico do despejo de efluentes não tratados em corpos hídricos. Dentre os impactos mais comuns estão: (i) à perda da capacidade fotossintetizante do zooplâncton pelo bloqueio da entrada de luz; (ii) inibição do crescimento de microrganismos aquáticos; (iii) disfunção em órgãos e bioacumulação dos corantes em peixes; (iv) redução da fertilidade de solos e redução do tamanho de plantas; e (v) toxicidade ao sistema nervoso, carcinogênese e reações de hipersensibilidade em humanos. Figura retirada de Lin *et al.* (2023).

Atualmente, os processos de tratamento tradicionais removem apenas frações dos corantes em efluentes da indústria têxtil, de tal forma que os corpos hídricos permanecem vulneráveis aos impactos provocados após seu despejo (Cardoso *et al.*, 2016). Dentre as tecnologias atualmente empregadas e, em desenvolvimento, incluem: (i) a biocatálise e biorremediação utilizando microrganismos e seus subprodutos enzimáticos como lacases, azoredutases e peroxidases para descoloração das moléculas; (ii) a foto- e eletrocatalise

utilizando catalisadores com Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , entre outros, baseados em reações de peroxidação (e.g., reação de Fenton) e oxidação destes compostos; (iii) processos eletroquímicos como floculação; e (iv) separação física por filtração e adsorção em membranas (e.g., micro-, ultra- e nanofiltração seguida de osmose reversa) (Lin *et al.*, 2023). Somado a isso, NPs vêm sendo cada vez mais utilizadas no desenvolvimento de nanoferramentas capazes de detoxificar estes poluentes, principalmente requerendo a sua funcionalização com moléculas orgânicas e grupos funcionais, tais como amina (NH_2 e seu estado protonado NH_3^+), carboxila (COOH e seu estado desprotonado COO^-), hidroxila (OH) e cadeias carbônicas alifáticas e aromáticas, aumentando o a rede de interações intermolecular, como ligações de hidrogênio (*H-bonds*, do inglês *Hydrogen bonds*), atrações eletrostáticas (i.e., pontes salinas) e interações hidrofóbicas e pi-pi (Figura 14).

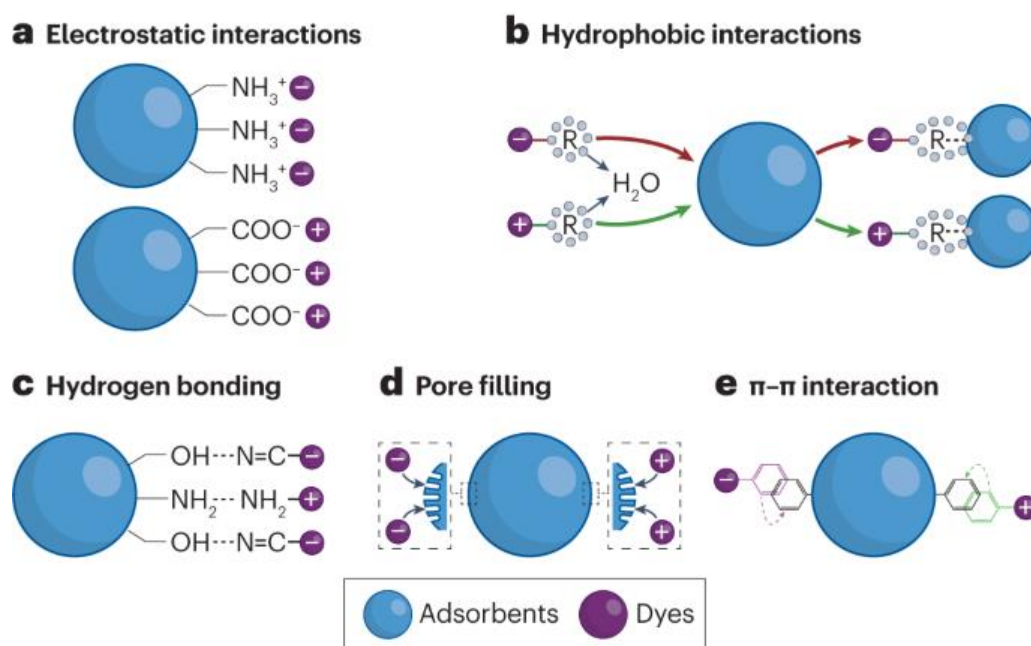


Figura 14. Funcionalizações propostas em NPs para remoção de corantes em corpos hídricos. **A.** Funcionalização com grupos funcionais amina e carboxila para a promoção de interações eletrostáticas (i.e., pontes salinas) para a adsorção dos corantes à NP. **B.** Atração por interações hidrofóbicas entre grupos funcionais hidrofóbicos nas NPs (e.g., funcionalização com cadeias alifáticas) e porções alifáticas ou aromáticas de corante sintéticos. **C.** Interação dos corantes com NPs por interações polares como ligações de hidrogênios. **D.** Interação por preenchimento dos poros das NPs pelos corantes sintéticos. **E.** Interação do tipo pi-pi (e.g., empilhamento ou *T-shaped*) entre a porção aromática do corante e a NP funcionalizada com grupamentos aromáticos como cadeias laterais dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. Figura retirada de Lin *et al.* (2023).

Além disso, Correa (2021) reportou a capacidade de degradação (i.e., descoloração) do corante azul de metila, de utilização rotineira na indústria têxtil, utilizando NMOBs de *Mv. blakemorei cepa MV-1^T*. Nesse estudo, foi possível observar que a degradação do corante, principalmente associada à degradação da porção organo-conjugada da molécula. O efeito foi relacionado à presença da membrana que envolve a NMOB — em condições que empregaram

ou não a adição de H_2O_2 — sugerindo que a degradação observada provavelmente não foi realizada pela reação de Fenton, mecanismo comum utilizado em plantas de tratamento de efluente (Sadegh *et al.*, 2021), e sim a um fenômeno catalítico intrínseco à NMOB. No entanto, o mecanismo e a biologia estrutural do fenômeno não foram elucidados à época.

2. Justificativa

Nanopartículas (NPs) são materiais de escala nanométrica de diferentes matrizes (e.g., natureza polimérica, inorgânica, lipídica, magnética, etc.) que podem ser aplicados em diferentes setores da Biotecnologia desde a Nanomedicina até o desenvolvimento de soluções para problemas industriais. Portanto, há uma demanda global crescente por NPs e estima-se que esse mercado atinja a marca de US\$ 173 bilhões em 2025, conforme a taxa anual de crescimento de 18% (Gharailou, 2018). Neste cenário, encontram-se as nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxidos de ferro, um dos pilares deste mercado, que crescem cerca de 11% ao ano, sendo projetada para crescer US\$ 5 bilhões no ano de 2023. Atualmente, destacam-se as indústrias de sensores, cosméticos, materiais de construção, farmacêuticas e de tratamento de efluentes como sendo as que possuem o maior número de produtos e patentes envolvendo NPs registrados. Ao considerarmos a América Latina, contexto ao qual nosso país está inserido, Brasil e México são os maiores desenvolvedores de NPs, ao passo que os setores de construção civil, cosméticos e automobilístico despontam no número de produtos registrados (NanoPowder Factory, 2020). Considerando o avanço crescente na área, há carência de tecnologias que solucionem problemas relacionados à área ambiental, à industrial têxtil e à Nanomedicina.

Logo, tecnologias relacionadas ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de nanopartículas magnéticas são necessárias no cenário global e no contexto continental. Por sua vez, NMOBs são organelas procarióticas contendo magnetita biomineralizadas por BMs que vêm sendo estudadas nos campos da Nanomedicina e Nanobiotecnologia nos últimos anos. Estas nanopartículas possuem diversas propriedades, tais como: (i) a sua permanente magnetização por serem constituídas de um monodomínio magnético; (ii) alto grau de pureza química; (iii) propriedades magnéticas e cristalográficas bem definidas; (iv) síntese sob tamanho delimitado entre a faixa de 30 a 120 nm; (v) presença de membrana biológica que reveste o núcleo mineral da NP com proteínas de membrana espécie-específica, conferindo carga global negativa à NP; (vi) resistência térmica e ambiental; e (vii) boa dispersibilidade em meio aquoso (Vargas *et al.*, 2018). Deste modo, esse rol de características as tornam vantajosas em relação às NPs magnéticas de origem sintética, a depender do campo de aplicação.

A maior parte dos estudos de cultivo de BMs para produção de NMOBs está concentrada em BMs do gênero *Magnetospirillum* — *i.e.*, *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 — correspondente a um gênero de alfaproteobactérias magnetotáticas que biomineralizam magnetossomos cuboctaédricos de diâmetro médio de 40

µm, em estratégias de cultivo por batelada alimentada e cultivo contínuo (Heyen e Schüller, 2003; Zhang *et al.*, 2011). Logo, o estabelecimento de novos bioprocessos que utilizem novas BMs com magnetossomos de diferentes morfologias (*i.e.*, conteúdo de magnetita por partícula) que podem afetar a resposta magnética da nanopartícula bem como a caracterização de novas proteínas de membrana espécie-específica são mandatórios em Biotecnologia. Portanto, o estabelecimento do cultivo em batelada de *Mf. australis* cepa IT-1, faz-se necessário, uma vez que esta é capaz de biomineralizar magnetossomos octaédricos alongados de magnetita com proteínas de membrana ainda não caracterizadas na literatura bem como não há relatos de bioprocessos que empreguem o cultivo de cocos magnetotáticos. Ademais, a BM foi isolada a partir de amostras da Lagoa de Itaipu, Niterói (RJ), o que favorece o desenvolvimento de tecnologia e processo desenvolvido em território nacional, isto é, desde a bioprospecção e isolamento da BM em 2014 até o escalonamento de seu cultivo em biorreator de bancada para aplicações biotecnológicas de suas NMOBs (Morillo *et al.*, 2014). Além disso, a estratégia de cultivo em microaerofilia torna-se vantajosa devido à sustentabilidade provocada pela eliminação do uso de gases estufa com óxido nitroso (N₂O), além de ser menos onerosa devido à utilização do O₂ disponível na atmosfera como fonte deceptor final de elétrons para a respiração celular durante todo o bioprocessos (Correa *et al.*, 2022).

Conseqüentemente, uma vez estabelecido seu cultivo em batelada, a caracterização de suas NMOBs e aplicações em novos processos é fundamental. Nesse contexto, abordagens que visam a saúde ambiental foram escolhidas como diretrizes desta tese. Portanto, NMOBs isoladas de *Mf. australis* cepa IT-1 foram utilizadas em processos de separação magnética de microalgas. Microalgas são fototróficos unicelulares importantes no ciclo do carbono na natureza (*e.g.*, mitigação das emissões de CO₂ e produção de mais da metade do O₂ atmosférico disponível no globo) e podem ser utilizadas para produção de biodiesel de 3^a geração, uma vez que acumulam inclusões de lipídeos neutros (*e.g.*, triacilgliceróis) (Wijffels e Barbosa, 2010). Tais lipídeos podem ser extraídos, processados e convertidos em biodiesel, promovendo uma alternativa sustentável à natureza não renovável das matrizes fósseis utilizadas atualmente. Dois aspectos importantes na produção do biodiesel de 3^a geração são a modulação do conteúdo lipídico e a coleta de microalgas após o cultivo. Logo, o desenvolvimento de nanoferramenta baseada em NMOBs que permite a separação magnética do material suspenso em cultivo pode representar ganho para o processo dada a natureza da NP, o perfil de interação com as microalgas e a provável capacidade de reuso em novos bioprocessos. Ademais, iniciativas públicas como o estabelecimento da Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

(PNPB) e a regulamentação pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 são importantes para a consolidação do biodiesel na matriz energética brasileira e para o fomento de novas tecnologias que viabilizem cada vez mais a inserção de biocombustíveis no mercado nacional (Brasil, 2005).

Além disso, outro campo de aplicação avaliado para as NMOBs foi o tratamento de efluentes industriais. Nesse sentido, o Brasil representa o 4º maior parque produtivo da indústria têxtil — *e.g.*, produção média anual de 1,3 milhão de toneladas de tecidos — e um dos principais rejeitos são efluentes com altas concentrações de corantes sintéticos. Além disso, o estado do Rio de Janeiro contém atualmente 330 indústrias regulamentadas que operam no setor (Firjan, 2018). A poluição causada por corantes sintéticos afeta corpos d'água uma vez que bloqueiam a passagem da luz na coluna d'água e prejudicam a taxa fotossintética de microrganismos e plantas aquáticas, além terem baixa biodegradabilidade e alta toxicidade à vida aquática e ao ser humano. Nesse sentido, NPMs já vem sendo empregadas em processos de descoloração por peroxidação de corantes baseado na reação de Fenton (Lin *et al.*, 2023). No entanto, dada à natureza das NMOBs, sua aplicação no tratamento de efluentes de indústrias têxteis pode representar ganho no processo devido às propriedades únicas relacionadas à química de superfície da NP, a presença de proteínas de membrana espécie-específicas e o potencial de reusabilidade das mesmas, promovendo uma alternativa mais sustentável ao processo. Logo, o estudo racional da base molecular da interação de efluentes como corantes utilizados pela indústria têxtil com as proteínas de membrana das NMOBs é de extrema importância para a compreensão do mecanismo de remoção/degradação do poluente. Além disso, tal estratégia permite o desenvolvimento e melhoramento da tecnologia a partir de diferentes afinidades de interação em proteínas de membrana espécie-específicas para cada tipo de NMOB, dado que até o momento estas propriedades não foram exploradas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Estabelecer e caracterizar o cultivo do coco magnetotático *Mf. australis* cepa IT-1 em batelada em biorreator de bancada operando em microaerofilia, e, posteriormente, utilizar as NMOBs biomineralizadas por esta BM em aplicações biotecnológicas como separação magnética de microalgas de interesse para a produção de biocombustível. Além disso, pretende-se compreender a base molecular da degradação de corantes por NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T através da bioinformática estrutural.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Caracterização do cultivo em batelada da BM *Mf. australis* cepa IT-1 e da produção de NMOBs octaédricas alongadas

- Caracterização do cultivo em microaerofilia (*i.e.*, dO₂ 2,0%) de *Mf. australis* cepa IT-1 através do monitoramento da taxa de crescimento (μ) por DO_{600nm} e correlação com contagem previamente estabelecida em microscopia óptica;
- Análise de produtividade ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) e produção ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de magnetita durante o bioprocessos;
- Monitoramento da disponibilidade de nutrientes (*i.e.*, Fe²⁺ e nitrogênio amínico/amoniaco livre) e O₂ dissolvido (dO₂%);
- Cálculo do coeficiente de transferência de massa ($k_L a$) e saturação dos gases O₂ e N₂ no meio de cultivo;
- Extração de NMOBs por disrupção ultrassônica, purificação por concentração magnética, caracterização e controle de qualidade por microscopia eletrônica de transmissão e potencial zeta (ζ);
- Estimativa de parâmetros das NMOBs como: área de superfície (a_s), volume (v), massa magnetita média por cada unidade de NMOB (m_{NMOB}) e por célula (m_{cel});

3.2.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

- Cultivo de microalgas dos gêneros *Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Monoraphidium*, *Nannochloropsis* e *Dunaliella* em meio BG11 em fotoperíodo 12h/12h;
- Caracterização do impacto da alteração de pH e da concentração de Ferro no meio através de monitoramento morfológico por microscopia óptica em contraste interferencial diferencial (DIC, do inglês *differential interference contrast*) e da avaliação do teor de lipídeos neutros por fluorimetria;
- Ensaio de floculação e separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T e *Mf. australis* cepa IT-1 com variação de pH em tampão citrato e observação em microscopia óptica em DIC;
- Desafio do ensaio de separação magnética utilizando NPMSs;
- Planejamento experimental para construção de superfície de resposta baseada na separação magnética de microalgas variando condições de pH e salinidade;

3.2.2. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

- Modelagem molecular por homologia de proteínas da membrana de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T pela plataforma SWISS-MODEL integrado ao AlphaFold DB v2 e avaliação da qualidade da construção dos modelos pelas métricas pLDDT, GQME e QMEAN;
- Avaliação de propriedades físico-químicas como massa molecular, pI teórico, assinatura espectrométrica pela razão massa/carga (m/z); e propriedades estruturais como potencial eletrostático de superfície, hidrofobicidade, área de superfície acessível ao solvente e tendência à desordem;
- *Docking* molecular do corante azul de metila proteínas da membrana de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T através do software AutoDock Vina, avaliação dos *scores* (ΔG e RMSD) e do bolsão interação e além da predição da rede de interações intermoleculares;

- Alinhamento da sequência de aminoácidos e alinhamento estrutural do melhor receptor para a interação com o ligante com receptores homólogos presentes na membrana de outras NMOBs utilizadas em Biotecnologia;

4. Metodologia

4.1. Caracterização do cultivo da BM *Mf. australis* cepa IT-1 em batelada e da produção de NMOBs octaédricas alongadas

4.1.1. Propagação do inóculo em meio semissólido heterotrófico com gradiente de O₂

As células de *Mf. australis* IT-1 foram obtidas a partir do banco de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia (LaBMax) da UFRJ. Posteriormente, as células foram ativadas em meio de cultura semissólido EMSH heterotrófico (*i.e.*, acetato e succinato de sódio) com gradiente de O₂ confeccionado em água do mar artificial (ASW, do inglês *artificial seawater*) (Tabela 1) com composição descrita em Morillo *et al.* (2014) (Tabela 2; Tabela 3; Tabela 4). O pH foi ajustado em 7,2 e vertido em tubos. As células foram incubadas a 28°C em estufa por 72 h. Em seguida, as células foram coletadas de 8 tubos e transferidas para 2 garrafas com mesma composição de meio semissólido contendo 150 mL cada. As células foram novamente incubadas a 28°C em estufa por 72 h até o início do bioprocessamento.

Tabela 1. Componentes da água do mar artificial.

Componentes	Quantidade
Água Ultrapura (18,2 MΩ · cm)	1 L
Cloreto de sódio	16,43 g
Cloreto de magnésio	3,49 g
Sulfato de sódio	2,74 g
Cloreto de cálcio	0,386 g
Cloreto de potássio	0,465g

Tabela 2. Componentes do meio semissólido para cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1.

Componentes	Quantidade
Água do mar artificial	1 L
HEPES	3 g
Cloreto de amônia	0,24 g
Bicarbonato de sódio	1,28 g
Acetato de sódio	1 g
Succinato de sódio	1 g
Solução de minerais	5 mL
Resazurina a 0,2%	0,2 mL
L-cisteína	0,6 g
Fosfato dipotássico a 1,86%	4 mL
Quinato férrico a 10mM	2 mL
Solução de vitaminas	0,5 mL
Tiosulfato de sódio a 40%	5 mL
Ágar 0,15%	1,5 g

Tabela 3. Componentes da solução de minerais.

Componentes	Quantidade
Água Ultrapura (18,2 M Ω · cm)	500 mL
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	1,5 g
Sulfato de Manganês II	0,25 g
Cloreto de Sódio	0,5 g
Sulfato de Ferro II	0,05 g
Cloreto de Cobalto II	0,05 g
Cloreto de Cálcio	0,05 g
Sulfato de Zinco II Heptahidratado	0,05 g
Sulfato de Cobre II	0,005 g
Sulfato duplo de Alumínio e Potássio	0,005 g
Ácido Bórico	0,005 g
Molibdato de Sódio Dihidratado	0,005 g
Cloreto de Níquel II Hexahidratado	0,005 g

Tabela 4. Componentes da solução de vitaminas.

Componentes	Quantidade
Água Ultrapura (18,2 M Ω · cm)	100 mL
Tiamina	90 mg
Inositol	40 mg
Pantotenato de cálcio	4 mg
Ácido p-aminobenzóico (PABA)	5 mg
Vitamina B12	5 mg
Piridoxina	4 mg
Niacina	0,1 mg
Ácido fólico	0,04 mg

4.1.2. Confeção do meio do biorreator e controle de parâmetros durante o bioprocesso

O meio líquido utilizado no bioprocesso foi confeccionado para o volume de 10 L para cultivo em batelada simples, em triplicata ($n=3$). Para tal, omitiu-se a adição de bicarbonato de sódio, ágar, L-cisteína e resazurina e substituiu-se a fonte de ferro para sulfato de ferroso a 30 μ M em concentração final. O biorreator contendo o meio confeccionado foi esterilizado em autoclave a 121°C por 30 min junto aos eletrodos de pH e $dO_2\%$, removendo-se o motor de agitação e o termômetro. Após o resfriamento do tanque, os sensores foram ligados na torre de controle para monitoramento em tempo real dos parâmetros.

Os parâmetros definidos foram: (i) agitação a 100 rpm; (ii) temperatura a 28°C; (iii) pH 7,2 e; e saturação de oxigênio dissolvido (dO_2) 2,0 % (*i.e.*, 0,16 mg $O_2 \cdot L^{-1}$) obtida por purga de N_2 com vazão de 1 L \cdot min⁻¹. Não foi realizada alimentação com meio *feed* devido à estratégia de cultivo em batelada simples. A manutenção da $dO_2\%$ foi monitorada com sonda óptica

VisiFerm (Hamilton, EUA) e pulsos diários com O₂ atmosférico e esterilizado pelo sistema de filtração de gases em membrana de PTFE (politetrafluoroetileno) 0,22 µm foram ministrados a fim de manter a saturação em 2,0 % e permitir o metabolismo microaerófilo.

Todos os sensores e controladores de parâmetros que foram durante o bioprocessamento estão numerados. O termômetro foi inserido por tubulação cilíndrica sem contato direto com o meio de cultura, sendo responsável pelo acionamento da manta térmica com resistência elétrica ligada à torre para aquecimento do meio de cultura. O potenciômetro de pH (EasyFerm, Hamilton, EUA) e sensor óptico de pO₂ (VisiFerm, Hamilton, EUA) foram utilizados para monitoramento em tempo real. A saída do amostrador foi acoplada à bomba peristáltica para monitoramento dos parâmetros de cultivo (DO_{600nm}, consumo de Fe e N e análises em microscopia óptica em DIC e TEM). O condensador de refluxo foi montado com filtro PTFE de poro 0,22 µm para evitar perda de água durante o bioprocessamento e alívio da pressão interna durante a purga com N₂. O motor foi acoplado ao eixo central de rotação com impelidores do tipo Rushton e ajustado a 100 rpm durante o cultivo e 200 rpm durante a purga com N₂. A entrada de gás nitrogênio (N₂) para *sparging* (purga) foi acoplada a filtro de PTFE de poro 0,22 µm para esterilização do gás. A torre de controle com sistema operacional fornecido pela empresa foi utilizada para monitoramento dos parâmetros. Houve também um jogo de bombas peristálticas para inóculo e/ou *feed* (alimentação) e ajuste de pH por ácido (HCl 2N) e base (NaOH 2N), que convergem em entrada de alimentação trifurcada.

4.1.3. Monitoramento do crescimento celular

O monitoramento do crescimento celular, a dosagem de nutrientes disponíveis no meio (*e.g.*, Fe²⁺, Nitrogênio amínico/amoniaco), o consumo de dO₂% e a produção e produtividade de magnetita foram monitorados durante 9 dias (216 h) até a fase de declínio ou morte celular (*n*=3). A curva de crescimento foi obtida a partir do monitoramento diário pela aferição da absorbância ($\lambda = 600 \text{ nm}$) e multiplicado pela relação DO (densidade óptica) $1,0 \propto 8,12 \cdot 10^8$ células · L⁻¹, previamente estabelecida por correlação entre contagem em microscopia em DIC e DO pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia (LaBMax). A taxa de crescimento (μ) em escala logarítmica foi descrita pela Equação 1 (Zwietering *et al.*, 1990):

$$\mu = \frac{\log_{10} N_f - \log_{10} N_i}{t_f - t_i}$$

Equação 1. Taxa de crescimento microbiano.

Em que: (i) N_f representa a densidade celular final no intervalo de tempo t_f ; e (ii) N_i representa a densidade celular inicial no intervalo de tempo t_i . Por sua vez, o tempo de geração (g) foi calculado pelas Equações 2 e 3:

$$n = 3,321 \cdot (\log_{10} N_f - \log_{10} N_i)$$

Equação 2. Número de gerações (n).

$$g = \frac{t}{n}$$

Equação 3. Tempo de geração (g).

Em que: (i) n representa o número de gerações em um dado intervalo de tempo t (e.g., neste caso $t = 24\text{h}$); e (ii) g representa o número de gerações no dado intervalo de tempo.

4.1.4. Quantificação do consumo de nutrientes

Foi realizada a quantificação do consumo de ferro e nitrogênio disponíveis no meio durante o crescimento em batelada simples. A quantificação de ferro disponível no meio foi realizada pela reação cromogênica da orto-fenantrolina cuja absorvância foi lida em comprimento de onda (λ) de 510 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Brasil) (Pyenson e Tracy, 1945). Sucintamente, foi montada a reação de cor com 200 μL HCl 2N, 10 μL de solução de ácido ascórbico 0,56 M, 200 μL de tampão acetato de sódio a 2,70 M (pH 4,5 ajustado com ácido acético) e 100 μL de orto-fenantrolina 5,55 mM. Posteriormente, foi adicionado 200 μL de amostra e realizada a leitura. A curva de calibração foi previamente estabelecida baseada na correlação entre a absorvância e o fator de diluições seriadas de FeSO_4 .

A quantificação do nitrogênio disponível no meio foi realizada a reação cromogênica de FAN (do inglês *free aminic nitrogen*) cuja absorvância foi lida em comprimento de onda (λ) de 570 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Brasil) (Lie, 1973). Sucintamente, foram preparados os reagentes de cor (5 g ninidrina, 49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60g KH_2PO_4 e 3g frutose em 1-L de água ultrapura a 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, pH 6,8), reagente de diluição (2 g KI, 384 mL etanol absoluto e Água ultrapura a 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ q.s.p. 1 L) e solução estoque de glicina (0,1072 g glicina em 100 mL de água ultrapura a 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) e solução padrão de glicina (1:100

solução estoque). Em seguida, as amostras foram fervidas por 16 min com 1 mL de amostra e 0,5 mL de reagente de cor, esfriadas em água corrente e adicionadas de 5 mL do reagente de diluição. Em sequência, houve a leitura das amostras e o cálculo de FAN foi determinado pela Equação 4:

$$FAN = A_1 \cdot D \cdot 2 / A_2$$

Equação 4. Determinação da concentração de nitrogênio disponível no meio durante a batelada.

Em que: (i) *FAN* representa a concentração do nitrogênio amínico livre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); (ii) A_1 representa a absorvância da amostra; (iii) 2 representa a concentração de FAN na solução padrão de glicina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); (iv) D é o fator de diluição da amostra; e (v) A_2 representa a absorvância do padrão de glicina.

4.1.5. Monitoramento das características morfológicas por DIC e TEM

Alíquotas diárias do cultivo em batelada simples foram retiradas e um volume 2 μL de BMs foram observadas em gota pendente em microscópio óptico equipado para DIC (AxioImager D2; ZEISS, Oberkochen, Germany) acoplado com câmeras (AxioCam HRm e AxioCam MRc) (Wenter *et al.*, 2009). A técnica foi realizada para conferência diária da ausência de contaminantes e da observação do comportamento magnetotático da BM (*i.e.*, nado antiparalelo ao campo magnético externo gerado pelo posicionamento de ímã de neodímio-boro com h e $l = 0,5$ cm e $c = 1,5$ cm na mesa do microscópio).

Para observação direta em TEM, as células foram depositadas sobre grades de cobre 300 *mesh* com filmes suporte de Formvar (*i.e.*, polivinilformal) e carbono. As grades foram secas com papel filtro e observadas no microscópio FEI Morgagni (FEI Company, Holanda) operado a 80 kV equipado com câmera MegaView G2 (Olympus, Japão). A partir das imagens obtidas, foram medidos comprimento, largura e o fator de forma ($\text{largura} \cdot \text{comprimento}^{-1}$) das células utilizando-se o software iTEM (OLYMPUS, Japão). A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e a inferência estatística foi calculada pelo teste t não pareado utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, California, EUA).

4.1.6. Extração e purificação de NMOBs

Por fim, ao final do período de crescimento em biorreator o volume celular foi coletado em tubos de polipropileno de 50 mL por centrifugação a $6.100 \times g$ a 4°C por 15 min. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão HEPES (20 mM, pH 6,8). As células foram submetidas à lise por ruptura ultrassônica em sonicador de ponteira (VCX 500, Newton, EUA) na amplitude de 20%, frequência de 20 kHz, em 60 ciclos de 60 s com intervalos de 60 s. As NMOBs foram concentradas magneticamente utilizando-se um ímã de neodímio-boro circular ($r = 18$ mm; $h = 6$ mm) por 24 h a 4°C . Em seguida, foram aplicados 4 ciclos de lavagens das NMOBs em tampão HEPES-NaCl (HEPES a 10 mM, NaCl a 200 mM, pH 6,8) durante 30 min e 60 W cada em banho ultrassônico Branson 2200 (Emerson Industrial Automation, Rochester, NY, EUA). Ao final, as NMOBs foram armazenadas em tampão HEPES (20 mM, pH 6,8) a 4°C .

4.1.6. Caracterização e controle de qualidade de NMOBs por TEM e potencial zeta

Para observação direta em TEM, NMOBs foram depositadas sobre grades de cobre 300 *mesh* com filmes suporte de Formvar (*i.e.*, polivinilformal) e carbono. As grades foram secas com papel filtro e dessecador de bancada. As amostras foram observadas no microscópio FEI Morgagni (FEI Company, Holanda) operado a 80 kV equipado com câmera MegaView G2 (Olympus, Tokyo, Japão). A partir das imagens obtidas, foram medidos comprimento, largura e o fator de forma (largura \cdot comprimento⁻¹) das NMOBs utilizando-se o software iTEM (OLYMPUS, Japão). Para medidas de comprimento e largura entre cada morfologia de magnetossomo foi realizada ajuste de regressão linear e distribuição lognormal com valores de R^2 calculados pelo software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, California, EUA).

Como forma de aferir a estabilidade coloidal das NMOBs extraídas, $30 \mu\text{g NMOBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ foram ressuspensas em água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$) e o potencial zeta (ζ) foi medido em analisador ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, EUA) ($n=10$).

Além disso, a massa de magnetita média por cada unidade de NMOB (m_{NMOB}) e por célula ($10 \pm 3 \text{ NMOBs} \cdot \text{cél}^{-1}$) (m_{cel}) foi calculada através do volume e da área estimada para octaedro regular, uma vez que as NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 foram caracterizadas como octaédricas alongadas previamente, possuindo as faces cristalinas $\langle 111 \rangle$ (Equações 5 a 8). Para o cálculo da área de superfície (a_s) e volume (v) da NMOB, foram utilizadas as fórmulas do

octaedro regular com aresta média (a) medida no software iTEM e definida em 103,78 nm, a partir de medições prévias. A densidade (d) da magnetita a $5,17 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (*i.e.*, $5,17 \cdot 10^{21} \text{ g} \cdot \text{nm}^3$) e a média do número de magnetossomos por célula (10) conforme estabelecido previamente por Morillo *et al.* (2014) foram utilizados no cálculo de m_{NMOB} e m_{cel} .

$$a_s = 2a^2\sqrt{3}$$

Equação 5. Cálculo da área de superfície da NMOB.

$$v = \frac{a^3\sqrt{2}}{3}$$

Equação 6. Cálculo do volume de magnetita da NMOB.

$$d = m_{NMOB}/v$$

Equação 7. Cálculo de massa de magnetita média por cada unidade de NMOB (m_{NMOB}).

$$m_{cel} = 10m_{NMOB}$$

Equação 8. Cálculo da massa de magnetita média por célula (m_{cel}).

Em que: (i) a_s é a área de superfície da NMOB; (ii) v é o volume de magnetita da NMOB; (iii) a é a aresta média da NMOB; (iv) d é a densidade de magnetita; (v) m_{NMOB} é massa de magnetita média por cada unidade de NMOB; e (vi) m_{cel} é a massa de magnetita média por célula.

4.1.7. Determinação da transferência de massa dos gases N₂ e O₂

O cálculo de transferência de massa de gases sobre diferentes agitações foi realizado em triplicata ($n=3$) a fim de avaliar a eficiência da purga de N₂ para de deslocamento de O₂ dissolvido no meio, uma vez que é necessária a condição microaerófila em dO₂% ajustada em 2,0 para o cultivo (Waites *et al.*, 2001). A determinação do coeficiente de transferência de massa ($k_L a$) de N₂ e O₂ foi realizada através de medidas da concentração destes gases. Sucintamente, um volume de ASW saturada com O₂ foi diluído com ASW isenta de gases para se obter 10 L a aproximadamente 10 % de dO₂. A solução foi transferida para o biorreator e purgada com N₂ a 1 L · min⁻¹ e sob agitações de 100, 200 e 300 rpm. A concentração inicial de O₂ e o tempo necessário para atingir a leitura zero pelo sensor foram registrados. Ademais, também a concentração de saturação de N₂ também e tempo necessário para atingi-la também foi monitorado. Os dados foram alimentados na Equação 9:

$$-k_L a = \log_{10}(C' - C)/t$$

Equação 9. Transferência de massa de gases (N₂ e O₂).

Em que: (i) $C' - C$ representa a diferença de concentração em cada gás nos pontos aferidos; e (ii) t é intervalo de tempo em min.

4.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

4.2.1. Obtenção e controle de qualidade de NMOBs BMs *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

Foram cultivadas em biorreator de bancada, de forma separada, as BMs *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T e *Mf. australis* cepa IT-1 para posterior extração e obtenção de suas NMOBs. As células de *Mf. australis* cepa IT-1 foram cultivadas e suas NMOBs extraídas conforme descrito no tópico na seção da Metodologia “4.1. Caracterização do cultivo em batelada da BM *Mf. australis* cepa IT-1 e da produção de NMOBs octaédricas alongadas”.

Para a obtenção de NMOBs prismáticas as células de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T foram cultivadas em estratégia de batelada alimentada no meio otimizado previamente formulado por Silva *et al.* (2013) e os parâmetros foram ajustados conforme Correa *et al.* (2022). Sucintamente, os parâmetros de cultura foram estabelecidos como pH 7,0 — ajustado com 1,0 N NaOH ou HCl — com agitação de 100 rpm, 28 °C e O₂ não detectável atingido pela purga de N₂ estéril até a leitura do sensor atingir o zero e posteriormente purga de N₂O por 15 min. Posteriormente, a caracterização e o controle de qualidade das NMOBs extraídas de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T seguiu a metodologia descrita para: (i) obtenção de dimensões de comprimento e largura, além da caracterização morfológica por TEM; e (ii) medida indireta da carga de superfície de estabilidade coloidal por potencial zeta. Tal metodologia foi reproduzida conforme descrito no tópico da seção da Metodologia “4.1.6. Caracterização e controle de qualidade de NMOBs por TEM e potencial zeta”.

4.2.2. Caracterização do impacto da alteração de pH e da concentração de ferro no cultivo, nos parâmetros morfológicos de microalgas e no acúmulo de lipídeos neutros

No primeiro momento, foram caracterizadas a capacidade das células sobreviverem em condições em diferentes fontes de ferro — *e.g.*, cloreto férrico, quinato férrico e sulfato ferroso — em crescentes concentrações e diferentes valores de pH, além de quantificar a presença de lipídeos neutros por célula. As microalgas pertencentes às espécies *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp. e *Dunaliella* sp. foram cultivadas na condição padrão em meio BG11 (0,17M NaCl, 0,08 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0,11 mM K₂HPO₄, 5 mL · L⁻¹ de solução de Minerais de Wolfe, 0,33 mM ureia, 1,41 mM NaHCO₃, 0,15 μM FeCl₃, pH 8,0) a 28° em fotoperíodo 12h/12h. Para o cultivo de *Nannochloropsis* sp. foi utilizado o mesmo com alteração de 0,17 M para 0,68 M NaCl. As células foram gentilmente cedidas pelo setor de Biotecnologia do Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello da Petrobras (CENPES - Petrobras), coordenado pelo pesquisador Leonardo Bacellar.

Os 5 tipos celulares foram cultivados por 7 dias e o crescimento foi monitorado por DIC e absorbância em $\lambda = 680$ nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Brasil). A relação DO_{680nm} e densidade celular foi previamente estabelecida por microscopia óptica em DIC. Foram empregadas variações relacionadas: (i) à fonte de ferro utilizada, sendo realizados testes com cloreto férrico, quinato férrico e sulfato ferro; (ii) à concentração de ferro disponível no meio descrito como concentração Padrão, 10×, 100× e BM× (*i.e.*, quantidade equivalente para o cultivo de BMs, representando $\approx 200\times$); e (iii) ao pH ajustado para o crescimento, sendo o controle estabelecido em pH 8,0 e testadas duas condições, sendo em pH 5,0 e pH 11,0. A partir das imagens obtidas em DIC, foram medidos comprimento, largura e o fator de forma (largura · comprimento⁻¹) das microalgas utilizando-se o software iTEM (OLYMPUS, Japão). A inferência estatística pelo teste de ANOVA de duas vias com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad, EUA).

As microalgas foram marcadas com Vermelho do Nilo (Ref: N1142; Thermo Fisher, EUA) para dosagem do teor de lipídeos neutros por célula nas condições: (i) concentração de Fe³⁺ disponível no meio, ou seja, concentração padrão, 10× e BM×; e (ii) nas condições de pH 5,0, 8,0 e 11,0. Sucintamente, o material foi fixado em paraformaldeído a 4% em concentração final, lavado 3 vezes em PBS 1×, incubado com Vermelho do Nilo 1 μg · mL⁻¹ por 5 min e lavado novamente 3 vezes em PBS 1×. As amostras foram lidas em fluorímetro FLx800 (Bio-

Tek Instruments, EUA) nas condições: (i) pico de excitação em 614 nm e pico de emissão em 665 nm para clorofila b; (ii) pico de excitação em 552 nm e pico de emissão a 636 nm para Vermelho do Nilo em DMSO. A razão da intensidade de fluorescência por célula foi calculada e a inferência estatística pelo teste de ANOVA de duas vias com pós-teste de comparações múltiplas de Sidak foi calculada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad, EUA).

4.2.3. Ensaio de separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T com variação de pH em tampão citrato

Foi realizado o ensaio de separação magnética das espécies de microalgas *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *Dunaliella* sp. e *Nannochloropsis* sp. após a interação com NMOBs octaédricas alongadas de *Mf. australis* cepa IT-1 em condições de alteração de pH em tampão citrato (87,4 mM citrato de sódio dihidratado e 12,6 mM ácido cítrico; pH 3,1, 4,8 e 6,4) e tampão fosfato (75,41 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O e 24,59 mM NaH₂PO₄ · H₂O; pH 7,2) que levam à protonação da superfície celular das microalgas. Foram utilizadas 80 µg NMOBs · mL⁻¹ frente a faixas de densidade celular de 3 · 10³ a 1,2 · 10⁴ células · mL⁻¹. Sucintamente, as células foram coletadas, lavadas em PBS 1× e ressuspensas nas condições acima mencionadas em tampão citrato ou tampão fosfato. Posteriormente, as células foram incubadas por 5 min com as NMOBs e a concentração magnética foi realizada utilizando ímã de neodímio-boro circular ($r = 18$ mm; $h = 6$ mm) posicionado na parede do tubo por 30 segundos.

A taxa de recuperação foi medida pela DO em comprimento de onda de 680 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Brasil) realizando-se a subtração entre a quantidade de células suspensas previamente à adição e interação com as NMOBs e, posteriormente, pela coleta do sobrenadante com permanência do material magneticamente concentrado na parede do microtubo. A inferência estatística pelo teste de ANOVA de duas vias com pós-teste de comparações múltiplas de Sidak foi calculada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad, EUA). Também foi realizado o ajuste de polinômio do 2º grau — *i.e.*, quadrático — para as taxas de recuperação dos cinco tipos celulares testados. Por fim, o resultado foi validado utilizando NMOBs *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T para taxa de recuperação mais e menos eficiente obtidos seguindo todas as etapas do ensaio acima descrito.

4.2.4. Desafio do ensaio de separação magnética utilizando NPMSs

Os resultados obtidos nos ensaios de separação magnética realizados com NMOBs foram desafiados utilizando NPMSs com faixa de tamanho próxima (Ref: 637106, Sigma-Aldrich, EUA). Sucintamente, o ensaio foi repetido utilizando NPMSs nas mesmas condições de pH em tampão citrato (pH 3,1, 4,8 e 6,4) e tampão fosfato (pH 7,2), sob o mesmo tempo de interação e concentração magnética — *i.e.*, 5 min e 30 s, respectivamente — sob a mesma concentração das NMOBs utilizadas — *i.e.*, $80 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{mL}^{-1}$ e sob a mesma faixa de densidade celular — *i.e.*, $3 \cdot 10^3$ a $1,2 \cdot 10^4$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$ — para as cinco espécies previamente descritas. O cálculo da taxa de recuperação e a inferência estatística foram realizados da mesma forma, conforme descrito no tópico “4.2.3. Ensaio de separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T com variação de pH em tampão citrato”.

4.2.5. Construção de superfície de resposta da separação magnética de microalgas variando condições de pH e salinidade

Foi realizado o cultivo de microalgas das espécies *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp. utilizando meio BG11, conforme descrito anteriormente. Contudo, a salinidade necessária ao crescimento das duas espécies foi ajustada de tal forma que foi adicionado $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl aos meios de cultura para *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp., respectivamente. Posteriormente, as algas foram coletadas e ressuspensas em soluções de tampão citrato em diferentes salinidades, conforme delineado em planejamento experimental.

O planejamento experimental realizado foi do tipo Box-Benkhen para duas variáveis, *i.e.*, pH e salinidade (indiretamente conferida pela concentração de NaCl presente no meio), em três níveis para cada variável. As faixas de pH para ambas as espécies foram os valores de 3,1, 4,8 e 6,4, relativas aos níveis -1, 0 e +1. As faixas de salinidade, indiretamente conferida pela adição de NaCl no meio, foram: (i) os valores de 0, 5 e $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, relativas aos níveis -1, 0 e +1, respectivamente, para *Scenedesmus* sp.; e (ii) os valores de 0, 20 e $40 \text{ g NaCl} \cdot \text{L}^{-1}$, relativas aos níveis -1, 0 e +1, respectivamente, para *Nannochloropsis* sp. O desenho do planejamento, a geração da matriz do modelo, o cálculo dos coeficientes e a plotagem dos resultados foram realizadas utilizando o software Microsoft Excel 2016 (Microsoft, EUA). O planejamento obedeceu ao modelo descrito abaixo (Equação 10):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$$

Equação 10. Polinômio do segundo grau utilizado para cálculo dos coeficientes e ajuste do modelo.

Após a ressuspensão das células em cada condição prevista no planejamento do tipo Box-Benkhen, foi adicionado suspensão de NMOBs prismáticas extraídas de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T na concentração final de 80 µg Fe₃O₄ · mL⁻¹. O ensaio de recuperação magnética, o cálculo da taxa de recuperação e a inferência estatística foram realizados da mesma forma, conforme descrito no tópico “4.2.3. Ensaio de separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T com variação de pH em tampão citrato”.

4.2.6. Avaliação do impacto da concentração de NMOBs sob a taxa de recuperação celular e desafio contra NPMSs e flocculante catiônico

O impacto da alteração da concentração de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T sobre a taxa de recuperação celular também foi avaliado em condições de salinidade crescente para *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp. Logo, foram testadas as condições de 0,8 µg · mL⁻¹, 80 µg · mL⁻¹ e 800 µg · mL⁻¹ para ambos os tipos celulares e a variação de salinidade seguiu o delineamento experimental descrito no tópico “4.2.5. Construção de superfície de resposta da recuperação magnética de microalgas variando condições de pH e salinidade”. O cálculo da taxa de recuperação e a inferência estatística foram realizados da mesma forma, conforme descrito no tópico “4.2.3. Ensaio de flocculação e separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T com variação de pH em tampão citrato”.

Por fim, a taxa de recuperação das NMOBs foi desafiada na condição de pH 3,1 e meio contendo 40 g NaCl · L⁻¹ para *Nannochloropsis* sp. O desafio foi feito utilizando NPMSs na mesma concentração de uso das NMOBs e utilizando o flocculante catiônico como controle, (cedido pelo grupo de Biotecnologia do Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello da Petrobras (CENPES-Petrobras), de composição sigilosa, porém empregado rotineiramente na flocculação das espécies pelo grupo). A inferência estatística pelo teste de ANOVA de duas vias com pós-teste de comparações múltiplas de Sidak foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad, EUA).

4.3. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

4.3.1. Modelagem molecular de proteínas de membrana de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

As sequências de aminoácidos das proteínas Mam e Mms presentes nas NMOBs da BM *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T utilizada no ensaio de degradação do corante azul de metila por Correa (2021) foram obtidas pelas bases de dados NCBI Nucleotide e UniProt (Mizrachi *et al.*, 2007; UniProt Consortium, 2015). As propriedades das proteínas de membrana das NMOBs foram calculadas utilizando a plataforma Prot Pi como massa molecular, pI teórico, carga (z) e razão massa/carga dado por m/z (Center for Biochemistry and Bioanalytics, Zurich University of Applied Sciences)

A modelagem molecular das proteínas de membrana das NMOBs foi realizada na plataforma SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018; Bordoli *et al.*, 2009) em algoritmo ProMod3 (Studer *et al.*, 2021) utilizando sequências de referência depositadas no PDB (Burley *et al.*, 2017) ou construídas pelo AlphaFold DB v2 (Ruff *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) integrado à plataforma. Métricas de qualidade local e global por potenciais estatísticos foram calculadas para os modelos gerados, sendo estas: (i) o *Global Model Quality Estimate* (GMQE) (Waterhouse *et al.*, 2018); (ii) *Qualitative Model Energy ANalysis* (QMEAN) (Benkert, Biasini e Schwede, 2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.) e *Qualitative Model Energy ANalysis with Distance Constraints* (QMEANDisCo) (Studer *et al.*, 2020); e (ii) *Predicted Local Distance Difference Test* (pLDDT) (Mariani *et al.*, 2013). Ademais, a probabilidade de inserção transmembrana também foi predita na plataforma e a predição de domínios realizado pelas plataformas Pfam (Mistry *et al.*, 2021) e InterPro (Jones *et al.*, 2014).

A equação de Poisson- Boltzmann (PBE, do inglês *Poisson- Boltzmann equation*), referente ao potencial eletrostático de superfície, foi calculada: (i) utilizando o servidor APBS, preparando a molécula pelo PDB2PQR, aplicando campo de força PARSE, estado de protonação configurado em pH 7,2 com PROPKA (Rostkowski *et al.*, 2021), otimização da rede de ligações de hidrogênio, remoção das moléculas de água do *output*, método de resolução da linearizado PBE, temperatura em 298,15K (25 °C), constante dielétrica do solvente em 78,54, constante dielétrica da proteína em 2,0, definição da *boundary condition* (e.g., condição de fronteira) pelo método de *Single Debye-Huckel*, discretização cúbica por *B-spline* das cargas

pontuais, seleção do modelo de *9-point harmonic averaging* para construção dos coeficientes dielétricos de acessibilidade dos íons e mapeamento de superfície configurado em 10 *grid-points* por \AA^2 (Jurrus *et al.*, 2018); ou (ii) localmente utilizando o plugin “APBS Electrostatics” na ferramenta PyMOL, preparando a molécula pelo PDB2PQR, aplicando campo de força AMBER (Case *et al.*, 2009) método de resolução linearizado da PBE, temperatura em 310,0K (38,85), constante dielétrica do solvente em 78,0, constante dielétrica da proteína em 2,0, definição da *boundary condition* (e.g., condição de fronteira) pelo método de *Single Debye-Huckel*, discretização cúbica por *B-spline* das cargas pontuais, seleção do modelo de *smoothed surface* para construção dos coeficientes dielétricos de acessibilidade dos íons e mapeamento de superfície configurado em 10 *grid-points* por \AA^2 .

A construção da hidrofobicidade da superfície dos modelos foi calculada utilizando a escala de tendência transmembrana definida por (Zhao e London, 2009). A visualização dos modelos construídos foi realizada utilizando as ferramentas UCSF Chimera, UCSF ChimeraX e PyMOL (DeLano, 2002; Pettersen *et al.*, 2004). A área de superfície acessível ao solvente (SAS, do inglês *solvent-accessible surface*) foi calculada através das métricas RSA (do inglês *relative solvent accessibility*) e ASA (do inglês *accessible surface area*) utilizando: (i) o webserver NetSurfP 3.0 (Høie *et al.*, 2022); ou (ii) localmente utilizando “Define Attribute” para cálculo do ASA e “Attribute Calculator” para cálculo do RSA em “Structure Analysis” da ferramenta UCSF Chimera (Sanner, Olson e Spehner, 1996); ou (iii) plugin “APBS Electrostatics” na ferramenta PyMOL, conforme descrito anteriormente, com *probe radius* de 1,4 \AA para o solvente (*i.e.*, água). Também foi calculada a métrica de flexibilidade e rigidez dos modelos descrita como probabilidade de desordem (P_{desordem}) por resíduo utilizando a plataforma NetSurfP 3.0.

4.3.2. Interação proteína-ligante por *docking* molecular e afinidade de ligação

A estrutura molecular do corante azul de metila foi recuperada do PubChem (Kim *et al.*, 2019; PubChem CID 14513727). A docagem molecular foi realizada pelo software AutoDock Vina (Trott e Olson, 2010). Os modelos construídos para as proteínas de membrana da BM (e.g., proteínas Mam e Mms) foram definidos como receptores, o azul de metila como ligante e a caixa de interação no lado citoplasmático das proteínas BM, excluindo o lado do lúmen mangetossomal.

Sucintamente, os parâmetros utilizados na docagem foram: (i) adição de hidrogênios no receptor e no ligante e designação e mesclagem de cargas junto à remoção de pares solitários (*i.e.*, *lone pairs*); (ii) hidrogênios não polares foram removidos; (iii) remoção da solvatação pela água; e (iv) cadeias de resíduos *non-standard* foram ignoradas, porém resíduos *non-standard* foram considerados. Além disso, os parâmetros de número de conformações de interação, exaustividade da busca e máxima diferença de energia foram definidos em 10, 8 e 3, respectivamente. Os resultados da docagem foram classificados pelo menor resultado da função de pontuação de energia e RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) próximos (<2,0). A rede de interação intermolecular foi obtida usando BIOVIA Discovery Studio (Baroroh *et al.*, 2023) e a plataforma PLIP (do inglês *Protein-Ligand Interaction Profiler*) (Salentin *et al.*, 2015) e exibida dentro da distância limite de 5 Å de resíduos próximos ao ligante.

4.3.3. Comparação estrutural do sítio de docagem do ligante em MamZ de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Ms. magneticum* cepa AMB-1

As sequências referentes ao melhor receptor designado pela docagem do corante azul de metila foram recuperadas do UniProt para as espécies *Mf. australis* cepa IT-1, *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (UniProt Consortium, 2015). O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado utilizando o algoritmo do ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) no software MEGA 11 (ref). A visualização da conservação dos aminoácidos foi realizada pela ferramenta Color Align Conservation disponível no Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000). Em sequência, as sequências referentes ao melhor receptor foram modeladas e o controle de qualidade foi realizado conforme descrito no tópico “4.3.1. Modelagem molecular de proteínas de membrana de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T”. Por fim, foi realizado o alinhamento estrutural dos modelos utilizando como referência o modelo do receptor construído para os ensaios de docagem em *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T utilizando os softwares UCFS Chimera e PyMOL.

5. Resultados

5.1. Caracterização do cultivo da BM *Mf. australis* cepa IT-1 em batelada e da produção de NMOBs octaédricas alongadas

5.1.1. Propagação do inóculo e controle de parâmetros durante o bioprocesso

Após a reativação da BM *Mf. australis* cepa IT-1, foi possível observar o crescimento característico em forma de banda em tubos contendo meio heterotrófico semissólido (Figura 15A e B). Tal padrão característico ocorre devido ao consumo de O_2 e, conseqüentemente, as células tendem a se deslocar para a interface entre o meio de cultura e a atmosfera, dentro do tubo. Não houve presença de contaminantes após monitoramento das células em microscopia óptica em DIC durante as etapas de propagação do inóculo e crescimento da célula em biorreator. Dessa forma, garante-se que o crescimento observado e o consumo de nutrientes que foram monitorados são relacionados à BM *Mf. australis* cepa IT-1 (Figura 15).

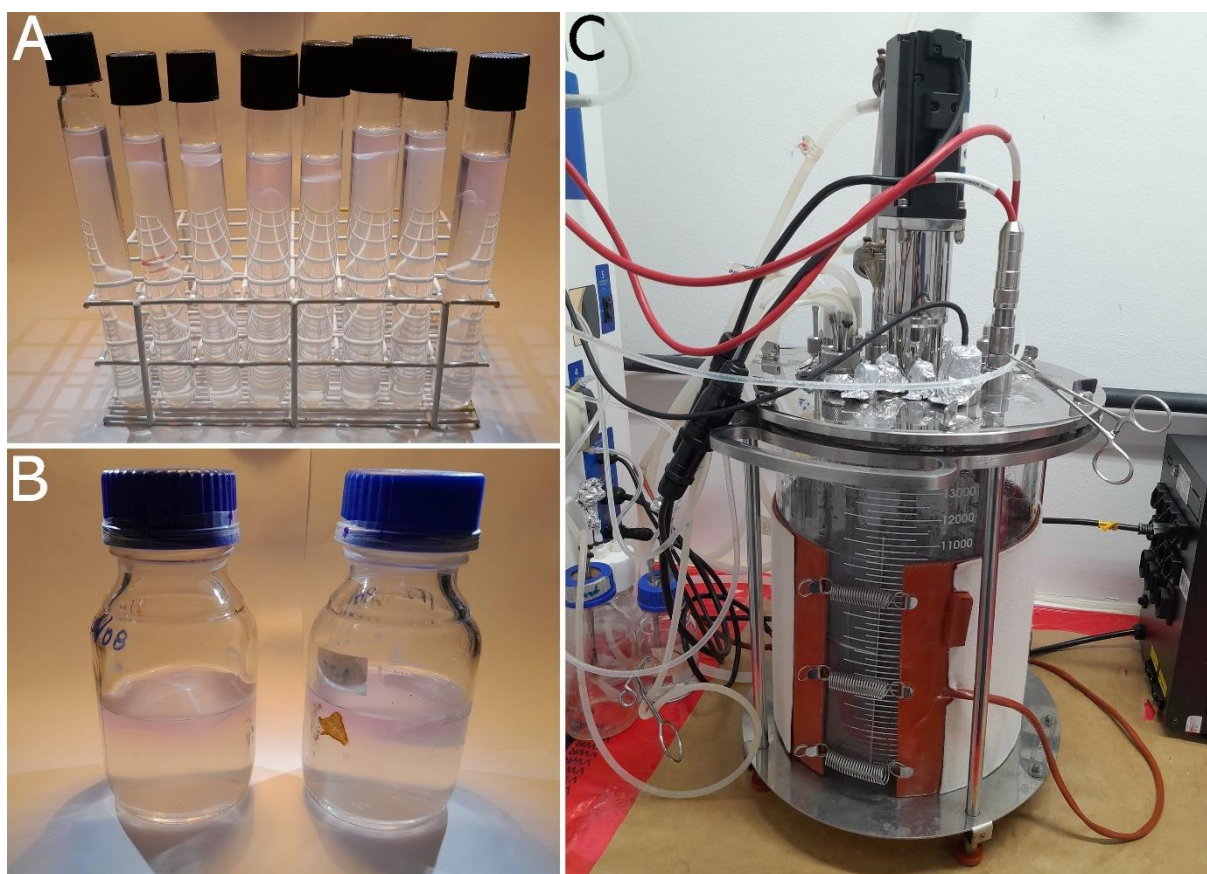


Figura 15. Propagação do inóculo de *Mf. australis* cepa IT-1. **A.** Crescimento celular do pré-inóculo durante 3 dias em tubos contendo meio semissólido EMSH com gradiente de O_2 . **B.** Repique das células em garrafas com 150 mL de meio semissólido EMSH com gradiente de O_2 e transferência para o biorreator após 3 dias, alimentando-o como inóculo. **C.** Cultivo em batelada, sem alimentação, do coco magnetotático *Mf. australis* cepa IT-1, totalizando 10 L de volume de trabalho em biorreator TECNAL (TECNAL, SP, Brasil). Os parâmetros de

pH e $dO_2\%$ foram monitorados em tempo real por eletrodos de pH e de pO_2 (HAMILTON, Nevada, EUA). A margem de ajuste de pH com NaOH ou HCl foi configurada em $7,2 \pm 0,1$. O cultivo foi interrompido ao 9º dia.

Posteriormente, os parâmetros relativos ao bioprocessamento foram configurados e monitorados diariamente, conforme ilustrado na representação técnica da montagem do bioprocessamento (Figura 16A e B). Após o monitoramento diário dos parâmetros técnicos (e.g., ajuste de pH, agitação e temperatura) e dos parâmetros de crescimento e consumo de nutrientes, detalhados mais à frente, as células foram coletadas após o término da batelada simples para posterior separação magnética das NMOBs (Figura 16C).

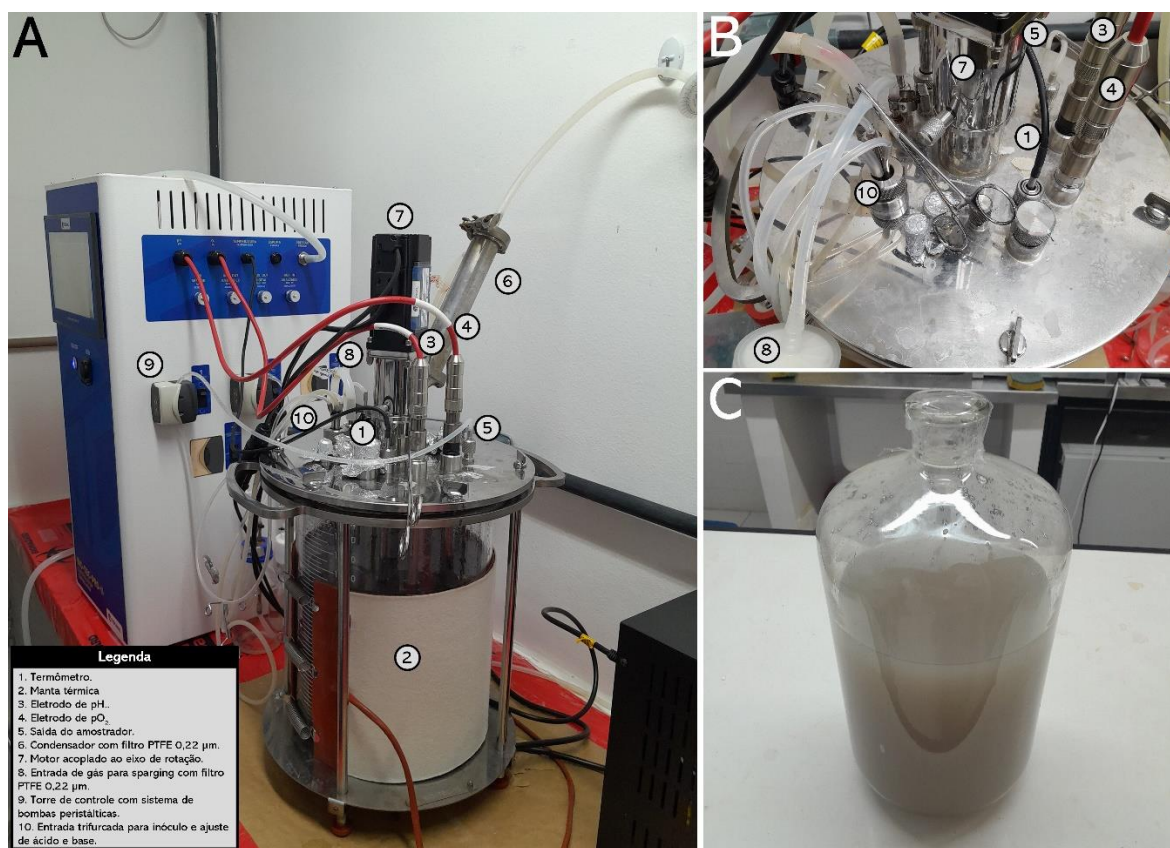


Figura 16. Indicação do monitoramento de parâmetros avaliados durante o bioprocessamento, numerados de 1 a 10. A. Em (1) termômetro inserido por tubulação cilíndrica sem contato direto com o meio de cultura. Em (2): manta térmica com resistência elétrica ligada à torre (10) para controle de temperatura. Em (3) e (4): eletrodos de pH e pO_2 , respectivamente. Em (5): saída do amostrador acoplado à bomba peristáltica. Em (6): condensador com filtro PTFE de poro 0,22 μm . Em (7): motor acoplado ao eixo central de rotação. Em (8): entrada de gás para *sparging* (purga) de N_2 com filtro de PTFE de poro 0,22 μm . Em (9): torre de controle com sistema operacional fornecido pela empresa e jogo de bombas peristálticas para inóculo e/ou *feed* (alimentação) e ajuste de pH por ácido (HCl 2N) e base (NaOH 2N). Em (10): entrada de alimentação trifurcada com entrada de inóculo e/ou *feed* e ajuste de pH. B. Vista topográfica da tampa do vaso do biorreator e respectiva numeração das entradas, saídas e dos parâmetros controlados. C. Material celular coletado após o 9º dia da batelada para posterior disrupção ultrassônica e purificação por separação magnética das NMOBs.

Por fim, para realização do cultivo em microaerofilia foi necessária a obtenção de parâmetros relacionados à transferência de gases na interface gás-líquido durante a purga do biorreator (*i.e.*, *sparging*). Logo, foram calculados os valores de $k_L a$ e da saturação dos gases

utilizados durante o bioprocessamento (e.g., N_2 e O_2). Assim, o melhor valor de transferência de massa para o N_2 foi dado pelo coeficiente de transferência de massa ($k_L a_{N_2}$) cujo valor é $0,41 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ sob agitação de 300 rpm durante a purga do meio antes do inóculo com o gás sob vazão de $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figura 17). A agitação foi mantida em 300 rpm durante a purga e então reduzida a 100 rpm após o inóculo de *Mf. australis* cepa IT-1, a fim de evitar o cisalhamento celular provocado pelo fluxo transicional ($2300 < Re < 4000$) ou turbulento ($Re > 4000$), que seria ocasionado em maiores agitações. O $k_L a_{O_2}$ a 100 rpm, i.e., agitação empregada durante o bioprocessamento, correspondeu a $0,38 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$, indicando maior facilidade de transferência de massa em relação ao emprego de N_2 . Tal característica foi importante durante o consumo do O_2 dissolvido no meio, uma vez que a reposição pode ser realizada pela alimentação por O_2 atmosférico esterilizado por filtro PTFE $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ (Figura 16).

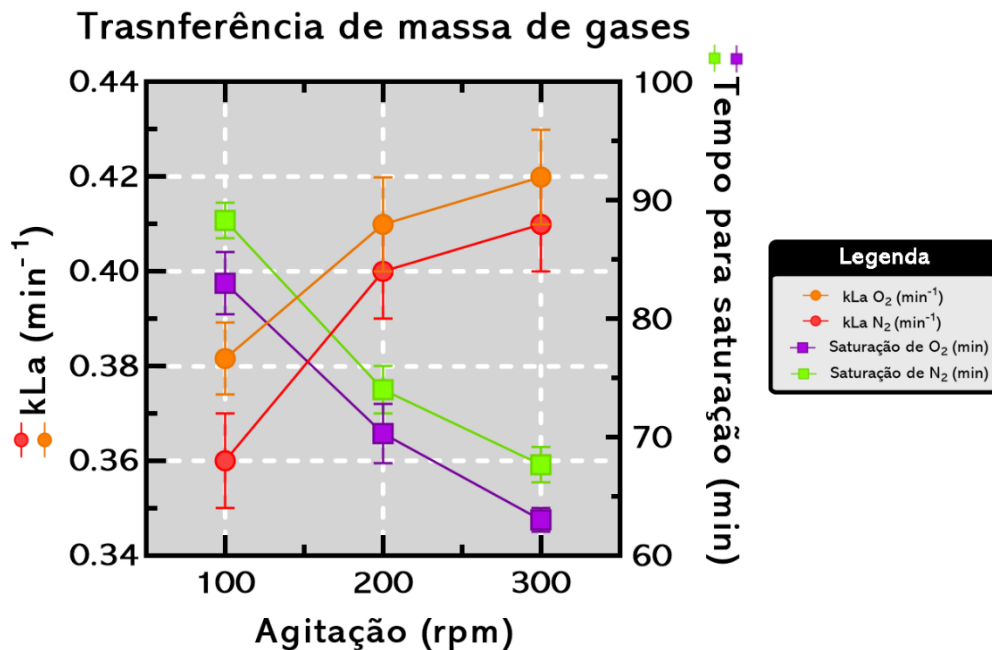


Figura 17. Cálculo de transferência de massa de gases sobre diferentes agitações. O melhor valor de transferência de massa para o N_2 é dado pelo coeficiente de transferência de massa ($k_L a_{N_2}$) cujo valor é $0,41 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ sob agitação de 300 rpm durante a purga do meio. O $k_L a_{O_2}$ a 100 rpm, i.e., agitação empregada durante o bioprocessamento, corresponde a $0,38 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$. Além disso, a saturação de N_2 , i.e., desejada durante a purga pré-inóculo, é atingida após o tempo médio de $67 \pm 2 \text{ min}$.

5.1.2. Monitoramento do crescimento celular, do consumo de nutrientes e da respiração de O₂

Durante a batelada simples foram monitorados o crescimento celular, o consumo de nutrientes (*i.e.*, nitrogênio e ferro) e a taxa de respiração de O₂. Dessa forma, a maior taxa de crescimento (*i.e.*, 1631,69 % ou aumento de 16,31 vezes a densidade celular inicial) foi observada no intervalo entre os dias 0 ($3,92 \pm 3,49 \cdot 10^6$ células · mL⁻¹) e 1 ($3,96 \pm 2,59 \cdot 10^7$ células · mL⁻¹), resultando em tempo de geração médio de 6h e 52 min ± 3h e 20 min. A fase estacionária foi atingida no 5º dia de cultivo ($3,18 \pm 2,05 \cdot 10^8$ células · mL⁻¹). No 6º dia, foi observada a entrada na fase de declínio ou morte celular, representando pela queda de $3,18 \pm 2,05 \cdot 10^8$ células · mL⁻¹ (dia 5) para $2,92 \pm 2,00 \cdot 10^8$ células · mL⁻¹ (dia 6) (Figura 18).

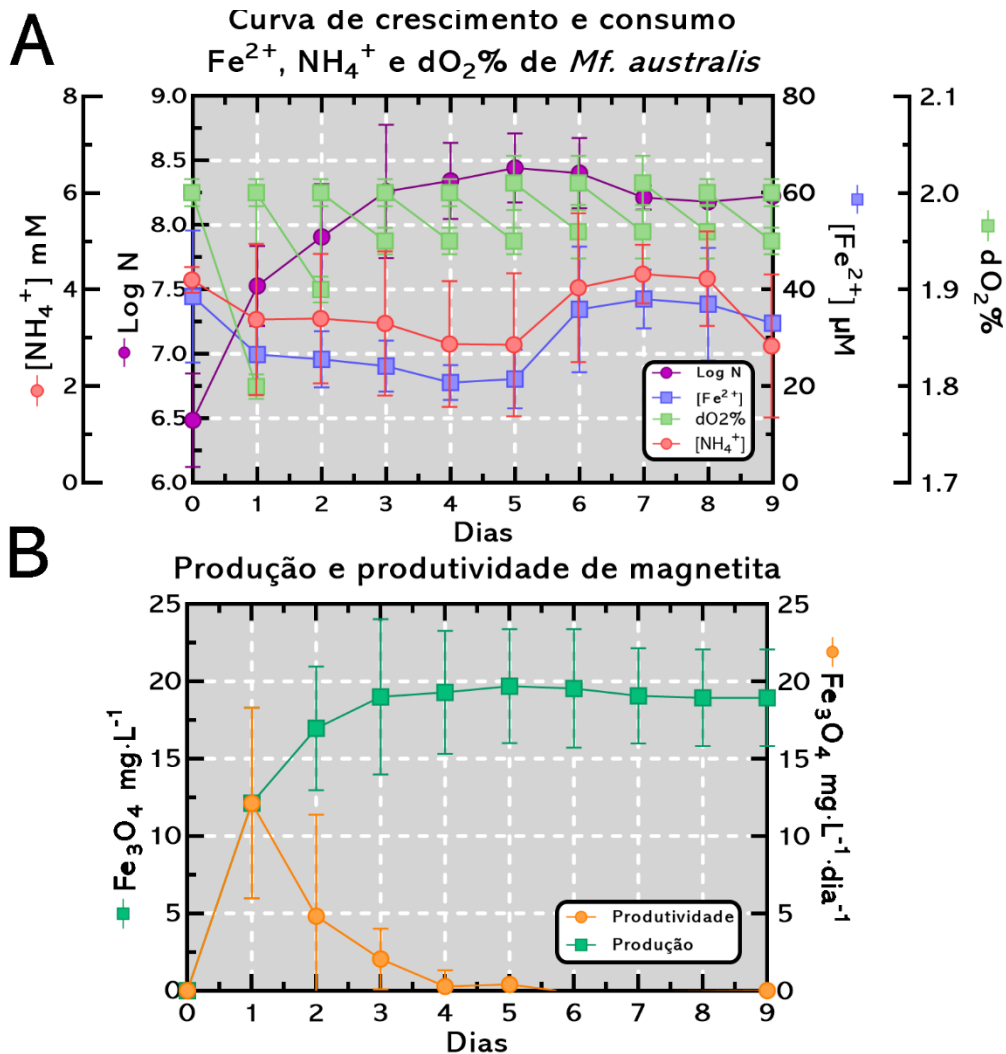


Figura 18. Monitoramento do crescimento celular, consumo de Fe²⁺ e produção e produtividade de magnetita. **A.** Curva de crescimento celular (rosa), consumo de Fe²⁺ no meio (azul), consumo de NH₄⁺ (vermelho) e dO₂% (verde). A curva de crescimento foi obtida a partir do monitoramento diário pela aferição da absorbância ($\lambda = 600$ nm) e multiplicado pela relação $DO\ 1,0 \propto 8,12 \cdot 10^8$ células · mL⁻¹, previamente estabelecida por correlação entre

contagem em microscopia em DIC e DO. A maior taxa de crescimento é observada no intervalo entre os dias 0 ($3,92 \pm 3,49 \cdot 10^6$ células \cdot m L⁻¹) e 1 ($3,96 \pm 2,59 \cdot 10^7$ células \cdot mL⁻¹), resultando em tempo de geração médio de 6 h e 52 min \pm 3 h e 20 min. A fase estacionária foi atingida no 5º dia de cultivo ($3,18 \pm 2,05 \cdot 10^8$ células \cdot mL⁻¹). O Fe²⁺ disponível no meio foi quantificado pelo ensaio da orto-fenantrolina por reação colorimétrica medida em $\lambda = 510$ nm. A maior taxa de consumo de Fe²⁺ acompanha a maior taxa de crescimento entre os dias 0 (48,53 μ M) e 1 (36,54 μ M). O consumo cessa no 5º dia (*i.e.*, fase estacionária) e o Fe²⁺ volta a ficar disponível após o início da fase de declínio da cultura, possivelmente devido à morte celular e liberação do conteúdo citoplasmático. O consumo de NH₄⁺ acompanha a mesma tendência observada para o Fe²⁺. A maior taxa de consumo ocorreu nas primeiras 24h, com 4,39 a 3,57 mM de NH₄⁺. A saturação de O₂ (dO₂%) foi mantida em 2,0% e o consumo foi repostado diariamente, sendo a maior taxa de consumo no primeiro dia (de 2,01 a 1,80% de saturação). **B.** Produção (Fe₃O₄ mg \cdot L⁻¹) e produtividade (Fe₃O₄ mg \cdot L⁻¹ \cdot dia⁻¹) de magnetita durante o bioprocessamento. Dosagens de consumo de nitrogênio pelo método da ninidrina e de carbono por HPLC estão sendo conduzidas. A maior produtividade é obtida ao final do 1º dia de cultivo, concomitantemente à melhor taxa de crescimento, sendo obtido 12,13 \pm 6,17 Fe₃O₄ mg \cdot L⁻¹ \cdot dia⁻¹. Por fim, a produção total de magnetita acompanha a curva de crescimento celular sendo atingida no 5º dia, representando $19,70 \pm 3,70$ Fe₃O₄ mg \cdot L⁻¹.

Durante a fase logarítmica (log) de crescimento, a célula foi observada em TEM e apresentou morfologia cocóide-ovoide com dimensões $1,40 \pm 0,40$ por $1,00 \pm 0,20$ μ m ($n=100$) (Figura 19). Além disso, foi possível observar a cadeia única de 10 ± 3 NMOBs octaédricas alongadas não alinhadas ao eixo maior da célula e duas inclusões eletrondensas. As NMOBs apresentaram dimensões de $122,77 \pm 23,54$ por $95,89 \pm 18,05$ nm, fator de forma $0,79 \pm 0,03$ nm e diâmetro médio igual a $109,33 \pm 20,46$ nm ($n=120$). As NMOBs, após a extração, apresentaram membrana biológica revestindo a NP (Figura 19) e potencial zeta de $20,93 \pm 1,01$ mV ($n=10$) (Figura 20).

Além disso, a massa de magnetita média por cada unidade de NMOB (m_{NMOB}) e por célula (10 ± 3 NMOBs \cdot cél⁻¹) (m_{cel}) foi calculada através do volume (v) e da área de superfície (a_s) estimada para octaedro regular. Logo, foi obtida a área de superfície (a_s) de $3,73 \cdot 10^4$ nm² \cdot NMOB⁻¹ (ou $3,73 \cdot 10^{-2}$ μ m²), o volume (v) de $5,27 \cdot 10^5$ nm³ \cdot NMOB⁻¹ (ou $5,27 \cdot 10^{-4}$ μ m³ \cdot NMOB⁻¹) e a massa de magnetita média por cada unidade de NMOB (m_{NMOB}) de 2,72 Fe₃O₄ fg \cdot NMOB⁻¹ (ou $2,72 \cdot 10^{-6}$ ng). Portanto, a massa média de magnetita por célula (m_{cel}) corresponde a 27,2 fg Fe₃O₄ fg \cdot célula⁻¹ (ou $27,2 \cdot 10^{-6}$ ng \cdot célula⁻¹).

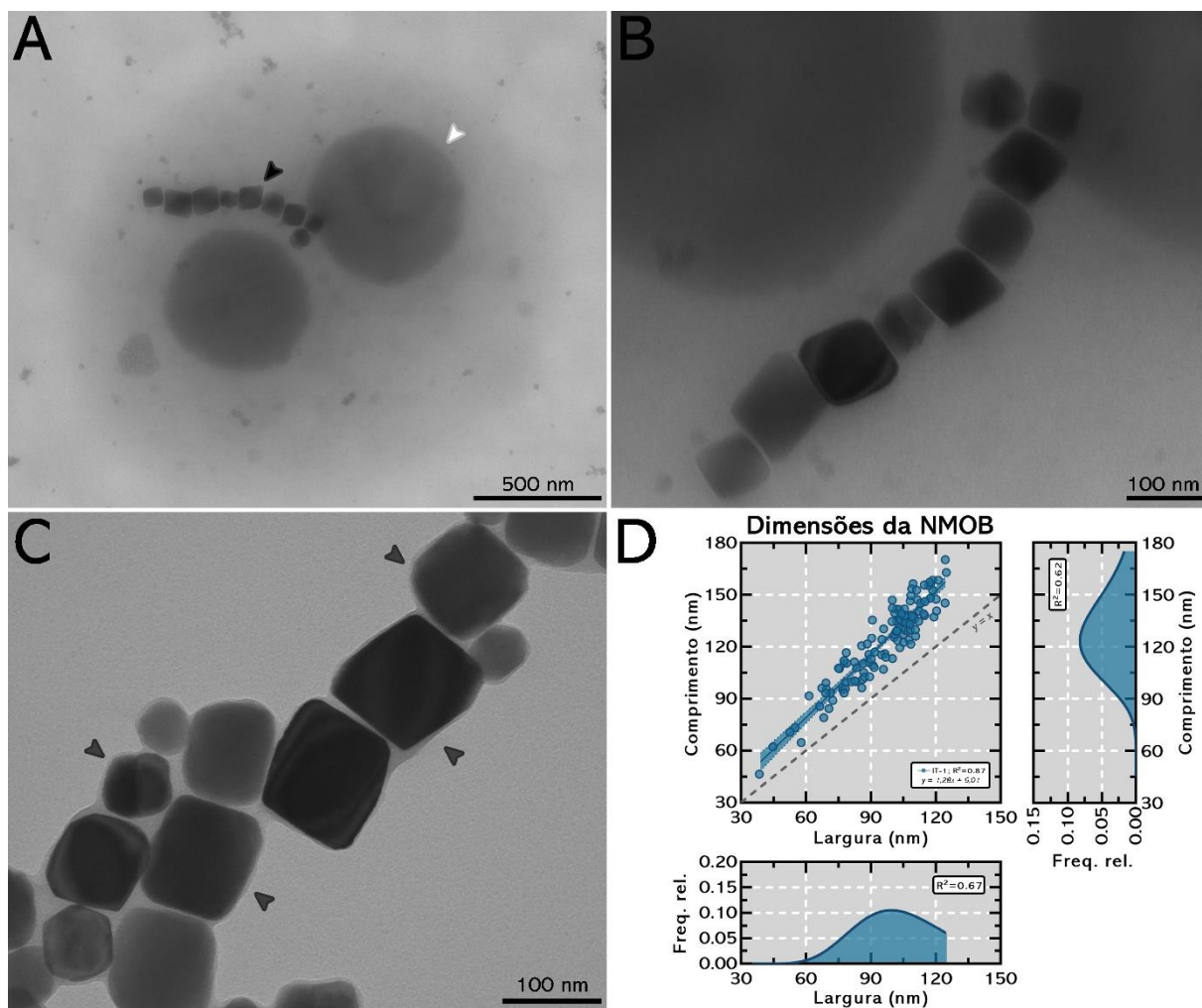


Figura 19. Caracterização morfológica da célula, de suas NMOBs e dimensões da NP. **A.** Morfologia cocóide-ovoide de *Mf. australis* cepa IT-1 observada em TEM. As cabeças de seta preta indicam a cadeia única de NMOBs octaédricas alongadas não alinhadas ao eixo maior da célula e as cabeças de seta branca indicam os grânulos eletrondensos que podem ser resultado do acúmulo de fosfato, ainda a ser confirmado posteriormente por EDS (do inglês *energy dispersive X-ray spectroscopy*). **B.** Aumento maior da cadeia de NMOBs dentro do corpo celular. **C.** NMOBs extraídas e purificadas após o final do bioprocesso. Note a presença da membrana fosfolipídica que recobre as NPs indica pelas cabeças de seta cinza. **D.** Dimensões da NMOB após extração. As NMOBs apresentam $122,77 \pm 23,54$ por $95,89 \pm 18,05$ nm, diâmetro médio de $109,33 \pm 20,46$ nm e fator de forma $0,79 \pm 0,03$. Foram realizados: (i) o ajuste da regressão linear para predição da dimensão das NMOBs; e (ii) a distribuição lognormal de cada parâmetro (*i.e.*, largura e comprimento) ($n=120$).

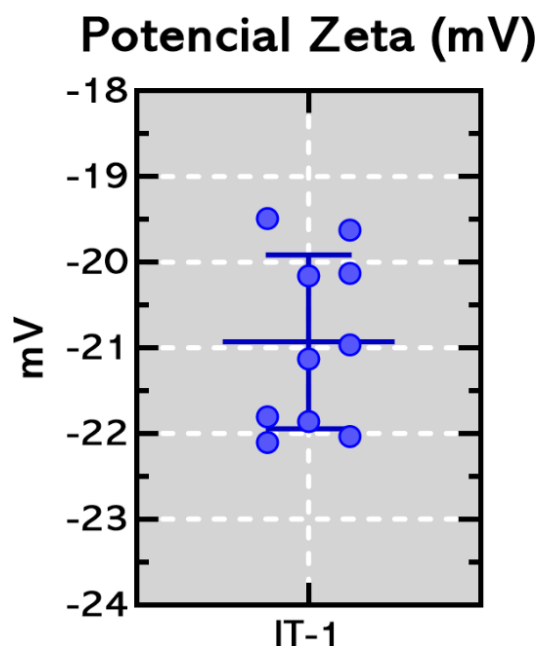


Figura 20. Potencial Zeta em mV das NMOBs octaédricas alongadas extraídas de *Mf. australis* cepa IT-1. As NMOBs apresentaram potencial zeta de $-20,93 \pm 1,01$ mV ($n=10$).

A análise de Fe^{2+} disponível no meio revelou que a maior taxa de consumo de Fe^{2+} (24,07%) acompanhou a maior taxa de crescimento entre os dias 0 ($48,53 \pm 13,67 \mu\text{M}$) e 1 ($36,54 \pm 5,88 \mu\text{M}$) (Figura 18A). O consumo cessou no 5º dia (*i.e.*, fase estacionária; $31,51 \pm 6,10 \mu\text{M}$) e o Fe^{2+} voltou a ficar disponível após o início da fase de declínio da cultura, ou seja, no 6º dia ($45,89 \pm 13,00 \mu\text{M}$). O consumo de nitrogênio amínico/amoniaco livre foi determinado pelo ensaio da reação de FAN. O padrão de consumo de nitrogênio seguiu a mesma tendência do consumo de Fe^{2+} (Figura 18A). Ou seja, a maior taxa de consumo (18,67%) de nitrogênio (*i.e.*, NH_4^+) acompanhou a maior taxa de crescimento entre os dias 0 ($4,39 \pm 0,26$ mM) e 1 ($3,57 \pm 1,56 \mu\text{M}$). O consumo cessou no 5º dia (*i.e.*, fase estacionária; $3,04 \pm 1,48$ mM) e o nitrogênio voltou a ficar disponível após o início da fase de declínio da cultura, ou seja, no 6º dia ($4,23 \pm 1,53$ mM).

A saturação de oxigênio dissolvido no meio ($\text{dO}_2\%$) foi medida diariamente por eletrodo com sensor óptico VisiFerm (Hamilton, EUA) (Figura 18A). O maior consumo de $\text{dO}_2\%$ ($0,2 \text{ dO}_2\%$ ou $0,02 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) acompanhou a maior taxa de crescimento celular entre as primeiras 24 horas, ou seja, no dia 0 foi disponibilizado $2,01 \pm 0,01 \text{ dO}_2\%$ ($0,16 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e atingiu o valor de $1,80 \pm 0,01$ ($0,14 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) de saturação. Após o pulso de O_2 atmosférico e filtrado pelo sistema de esterilização de gases a saturação foi mantida diariamente próxima a 2,0 %, mantendo o cultivo em microaerofilia. Diariamente o consumo de O_2 pôde ser representado

por: (i) intervalo entre os dias 1 e 2, 0,1 dO₂% ou 0,01 mg O₂ · L⁻¹; e (ii) intervalo entre os dias 2 e 3 e manutenção até o final do cultivo, 0,05 dO₂% e 0,005 mg O₂ · L⁻¹ (Figura 18A).

A produção (Fe₃O₄ mg · L⁻¹) e produtividade (Fe₃O₄ mg · L⁻¹ · dia⁻¹) de magnetita foram monitoradas durante o bioprocessamento, uma vez que o interesse ao final foi a obtenção da maior massa de magnetita possível para aplicações *downstream* (Figura 18B). A maior produtividade foi obtida ao final do 1º dia de cultivo, concomitantemente à melhor taxa de crescimento (μ), sendo obtido $12,13 \pm 6,17$ Fe₃O₄ mg · L⁻¹ · dia⁻¹, correspondendo a 61,57 % do total da massa de magnetita produzida durante o bioprocessamento. O segundo maior valor de produtividade foi alcançado entre o dia 1 e 2, representando $4,82 \pm 6,56$ Fe₃O₄ mg · L⁻¹ · dia⁻¹. Logo, ao contabilizar a produtividade até o 2º dia (48h), foram produzidas 86,04% correspondentes à massa total de magnetita obtida durante o bioprocessamento. Por fim, a produção total de magnetita acompanhou a curva de crescimento celular sendo atingida no 5º dia, representando $19,70 \pm 3,70$ Fe₃O₄ mg · L⁻¹ e totalizando o rendimento médio total de magnetita de 197 ± 37 Fe₃O₄ mg.

5.1.3. Monitoramento das características morfológicas por DIC e TEM

A resposta magnetotática das células foi avaliada em microscopia em DIC durante o instante 0 (referente ao dia 0; fase lag), o dia 1 (fase log; F_{log}) e dia 5 (fase estacionária; F_{est}) (Figura 21). A resposta magnetotática, *i.e.*, sentido de nado antiparalelo ao campo magnético externo gerado, foi observada em todos os estágios do crescimento, indicando a presença de células com aparente viabilidade celular. No entanto, durante o crescimento foi possível observar por TEM a presença de células com morfologia alterada a partir do 5º dia, ou seja, tamanho reduzido, mudança da morfologia cocóide-ovoide característica para cocóide (*i.e.*, arredondamento do corpo celular), ausência de NMOBs biomineralizadas e aumento do nº de inclusões citoplasmáticas a partir de medidas de parâmetros morfológicos ($n=100$) (Figura 21; Figura 22). Quanto às células com morfologia alterada, foi possível observar: (i) aumento significativo ($*p=0,0199$) do fator de forma de $0,72 \pm 0,06$ para $0,89 \pm 0,04$, bem como o aumento significativo ($**p=0,0080$) do número de inclusões por célula (nº inclusões · cél⁻¹) de 3 ± 1 para 7 ± 1 durante a transição da de F_{log} para F_{est} ; e (ii) o número de células com alteração morfológica aumentou $10,52 \pm 8,37$ vezes em relação à F_{log} , representando $10,46 \pm 3,04\%$ da população total ($**p=0,0077$). Dessa forma, tais alterações morfológicas podem representar o

impacto da depleção dos nutrientes essenciais para o crescimento celular durante a batelada, conforme observado no consumo de Fe^{2+} e NH_4^+ pela célula, discuto mais adiante (Figura 18).

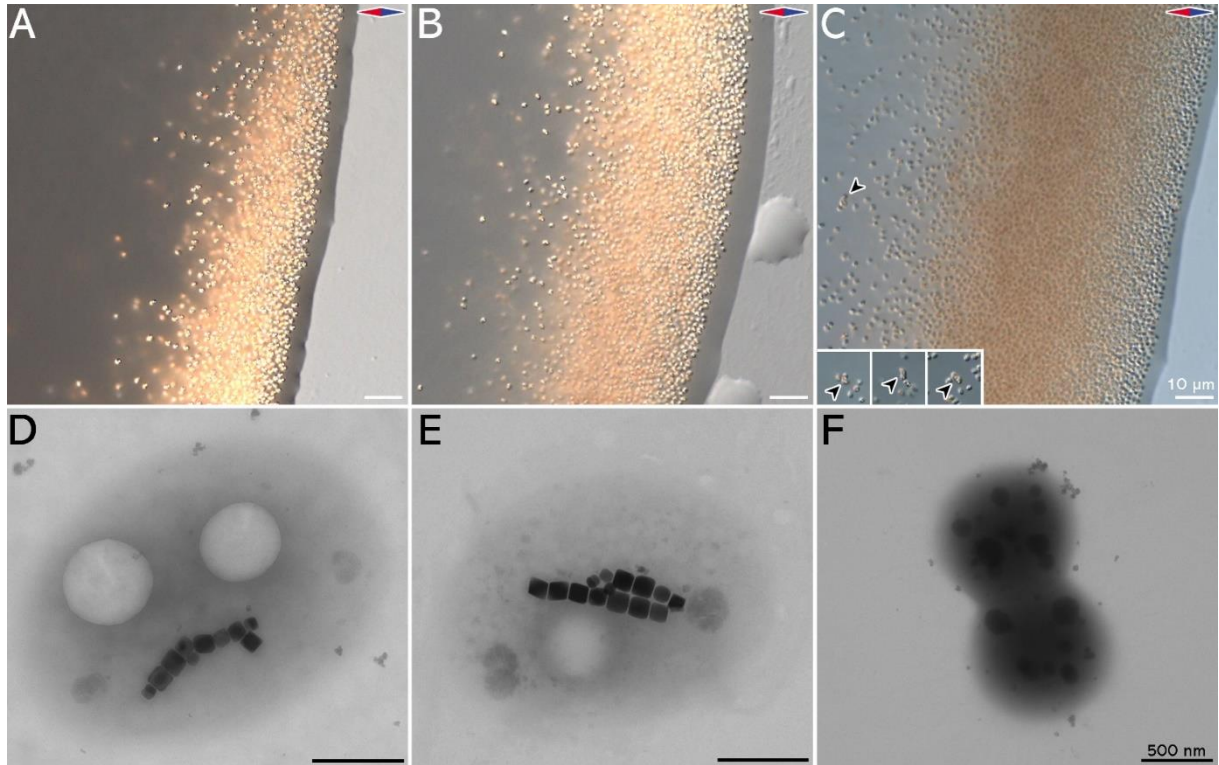


Figura 21. Observação do comportamento magnetotático e morfologia cocóide-ovoide da BM *Mf. australis* cepa IT-1 por microscopia óptica em DIC. As células nadam de forma antiparalela ao campo magnético externo gerado pelo ímã e se concentram na borda da gota. **A. e D.** Comportamento magnetotático na fase lag (dia 0) observado em DIC (A) e respectiva morfologia celular observada em TEM (D). Note a cadeia única de NMOBs octaédricas alongadas. **B. e E.** Comportamento magnetotático na fase log (dia 1) e respectiva morfologia celular observada em TEM (E). Note a duplicação da cadeia de NMOBs (E). **C. e F.** Comportamento magnetotático na fase estacionária (dia 5) e respectiva morfologia celular observada em TEM (F). Há, aparentemente, redução do tamanho celular, aumento do número de inclusões eletrondensas, ausência da cadeia de NMOBs e a presença de células com divisão celular incompleta (F). É possível observar células com divisão celular interrompida, possivelmente devido à depleção de nutrientes durante a batelada (indicado pelas cabeças de seta preta).

Impacto da depleção de nutrientes da fase estacionária na morfologia celular

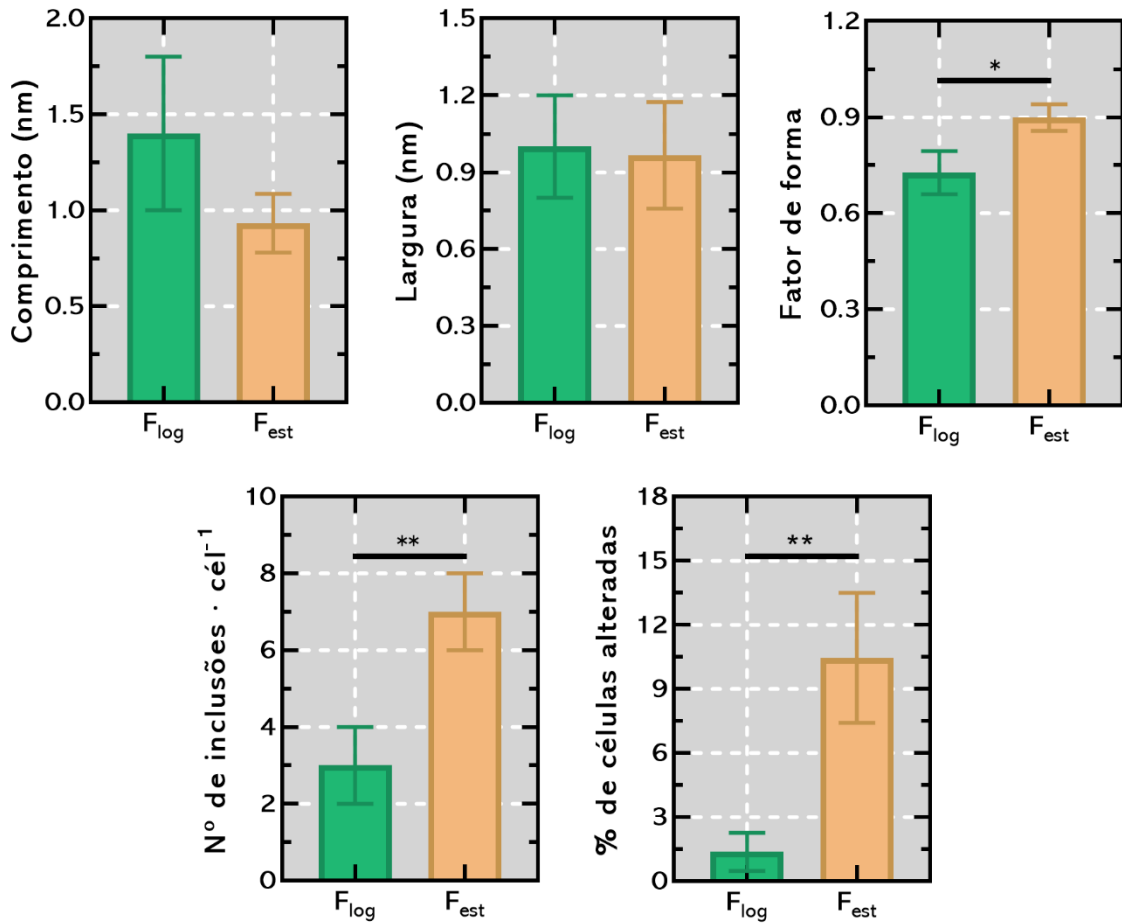


Figura 22. Parâmetros morfológicos durante o cultivo, em que F_{log} representa o dia 1 e F_{est} o dia 5 ($n=100$ em cada condição). Redução do comprimento celular de $1,40 \pm 0,40$ para $0,93 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ($p = \text{ns}$) e manutenção da largura de $1,00 \pm 0,20$ para $0,96 \pm 0,20 \mu\text{m}$ ($p = \text{ns}$) na transição da F_{log} para F_{est}. Também é observado o aumento significativo (* $p=0,0199$) do fator de forma de $0,72 \pm 0,06$ para $0,89 \pm 0,04$ bem como o aumento significativo (** $p=0,0080$) do número de inclusões por célula (n° inclusões \cdot cél⁻¹) de 3 ± 1 para 7 ± 1 durante a transição da de F_{log} para F_{est}. Além disso, o número de células com alteração morfológica (*i.e.*, divisão interrompida, arredondamento e redução do tamanho celular) aumento $10,52 \pm 8,37$ vezes em relação à F_{log}, representando $10,46 \pm 3,04\%$ da população total (** $p=0,0077$). Tais alterações morfológicas podem representar o impacto da depleção dos nutrientes durante a batelada.

5.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

5.2.1. Controle de qualidade de NMOBs utilizadas nos ensaios de separação magnética

A caracterização e o controle de qualidade das NMOBs extraídas de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T foi realizada pela conferência da morfologia característica em TEM e aferição da dispersibilidade e carga indireta de superfície pelo potencial zeta das NPs. Dessa forma, as observadas em TEM possuíam a morfologia prismática ou pseudo-hexagonal alongada característica com a presença da membrana biológica revestindo a NP e dimensões de $73,20 \pm 6,62$ por $49,55 \pm 5,96$ nm com fator de forma igual $0,77 \pm 0,03$ ($n=120$) (Figura 23A e B). A regressão linear e o ajuste de distribuição lognormal das dimensões de comprimento e largura foi realizado e retornou os valores de R^2 iguais a 0,44, 0,98 e 0,98, respectivamente. O potencial zeta das NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T apresentou valor igual $-27,17 \pm 4,80$ mV ($n=10$), correspondente a partículas negativamente carregadas e com boa faixa de dispersibilidade em solvente aquoso (Figura 23C). Por sua vez, o controle de qualidade e caracterização de NMOBs biomineralizadas por *Mf. australis* cepa IT-1 foi realizado durante o monitoramento do cultivo da célula em batelada simples e encontra-se descrito no tópico “5.1.2. Monitoramento do crescimento celular, do consumo de nutrientes e da respiração de O₂”.

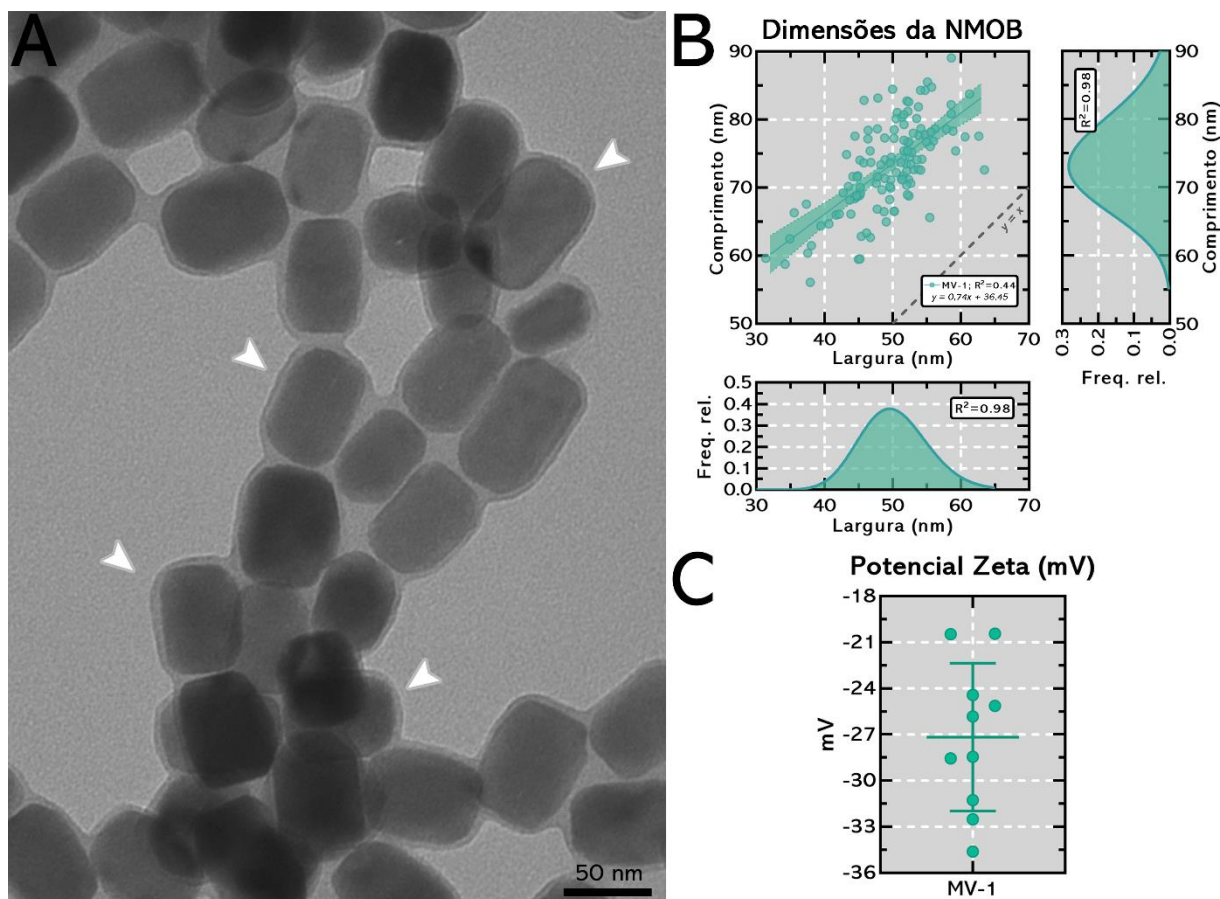


Figura 23. Controle de qualidade das NMOBs de *Mv. blakemorei cepa* MV-1^T. **A.** NMOBs observadas em TEM com morfologia prismática ou pseudo-hexagonal alongada característica. Note a presença da membrana biológica envolvendo as NMOBs (cabeças de seta branca). **B.** Dimensões das NMOBs variando entre $73,20 \pm 6,62$ por $49,55 \pm 5,96$ nm com fator de forma igual $0,77 \pm 0,03$ ($n=120$). Regressão linear e ajuste de distribuição lognormal das dimensões de comprimento e largura com respectivos valores de R^2 iguais a 0,44, 0,98 e 0,98. **C.** Valores de potencial zeta de $-27,17 \pm 4,80$ mV ($n=10$), correspondente a partículas negativamente carregadas.

5.2.2. Caracterização do impacto da alteração de pH e da concentração de ferro no cultivo e nos parâmetros morfológicos de microalgas

No primeiro momento, foram caracterizadas a capacidade das células sobreviverem em condições em diferentes fontes de ferro (*e.g.*, cloreto férrico, quinato férrico e sulfato ferroso) em crescentes concentrações e diferentes valores de pH, além de quantificar a presença de lipídeos neutros por célula (Figura 24; Figura 25; Figura 26; Figura 27; Figura 28; Figura 29). Tais condições foram aferidas a fim de estabelecer os parâmetros que poderiam ser modulados mais à frente nos ensaios de separação magnética utilizando NMOBs. Logo, a partir da observação e medida de parâmetros morfológicos em DIC foi possível observar que as células aparentemente toleravam concentrações crescentes de diferentes fontes de Fe, mantendo a morfologia característica de cada tipo celular (Figura 24; Figura 27). Em *Scenedesmus* sp., foi

possível observar a presença de debris que possam indicar lise celular quando empregado: (i) cloreto férrico em concentrações superior a 100× a concentração padrão; (ii) quinato férrico em concentrações superior a 10× a concentração padrão; e (iii) sulfato ferroso em concentrações superior a 100× a concentração padrão. Além disso, foi possível observar células não lisadas e, aparentemente íntegras, nas concentrações BM×, ou seja, a concentração que representa a quantidade de Ferro equivalente durante o cultivo de BMs, *i.e.*, $\approx 200\times$ a mais que o meio padrão de cultivo de microalgas (Figura 24).

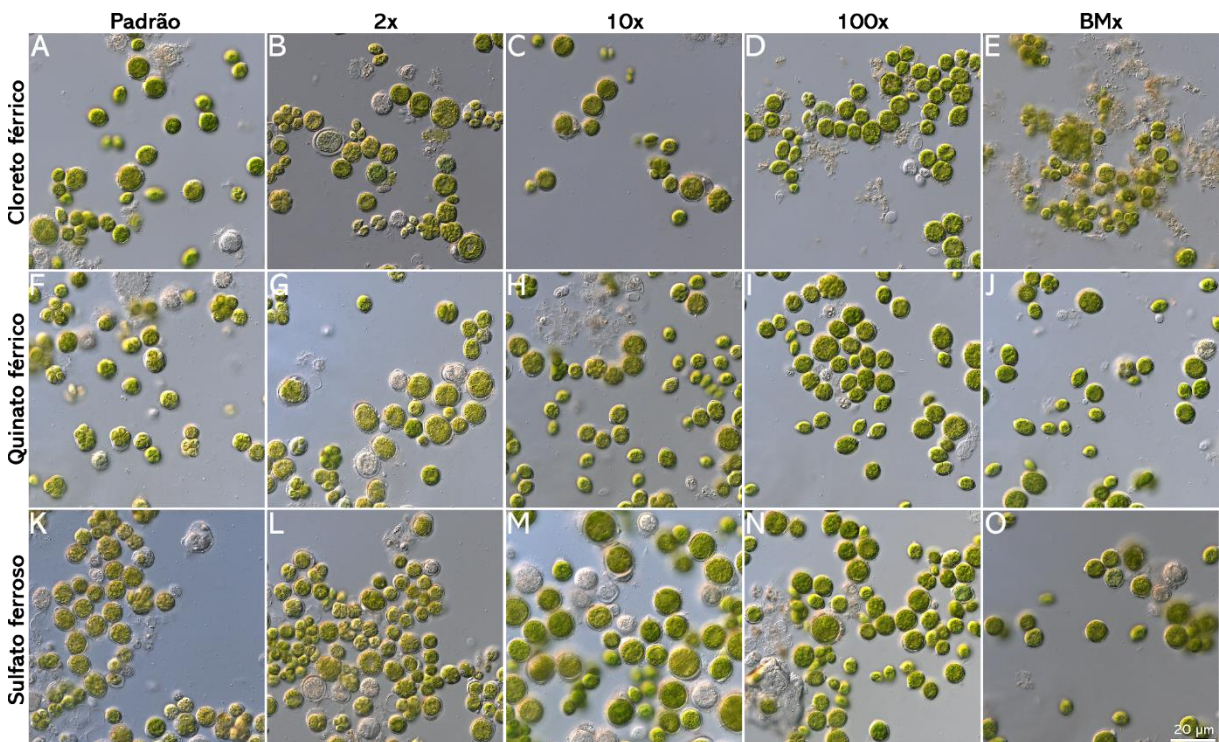


Figura 24. Impacto morfológico sobre *Scenedesmus* sp. observado em DIC a partir das diferentes fontes de ferro e suas concentrações. Aparentemente, as células conseguem crescer em todas as condições reportadas e mantêm a morfologia característica da espécie. Foram utilizadas as fontes de ferro: cloreto férrico, quinato férrico e sulfato ferroso em concentrações crescentes. Observação: BM× representa a quantidade de Ferro equivalente durante o cultivo de BMs, o que representa $\approx 200\times$ a mais que o meio padrão de cultivo de microalgas.

Em *Scenedesmus* sp., por exemplo, foi possível observar a redução estatisticamente significativa ($****p < 0,0001$) do diâmetro médio celular entre a condição padrão ($12,97 \pm 2,57 \mu\text{m}$) e BM× ($9,26 \pm 1,95 \mu\text{m}$) ao utilizar cloreto férrico como fonte de ferro (Figura 25). No entanto, não houve alteração estatisticamente significativa ($p = \text{ns}$) relacionada ao fator de forma nas condições testadas utilizando cloreto férrico como fonte de ferro (Figura 26). Portanto, apesar da diferença estatística observada em algumas condições, as células não sofreram alterações morfológicas significativas de forma visível, quando observadas em DIC, que comprometessem as condições experimentais futuras.

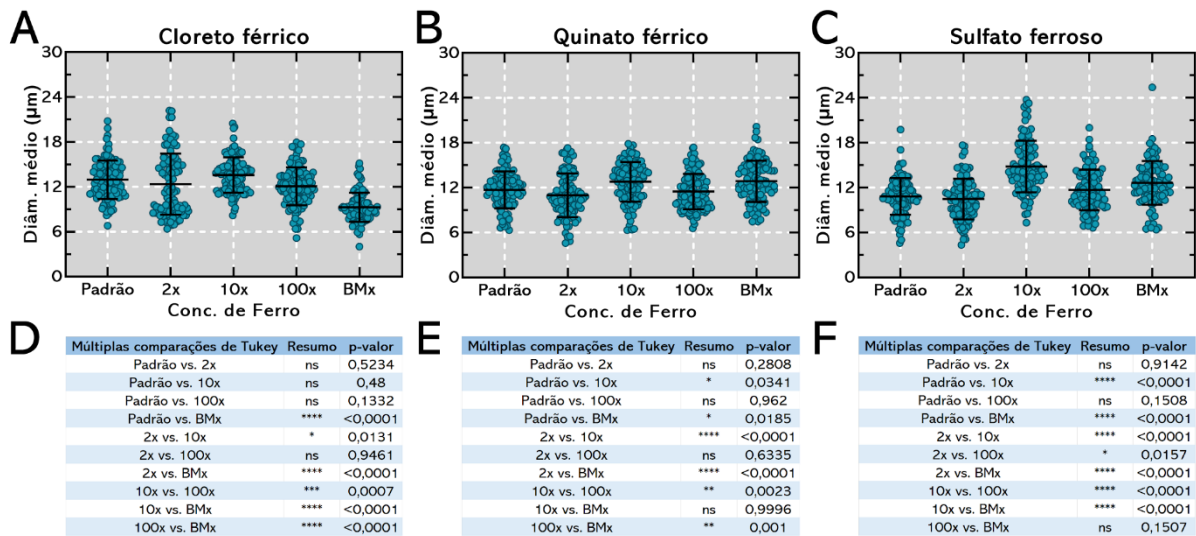


Figura 25. Efeito da fonte e da concentração de Ferro sobre o diâmetro médio em *Scenedesmus* sp ($n=300$),. Apesar da diferença estatística em alguns cenários (e.g., redução do diâmetro em BMx para cloreto férrico e aumento do diâmetro em 10x para sulfato ferroso), as células não sofreram alterações significativas de forma visível quando observadas em DIC e que comprometessem as condições experimentais futuras.

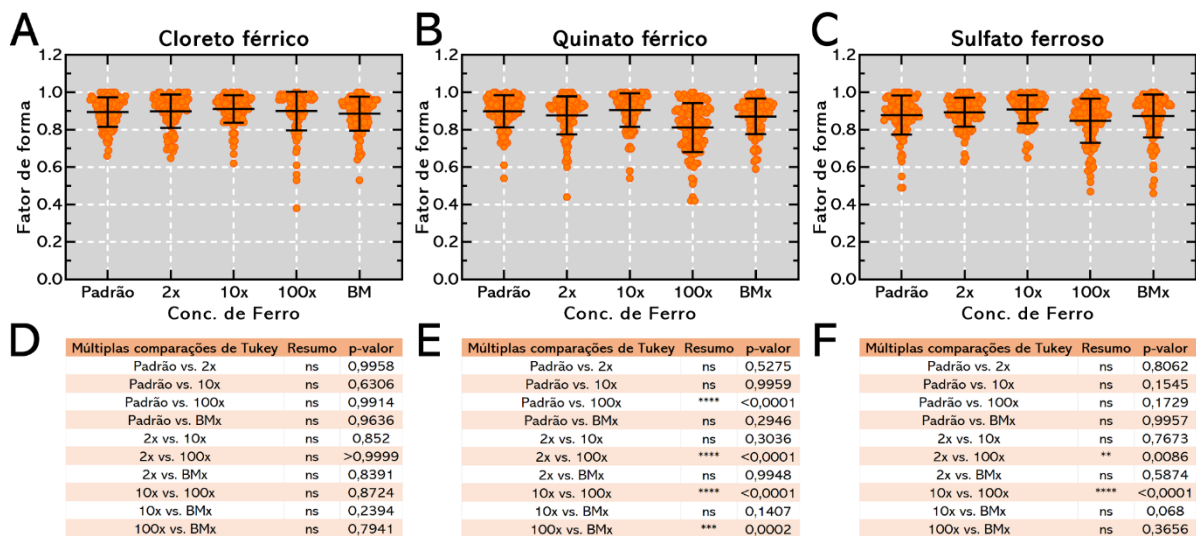


Figura 26. Efeito da fonte e da concentração de Ferro sobre o fator de forma em *Scenedesmus* sp ($n=300$). Não há diferença estatística entre as condições observadas, indicando que as células não sofreram alterações significativas de forma visível quando observadas em DIC e que comprometessem as condições experimentais futuras.

Em *Monoraphidium* sp., é possível observar a presença de debris que podem indicar lise celular quando empregado: (i) cloreto férrico em concentrações superior a $\approx 200\times$ (i.e., BMx) a concentração padrão; (ii) quinato férrico em concentrações superior 100x a concentração padrão; e (iii) sulfato ferroso em concentrações superior $\approx 200\times$ (i.e., BMx) a concentração padrão. Além disso, foi possível observar células não lisadas e, aparentemente íntegras, nas concentrações BMx, ou seja, a concentração que representa a quantidade de ferro equivalente

durante o cultivo de BMs, *i.e.*, $\approx 200\times$ a mais que o meio padrão de cultivo de microalgas (Figura 27).

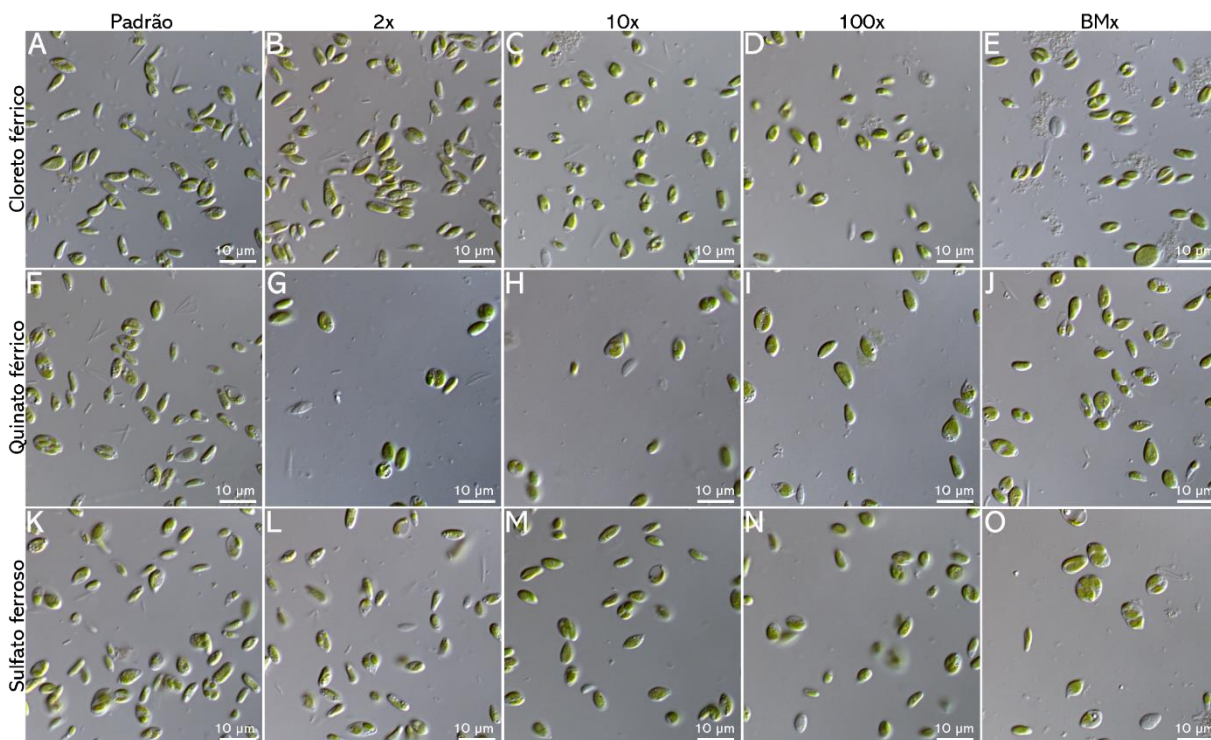


Figura 27. Impacto morfológico sobre *Monoraphidium* sp. observado em DIC a partir das diferentes fontes de ferro e suas concentrações. Aparentemente, as células conseguem crescer em todas as condições reportadas e mantém a morfologia característica da espécie. Foram utilizadas as fontes de ferro: cloreto férrico, quinato férrico e sulfato ferroso em concentrações crescentes.

Em seguida, foi avaliada a taxa de crescimento celular (μ) de *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp. e *Monoraphidium* sp., durante 7 dias (168 h) em pH 5,0, 8,0 e 11,0 (Figura 28). Em todos os tipos celulares, foi possível observar a tolerância e, em alguns casos, a μ em condição de pH 5,0. Por exemplo, *Scenedesmus* sp. apresentou densidade celular final ($1,62 \pm 0,05 \cdot 10^4$ células \cdot mL $^{-1}$) 6,34 \times superior à inicial ($2,21 \pm 0,70 \cdot 10^3$ células \cdot mL $^{-1}$) quando submetida à pH 5,0. Logo, se comparada à condição padrão, a densidade celular final em pH 5,0 foi 1,41 \times (*i.e.*, 41%) superior a em pH 8,0 ($1,15 \pm 0,01 \cdot 10^4$ células \cdot mL $^{-1}$). A mesma tendência foi observada em *Monoraphidium* sp., uma vez que apresentou densidade celular final ($1,98 \pm 0,41 \cdot 10^4$ células \cdot mL $^{-1}$) 5,33 \times superior à inicial ($3,12 \pm 0,72 \cdot 10^3$ células \cdot mL $^{-1}$) quando submetida à pH 5,0. Logo, se comparada à condição padrão, a densidade celular final em pH 5,0 foi 1,09 \times (*i.e.*, 9%) superior a em pH 8,0 ($1,82 \pm 0,10 \cdot 10^4$ células \cdot mL $^{-1}$). Em *Desmodesmus* sp., houve semelhança entre a condição de pH 5,0 e 8,0 (padrão), ambas apresentando densidade celular final igual a $1,37 \pm 0,02 \cdot 10^4$ células \cdot mL $^{-1}$ e $1,30 \pm 0,13 \cdot 10^4$ células \cdot mL $^{-1}$, respectivamente. Logo, se comparada à condição padrão, a densidade celular

final em pH 5,0 foi $1,05\times$ (i.e., 5%) superior a em pH 8,0 ($1,30 \pm 0,13 \cdot 10^4$ células \cdot mL $^{-1}$) (Figura 28).

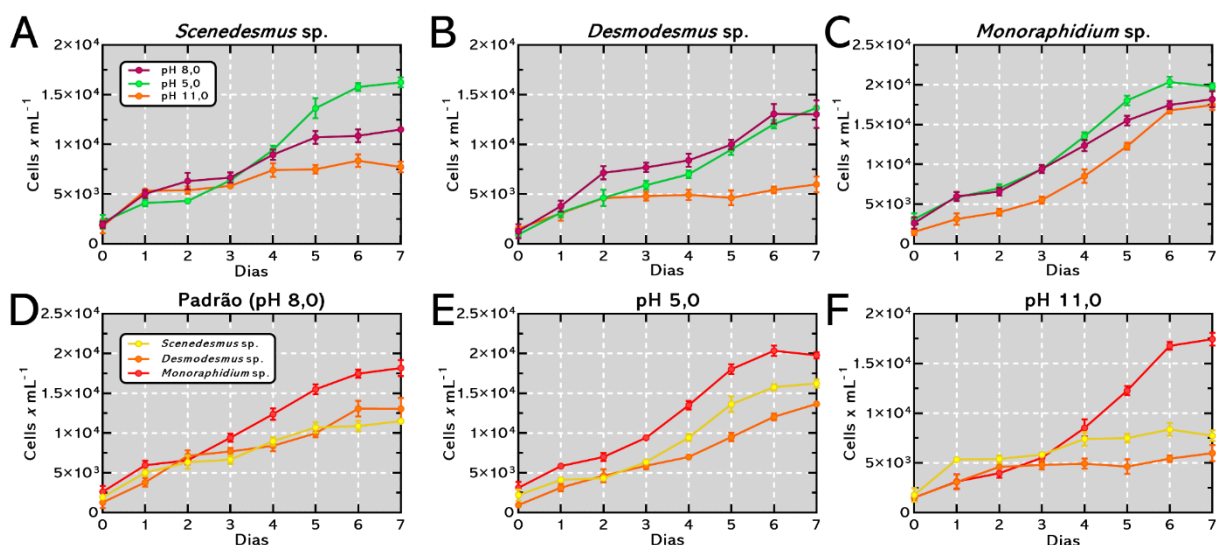


Figura 28. Estabelecimento da taxa de crescimento em diferentes valores de pH. A. a C. Todas as células, i.e., *Desmodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium* sp. apresentaram tolerância ao pH ácido estabelecido em 5,0 e, em alguns casos, como em *Scenedesmus* e *Monoraphidium* a taxa de crescimento superou a da condição de pH controle em 8,0. Em contrapartida, *Desmodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp. apresentaram menor taxa de crescimento em pH básico (11,0).

Por fim, foi realizado a quantificação do teor de lipídeos neutros por célula para as microalgas observando a exposição às diferentes concentrações de cloreto férrico (e.g., concentração padrão, 10 \times e BM \times) e às diferentes condições de pH (5,0, 8,0 e 11,0) ao final do intervalo de 7 dias, em que t_0 representa o dia 0 e t_F representa o dia 7 (Figura 29). Logo, foi possível observar aumento significativo da intensidade média de fluorescência \cdot célula $^{-1}$, o que pode estar diretamente relacionado ao acúmulo de lipídeos neutros nos tipos celulares: (i) *Scenedesmus* sp, representando aumento de $19,03 \pm 1,46\%$ (**** $p < 0,0001$); (ii) *Desmodesmus* sp., representando aumento de $31,31 \pm 4,75\%$ (**** $p < 0,0001$); e (iii) *Monoraphidium* sp., representando aumento de $15,10 \pm 2,90\%$ (** $p = 0,0006$) (Figura 29A-C).

Quanto à concentração crescente de cloreto férrico utilizada, foi possível observar para as células submetidas a 10 \times a concentração padrão aumento significativo para os tipos celulares: (i) *Scenedesmus* sp., representando aumento de $26,58 \pm 2,27\%$ (** $p = 0,0002$); e (ii) *Monoraphidium* sp., representando aumento de $23,42 \pm 3,20\%$ (* $p = 0,0255$). Da mesma forma, quando as células foram submetidas a concentrações \approx 200 \times (i.e., BM \times), houve aumento significativo em: (i) *Scenedesmus* sp., representando aumento de $27,29 \pm 6,68\%$ (**** $p < 0,0001$); e (ii) *Monoraphidium* sp., representando aumento de $23,79 \pm 2,41\%$ (* $p = 0,0264$) (Figura 29D-F).

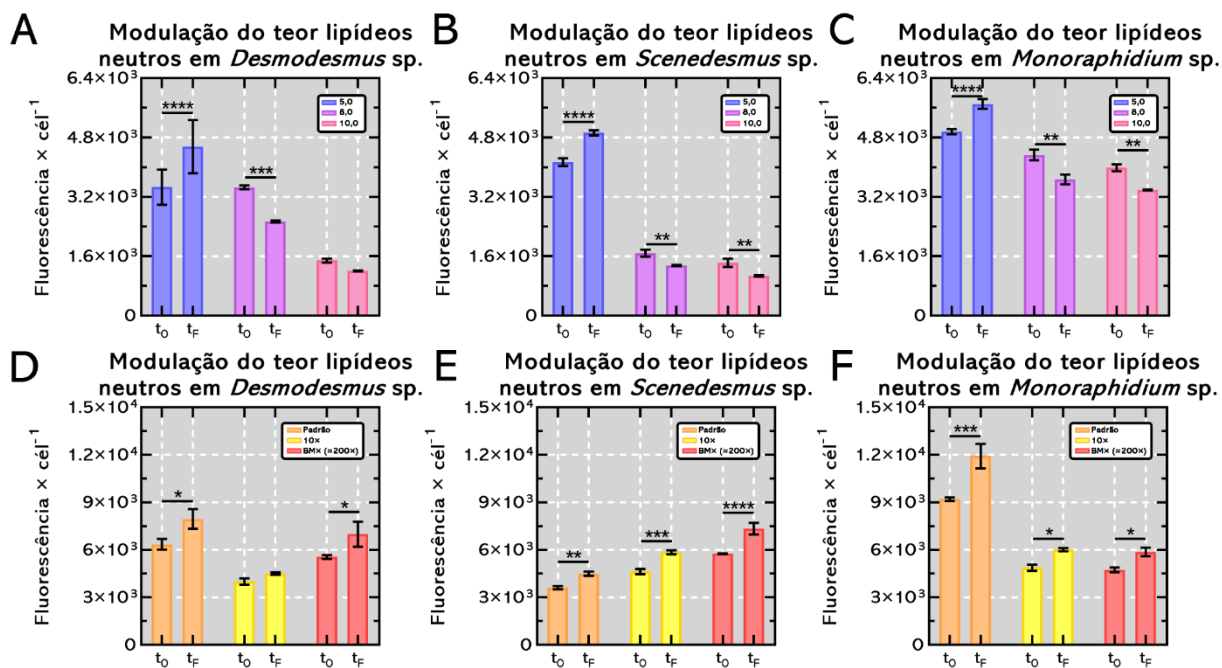


Figura 29. Modulação do teor de lipídeos neutros em condições de alteração de pH e concentração de Fe³⁺ disponível no meio ao longo do intervalo de 7 dias (t₀-t_F). **A. a C.** Ensaios em valores de pH de 5,0, 8,0 e 11,0 para as células de *Desmodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium* sp. Foi possível observar o acúmulo significativo de lipídeos neutros na condição de pH 5,0 para todos os tipos celulares. **D a F.** Ensaios com concentrações de Fe³⁺ padrão, 10× mais e BMx (quantidade equivalente ao cultivo de BMs, *i.e.*, aproximadamente 200× mais). Foi possível observar acúmulo significativo de lipídeos neutros nas condições de cultivo em que todas as espécies foram submetidas a 10× e ≈ 200× a concentração de Fe³⁺ original, exceto para a condição de 10× em *Scenedesmus* sp.

5.2.3. Ensaio de separação magnética de microalgas utilizando NMOBs extraídas de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T com variação de pH em tampão citrato

Foi realizado o ensaio de separação magnética das microalgas após a interação com NMOBs octaédricas alongadas de *Mf. australis* cepa IT-1. É importante ressaltar a proporção do emprego de NMOBs em relação à densidade celular de microalgas, portanto, foram utilizadas 80 μg NMOBs · mL⁻¹ frente a faixas de densidade celular de 3 · 10³ a 1,2 · 10⁴ (Figura 30; Figura 31). Em todos os tipos celulares foi possível observar a resposta pH-dependente, ou seja, quanto menor o valor de pH em tampão citrato e, conseqüentemente, maior a o grau de protonação da superfície da microalga, maior foi a taxa de recuperação magnética para todas as cinco espécies avaliadas, dado a natureza da interação (*i.e.*, interação entre microalgas com superfície em diferentes graus de protonação e NMOBs negativamente carregadas). Em

Scenedesmus sp., foi verificada a melhor taxa de recuperação em pH 3,1, correspondendo a $80,08 \pm 2,08\%$ (Figura 30; Figura 31).

Posteriormente, em ordem decrescente, foram observadas as taxas de recuperação para: (i) *Desmodesmus* sp. em pH 3,1, correspondendo a $75,26 \pm 2,45\%$; (ii) *Nannochloropsis* sp. em pH 3,1, correspondendo a $73,88 \pm 3,74\%$; (iii) *Dunaliella* sp. em pH 3,1, correspondendo a $60,77 \pm 4,30\%$; e (iv) *Monoraphidium* sp. em pH 3,1, correspondendo a $11,61 \pm 1,41\%$ (Figura 30; Figura 31). Além disso, foi verificada diferença estatística significativa ($****p < 0,0001$) após o tratamento com $80 \mu\text{g NMOBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ em todas as condições testadas, exceto para: (i) *Monoraphidium* sp. em pH 4,8 ($***p = 0,0012$) e 6,4 ($p = \text{ns}$); e (ii) *Dunaliella* sp. em pH 4,8 ($**p = 0,0018$). Portanto, taxas satisfatórias a boas, ou seja, compreendidas entre 60 e 80% de recuperação da biomassa, foram observadas para *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Dunaliella* sp. No entanto, *Monoraphidium* sp. representou a exceção à faixa de recuperação obtida para os demais tipos celulares, com taxa de recuperação de $11,61 \pm 1,41\%$. Por fim, foi realizado o ajuste de polinômio do 2º grau — *i.e.*, quadrático — para as taxas de recuperação das cinco microalgas testadas, respectivamente, retornando bons valores de qualidade do ajuste ($R^2 > 0,82$) para todos os tipos celulares (Tabela 5) (Figura 30; Figura 31).

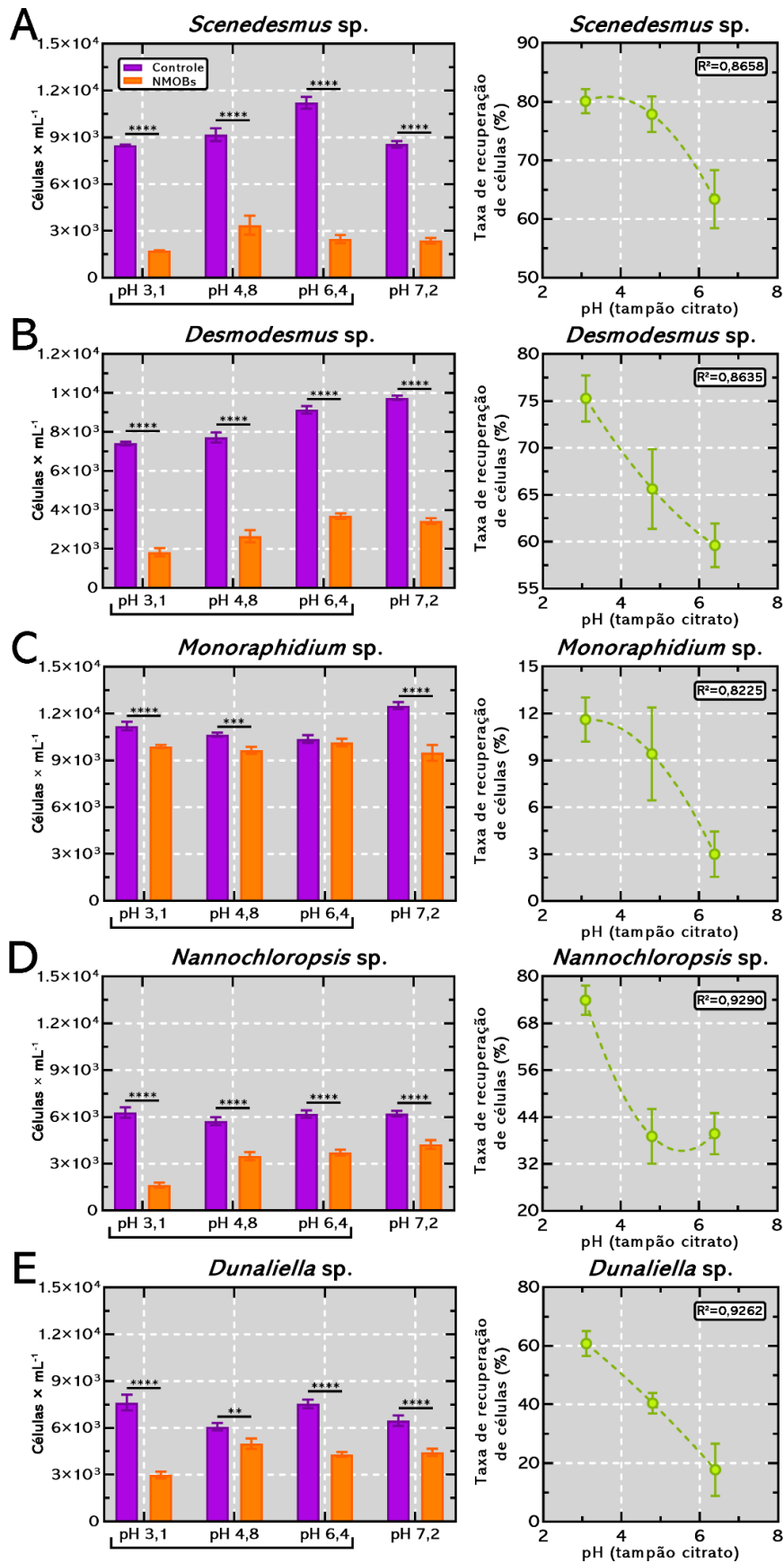


Figura 30. Taxa de recuperação magnética das espécies de microalgas utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1. Logo, foi possível observar a resposta pH-dependente, ou seja, ou seja, quanto menor o valor de pH e, conseqüentemente, maior a o grau de protonação da superfície da microalga, maior é a taxa de recuperação magnética para todas as 5 espécies avaliadas. **A.** *Scenedesmus* sp. apresentou melhor taxa de recuperação em pH 3,1, correspondendo a $80,08 \pm 2,08\%$. **B.** *Desmodesmus* sp. apresentou melhor taxa de recuperação em pH 3,1, correspondendo a $75,26 \pm 2,45\%$. **C.** *Monoraphidium* sp. apresentou melhor taxa de recuperação em pH 3,1, correspondendo a $11,61 \pm 1,41\%$. **D.** *Nannochloropsis* sp. apresentou melhor taxa de recuperação em pH 3,1, correspondendo a $73,88 \pm 3,74\%$. **E.** *Dunaliella* sp. apresentou melhor taxa de recuperação em pH 3,1, correspondendo a $60,77 \pm 4,30\%$.

Uso de NMOBs na floculação de espécies de microalgas

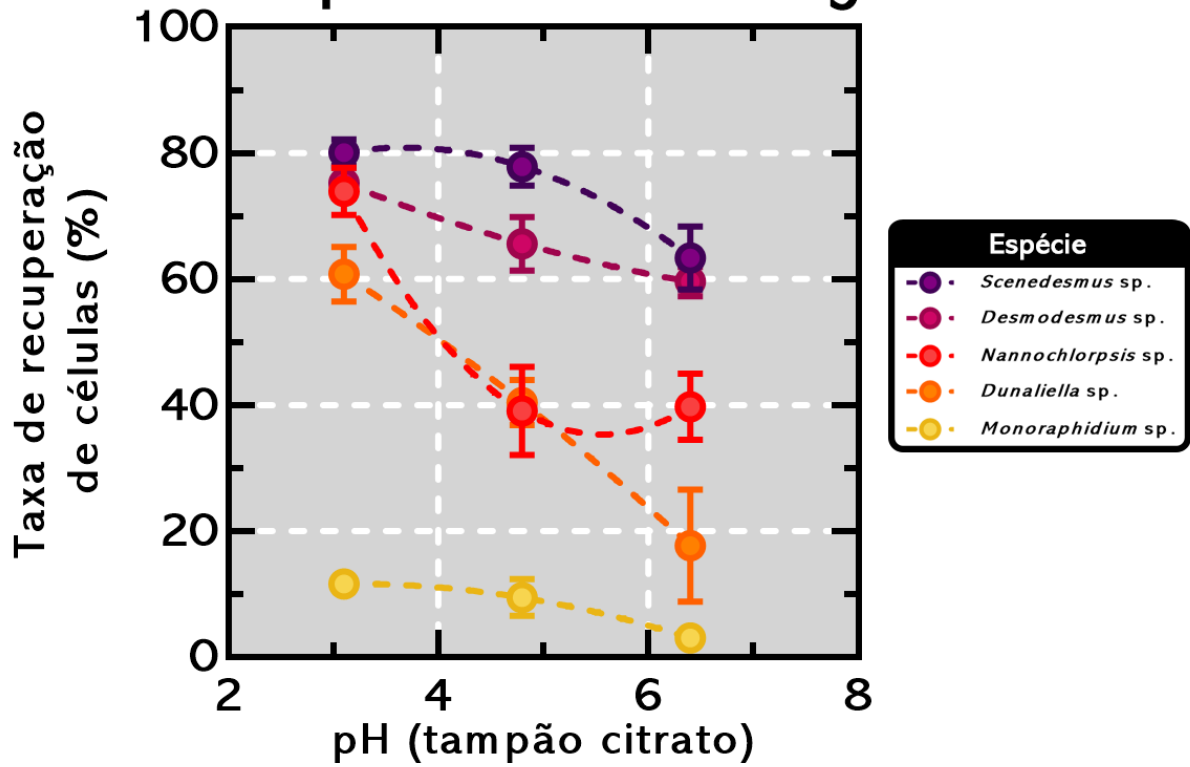


Figura 31. Taxa de recuperação magnética das espécies de microalgas utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 com resposta pH-dependente. Logo, foi possível observar resposta pH-dependente, ou seja, quanto menor o valor de pH e, conseqüentemente, maior o grau de protonação da superfície da microalga, maior é a taxa de recuperação magnética para todas as 5 espécies avaliadas. A melhor taxa de recuperação (e.g., 80,08 ± 2,08%) foi obtida em pH 3,1 para *Scenedesmus sp.* Outras 3 espécies (i.e., *Desmodesmus sp.*, *Nannochloropsis sp.* e *Dunaliella sp.*) seguiram a mesma tendência com valores entre 75,26% e 60,77%. A taxa de recuperação não seguiu a tendência para *Monoraphidium sp.*, retornando valores de 11,61 ± 1,41% em pH 3,1.

Tabela 5. Qualidade do ajuste de regressão quadrática pelo valor de R²

Célula	R ²
<i>Nannochloropsis sp.</i>	0,93
<i>Dunaliella sp.</i>	0,93
<i>Scenedesmus sp.</i>	0,87
<i>Desmodesmus sp.</i>	0,86
<i>Monoraphidium sp.</i>	0,82

Uma vez estabelecida a interação e a recuperação magnética das microalgas através do emprego de NMOBs, o resultado da interação foi observado em microscopia óptica em DIC e registrado em vídeo (Figura 32; Figura 33; Figura 34). Logo, foi possível observar a adsorção das NMOBs à superfície de *Scenedesmus sp.* em todas as condições de pH testadas no tampão citrato (3,1, 4,8 e 6,4) e fosfato (7,2) promovendo a agregação das células e conferindo à capacidade de separação magnética do grumo formado entre a interação de ambos (Figura 32;

Figura 33; Figura 34). Ademais, após a interação por 5 min com a superfície protonada da microalga (pH 3,1) e 20 s de exposição à aplicação de campo magnético externo gerado por ímã de neodímio, é possível observar a concentração magnética do material flocculado na parede interna do tubo e a clarificação do meio (Figura 33). Para *Monoraphidium* sp., não há a formação de grumos contendo a biomassa celular e, aparentemente, o efeito parece ser o oposto. Dessa forma, *Monoraphidium* sp. parece excluir a interação de NMOBs e aglomera as NPs de forma isolada, o que pode justificar a baixa recuperação observada anteriormente. Em suma, tais observações corroboram os dados obtidos anteriormente pela quantificação da taxa de recuperação magnética (Figura 30; Figura 31).

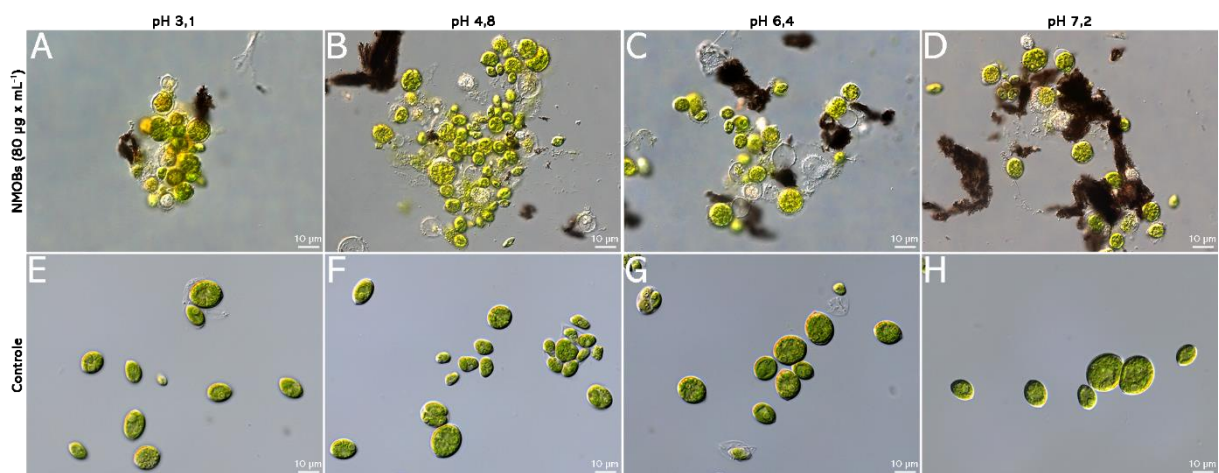


Figura 32. Observação em DIC da resposta de separação magnética de *Scenedesmus* sp. utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1. As colunas representam as alterações do valor de pH utilizando tampão citrato (3,1, 4,8 e 6,4) e tampão fosfato (7,2) ao passo que as linhas representam a condição de tratamento (NMOBs a $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o controle. É possível observar a presença de grumos que indicam a interação do material flocculado — *i.e.*, interação entre microalgas com superfície em diferentes graus de protonação e NMOBs negativamente carregadas — em todas as condições de alteração de pH testadas.

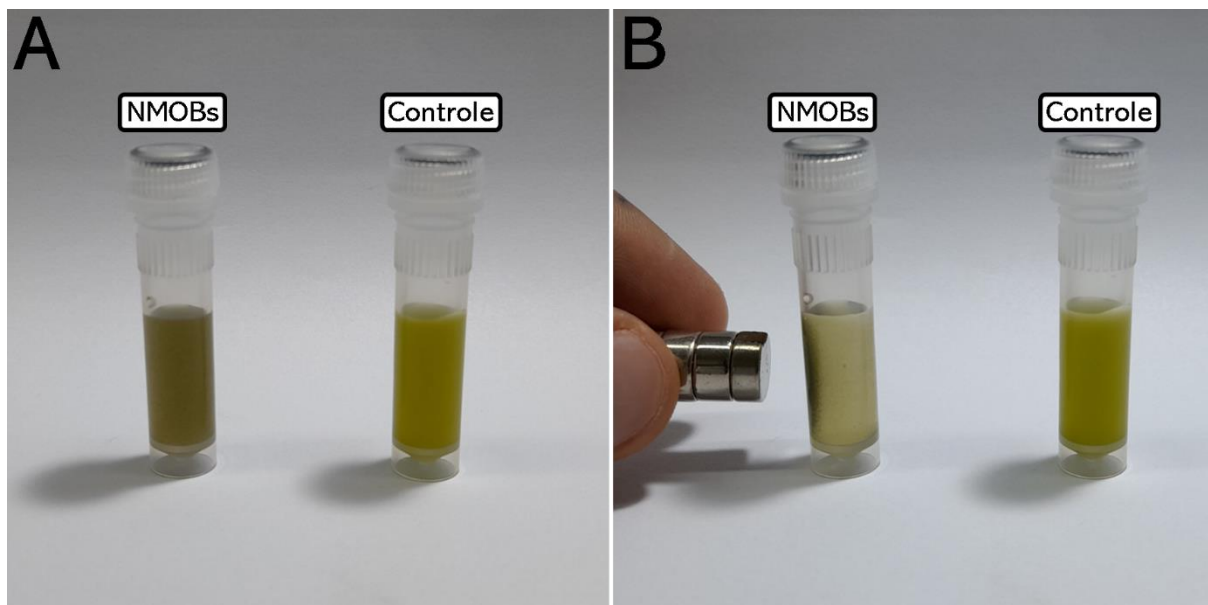


Figura 33. Observação da resposta de separação magnética de *Scenedesmus* sp. utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1. **A.** As NMOBs interagiram por 5 min com a superfície protonada da microalga (pH 3,1). **B.** Após 20s de aplicação de campo magnético externo gerado por ímã de neodímio, é possível observar a concentração magnética do material floculado na parede interna do tubo e a clarificação do meio.

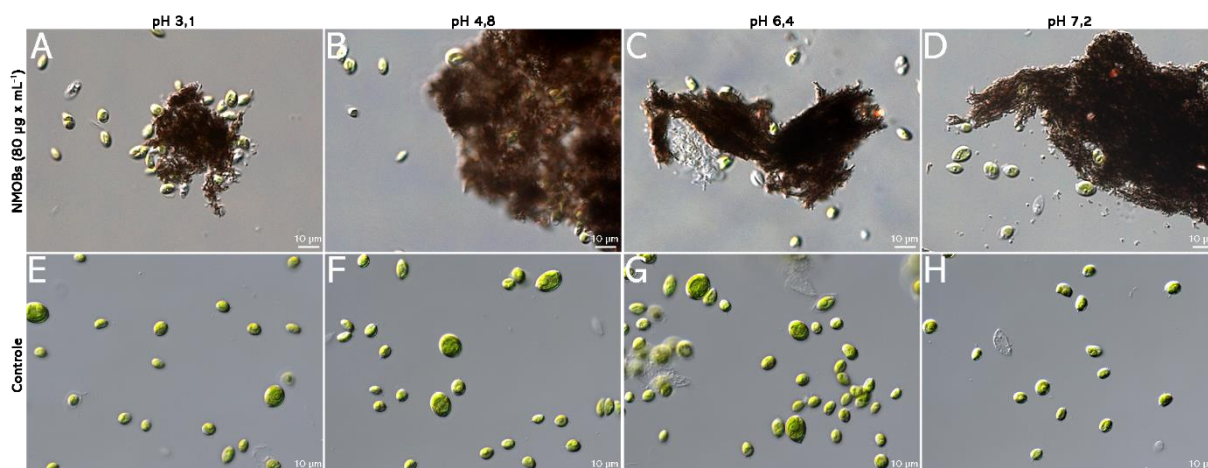


Figura 34. Observação em DIC da resposta de separação magnética de *Monoraphidium* sp. utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1. As colunas representam as alterações do valor de pH utilizando tampão citrato (3,1, 4,8 e 6,4) e tampão fosfato (7,2) ao passo que as linhas representam a condição de tratamento (NMOBs a $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o controle. Não há o padrão de interação esperado e, consequentemente, não há a formação de material floculado — *i.e.*, interação entre microalgas com superfície em diferentes graus de protonação e NMOBs negativamente carregadas — em todas as condições de alteração de pH testadas.

Em seguida, o ensaio de separação magnética foi validado utilizando NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Figura 35). Portanto, foram utilizadas as microalgas que apresentaram a melhor e a pior taxa de recuperação — ou seja, *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium*, respectivamente — previamente observada durante a utilização de NMOBs *Mf. australis* cepa IT-1. Dessa forma, foi possível observar a mesma tendência de resposta pH-dependente, ou

seja, quanto menor o valor de pH e, conseqüentemente, maior a o grau de protonação da superfície da microalga, maior é a taxa de recuperação magnética. A melhor taxa de recuperação para *Scenedesmus* sp. foi obtida em pH 3,1, sendo $82,03 \pm 6,55\%$, semelhante à faixa observada anteriormente ($80,08 \pm 2,08\%$). Para *Monoraphidium* sp. foi observada a mesma tendência, obtida em pH 3,1, sendo $13,72 \pm 3,78\%$. Também foi realizado o ajuste de polinômio do 2º grau — *i.e.*, quadrático — para as taxas de recuperação de *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium* sp., respectivamente, retornando os valores de R^2 de 0,74 e 0,71.

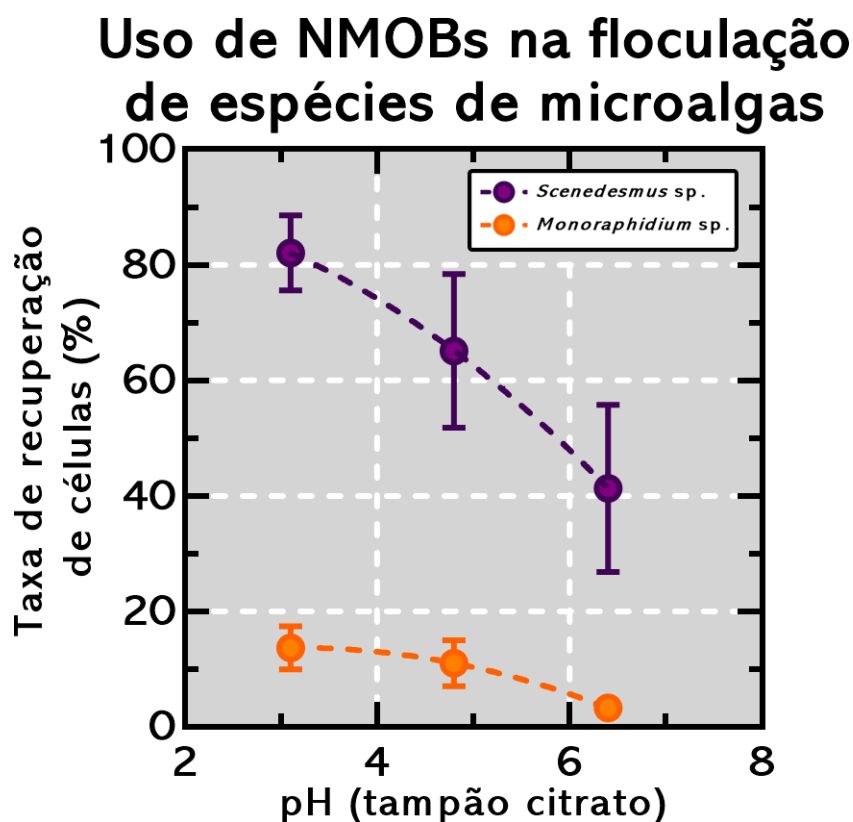


Figura 35. Validação do ensaio de recuperação magnética para NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T. Foram selecionadas as espécies com melhor e pior taxa de recuperação para a validação dos resultados obtidos anteriormente com NMOBs extraídas de *Mf. australis* cepa IT-1. Foi possível observar a mesma tendência de resposta pH-dependente, ou seja, quanto menor o valor de pH e, conseqüentemente, maior a o grau de protonação da superfície da microalga, maior é a taxa de recuperação magnética. A melhor taxa de recuperação: (i) para *Scenedesmus* sp. foi obtida em pH 3,1, sendo $82,03 \pm 6,55\%$; e (ii) para *Monoraphidium* sp. também obtida em pH 3,1, sendo $13,72 \pm 3,78\%$.

5.2.4. Desafio do ensaio de separação magnética utilizando NPMSs

O ensaio de separação magnética foi repetido utilizando NPMSs nas mesmas condições de pH em tampão citrato, sob o mesmo tempo de interação — *i.e.*, 5 min — e sob a mesma concentração das NMOBs utilizadas — *i.e.*, $80 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 36). Primeiramente, as

NPs foram observadas em TEM, não possuindo forma definida e diâmetros de até 50 nm (Figura 36A). Após 20 s de aplicação de campo magnético externo gerado por ímã de neodímio, foi de difícil observação a concentração magnética do material concentrado na parede interna do tubo e não houve aparente clarificação do meio (Figura 37). No entanto, apesar da difícil observação durante o registro em tempo real, a aferição da taxa de recuperação por DO foi realizada (Figura 36B; Tabela 6). A eficiência maior próxima foi detectada próxima ao pH neutro, isto é, comportamento diverso do observado para NMOBs. Logo, foi possível observar resposta pH-dependente diversa da constatada durante o uso de NMOBs, ou seja, quanto maior o valor de pH, maior é a taxa de recuperação magnética para todas as cinco espécies avaliadas ao utilizar as NPSs. A melhor taxa de recuperação (e.g., $79,61 \pm 10,26\%$) foi obtida em pH 6,4 para *Nannochloropsis* sp.

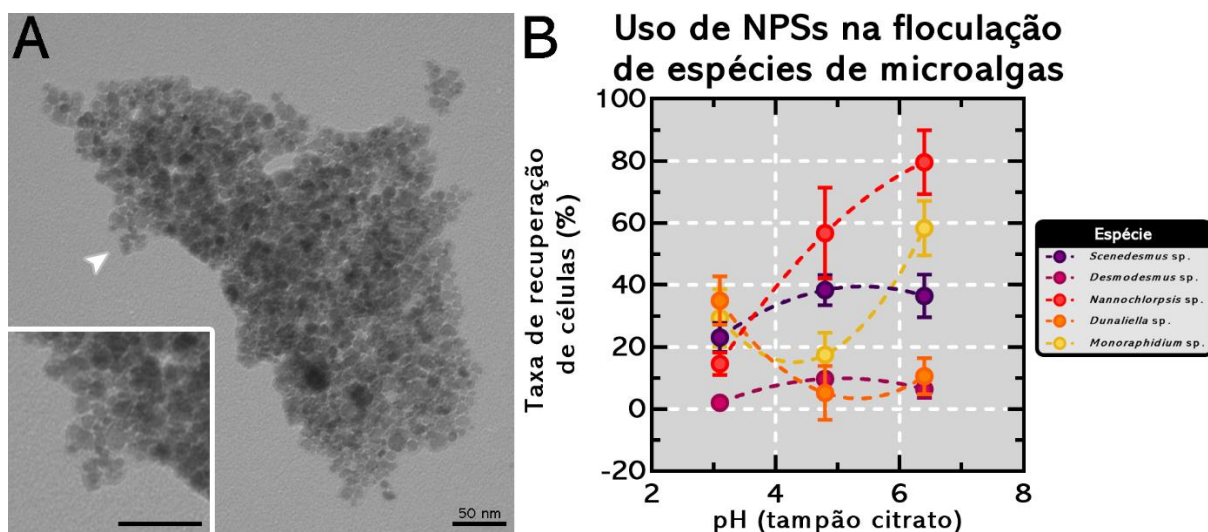


Figura 36. Caracterização em TEM e taxa de recuperação magnética das espécies de microalgas utilizando NPSs de Fe_3O_4 . **A.** Observação em TEM de NPMSs com diâmetro médio de até 50 nm. *Inset* com região em maior aumento indicada pela cabeça de seta branca e mesmo valor de referência para barra de escala. **B.** Eficiência maior próxima do pH neutro, isto é, comportamento diverso do observado para NMOBs. Logo, foi possível observar resposta pH-dependente diversa da constatada durante o uso de NMOBs, ou seja, quanto maior o valor de pH, maior é a taxa de recuperação magnética para todas as 5 espécies avaliadas ao utilizar as NPSs. A melhor taxa de recuperação (e.g., $79,61 \pm 10,26\%$) foi obtida em pH 6,4 para *Nannochloropsis* sp.

Tabela 6. Qualidade do ajuste de regressão quadrática pelo valor de R^2

Célula	R^2
<i>Nannochloropsis</i> sp.	0,90
<i>Dunaliella</i> sp.	0,81
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,68
<i>Desmodesmus</i> sp.	0,75
<i>Monoraphidium</i> sp.	0,86

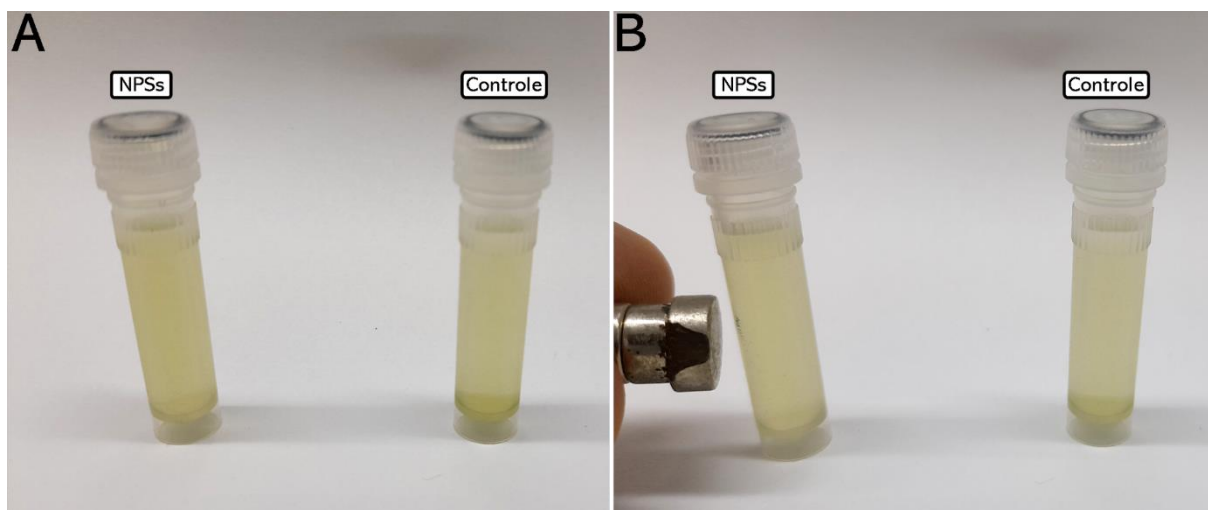


Figura 37. Observação da resposta de separação magnética de *Scenedesmus* sp. utilizando NPSs de Fe_3O_4 . **A.** As NPSs interagiram por 5 min com a superfície protonada da microalga (pH 3,1). **B.** Após 20s de aplicação de campo magnético externo gerado por ímã de neodímio, foi de difícil observação a concentração magnética do material floculado na parede interna do tubo e não houve aparente clarificação do meio.

5.2.5. Construção de superfície de resposta da recuperação magnética de microalgas variando condições de pH e salinidade

Previamente, antes do planejamento experimental realizado para construção da superfície de resposta, foi realizado desafio em número reduzido de condições experimentais para o ensaio de floculação e separação magnética das NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, da NPs de magnetita sintética e do flocculante químico, mantido sob sigilo, utilizado na etapa de recuperação da biomassa (Figura 38).

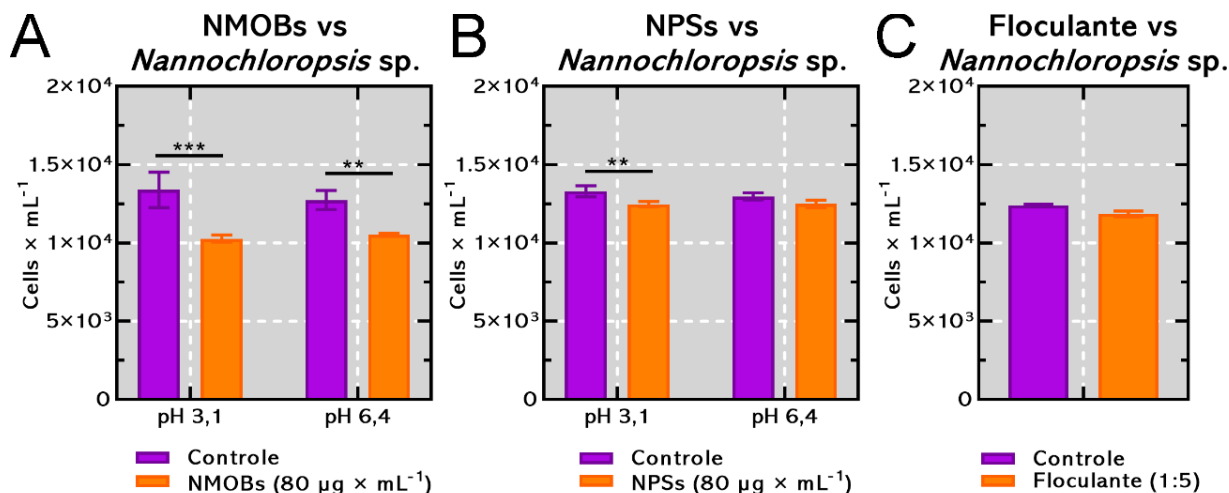


Figura 38. Desafio inicial sobre taxa de recuperação de microalgas do gênero *Nannochloropsis* sp. utilizando NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, NPSs de Fe₃O₄ e flocculante catiônico. **A.** Taxa de recuperação estatisticamente significativa de 23,01 ± 4,94% e (***)*p*=0,0008 e 17,31 ± 3,27% (**)*p*=0,0063 em tampão citrato com pH 3,1 e 6,4, respectivamente. **B.** Taxa de recuperação de 6,22 ± 2,88% estatisticamente significativa apenas em tampão citrato com pH 3,1 (**)*p*=0,0076. **C.** Não houve recuperação estatisticamente significativa ao utilizar o flocculante (4,30 ± 1,81%) na condição de cultivo com pH 8,0.

Na condição de cultivo — *i.e.*, 40 g NaCl · L⁻¹ — e ressuspensas em tampão citrato com pH 3,1 ou 6,4, as NMOBs apresentaram taxa de recuperação estatisticamente significativa de 23,01 ± 4,94% e (***)*p*=0,0008 e 17,31 ± 3,27% (**)*p*=0,0063, respectivamente (Figura 39A). NPs sintéticas obtiveram taxa de recuperação estatisticamente significativa de 6,22 ± 2,88% (**)*p*=0,0076 em pH 3,1 (Figura 39B). Não houve recuperação estatisticamente significativa ao utilizar o flocculante químico (4,30 ± 1,81%), na condição de cultivo com pH 8,0 (Figura 39C).

Foi possível observar o ponto ótimo (cabeça de seta laranja) e o ponto da condição de cultivo (Figura 39; cabeça de seta vermelha). O ponto ótimo, conforme previamente descrito anteriormente, foi atingido no pH 3,1 e sem adição de NaCl ao meio de cultura (correspondendo à recuperação de 46,5%). O ponto da condição de cultivo (Figura 39; cabeça de seta vermelha) — *i.e.*, 10 g NaCl · L⁻¹ — obteve recuperação de 25,12%, correspondendo à aproximadamente metade da eficiência encontrada na condição ótima.

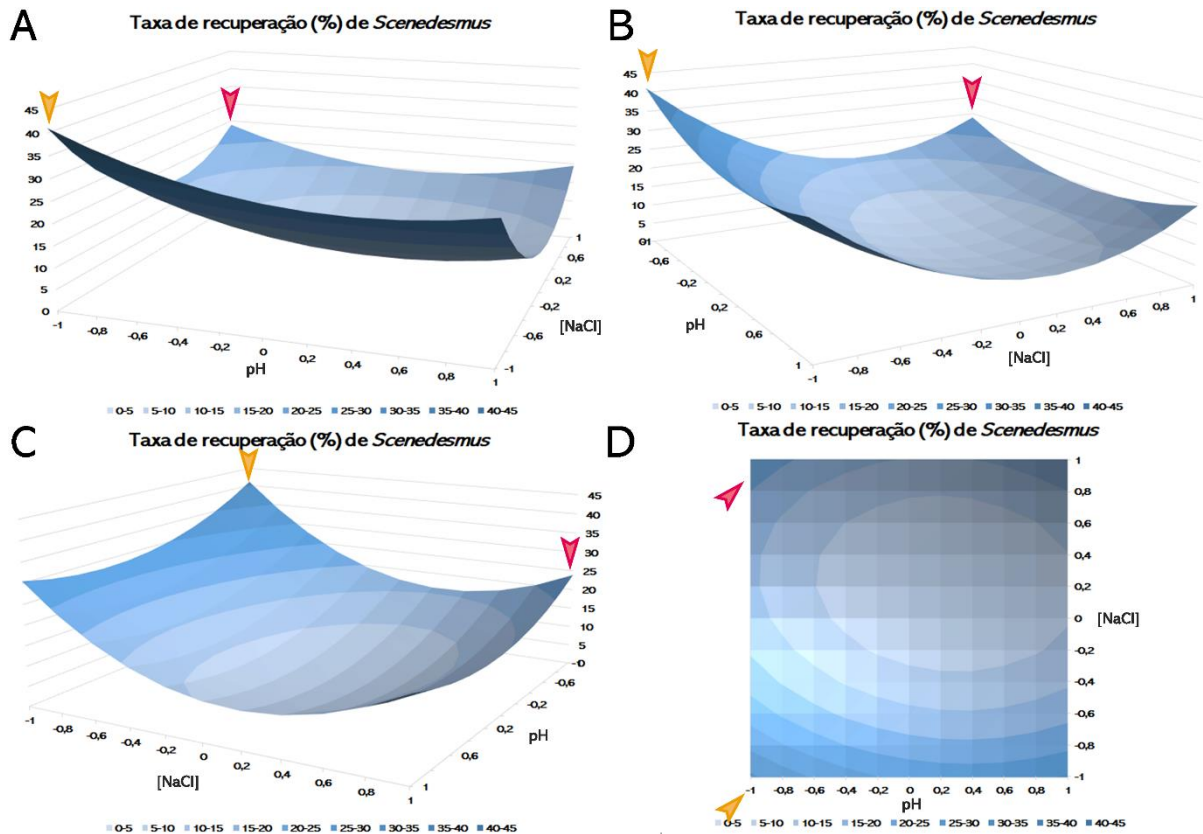


Figura 39. Superfície de resposta da taxa de recuperação de *Scenedesmus* sp. utilizando NMOBs variando as condições de pH e concentração de NaCl. **A.**, **B.** e **C.** Superfície de resposta projetada em três dimensões com valores de pH fixados nos níveis -1, 0 e 1 correspondentes a valores de pH de 3,1, 4,8 e 6,4, respectivamente. Valores da concentração de NaCl foram fixados nos níveis -1, 0 e 1 que correspondem a 0, 5 e 10 g NaCl · L⁻¹. **D.** Projeção em duas dimensões da superfície de resposta. São mostrados o ponto ótimo (cabeça de seta laranja) e o ponto da acidificação da condição de cultivo com 10 g NaCl · L⁻¹ (cabeça de seta vermelha).

Em seguida, conforme descrito anteriormente, foram plotadas as superfícies de resposta conforme o modelo descrito em diferentes rotações a fim de facilitar a visualização e interpretação (Figura 39). Após o cálculo dos coeficientes, foi previsto o modelo a seguir para *Scenedesmus* sp, descrito pela Equação 11:

$$y = 6,39 - 3,74x_1 - 7,05x_2 + 1,54x_1x_2 + 6,89x_1^2 + 15,44x_2^2$$

Equação 11. Modelo do polinômio com os coeficientes calculados que representa a superfície de resposta da taxa de recuperação para *Scenedesmus* sp.

Em que: (i) y representa a taxa de recuperação magnética das células; (ii) x_1 representa a variação dos níveis de pH; e (iii) x_2 representa a variação dos níveis da concentração de NaCl.

O planejamento experimental foi reproduzido para o desafio em condição hipersalina para *Nannochloropsis* sp. (Figura 40; Figura 41). Após o cálculo dos coeficientes, foi previsto o modelo a seguir para *Nannochloropsis* sp., representado pela Equação 12:

$$y = 39,12 - 14,09x_1 - 1,19x_2 + 4,11x_1x_2 + 11,59x_1^2 - 8,92x_2^2$$

Equação 12. Modelo do polinômio com os coeficientes calculados que representa a superfície de resposta da taxa de recuperação para *Nannochloropsis* sp.

Em que: (i) y representa a taxa de recuperação magnética das células; (ii) x_1 representa a variação dos níveis de pH; e (iii) x_2 representa a variação dos níveis da concentração de NaCl.

Foi possível observar o ponto ótimo (Figura 40; cabeça de seta laranja), ponto da condição de cultivo (Figura 40; cabeça de seta vermelha) e ponto intermediário quanto ao ajuste de pH e salinidade (Figura 40; cabeça de seta azul). O ponto ótimo, conforme previamente descrito anteriormente, foi atingido no pH 3,1 e sem adição de NaCl ao meio de cultura (Figura 40; cabeça de seta laranja) correspondendo à recuperação de 59,52%. O ponto da condição de cultivo (Figura 40; cabeça de seta vermelha) — *i.e.*, 40 g NaCl · L⁻¹ — obteve recuperação de 52,08%, correspondendo a uma queda pouco significativa ao consideramos as condições do processo. Além disso, ponto da intermediário da salinidade do cultivo (Figura 40; cabeça de seta vermelha) — *i.e.*, 20 g NaCl · L⁻¹ — obteve recuperação de 64,93%, correspondendo a um aumento ligeiramente superior ao esperado para o ponto ótimo, previamente descrito. A concentração magnética das células foi facilmente observada durante o ensaio (Figura 41).

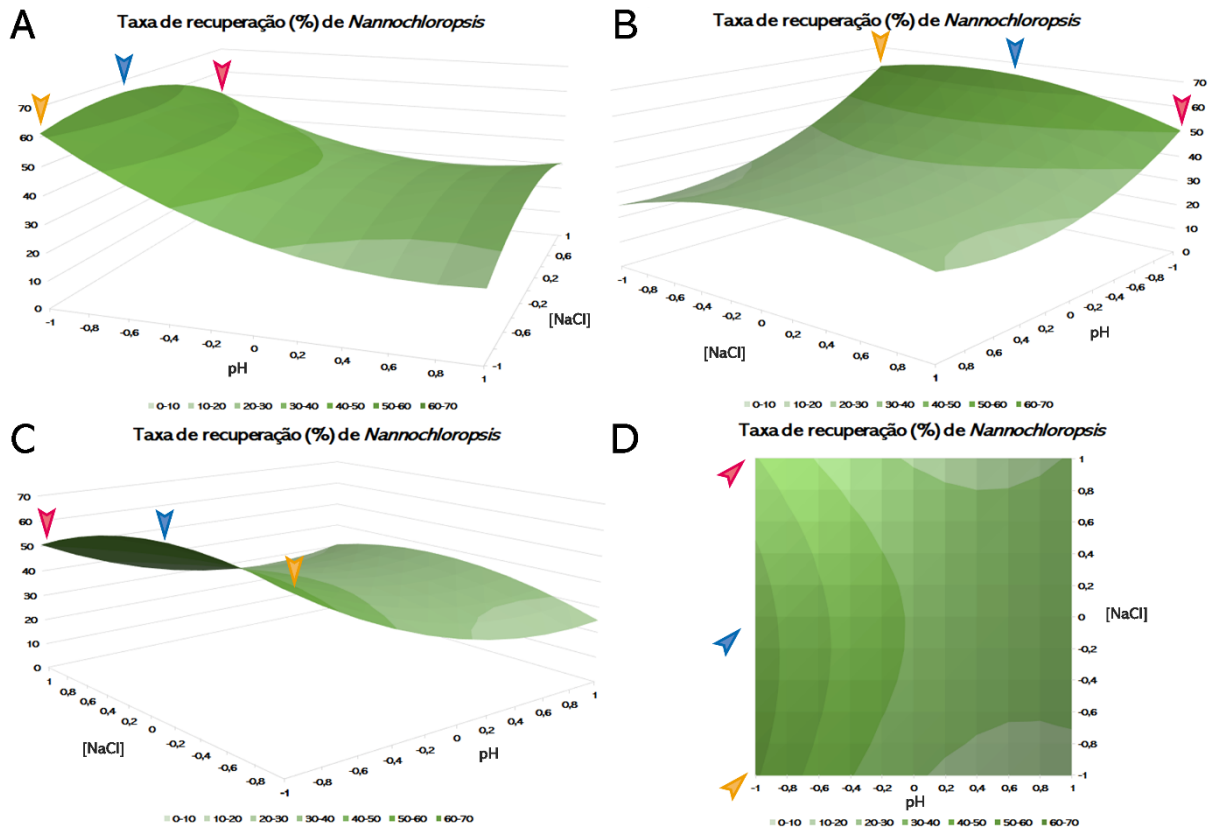


Figura 40. Superfície de resposta da taxa de recuperação de *Nannochloropsis* sp. utilizando NMOBs variando as condições de pH e concentração de NaCl. **A.**, **B.** e **C.** Superfície de resposta projetada em três dimensões com valores de pH fixados nos níveis -1, 0 e 1 correspondentes a valores de pH de 3,1, 4,8 e 6,4, respectivamente. Valores da concentração de NaCl foram fixados nos níveis -1, 0 e 1 que correspondem a 0, 20 e 40 g · L⁻¹. **D.** Projeção em duas dimensões da superfície de resposta. São mostrados o ponto ótimo (cabeça de seta laranja; taxa de recuperação de 52,08%), o ponto da acidificação da condição de cultivo com 40 g NaCl · L⁻¹ (cabeça de seta vermelha) e o ponto de acidificação na condição central da concentração de NaCl (20 g · L⁻¹; cabeça de seta azul).

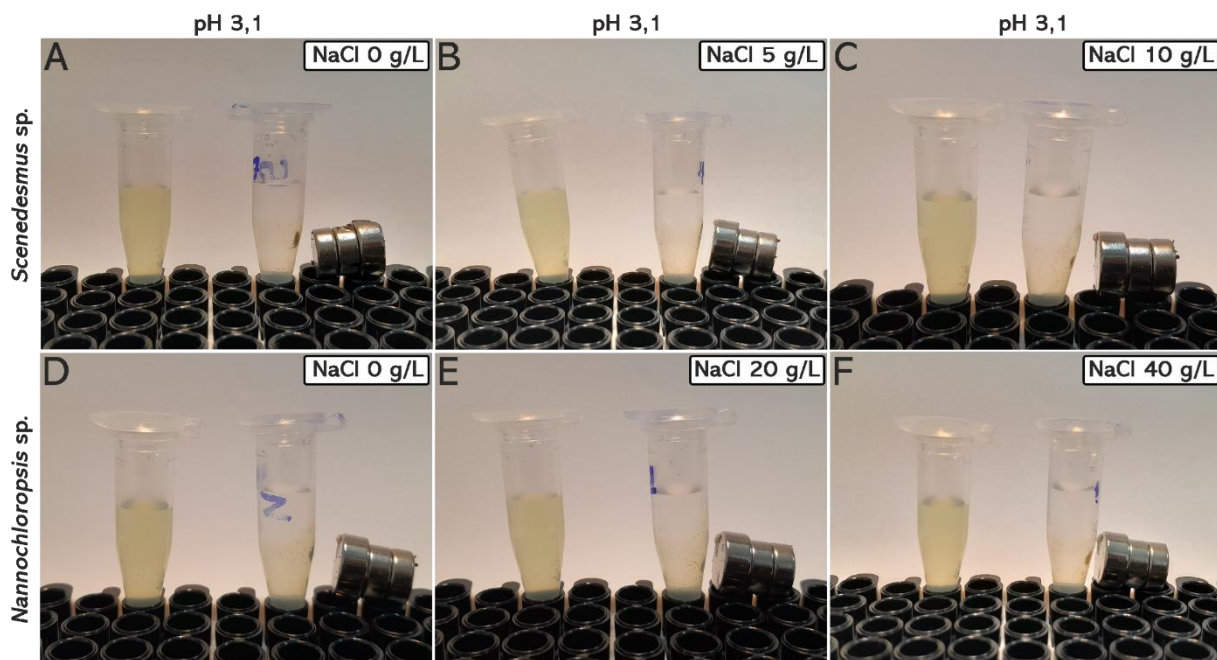


Figura 41. Observação da separação magnética após o desafio de *Nannochloropsis* em condições de salinidade crescente e pH fixado em 3,1. **A.** a **C.** Controle em diferentes condições abordadas no planejamento experimental para *Scenedesmus* sp. Foi possível observar a interação com as NMOBs e, posteriormente, a separação magnética por ímã de neodímio posicionado na lateral do microtubo. Observação: em cada imagem à esquerda encontra-se o tubo controle e à direita o tubo com interação de NMOBs para floculação e separação magnética. **D.** a **E.** Desafio em crescentes concentrações de NaCl (0, 20 e 40 g · L⁻¹) para *Nannochloropsis* sp. Foi possível observar a resposta magnética da biomassa floculada após a interação com NMOBs em todas as condições.

O impacto da alteração da concentração de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T sobre a taxa de recuperação celular também foi avaliado (**Figura 42**). Logo, para o ensaio realizado com *Scenedesmus* sp. em condição ótima de recuperação previamente estabelecida — *i.e.*, não adição de NaCl, lavagem da célula e alteração do estado de protonação da superfície celular por variação de pH em tampão citrato. Na condição de pH 3,1, foi observada a taxa de recuperação de: (i) 46,30 ± 2,70% com NMOBs a 0,8 µg · mL⁻¹; (ii) 78,04 ± 2,26% com NMOBs a 80 µg · mL⁻¹; e (iii) 83,23 ± 3,64% com NMOBs a 800 µg · mL⁻¹). Também foi realizado o ajuste de polinômio do 2º grau — *i.e.*, quadrático — para as condições de NMOBs testadas, retornando, respectivamente, os valores de R² de: 0,59, 0,73 e 0,83. Dessa forma, para *Scenedesmus* sp., não houve ganho significativo ($p=ns$) no aumento da concentração de NMOBs e houve perda significativa (**** $p<0,0001$) ao reduzir a quantidade ótima de NMOBs de 80 µg · mL⁻¹ para ,8 µg · mL⁻¹ (**Figura 42A**).

Em seguida, o mesmo foi avaliado para *Nannochloropsis* sp. em desafio de condição hipersalina (*i.e.*, 40 g NaCl · mL⁻¹). Na condição de pH 3,1, foi observada a taxa de recuperação de: (i) 36,66 ± 12,82% com NMOBs a 0,8 µg · mL⁻¹; (ii) 57,5 ± 6,61% com NMOBs a 80 µg · mL⁻¹; e (iii) 55,01 ± 6,54% com NMOBs a 800 µg · mL⁻¹. Também foi realizado o ajuste de

polinômio do 2º grau — *i.e.*, quadrático — para as condições de NMOBs testadas, retornando, respectivamente, os valores de R^2 de: 0,48, 0,12 e 0,045. Dessa forma, para *Nannochloropsis* sp. não houve ganho significativo ($p=ns$) no aumento da concentração de NMOBs e houve perda significativa em alguns casos (***** $p=0,0002$) ao reduzir a quantidade ótima de NMOBs de $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para $,8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 42B). Portanto, em ambos os tipos celulares, não houve ganho significativo da taxa de recuperação magnética ao aumentar a concentração de uso das NMOBs.

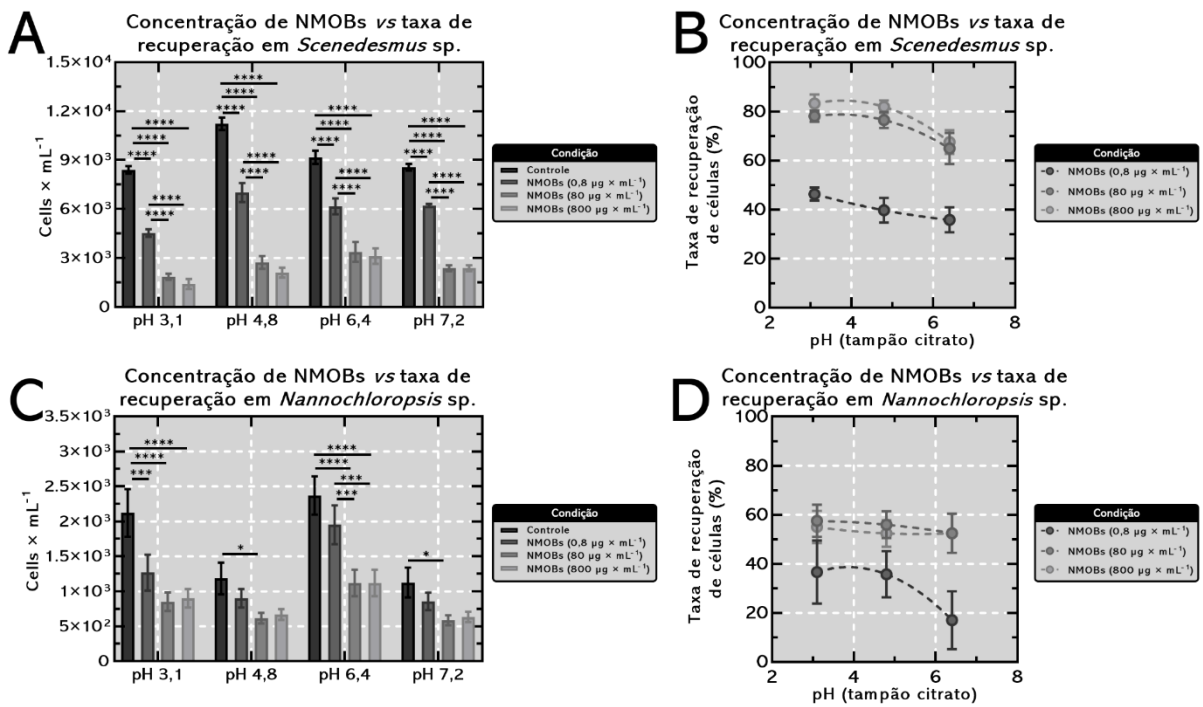


Figura 42. Impacto da alteração da concentração de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T sobre a taxa de recuperação celular. **A.** Ensaio realizado com *Scenedesmus* em condição ótima (*i.e.*, não adição de NaCl e alteração do pH por tampão citrato). Na condição de pH 3,1, foi observada a taxa de recuperação de: (i) $78,04 \pm 2,26\%$ a $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; e (ii) $83,23 \pm 3,64\%$ a $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **B.** Ensaio realizado com *Nannochloropsis* sp. em desafio na condição hipersalina ($40 \text{g NaCl} \cdot \text{mL}^{-1}$). Na condição de pH 3,1, foi observada a taxa de recuperação de: (i) $57,5 \pm 6,61\%$ com NMOBs a $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; e (ii) $55,01 \pm 6,54\%$ com NMOBs a $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Em suma, em ambos os tipos celulares não houve ganho significativo da taxa de recuperação magnética ao aumentar a concentração de uso das NMOBs.

5.3. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

5.3.1. Modelagem molecular de proteínas de membrana de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

Foram construídos 25 modelos referentes às Mam e Mms cujos genes estão contidos no MGC de *M. blakemorei* cepa MV-1^T (Trubitsyn *et al.*, 2016). Foram obtidas sequências que correspondem a proteínas com: (i) n° de resíduos variando entre 68 (*i.e.*, MamI) a 707 (*i.e.*, MamO); (ii) massa molecular de 7,45 (*i.e.*, MamI) a 7,20 kDa (*i.e.*, MamO); (iii) pI teórico entre 4,35 (*i.e.*, MamI) e 10,11 (*i.e.*, MamR); (iv) z entre -23,174 (*i.e.*, MamK) e 14,50 (*i.e.*, MamZ); e (v) razão *m/z* entre -75,74 (*i.e.*, MamE) e 61,97 (*i.e.*, MamH) (Tabela 7). Dentre os modelos construídos, cabe ressaltar proteínas com qualidades que podem ser futuramente exploradas em Biotecnologia como: (i) MamI, com maior percentual de resíduos ácidos, correspondendo a uma proteína de 68 resíduos com 7,45 kDa, pI teórico de 4,35, com z igual a -4,725 e razão *m/z* igual a -1,5775; MamR, com maior percentual de resíduos básicos, correspondendo a uma proteína de 83 resíduos com 9,37 kDa, pI teórico igual a 10,11, z igual a +6,383 e razão *m/z* igual a +1,4679.

Tabela 7. Características gerais das proteínas de membrana de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Nº de resíduos	pI teórico	Carga (z)	Razão <i>m/z</i>
MamA	24,240	215	6,076	-6,410	-3,782
MamB	33,380	309	4,909	-10,124	-3,297
MamC	11,063	113	4,748	-5,638	-1,962
MamD	20,948	215	9,808	10,295	2,035
MamE	73,167	705	7,076	-0,966	-75,742
MamH	47,856	436	7,925	1,140	41,979
MamI	7,454	68	4,350	-4,725	-1,578
MamK	39,363	360	4,521	-23,174	-1,699
MamK-II	38,866	356	4,571	-22,142	-1,755
MamM	34,924	318	6,453	-5,345	-6,534
MamN	46,942	438	4,721	-11,915	-3,940
MamO	74,206	707	5,974	-7,546	-9,834
MamP	33,624	316	4,962	-12,884	-2,610
MamQ	30,528	270	5,943	-3,599	-8,482
MamR	9,370	83	10,113	6,383	1,468
MamR-like	10,582	96	9,707	4,710	2,247
MamS	19,850	184	5,321	-3,881	-5,115
MamT	19,330	178	9,720	12,068	1,602
MamX	11,599	110	6,095	-3,930	-2,951
MamY	36,695	333	5,091	-8,861	-4,141
MamZ	69,371	630	9,446	14,504	4,783
Mms6	7,548	77	7,994	0,258	29,255

MmsF	11,983	107	9,603	4,314	2,778
------	--------	-----	-------	-------	-------

Após a construção dos modelos, foi realizado a docagem molecular do corante azul de metila. O melhor perfil de interação proteína-ligante foi para o modelo de MamZ, com *binding score* (*i.e.*, ΔG) igual a $-9,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ e com média de *score* para todas as proteínas transmembrana das NMOBs de $-8,1 \pm 0,7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Tabela 8) (Figura 43; Figura 44). Foi obtido um modelo molecular robusto para MamZ a partir da modelagem realizada pelo AlphaFold DB v2 com 100% de cobertura, com pLDDT médio de $81,53 \pm 12,95$ por resíduo, GQME = 0,82. Quanto ao gráfico de Ramachandran, não houve *outliers* para as ligações phi-psi [ϕ, ψ], com MolProbity igual a 0,91, 97,77% dos resíduos Ramachandran-favoráveis, *clash score* de 1,30 (*i.e.*, resíduos Y210- W212 com valor $-0,572$ e F35-M180 com valor $-0,408$) e 0,78% de rotâmeros *outliers* (*i.e.*, resíduos I47, L65, W529 e D594). O modelo de MamZ é corresponde a um monômero transmembrana com 630 resíduos, com 69,37 kDa, pI teórico igual a 9,44, z igual a 14,50, razão *m/z* igual a 4,78, com face majoritariamente básica voltada para o meio extracelular, 22 hélices transmembrana ($\alpha 1$ - $\alpha 22$) e domínios MFS (do inglês *major facilitator superfamily*) e FRS (do inglês *ferric reductase superfamily*) e as porções N- e C-terminal voltadas para o meio extracelular. O domínio MFS é composto por 16 hélices transmebrana — *i.e.*, $\alpha 1$ a $\alpha 16$ — iniciando na porção N-terminal e encerrando em D446. O *loop* $\alpha 16$ - $\alpha 17$ conecta o domínio MFS ao FRS, sendo composto pela sequência 14 resíduos (*i.e.*, NGGVISGSALGGLP), sendo 5 resíduos de glicina (G), provavelmente responsáveis pela flexibilidade do *loop*. O domínio FRS é composto por 5 hélices transmembrana — *i.e.*, $\alpha 17$ a $\alpha 22$ — iniciando em L460 e com V630 na porção C-terminal (Figura 43).

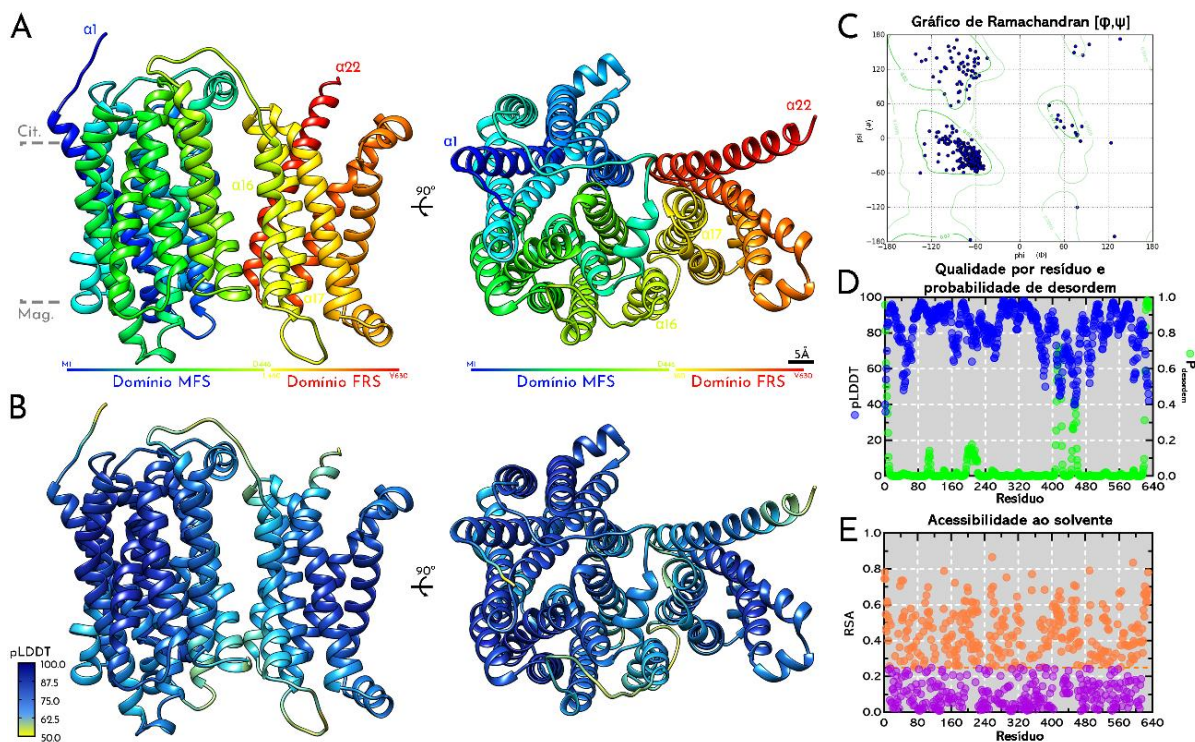


Figura 43. Modelagem molecular da proteína MamZ baseada na sequência de aminoácidos. **A.** Estrutura secundária do modelo com segregação dos domínios MFS (do inglês *Major Facilitator Superfamily*) e FRS (do inglês *Ferric Reduction Superfamily*). **B.** a **D.** Avaliação da qualidade do modelo pela métrica pLDDT obtida pelo AlphaFold DB v2 (B e D) e pelo gráfico de Ramachandran com ângulos phi-psi (C). **D.** Probabilidade de desordem (P_{desordem}). **E.** Área relativa acessível ao solvente (RSA) com *threshold* de 0,25 (i.e., 25%) indicando resíduos enterrados (roxo; $<0,25$) e expostos ao solvente ($\geq 0,25$).

Tabela 8. *Score* da interação proteína-ligante para o *docking* molecular do corante azul de metila e as proteínas de membrana das NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T.

Receptor	Score de interação (kcal · mol ⁻¹)
MamZ	-9,6
MamY	-9,1
MamH	-9
MamB	-8,8
MamO	-8,6
MamC	-8,5
MamN	-8,5
MamM	-8,4
MamA	-8,2
MamP	-8,2
MamS	-8,1
MamK	-7,9
MamX	-7,8
MamL	-7,7
MamQ	-7,7
MmsF	-7,4
MamD	-7,1
MamR	-6,7
MamI	-6,6

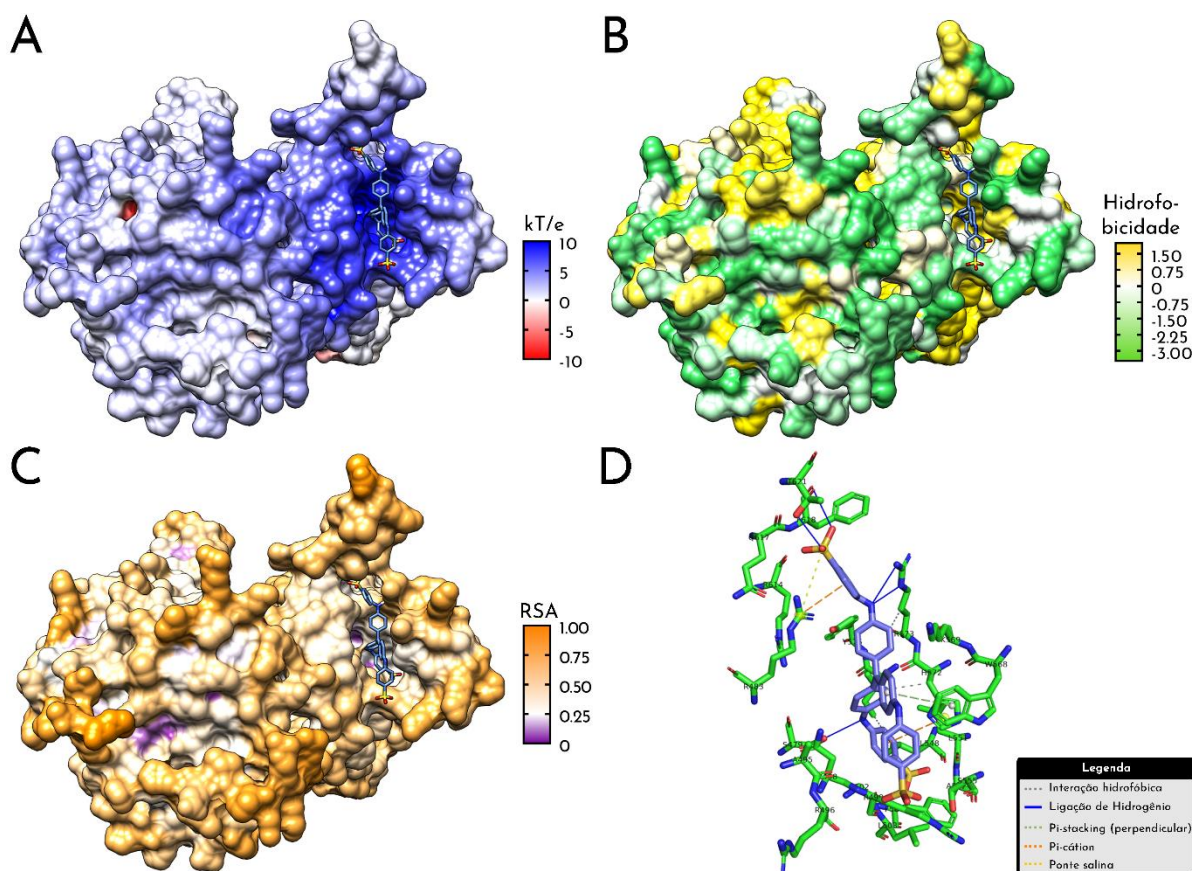


Figura 44. Base molecular *in silico* da interação do corante azul de metila com a proteína MamZ de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T. **A.** Representação do potencial eletrostático de superfície indicando o bolsão de interação majoritariamente básico. **B.** Representação da hidrofobicidade da superfície determinada pela tendência transmembrana indicando a presença de resíduos hidrofóbicos no bolsão de interação. **C.** Representação da superfície da área relativa acessível ao solvente (RSA) indicando área parcialmente exposta ao solvente de acordo com o *threshold* de 0,25. **D.** Sítio de interação do ligante com MamZ ($\leq 5\text{\AA}$). A rede de interação intermolecular é composta por: (i) 5 *H-bonds* dos resíduos F618, T621 e R573 (2) e S479 com os grupos sulfonato e o nitrogênio anilínico do corante; (ii) 3 interações hidrofóbicas realizadas pelos resíduos R573, H572 e I575; (iii) 1 interação pi-pi (π - π ; perpendicular ou *T-shaped*) com W568 e 2 interações pi-cátion (π -cátion) com o nitrogênio imidazólico de H572 e o nitrogênio amínico terminal da R483; e (iv) 1 ponte salina com os grupos sulfonato e R483.

5.3.2. Interação proteína-ligante por *docking* molecular e afinidade de ligação

O bolsão de interação de MamZ está localizado na porção voltada para o meio extracelular no domínio FRS, com potencial eletrostático de superfície majoritariamente positivo, provavelmente devido aos estados protonados dos resíduos R483, H572 e R573, que compõe o provável sítio de ligação (Figura 44; Figura 45). A maior contribuição para a hidrofobicidade do bolsão provavelmente é devido à presença dos resíduos W568, I575 e F618. Portanto, o bolsão de interação apresenta uma área acessível ao solvente descrita por RSA igual a $22,98 \pm 20,501\%$ e ASA igual a $31,65 \pm 28,66 \text{\AA}^2$, com 5 resíduos enterrados — *i.e.*, com

RSA < 25% — e 3 resíduos expostos ao solvente — *i.e.*, R483, F618 e T621 — representando, portando, um sítio parcialmente exposto ao solvente com qualidade média por resíduo dada por pLDDT = $84,13 \pm 8,62$ e com baixa tendência a desordem — *i.e.*, $P_{\text{disorder}} = 1,38 \pm 1,52 \cdot 10^{-3} \%$ (Figura 43B-D) (Figura 44A-C).

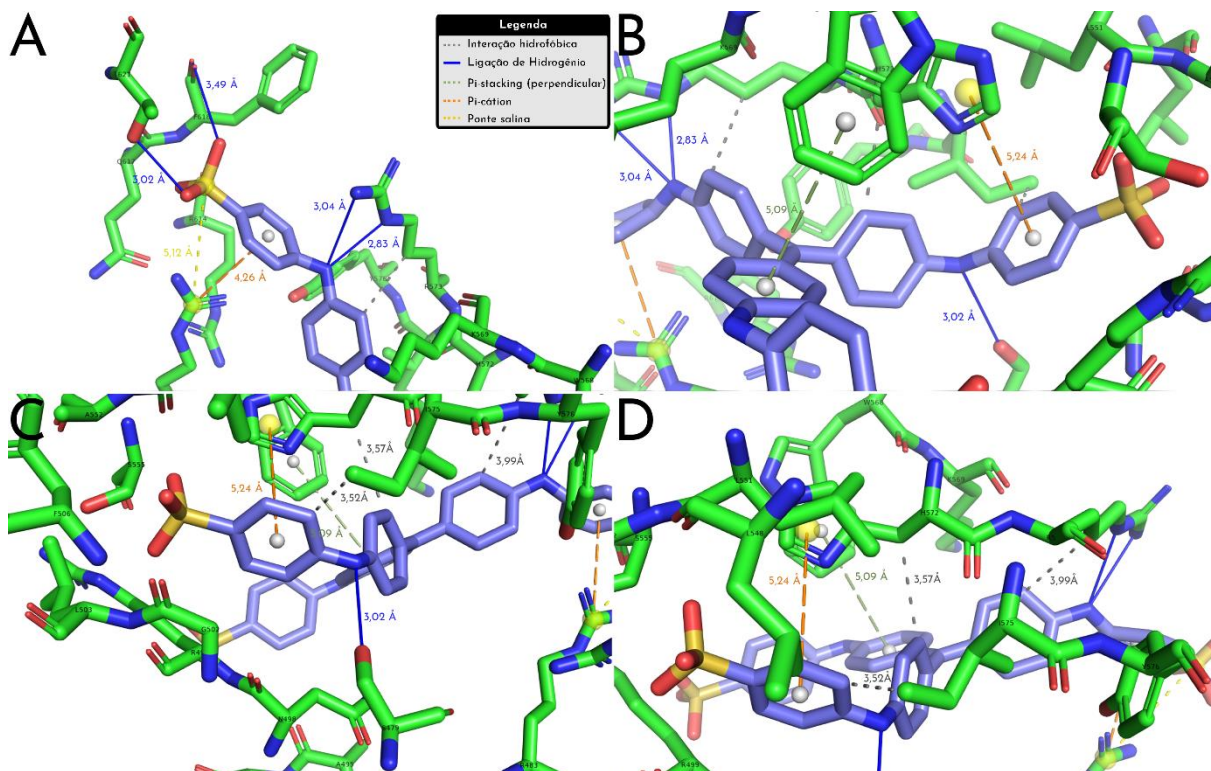


Figura 45. Rede de interações intermoleculares do corante azul de metila com sítio de interação em MamZ. **A. a D.** O sítio de interação é descrito pelas interações: (i) 5 *H-bonds* dos resíduos F618, T621 e R573 (2) e S479 com os grupos sulfonato e o nitrogênio anilínico do corante; (ii) 3 interações hidrofóbicas realizadas pelos resíduos R573, H572 e I575; (iii) 1 interação pi-pi (π - π ; perpendicular ou *T-shaped*) com W568 e 2 interações pi-cátion (π -cátion) com o nitrogênio imidazólico de H572 e o nitrogênio amínico terminal da R483; e (iv) 1 ponte salina com os grupos sulfonato e R483.

Por sua vez, a rede de interações intermoleculares é composta por 5 ligações de hidrogênio, 3 interações hidrofóbicas, 2 interações pi-pi perpendiculares (*T-shaped*), 1 interação pi-cátion e 1 ponte salina (Figura 44; Figura 45). Quanto às ligações de hidrogênio (*H-bond*), são estas: (i) 1 *H-bond* do grupamento sulfonato do corante com a carbonila do resíduo F618 (3,49 Å); (ii) 1 *H-bond* do grupamento sulfonato do corante com a hidroxila do resíduo T621 (3,02 Å); (iii) 2 *H-bonds* do nitrogênio anilínico do corante com a amina primária terminal (3,04 Å) e a amina secundária (2,83 Å) do resíduo R573; e (iv) 1 *H-bond* com a hidroxila do resíduo S479 (3,02 Å) (Figura 45).

Em relação às três interações hidrofóbicas, estas ocorrem entre três carbonos distintos de porções aromáticas do corante em relação ao: (i) C_{β} do resíduo H572 (3,57 Å); (ii) C_{δ} de

I575 (3,52 Å); e (iii) C_γ de R573 (3,99 Å). Também há presença de: (i) 1 interação pi-pi (π - π) perpendicular (*T-shaped*) de um anel aromático do corante com um anel indólico do resíduo W568 (5,09 Å); (ii) 2 interações pi-cátion (π -cátion) com um anel aromático do corante em relação ao anel imidazólico do resíduo H572 (5,24 Å) e outro anel aromático do corante em relação ao grupo guanidino do resíduo R483 (4,26 Å). Por fim, há 1 ponte salina, *i.e.*, atração eletrostática, entre um grupo sulfonato do corante nitrogênio imínico de R483 (5,12 Å).

Dada a conformação do possível sítio de ligação da degradação do corante, é sugerido que os 3 resíduos expostos ao solvente — *i.e.*, 2 H-bonds com a carbonila do *backbone* de F618 e a hidroxila da cadeia lateral de T621, 1 ponte salina e 1 interação π -cátion com o grupo guanidino da cadeia lateral de R483 — sejam essenciais para a primeira estabilização do corante azul de metila no bolsão de ancoragem, de forma que proporcionam as primeiras interações para que o restante da rede de interações intermoleculares possa ocorrer e haja exposição dos resíduos hidrofóbicos enterrados aos anéis aromáticos do corante (Figura 44C e D; Figura 45).

5.3.3. Comparação estrutural do sítio de docagem do ligante em MamZ de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Ms. magneticum* cepa AMB-1

Para melhor compreensão da possível aplicação de outras NMOBs frente à degradação do corante azul de metila, foi realizado o alinhamento da sequência de aminoácidos e o alinhamento estrutural referentes à proteína MamZ de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em relação à mesma proteína das BMs *Mf. australis* cepa IT-1, *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Figura 46; Figura 47; Figura 48). Quanto ao alinhamento múltiplo de sequências foi possível detectar 205 resíduos conservados do total de 630 (32,53%). Quanto ao alinhamento *pairwise*, foi possível detectar: (i) 264 (41,90%) resíduos conservados em relação à MamZ de *Mf. australis* cepa IT-1 e identidade de 42,24% com 97% de cobertura; (ii) 250 (39,68%) resíduos conservados em relação à MamZ de *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 e identidade de 40,32% com 96% de cobertura; e (iii) 246 (39,04%) resíduos conservados em relação à MamZ de *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e identidade de 40,32% com 96% de cobertura (Figura 46).

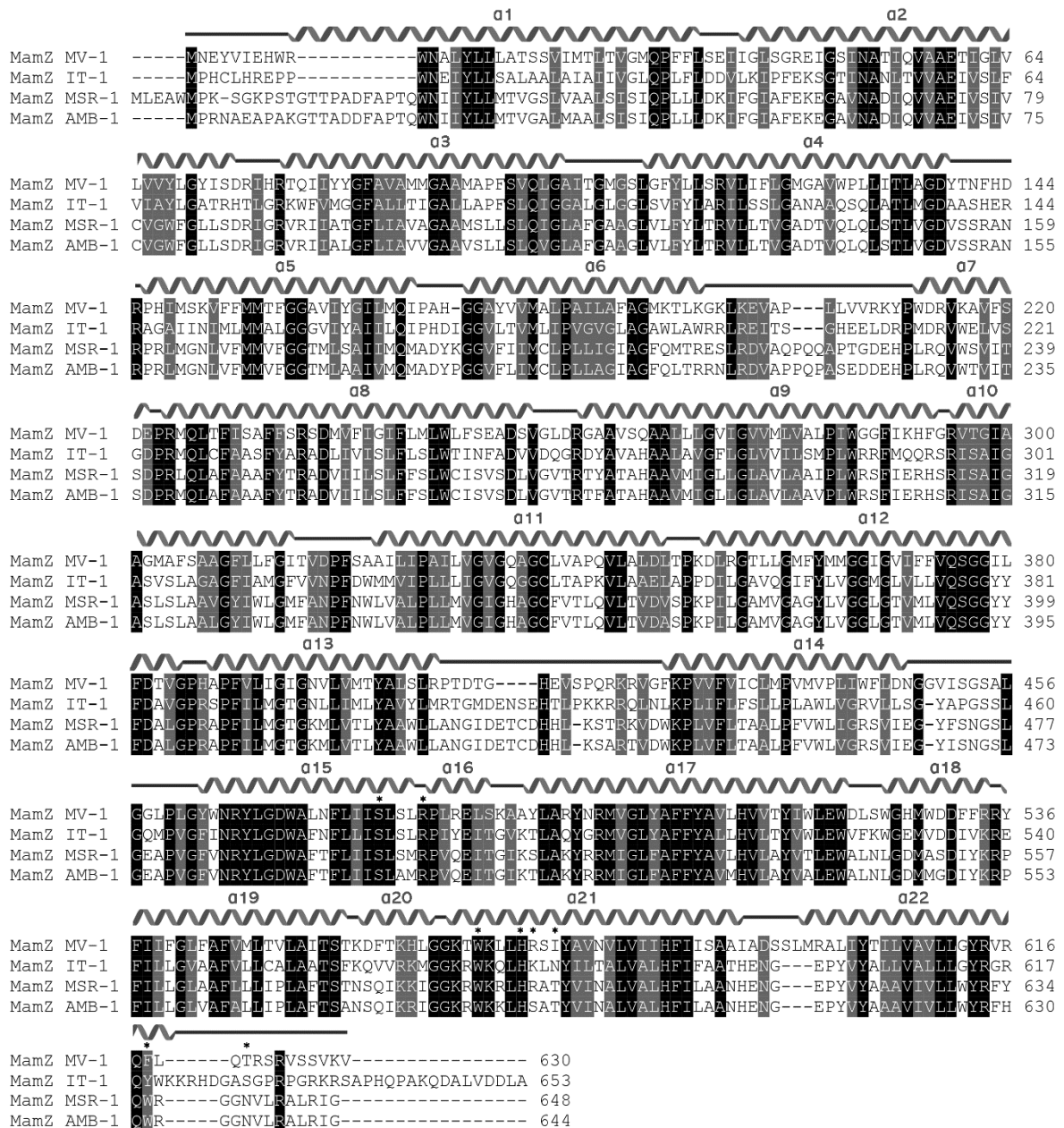


Figura 46. Alinhamento da sequência de MamZ pertencente a *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em relação a outras BMs cujas NMOBs podem ser utilizadas em biotecnologia, *i.e.*, *Mf. australis* cepa IT-1, *Ms.* cepa MSR-1 e cepa AMB-1. Resíduos do sítio de docagem que realizam interações intermoleculares estão destacados com asterisco (*). Dentre os resíduos que compõe o bolsão de docagem do ligante, são conservados em MamZ das cepas AMB-1, MSR-1 e IT-1: S479, R483, W568 e H572. Há troca pontual de resíduos, quando comparados com MamZ da cepa MV-1^T, sendo estes: (i) R573S, I575T, F618W e T621N na cepa AMB-1; e (ii) R573K, I575N, F618Y e T621S na cepa IT-1.

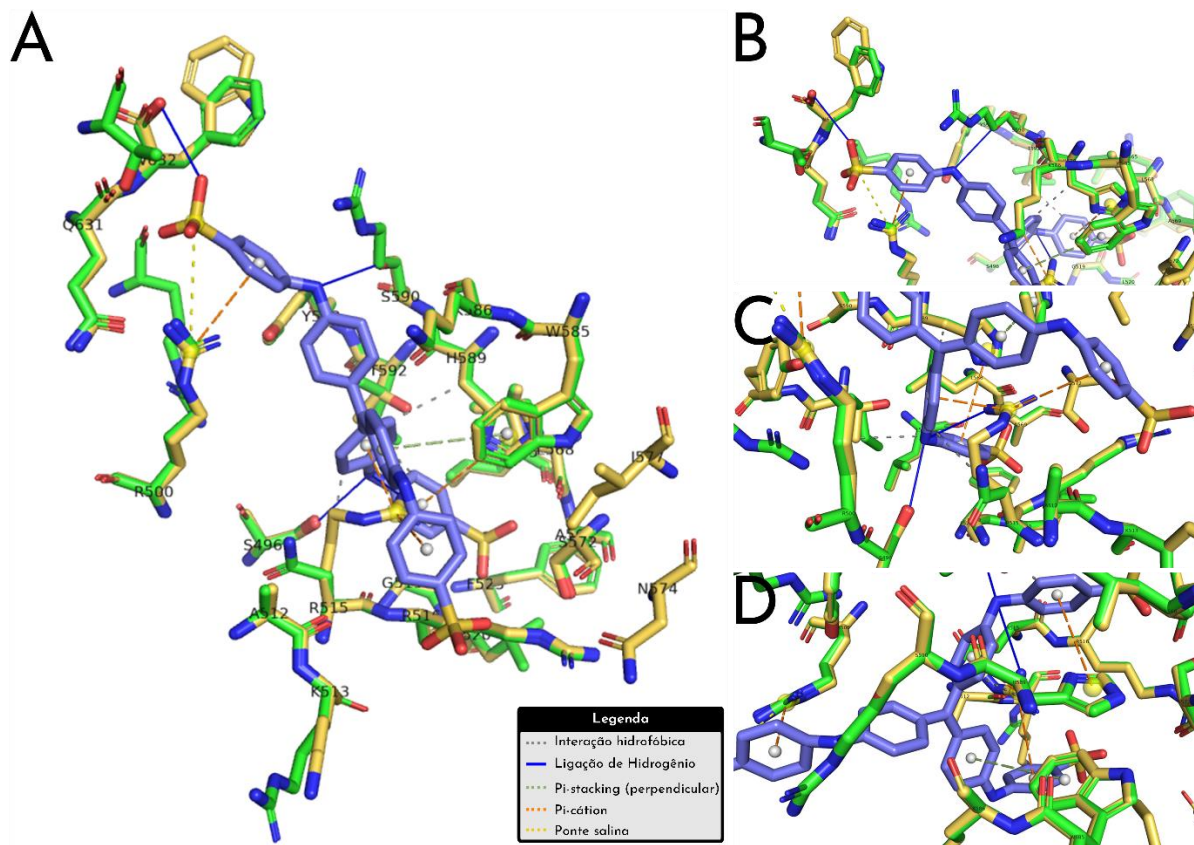


Figura 47. Alinhamento estrutural do sítio de docagem referente às proteínas MamZ de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (verde) e *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (amarelo). **A. a D.** Há conservação entre os resíduos S479, R483, W568 e H572 entre ambas as estruturas. Dentre os resíduos alterados, é possível observar: (i) alteração de classe em R573S (troca de resíduo básico por polar não ionizável) e I575T (troca de resíduo hidrofóbico alifático por polar não ionizável); (ii) manutenção de classe em F618W (troca entre resíduos hidrofóbicos aromáticos) e T621N (troca entre resíduos polares não ionizáveis). A rede de interações intermoleculares é representada por: (i) interações hidrofóbicas (tracejado cinza); (ii) ligação de hidrogênio (linha azul); (iii) ponte salina ou atração eletrostática (tracejado amarelo); e (iv) interações π - π (tracejado verde); e (v) π -cátion (tracejado laranja).

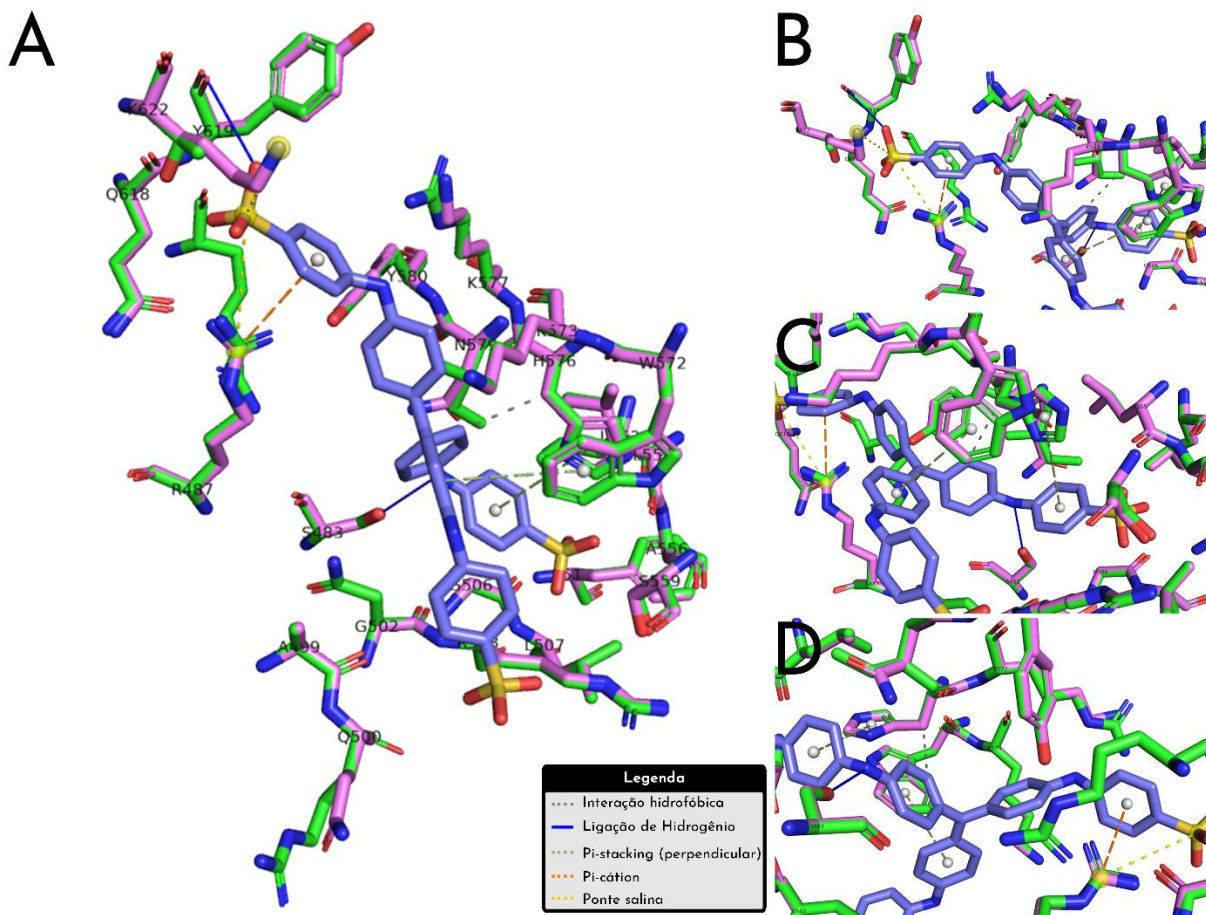


Figura 48. Alinhamento estrutural do sítio de docagem referente às proteínas MamZ de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (verde) e *Mf. australis* cepa IT-1 (rosa). **A. a D.** Há conservação entre os resíduos S479, R483, W568 e H572 entre ambas as estruturas. Dentre os resíduos alterados, é possível observar: (i) alteração de classe apenas em I575N (troca de resíduo hidrofóbico alifático por polar não ionizável); (ii) manutenção de classe em F618Y (troca entre resíduos hidrofóbicos aromáticos), R573K (troca entre resíduos básicos) e T621S (troca entre resíduos polares não ionizáveis). A rede de interações intermoleculares é representada por: (i) interações hidrofóbicas (tracejado cinza); (ii) ligação de hidrogênio (linha azul); (iii) ponte salina ou atração eletrostática (tracejado amarelo); e (iv) interações π - π (tracejado verde); e (v) π -cátion (tracejado laranja).

Além disso, foram avaliados os resíduos conservados em relação ao sítio de ancoragem do ligante em relação à MamZ da cepa MV-1^T bem como sua conformação espacial, sendo estes: S479, R483, W568 e H572. Quanto à alteração de resíduos, foram detectadas as substituições: (i) R573S (*i.e.*, troca da arginina-573 por serina), I575T (*i.e.*, troca da isoleucina-575 por treonina), F618W *i.e.*, (*i.e.*, troca da fenilalanina-618 por triptofano) e T621N (*i.e.*, troca da treonina-621 por asparagina) na cepa AMB-1 (Figura 46; Figura 47); e (ii) I575N (*i.e.*, troca da isoleucina-575 por asparagina), F618Y (*i.e.*, troca da fenilalanina-618 por tirosina), R573K (*i.e.*, troca da arginina-573 por lisina) e T621S (*i.e.*, troca da treonina-621 por serina) na cepa IT-1 (Figura 46; Figura 48). Como não houve diferença significativa do provável sítio de ancoragem entre MamZ da AMB-1 e MSR-1, esta foi excluída da sobreposição estrutural. Além disso, foi possível também observar um *clash* (*i.e.*, impedimento estérico devido à sobreposição dos raios de Van der Waals) devido à sobreposição estrutural causada pela troca

R573K, ou seja, a troca da asparagina-573 por lisina em MamZ da cepa IT-1, levando a um impedimento estérico da cadeia lateral da lisina em relação a um dos grupos sulfonato do corante. No entanto, foi calculado o estado rotamérico (*i.e.*, isômero promovido pela rotação da cadeia lateral) para tal resíduo a fim de acomodar o ligante, resultando na resolução do impedimento estérico (*i.e.*, valores de chi-1, chi-2, chi-3 e chi-4 iguais a -70,5, 179,2, -179,5 e 178,4, respectivamente, e probabilidade de 0,2399).

Dentre os resíduos conservados nas sequências de MamZ referentes às cepas IT-1 e AMB-1 (*i.e.*, S479, R483, W568 e H572), é possível observar a manutenção da: (i) *H-bond* da hidroxila de S479 com um nitrogênio anilínico do corante; (ii) ponte salina e da interação π -cátion com o grupo guanidino da cadeia lateral de R483; (iii) interação pi-pi perpendicular (*T-shaped*) de um anel aromático do corante com um anel indólico do resíduo W568 (5,09 Å); e (iv) π -cátion com um anel aromático do corante em relação ao anel imidazólico do resíduo H572.

6. Discussão

6.1. Caracterização do cultivo em batelada da BM *Mf. australis* cepa IT-1 e da produção de NMOBs octaédricas alongadas

NMOBs biomineralizadas por BMs são frequentemente comparadas a NPMSs em diversas propriedades de interesse em Biotecnologia. Há uma gama de aplicações biotecnológicas que exploram o uso das NPMs uma vez que estas nanopartículas possuem faixa de tamanho nanométrica — isto é, de 1 a 100 nm — e que podem ser controladas e direcionadas com a aplicação de um campo magnético externo (Mitchel *et al.*, 2021). As NPMs mais empregas são formadas por óxidos de ferro dentre os quais se destacam as nanopartículas de magnetita sintética (NPMSs) superparamagnéticas devido à sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade (Singh *et al.*, 2010). As NPMSs, muitas vezes, não apresentam uniformidade quanto à forma, composição química e nem quanto à morfologia cristalina da partícula ocasionando a ocorrência de diferentes populações cristalinas em uma mesma amostra. Desta forma, há diversos métodos físicos, químicos e biológicos atualmente empregados na produção de NPMs (Mitchell *et al.*, 2021).

Por sua vez, a síntese biológica de NPMs, a qual está apoiada na biomineralização de magnetossomos por BMs, produz nanopartículas compostas por um núcleo mineral de magnetita (Fe_3O_4) envolto por uma membrana biológica formada a partir da membrana citoplasmática de BMs. Visto que a síntese destas nanopartículas por BMs obedecem a um rigoroso controle genético, as NMOBs apresentam propriedades desejáveis para aplicações biotecnológicas, conforme discutido anteriormente (Vargas *et al.*, 2018). No entanto, o cultivo de BMs em larga escala é laborioso devido ao crescimento lento e à manutenção das condições ótimas de pH, temperatura, pO_2 e nutrientes (*e.g.*, suplementação de carbono, nitrogênio e ferro) (Silva *et al.*, 2013).

Além disso, a maior parte dos estudos de cultivo de BMs na literatura estão concentradas em BMs do gênero *Magnetospirillum* (*i.e.*, *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1), correspondente a um gênero de alfaproteobactérias magnetotáticas que biomineralizam magnetossomos cuboctaédricos em estratégias de cultivo por batelada alimentada e cultivo contínuo (Heyen e Schuler, 2003; Sun *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Recentemente, foi proposto o cultivo contínuo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Correa *et al.*, 2022) em estratégia de cultivo contínuo para minimizar o fenótipo de mutantes não magnéticos. A célula é capaz de biomineralizar magnetossomos prismáticos ou pseudo-

hexagonais alongados. No entanto, as proteínas de membrana do magnetossomo podem ser utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas, conforme discuto adiante, e são espécie-específicas. Logo, a caracterização de novos bioprocessos que utilizem novas BMs com magnetossomos de diferentes morfologias (*i.e.*, conteúdo de magnetita por partícula) que podem afetar as propriedades magnéticas da nanopartícula bem como a caracterização de novas proteínas de membrana espécie-específica são mandatórios em Biotecnologia.

Dessa forma, há algumas características relevantes em Biotecnologia relacionadas ao cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 e suas NMOBs. Em primeiro lugar, o cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 emprega meio confeccionado em ASW, ou seja, com alta concentração de sais, o que dificulta o crescimento de contaminantes ambientais em eventuais falhas que possam ocorrer durante o bioprocessos e que sejam capazes de tolerar a pressão osmótica (Junker, 2010). Além disso, o cultivo em microaerofilia torna-se vantajoso uma vez que o O₂ é o melhor aceptor final de elétrons durante a respiração celular, uma vez que este é reduzido à H₂O (*i.e.*, $\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2e^- / \text{H}_2\text{O}$; 0,82V) pelo complexo IV da cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, a célula aproveita todo o potencial redutor gerado na cadeia respiratória (*i.e.*, acoplamento da cadeia transportadora de elétrons à fosforilação oxidativa para geração de ATP), o que possibilita a maior geração de força próton-motriz pela célula devido à maior diferença de potencial eletroquímico gerado e, conseqüentemente, um saldo energético mais favorável se comparado à respiração anaeróbia (Barber-Zucker e Zarivach, 2017). Dessa forma, otimiza-se a taxa de crescimento celular de BMs, que são naturalmente microrganismos fastidiosos (*e.g.*, tempo de geração de 6h e 52 min \pm 3h e 20 min; Figura 18) e, por sua vez, reduz o custo de produção de NMOBs ao não necessitar do uso de O₂ com alta pureza química (*e.g.*, O₂ medicinal a 98%) uma vez que é possível utilizar o próprio O₂ atmosférico e introduzi-lo no sistema por sistema de filtração de gases (Figura 17).

O cultivo em anaerobiose, por sua vez, já foi estabelecido em outros microrganismos como *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 utilizando o nitrato (NO₃⁻) como aceptor final de elétrons e convertendo-o a nitrito (NO₂⁻) (Heyen e Schüller, 2003). Há dois aspectos a considerar no durante o crescimento em anaerobiose: (i) o aumento do tempo geração celular devido ao menor potencial redutor do par NO₃⁻/NO₂⁻ e, conseqüentemente, menor energia disponível à fisiologia do microrganismo; (ii) o ganho formação e alto rendimento da produção de NMOBs. Por exemplo, em uma batelada para o crescimento de *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1, a concentração de O₂ foi diminuída de 20 para 2 mbar durante a fase exponencial de crescimento de MSR-1 em meio rico em ferro (Tabela 9). Após 4 h

decorridas da diminuição do O₂, a produção de magnetita começou a ser detectada nas células, aumentando até atingir a fase estacionária (Heyen e Schuler, 2003). Por isso, diversas abordagens de cultivo em bioprocessos estão concentradas na manutenção de concentrações de O₂ mínimas para o crescimento desde que não prejudiquem a biomineralização de NMOBs e favoreçam simultaneamente os dois fenômenos biológicos (Heyen e Schuler, 2003; Liu *et al.*, 2010; Sun, *et al.*, 2008). Nesse sentido, ao compararmos com o perfil metabólico baseado no genoma de *Mf. australis* cepa IT-1, a célula não é capaz de crescer em anaerobiose utilizando nitrato com aceptor final de elétrons, dado que não possui os genes que codifiquem as etapas subsequentes de desnitrificação como os genes *nir*, *nor* e *nos* (Araujo *et al.*, 2016), ao contrário dos genomas de alfa-proteobactérias magnetotáticas do gênero *Magnetospirillum* que são capazes de realizar a redução dissimilatória de nitrito, óxido nítrico e óxido nitroso (Taoka *et al.*, 2003; Matsunaga *et al.*, 2005). Além disso, ao comparar com o cultivo contínuo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, não há emprego de gases de efeito estufa durante o processo, como é o caso da utilização do óxido nitroso (N₂O) como aceptor final de elétrons em anaerobiose, aumentando, portanto, a sustentabilidade do bioprocessos em particular (Silva *et al.*, 2013; Correa *et al.*, 2022).

Tabela 9. Espécies de BMs utilizadas em cultivo de larga escala descritos na literatura com seus respectivos valores de produção e produtividade de Fe₃O₄. Adaptado de Correa (2021).

Espécie e cepa	Condução do cultivo	Produção (mg · L ⁻¹)	Produtividade (mg · L ⁻¹ · dia ⁻¹)	Referência
<i>Ms. magneticum</i> / AMB-1	B.A	9	3,7	Yang <i>et al.</i> , 2001
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.S	7,9	6,3	Heyen e Schuler, 2003
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	58,4	--	Liu <i>et al.</i> , 2008
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	41,7	16,7	Sun, <i>et al.</i> , 2008
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	83,2	55,49	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	356,5	178,26	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	SC	168,3	83,5	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Mv. blakemorei</i> / MV-1 ^T	B.S	22,4	5,6	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Mv. blakemorei</i> / MV-1 ^T	B.A	26	3,2	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Mv. blakemorei</i> / MV-1 ^T	SC.	27,1	22,7	Correa <i>et al.</i> , 2022
<i>Ms. sp.</i> / ME-1	B.A	120	58,7	Ke <i>et al.</i> , 2018
<i>Ms. gryphiswaldense</i> / MSR-1	B.A	139	47	Fernández-Castané <i>et al.</i> , 2018

Além disso, entender a cinética de transferência de massa de gás é crucial para projetar escalas maiores de um dado bioprocessos (Burke, 2008). Logo, para realização do cultivo em microaerofilia é necessário a obtenção de parâmetros relacionados à transferência de gases na interface gás-líquido durante a purga do biorreator (*i.e.*, *sparging*) e o fornecimento de O₂ para a respiração celular. Assim, o melhor valor de transferência de massa para o N₂ é dado pelo $k_L a$

N_2 cujo valor foi $0,41 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ sob agitação de 300 rpm durante a purga do meio antes do inóculo com o gás sob vazão de $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figura 17). O aumento da agitação e o posicionamento dos impelidores acima dos aspersores promoveu a quebra das bolhas aumentando a razão superfície \cdot volume $^{-1}$ e, conseqüentemente, melhorou a transferência dos gases, conforme observado durante os ensaios de determinação do $k_L a$. Outro fator importante foi a redução da agitação de 300 para 100 rpm após o inóculo, uma vez que é desejado evitar o cisalhamento causado pelos impelidores do tipo Rushton em agitações maiores que são responsáveis por gerarem fluxo transicional ($2300 < Re < 4000$) ou turbulento ($Re > 4000$) (Koerich e Rosa, 2016). O $k_L a$ O_2 a 100 rpm, *i.e.*, agitação empregada durante o bioprocessamento, corresponde a $0,38 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$, indicando maior facilidade de transferência de massa em relação ao emprego de N_2 , devido a maior solubilidade do O_2 em água e, conseqüentemente, sugerindo a necessidade de tempos elevados durante o *sparging* de N_2 durante o deslocamento do O_2 dissolvido no meio de cultura (Figura 49) (Figura 17; Figura 18) (Wiebe, Gaddy e Heins, 1933; Chemistry LibreTexts Libraries, 2023; Bok, Moog, e Brendler, 2023). Somado a isso, a saturação de oxigênio dissolvido no meio ($dO_2\%$) foi medida diariamente e o maior consumo de $dO_2\%$ ($0,2 dO_2\%$ ou $0,02 \text{ mg } O_2 \cdot \text{L}^{-1}$) acompanhou a maior taxa de crescimento celular entre as primeiras 24 horas, ou seja, no dia 0 foi disponibilizado $2,01 \pm 0,01 dO_2\%$ ($0,16 \text{ mg } O_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e atingiu o valor de $1,80 \pm 0,01$ ($0,14 \text{ mg } O_2 \cdot \text{L}^{-1}$) de saturação, corroborando a importância do pulso diário para fornecimento do aceptor final de elétrons durante a respiração celular em microaerofilia (Figura 18).

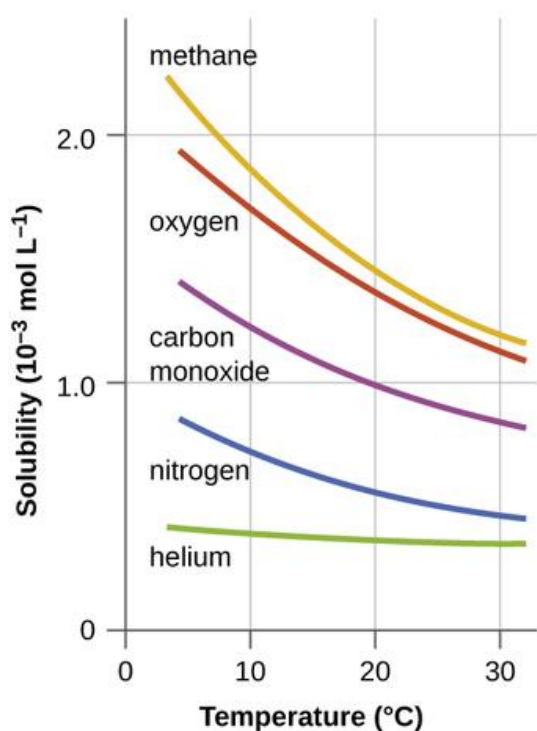


Figura 49. Curva de solubilidade de gases em água de acordo com a temperatura. É possível observar a maior solubilidade do O_2 (curva rosa) comparado ao N_2 (curva azul) em água, sugerindo a necessidade de tempos elevados durante o *sparging* de N_2 durante o deslocamento do O_2 dissolvido no meio de cultura. Note também a queda de solubilidade dos gases proporcionalmente ao aumento da temperatura, devido ao aumento da energia cinética entre as moléculas e a maior energia para o rompimento da tensão superficial da água. Figura retirada de Chemistry LibreTexts Libraries, UC Davis, California, EUA.

A produção ($\text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e produtividade ($\text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) de magnetita também foram monitoradas durante o bioprocesso, uma vez que o interesse ao final é a obtenção da maior massa de magnetita possível para aplicações *downstream* (Figura 18B). A maior produtividade foi obtida ao final do 1º dia de cultivo, concomitantemente à melhor taxa de crescimento (μ) e o maior consumo de $\text{dO}_2\%$, sendo obtido $12,13 \pm 6,17 \text{ Fe}_3\text{O}_4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, correspondendo a 61,57% do total da massa de magnetita produzida durante o bioprocesso. O segundo maior valor de produtividade foi alcançado entre o dia 1 e 2, representando $4,82 \pm 6,56 \text{ Fe}_3\text{O}_4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. Logo, ao contabilizar a produtividade até o 2º dia (48h), foram produzidas 86,04% correspondentes à massa total de magnetita obtida durante o bioprocesso. Portanto, sugere-se que o intervalo-chave para a manutenção da alta produtividade de magnetita encontra-se nas primeiras 48h. Dessa maneira, em estudos futuros relacionados ao cultivo em batelada alimentada ou semicontínuo é necessário que sejam fornecidas as mesmas condições nutricionais estabelecidas na taxa de consumo dos nutrientes, favorecendo a taxa de crescimento, o consumo de $\text{dO}_2\%$ e, conseqüentemente, a manutenção da produtividade de magnetita.

Somado a isso, não há nenhum bioprocesso descrito na literatura que trabalhe com o cultivo em biorreator ou em larga escala de cocos magnetotáticos, afiliados à classe afiliado à classe *Ca*. Etaproteobacteria do filo Pseudomonadota (*i.e.*, formalmente renomeado a partir de Proteobacteria), apesar de ser discutido que estes são os morfotipos mais diversos em estudos de amostras ambientais (Liu *et al.*, 2021). Há apenas outros 2 cocos magnetotáticos cultivados descritos na literatura — *Mc. marinus* cepa MC-1, que contém 14 ± 3 magnetossomos prismáticos de magnetita de 83 ± 14 por 78 ± 11 nm e *Ca. Mc. massalia* cepa MO-1, que contém 17 ± 5 magnetossomos cuboctaédricos alongados de magnetita de 64 ± 20 por 57 ± 17 nm (Bazylinski *et al.*, 2013; Lefreve *et al.*, 2009), capazes de biomineralizar NMOBs prismáticas de magnetita — e até o presente momento nenhum havia sido empregado para produção em larga escala de NMOBs. Dessa forma, o coco magnetotático *Mf. australis* cepa IT-1 foi isolado e caracterizado a partir de amostras da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ, Brasil (Morillo *et al.*, 2014; Araujo *et al.*, 2016). Portanto, é o primeiro relato de bioprocesso que emprega uma BM cujo patrimônio genético é nacional, além de empregar a única espécie isolada no hemisfério sul (Morillo *et al.*, 2014).

Outro ponto relevante é que não há produções técnicas ou científicas disponíveis na literatura que utilizem NMOBs na faixa de tamanho das biomineralizadas por *Mf. australis* cepa

IT-1. Portanto, as dimensões de $122,77 \pm 23,54$ por $95,89 \pm 18,05$ nm e diâmetro médio igual a $109,33 \pm 20,46$ nm são as maiores reportadas até então dentro do diagrama de fase magnética que garante a magnetização permanente da NP (*i.e.*, comportamento como monodomínio magnético) (Figura 9; Figura 19). Tal característica torna-se vantajosa em aplicações biotecnológicas que necessitem NPMs mais responsivas e que possam atuar em processos de separação magnética de forma mais eficiente, principalmente ao separar magneticamente biomoléculas ou células alvo através do uso destas NMOBs, conforme descrito na aplicação das NMOBs no tópico. Nesse sentido, as NMOBs biomineralizadas por *Mf. australis* cepa IT-1 apresentam valores área de superfície (*i.e.*, $3,73 \cdot 10^4 \text{ nm}^2 \cdot \text{NMOB}^{-1}$), volume (*i.e.*, $5,27 \cdot 10^5 \text{ nm}^3$), massa por NMOB superior (*i.e.*, $2,72 \text{ Fe}_3\text{O}_4 \text{ fg} \cdot \text{NMOB}^{-1}$) a outros bioprocessos descritos na literatura, como os que utilizam NMOBs cuboctaédricas de BMs dos gêneros *Magnetospirillum* — que possuem diâmetro médio ≈ 40 nm (Sun *et al.*, 2008) — e NMOBs prismáticas alongadas em *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T — que possuem diâmetro médio ≈ 60 nm (Correa *et al.*, 2022).

Sabe-se também que a presença de membrana biológica oriunda da membrana citoplasmática da célula é extremamente importante para aplicações biotecnológicas, uma vez que permite o aumento da biocompatibilidade. Somado a isso, nesta membrana estão inseridas proteínas transmembrana espécie-específicas que podem ter seu potencial explorado para novas aplicações em Biotecnologia. Ademais, NMPSs não possuem tal membrana e sua funcionalização com moléculas que mimetizam uma membrana biológica (*e.g.*, revestimento com fosfatidilcolina) encarece o processo e não replica a mesma fidelidade do sistema biológico presente na membrana de NMOBs (Correa *et al.*, 2022). Somado a isso, em relação à sustentabilidade do bioprocessos de cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 e purificação de suas NMOBs, a principal diferença para a síntese química de NPMSs é a não utilização de solventes, nem condições extremas de temperatura e pressão como descrito nos métodos de coprecipitação e síntese hidrotermal para NMPSs (Douglas, MacLaren e Murrie, 2012).

Outro parâmetro relevante observado durante o bioprocessos é o aumento das dimensões de comprimento, largura e diâmetro médio da NMOB em relação à primeira caracterização das NMOBs após o isolamento do BM, descrito em Morillo *et al.* (2014) (Figura 50). Logo, foi possível observar: (i) aumento de 47,92% em relação ao comprimento (*i.e.*, de 83 ± 26 nm para 122 ± 23 nm); (ii) aumento de 29,58% em relação à largura (*i.e.*, de 74 ± 23 nm para 95 ± 18 nm); e (iii) aumento de 40,17% em relação ao diâmetro médio (*i.e.*, de 78 ± 24 nm para $109 \pm$

20 nm) (Figura 19). Também foi observado também a manutenção do número médio de NMOBs por célula, i.e., 10 ± 3 , conforme descrito por Morillo *et al.* (2014). Tais características são vantajosas do ponto de vista biotecnológico, conforme discutido anteriormente, e podem sugerir à adaptação do microrganismo ao meio de cultivo estabelecido em laboratório. Além disso, pode sugerir a correta configuração dos parâmetros físico-químicos estabelecidos na batelada simples, aproximando-se de uma condição que reduza eventos de estresse celular, como a superexposição a concentrações de oxigênio superiores à microaerofilia necessária para o crescimento celular, conforme era estabelecido previamente em meio líquido (Taveira, 2019).

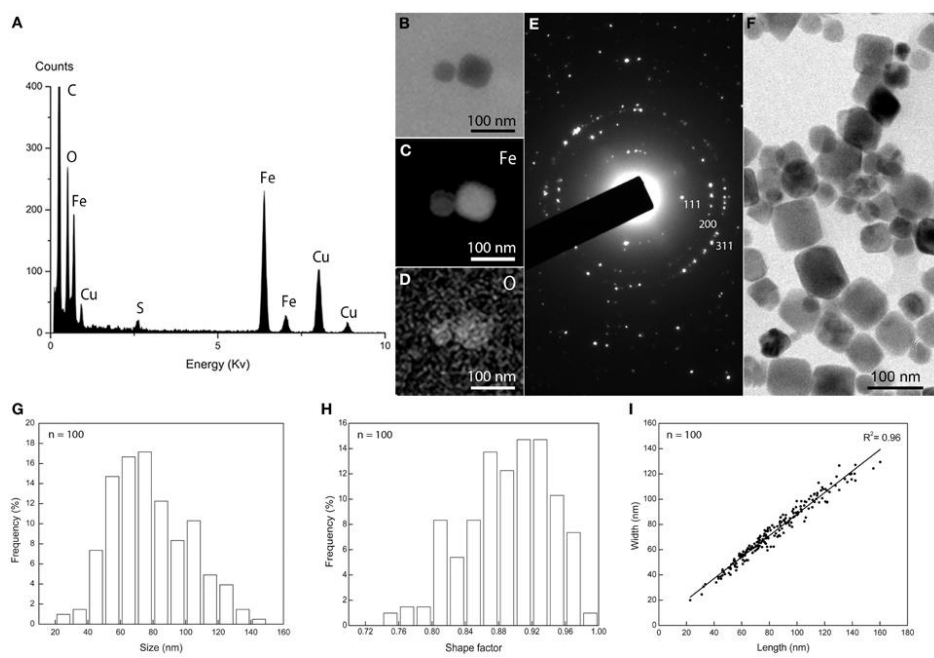


Figura 50. Biomíneralização de magnetossomos em *Magnetofaba australis* cepa IT-1. **A.** Espectro de energia dispersiva de raios X com detecção Fe e O como os principais elementos das NMOBs. **B. a E.** Mapeamento elemental por EFTEM de um magnetossomo mostrando a distribuição de ferro (C), oxigênio (D) e o padrão de difração de elétrons (E) de NMOBs isoladas

mostrado em (F). **G. a I.** Distribuição de tamanho (G), distribuição do fator de forma (H) e gráfico de dispersão do comprimento e largura das NMOBS (I). Figura retirada de Morillo *et al.*, (2014).

Adicionalmente, outra propriedade descrita é a boa dispersibilidade da NMOB em meio aquoso (Alphandéry *et al.*, 2017; Correa *et al.*, 2022), dado pelo potencial ζ de $-20,93 \pm 1,01$ mV (Figura 20), o que caracteriza também a NMOB como uma partícula negativamente carregada devido à prevalência da carga negativa dos grupamentos fosfato dos glicerofosfolípídeos sobre os grupamentos de aminas primárias presentes nos resíduos terminais destes lipídeos de membrana (*e.g.*, colina, etanolamina e resíduo de serina) (Geiger, López-Lara e Sohlenkamp, 2013).

A resposta magnetotática, avaliada em microscopia em DIC, somada à caracterização em TEM possibilitaram a aquisição de informações que serão de utilidade no desenho de novas estratégias de cultivo, como a batelada alimentada e o cultivo contínuo da BM. Portanto, durante o cultivo, a célula apresentou resposta magnetotática característica, *i.e.*, sentido de nado

antiparalelo ao campo magnético externo gerado, que foi observada em todos os estágios do crescimento, indicando a presença de células com aparente viabilidade celular (Figura 21). No entanto, durante o crescimento é possível observar por TEM a partir do 5º dia (*i.e.*, fase estacionária) a presença de células com morfologia alterada, ou seja, tamanho reduzido, mudança da morfologia cocóide-ovoide característica para cocóide (*i.e.*, arredondamento do corpo celular), ausência de NMOBs biomineralizadas e aumento do número de inclusões citoplasmáticas a partir de medidas de parâmetros morfológicos ($n=100$) (Figura 21; Figura 22). Quanto às células com morfologia alterada, foi possível observar que houve: (i) aumento significativo ($*p=0,0199$) do fator de forma de $0,72 \pm 0,06$ para $0,89 \pm 0,04$ bem como o aumento significativo ($**p=0,0080$) do número de inclusões por célula (n° inclusões \cdot cél⁻¹) de 3 ± 1 para 7 ± 1 durante a transição da de F_{log} para F_{est} ; e (ii) o número de células com alteração morfológica aumentou $10,52 \pm 8,37$ vezes em relação à F_{log} , representando $10,46 \pm 3,04\%$ da população total ($**p=0,0077$). Dessa forma, tais alterações morfológicas podem representar o impacto da depleção dos nutrientes essenciais para o crescimento celular durante a batelada, conforme observado no consumo de Fe^{2+} e NH_4^+ pela célula (Figura 18).

Logo, pode-se hipotetizar que as células com alteração morfológica (*i.e.*, arredondamento, redução do tamanho e ausência de NMOBs) possam ser células com divisão celular interrompida, possivelmente devido à depleção de nutrientes durante a batelada, o que justifica a necessidade de trabalhos futuros que empreguem estratégias de batelada alimenta ou cultivo contínuo a fim de otimizarem a produção e produtividade de magnetita, uma vez que parâmetros relevantes como a taxa de crescimento e o consumo de nutrientes foram dosados no cultivo em batelada a fim melhorar a compreensão das necessidades fisiológicas desta BM.

É sabido que a depleção de nutrientes dispara a resposta estrigente em bactérias, ou seja, uma cascata de sinalização que regula os níveis de tradução e transcrição da célula (Irving, Choudhury e Corrigan, 2021). A resposta é disparada pelo complexo proteico RelA acoplado ao ribossomo 70S através da quebra do mensageiro (p)ppGpp (pentafosfato de guanósina) em ppGpp (tetrafosfato de guanósina), uma vez que a resposta de *stalling* da tradução é acionada pela entrada de tRNAs não aminoacilados, ou seja, sem aminoácidos ligados covalentemente à extremidade 3'-OH. A ausência de aminoácidos ligados ao tRNA é interpretada como sinal de carência nutricional, dado que a biossíntese destes ocorre devido a desvios anabólicos nas vias glicolíticas e no ciclo do ácido cítrico.

Nesse sentido, há 2 hipóteses para ausência da biomineralização de NMOBs após fase estacionária. A primeira pode estar fundamenta na ausência da concentração mínima de nutrientes como ferro, carbono e nitrogênio disponíveis no meio para a biomineralização do magnetossomo, uma vez que a concentração de determinados nutrientes é constantemente monitorada pelos microrganismos e esse monitoramento é responsável pelo disparo e regulação de diversas vias de sinalização, tal como a invaginação da membrana citoplasmática para a formação da membrana da NMOB e nucleação do mineral, conforme discutido por Uebe e Schüller (2016). É possível também que haja uma instabilidade genômica no MGC de *Mf. australis* cepa IT-1, o que pode levar à excisão do fragmento gênico e, conseqüentemente, a perda da capacidade de biomineralizar as NMOBs octaédricas alongadas, uma vez que tal fenômeno já foi reportado para outras BMs como as alfaproteobactérias magnetotáticas *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Silva *et al.*, 2013; Correa *et al.*, 2022) e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Schübbe *et al.*, 2003; Ulrich *et al.*, 2005) (Figura 51). Dessa forma, são abordados dois possíveis fenômenos: (i) o primeiro, provavelmente reversível se a quantidade mínima de nutrientes for reestabelecida durante o cultivo; e (ii) o segundo, provavelmente irreversível devido à perda do fragmento gênico responsável pela biomineralização. No entanto, apesar de ambos os eventos serem hipóteses sugeridas para explicar o fenótipo observado, caso haja a excisão do MGC, é possível mitigar o surgimento de mutantes não magnetotáticos utilizando-se a estratégia do cultivo em batelada alimentada ou contínuo, retardando-se a chegada à fase estacionária e mantendo a produtividade de magnetita alta, conforme descrito anteriormente para a BM *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Silva *et al.*, 2013; Correa *et al.*, 2022).

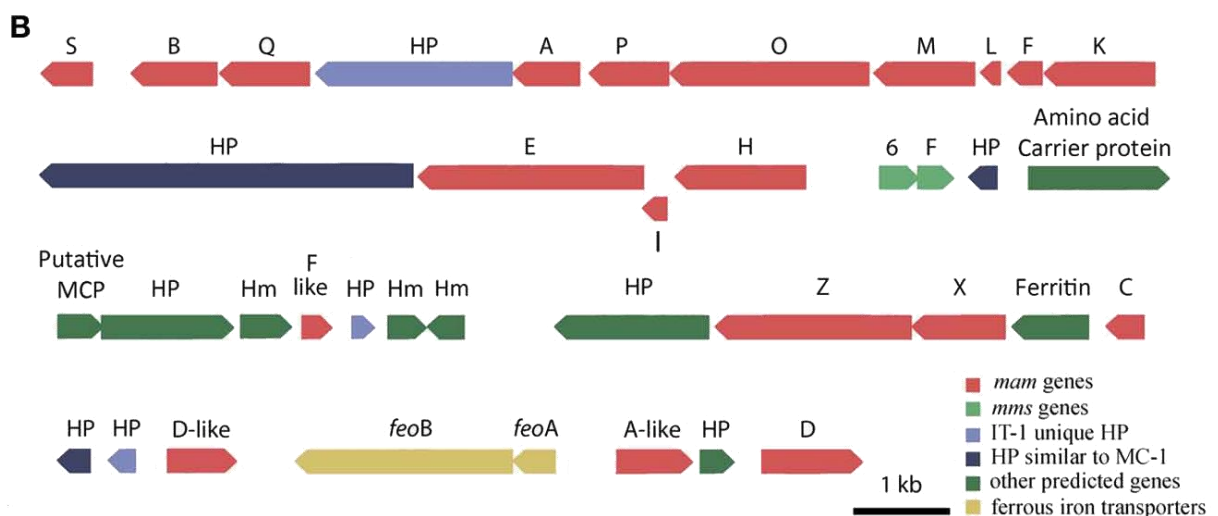


Figura 51. Arquitetura do MGC em *Mf. australis* cepa IT-1. São demonstrados os genes *mam*, *mms* e seqüências referentes a proteínas hipotéticas que se encontram em operons distintos e codificam funções de invaginação da

membrana do magnetossomo, transporte de ferro, controle do tamanho e morfologia do cristal e alinhamento da cadeia. Figura retirada de Morillo *et al.*, (2014).

Além disso, ao retornar a discussão sobre a depleção de nutrientes como NH_4^+ e Fe^{2+} , quantificados no meio durante o crescimento, e a provável depleção das fontes heterotróficas de carbono (*i.e.*, acetato e succinato), não monitorados durante o cultivo, é possível sugerir a falta de concentrações mínimas para a fisiologia celular, o que pode resultar na queda do metabolismo bioenergético e, conseqüentemente, na produtividade de magnetita observada (Figura 18). Durante o processo foi observada que a maior taxa de consumo de Fe^{2+} (24,07%) acompanha a maior taxa de crescimento entre os dias 0 ($48,53 \pm 13,67 \mu\text{M}$) e 1 ($36,54 \pm 5,88 \mu\text{M}$) (Figura 18). O consumo cessa no 5º dia (*i.e.*, F_{est} ; $31,51 \pm 6,10 \mu\text{M}$) e o Fe^{2+} volta a ficar disponível após o início da fase de declínio da cultura, ou seja, no 6º dia ($45,89 \pm 13,00 \mu\text{M}$). O consumo de nitrogênio amínico/amoniaco livre foi determinado pelo ensaio da reação de FAN.

O padrão de consumo de nitrogênio seguiu a mesma tendência do consumo de Fe^{2+} (Figura 18). Ou seja, a maior taxa de consumo (18,67%) de nitrogênio (*i.e.*, NH_4^+) acompanha a maior taxa de crescimento entre os dias 0 ($4,39 \pm 0,26 \text{ mM}$) e 1 ($3,57 \pm 1,56 \mu\text{M}$). O consumo cessa no 5º dia (*i.e.*, fase estacionária; $3,04 \pm 1,48 \text{ mM}$) e o nitrogênio volta a ficar disponível após o início da fase de declínio da cultura, ou seja, no 6º dia ($4,23 \pm 1,53 \text{ mM}$). Portanto, o aumento da concentração de ferro e nitrogênio após o estacionamento da cultura pode ser possivelmente explicado devido à morte celular e liberação do conteúdo citoplasmático (Figura 18). Dessa forma, após a perda da integridade da membrana da célula durante a fase de morte celular, há a liberação de macromoléculas nos quais estes elementos participam da composição (*e.g.*, aminoácidos e bases nitrogenadas para o nitrogênio) (Turnbull *et al.*, 2016).

Outro fator importante é o acúmulo de ferro intracelular próximo às NMOBs em *Mf. australis* cepa IT-1, conforme caracterizado pela observação da cadeia de NMOBs em STEM-HAADF (do inglês *scanning electron transmission microscopy at high-angle annular dark-field*) e confirmado pelo mapeamento de elementos químicos por EDS, sendo tal estrutura caracterizada como matriz magnetossomal (Werckmann *et al.*, 2017) (Figura 52). É discutido que o acúmulo de ferro próximo ao cristal seja relevante durante a fisiologia de BMs, como em eventos de transporte do ferro citoplasmático para a vesícula do magnetossomo a fim de otimizar a nucleação de magnetita, conforme proposto por Uebe e Schüller (2016). Logo, a detecção da liberação de ferro após o 5º dia provavelmente ocorre devido à lise celular e que,

provavelmente, o ferro detectado e não da liberação das NMOBs propriamente ditas (Figura 18).

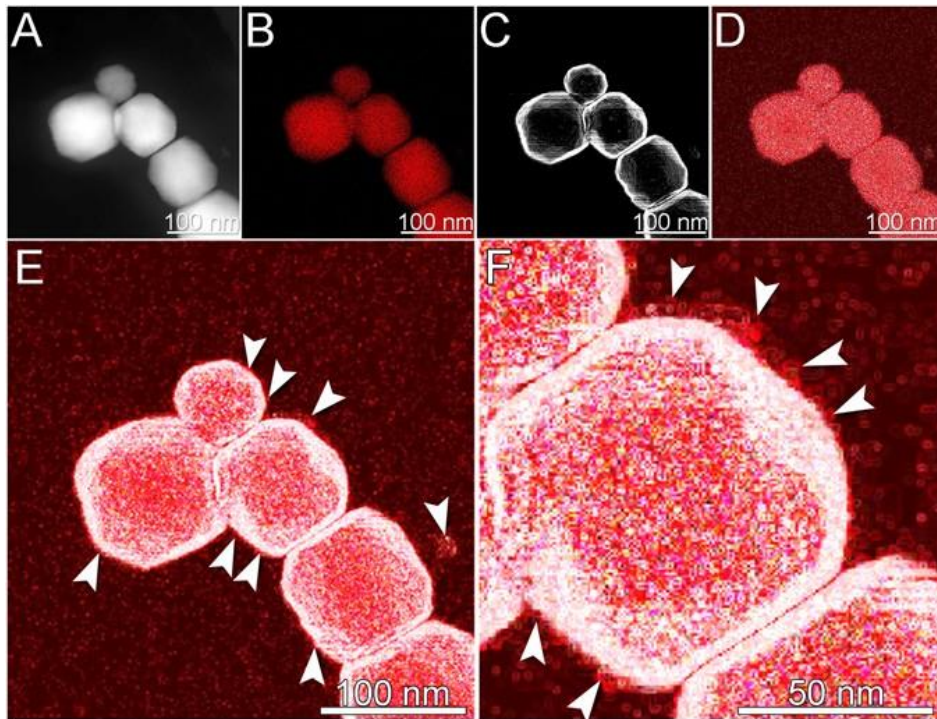


Figura 52. Imagens obtidas em STEM-HAADF e mapa de elementos por EDS da cadeia de NMOBs de células de cultura de *Mf. australis* cepa IT-1 exibindo o acúmulo de ferro na matriz magnetossomal. **A.** Imagem em HAADF de uma cadeia de magnetossomo Fe_3O_4 . **B.** Mapa Fe da cadeia mostrada em (A). **C.** Imagem do algoritmo de detecção de borda da imagem STEM mostrada em (A). **D.** Imagem do algoritmo de detecção de borda do mapa Fe mostrado em (C). **E.** Imagem de sobreposição do

STEM processado (C) e do mapa Fe (D). **F.** Alta ampliação da imagem de sobreposição mostrada em (E). As setas indicam regiões de acúmulo significativo de Fe ao redor do cristal Fe_3O_4 do magnetossomo. Figura retirada de Werckmann *et al.* (2017).

Por fim, o estabelecimento de futuras estratégias de cultivo como a batelada alimentada ou o cultivo contínuo, que estão sendo conduzidas, devem estar pautadas na suplementação adequada da taxa de consumo destes nutrientes a fim de manter a elevada taxa de crescimento e produtividade de magnetita observados nos dois primeiros dias por mais tempo, o que consequentemente resultará na maior produção de magnetita por bioprocessos e, sucessivamente, na maior viabilidade técnico-econômica da produção desta classe de NPs.

6.2. Separação magnética de microalgas utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

Dado o estabelecimento do cultivo em batelada simples de *Mf. australis* cepa IT-1 e a caracterização de suas NMOBs, é fundamental a integração dessas NPs em novos processos biotecnológicos. Portanto, devido à natureza singular da química de superfície desta classe de NPs, as NMOBs isoladas de *Mf. australis* cepa IT-1 foram utilizadas em processos de floculação e separação magnética de microalgas de interesse biotecnológico — *e.g.*, acúmulo de lipídeos neutros para produção de biodiesel. Microalgas são fototróficos unicelulares importantes no ciclo do carbono — *e.g.*, mitigação das emissões de gases estufa como CO₂ e produção de mais da metade do O₂ atmosférico disponível no globo.

Além disso, há interesse biotecnológico neste grupo de microrganismos devido à sua capacidade de acumular inclusões de lipídeos neutros (*e.g.*, triacilgliceróis que, por sua vez, podem ser utilizadas para produção de biodiesel de 3^a geração (Wijffels e Barbosa, 2010; Liao *et al.*, 2016)). Tais lipídeos podem ser extraídos, processados e convertidos em biodiesel, promovendo uma alternativa sustentável à natureza não renovável das matrizes fósseis utilizadas atualmente. Nesse aspecto, dois aspectos importantes na produção do biodiesel de 3^a geração são a modulação do conteúdo lipídico e a coleta de microalgas após o cultivo.

Dessa forma, foram utilizadas as NMOBs das cepas NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T na etapa de coleta das microalgas, promovendo uma ferramenta de floculação e separação magnética da biomassa para posterior extração de lipídeos. O controle de qualidade de NMOBs *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T indicou a presença de NPs dentro da faixa de tamanho esperado (*i.e.*, $73,20 \pm 6,62$ por $49,55 \pm 5,96$ nm; fator de forma $0,77 \pm 0,03$), conforme caracterizado por TEM, bem como a superfície negativamente carregada, conforme caracterizado pelo potencial zeta (*i.e.*, $-27,17 \pm 4,80$ mV), de acordo com os parâmetros estabelecidos na literatura (Figura 23) (Silva *et al.*, 2013; Correa *et al.*, 2022). A discussão sobre o controle de qualidade realizado para NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 encontra-se descrito no tópico “6.1. Caracterização do cultivo em batelada da BM *Mf. australis* cepa IT-1 e da produção de NMOBs octaédricas alongadas”.

Previamente, também foram realizados testes quanto à capacidade das microalgas crescerem em meios de cultivo com alteração de pH, de fonte de ferro e da quantidade de ferro disponível (Figura 24; Figura 25; Figura 26; Figura 27; Figura 28; Figura 29). Sucintamente, as

espécies *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* e *Desmodesmus* sp. foram capazes de tolerar o crescimento em pH 5,0, etapa crucial os ensaios de separação magnética posteriores de com NMOBs, e, alguns casos, como *Scenedesmus* sp., foi possível observar densidade celular final ($1,62 \pm 0,05 \cdot 10^4$ células \cdot mL⁻¹) 6,34× superior à inicial ($2,21 \pm 0,70 \cdot 10^3$ células \cdot mL⁻¹) quando submetida à pH 5,0, sem aparente dano celular quando observado em DIC e sem alteração quanto ao diâmetro médio e o fator de forma celular (Figura 24; Figura 25; Figura 26). A caracterização da sobrevivência celular em pH ácido é essencial para as etapas de separação magnética futuras, dado que a interação entre NMOBs e a superfície de microalgas é pH-dependente. Ou seja, após a acidificação do meio no qual se encontram as células, há aumento do grau de protonação da superfície destas espécies, uma vez que o tampão citrato corresponde à base conjugada do ácido cítrico, um ácido tricarbóxico com 3 hidrogênios ionizáveis (*i.e.*, $pK_{a1}=3,15$; $pK_{a2}=4,77$; $pK_{a3}=6,40$) (Trujillo-Reyes *et al.*, 2013) (Figura 53).

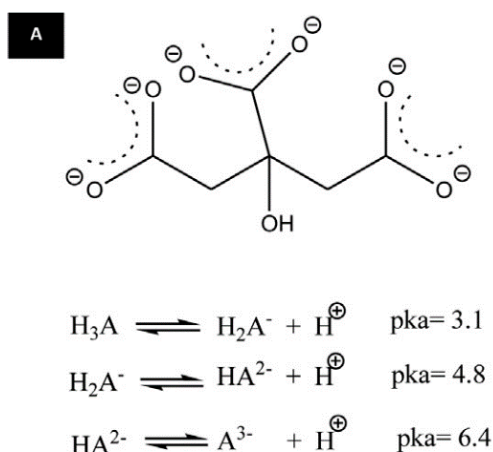


Figura 53. Desprotonação e constante de dissociação de ácidos em escala logarítmica (pK_a) do ácido cítrico. Há três grupamentos carboxila com prótons ionizáveis nos valores de $pK_{a1}=3,15$; $pK_{a2}=4,77$; $pK_{a3}=6,40$. Figura retirada de Trujillo-Reyes *et al.* (2013).

A quantificação do teor de lipídeos neutros por célula para as microalgas em exposição às diferentes condições de pH, retornou aumento significativo quando os tipos celulares *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp. e *Monoraphidium* sp. foram cultivados em condição de pH 5,0, sem queda significativa na taxa de crescimento (Figura 28; Figura 29). Tal característica é importante para as etapas *downstream*, bem como, é sabido que determinados padrões de estresse podem causar o acúmulo de inclusões de lipídeos neutros, o que é vantajoso para o processo (Wijffels e Barbosa, 2010).

Além disso, a caracterização da taxa de crescimento das células sob variações de condição de pH também é fundamental devido às variações comumente encontradas em cultivos do tipo *raceway* (*i.e.*, piscinas de cultivo a céu aberto), comumente empregados em países com alta taxa de incidência de luz solar como o Brasil, indicando a robustez e uma

propriedade desejável deste grupo de microrganismos em relação à sobrevivência em condições diversas (Wijffels e Barbosa, 2010; Andrade *et al.*, 2020). Logo, uma vez estabelecida a sobrevivência celular nestas condições, prosseguiu-se para o ensaio de separação magnética com NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 (Figura 30; Figura 31; Figura 32). Foi possível obter taxas de separação magnética de até $80,08 \pm 2,08\%$ para a espécie *Scenedesmus* sp. em pH 3,1 em tampão citrato, sendo possível observar a clarificação do meio após a etapa de floculação e separação magnética e, posteriormente, a observação dos agregados de células e NMOBs formados em DIC. É sugerido que uma das interações mais importantes pelo efeito observado é a atração eletrostática promovida pela protonação em diferentes graus da superfície celular ao passo que essa interage com uma NP negativamente carregada, conforme observado pelo potencial zeta de $20,93 \pm 1,01$ mV (Figura 20). Além disso, é possível que ocorram outros tipos de interação entre as proteínas de membrana da NMOB com a superfície celular que, até o presente momento, ainda não foram elucidadas e podem contribuir para a capacidade de separação magnética das microalgas. Posteriormente, o ensaio foi validado utilizando NMOBs extraídas *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T sobre a melhor e a pior condição de concentração magnética (*i.e.*, *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium* sp.), e os resultados corroboraram as observações anteriores sobre o efeito pH-dependente (Figura 35). Indicando, novamente, a robustez da NP e possibilidade variação da aplicação de NMOBs obtidas de BMs diferentes, dada à natureza principal da interação ser pH-dependente.

Outro fator importante é o estabelecimento da relação entre densidade celular (*i.e.*, $3 \cdot 10^3$ a $1,2 \cdot 10^4$) e concentração de NMOBs (*i.e.*, $80 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{mL}^{-1}$). Um aspecto importante é o estabelecimento prévio da concentração de $80 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{mL}^{-1}$ para a remoção de sólidos suspensos de resíduo de brasagem (*i.e.*, efluente cervejeiro com pH 5,0) (Correa, 2021). Por exemplo, a ferramenta desenvolvida por Zhu *et al.* (2019) apresenta NPs de magnetita e magnetita dopada com ítrio sem revestimento (ambas sintéticas). Dessa forma, a fim de obter uma eficiência de separação próxima a 90%, além da redução do pH, as NPs foram utilizadas em concentrações de ótimas de 10 e 2,5 g/L, respectivamente. Tal valor supera até quatro ordens de grandeza, *i.e.*, 10^4 vezes, a quantidade de NMOBs utilizadas nos ensaios separação magnética desta tese. Logo, a menor quantidade de NMOBs utilizadas, em comparação às NPs sintéticas, confere ganho na quantidade de NPs utilizadas do processo bem como a redução do custo final. Além disso, é possível que as NMOBs sejam reutilizáveis devido à natureza da interação e a possibilidade de deslocamento da interação. No entanto, a capacidade de reusabilidade precisa ser confirmada por estudos futuros.

Também é sabido que NPs sintéticas possuem menor vida útil em razão da ausência de revestimento e do encarecimento durante a mimetização de superfícies orgânicas (*e.g.*, adição de fosfatidilcolina) (Klektoka *et al.*, 2022) (Groult *et al.*, 2014). Somado a isso, em decorrência da degradação natural destas NPs, como em processo que levam à acidificação do meio, ocorre a solubilização da magnetita e, conseqüentemente, a liberação dos cátions di- e tri- valentes de ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) (Salmimies *et al.*, 2014). Ademais, as NPMSs são cristalograficamente imperfeitas com forma e faces pouco definidas, o que facilita sua oxidação, a perda de propriedade e a magnética e dissolução do nanocristal. Dessa forma, a liberação abrupta de ferro resulta em efeitos tóxicos às células alvos, o que pode prejudicar aplicações *downstream* durante o processamento (*e.g.*, extração de lipídeos neutros) que necessitem da célula viável ou sem extravasamento de conteúdo citoplasmático (Xiao *et al.*, 2021). O aumento do ferro em tanques de produção de microalgas também pode ocasionar o aumento da comunidade bacteriana, principalmente na classe dos patógenos, além de promover relações de competição pelos nutrientes fornecidos, sendo, portanto, um problema adicional em escala industrial por diminuir a produtividade (Fuentes *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2021).

Outros autores também utilizam outras abordagens como o revestimento das NPMSs com quitosana (Bae *et al.*, 2008). A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido a partir da desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos. Sua síntese ocorre devido à alcalinização da quitina sob altas temperaturas (Kim e Lee, 1993; Wang *et al.*, 2016). Logo, diversos autores utilizam o revestimento de quitosana com agente de ligação cruzada Pluronic F-127, um copolímero surfactante hidrofílico não iônico (Bae *et al.*, 2008) (Figura 54). Este é um composto com conhecida toxicidade para diversos organismos marinhos (Hering *et al.*, 2020; Rahdar *et al.*, 2020). Além disso, vários processos de revestimento artificial também utilizam tripolifosfato de sódio, um poluente aquático não removido por estações de tratamento de água e que atua na eutrofização de ecossistemas de corpos hídricos fluviais (Lu *et al.*, 2014).

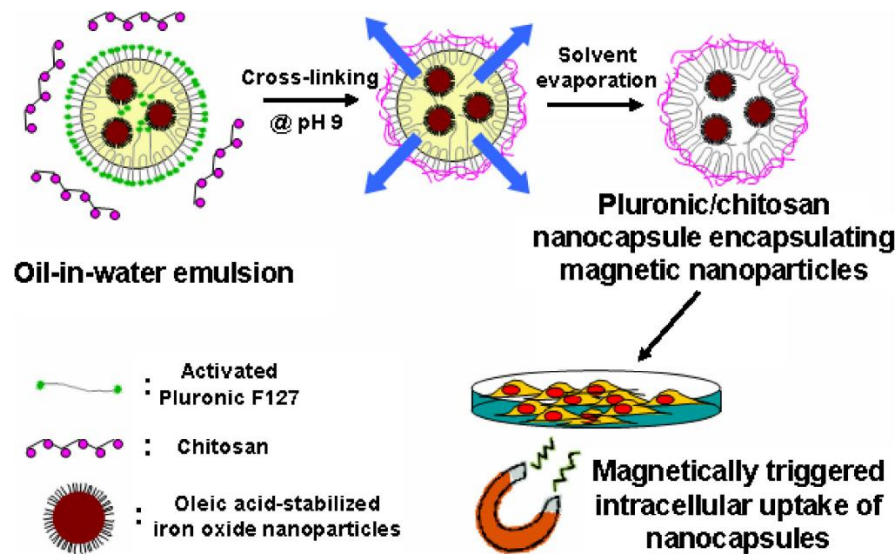


Figura 54. Exemplo de revestimento sintético com o polímero catiônico quitosana e o agente de ligação cruzada Pluronic F-127 realizado em pH 9 sobre NPMSs. Figura retirada de Bae *et al.* (2008).

Além disso, os dados obtidos a partir dos ensaios de separação magnética em relação ao desafio com NPMSs com as culturas de *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Dunaliella* sp. indicaram taxas de recuperação inferiores às NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Figura 36; Figura 37). Outro aspecto relevante é a contradição entre os resultados observados na coleta de microalgas, baseado em absorvância em DO_{680nm}, em relação à avaliação visual da recuperação de microalgas por NPMSs através da aplicação de \vec{H} nos mostrou que não havia aglomeração de células, o que impossibilita a coleta magnética (Figura 36; Figura 37). Dessa forma, é sugerido que devido ao fato de NPMSs não serem cristais com faces bem definidas e cristalograficamente perfeitas, esta classe de NP provavelmente é dissolvida em no meio, o que causaria a liberação de grande quantidade de ferro e, sucessivamente, os efeitos acima mencionados.

Nesse sentido, diversos autores apontam a dissolução de NPMSs em soluções com pH ácido, condição necessária à separação das células (Ike e Duke, 2018). É sugerido também que a provável dissolução das NPMSs pode falsear o resultado da coleta aferido pela absorvância em DO_{680nm}, dado que não é observada a clarificação do meio quando comparado à utilização das NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (Figura 32; Figura 33). Assim, o desempenho de NMOBs se mostrou significativamente superior ao exibido por NPMSs, pois NMOBs apresentaram-se mais estáveis e, de fato, promovem a formação de agregados de células e NMOBs devido à natureza da interação pH-dependente e com capacidade de responder ao campo magnético aplicado, promovendo a separação magnética das células alvo.

Outra abordagem consiste no emprego de flocculantes químicos, geralmente polímeros catiônicos, empregados na coleta de microalgas (Tiron *et al.*, 2017). No entanto, há limitação dos flocculantes atualmente descritos em promover a coleta de microalgas marinhas em meios de alta salinidade (Vandamme *et al.*, 2010; Roselet *et al.*, 2017). Nestes casos, é comum a perda de eficiência do flocculante ou o aumento demasiado de sua concentração (Vandamme *et al.*, 2011) para que haja efeito desejado e a velocidade de sedimentação, mesmo após a flocculação, é relativamente lenta, o que leva a longos tempos de processamento, além do encarecimento do processo. Em contrapartida, NMOBs mostraram-se eficazes em promover a recuperação de 52,08% das células de *Nannochloropsis* sp. em alta salinidade com 40 g NaCl · L⁻¹ e pH 3,1, condição de salinidade que é praticada em *raceways* de cultivo a céu aberto e iluminação solar durante o cultivo da célula (Figura 38; Figura 40; Figura 41) (Gu *et al.*, 2012). Ademais, caso a salinidade seja reduzida para comportar 20 g NaCl · L⁻¹, é possível recuperar magneticamente até 64,93% das células. Também foi possível observar a ineficácia da recuperação das células na condição de 40 g NaCl · L⁻¹ em *Nannochloropsis* sp., ao utilizar o flocculante químico, mantido sob sigilo, e as NPMSs (Figura 38).

Logo, o desenvolvimento de nanoferramenta baseada em NMOBs que permite separação magnética do material suspenso em cultivo pode representar ganho para o processo dada a natureza da NP, o perfil de interação com as microalgas e a provável capacidade de reuso em novos bioprocessos. Ademais, iniciativas públicas como o estabelecimento do PNPB e a regulamentação pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, são importantes para a consolidação do biodiesel na matriz energética brasileira e para o fomento de novas tecnologias que viabilizem cada vez mais a inserção de biocombustíveis no mercado nacional.

6.3. Base molecular da interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana de NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T

Conforme discutido anteriormente, os corantes sintéticos não tratados causam diversos impactos ecotoxicológicos relacionados ao seu despejo em corpos hídricos (Figura 13) (Lin *et al.*, 2023). Uma vez que os impactos estão ligados à natureza química destes poluentes, tornando-os pouco biodegradáveis e com perfis complexos de toxicidade para organismos aquáticos, são necessárias novas alternativas às estratégias convencionais de tratamento de efluentes da indústria têxtil (Cai *et al.*, 2020; Lellis *et al.*, 2019). Nesse sentido, dentro do contexto da aplicação de NPs em Biotecnologia, NMOBs podem ser utilizadas como alternativas viáveis aos tratamentos convencionais devido às propriedades relacionadas à sua química de superfície e a presença de proteínas de membrana espécie-específica.

Apesar de Correa (2021) ter reportado a capacidade de degradação (*i.e.*, descoloração) do corante azul de metila utilizando NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, o mecanismo envolvido no processo não foi totalmente elucidado. É sabido que um dos principais mecanismos de descoloração de corantes é a peroxidação da molécula provocada pela reação de Fenton utilizando peróxido de hidrogênio e Fe²⁺ como catalisador, estratégia adaptada recentemente ao uso de NMPSs devido à capacidade de liberação de ferro das mesmas (Sadegh *et al.*, 2021). Em suma, foi possível observar que a degradação do corante, principalmente associada à degradação da porção organo-conjugada da molécula (pico b; Figura 55), apresentava efeito relacionado à presença da membrana que envolve a NMOB — em condições que empregaram ou não a adição de H₂O₂ (Figura 56) — em condições de pH neutro e com capacidade de reutilização por até 4 ciclos levando ao espessamento de membrana da NMOB e, conseqüentemente, redução da atividade após o reuso (*e.g.*, 1º ciclo com 87,76 ± 1,43% de degradação do corante e 4º ciclo com 43,46 ± 11,24%) (Figura 57).

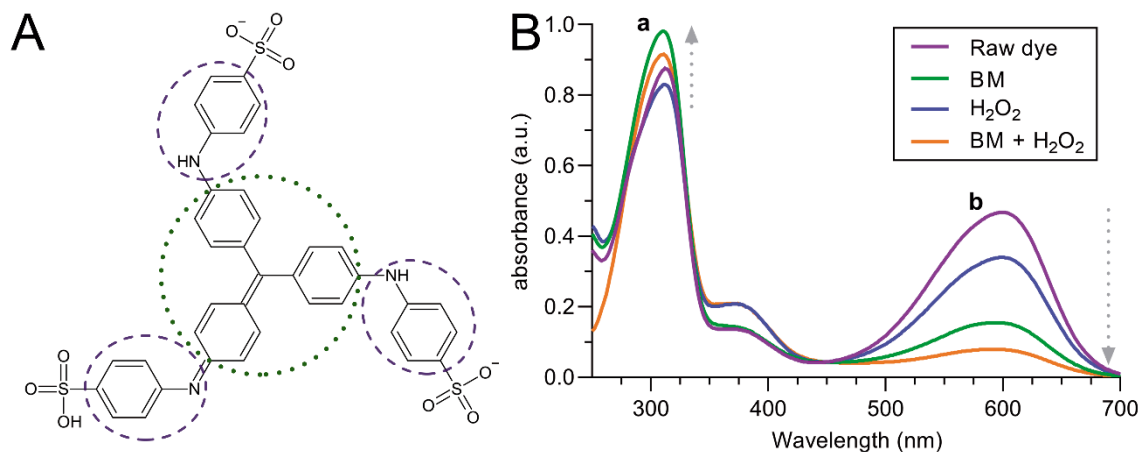


Figura 55. Estrutura química e padrão de absorvância do corante azul de metila **A.** Estrutura química mostrando o grupo anilina (tracejado roxo) e o grupo triarilmetano (pontilhado em verde). Há também a presença dos grupos sulfonato terminais ligados aos grupos anilina. **B.** Espectro UV-Vis do corante em diferentes condições de tratamento. O pico a entre 290 e 310 nm corresponde ao grupo anilina e o pico b entre 580 e 620nm corresponde a estrutura organo-conjugada do corante. O pico b apresenta degradação significativa ao comparar os tratamentos com NMOBs apenas e NMOBs adicionadas de H_2O_2 . Legenda: (i) BM, *bacterial magnet*; (ii) raw dye, corante bruto; (iii) H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; e (iv) BM + H_2O_2 , aplicação da NMOB junto ao peróxido de hidrogênio. Figura retirada de Correa (2021).

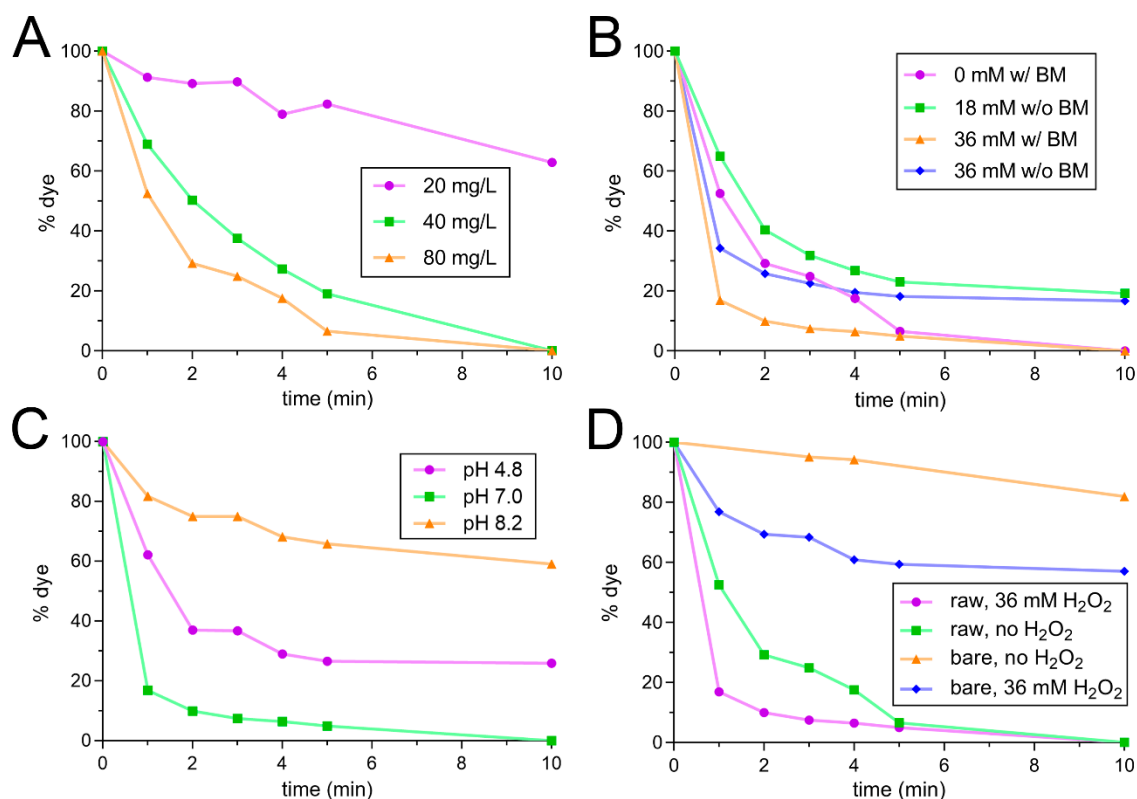


Figura 56. Cinética da concentração de corante ao longo de tratamentos de 10 minutos. **A.** Efeito da concentração de NMOBs na ausência de peróxido de hidrogênio. **B.** Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na presença de NMOBs. **C.** Efeito do pH sobre a cinética de degradação. **D.** Efeito da remoção da membrana de NMOBs com e sem adição de peróxido de hidrogênio. Legenda: (i) BM, *bacterial magnet*; (ii) raw dye, corante bruto; (iii) H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; e (iv) BM + H_2O_2 , aplicação da NMOB junto ao peróxido de hidrogênio. Figura retirada de Correa (2021).

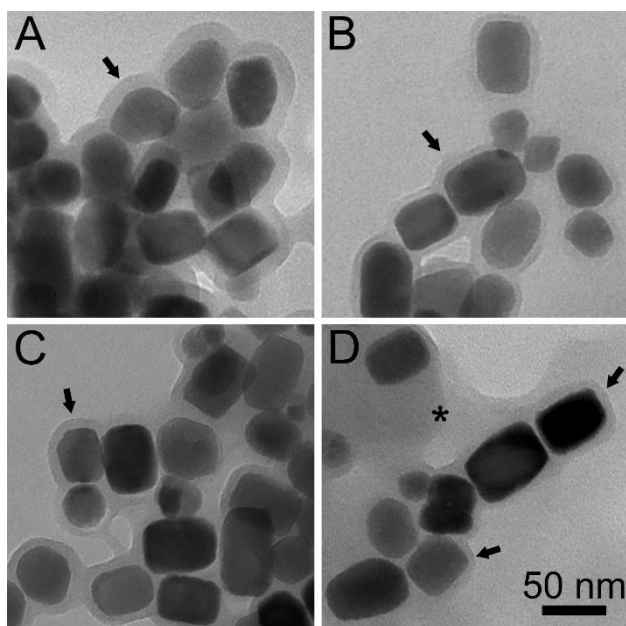


Figura 57. Imagem relativa ao espessamento de membrana de NMOBs de *Mv. blakemorei cepa MV-1^T* de realizadas em TEM durante os ciclos de reuso das NPs. **A. a D.** Correspondem respectivamente ao 1°, 2°, 3° e 4° ciclo de reuso das NMOBs, indicando o espessamento de membrana (seta preta). Figura retirada de Correa (2021).

Portanto, uma vez estabelecido que o efeito de degradação do corante está relacionado diretamente à presença da membrana das NMOBs de *Mv. blakemorei cepa MV-1^T* e não diretamente à reação de Fenton, visto que esta ocorre em pH ácido (Jung *et al.*, 2009), há um indicativo de biocatálise. Logo, nesta tese foi realizada a predição da base molecular de interação entre o corante azul de metila e as proteínas de membrana destas NPs para melhor compreensão do efeito observado. A partir dos 25 modelos de proteínas Mam e Mms, que previamente haviam sido identificadas como proteínas de membrana (Murat *et al.*, 2010; Uebe e Schuler, 2016), foi possível observar, a partir da docagem molecular, a melhor afinidade de interação entre o corante azul de metila e a proteína MamZ de *Mv. blakemorei cepa MV-1^T* (Tabela 8; Figura 44; Figura 45), correspondendo ao *binding score* de $-9,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Além disso, o modelo de MamZ foi considerado robusto com pLDDT médio de $81,53 \pm 12,95$ por resíduo, GQME = 0,82 e sem outliers no gráfico de Ramachandran (Figura 43).

Quanto à caracterização do sítio de interação, este é composto por 22 resíduos em região de até 5,0 Å do ligante, mas a rede de interações intermoleculares é composta 8 resíduos, sendo estes: (i) F618, I575 e W568 (hidrofóbicos aromáticos); (ii) T621 e S479 (polares não ionizáveis); e (iii) R483, H572 e R573 (básicos; polares ionizáveis) (Figura 44; Figura 45). Tais resíduos são responsáveis pelo estabelecimento de 5 *H-bonds* (*i.e.*, F618, T621, R573 e S479), 3 interações hidrofóbicas (*i.e.*, R573, H572 e I575), 1 interação pi-pi (perpendicular; W568), 2 interações pi-cátion (*i.e.*, H572 e R483) e 1 ponte salina (*i.e.*, R483). Outro aspecto importante

é a robustez dos resíduos que compõe a rede de interação intermolecular com pLDDT de $84,13 \pm 8,62$, indicando fidedignidade para a interpretação das interações, além de apresentar valor de RSA $22,98 \pm 20,50\%$, indicando sítio parcialmente exposto ao solvente, considerando o *threshold* de 25% para resíduos enterrados (Zhang *et al.*, 2009). Ainda no aspecto da exposição ao solvente, é possível que os 3 resíduos expostos ao solvente — *i.e.*, 2 H-bonds, sendo uma com a carbonila do *backbone* de F618 e outra com a hidroxila da cadeia lateral de T621, 1 ponte salina e 1 interação π -cátion com o grupo guanidino positivamente carregado em seu estado protonado da cadeia lateral de R483 — sejam essenciais para a primeira estabilização do corante azul de metila no bolsão de ancoragem, de forma que proporcionam as primeiras interações para que o restante da rede de interações intermoleculares possa ocorrer e haja exposição dos resíduos hidrofóbicos enterrados aos anéis aromáticos do corante. Além disso, o sítio de interação encontra-se no folheto externo do domínio FRS de MamZ, correspondendo à porção composta por 5 α -hélices transmembrana — *i.e.*, $\alpha 17$ a $\alpha 22$. Nesse sentido, já é descrita a atividade redutase no folheto externo do domínio FRS de MamZ em outras BMs afiliadas à classe Alphaproteobacteria, estando relacionado à redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} e importe deste para a vesícula do magnetossomo (Raschdorf *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2021).

Uma vez estabelecida a possível base estrutural do sítio de interação de MamZ *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T com o ligante, foram realizados o alinhamento das sequências de aminoácidos e o alinhamento estrutural em relação à mesma proteína das BMs *Mf. australis* cepa IT-1, *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Figura 46; Figura 47; Figura 48). A escolha foi pautada na disponibilidade e na prévia caracterização de aplicações biotecnológicas das NMOBs cuboctaédricas do gênero *Magnetospirillum* (Uebe e Schüller; Vargas *et al.*, 2018), além da caracterização das NMOBs octaédricas alongadas de *Mf. australis* cepa IT-1, descritas neste trabalho. Quanto ao alinhamento múltiplo das sequências, foi observado que 205 resíduos eram conservados do total de 630 (32,53%) e, posteriormente, o maior percentual de resíduos conservados é observado em relação à MamZ de *Mf. australis* cepa IT-1, com conservação de 264 (41,90%) resíduos, identidade de 42,24% e 97% de cobertura (Figura 46).

Além disso, quanto ao alinhamento de sequências e ao alinhamento estrutural, foi observado a conservação dos resíduos S479, R483, W568 e H572 referentes às cepas IT-1 e AMB-1. Logo, caso a atividade catalítica seja mantida ao utilizar outras NMOBs, é possível que a manutenção da rede de interações intermoleculares destes resíduos seja importante para

o efeito observado. Logo, mantém-se conservadas as interações: (i) uma *H-bond* da hidroxila de S479 com um nitrogênio anilínico do corante; (ii) uma ponte salina e uma interação π -cátion com o grupo guanidino da cadeia lateral de R483; (iii) uma interação π - π perpendicular (*T-shaped*) de um anel aromático do corante com um anel indólico de W568; e (iv) uma interação π -cátion com um anel aromático do corante em relação ao anel imidazólico do resíduo H572 (Figura 46; Figura 48).

Quanto às alterações de resíduos em relação à MamZ da cepa MV-1^T em relação à mesma proteína da cepa IT-1, *i.e.*, de maior identidade e percentual de cobertura, foi detectado apenas 1 troca relacionada à alteração de classe do resíduo, sendo I575N, ou seja, troca da isoleucina-575, um resíduo hidrofóbico alifático, por uma asparagina, um resíduo polar não ionizável. Além disso, mantiveram-se conservadas as classes referentes às trocas: (i) F618Y, ou seja, a troca da fenilalanina-618 por tirosina, ambos hidrofóbicos aromáticos; (ii) R573K, ou seja, troca da arginina-573 por lisina, ambos básicos (*i.e.*, polares ionizáveis); e (iii) T621S, ou seja, a troca da treonina-621 por serina, ambos polares não ionizáveis (Figura 46; Figura 48). Logo, o alto grau de conservação dos resíduos e a troca por resíduos de classes bioquímicas semelhantes em MamZ de *Mf. australis* cepa IT-1 sugere que a NP possa ter atividade catalítica semelhante à observada para as NMOBs da cepa MV-1^T. No entanto, são necessárias abordagens experimentais para a confirmação ou não desta propriedade, bem como o possível efeito da troca de determinados resíduos sobre o ganho, manutenção ou perda da atividade catalítica.

Portanto, é importante lembrar que as inferências foram realizadas baseadas em modelo construído *in silico* e que o estudo dos resíduos catalíticos bem como os mecanismos reacionais (*e.g.*, catálise acidobásica, metálica e covalente) relacionados à catálise (*e.g.*, redução da entropia, posicionamento correto dos grupos funcionais, perda da camada de solvatação e o ajuste induzido, efeitos provocados pela interação do ligante no bolsão de interação) ainda precisam ser confirmados por técnicas de elucidação estrutural. Além disso, abordagens relacionadas à dinâmica molecular, ou seja, à adição e previsibilidade da flexibilidade e dos graus de liberdade de movimento das ligações químicas podem auxiliar ainda mais na melhoria do modelo atual construído, dado que este não é dinâmico e outras interações relacionadas à cinética da reação podem não estar sendo totalmente observados. Logo, é sugerido um possível mecanismo estrutural relacionado à degradação do corante azul de metila e, provavelmente, é

possível que esse efeito possa ser conservado e estar presente em outras NMOBs disponíveis em Biotecnologia, como as NMOBs octaédricas alongadas de *Mf. australis* cepa IT-1.

Por fim, a abordagem referente aos possíveis eventos estruturais que ocorrem durante a degradação do corante azul de metila é pioneira. Nesse sentido, o entendimento da biologia estrutural das proteínas de membrana de NMOBs e as alterações pontuais de aminoácidos encontradas em diferentes espécies pode guiar os estudos de engenharia genética afim de tornar esta classe de NPs mais eficientes como ferramentas em Biotecnologia. Tal abordagem *in silico* já é empregada, por exemplo, para a proposição de substituições de aminoácidos em proteínas termoestáveis de interesse biotecnológico, como a alteração de resíduos catalíticos e os posicionados em sua vizinhança (Xu *et al.*, 2020; De Souza *et al.*, 2023). Além disso, estudos relacionados à base estrutural das proteínas Mam e Mms podem prover maior compreensão sobre o potencial catalítico contido no repertório proteico contido na membrana de NMOBs.

7. Conclusão

O cultivo em batelada de *Mf. australis* cepa IT-1 corresponde ao primeiro relato de bioprocesso que emprega uma BM isolada em território nacional, além de ser o único processo para produção de NMOBs cuboctaédricas alongadas. Tal BM biomineraliza NMOBs octaédricas alongadas com área de superfície, volume e massa de magnetita por NMOB superior a outras NMOBs descritas atualmente na literatura. Portanto, tem-se que, as NMOBs são responsivas à aplicação de um campo magnético, uma vez que são passíveis de aplicações em separação magnética e carregamento de moléculas, conforme descrito na patente relacionada BR 10 2022 024357 3, que trata da separação magnética de microalgas empregadas na produção de biodiesel utilizando NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1.

Além disso, o cultivo pioneiro em microaerofilia torna-se vantajoso uma vez que o O₂ é o melhor acceptor final de elétrons durante a respiração celular, isto é, aproveitando todo o potencial redutor gerado na cadeia respiratória. Dessa forma, otimiza-se a taxa de crescimento celular de BMs, que são naturalmente microrganismos fastidiosos e, por sua, reduz o custo ao não necessitar do uso de O₂ com alta pureza química uma vez que é possível utilizar o próprio O₂ disponível no ambiente e introduzi-lo no sistema.

Em suma, os dados relacionados ao cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1, como a taxa de crescimento e o consumo de nutrientes, podem ser utilizados em futuros bioprocessos que otimizem o meio de cultura e os parâmetros físico-químicos durante o crescimento. Tal abordagem pode colaborar para o aumento da produção e produtividade do bioprocessos. Por fim, há diversos campos nas quais as NMOBs podem ser empregadas, tanto em Nanomedicina como aplicações ambientais e industriais. Nesse sentido, o aumento da escala da produção de NMOBs, como as obtidas a partir do cultivo em batelada simples de *Mf. australis* cepa IT-1, aumentando ainda mais as possíveis áreas de aplicação desta classe NPs, conforme necessita a demanda global.

Além disso, o emprego das NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T em processos de separação magnética é crucial na etapa de coleta de microalgas empregadas na produção de biodiesel de 3^a geração. Tais nanopartículas conseguem interagir com a superfície de microalgas a partir de mecanismo pH-dependente. Além disso, devido às propriedades desejáveis das NMOBs — principalmente relacionadas à sua química de superfície, a presença da membrana biológica e proteínas transmembrana espécie-específicas — são responsáveis pela capacidade de ligação e separação magnética quando desafiadas em

altas salinidades, condição na qual NPMSs e flocculantes químicos se mostram ineficazes. Conferindo, portanto, tal processo pode conferir ganho no processo na coleta relacionado à eficiência, sustentabilidade e possível reusabilidade das NMOBs, consolidando-as em uma nova aplicação em Biotecnologia.

Por fim, foi realizada a elucidação da possível base molecular relacionada ao efeito catalítico observado durante a degradação do corante azul de metila, um efluente importante da indústria têxtil com alta capacidade ecotoxicológica cuja maior parte é despejada em corpos hídricos sem tratamentos eficazes na sua descoloração. Logo, ao observar a capacidade de degradação das NMOBs de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T foi possível observar a presença de oito resíduos conservados relacionados à docagem molecular do corante em relação à proteína MamZ em outras espécies disponíveis em Biotecnologia, sendo as cepas IT-1, AMB-1 e MSR-1. Além disso, é possível que o efeito seja mantido em NMOBs com alto grau de conservação de resíduos pertencentes ao sítio de interação, como em *Mf. australis* cepa IT-1.

Portanto, é importante ressaltar que as inferências sobre o sítio de interação entre o corante azul de metila e a proteína MamZ foram realizadas baseadas em modelo construído *in silico* e que o estudo dos resíduos catalíticos bem como os mecanismos reacionais ainda precisa ser confirmado por técnicas de elucidação estrutural. Além disso, abordagens relacionadas à dinâmica molecular podem auxiliar ainda mais na melhoria do modelo atual construído, dado que este não é dinâmico e outras interações relacionadas à cinética da reação podem não estar sendo totalmente observados, favorecendo a melhor compreensão do fenômeno de biocatálise observado além de aumentar a robustez da base estrutural para a predição e inferência da mesma capacidade em outras BMs com potencial biotecnológico ainda não explorado.

8. Referências

- Abenojar e. C., Wickramasinghe, S., Bas-Concepcion, J. e Samia, A. C. S. (2016). Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Progress in Natural Science: Materials International*, 26(5), 440-448.
- ABIT (Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção). (2019). Perfil do setor. Acesso em 10 de outubro de 2023. Disponível em: <https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>.
- Abreu, F., Martins, J. L., Silveira, T. S., Keim, C. N., de Barros, H. G. L., Gueiros Filho, F. J. e Lins, U. (2007). 'Candidatus Magnetoglobus multicellularis', a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(6), 1318-1322.
- Abreu, F., Silva, K. T., Leão, P., Guedes, I. A., Keim, C. N., Farina, M. e Lins, U. (2013). Cell adhesion, multicellular morphology, and magnetosome distribution in the multicellular magnetotactic prokaryote *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*. *Microscopy and Microanalysis*, 19(3), 535-543.
- Abreu, F., Carolina, A., Araujo, V., Leão, P., Silva, K. T., Carvalho, F. M. D. e Lins, U. (2016). Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4426-4441.
- Abreu, F., Leão, P., Vargas, G., Cypriano, J., Figueiredo, V. enrich-Prast, A. e Lins, U. (2018). Culture-independent characterization of a novel magnetotactic member affiliated to the Beta class of the Proteobacteria phylum from an acidic lagoon. *Environmental microbiology*, 20(7), 2615-2624.
- Abrikosov, I. A., Ponomareva, A. V., Steneteg, P., Barannikova, S. A. e Alling, B. (2016). Recent progress in simulations of the paramagnetic state of magnetic materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 20(2), 85-106.
- Ali, A., Shah, T., Ullah, R., Zhou, P., Guo, M., Ovais, M. e Rui, Y. (2021). Review on recent progress in magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, and diverse applications. *Frontiers in Chemistry*, 9, 629054.
- Alphandéry e., Ngo, A. T., Lefèvre, C., Lisiecki, I., Wu, L. F. e Pileni, M. P. (2008). Difference between the Magnetic Properties of the Magnetotactic Bacteria and Those of the Extracted Magnetosomes: Influence of the Distance between the Chains of Magnetosomes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(32), 12304-12309.
- Alphandéry e., Guyot, F. e Chebbi, I. (2012). Preparation of chains of magnetosomes, isolated from *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 magnetotactic bacteria, yielding efficient treatment of tumors using magnetic hyperthermia. *International journal of pharmaceutics*, 434(1-2), 444-452.
- Alphandéry e., Idbaih, A., Adam, C., Delattre, J. Y., Schmitt, C., Guyot, F. e Chebbi, I. (2017). Development of non-pyrogenic magnetosome minerals coated with poly-l-lysine leading to full disappearance of intracranial U87-Luc glioblastoma in 100% of treated mice using magnetic hyperthermia. *Biomaterials*, 141, 210-222.
- Amor, M., Wan, J. egli, R., Carlut, J., Gatel, C., Andersen, I. M. e Komeili, A. (2022). Key signatures of magnetofossils elucidated by mutant magnetotactic bacteria and micromagnetic calculations. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 127(1) e2021JB023239.
- Andrade, D. S., Telles, T. S. e Castro, G. H. L. (2020). The Brazilian microalgae production chain and alternatives for its consolidation. *Journal of Cleaner Production*, 250, 119526.

- Ansari, S. A. M. K., Ficiarà e., Ruffinatti, F. A., Stura, I., Argenziano, M., Abollino, O. e D'Agata, F. (2019). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and functionalization for biomedical applications in the central nervous system. *Materials*, 12(3), 465.
- Araujo, A. C. V., Morillo, V., Cypriano, J., Teixeira, L. C. R. S., Leão, P., Lyra, S. e Lins, U. (2016). Combined genomic and structural analyses of a cultured magnetotactic bacterium reveals its niche adaptation to a dynamic environment. *BMC genomics*, 17(8), 363-375.
- Bae, K. H., Ha, Y. J., Kim, C., Lee, K. R. e Park, T. G. (2008). Pluronic/chitosan shell cross-linked nanocapsules encapsulating magnetic nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(12), 1571-1583.
- Balivada, S., Rachakatla, R. S., Wang, H., Samarakoon, T. N., Dani, R. K., Pyle, M. e Troyer, D. L. (2010). A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron (0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. *BMC Cancer*, 10(1), 1-9.
- Banerjee, S. K. e Moskowitz, B. M. (1985). Ferrimagnetic properties of magnetite. In *Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms* (pp. 17-41). Springer, Boston, MA.
- Barber-Zucker, S. e Zarivach, R. (2017). A look into the biochemistry of magnetosome biosynthesis in magnetotactic bacteria. *ACS Chemical Biology*, 12(1), 13-22.
- Baroroh, U., Biotek, M., Muscifa, Z. S., Destiarani, W., Rohmatullah, F. G. e Yusuf, M. (2023). Molecular interaction analysis and visualization of protein-ligand docking using Biovia Discovery Studio Visualizer. *Indonesian Journal of Computational Biology (IJCB)*, 2(1), 22-30.
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. e Rizzolio, F. (2019). The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112.
- Bazylnski, D. A., Frankel, R. B. e Jannasch, H. W. (1988). Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium. *Nature*, 334, 518.
- Bazylnski, D. A. e Frankel, R. B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 217-230. De Araujo, F. T., Pires, M. A., Frankel, R. B. e Bicudo, C. E. M. (1986). Magnetite and magnetotaxis in algae. *Biophysical journal*, 50(2), 375-378.
- Bazylnski, D. A., Williams, T. J., Lefevre, C. T., Berg, R. J., Zhang, C. L., Bowser, S. S., e Beveridge, T. J. (2013). *Magnetococcus marinus* gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcaceae fam. nov., Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_3), 801-808.
- Benkert, P., Biasini, M. e Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
- Bentsen, N. S., Larsen, S. e Felby, C. (2014). CO2 emissions from crop residue-derived biofuels. *Nature Climate Change*, 4(11), 932-932.
- Bok, F., Moog, H. C. e Brendler, V. (2023). The solubility of oxygen in water and saline solutions. *Frontiers in Nuclear Engineering*, 2, 1158109.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J. e Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 4(1), 1-13.
- Bowen, A., Cochrane, S. e Fankhauser, S. (2012). Climate change, adaptation and economic growth. *Climatic Change*, 113(2), 95-106.

Brasil. Ministério da Casa Civil. (2005). Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências.

Burley, S. K., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Markley, J. L., Nakamura, H. e Velankar, S. (2017). Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Protein crystallography: methods and protocols*, 627-641.

Burke, F. (2008). Scale up and scale down of fermentation processes. *Practical Fermentation Technology*, 231-269.

Butler, R. F. e Banerjee, S. K. (1975). Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. *Journal of Geophysical Research*, 80(29), 4049-4058.

Cai, H., Liang, J., Ning, X. A., Lai, X. e Li, Y. (2020). Algal toxicity induced by effluents from textile-dyeing wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Sciences*, 91, 199-208.

Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., e Kollman, P. A. (2006). AMBER 9. University of California, San Francisco, 45.

Chagri, S., Ng, D. Y. e Weil, T. (2022). Designing bioresponsive nanomaterials for intracellular self-assembly. *Nature Reviews Chemistry*, 6(5), 320-338.

Chen, Y. R., Zhang, W. Y., Zhou, K., Pan, H. M., Du, H. J., Xu, C. e Wu, L. F. (2016). Novel species and expanded distribution of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes. *Environmental microbiology reports*, 8(2), 218-226.

Chhandama, M. V. L., Satyan, K. B., Changmai, B., Vanlalveni, C. e Rokhum, S. L. (2021). Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100771.

Cardoso, J. C., Bessegato, G. G. e Zanoni, M. V. B. (2016). Análise crítica dos processos empregados no tratamento de efluentes têxteis. In M. V. B. Zanoni & H. Yanamaka (Eds.), *Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento* (pp. 215–239). Cultura Acadêmica Ed.

Chemistry LibreTexts Libraries. Solutions of Gases in Water. UC Davis, California, EUA. Acesso em 11 de novembro de 2023. Disponível em: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry

Correa, T. (2021). Nanotecnologia sustentável: simulação de bioprocesso e análise econômica da produção de magnetossomos em escala industrial e desenvolvimento de ferramenta para tratamento de efluentes. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Correa, T., Bazylnski, D. A., Garcia, F. e Abreu, F. (2021). A rapid and simple preparation of amphotericin B-loaded bacterial magnetite nanoparticles. *RSC Advances*, 11(45), 28000-28007.

Correa, T., Godoy, M. G., Bazylnski, D. A. e Abreu, F. (2022). Continuous Production of Biogenic Magnetite Nanoparticles by the Marine Bacterium *Magnetovibrio blakemorei* Strain MV-1T with a Nitrous Oxide Injection Strategy. *Marine Drugs*, 20(11), 724.

de Almeida, É. J. R., Dilarri, G. e Corso, C. R. (2014). A indústria têxtil no Brasil: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. *Conexão Água*.

De Souza, T. P., Cantão, L. X. S., Rodrigues, M. Q. R. B., Gonçalves, D. B., Nagem, R. A. P., Rocha, R. E. O. e Lima, L. H. F. D. (2023). Glycosylation and charge distribution orchestrates the conformational ensembles of a

biotechnologically promissory phytase in different pHs—a computational study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-12.

DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, 40(1), 82-92.

Deng, Q., Liu, Y., Wang, S., Xie, M., Wu, S., Chen, A. e Wu, W. (2013). Construction of a novel magnetic targeting anti-tumor drug delivery system: cytosine arabinoside-loaded bacterial magnetosome. *Materials*, 6(9), 3755-3763.

Dong, Y., Li, J., Zhang, W., Zhang, W., Zhao, Y., Xiao, T. e Pan, H. (2016). The detection of magnetotactic bacteria in deep-sea sediments from the east Pacific Manganese Nodule Province. *Environmental Microbiology Reports*, 8(2), 239-249.

Douglas, F. J., MacLaren, D. A. e Murrie, M. (2012). A study of the role of the solvent during magnetite nanoparticle synthesis: tuning size, shape and self-assembly. *Rsc Advances*, 2(21), 8027-8035.

Dulińska-Litewka, J., Łazarczyk, A., Hałubiec, P., Szafranski, O., Karnas, K. e Karewicz, A. (2019). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles—Current and prospective medical applications. *Materials*, 12(4), 617.

Estime, B., Ren, D. e Sureshkumar, R. (2017). Cultivation and energy efficient harvesting of microalgae using thermoreversible sol-gel transition. *Scientific reports*, 7(1), 40725.

Essén, H. e Fiolhais, M. C. (2012). Meissner effect, diamagnetism, and classical physics — a review. *American Journal of Physics*, 80(2), 164-169.

Faivre, D. e Schuler, D. (2008). Magnetotactic bacteria and magnetosomes. *Chemical Reviews*, 108(11), 4875-4898.

Fernández-Castané, A., Li, H., Thomas, O. R. e Overton, T. W. (2018). Development of a simple intensified fermentation strategy for growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1: physiological responses to changing environmental conditions. *New biotechnology*, 46, 22-30.

Firjan (Federação das Indústrias do Estado do Rio de Janeiro). (2018). Os setores têxtil e de confecção e a Firjan. Acesso em 23 de outubro de 2023. Disponível em: <https://www.firjan.com.br/o-sistema-firjan/setores-deatuacao/textil-e-confeccao.htm>.

Frey, N. A., Peng, S., Cheng, K. e Sun, S. (2009). Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chemical Society Reviews*, 38(9), 2532-2542.

Fuentes, J. L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del-Valle, M. e Vílchez, C. (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine drugs*, 14(5), 100.

Gao, Q., Yan, H., Zou, H., Li, W., Peng, Z., Meng, G. e Zhang, W. (2021). Magnetic levitation using diamagnetism: Mechanism, applications and prospects. *Science China Technological Sciences*, 64(1), 44-58.

Geiger, O., López-Lara, I. M. e Sohlenkamp, C. (2013). Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 503-513.

Gharailou, D. (2019). A Review of Market Studies in Different Fields of Nanotechnology. Londres, Reino Unido: StatNano Publications.

- Gillet, N., Jault, D., Finlay, C. C. e Olsen, N. (2013). Stochastic modeling of the Earth's magnetic field: Inversion for covariances over the observatory era. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 14(4), 766-786.
- Ginet, N., Pardoux, R., Adryanczyk, G., Garcia, D., Brutesco, C. e Pignol, D. (2011). Single-step production of a recyclable nanobiocatalyst for organophosphate pesticides biodegradation using functionalized bacterial magnetosomes. *PLoS one*, 6(6) e21442.
- González-Gómez, M. A., Belderbos, S., Yañez-Vilar, S., Piñeiro, Y., Cleeren, F., Bormans, G. e Rivas, J. (2019). Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging. *Nanomaterials*, 9(11), 1626.
- Groult, H., Ruiz-Cabello, J., Lechuga-Vieco, A. V., Mateo, J., Benito, M., Bilbao, I. e Herranz, F. F. (2014). Phosphatidylcholine-Coated Iron Oxide Nanomicelles for In Vivo Prolonged Circulation Time with an Antibiofouling Protein Corona. *Chemistry—A European Journal*, 20(50), 16662-16671.
- Grünberg, K., Müller e. C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M. e Schüler, D. (2004). Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1040-1050.
- Gu, N., Lin, Q., Li, G., Qin, G., Lin, J. e Huang, L. (2012). Effect of salinity change on biomass and biochemical composition of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(1), 97-106.
- Hausoel, A., Karolak, M., Şaşıoğlu e., Lichtenstein, A., Held, K., Katanin, A. e Sangiovanni, G. (2017). Local magnetic moments in iron and nickel at ambient and Earth's core conditions. *Nature communications*, 8(1), 16062.
- Hering, I., Eilebrecht, E., Parnham, M. J., Günday-Türelı, N., Türelı, A. E., Weiler, M. e Wacker, M. G. (2020). Evaluation of potential environmental toxicity of polymeric nanomaterials and surfactants. *Environmental toxicology and pharmacology*, 76, 103353.
- Heyen, U. e Schüler, D. (2003). Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 536-544.
- Holcomb, M. B., Martin, L. W., Scholl, A., He, Q., Yu, P., Yang, C. H. e Ramesh, R. (2010). Probing the evolution of antiferromagnetism in multiferroics. *Physical Review B*, 81(13), 134406.
- Høie, M. H., Kiehl e. N., Petersen, B., Nielsen, M., Winther, O., Nielsen, H. e Marcatili, P. (2022). NetSurfP-3.0: accurate and fast prediction of protein structural features by protein language models and deep learning. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W510-W515.
- Hubbert, M. K. (1949). Energy from fossil fuels. *Science*, 109(2823), 103-109.
- Ike, I. A. e Duke, M. (2018). Synthetic magnetite, maghemite, and haematite activation of persulphate for orange G degradation. *Journal of Contaminant Hydrology*, 215, 73-85.
- Islam, T., Repon, M. R., Islam, T., Sarwar, Z. e Rahman, M. M. (2023). Impact of textile dyes on health and ecosystem: A review of structure, causes, and potential solutions. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(4), 9207-9242.
- Irving, S. E., Choudhury, N. R. e Corrigan, R. M. (2021). The stringent response and physiological roles of (pp) pGpp in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 19(4), 256-271.
- Jones, H. P., Hole, D. G. e Zavaleta e. S. (2012). Harnessing nature to help people adapt to climate change. *Nature Climate Change*, 2(7), 504-509.

- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C. e Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Junker, B. (2010). Minimizing the environmental footprint of bioprocesses. *BioProcess Int*, 8, 36-46.
- Jung, Y. S., Lim, W. T., Park, J. Y. e Kim, Y. H. (2009). Effect of pH on Fenton and Fenton-like oxidation. *Environmental Technology*, 30(2), 183-190.
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E. e Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112-128.
- Ke, L., Chen, Y., Liu, P., Liu, S., Wu, D., Yuan, Y. e Gao, M. (2018). Characteristics and optimised fermentation of a novel magnetotactic bacterium, *Magnetospirillum* sp. ME-1. *FEMS microbiology letters*, 365(14), fny052.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S. e Bolton e. E. (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1102-D1109.
- Kim, J. H. e Lee, Y. M. (1993). Synthesis and properties of diethylaminoethyl chitosan. *Polymer*, 34(9), 1952-1957.
- Klekotka, U., Rogacz, D., Szymanek, I., Malejko, J., Rychter, P. e Kalska-Szostko, B. (2022). Ecotoxicological assessment of magnetite and magnetite/Ag nanoparticles on terrestrial and aquatic biota from different trophic levels. *Chemosphere*, 308, 136207.
- Klok, A. J., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. e Wijffels, R. H. (2014). Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation. *Trends in Biotechnology*, 32(10), 521-528.
- Koerich, D. M. e Rosa, L. M. (2016). Numerical evaluation of the low Reynolds turbulent flow behaviour in a bioreactor. *International Journal of Simulation and Process Modelling*, 11(1), 66-75.
- Kolinko, S., Jogler, C., Katzmann e., Wanner, G., Peplies, J. e Schüler, D. (2012). Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3. *Environmental Microbiology*, 14(7), 1709-1721.
- Kopp, R. E. e Kirschvink, J. L. (2008). The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria. *Earth-Science Reviews*, 86(1-4), 42-61.
- Ku, S. B. e Edwards, G. E. (1977). Oxygen inhibition of photosynthesis: I. Temperature dependence and relation to O₂/CO₂ solubility ratio. *Plant Physiology*, 59(5), 986-990.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H. e Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Leão, P., Chen, Y. R., Abreu, F., Wang, M., Zhang, W. J., Zhou, K. e Lins, U. (2017). Ultrastructure of ellipsoidal magnetotactic multicellular prokaryotes depicts their complex assemblage and cellular polarity in the context of magnetotaxis. *Environmental Microbiology*, 19(6), 2151-2163.
- Leão, P., Le Nagard, L., Yuan, H., Cypriano, J., Da Silva-Neto, I., Bazyliniski, D. A. e Abreu, F. (2020). Magnetosome magnetite biomineralization in a flagellated protist: evidence for an early evolutionary origin for magnetoreception in eukaryotes. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1495-1506.
- Lee, N. e Hyeon, T. (2012). Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2575-2589.

- Lefèvre, C. T., Bernadac, A., Yu-Zhang, K., Pradel, N. e Wu, L. F. (2009). Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea. *Environmental microbiology*, 11(7), 1646-1657.
- Lefevre, C. T., Abreu, F., Schmidt, M. L., Lins, U., Frankel, R. B., Hedlund, B. P. e Bazylinski, D. A. (2010). Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3740-3743.
- Lefèvre, C. T., Frankel, R. B., Pósfai, M., Prozorov, T. e Bazylinski, D. A. (2011). Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments. *Environmental Microbiology*, 13(8), 2342-2350.
- Lellis, B., Fávoro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A. e Polonio, J. C. (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 275-290.
- Leslie-Pelecky, D. L. e Rieke, R. D. (1996). Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of materials*, 8(8), 1770-1783.
- Li, A., Zhang, H., Zhang, X., Wang, Q., Tian, J., Li, Y. e Li, J. (2010). Rapid separation and immunoassay for low levels of Salmonella in foods using magnetosome-antibody complex and real-time fluorescence quantitative PCR. *Journal of Separation Science*, 33(21), 3437-3443.
- Li, Q., Kartikowati, C. W., Horie, S., Ogi, T., Iwaki, T. e Okuyama, K. (2017). Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. *Scientific reports*, 7(1), 1-7.
- Liao, J. C., Mi, L., Pontrelli, S. e Luo, S. (2016). Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 288-304.
- Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.
- Lin, W., Wang, Y., Li, B. e Pan, Y. (2012). A biogeographic distribution of magnetotactic bacteria influenced by salinity. *The ISME Journal*, 6(2), 475-479.
- Lin, W., Bazylinski, D.A., Xiao, T., Wu, L.F. e Pan, Y. (2014). Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria. *Environmental Microbiology* 16, 2646-2658.
- Lin, W. e Pan, Y. (2015). A putative greigite-type magnetosome gene cluster from the candidate phylum Latescibacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 7(2), 237-242.
- Lin, W., Paterson, G. A., Zhu, Q., Wang, Y., Kopylova e., Li, Y. e Pan, Y. (2017). Origin of microbial biomineralization and magnetotaxis during the Archean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), 2171-2176.
- Lin, W., Zhang, W., Zhao, X., Roberts, A. P., Paterson, G. A., Bazylinski, D. A. e Pan, Y. (2018). Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. *The ISME Journal*, 12(6), 1508-1519.
- Lin, J., Ye, W., Xie, M., Seo, D. H., Luo, J., Wan, Y. e Van der Bruggen, B. (2023). Environmental impacts and remediation of dye-containing wastewater. *Nature Reviews Earth e Environment*, 1-19.

- Liu, J., Ding, Y., Jiang, W., Tian, J., Li, Y e Li, J. (2008). A mutation upstream of an ATPase gene significantly increases magnetosome production in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 551-558.
- Liu, Y., Li, G. R., Guo, F. F., Jiang, W., Li, Y. e Li, L. J. (2010). Large-scale production of magnetosomes by chemostat culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* at high cell density. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1-8.
- Liu, P., Liu, Y., Zhao, X., Roberts, A. P., Zhang, H., Zheng, Y. e Li, J. (2021). Diverse phylogeny and morphology of magnetite biomineralized by magnetotactic cocci. *Environmental microbiology*, 23(2), 1115-1129.
- Lu, Y., Cheng, D., Lu, S., Huang, F. e Li, G. (2014). Preparation of quaternary ammonium salt of chitosan nanoparticles and their textile properties on *Antheraea pernyi* silk modification. *Textile Research Journal*, 84(19), 2115-2124.
- Lüderitz, O. T. T. O., Westphal, O. T. T. O., Staub, A. M. e Nikaido. (2016). Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. *Microbial Toxins*, 4, 145-233.
- Maine e., Thomas, V. J., Bliemel, M., Murira, A. e Utterback, J. (2014). The emergence of the nanobiotechnology industry. *Nature Nanotechnology*, 9(1), 2-5.
- Mandawala, C., Chebbi, I., Durand-Dubief, M., Le Fèvre, R., Hamdous, Y., Guyot, F. e Alphandéry e. (2017). Biocompatible and stable magnetosome minerals coated with poly-l-lysine, citric acid, oleic acid, and carboxy-methyl-dextran for application in the magnetic hyperthermia treatment of tumors. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(36), 7644-7660.
- Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A. e Schwede, T. (2013). IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics*, 29(21), 2722-2728.
- Martín-Hernández, F. e Ferré e. C. (2007). Separation of paramagnetic and ferrimagnetic anisotropies: A review. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 112(B3).
- Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A. T., Murase, Y. e Takeyama, H. (2005). Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Research*, 12(3), 157-166.
- Mériaux, S., Boucher, M., Marty, B., Lalatonne, Y., Prévéral, S., Motte, L. e Ginet, N. (2015). Magnetosomes, biogenic magnetic nanomaterials for brain molecular imaging with 17.2 T MRI scanner. *Advanced Healthcare Materials*, 4(7), 1076-1083.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer e. L. e Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412-D419.
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A. e Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature reviews drug discovery*, 20(2), 101-124.
- Mizrachi, I. (2007). GenBank: the nucleotide sequence database. *The NCBI handbook* [Internet], updated, 22.
- Morillo, V., Abreu, F., Araujo, A. C., de Almeida, L. G. enrich-Prast, A., Farina, M. e Lins, U. (2014). Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the Alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5, 72.
- Murat, D., Quinlan, A., Vali, H. e Komeili, A. (2010). Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(12), 5593-5598.

- Otto, A. e Simoneit, B. R. (2001). Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(20), 3505-3527.
- Petermann, H. e Bleil, U. (1993). Detection of live magnetotactic bacteria in South Atlantic deep-sea sediments. *Earth and Planetary Science Letters*, 117(1-2), 223-228.
- Pettersen, F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng e. C. e Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Pike, C. R., Roberts, A. P., Dekkers, M. J. e Verosub, K. L. (2001). An investigation of multi-domain hysteresis mechanisms using FORC diagrams. *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 126(1-2), 11-25.
- Prates, C. P. T., Pierobon e. C. e Costa, R. C. D. (2007). Formação do mercado de biodiesel no Brasil. *Revista Digital BNDES*.
- Pyenson, H. e Tracy, P. H. (1945). A 1, 10—phenanthroline method for the determination of iron in powdered milk. *Journal of dairy science*, 28(5), 401-412.
- Rahdar, A., Hajinezhad, M. R., Nasri, S., Beyzaei, H., Barani, M. e Trant, J. F. (2020). The synthesis of methotrexate-loaded F127 microemulsions and their in vivo toxicity in a rat model. *Journal of Molecular Liquids*, 313, 113449.
- Rasaili, P., Sharma, N. K. e Bhattarai, A. (2022). Comparison of ferromagnetic materials: Past work, recent trends, and applications. *Condensed Matter*, 7(1), 12.
- Raschdorf, O., Müller, F. D., Pósfai, M., Plitzko, J. M. e Schüler, D. (2013). The magnetosome proteins MamX, MamZ and MamH are involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Molecular microbiology*, 89(5), 872-886.
- Reitner, J., Peckmann, J., Blumenberg, M., Michaelis, W., Reimer, A. e Thiel, V. (2005a). Concretionary methane-seep carbonates and associated microbial communities in Black Sea sediments. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 227(1-3), 18-30.
- Reitner, J., Peckmann, J., Reimer, A., Schumann, G. e Thiel, V. (2005b). Methane-derived carbonate build-ups and associated microbial communities at cold seeps on the lower Crimean shelf (Black Sea). *Facies*, 51(1), 66-79.
- Ricci, J. C. D. e Kirschvink, J. L. (1992). Magnetic domain state and coercivity predictions for biogenic greigite (Fe₃S₄): A comparison of theory with magnetosome observations. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 97(B12), 17309-17315.
- Roselet, F., Vandamme, D., Muylaert, K. E Abreu, P. C. (2019). Harvesting of microalgae for biomass production. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, 211-243.
- Rostkowski, M., Olsson, M. H., Søndergaard, C. R. e Jensen, J. H. (2011). Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. *BMC structural biology*, 11, 1-6.
- Ruff, K. M. e Pappu, R. V. (2021). AlphaFold and implications for intrinsically disordered proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(20), 167208.
- Sadegh, F., Politakos, N., de San Roman e. G., Sanz, O., Modarresi-Alam, A. R. e Tomovska, R. (2021). Toward enhanced catalytic activity of magnetic nanoparticles integrated into 3D reduced graphene oxide for heterogeneous Fenton organic dye degradation. *Scientific Reports*, 11(1), 18343.

- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F. e Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*, 43(W1), W443–W447.
- Salmimies, R., Mannila, M., Kallas, J. e Häkkinen, A. (2011). Acidic dissolution of magnetite: experimental study on the effects of acid concentration and temperature. *Clays and clay minerals*, 59, 136–146.
- Sanner, M. F., Olson, A. J. e Spehner, J. C. (1996). Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers*, 38(3), 305–320.
- Sarikaya, M. (1994). An introduction to biomimetics: a structural viewpoint. *Microscopy Research and Technique*, 27(5), 360–375.
- Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A. e Schüler, D. (2003). Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5779–5790.
- Silva, K. T., Leão, P. E., Abreu, F., López, J. A., Gutarra, M. L., Farina, M. e Lins, U. (2013). Optimization of magnetosome production and growth by the magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1 through a statistics-based experimental design. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2823–2827.
- Simmons, S. L., Sievert, S. M., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A. e Edwards, K. J. (2004). Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6230–6239.
- Singh, N., Jenkins, G. J., Asadi, R. e Doak, S. H. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1(1), 5358.
- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., van Gemerden, H. e Petersen, N. (1993). Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2397–2403.
- Spring, S., Lins, U., Amann, R., Schleifer, K. H., Ferreira, L. C. esquivel, D. M. e Farina, M. (1998). Phylogenetic affiliation and ultrastructure of uncultured magnetic bacteria with unusually large magnetosomes. *Archives of Microbiology*, 169(2), 136–147.
- Stolz, J. F., Chang, S. B. R. e Kirschvink, J. L. (1986). Magnetotactic bacteria and single-domain magnetite in hemipelagic sediments. *Nature*, 321(6073), 849–851.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28(6), 1102–1104.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J. e Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36(6), 1765–1771.
- Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johner, N. e Schwede, T. (2021). ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. *PLoS Computational Biology*, 17(1) e1008667.
- Sun, J. B., Zhao, F., Tang, T., Jiang, W., Tian, J. S., Li, Y. e Li, J. L. (2008). High-yield growth and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 389–397.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T. e Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11(4), 443–451.

- Tanabe, K. e Ohe, J. I. (2021). Spin-Motive Force in Ferromagnetic and Ferrimagnetic Materials. *Journal of the Physical Society of Japan*, 90(8), 081011.
- Taoka, A., Yoshimatsu, K., Kanemori, M. e Fukumori, Y. (2003). Nitrate reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1: purification and sequence analyses. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(3), 197-206.
- Taoka, A., Kiyokawa, A., Uesugi, C., Kikuchi, Y., Oestreicher, Z., Morii, K. e Fukumori, Y. (2017). Tethered magnets are the key to magnetotaxis: direct observations of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 show that MamK distributes magnetosome organelles equally to daughter cells. *MBio*, 8(4).
- Taveira, I. N. (2019). Evolução da magnetotaxia: predição, isolamento e caracterização de bacteriófagos potencialmente transdutores de genes de biomineralização. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Repositório Institucional Pantheon, UFRJ.
- Tiron, O., Bumbac, C., Manea e., Stefanescu, M. e Nita Lazar, M. (2017). Overcoming microalgae harvesting barrier by activated algae granules. *Scientific Reports*, 7(1), 4646.
- Trott, O. e Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.
- Trubitsyn, D., Abreu, F., Ward, F. B., Taylor, T., Hattori, M., Kondo, S. e Bazylinski, D. A. (2016). Draft genome sequence of *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1, a marine vibrioid magnetotactic bacterium. *Genome Announcements*, 4(6), 10-1128.
- Trujillo-Reyes, J., Vilchis-Nestor, A. R., Majumdar, S., Peralta-Videa, J. R. e Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Citric acid modifies surface properties of commercial CeO₂ nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (*Raphanus sativus*) seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, 263, 677-684.
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A. L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N. K. e Whitchurch, C. B. (2016). Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature communications*, 7(1), 11220.
- Uebe, R. e Schüler, D. (2016). Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 621-637.
- Ullrich, S., Kube, M., Schübbe, S., Reinhardt, R. e Schüler, D. (2005). A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7176-7184.
- UniProt Consortium. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*, 43(D1), D204-D212.
- Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B. e Muylaert, K. (2010). Flocculation of microalgae using cationic starch. *Journal of Applied Phycology*, 22, 525-530.
- Vandamme, D., Pontes, S. C. V., Goiris, K., Foubert, I., Pinoy, L. J. J. e Muylaert, K. (2011). Evaluation of electrocoagulation–flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. *Biotechnology and bioengineering*, 108(10), 2320-2329.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G. e Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439-D444.

- Vargas, G., Cypriano, J., Correa, T., Leão, P., Bazylnski, D. A. e Abreu, F. (2018). Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review. *Molecules*, 23(10), 2438.
- Wacker, R., Ceyhan, B., Alhorn, P., Schueler, D., Lang, C. e Niemeyer, C. M. (2007). Magneto immuno-PCR: a novel immunoassay based on biogenic magnetosome nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(2), 391-396.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S. e Higton, G. (2009). *Industrial microbiology: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Wang, Y. X. J., Hussain, S. M. e Krestin, G. P. (2001). Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology*, 11(11), 2319-2331.
- Wang, C. e Lan, C. Q. (2018). Effects of shear stress on microalgae—A review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 986-1002.
- Wang, X., Wang, J. G., Geng, Y. Y., Wang, J. J., Zhang, X. M., Yang, S. S. e Liu, W. Q. (2018). An enhanced anti-tumor effect of apoptin-cccropin B on human hepatoma cells by using bacterial magnetic particle gene delivery system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2), 719-725.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R. e Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.
- Wang, J., Wang, L., Yu, H., Chen, Y., Chen, Q., Zhou, W. e Chen, X. (2016). Recent progress on synthesis, property and application of modified chitosan: an overview. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 333-344.
- Wang, J., Geng, Y., Zhang, Y., Wang, X., Liu, J., Basit, A. e Jiang, W. (2019). Bacterial magnetosomes loaded with doxorubicin and transferrin improve targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Nanotheranostics*, 3(3), 284.
- Wenter, R., Wanner, G., Schüler, D. e Overmann, J. (2009). Ultrastructure, tactic behaviour and potential for sulfate reduction of a novel multicellular magnetotactic prokaryote from North Sea sediments. *Environmental Microbiology*, 11(6), 1493-1505.
- Werckmann, J., Cypriano, J., Lefèvre, C. T., Dembelé, K. ersen, O., Bazylnski, D. A. e Farina, M. (2017). Localized iron accumulation precedes nucleation and growth of magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- Wiebe, R., Gaddy, V. L. e Heins Jr, C. (1933). The solubility of nitrogen in water at 50, 75 and 100 from 25 to 1000 atmospheres. *Journal of the American Chemical Society*, 55(3), 947-953.
- Wijffels, R. H. e Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329(5993), 796-799.
- Wu, X., Tang, H. e Jensen, J. H. (2004). Applications of ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agents in the MR study of animal models. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo*, 17(7), 478-483.
- Wu, L., Gao, B., Zhang, F., Sun, X., Zhang, Y. e Li, Z. (2013). A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Talanta*, 106, 360-366.

- Wu, S., Wang, Q., Wang, X., Guo, R., Zhang, T., Pan, Y. e Li, Y. (2021). MamZ protein plays an essential role in magnetosome maturation process of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39(6), 2082-2096.
- Xiao, L. J., Lei, L. M., Peng, L., Lin, Q. Q. e Naselli-Flores, L. (2021). Iron operates as an important factor promoting year-round diazotrophic cyanobacteria blooms in eutrophic reservoirs in the tropics. *Ecological Indicators*, 125, 107446.
- Xu, Z., Cen, Y. K., Zou, S. P., Xue, Y. P. e Zheng, Y. G. (2020). Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(1), 83-98.
- Yang, C. D., Takeyama, H., Tanaka, T. e Matsunaga, T. (2001). Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations on production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(1), 13-19.
- Železný, J., Wadley, P., Olejník, K., Hoffmann, A. e Ohno, H. (2018). Spin transport and spin torque in antiferromagnetic devices. *Nature Physics*, 14(3), 220-228.
- Zahn, D., Landers, J., Buchwald, J., Diegel, M., Salamon, S., Müller, R. e Dutz, S. (2022). Ferrimagnetic large single domain iron oxide nanoparticles for hyperthermia applications. *Nanomaterials*, 12(3), 343.
- Zhang, H., Zhang, T., Chen, K., Shen, S., Ruan, J. e Kurgan, L. (2009). On the relation between residue flexibility and local solvent accessibility in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 76(3), 617-636.
- Zhang, Y., Zhang, X., Jiang, W., Li, Y. e Li, J. (2011). Semicontinuous culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies. *Applied and environmental microbiology*, 77(17), 5851-5856.
- Zhang, W. Y., Zhou, K., Pan, H. M., Yue, H. D., Jiang, M., Xiao, T. e Wu, L. F. (2012). Two genera of magnetococci with bean-like morphology from intertidal sediments of the Yellow Sea, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5606-5611.
- Zhao, G. e London e. (2009). Strong correlation between statistical transmembrane tendency and experimental hydrophobicity scales for identification of transmembrane helices. *Journal of Membrane Biology*, 229, 165-168.
- Zhu, L. D., Hiltunen, E. e Li, Z. (2019). Using magnetic materials to harvest microalgal biomass: evaluation of harvesting and detachment efficiency. *Environmental Technology*, 40(8), 1006-1012.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. e Van't Riet, K. J. A. E. M. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881.

9. Anexos

Os documentos anexados à Tese de Doutorado do candidato referem-se às publicações relacionadas ao período em que esteve vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos pertencente à Decania do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, período este compreendido entre abril de 2021 e janeiro de 2024.

1. **Taveira, I.***, Bazylnski, D. A., & Abreu, F. (2021). Release the iron: does the infection of magnetotactic bacteria by phages play a role in making iron available in aquatic environments? *Journal of Oceanology and Limnology*, 39, 2063-2069. doi.org/10.1007/s00343-021-1072-3
2. **Taveira, I.***, Correa, T., Presciliano, R., Castro, J., Richard, R., L. Bacellar & Abreu, F. (2022). Processo para recuperação de microalgas utilizando nanopartículas magnéticas de origem bacteriana. Universidade Federal do Rio de Janeiro; Petróleo Brasileiro S.A. BR 10 2022 0243357-3, INPI.
3. **Taveira, I.***, Correa, T., Presciliano, R., Castro, J., Richard, R., L. Bacellar & Abreu, F. (2023). Título: "Sigilo". Universidade Federal do Rio de Janeiro; Petróleo Brasileiro S.A. 18/315,169, United States Patent and Trademark Office, US.
4. **Taveira, I.***, Correa, T., Presciliano, R., Castro, J., Richard, R., L. Bacellar & Abreu, F. (2023). Título: "Sigilo". Universidade Federal do Rio de Janeiro; Petróleo Brasileiro S.A. FR2304690, Institut National de la Propriete Industrielle, France.
5. Cypriano, J., Castro, J., **Taveira, I.***, Correa, T., Acosta-Avalos, D., Abreu, F., & Keim, C. N. (2022). Magnetosome Biomineralization by Magnetotactic Bacteria. In *Mineral Formation by Microorganisms: Concepts and Applications* (pp. 243-281). Cham: Springer International Publishing. doi.org/10.1007/978-3-030-80807-5_7
6. Ferreira, J. G., Ramnarain, V., **Taveira, I.***, de Castro, J., Presciliano, R., Vessalli, B. A., & Abreu, F. (2022). Applications of Biological Magnetic Nanoparticles in Nanobiotechnology. ICNNFC, 133. doi.org/10.11159/icnnfc23.133
7. **Taveira, I.***, Correa, T., Presciliano, R., L. Bacellar & Abreu, F. Cultivo em batelada de *Magnetofaba australis* cepa IT-1 e processo de produção de nanopartículas magnéticas de origem biológica. Patente em depósito (2023). Universidade Federal do Rio de Janeiro; Petróleo Brasileiro S.A.
8. Verdan, M.*, **Taveira, I.***, Lima, F., Abreu, F., & Nico, D. (2023). Drugs and nanoformulations for the management of *Leishmania* infection: a patent and literature

- review (2015-2022). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 33(3), 137-150. doi.org/10.1080/13543776.2023.2201431
9. De Ramos Silva, J., **Taveira, I.***, Correa, T., & Abreu, F. Patente em depósito. (2023). Processo de produção de nanopartículas magnéticas biogênicas e uso das mesmas. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
 10. Correa, T., **Taveira, I.***, & Abreu, F. Em submissão (2023). Bacterial-origin magnetic nanoparticles for decolorization of methyl blue dye.
 11. Oliveira H., Kozlowsky-Suzuki, B., Björn, A., Shakeri-Yekta, S., Caetano, C., Machado, E., Marotta, H., Bassin, J., Oliveira, L., Reis, M., Schultz, M., Mangiavacchi, N., Ferreira-Leitão, V., Fasheun, D., Geraldo, F., **Taveira, I.***, Soares-Alves, I., Castro, J., Durão, J., Guimarães, J., Rocha, M., Tomasini, M., Martins, V., Presciliano, R., Buback, S., Faria, T., Correa, T., Linde, T., Abreu, F., Enrich-Prast, A. Biogas potential of biowaste: a case study in the state of Rio de Janeiro, Brazil (2023). *Renewable Energy*. doi.org/10.1016/j.renene.2023.119751

Release the iron: does the infection of magnetotactic bacteria by phages play a role in making iron available in aquatic environments?

Igor TAVEIRA¹, Dennis A. BAZYLINSKI², Fernanda ABREU^{1, **}

¹ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Geral, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil

² School of Life Sciences, University of Nevada at Las Vegas, Las Vegas 94720, USA

Received Mar. 3, 2021; accepted in principle Apr. 7, 2021; accepted for publication May 19, 2021

© Chinese Society for Oceanology and Limnology, Science Press and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract Magnetotactic bacteria (MTB) are ubiquitous prokaryotes that orient along magnetic field lines due to magnetosomes' biomineralization within the cell. These structures are ferrimagnetic organelles that impart a magnetic moment to the cell. To succeed in producing magnetosomes, MTB accumulate iron in (i) cytoplasm; (ii) magnetosomes; and (iii) nearby the organelle. It has already been estimated that a single MTB has an iron content of 10 to 100-fold higher than *Escherichia coli*. Phages are the most abundant entity in oceans and are known for controlling nutrient flow such as carbon and nitrogen by viral shunt and pump. The current work addresses the putative role of phages that infect MTB on the iron biogeochemical cycle. Can phage infection in MTB hosts cause a biogenic iron fertilization-like event in localized microenvironments? Are phages critical players in driving magnetosome biomineralization genes (BGs) horizontal transfer? Further investigation of those events, including frequency of occurrence, is necessary to fully comprehend MTB's effect on iron cycling in aqueous environments.

Keyword: horizontal gene transfer; iron biogeochemical cycle; magnetotactic bacteria; magnetosome biomineralization genes; phages

1 INTRODUCTION

1.1 Magnetotactic bacteria and iron flux in aquatic environments

Magnetotactic bacteria (MTB) are ubiquitous aquatic Gram-negative prokaryotes that swim through stratified water columns or sediment exhibiting magnetotaxis (Bazylinski and Frankel, 2004). This behavior is known as a guided dislocation by the active flagellar propulsion along Earth's magnetic field (EMF) lines to find or maintain the bacterial position in optimal conditions for survival and growth in environmental gradients (Frankel and Blakemore, 1980). Cell alignment along magnetic field lines occurs because MTB biomineralize ferrimagnetic nanocrystals surrounded by a lipid bilayer, known as magnetosomes. These structures are organized in chain(s), imparting the cell a magnetic moment (Frankel, 1984). The mineral core

of magnetosomes is composed of magnetite (Fe_3O_4) or greigite (Fe_3S_4) (Bazylinski and Frankel, 2004). It is estimated that a single magnetotactic bacterium contains an iron mass of about 0.5×10^{-6} ng (Amor et al., 2020a). This corresponds to a mass 10 to 100 folds higher than that in *Escherichia coli* (Amor et al., 2020a). Some magnetotactic Nitrospirae bacteria biomineralize hundreds of magnetite anisotropic magnetosomes (Amor et al., 2020b). Thus, iron content estimations for these MTB indicate that they can accumulate up to 1 000-fold higher than other microorganisms (Amor et al., 2020b). Although most of the iron content in MTB is located in the mineral core of magnetosomes, iron is also accumulated nearby magnetosomes enmeshed in a magnetosomal matrix as shown in a few recent studies using highly accurate techniques (Werckmann

* Corresponding author: fernandaabreu@micro.ufjf.br

et al., 2017), or in ferrosomes (Grant and Komeili, 2020), besides its accumulation in cytoplasm (Bazylinski and Frankel, 2004; Amor et al., 2020a). Uncultured and cultured MTB accumulate iron ions close to magnetosomes as an event before crystal nucleation (Werckmann et al., 2017). Recently, Cypriano et al. (2020) demonstrated that the mineral core of magnetosomes as well as the lipid membrane of the crystal could resist up to 300 °C heating. Magnetosomes can endure this condition without loss of crystallographic morphology or exhibiting oxidation in the magnetite mineral core. This is a first indication that magnetosomes can endure high temperatures, which naturally occur during sediments diagenesis. In the iron biogeochemical flux context, Lin et al. (2014) showed that lacustrine MTB could provide an annual yield of 2×10^6 kg of magnetite. Following these estimates, Amor et al. (2020a) proposed that the ranges of MTB concentration in sediments were 10^5 – 10^7 cells/cm³ in freshwater, 10^3 – 10^5 cells/cm³ in seawater and 10^4 – 10^7 cells/cm³ in estuaries. Amor et al. (2020a) presented calculations of the global mass of iron in environmental MTB populations (M_{MTB}). The ranges of total flux of iron processed by M_{MTB} were 1.5×10^5 – 4×10^7 kg/a for freshwater, 1×10^5 – 3×10^7 kg/a for the ocean, and 0.3×10^5 – 5×10^8 kg/a for estuaries. The most conservative estimations show that MTB are capable of incorporating $\approx 1\%$ – 500% of the mass of dissolved iron transported by the rivers to the oceans, affecting the biogeochemical iron cycle (Amor et al., 2020a). Thus MTB contribution to the iron flux is significant compared to the contribution of atmospheric dust and hydrothermalism (Fantle and DePaolo, 2004), which is 5×10^8 kg iron/a and 3×10^8 kg iron/a, respectively. It is possible that MTB can act as a sink of iron in aquatic environments, avoiding the accumulation of dissolved iron (Chen et al., 2014), and possibly affecting other microbial community members. Recently, Yuan et al. (2020) presented the first proof of magnetosome magnetite fossils in found in Fe-Mn crusts from the Pacific Ocean and South China Sea. This finding brought up a previously unappreciated source of iron removal in the deep sea (Yuan et al., 2020). Dependent on environmental conditions, magnetofossils can persist in the environment for over billions of years (Chang et al., 1989; Akai et al., 1997). To confirm the actual contribution of magnetofossils in the iron biogeochemical cycle, the specific MTB flux of Fe-Mn needs quantification.

1.2 Iron availability in aquatic environments

Iron is an essential micronutrient for microbial organisms and communities to thrive in any environment. Bioavailability of iron is used as a bottom-up control on primary productivity in much of the modern surface ocean, making characterization of iron speciation of vital importance to understanding the carbon cycle and global climate (Martin et al., 1989). Marine bacteria are known to thrive in an oligotrophic environment, and to survive, natural selection enforced those capable of acquiring iron due to specialized mechanisms. Many are known to produce siderophores, high-affinity iron-chelating compounds (Butler, 2005). This organic complexation of iron prevents it from precipitating and integrates it again on the water column (Kuma et al., 1996). Although the biosynthesis and uptake of siderophores are species-specific, some bacteria evolved to hijack other's siderophores and scavenge the available iron. This competition behavior is possible due to xenosiderophores (Matzanke et al., 1997).

1.3 Phage in oceans

Phages are the most abundant entity on Earth, and their major reservoir is the oceans. In freshwater habitats, it has been estimated that viruses can overcome eukaryotic and bacterial populations up to 10^6 and 10^3 times, respectively (Wetzel, 2001; Kavagutti et al., 2019). Metagenomic analysis of oceans samples around the globe showed the presence of 195 728 viral populations and 90% of them could not be taxonomically annotated (Gregory et al., 2019); see Dion et al. (2020) for detailed information regarding virus diversity in environments. Ocean waters comprise an average of 10^7 – 10^8 phage particles per milliliter (Suttle, 2007). This abundance can decrease with depth and distance from shore. Marine sediments near the coast have the highest phage abundance, where 10^8 – 10^9 phage particles per cubic centimeter can be found (Suttle, 2007). There are estimated to be 10^{31} phage particles around the globe (Brüssow and Hendrix, 2002). Regarding phage distribution, viral abundance decreases further offshore and deeper in the water column (Suttle and Chan, 1994). These trends are also reflected in the virus-bacteria ratio (VBR). Within any environment, the total viral abundance generally varies with the prokaryotic quantity and productivity (e.g., the concentration of chlorophyll *a*) (Cochlan et al., 1993). Many factors are responsible for interfering with viral

abundance in the water column. One particular abiotic factor that plays a crucial role in viral abundance is salinity. For example, VBR in the surface waters of the Pacific and Arctic Oceans are ≈ 40 and ≈ 10 , respectively, while in freshwater lakes, the average VBR is less than 5 (Clasen et al., 2008). An interesting fact is that deep-sea waters from the Northern Atlantic Ocean are natural viral hotspots where VBR often exceeds 100 (Parada et al., 2007). In that way, viral abundance does not decrease in sediments and does not exhibit homogenous distribution patterns. Instead, its abundance is influenced by environmental factors, bacterial populations occurring at microbial hotspots, and the variation of host individual cells' spatial scales (Danovaro et al., 2001). Phages are also catalysts for biogeochemical cycling, as they constitute a significant reservoir of genetic diversity. One example is the viral shunt, which controls the carbon, nitrogen, and other nutrients flow from phytoplankton and bacteria, preventing those nutrients to migrate to higher trophic levels, thus accumulating in the primary production, which is majorly composed of digested or particulate organic matter (D-P-OM). The immediate result is an increase in carbon respiration, which leads to a decrease in the trophic transfer efficiency of nutrients and energy through the marine food web (Suttle, 2005). Finally, they are known for their capacity to transduce genetic information as a modality of horizontal gene transfer (HGT), which is one of the most relevant events that drive microbial diversity (Clokie et al., 2011). Several examples were discovered in the last years with the advance of viral metagenomics. Phages encode auxiliary metabolic genes (AMGs) which in oceans are responsible for a broad range of metabolic pathways such as: (i) antioxidation; (ii) carbon metabolism; (iii) cell defense; (iv) nutrient cycling (e.g. nitrogen, phosphorus and sulfur); (v) fatty acid metabolism; (vi) iron-sulfur clusters; (vii) photosynthesis; (viii) purine and pyrimidine metabolism; and (ix) protein synthesis (Breitbart et al., 2018).

Bartual et al. (2010) demonstrated the presence of seven iron ions in the crystal structure of the bacteriophage T4 tail. The presence of iron ions in the gp37 tail fiber proteins stabilizes the tail conformation and serves as a strategy to infect bacterial cells that intend to capture the iron. The gp37 tail fiber protein competes to the binding site of the siderophore-bound iron receptor (Bartual et al., 2010). This process is a well-characterized protein-protein interaction for non-marine phage-bacteria relations (Braun, 2009).

Another hijacking mechanism is the bacterial membrane piercing by a phage using an iron-loaded spike (Browning et al., 2012). This membrane-attacking apex was described for P2 and phi2 phages. Based on these findings, Bonnain et al. (2016) hypothesized the "Ferrojan Horse Hypothesis", which states that iron content in the phage tail could be used as a hijacked system promoting a new pathway that leads to a viral infection. Considering the limitation of bioavailable iron in oceans and phage's ocean abundance, the authors hypothesize that the phage hijack mechanisms could be of significant importance in marine microbial ecology. Bonnain et al. (2016) estimate that phages could contain up to 7×10^{-13} mol/L of iron, which is equivalent to as much as 70% of the colloidal fraction of organically complexed dissolved iron in the surface ocean.

Therefore, tailed phages that have iron-loaded spikes in their tail structure have high affinity for bacterial siderophore receptors on the cell membrane. This hypothesis suggests that this could be another mechanism for hijacking bacterial receptors thus initiating a new phage infection. Whether the infection outcome results in lytic or lysogenic cycle depends on intrinsic bacterial or extrinsic environmental factors (e.g. quorum sensing) (Erez et al., 2017). The mechanism then proposed by Bonnain et al. (2016) suggests that this mechanism is already well established for horizontal gene transfer in soils, but is not proven in oceans yet. Considering that MTB presents high demand and affinity for iron, as well as accumulate huge amount of this element, this process could possibly be relevant in oceans. However, the role of these phages in magnetotaxis evolution in the Bacteria domain needs further investigation.

2 DISCUSSION

Considering all aspects hence, we propose that the role of MTB in the iron cycle is broader than just capturing iron to form magnetosomes. In the light of the "Ferrojan Horse Hypothesis", MTB infection by phages in the environment might be a frequent event, possibly playing a significant role in making iron available for the local microbial community. Figure 1 explores the possible routes that the phage course of infection might undergo in MTB. Once the phage adsorbed into the cell surface, it starts infection and hijacks cell's enzymatic machinery to make copies of itself (Fig.1, 2nd step). One crucial point might be the nucleic acid packaging into the phage capsid (Fig.1, 3rd step). During this stage of infection, three situations

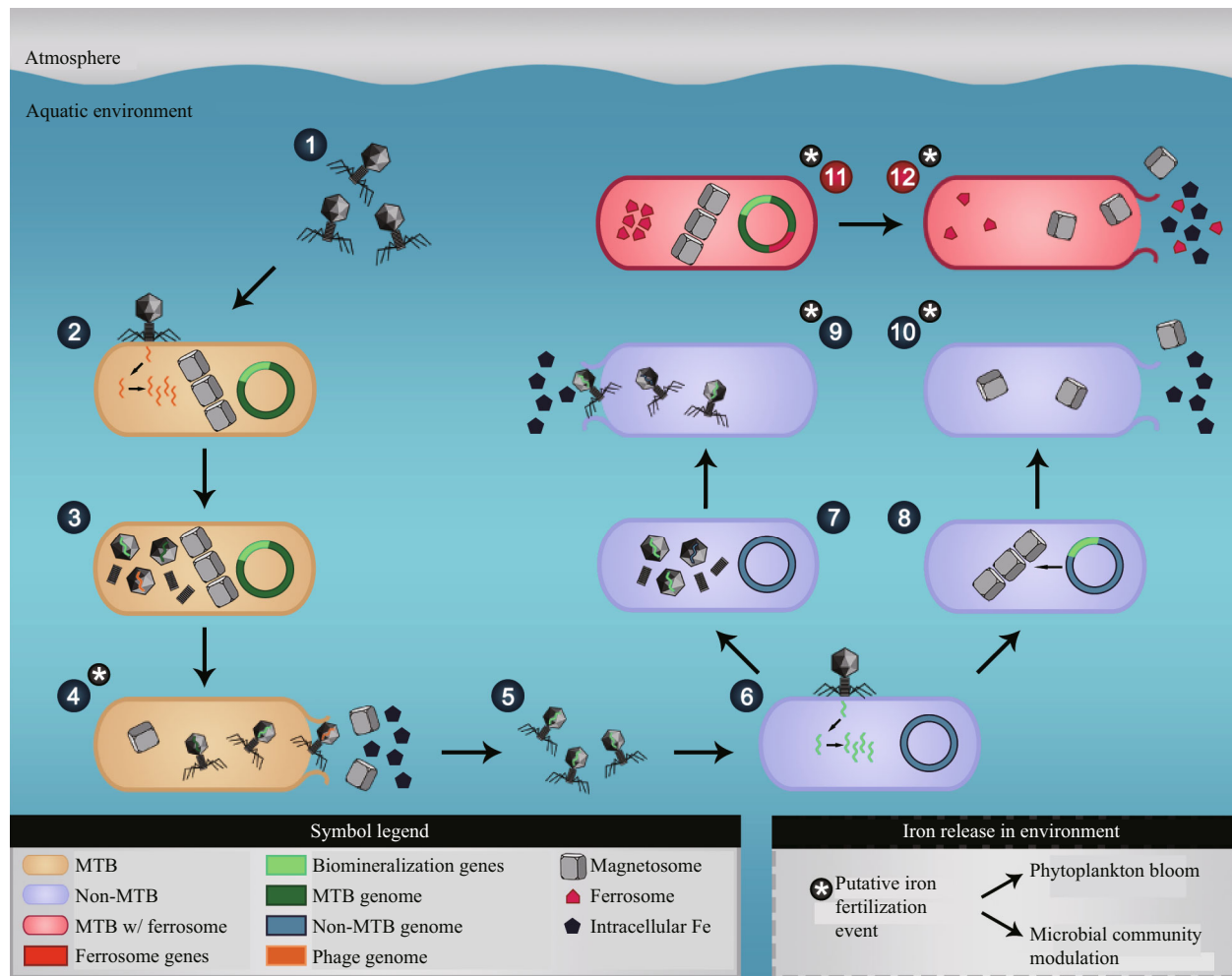


Fig.1 Role of MTB and phages in aquatic environments

1: phage pool in the water column containing viable viral particles; 2: phage infecting a susceptible and permissive MTB (gold rod-shaped). During the course of infection bacteria will synthesize phage's nucleic acid (orange), metabolic, and structure; 3: phage's components ready for self-assembly in cytoplasm. During phage infection the nucleic acid packing is extremely important. Three possible routes are demonstrated: (i) phage genome correctly packed into capsid (orange); (ii) piece of bacterial DNA carried into capsid (dark green); and (iii) piece of biomineralization genes (BGs) carried into phage capsid (light green); 4: phage exit from cell can occur by: (i) lysis liberating a large pool of phages into the environment; and/or (ii) constitutively release by the exocytic route liberating constant amounts of phage over time. In both situations magnetosomes and intracellular Fe can be released into the water column; 5: phages exit the cell and may proceed to search another host; 6: phage containing BGs infect a non magnetotactic bacteria (lilac). Copies of genetic material are replicated in cytoplasm using host enzymatic machinery. If phages lose an essential gene that promotes infection, they can become defective, thus BGs will remain in phage genome; 7: phages can be packed with BGs (light green) or a piece of bacterial genome (blue); 8: infection may undergo lysogeny and BGs might be integrated in the non-MTB genome. During transcription and translation BGs might be able or not to code a complete magnetosome. The presence of the magnetosome into cell's cytoplasm does not make it necessarily magnetotactic; 9: cell's rupture releases newly assembled phages and intracellular Fe. Intracellular Fe thus become available for other microorganisms; 10: cell's death leads to the release of magnetosomes and intracellular Fe; 11: MTB (light red) with ferrosomes (red polygon) and magnetosomes. MTB contains ferrosome genes (red); 12: upon cell's death the cytoplasmic content is release such as cytoplasmic iron, magnetosomes, and ferrosomes. Asterisk: situations where putative iron fertilization-like events can be performed by MTB and non-MTB. MTB can release iron in the environment by cell natural death or due to lysis during a phage infection (4th step). Non-MTB could release iron in the environment due to cell lysis (10th step) or due to lysis during a phage infection (9th step). MTB with ferrosomes contains this additional organelle, which could be an addition of iron release in environment upon cell's death (12th step). These events could release a large pool of cytoplasmic iron or magnetite/greigite, thus promoting the iron fertilization-like phenomenon, which could lead to a local microbial community modulation.

can be foreseen: (i) phage genome can be correctly packed into the capsid; (ii) a piece of the bacterial genome can be mispackaged into the capsid; or (iii) biomineralization genes (BGs) can be mispackaged into the capsid. In all these scenarios, cell death would cause the release of magnetosomes (magnetite or greigite) and intracellular iron from the cell's

cytoplasm to the water column (Fig.1, 4th step).

In general, the relevance of phage's role in the iron cycle has been underestimated in the literature, but new studies are beginning to bring up this issue. To our knowledge, MTB infection by phages has never been detailed analyzed. However, as a single MTB contains $\approx 0.5 \times 10^{-6}$ ng of iron per cell (Amor et al.,

2020a), cell death or lysis by phage infection can release a considerable amount of unmineralized iron in aquatic microenvironments, supposing a localized population of MTB. The outcome in this situation could represent a biogenic iron fertilization-like event, in which iron accumulated by MTB would be released back to the environment and be available for other bacteria. Iron fertilization is a well-known phenomenon to occur in high-nutrient, low-chlorophyll areas that lead to phytoplankton blooms (Martin et al., 1994). Microbial productivity is enhanced within the fertilized area and a succession like the response of the microbial community upon the algal bloom is averted by highly effective grazing (Thiele et al., 2012). Globally, it was estimated that MTB promote a constant iron flux in aquatic environments (Amor et al., 2020a). Therefore, MTB population might directly regulate local microbial communities because of their exceptional ability to capture iron from the environment, which reduces this element's availability, and indirectly regulates other populations, especially the growth of phototrophs if MTB susceptibility to phages is considered. This event is relevant in microbial community modulation, especially in oceans where iron is a limiting nutrient (Martin et al., 1994).

Another interesting outcome of MTB infection by phages is that it possibly allows the dissemination of BGs through horizontal gene transfers (Fig.1). When phage containing BGs infects a bacterium, two possible routes must be considered. The new phage components are synthesized and assembled (Fig.1, 7th step) and then, through cell death or lysis, can release phage particles; or phage may undergo lysogeny and have its genome integrated to bacterial chromosome or plasmid (Fig.1, 8th step). During the lysogenic pathway, BGs might be expressed to synthesize magnetosomes or similar structures, which might not be fully functional, contain crystallographic defects and do not necessarily make the cell magnetotactic. Another possibility could be the increment of BGs content and variability in an infected magnetotactic cell. Yet during activation of the phage lytic cycle would lead to cell death and a large pool of iron might be released (Fig.1, 10th step). Other aspect to be considered is the presence of ferrosomes in some MTBs (Grant and Komeili, 2020) (Fig.1, 11th step). MTB with ferrosomes could release an addition iron load in aquatic environments upon cell's death contributing to the iron fertilization-like phenomenon (Fig.1, 12th step). In conclusion, this

hypothesis might be one of the forces driving magnetotaxis evolution, yet further investigation is required.

3 PERSPECTIVES IN MTB AND PHAGE INTERACTIONS

To understand phage and MTB interactions, a few questions need addressing. The first and most important is to know if all or which MTB is susceptible to phage infections and what is the outcome of that infection. Following that question, it is mandatory to understand the frequency of the infection events in MTB, and what guides the lysis-lysogeny decisions in this group of organisms. The frequency and the outcomes of those events could help answer the accurate role of phage impact in MTB populations and the magnetotaxis evolution.

Despite all those questions that need addressing, there are technical obstacles in executing them. For example, cultivating MTB is not an easy task, as many of them require specific oxygen, sulfur, and other chemical gradients (Bazylinski and Frankel, 2004). These gradients are intrinsic within the water column, but hard to replicate in laboratory conditions. Specific nutrients for MTB growth are not fully known as all representatives from the phyla Nitrospirae and Omnitrophica have not been isolated yet (Lin et al., 2017). The isolation and decontamination process is also laborious, as MTB have to be sorted from environmental contaminants. The process itself is composed of a magnetic concentration in a capillary known as "racetrack" and is responsible for the loss of many MTB morphotypes during the execution (Wolfe et al., 1987).

Another hindrance is phage isolation by plaque assay, because few MTB (e.g. species affiliated to the genus *Magnetospirillum*) are capable of growing in solid media, which makes the natural process of phage isolation and characterization more difficult. Magnetotactic cocci, the most abundant MTB morphotype in environmental samples, have few representatives isolated until this day and their cultivation is even more laborious (Liu et al., 2021). Thus, a series of complex techniques have to be established and adapted in order to properly study phages impact on MTB ecology and evolutions. These facts make this topic very challenging, yet capable of resolving important issues to fully understand the magnetotactic behavior and what shaped its evolution in Bacteria domain.

References

- Akai J, Iida A, Akai K, Chiba A. 1997. Mn and Fe minerals of possible biogenic origin from two Precambrian stromatolites in Western Australia. *The Journal of the Geological Society of Japan*, **103**(5): 484-488, <https://doi.org/10.5575/geosoc.103.484>.
- Amor M, Tharaud M, Gélabert A, Komeili A. 2020a. Single-cell determination of iron content in magnetotactic bacteria: implications for the iron biogeochemical cycle. *Environmental Microbiology*, **22**(3): 823-831, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14708>.
- Amor M, Mathon F P, Monteil C L, Busigny V, Lefevre C T. 2020b. Iron-biomineralizing organelle in magnetotactic bacteria: function, synthesis and preservation in ancient rock samples. *Environmental Microbiology*, **22**(9): 3611-3632, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15098>.
- Bartual S G, Otero J M, Garcia-Doval C, Llamas-Saiz A L, Kahn R, Fox G C, van Raaij M J. 2010. Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(47): 20287-20292, <https://doi.org/10.1073/pnas.1011218107>.
- Bazylinski D A, Frankel R B. 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, **2**(3): 217-230, <https://doi.org/10.1038/nrmicro842>.
- Bonnain C, Breitbart M, Buck K N. 2016. The ferrojan horse hypothesis: iron-virus interactions in the ocean. *Frontiers in Marine Science*, **3**: 82, <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00082>.
- Braun V. 2009. FhuA (TonA), the career of a protein. *Journal of Bacteriology*, **191**(11): 3431-3436, <https://doi.org/10.1128/JB.00106-09>.
- Breitbart M, Bonnain C, Malki K, Sawaya N A. 2018. Phage puppet masters of the marine microbial realm. *Nature Microbiology*, **3**(7): 754-766, <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0166-y>.
- Browning C, Shneider M M, Bowman V D, Schwarzer D, Leiman P G. 2012. Phage pierces the host cell membrane with the iron-loaded spike. *Structure*, **20**(2): 326-339, <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.12.009>.
- Brüssow H, Hendrix R W. 2002. Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, **108**(1): 13-16, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00637-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00637-7).
- Butler A. 2005. Marine siderophores and microbial iron mobilization. *Biometals*, **18**(4): 369-374, <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3711-0>.
- Chang S B R, Stolz J F, Kirschvink J L, Awramik S M. 1989. Biogenic magnetite in stromatolites. II. Occurrence in ancient sedimentary environments. *Precambrian Research*, **43**(4): 305-315, [https://doi.org/10.1016/0301-9268\(89\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0301-9268(89)90062-4).
- Chen A P, Berounsky V M, Chan M K, Blackford M G, Cady C, Moskowitz B M, Kraal P, Lima E A, Kopp R E, Lumpkin G R, Weiss B P, Hesse P, Vella N G F. 2014. Magnetic properties of uncultivated magnetotactic bacteria and their contribution to a stratified estuary iron cycle. *Nature Communications*, **5**(1): 4979, <https://doi.org/10.1038/ncomms5797>.
- Clasen J L, Brigden S M, Payet J P, Suttle C A. 2008. Evidence that viral abundance across oceans and lakes is driven by different biological factors. *Freshwater Biology*, **53**(6): 1090-1100, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01992.x>.
- Clokic M R J, Millard A D, Letarov A V, Heaphy S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, **1**(1): 31-45, <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>.
- Cochlan W P, Wikner J, Steward G F, Smith D C, Azam F. 1993. Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Marine Ecology Progress Series*, **92**(1-2): 77-87, <https://doi.org/10.3354/meps092077>.
- Cypriano J, Bahri M, Dembelé K, Baaziz W, Leão P, Bazylinski D A, Abreu F, Ersen O, Farina M, Werckmann J. 2020. Insight on thermal stability of magnetite magnetosomes: implications for the fossil record and biotechnology. *Scientific Reports*, **10**(1): 6706, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63531-5>.
- Danovaro R, Dell'Anno A, Trucco A, Serresi M, Vanucci S. 2001. Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(3): 1384-1387, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1384-1387.2001>.
- Dion M B, Oechslin F, Moineau S. 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, **18**(3): 125-138, <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>.
- Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, Amitai G, Sorek R. 2017. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*, **541**(7638): 488-493, <https://doi.org/10.1038/nature21049>.
- Fantle M S, DePaolo D J. 2004. Iron isotopic fractionation during continental weathering. *Earth and Planetary Science Letters*, **228**(3-4): 547-562, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2004.10.013>.
- Frankel R B. 1984. Magnetic guidance of organisms. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, **13**: 85-103, <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.13.060184.000505>.
- Frankel R B, Blakemore R P. 1980. Navigational compass in magnetic bacteria. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **15-18**: 1562-1564, [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(80\)90409-6](https://doi.org/10.1016/0304-8853(80)90409-6).
- Grant C R, Komeili A. 2020. Ferrosomes are iron storage organelles formed by broadly conserved gene clusters in bacteria and archaea. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.01.10.902569>.
- Gregory A C, Zayed A A, Conceição-Neto N, Temperton B, Bolduc B, Alberti A, Ardyna M, Arkhipova K, Carmichael M, Cruaud C, Dimier C, Domínguez-Huerta G, Ferland J, Kandels S, Liu Y X, Marec C, Pesant S, Picheral M, Sunagawa S, Wincker P, Sullivan M B. 2019. Marine DNA viral macro- and microdiversity from pole to pole. *Cell*, **177**(5): 1109-1123, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.040>.

- Kavagutti V S, Andrei A Ş, Mehrshad M, Salcher M M, Ghai R. 2019. Phage-centric ecological interactions in aquatic ecosystems revealed through ultra-deep metagenomics. *Microbiome*, **7**(1): 135, <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0752-0>.
- Kuma K, Nishioka J, Matsunaga K. 1996. Controls on iron (III) hydroxide solubility in seawater: the influence of pH and natural organic chelators. *Limnology and Oceanography*, **41**(3): 396-407, <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.3.0396>.
- Lin W, Bazylnski D A, Xiao T, Wu L F, Pan Y X. 2014. Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria. *Environmental Microbiology*, **16**(9): 2646-2658, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12313>.
- Lin W, Pan Y X, Bazylnski D A. 2017. Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. *Environmental Microbiology Reports*, **9**(4): 345-356, <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12550>.
- Liu P Y, Liu Y, Zhao X, Roberts A P, Zhang H, Zheng Y, Wang F X, Wang L S, Menguy N, Pan Y X, Li J H. 2021. Diverse phylogeny and morphology of magnetite biomineralized by magnetotactic cocci. *Environmental Microbiology*, **23**(2): 1115-1129, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15254>.
- Martin J H, Coale K H, Johnson K S, Fitzwater S E, Gordon R M, Tanner S J, Hunter C N, Elrod V A, Nowicki J L, Coley T L, Barber R T, Lindley S, Watson A J, van Scoy K, Law C S, Liddicoat M I, Ling R, Stanton T, Stockel J, Collins C, Anderson A, Bidigare R, Ondrusek M, Latasa M, Millero F J, Lee K, Yao W, Zhang J Z, Friederich G, Sakamoto C, Chavez F, Buck K, Kolber Z, Greene R, Falkowski P, Chisholm S W, Hoge F, Swift R, Yungel J, Turner S, Nightingale P, Hatton A, Liss P, Tindale N W. 1994. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, **371**(6493): 123-129, <https://doi.org/10.1038/371123a0>.
- Martin P, Rosenberg N J, McKenney M S. 1989. Sensitivity of evapotranspiration in a wheat field, a forest, and a grassland to changes in climate and direct effects of carbon dioxide. *Climatic Change*, **14**(2): 117-151, <https://doi.org/10.1007/BF00142724>.
- Matzanke B F, Böhnke R, Möllmann U, Reissbrodt R, Schünemann V, Trautwein A X. 1997. Iron uptake and intracellular metal transfer in mycobacteria mediated by xenosiderophores. *Biometals*, **10**(3): 193-203, <https://doi.org/10.1023/A:1018351728081>.
- Parada V, Sintés E, van Aken H M, Weinbauer M G, Herndl G J. 2007. Viral abundance, decay, and diversity in the meso- and bathypelagic waters of the North Atlantic. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(14): 4429-4438, <https://doi.org/10.1128/AEM.00029-07>.
- Suttle C A. 2005. Viruses in the sea. *Nature*, **437**(7057): 356-361, <https://doi.org/10.1038/nature04160>.
- Suttle C A. 2007. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, **5**(10): 801-812, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>.
- Suttle C A, Chan A M. 1994. Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(9): 3167-3174, <https://doi.org/10.1128/aem.60.9.3167-3174.1994>.
- Thiele S, Fuchs B M, Ramaiah N, Amann R. 2012. Microbial community response during the iron fertilization experiment LOHAFEX. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(24): 8803-8812, <https://doi.org/10.1128/AEM.01814-12>.
- Werckmann J, Cypriano J, Lefèvre C T, Dembelé K, Ersen O, Bazylnski D A, Lins U, Farina M. 2017. Localized iron accumulation precedes nucleation and growth of magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Scientific Reports*, **7**(1): 8291, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08994-9>.
- Wetzel R G. 2001. *Freshwater Ecosystems*. 2nd edn. Elsevier, Amsterdam. p.560-569, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00060-5>.
- Wolfe R S, Thauer R K, Pfennig N. 1987. A 'capillary racetrack' method for isolation of magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **3**(1): 31-35, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02335.x>.
- Yuan W, Zhou H Y, Yang Z Y, Hein J R, Yang Q H. 2020. Magnetite magnetofossils record biogeochemical remanent magnetization in hydrogenetic ferromanganese crusts. *Geology*, **48**(3): 298-302, <https://doi.org/10.1130/G46881.1>.

Magnetosome Biomineralization by Magnetotactic Bacteria



Jefferson Cypriano, Júlia Castro, Igor Taveira, Tarcisio Correa, Daniel Acosta-Avalos, Fernanda Abreu, Marcos Farina, and Carolina N. Keim

Contents

1	Introduction	244
2	Magnetotaxis at a Glance	244
3	Magnetosomes Are Tailored for Magnetotaxis	245
4	The Magnetosome as an Organelle	246
5	Minerals in the Magnetosomes	248
5.1	Precursor Phases for Magnetite in Magnetotactic Bacteria	249
5.2	Morphology and Crystalline Habits of Magnetite Magnetosomes	250
5.3	Defects and Twin Crystals in Magnetite Magnetosomes	252
5.4	Chemical Impurities in Magnetite Magnetosomes	254
5.5	Greigite Magnetosomes	255
6	Characterization of the Magnetic Properties of Magnetosomes	258
7	Genes and Proteins Associated with the Magnetosomes	264
8	Evolution of Magnetosome Biomineralization	269
9	Conclusions	270
	References	270

Abstract The magnetosome is an organelle consisting of a magnetic nanocrystal within a biological membrane vesicle. Magnetosomes impart a magnetic moment to the whole microorganism while it swims by flagellar propulsion, leading to alignment of the swimming trajectory to the Earth's magnetic field lines. Thus, the main physiological role of magnetosomes is magnetotaxis, which can be defined as a magnetic-driven behavior working in concert with other sensory systems of the microorganism in order to guide it to suitable microenvironments. Each magnetic

J. Cypriano · J. Castro · I. Taveira · T. Correa · F. Abreu · C. N. Keim (✉)
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
e-mail: cnkeim@micro.ufrj.br

D. Acosta-Avalos
Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, CBPF, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

M. Farina
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

nanocrystal in magnetosomes is a single-domain particle of magnetite (Fe_3O_4) or greigite (Fe_3S_4), which is biomineralized through precisely controlled processes leading to species-specific size, shape, and location within the cell. Several proteins are involved in magnetosome biomineralization, which includes iron uptake, redox conversion of iron, control on crystal size and shape, and arrangement of magnetosomes in chains properly located within the cell. Magnetosomes occur in microorganisms belonging to several groups scattered through the bacteria domain, as well as in a few protists and microalgae. Biomineralization of magnetosomes is a growing field of research, encompassing fields as diverse as biochemistry and molecular biology, microbial ecology, sediment magnetization, materials science, and biotechnology.

1 Introduction

Magnetotactic bacteria are identified by their passive response to magnetic fields, i.e., they orient their swimming direction to the direction of the local magnetic field lines. This behavior is due to magnetosomes, organelles composed of a magnetic crystal enveloped by a biological membrane (Blakemore 1975). Magnetosomes impart the whole cell a magnetic moment, which interacts with the local magnetic field, generating a magnetic torque that align the cell magnetic moment with the local magnetic field while the bacteria swim propelled by flagella (Klump and Faivre 2016). Mature magnetosomes contain either magnetite (Fe_3O_4) or greigite (Fe_3S_4) crystals, both ferrimagnetic minerals (Frankel et al. 1979; Farina et al. 1990; Mann et al. 1990; Pósfai et al. 1998a, b). These magnetic organelles are usually arranged in chains or rows in the cytoplasm, with the magnetic moments aligned parallel to the chain or row axes (Kasama et al. 2006a, b; Pósfai et al. 2006a). Figure 1 shows one example of magnetotactic bacterium and its magnetite magnetosomes.

2 Magnetotaxis at a Glance

Magnetotactic bacteria are either microaerophiles or anaerobes thriving in the chemocline of aquatic environments (Frankel et al. 1997; Frankel et al. 2006; Abreu et al. 2007; Lefèvre et al. 2011a; Lefèvre et al. 2014; Keim et al. 2018). The chemocline comprises gradients of O_2 and other chemicals such as H_2S , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , and Fe^{2+} , which are generated by the metabolic activities of several distinct guilds of microorganisms in stagnant water or sediments. To form chemical gradients, the rate of consumption must be higher than diffusion rates. In stratified lakes and sediments, the chemical gradients comprising the chemocline form roughly horizontal layers, parallel to the water or the sediment surfaces, respectively. The chemocline is not static; it changes through space and time due to oxygen production by photosynthesis following day/night cycles, bioturbation, and other

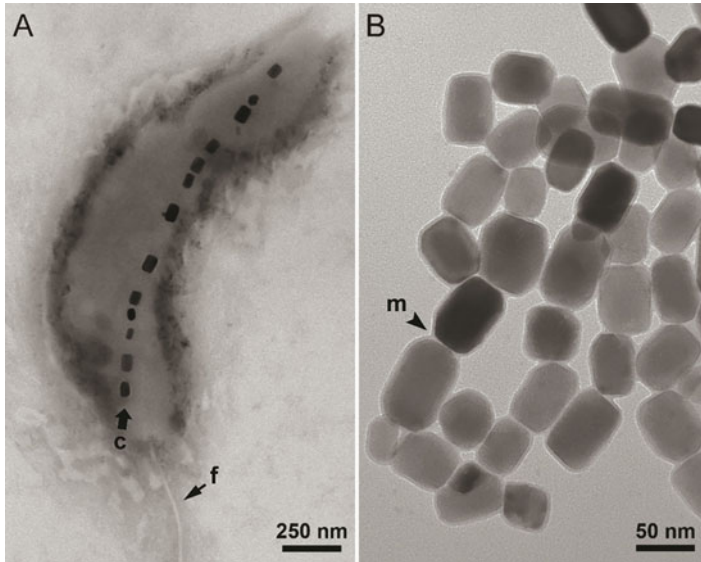


Fig. 1 Magnetotactic bacteria and the magnetosomes. (a) Typical cell of the alphaproteobacteria *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1T showing a single chain of prismatic magnetite magnetosomes (c; thick arrow) aligned along the cell's major axis and a flagellum (f; thin arrow). (b) Magnetosomes purified after cells lysis. Note the presence of the membrane, which is seen as a translucent coating around each magnetosome (m; arrowhead). Transmission electron microscopy, 80 kV

factors (Nealson 1997; Brune et al. 2000; Fenchel 2002). In such environments, magnetotaxis provides a vertical guideline to swimming microorganisms, facilitating migration through the chemocline, and turning a tridimensional search for optimal conditions into a unidimensional one—since most magnetotactic bacteria are two-way swimmers, they can swim back and forth until finding their preferred conditions within the chemocline (Frankel et al. 1997; Frankel et al. 2006; Lefèvre et al. 2014; Keim et al. 2018). While the cell's magnetic moment provides an axis for swimming, sensory systems for other taxis, such as aero-, photo-, and chemotaxis, drive the choice of the swimming direction (Frankel et al. 1997; Frankel et al. 2006; Wenter et al. 2009; Almeida et al. 2013; Lefèvre et al. 2014; Keim et al. 2018).

3 Magnetosomes Are Tailored for Magnetotaxis

As mentioned above, magnetosomes contain magnetic nanoparticles of magnetite or greigite. Their shape and size determine their magnetic properties. In bulk magnetic materials, magnetic orientation is not evenly distributed throughout the whole material but divided into regions with homogeneous magnetic moment orientations, which mutually cancel each other. Those regions are known as magnetic domains

and show all the atomic magnetic spins parallel to each other, resulting in a greater resultant magnetic moment. The division in magnetic domains is necessary to decrease the magnetic energy of the bulk material. However, if the magnet size decreases, the number of magnetic domains also decreases. Thus, there is a limit in size for any given material to maintain a uniform and stable internal magnetization. When that limit is reached, only one domain is found in the particle, and in this condition the particle is known as a magnetic single domain (SD) (Bean and Livingston 1959).

The size of SD nanoparticles is also limited at the small end size. Particles below a limit size are known as superparamagnetic (SPM), and are recognized because the magnetic moment flips constantly among the stable orientations in the crystalline easy axes separated by the magnetocrystalline anisotropy energy barrier. The thermal energy provides the energy for the magnetic moment to flip the barrier (Bean and Livingston 1959). A SPM particle does not present a stable magnetic moment in the absence of a magnetic field, in contrast to SD nanoparticles, which present a stable magnetic moment.

The size range for SD particles depends on the magnetic material, the magnetocrystalline anisotropy energy, and the shape anisotropy, which depends on its geometrical shape (Butler and Banerjee 1975). For parallelepiped-shaped particles of magnetite, the range of length sizes for SD nanoparticles depends on the axial ratio (width/length). For cubic particles (width = length), the limits to be SD are $50 \text{ nm} < \text{length} < 75 \text{ nm}$. If the axial ratio is 0.8, then $50 \text{ nm} < \text{length} < 110 \text{ nm}$, and if the axial ratio is 0.4, then $50 \text{ nm} < \text{length} < 420 \text{ nm}$. There is a known diagram that consists of the graph of the length versus the axial ratio to show if the magnetite nanoparticles are in the SD region (Butler and Banerjee 1975).

Table 1 shows the values of length and axial ratio for several magnetotactic bacteria, and Fig. 2 shows the corresponding diagram with those data. Most magnetite magnetosomes lie within the single magnetic domain range, suggesting that their main function in the cell is magnetotaxis (Frankel et al. 1979; Dunin-Borkowski et al. 1998; McCartney et al. 2001; Kasama et al. 2006a, b). It is common to observe particles at the beginning or the end of magnetosome chains that are in the size range for SPM magnetite (length < 50 nm). Probably those particles are still growing to reach the SD size range and inherit the magnetic polarity from neighbor crystals in the chain (Kirschvink 1992).

4 The Magnetosome as an Organelle

A recent definition of organelle defines “an organelle as a subcellular structure containing a proteomically distinct interior and a defined boundary layer (whether lipid membrane, lipid monolayer, proteinaceous or phase-defined) that affects cellular physiology” (Greening and Lithgow 2020). According to this definition, magnetosomes can be considered organelles, as (1) they are membrane-coated,

Table 1 Magnetite length and width. Data obtained from magnetosomes of diverse magnetotactic bacteria. Axial ratio = width/length

Microorganism	Length (nm)	Width (nm)	Axial ratio	References
IT-1	90.4 ± 19.6	–	0.74	Araujo et al. (2016)
MWB-1	116	40	0.34	Lin et al. (2012)
ARB-1	82 ± 23	49 ± 15	0.59	Cox et al. (2002)
QHL	101 ± 24	83 ± 21	0.83 ± 0.09	Pan et al. (2008)
MO-1	64 ± 20	57 ± 17	0.89	Lefèvre et al. (2009)
BMC disordered	102 ± 20	60 ± 9	0.6	Zhang et al. (2012)
BMC chains	125 ± 32	99 ± 25	0.8	Zhang et al. (2012)
GRS-1	54.6 ± 4.8	-	0.85	Taoka et al. (2014)
<i>M. magneticum</i>	42	-	0.87	Devouard et al. (1998)
MV-1	48	-	0.68	Devouard et al. (1998)
MC-2	100	-	0.87	Devouard et al. (1998)
UR-1	77.4 ± 11.8	46.2 ± 7.9	0.64 ± 0.09	Koziaeva et al. (2019)
MC-1 acetate grown	83 ± 14	78 ± 11	0.94	Bazylnski et al. (2013a)
MC-1 sulfide grown	72 ± 11	70 ± 13	0.97	Bazylnski et al. (2013a)
Antarctic UII two chains	117 ± 31	67 ± 18	0.6 ± 0.1	Abreu et al. (2016)
Antarctic UII four chains	102 ± 22	72 ± 19	0.7 ± 0.09	Abreu et al. (2016)
Antarctic UII disorganized	83 ± 13	46 ± 7	0.6 ± 0.06	Abreu et al. (2016)
Antarctic Machu Picchu	121 ± 29	59 ± 15	0.5 ± 0.08	Abreu et al. (2016)
Itaipu 3	120	70	0.56	Spring et al. (1998)
Itaipu 4	135	105	0.77	Spring et al. (1998)
Flagellated protist	276.6 ± 61.3	52.7 ± 5.1	0.2 ± 0.04	Leão et al. (2020)
Algae	140	48	0.34	Torres de Araujo et al. (1986)

(2) their content is distinct from the cytoplasm, and (3) they have at least one physiological function (magnetotaxis).

Magnetosomes are the structural signature of magnetotactic bacteria and a few magnetotactic protists (Fig. 1a). Magnetite crystals in the magnetosomes have many features that differ them from magnetic nanocrystals produced by both chemical processes (Vargas et al. 2018) and dissimilatory iron-reducing bacteria (Moskowitz et al. 1989; Sparks et al. 1990). The strict genetic control over biomineralization in magnetosomes allows the identification of relevant phylogenetic characteristics for species description based on the shape, size, composition, and organization within the cell (Table 2; Pósfai et al. 2013).

The lipid composition of the magnetosome and cytoplasmic membranes of *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 is remarkably similar, showing predominance of the unsaturated fatty acids C16:1 and C18:1 (Nakamura et al. 1991;

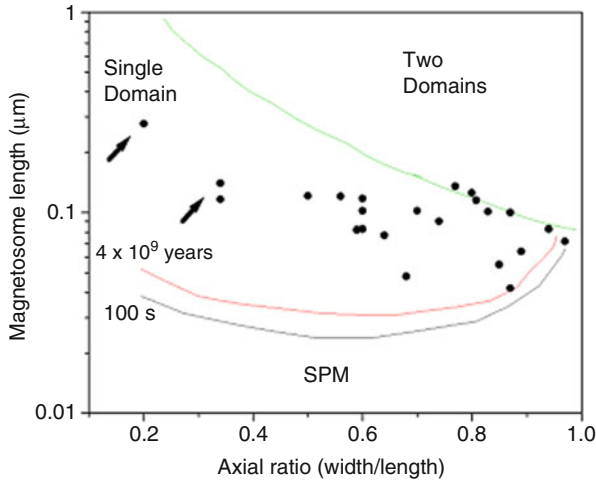


Fig. 2 Diagram of length versus width/length ratio of magnetite magnetosomes, containing the data shown in Table 1. Most magnetosomes lie within the stable single magnetic domain range. Arrows point to data from two magnetotactic eukaryotes, a ciliate (arrow at the left) and an algae (arrow at the right). The lines separate the plot in regions corresponding to two magnetic domain particles, single magnetic domain particles, or superparamagnetic (SPM) particles. The two inferior lines mark two distinct time boundaries for the magnetic moment to flip the magnetocrystalline energy barrier, i.e., the boundaries between permanently magnetic and superparamagnetic

Tanaka et al. 2006). On the other hand, the magnetosome membrane is the site of several proteins specific of magnetosomes, which participate in crucial steps of magnetosome synthesis, such as nucleation and maturation of magnetosomes' mineral core (Uebe and Schüler 2016). After magnetosome maturation, the magnetosome membrane continues to envelop the magnetic crystal. At this stage, the most relevant role of the magnetosome membrane is related to the organization of these structures in one or multiple chain(s) within the cell, maintaining each magnetosome in a defined position along a cytoskeleton-like filament (Komeili et al. 2006).

5 Minerals in the Magnetosomes

As afore mentioned, mature magnetosomes contain either magnetite (Fe_3O_4) or greigite (Fe_3S_4) in their inorganic core (Frankel et al. 1979; Farina et al. 1990; Mann et al. 1990; Kasama et al. 2006a; Pósfai et al. 2006a). Most magnetotactic microorganisms in nature produce magnetite, as well as most cultivated strains. Currently, a single cultivated bacterium produces both magnetite and greigite (Lefèvre et al. 2011a; Descamps et al. 2017). Thus, there is a much larger body of knowledge on magnetite biomineralization in magnetotactic bacteria as compared to greigite.

Table 2 Examples of correlation of magnetite magnetosome features, bacterial morphology, and phylogenetic affiliation

Magnetosome shape	Magnetosome organization	Cellular morphology	Phylogenetic affiliation	References
Cubo-octahedra	Single chain	Spirilla	(MS-1, MSR-1, AMB-1) <i>Alphaproteobacteria</i>	Devouard et al. (1998), Faivre et al. (2008), Li et al. (2009)
Elongated octahedra	Single chain	Cocci, rod-shaped	(IT-1) <i>Ca.</i> Etaproteobacteria (SS-5) <i>Gammaproteobacteria</i>	Lefèvre et al. (2012), Morillo et al. (2014), Araujo et al. (2016)
Prismatic (truncated hexa-octahedra/octahedral shape)	Single chain Double chains	Vibrio, cocci, ovoid	MC-1 <i>Ca.</i> Etaproteobacteria, (MV-1, MO-1) <i>Alphaproteobacteria</i> , (<i>CLV-1</i>) <i>Betaproteobacteria</i>	Meldrum et al. (1993a, b), Devouard et al. (1998), Clemett et al. (2002), Lefèvre et al. (2009), Zhang et al. (2012), Bazylinski et al. (2013b), Abreu et al. (2018)
Anisotropic (bullet, tooth, arrowhead, irregular shape)	Multiple chains Single chain	Ovoid cells Vibrio, flagellated protist	(LO-1, HSMV-1) <i>Nitrospirae</i> , (RS-1) <i>Deltaproteobacteria</i> (SKK-01) <i>Ommitrophica</i>	Pósfai et al. (2006b), Lefèvre et al. (2010, 2011b), Kolinko et al. (2012), Leão et al. (2020)

5.1 Precursor Phases for Magnetite in Magnetotactic Bacteria

The magnetite magnetosome synthesis pathway is still not deeply understood. It starts at the cytoplasmic membrane with the inward invagination to form a vesicle. After that, with the availability of iron, nucleation and growth of the crystal begins within the vesicle (Komeili et al. 2004; Komeili 2006; Tanaka et al. 2006). The oxygen atoms within magnetite are derived from water instead of molecular O₂ (Mandernack et al. 1999). Magnetotactic bacteria incorporate the iron from the environment, by diffusion as Fe(II), and/or by energy-dependent mechanisms as Fe(III). Interestingly, *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 seem to prefer Fe (III), whereas *Ms. magneticum* AMB-1 prefer Fe(II) (Schüler and Baeuerlein 1996; Schüler and Baeuerlein 1998; Amor et al. 2018). Several iron uptake systems are found in magnetotactic bacteria, such as siderophores (Calugay et al. 2003), copper-dependent iron uptake system (Dubbels et al. 2004), and ferrous iron transport protein B gene (*feoB1*) (Rong et al. 2008). The iron incorporated remains stored in Fe(III) form, establishing an iron pool in the periplasm and/or in cytoplasm, which would be reduced to Fe²⁺ and transported toward magnetosomes (Amor et al. 2018). Recently, it was detected a pool of noncrystalline Fe(II) species in the cytoplasm and

associated with magnetosomes in *Ms. magneticum* strain AMB-1 (Amor et al. 2020a). Werckmann et al. (2017) showed an iron pool inside magnetosomes, coating the magnetite crystals, in four distinct species of magnetotactic bacteria. They hypothesized that such pool could represent an iron source for magnetite biomineralization (Werckmann et al. 2017).

A series of studies suggested that ferrihydrite, hematite, or high-spin reduced iron complexes could be magnetite precursors after iron transport through the cell outer membrane (Frankel et al. 1979; Frankel et al. 1983; Faivre et al. 2007; Staniland et al. 2007; Fdez-Gubieda et al. 2013; Nagard et al. 2019; Uebe et al. 2019). Baumgartner and colleagues proposed a mechanism involving phase transformations from disordered phosphate-rich iron hydroxide into magnetite via oxidized iron (oxyhydr)oxide intermediates ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). In this approach, a ferritin-like precursor was localized outside the magnetosome vesicle, while the ferrihydrite-like intermediate was found inside (Baumgartner et al. 2013). Thus, phases corresponding to ferritin-like structures were evidenced in *Magnetospirillum* species strains AMB-1, MSR-1, and MS-1 (Baumgartner et al. 2013; Fdez-Gubieda et al. 2013). However, a recent study using Mössbauer spectroscopy and a *Ms. gryphiswaldense* strain MSR-1 mutant, with deletions in ferritin-like genes, proposed that ferritin and ferritin-like proteins are not required for magnetosome formation in this strain, being more related to oxidative stress resistance (Uebe et al. 2019). In this approach, the mutant strain synthesized magnetite in the same manner as the wild type. Therefore, this finding has raised a new discussion about the biomineralization pathway in magnetotactic bacteria. It is important to point out that most studies still focus on the genus *Magnetospirillum* as a biomineralization model. The mutant specimens obtained by genetic system manipulation of the magnetosome gene cluster are useful tools to understand the process. Nevertheless, the isolation, cultivation, and genetic manipulation of magnetotactic bacteria belonging to other taxa are essential to improve the knowledge on magnetosome biomineralization.

5.2 *Morphology and Crystalline Habits of Magnetite Magnetosomes*

The habits or morphologies of magnetite crystals that occur in magnetosomes vary significantly. However, it is widely accepted that the crystal shape is consistent for a given bacterial species or strain (Bazylinski et al. 1994; Bazylinski and Frankel 2004). Three general crystal morphology classes have been reported for magnetite magnetosomes. The first type is cubic or cubo-octahedral (Fig. 3a) (Balkwill et al. 1980; Mann et al. 1990). This is the simplest type of magnetosome crystal and shows the isotropic cubic geometry characteristic of abiogenic magnetite. The second type is elongated hexa- or octahedral, frequently labeled as “prismatic” (Fig. 3b). This is a type of crystal that assumes the shape of truncated hexagonal prisms, and has been reported in a variety of magnetotactic cells (Lins and Farina 1998; Kopp and

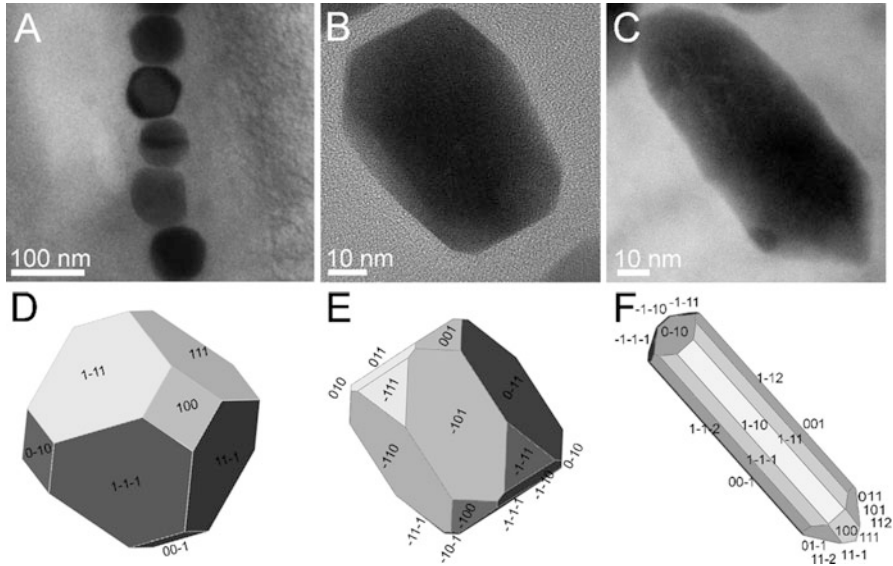


Fig. 3 Conventional and high-resolution transmission electron microscopy images of three general classes of crystal shapes and respective idealized models. (a) Chain of cubo-octahedral crystals. (b) Elongated prismatic, hexa-, or octahedral crystals. (c) An example of anisotropic crystal. (d–f) Idealized models for the crystals in (a), (b), and (c), respectively

Kirschvink 2008). The third type comprises more elongated crystals classified as anisotropic, showing tooth, arrowhead, or bullet shapes, with the wider end usually showing larger faces (Fig. 3c). Curved shapes are rather common (Taylor and Barry 2004; Lefèvre et al. 2011b).

The magnetite has a cubic face-centered, inverse-spinel crystalline structure (spatial group $Fd\bar{3}m$) (Palache et al. 1944; Faivre and Zuddas 2006). The idealized morphologies of the magnetosomes are based on combinations of faces $\{100\}$ (of cube), $\{110\}$ (of dodecahedron), and $\{111\}$ (of octahedron), with all possible distortions and elongations (Devouard et al. 1998; Pósfai et al. 2006a; Faivre and Schüler 2008). Most elongated magnetite crystals show elongation direction parallel to the $[111]$ direction, which corresponds to the easy axis of magnetization (Mann et al. 1984; Sparks et al. 1990; Taylor et al. 2001; Lins et al. 2005; Pósfai et al. 2006a). The exceptions are mainly the anisotropic crystals, which are elongated along the $[112]$ (Mann et al. 1987; Taylor et al. 2001), $[100]$, (Taylor et al. 2001; Lins et al. 2007; Lefèvre et al. 2011b), or $[110]$ directions (Taylor and Barry 2004; Lefèvre et al. 2011b).

5.3 Defects and Twin Crystals in Magnetite Magnetosomes

The magnetite crystals in magnetosomes generally display high structural perfection (Meldrum et al. 1993a, b; Bazylinski et al. 1994). However, some defects and twin crystals are observed in both cultured and uncultured bacterial strains (Devouard et al. 1998; Taylor et al. 2001; Zhang et al. 2017; Abreu et al. 2018). The frequency of these crystalline defects varies from strain to strain, and the proportion of twins appears to be significantly higher in some cells compared to others within the same strain. Besides twinned crystals (Fig. 4), there are defects classified as stacking faults, edge dislocations, irregular edges (Fig. 5), and subgrain boundaries (Taylor et al. 2001; Moisesescu et al. 2014).

Whereas in some morphotypes of magnetotactic bacteria about 1% of all magnetite crystals are twins, in others this value reaches approximately 70% (Pósfai et al. 2006a). These imperfections usually occur perpendicular to the chain axis, and the

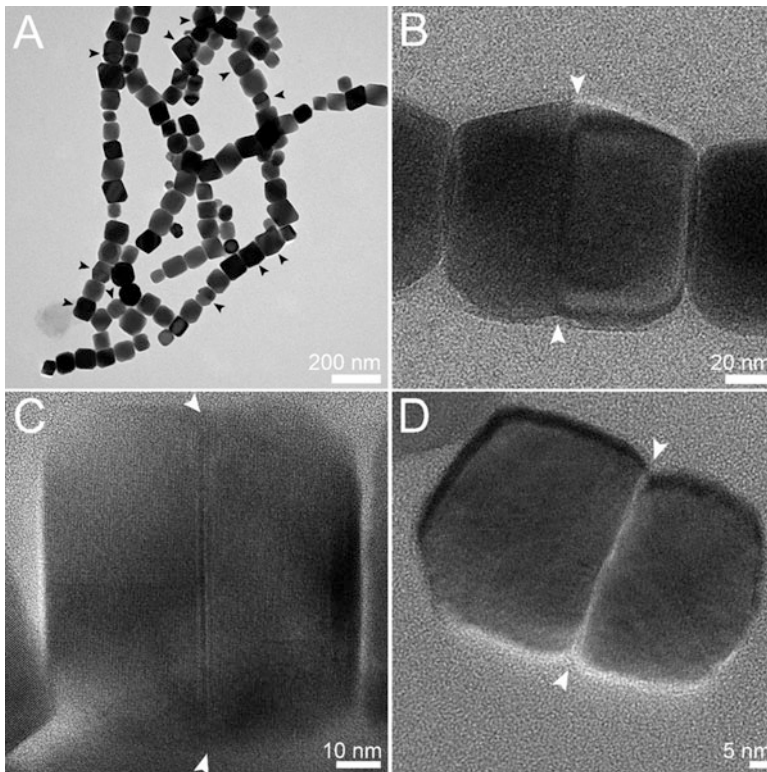


Fig. 4 Transmission electron microscopy (TEM) and high-resolution TEM (HRTEM) images of *Magnetofaba australis* strain IT-1 twin crystals. (a) Purified magnetosome chains displaying several twins (arrowheads). (b–d) HRTEM images showing twin crystals in detail. The crystals exhibit twin contact planes (arrowheads), all parallel to the (111) planes. Note reentrant angles at the twinning planes (white arrowheads)

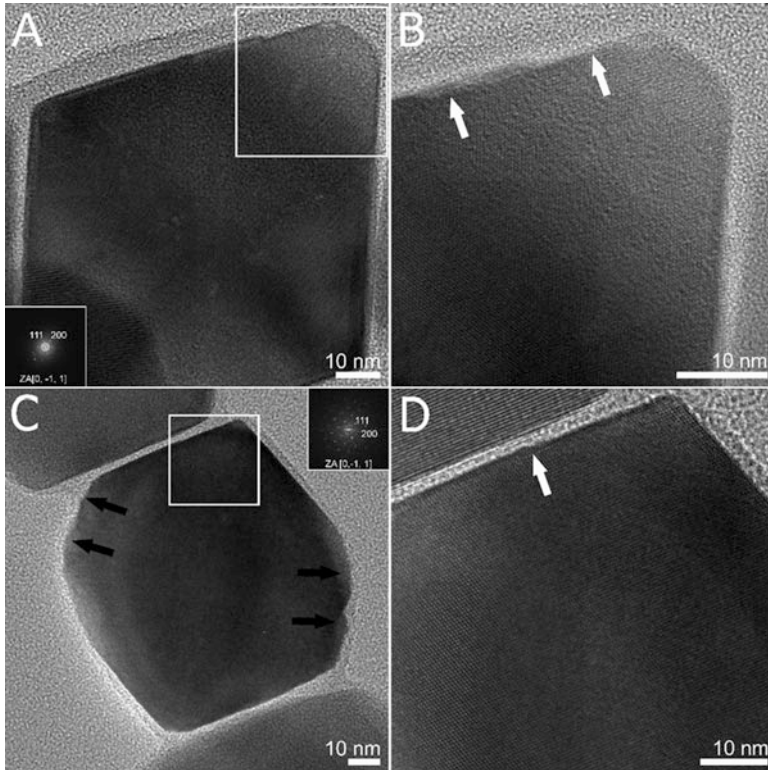


Fig. 5 High-resolution transmission electron microscopy images of cubo-octahedral magnetite from *Magnetofaba australis* strain IT-1 magnetosomes showing some crystalline defects. **(a)** Crystal containing some edge dislocation failures (square). Insert shows the fast Fourier transform (FFT) of the image. **(b)** Higher magnification of the area enclosed in the square in **(a)** showing in detail some edge dislocation failures (arrows). **(c)** Crystal with irregular edges (black arrows) and edge dislocation (square). Insert shows the FFT obtained from this image. **(d)** Higher magnification of the area enclosed in the square in **(c)** showing one edge dislocation (arrow)

twins are rotated by 180° around the $[111]$ direction. Thus, they are not expected to affect the crystal magnetic induction direction, since the magnetite easy axis of magnetization is in the $[111]$ direction (Dunlop and Özdemir 1997; Devouard et al. 1998). Other crystallographic defects, however, can reduce the particle's magnetic moment (Moiescu et al. 2014). It is unknown which physical or chemical parameters govern the formation of twinned crystals in magnetosomes. It is recognized that culture media variations result in different proportions of defective crystals (Moiescu et al. 2014). For example, increasing O_2 concentrations led to enlarged numbers of twin crystals in *Ms. magneticum* AMB-1 (Li and Pan 2012). Changes in some genes can increase twin crystals and defect frequency, for example, the deletion of the *mamZ* in strain AMB-1 mutants promoted reduction in crystal size and an increase in twinning frequency (Raschdorf et al. 2013).

5.4 Chemical Impurities in Magnetite Magnetosomes

In general, magnetite in magnetosomes presents a high chemical purity degree (Amor et al. 2015), as compared to nonbiological natural magnetite, which usually contain trace elements at concentrations >100 ppm, such as Al, Co, Cr, Cu, Ga, Mg, Mn, Ni, Si, Sn, Ti, V, W, and Zn (Clark and Evans 1997; Boutroy et al. 2014). Such chemical purity could indicate a high level of genetic control on magnetite biomineralization in magnetosomes and has been suggested as a biomarker (Thomas-Keppta et al. 2000; Amor et al. 2015). Careful analysis showed that, in fact, most elements were at least 100 times less concentrated in magnetite produced by *Ms. magneticum* AMB-1 than in synthetic crystals. Only Sn and Mo were more concentrated in magnetite magnetosomes than in synthetic magnetite, whereas Ba, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, La, Li, Mn, Ni, Pb, Sr, Ti, Y, and Zn were depleted in magnetosomes. Cs, As, and Ca apparently behave similarly in both biogenic and abiogenic magnetites (Amor et al. 2015).

Supplementation of culture media or microcosms where magnetotactic bacteria grew led to magnetite magnetosomes containing around 1 atom% Co (Staniland et al. 2008; Tanaka et al. 2012; Muñoz et al. 2020), Mn (Keim et al. 2009; Tanaka et al. 2012; Prozorov et al. 2014; Marcano et al. 2020; Muñoz et al. 2020), or Zn (Muñoz et al. 2020) in the crystalline structure of magnetite. Some metals, for example, Ni, Ru, V, and Zn, were added to the culture media at concentrations comparable to those of iron but were not incorporated into the *Magnetospirillum* spp. magnetosome crystal lattice (Tanaka et al. 2012; Prozorov et al. 2014). On the other hand, Sm and Cu were found in presumably amorphous phases associated with magnetosome surfaces (Shimoshige et al. 2017; Muñoz et al. 2020). The thin layer of amorphous Sm_2O_3 layer deposited on the surfaces of magnetosomes led to decrease in saturation magnetization and increase in coercivity, even though the magnetosome cores remained pure magnetite, as confirmed by the Verwey transition temperature, which remained at about 100K (Shimoshige et al. 2017).

Depending on concentration, trace elements such as Co, La, Mn, Ni, Ti, and Zn can change the magnetic properties of synthetic magnetite, including coercivity, the saturation magnetization, and the Verwey transition temperature (Kakol et al. 1994; Saravanan et al. 2002; Lelis et al. 2003; Zélis et al. 2013; Rayan et al. 2019). The saturation magnetization is related to the magnetic moment of magnetosomes and, consequently, to magnetotaxis efficiency. In *Magnetospirillum* spp. magnetosomes, incorporation of Co and Mn to surface layers or the bulk crystal led to changes in coercivity (Staniland et al. 2008; Tanaka et al. 2012; Marcano et al. 2020), whereas Cu and Mn incorporated to the crystal lattice reduced the Verwey transition temperature (Tanaka et al. 2012; Prozorov et al. 2014; Marcano et al. 2020), and both Mn and Sm, either in the bulk crystal or in an surface phase, changed the saturation magnetization (Prozorov et al. 2014; Shimoshige et al. 2017; Marcano et al. 2020).

At concentrations approaching those of iron in the growth media (in the $\mu\text{M/L}$ range), Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) led to decreased cell growth and magnetosome numbers per cell in *Magnetospirillum* spp. (Tanaka et al. 2012;

Muñoz et al. 2020). Muñoz et al. (2020) showed that *Ms. gryphiswaldense* MSR-1 containing magnetosomes were more resistant to Co, Cu, Mn, Ni, and Zn as compared to the same strain that did not produce magnetosomes due to the lack of iron in the growth medium. In their experiments, only Co, Mn, and Zn were incorporated into the crystalline core of magnetosomes, and in small amounts relatively to other cellular structures, indicating that metal incorporation is not the main pathway by which magnetosomes decrease metal toxicity (Muñoz et al. 2020). Maybe metal toxicity increased due to the lack of iron in the growth medium of bacteria without magnetosomes, leading to increased metal/Fe ratios and increased transportation of these metals into the cytoplasm. Accordingly, Tanaka et al. (2012) proposed that Co and Mn entered passively in the cells of *Ms. magneticum* AMB-1 and were inadvertently incorporated in the magnetosome magnetite core.

5.5 Greigite Magnetosomes

Greigite (Fe_3S_4) magnetosomes were described in the 1990s in magnetotactic bacteria from marine environments, estuaries, salt marshes (Farina et al. 1990; Mann et al. 1990; Heywood et al. 1990; Heywood et al. 1991), and, more recently, freshwater (Lefèvre et al. 2011a; Wang et al. 2013). Until this moment, all known greigite-producing microorganisms described are affiliated with the *Deltaproteobacteria* class (DeLong et al. 1993; Abreu et al. 2007; Descamps et al. 2017), although genomic analysis indicates that some members of *Latescibacteria* and *Planctomycetes* may synthesize greigite magnetosomes (Lin and Pan 2014; Lin et al. 2017; Lin et al. 2018). Two general greigite-forming well-studied morphotypes of magnetotactic microorganisms are described: the magnetotactic multicellular prokaryotes (MMPs) and rod-shaped bacteria (Pósfai et al. 1998a, b; Abreu et al. 2007; Lefèvre et al. 2011a; Kolinko et al. 2014). Figure 6 shows some cells of an uncultured MMP and their greigite magnetosomes displaying the characteristic irregular morphologies and blotchy diffraction contrast previously described (Pósfai et al. 1998a).

Greigite is ferrimagnetic and isostructural to magnetite. Currently, it is not known if the greigite easy axis for magnetization is the [111] or the [100] crystallographic direction (Muxworthy et al. 2013; Winklhofer et al. 2014). The size range of greigite crystals from magnetotactic microorganisms lies within the theoretical single-domain size range (Muxworthy et al. 2013). High-resolution images of the crystalline structure of several magnetosomes suggested that greigite crystals form through a series of solid-state transformations, which converts sphalerite-type cubic FeS to mackinawite (tetragonal FeS), and then to greigite (cubic Fe_3S_4). Despite the fact that cubic FeS and mackinawite magnetosomes are not permanent magnets, they are arranged in chains, and their long axis is aligned along the chain axis before they become ferrimagnetic greigite, indicating strict biological control on both chain arrangement and crystallographic alignment relative to the chain axis (Pósfai et al. 1998a, b).

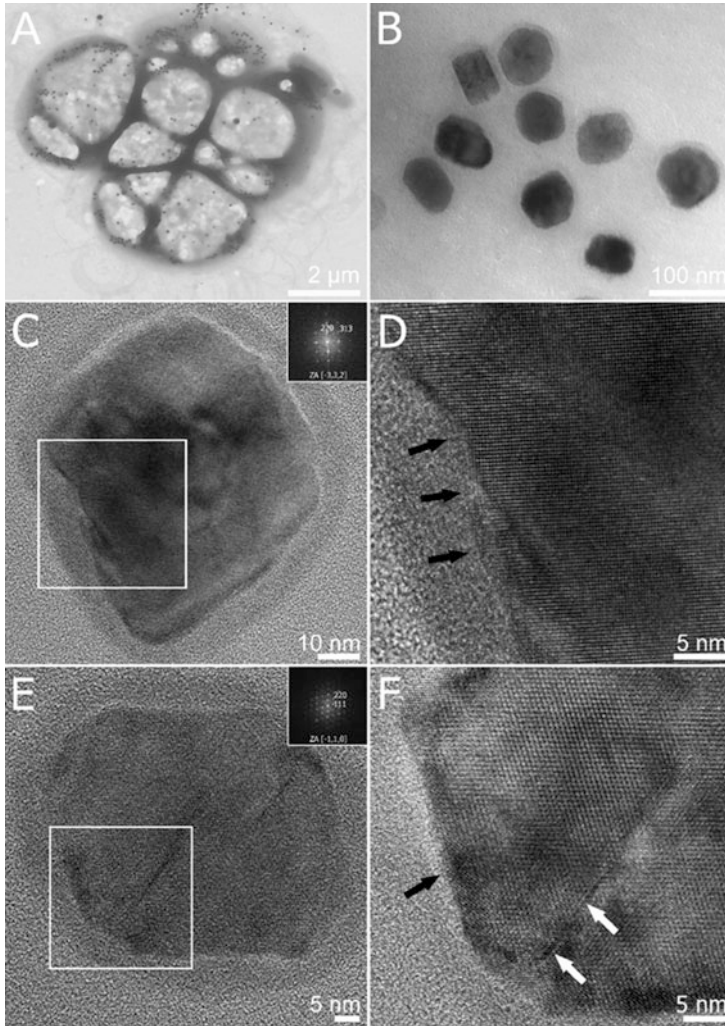


Fig. 6 Uncultured magnetotactic multicellular prokaryote (MMP) and its iron sulfide magnetosomes. **(a–b)** Conventional transmission electron microscopy, whole mounts; **(c–f)** high-resolution transmission electron microscopy. **(a)** Some cells showing magnetosomes (small dark dots), flagella (bottom right), and lipid globules (translucent structures). **(b)** Isolated greigite magnetosomes coated by amorphous layers. Note the irregular shapes, the rough borders, and the blotchy appearance of the crystals. **(c)** Crystal with irregular edges. Insert shows the fast Fourier transform (FFT) of the image. The square delimits the area enlarged in **(d)**. **(d)** Higher magnification of the area enclosed in the square in **(c)** showing in detail some irregular edges (black arrows). **(e)** Crystal with irregular edges and stacking faults (square). Insert shows the FFT of the image. **(f)** Higher magnification of the area in the square in **(e)** showing stacking faults (white arrows) and irregular edge contour (black arrow). Note that the frequency of defects in greigite crystals is noticeably higher than usually found in magnetite magnetosomes

An iron-oxygen amorphous phase is frequently observed coating iron sulfide magnetosomes (Farina et al. 1990; Lins and Farina 2001; Kasama et al. 2006b). Kasama et al. (2006b) suggested that this Fe-O amorphous phase results from sample oxidation, but we have observed them also in freshly prepared samples. Lins and Farina (2001) proposed that this Fe-O amorphous phase could be a sink for excess iron atoms resulting from solid-state transformation of mackinawite (FeS) to greigite (Fe₃S₄). During transformation, part of the Fe(II) in mackinawite must be oxidized to Fe(III), and, if the sulfur framework is maintained, some iron atoms must leave the crystal lattice (Lins and Farina 2001).

Two habits of greigite magnetosomes have been identified: (1) equidimensional cubo-octahedral and (2) cubic to parallelepipedal crystals elongated along the [100] direction (Heywood et al. 1990; Heywood et al. 1991; Pósfai et al. 1998a). On the other hand, Kasama et al. (2006b) found variable morphologies and no preferred crystallographic orientation in the greigite crystals of magnetotactic rods. No preferred orientation relative to the chain axis was observed, and magnetosome chains contained some apparently nonmagnetic, misaligned crystals. These rods probably have less control over the crystal biomineralization and chain organization as compared to microorganisms producing magnetite crystals (Kasama et al. 2006b).

High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) analysis identified structural defects like stacking faults, dislocations, undefined faces, thickness variations, and planar defects along (222) planes, along with surface steps and irregularities (Heywood et al. 1991; Pósfai et al. 1998a, b, 2006a; Kasama et al. 2006b). Figure 6 shows greigite crystals containing irregular edges and stacking faults. The defects in the crystalline core are assumed to be associated with the conversion of mackinawite into greigite and would demonstrate the reduced biological control on this step (Pósfai et al. 1998a, b, 2006a; Kasama et al. 2006b). Some greigite magnetosomes appear to be formed by smaller crystals aggregated in the same crystallographic orientation, as a single-crystal-like aggregate (Kasama et al. 2006b; Pósfai et al. 2006a), whereas spinel-type twins are not observed (Pósfai et al. 2006a).

The chemical purity varies depending on the environment where the microorganisms grew, with some magnetosome crystals showing up to ~10 atom% Cu homogeneously distributed in the crystal lattice (Bazylinski et al. 1993; Pósfai et al. 1998a). The precursor phases mackinawite and cubic FeS were also shown to contain Cu, indicating that Cu would be incorporated in the initial cubic FeS crystals and maintained through the solid-state transformation series to mackinawite and greigite (Pósfai et al. 1998a).

Some magnetotactic bacteria are also capable of synthesizing both greigite and magnetite. In these cells, magnetite crystals are always anisotropic, arrowhead, or bullet-shaped (Kasama et al. 2006b; Lins et al. 2007; Lefèvre et al. 2011a; Wang et al. 2013; Descamps et al. 2017). An example of bacteria producing magnetosomes of both greigite and magnetite is *Desulfamplus magnetovallimortis* strain BW-1, the only greigite-producing strain of magnetotactic bacteria available in pure culture (Lefèvre et al. 2011a; Descamps et al. 2017).

6 Characterization of the Magnetic Properties of Magnetosomes

To study the magnetic properties of magnetosomes, the use of magnetometry techniques sensitive enough to detect the magnetization of magnetic nanoparticles is common. Typical studies by magnetometry include the analysis of the curve of magnetization, or magnetic moment, as a function of the magnetic field (Fig. 7). This curve presents hysteresis behavior for single-domain magnetic nanoparticles or for superparamagnetic nanoparticles in a blocked state. It can be considered as a magnetic memory: in the initial state, the magnetization is almost zero for $B = 0$; the magnetization starts to grow with the magnetic field until it reaches a saturation value (the saturation magnetization, M_S). When the magnetic field decreases, the magnetization does not follow the same path to return from saturation, and when $B = 0$, the magnetization gets a value different from zero (the remanence magnetization, M_r). The curve continues to decrease for negative magnetic field values, and the magnetization will be null for a specific magnetic field: the coercive magnetic field (B_C). All these parameters are indicated in Fig. 7.

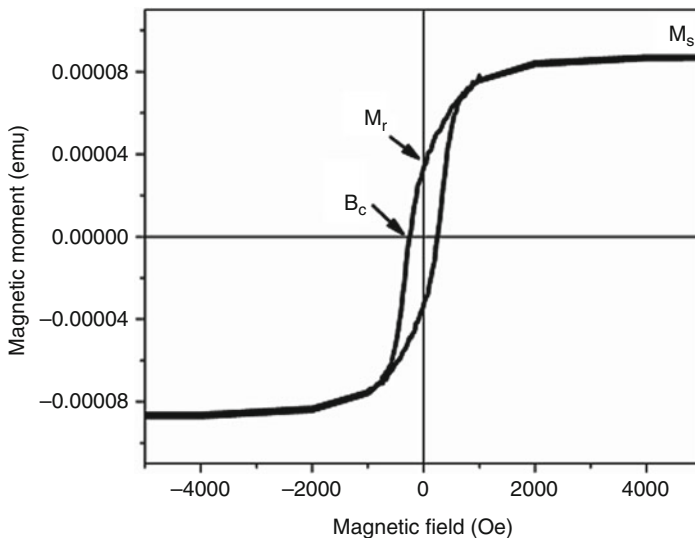


Fig. 7 Magnetic moment versus magnetic field curve showing hysteresis in a sample of magnetosomes from *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1. They were obtained from old culture samples supplied by Dr. Ulysses Lins in 2015. Magnetic nanoparticles were dried on Teflon tape, and the magnetization curve was measured in a SQUID magnetometer (Quantum Design) at ambient temperature. The saturation magnetization (M_S), the remanence magnetization (M_r), and the coercivity or coercive field (B_C) are indicated in the figure. The units of the magnetic moment are electromagnetic units ($1 \text{ emu} = 10^{-3} \text{ A m}^2$), and those of the magnetic field are oersted ($1 \text{ Oe} = 10^{-4} \text{ T}$)

Table 3 Magnetic parameters obtained from the magnetization versus magnetic field curves of magnetosomes

Microorganism strain	M_s	M_r	B_c	B_{cr}	M_r/M_s	B_{cr}/B_c	T_v	References
MSR-1	60	10	7.5	–	0.17	-	-	Han et al. (2008)
MSR-1	0.3	0.11	9.6	15.2	0.37	1.58	-	Zhang and Pan (2018)
MS-1	0.9	-	23	-	0.5	-	97	Yiriletu and Iwasa (2015)
M.g WT	-	-	16.9	18.9	0.54	1.12	102	Katzmann et al. (2013)
A. mag	-	-	26.7	27.6	0.53	1.02	-	Moskowitz et al. (1988)
MV-1a	-	-	-	-	0.49	1.1	110	Moskowitz et al. (1993)
MS-1	-	-	-	-	0.44	1.1	101	Moskowitz et al. (1993)
IT-1	-	-	12.1	26.3	0.18	2.2	110	Personal communication
MV-1b	-	-	25	33.3	0.38	1.3	95	Personal communication
MYR-1	-	-	54.5	61	0.59	1.12	100	Li et al. (2010)
AMB-1	-	-	14.2	18.2	0.45	1.28	104	Li et al. (2009)
RS-1 fum	0.0176	-	46.7	-	0.44	-	86	Pósfai et al. (2006b)
RS-1 sulf	0.0363	-	35.8	-	0.34	-	86	Pósfai et al. (2006b)

M_s = saturation magnetization (Am^2/kg); M_r = remanence magnetization (Am^2/kg); B_c = coercive field (mT); B_{cr} = remanent coercive field (mT); T_v = Verwey temperature (K); data for *Magnetofaba australis* strain IT-1 and *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1 (MV-1b) were obtained by D.A.-A. using a SQUID magnetometer (Quantum Design)

Another characteristic parameter is the remanent coercive field B_{CR} . For randomly oriented noninteracting single-domain particles with uniaxial anisotropy, it is expected that $M_r/M_s \approx 0.5$. Table 3 shows the values for M_r/M_s and B_{CR}/B_C published in the literature for several magnetotactic bacteria. Using those parameters, the Day plot (Kumari et al. 2015) can be constructed to catalog the magnetic material analyzed as magnetic stable single domains, pseudo-single domains, and superparamagnetic or multi-domains. Figure 8 shows the Day plot for the values in Table 3. It is interesting to observe that those magnetic parameters permit the identification of magnetic single domains without the direct observation of the magnetic nanoparticles.

In addition, it is possible to identify the presence of magnetite using magnetic measurements due to a low-temperature phase transition known as the Verwey transition at approximately 124 K (Bohra et al. 2019). The measurement of zero field cooling (ZFC) and field cooling (FC) thermoremanence or magnetization permits the identification of this transition. Table 3 shows the values of the temperature of the Verwey transition in some samples of magnetotactic bacteria, and Fig. 9 shows an example of ZFC and FC magnetization. For magnetotactic bacteria and

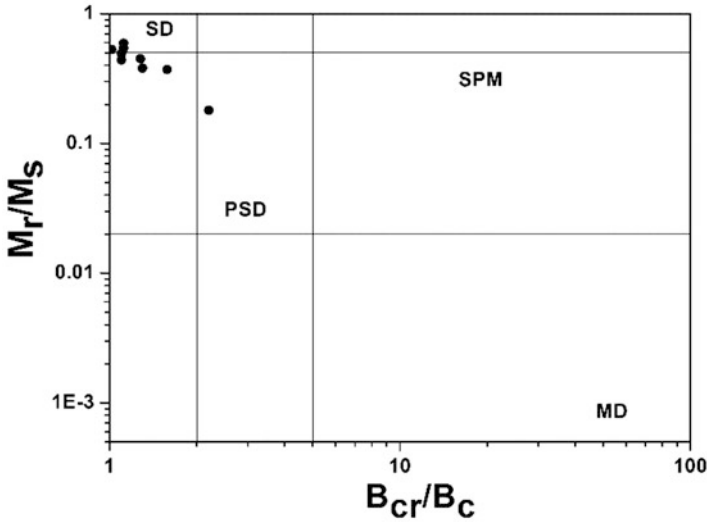


Fig. 8 Day plot (M_r/M_s versus B_{cr}/B_c). Data for different magnetotactic bacteria were obtained in the literature and compiled in Table 3. All points fell the SD region, except for one point in PSD region. This point corresponds to data from *Magnetofaba australis* IT-1. As data were obtained from old samples, the magnetosome chains may be disorganized, leading to magnetic PSD behavior. SD single domain, SPM superparamagnetic, PSD pseudo-single domain, MD multi-domain

magnetosomes, the Verwey transition is at approximately 100 K, which is a different value than that temperature measured for bulk magnetite. It has been proposed that a Verwey transition at approximately 100 K is an indication of the presence of magnetosomes in the measured samples (Pan et al. 2005).

Another feature that permits the identification of magnetosomes by magnetic techniques is their organization in chains. Even when the cell envelope of the magnetotactic microorganisms is lysed, the chain organization can be maintained for long time periods. This organization can be observed as a unique feature in first-order reversal curves (FORC) obtained from the hysteresis curves from magnetosomes, and also in ferromagnetic resonance (FMR) spectra.

A FORC is obtained by saturating a sample in a field B_{SAT} , then decreasing the field until a reversal field B_A , and finally sweeping the field back to B_{SAT} in a series of regular steps B_B . This process is repeated for several values of B_A producing several FORCs and yielding the magnetization as a function of B_A and B_B : $M(B_A, B_B)$. The FORC distribution $\rho(B_A, B_B)$ is defined as the mixed partial derivative of $M(B_A, B_B)$, and a FORC diagram is a contour plot of $\rho(B_A, B_B)$ mapped to a different set of coordinates: $B_C = (B_B - B_A)/2$ and $B_U = (B_B + B_A)/2$, where B_C is the distribution of coercive fields, also called switching fields, and B_U is the distribution of interaction fields. Figure 10 shows a typical FORC diagram of magnetosome chains, showing a narrow distribution in the vertical B_U axis and elongation along the horizontal B_C axis and indicating single-domain particles in a chain arrangement

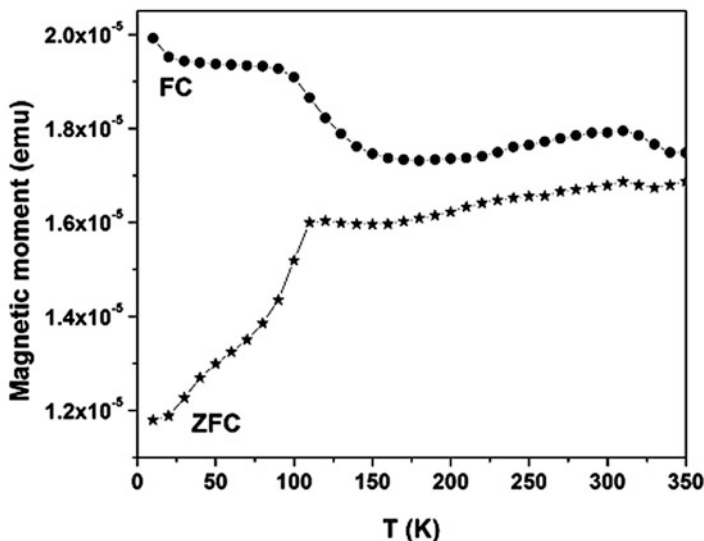


Fig. 9 Zero field cooling (ZFC) and field cooling (FC) magnetization curves as a function of the absolute temperature. Note the changes in the curves at about 100K. Magnetosomes were obtained from an old sample of a culture of *Magnetofaba australis* strain IT-1 supplied by Dr. Ulysses Lins in 2015. Magnetic nanoparticles were dried on Teflon tape, and the magnetization curves were measured in a SQUID magnetometer (*Quantum Design*). For the ZFC curve, the samples were cooled from 300 K to 5 K at zero magnetic field; at 5 K, a magnetic field of 100 Oe was applied, and the magnetization was measured while the temperature increased up to 350 K. For the FC curve, the sample was cooled in the presence of an applied magnetic field of 100 Oe

with weak interactions (Jovane et al. 2012; Katzmann et al. 2013; Zhang and Pan 2018). The mutant Δ mamJ of *M. gryphiswaldense* is not able to organize the magnetosomes in chains, and they organize in clumps, producing a FORC diagram different from that in Fig. 10, showing a region composed of two peaks symmetrical in the B_U axis that has been previously described in pseudo-single-domain PSD magnetite particles (Katzmann et al. 2013).

Ferromagnetic resonance (FMR) is the application of the electron paramagnetic resonance (EPR) technique on permanent magnetic materials. FMR spectroscopy detects coupled spins of a magnetically ordered phase. In that case, the applied magnetic field excites the precession of the total magnetic moment around a local magnetic field. Eventually, the magnetization aligns to the magnetic field direction because of the relaxation process. The resonance condition is fulfilled when the frequency of the microwave radiation coincides with the precessional frequency, and then the microwave power is absorbed by the magnetic material (Faivre et al. 2010). The resonance condition can be written as

$$hf = g_{\text{eff}}\mu_B \cdot B_{\text{App}}$$

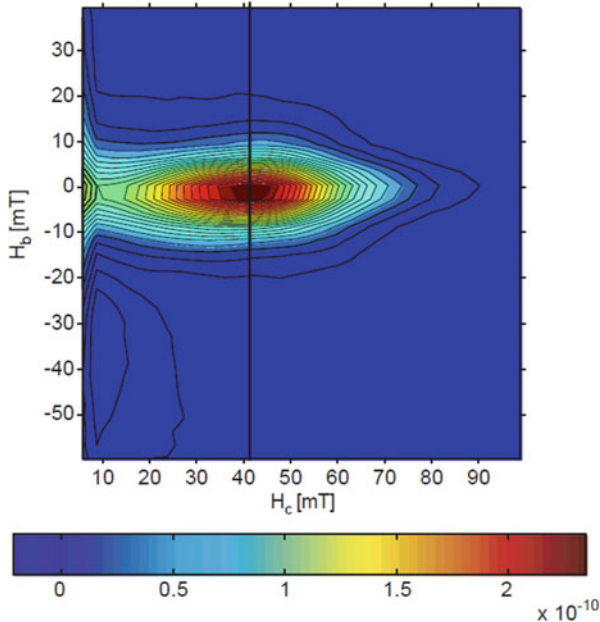


Fig. 10 FORC diagram of magnetotactic bacteria samples collected from Lake Chiemsee, Germany, composed mainly of wild-type cocci, the rod *Magnetobacterium bavaricum*, and a wild-type magnetotactic vibrio. The FORC distribution is bimodal with a broad maximum centered at 42 mT and a sharper peak toward the $H_c = 0$ axis. The sharper peak is attributed to SPM magnetosomes, as they typically occur at the chain ends. Magnetization values are indicated in the color scale bar. Figure reprinted from Earth and Planetary Science Letters Vol. 237, Pan Y, Petersen N, Winklhofer M, et al. “Rock magnetic properties of uncultured magnetotactic bacteria”, Pages 311–325, Copyright 2005, with permission from Elsevier

where h is the Planck constant, f is the microwave radiation frequency, g_{eff} is the effective splitting factor, μ_B is the Bohr magneton and B_{App} is the applied magnetic field. Figure 11a shows a typical FMR spectrum. It is common to analyze the derivative of the absorption spectrum. The parameters used to characterize the FMR spectrum are g_{eff} , B_{res} , ΔB , and A (Figure 11a). Regarding the values of g_{eff} , it is observed that $g_{\text{eff}} \approx 2$ is characteristic of superparamagnetic particles showing narrow ΔB , $g_{\text{eff}} > 2$ is characteristic of magnetite samples with a dominant magnetocrystalline anisotropy field, and $g_{\text{eff}} < 2$ is characteristic of samples with a prevalent shape anisotropy field caused by the organization of the particles in chains (Faivre et al. 2010). The values of parameter A are related to the magnetic anisotropy: $A = 1$ corresponds to samples with no significant anisotropy, $A > 1$ is common in magnetite at room temperature having a cubic negative magnetocrystalline anisotropy, and $A < 1$ is related to elongated single-domain magnetite particles or to magnetite particles aligned along their easy axes forming a dominant shape anisotropy, where a positive uniaxial anisotropy can be observed (Faivre et al. 2010). Figure 11b shows an example of an FMR spectrum for magnetosome chains from

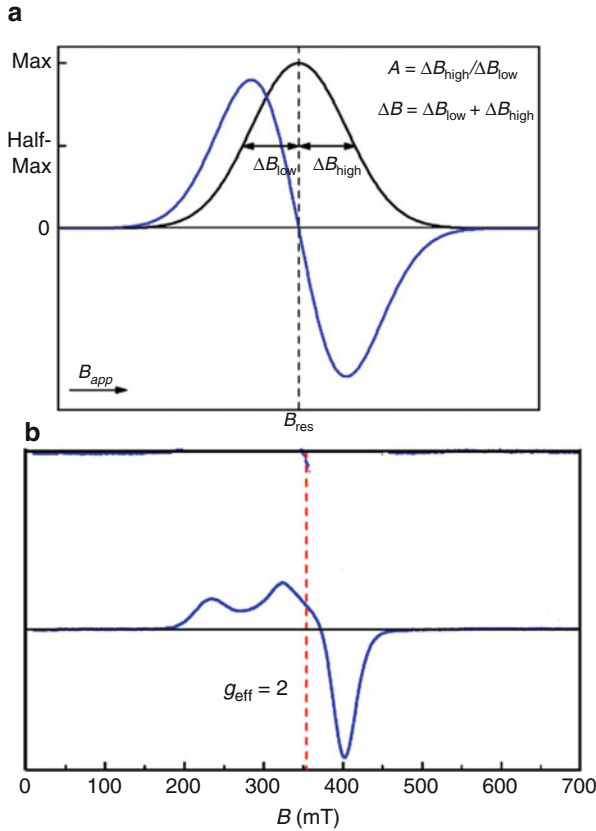


Fig. 11 (a) Absorption spectrum (black line) and first derivative spectrum (blue line). The dashed line defines the maximum resonance field (B_{res}). Parameters ΔB and A are defined in the figure. (b) Typical first derivative FMR spectra of magnetosome chains (X band spectra with a microwave frequency of 9.81 GHz). Magnetosomes were obtained from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. The dashed red line indicates the calculated position of $g_{eff} = 2$. The parameters calculated from the spectrum are $B_{res} = 371.8$ mT, $g_{eff} = 1.89$, $\Delta B = 167.4$ mT, and $A = 0.41$. Figure reprinted from Biophysical Journal Vol. 99 (4), Faivre D, Fischer A, Garcia-Rubio I, et al. “Development of cellular magnetic dipoles in magnetotactic bacteria”, Pages 1268–1273, Copyright 2010, with permission from the Biophysical Society

Ms. gryphiswaldense MSR-1. The high-field peak has the following parameters: $g_{eff} = 1.89$, $B_{res} = 372$ mT, $\Delta B = 167.4$ mT, and $A = 0.41$. The low-field peak is related to the assembly of magnetosomes into chains with pronounced uniaxial anisotropy. Magnetosome chains can be identified with FMR spectra similar to those in Fig. 11b obtained from sediments and from different strains of magnetotactic bacteria (Weiss et al. 2004; Kopp et al. 2006; Fischer et al. 2008).

All these techniques together (hysteresis curves, ZFC and FC thermoremanence, FORC curves, FMR spectra) are powerful analytical tools to identify biogenic magnetite nanoparticles organized in chains.

After death of magnetotactic bacteria, magnetosomes may be preserved in suitable environments, contributing to sedimentary magnetism. Magnetofossils (fossil magnetosomes) have been identified in numerous sediments as important magnetic carriers (Chang et al. 1989; Kopp et al. 2006; Kopp and Kirschvink 2008; Zhang and Pan 2018). A study carried out by Mao et al. (2014), where the sedimentation process was simulated in a micro environment with magnetotactic bacteria, showed that natural remanence magnetization in sediments is mainly obtained from magnetosome chains, with the sediment magnetization direction nearly parallel to that of the ambient magnetic field and approximately 90% of the acquired magnetization being due to single-domain magnetite nanoparticles from bacterial origin. The understanding of the ancient geomagnetic field through the study of sediment magnetization is connected to our understanding of the biomineralization of magnetic nanoparticles by magnetotactic bacteria, which are the main providers of magnetic material to natural sediments.

7 Genes and Proteins Associated with the Magnetosomes

Due to the strict genetic control over the magnetosome biomineralization in magnetosomes, the inorganic portion of magnetosomes has very particular properties such as specific shape and a narrow size range for each bacterial species, high chemical purity, and limited crystallographic defects (Matsuda et al. 1983; Mann et al. 1984; Bazylinski et al. 1995; Amor et al. 2015). Controlling the particle size, the magnetotactic microorganisms optimize the magnetic dipole moment of each magnetosome (Bazylinski et al. 1995). Indeed, most crystals are 35–120 nm in diameter, which corresponds to the size range for stable single magnetic domains, meaning that they are permanently magnetic at room temperature (Butler and Banerjee 1975; Moskowitz 1995; Albrecht et al. 2005). A few exceptions were reported, consisting of large crystals that behave as monodomains when arranged in chains, and as two- or multi-domains when the chain arrangement is lost (Spring et al. 1998; McCartney et al. 2001; Lins et al. 2005).

Magnetotactic bacteria have specific genes for the induction and control of the formation of magnetosomes. These genes are collectively known as *mam* (MAGnetosome Membrane) and *mms* (MAGnetosome Membrane Specific), which are organized in groups clustered within the genomes of magnetotactic bacteria (Jogler and Schüler 2009). These genes encode several specific proteins involved in magnetosome biomineralization, some of which have been identified as being an integral or peripheral part of the magnetosome membrane (Grünberg et al. 2004; Tanaka et al. 2006; Scheffel et al. 2008; Murat et al. 2010; Quinlan et al. 2011). They control the synthesis of magnetite particles by creating an environment that facilitates the nucleation and growth of immature crystals in a preferential orientation (Bazylinski and Frankel 2004; Tanaka et al. 2006). Other genes called *mtx* (MagneTotaXis-related proteins) and *mad* (MAGnetosome-Associated *Deltaproteobacteria*) are also involved in the biomineralization process. However,

the *mtx* genes and some *mam* genes do not synthesize proteins that are part of the membrane magnetosome, and little is known about the *mad* genes that are specific to *Deltaproteobacteria* and *Nitrospirae* (Richter et al. 2007; Lefèvre et al. 2013a; Rahn-Lee and Komeili 2013).

In the past decade, technological advances led to significant progress in analyzing the molecular aspects of magnetosome biogenesis. Major advances in understanding the role of magnetosome proteins were based on genetic manipulation experiments, in which gene deletion revealed phenotypic changes in magnetosome synthesis (Murat et al. 2010). In addition, location and structure of proteins are also key points to understand their function in magnetosome formation. Various microscopy and molecular techniques were often used to monitor protein localization and structure, to visualize magnetosome membrane, size, morphology, and subcellular arrangement of magnetic particles. There are currently just over 20 species of magnetotactic bacteria in axenic culture. Despite this, the largest number of magnetosome protein studies use *Ms. gryphiswaldense* strain MSR-1 and *Ms. magneticum* strain AMB-1 as models, restricting the understanding of the magnetosomes' biogenesis process to members of *Alphaproteobacteria* (Arakaki et al. 2016; Lang and Schüler 2008; Lefèvre and Bazyliński 2013; McCausland and Komeili 2020; Murat et al. 2010).

Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria is intrinsically related to the Mam (magnetosome-associated membrane) and Mms (magnetic particle membrane-specific) proteins, coded by *mam* and *mms* genes, respectively, which are clustered in a chromosomal region called the genomic "Magnetosome Island" (MAI) (Uebe and Schüler 2016). More recently, the term "MAI" has been gradually substituted by "magnetosome gene clusters" (MGCs), because some magnetotactic bacteria do not present a real genomic island harboring magnetosome biomineralization genes (Lin et al. 2018). Ten genes (*mamA*, *mamB*, *mamE*, *mamI*, *mamK*, *mamL*, *mamM*, *mamO*, *mamP*, and *mamQ*) are conserved in all magnetite producers. Nine of them seem to be conserved in greigite producers, and only *mamL* is absent (Uebe and Schüler 2016; Barber-Zucker and Zarivach 2017). In summary, the major operon *mamAB* is conserved in almost all magnetotactic bacteria, and its genes have key roles in magnetosome formation (Murat et al. 2010). There are other small operons, for instance *mamGFDC*, *mamXY*, *mms6*, and *feoAB* in strains MSR-1 and AMB-1, but they are not ubiquitous in magnetotactic bacteria (Uebe and Schüler 2016; Barber-Zucker and Zarivach 2017).

To date, magnetotactic microorganisms have been described in *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, and *Omnitrophica* phyla (Lin et al. 2018). In addition, metagenomic approaches suggest the existence of species of magnetotactic bacteria affiliated also to the *Ca. Latescibacteria* and *Planctomycetes* phyla. Despite this large diversity, the magnetosome biomineralization genes are unique, conserved, and shared among all magnetotactic bacteria despite their large phylogenetical distance (Fig. 12).

The magnetosome biogenesis can be divided into four stages: (1) vesicle formation through invagination of the cell membrane; (2) protein sorting; (3) iron transportation and biomineralization; and (4) alignment of magnetosomes in chains. These stages do not necessarily occur in separate moments (Uebe and Schüler 2016). In terms of location, proteins involved in magnetosome formation are usually

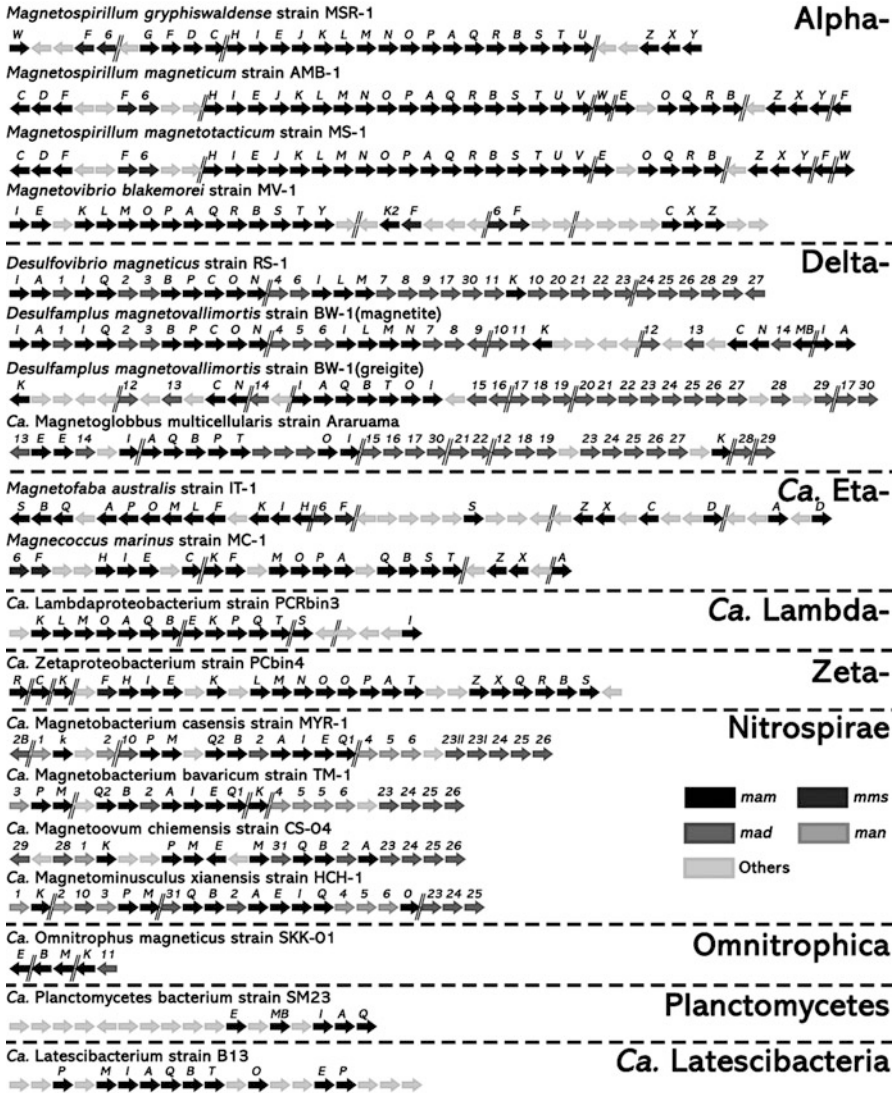


Fig. 12 Magnetosome gene organization in magnetosome gene clusters (MGCs) of cultivated magnetotactic bacteria and metagenome-assembled genomes affiliated to the *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Omnitrophica*, *Planctomycetes*, and *Ca. Latescibacteria* phyla. Magnetotactic proteobacteria are arranged according to their taxonomic classification. The mam genes are found in all magnetotactic bacteria, whereas the others are restricted to specific taxa, as follows: (i) mms genes, found in proteobacterial genomes (affiliated to the classes *Alpha-*, *Delta-*, *Ca. Eta-*, and *Zetaproteobacteria*); (ii) man genes, observed in genomes affiliated to *Nitrospirae* phylum; and (iii) mad genes, found in genomes affiliated to the *Deltaproteobacteria* class, and to the *Nitrospirae* and *Omnitrophica* phyla. Other genes nonrelated to magnetosome biomineralization also make part of MGCs

classified as belonging to the cytoplasmic membrane (CT), magnetosome membrane (MM), or transmembrane (TM) proteins, although many can be found in different parts of the cell, depending on the biomineralization phase. Their functions are related to vesicle formation from the cell inner membrane, iron trafficking, crystal growth, maturation, and alignment of magnetosome chain. However, dual roles are common, as well as redundant functions (one function performed by more than one protein), making it challenging to describe which protein is essential or not for which function (Amor et al. 2020b; Barber-Zucker et al. 2016; Uebe and Schüler 2016).

Among the genes responsible for the formation of magnetosomes, the *mamAB* operon is preserved in all magnetotactic bacteria described so far and seems to be crucial to magnetosome biomineralization. Some other operons are specific to different taxa, such as the *mamGFDC* and *mms6* operons, which are only found in magnetotactic bacteria within the *Alphaproteobacteria*. Since this group of magnetotactic bacteria produces cubo-octahedral or elongated prismatic magnetite particles, it is tempting to associate the operons with these crystal morphologies. Size and shape of magnetosome crystals seems to be controlled by the cumulative action of the MamGFDC and Mms proteins in *Ms. gryphiswaldense* MSR-1, although these proteins do not seem to be essential for magnetosome formation (Scheffel et al. 2008). When Mms5, Mms6, Mms7 (MamD), and Mms13 (MamC) were deleted in *Ms. magneticum* AMB-1, the magnetite crystals produced were smaller and defective. This indicates that these proteins probably regulate the size and shape of magnetite in later stages of crystallization and the maturation of magnetite crystals (Arakaki et al. 2014; Uebe and Schüler 2016).

One of the most studied proteins involved in the biomineralization of magnetosomes is MamC (also known as Mms13), which contains two helical transmembrane domains connected by an α -helical loop oriented toward the magnetosome lumen. This loop has structures responsible for a template effect that controls the nucleation and growth of nanoparticles in vitro. Studies with mutants suggested that the connection between the MamC magnetite-interaction loop structure and the charged surfaces of the protein is crucial for magnetite binding, and thus for the size control of the magnetite nanoparticles (Nudelman et al. 2016). Crystals formed by mutants deficient in either *mamC* or the entire *mamGFDC* operon were significantly smaller and less regular with respect to morphology and chain organization (Jogler and Schüler 2009).

MamD, also known as Mms7, contains a LG-repeat motif probably used to bind other proteins, and is tightly attached to the magnetite crystal (Scheffel et al. 2008; Arakaki et al. 2014). The deletion of the gene coding this protein leads to biomineralization of small and elongated magnetite particles, suggesting a function in crystal growth and maturation. Changes in the expression of Mms7 led the magnetosome crystals to change the cubo-octahedral shape to dumbbell or spherical shape (Arakaki et al. 2014), whereas the modulation of Mms7 expression allowed the biomineralization of magnetite crystals with tunable sizes and morphologies (Yamagishi et al. 2016). MamF is another protein associated with the control of crystal size. It is a deeply embedded membrane protein, and, in *Ms. gryphiswaldense* MSR-1 mutants, magnetosome crystals were slightly smaller than in wild type, indicating its role in size control (Scheffel et al. 2008).

Other proteins, such as those encoded by *mamP*, *mamR*, *mamS*, and *mamT* genes, are related to crystal size and shape (Murat et al. 2010). For example, in strain AMB-1 mutants deficient in *mamP*, crystals were mostly small, “flake-like,” suggesting that the MamP role in iron redox reactions is also important to control size and shape (Jones et al. 2015; Siponen et al. 2013). Other proteins, like MmsF, Mms5, MamR, and Mms6, seem to participate in crystal maturation (Murat et al. 2010; Lohsse et al. 2014; Rawlings et al. 2014; Arakaki et al. 2014). Indeed, when the gene *mamR* was deleted in *Ms. magneticum* AMB-1, both size and number of magnetosomes were reduced, suggesting a function in magnetite crystal maturation (Murat et al. 2010).

Mms6 is a small acidic protein tightly associated with the surface of bacterial magnetite in *Ms. magneticum* AMB-1 (Amemiya et al. 2007; Arakaki et al. 2010; Staniland and Rawlings 2016). Molecular modelling suggests the existence of specific, multiple sites for binding for ferrous ions in Mms6 (Staniland and Rawlings 2016). In addition, its amphiphilic nature allows it to form aggregates through hydrophobic interactions, forming micelles (Amemiya et al. 2007; Staniland and Rawlings 2016). In vitro experiments showed that Mms6 mediate the formation of cubo-octahedral magnetite crystals, leading to synthesis of uniform magnetic crystals through partial oxidation of ferrous hydroxide (Amemiya et al. 2007; Arakaki et al. 2010). The ability to self-assemble in micelles and to bind ferrous ions makes Mms6 of special interest for synthetic production of biomimetic magnetite crystals (Amemiya et al. 2007; Staniland and Rawlings 2016). In particular, the curvature of Mms6 micelle surfaces would delimit the size of the crystals (Staniland and Rawlings 2016).

The alignment of the magnetosomes into one (or more) chain(s) leads to the sum of the magnetic moments of individual particles. If magnetosome chains are attached to the cell's structural framework, they impart the whole cell a magnetic moment, turning the cell itself into a magnetic dipole, which results in passive alignment of the bacteria to the geomagnetic field. In the cultivated *Magnetospirillum* spp., magnetosome chains are aligned along the long cell axis, based on the interaction of proteins present in the magnetosome membrane (MamJ) with MamK, an actin-like protein that forms dynamic filaments and is required for the magnetosome chain assembly and positioning along the cell long axis (Uebe and Schüler 2016). MamK has also a role in organizing the magnetosome chains during cell division, such that equivalent numbers of magnetosomes are distributed to the two daughter cells (Taoka et al. 2017). Interestingly, MamJ is not conserved in all magnetotactic bacteria, suggesting that there are other mechanisms for magnetosome chain alignment (Bennet et al. 2015).

In addition to the *mam* and *mms* genes, *mad* (magnetosome-associated *Deltaproteobacteria*) and *man* (magnetosome specific to *Nitrospirae*) genes have been described in magnetotactic bacteria affiliated to *Deltaproteobacteria* class or to the *Nitrospirae* and *Omnitrophica* phyla. This suggests that these genes could be associated with greigite and/or bullet-shaped magnetite magnetosome biomineralization (Uebe and Schüler 2016). Studying the proteins involved in the production of bullet shape and greigite magnetosomes has been a great challenge, due to the lack of cultivated strains amenable to molecular manipulations. Despite the diversity described for these organisms, magnetotactic bacteria are microorganisms whose

cultivation is extremely difficult, especially concerning to greigite-producing microorganisms. Therefore, the use of different models that could clarify the role of proteins only seen in *Deltaproteobacteria* and *Nitrospirae* has been delayed by the difficulty of axenic cultivation and genetic manipulation.

Lohsse et al. (2016) showed that the enhanced expression of *mamGFDC*, *mamAB*, *mms6*, and *mamXY* operons in *Ms. gryphiswaldense* strain MSR-1 led to increased magnetosome size and number within the cell. This result is extremely interesting if we consider large-scale production of magnetite nanoparticles for biotechnological approaches. As previously mentioned, magnetosomes are structures that exhibit a narrow size range and characteristic crystal morphology per taxon, which result in stable magnetic single domains (are permanently magnetized at room temperature), and show high chemical purity in standard conditions, but are amenable to doping with Mn and other elements. These characteristics lead to a growing interest in biotechnological applications. Drug delivery, enzyme immobilization, magnetic hyperthermia and contrast enhancement of magnetic resonance imaging, cell separation, DNA recovery or detection, and bioremediation are the most common examples of the current studies in magnetosome application. Size, shape, and composition, especially in medical applications, is of great importance (Kerans et al. 2018; Tanaka et al. 2016; Vargas et al. 2018). Understanding the roles and mechanisms for defining and controlling sizes and shapes can help in the production of “customized” magnetic crystals with the magnetic properties tailored for each application (Peigneux et al. 2016). For this (and other reasons), studies on the diversity, biochemistry, and physiology of magnetotactic bacteria are so essential, not only for the understanding of this diverse group but also for the countless potential biotechnological advances.

Many other *mam* and *mms* genes are involved in the biomineralization process. Here we presented a few studies that shed light on the molecular mechanism for controlled biomineralization of magnetic nanocrystals in magnetotactic bacteria. For detailed information about the genetics of magnetosome biomineralization, as well as organization of magnetosomes in the cell and segregation of magnetosomes during cell division, see Uebe and Schüler (2016).

8 Evolution of Magnetosome Biomineralization

Until recently, the evolution of biomineralization-related genes was completely unknown. The development of DNA sequencing technologies allowed the genomic characterization of both cultured and uncultured species. Initially only magnetite-producing magnetotactic bacteria had their genomes sequenced (Jogler et al. 2009; Schübbe et al. 2009), and genomic comparison of these magnetotactic *Alphaproteobacteria* indicated that horizontal gene transfer played a relevant role in the evolution of magnetite biomineralization (Jogler et al. 2009). However, the genomic sequencing of both uncultured (Abreu et al. 2011) and cultured (Lefèvre et al. 2013a; Lefèvre et al. 2013b) greigite-producing magnetotactic microorganisms brought new insights about the evolution of magnetotactic bacteria.

Nowadays, metagenomic approaches are turning the path of the evolution of magnetosome biomineralization clearer (Lin et al. 2018). According to the recent hypothesis of magnetotactic bacteria gene evolution, we can assume two possible situations: one that the last common ancestor of magnetotactic microorganisms synthesized magnetite magnetosomes and MGC duplication, divergence, loss, or horizontal gene transfer brought up the current scenario of magnetosome biomineralization in the *Bacteria* domain, or that the last common ancestor of all magnetotactic microorganisms produced an unknown mineral and the same events resulted in the current diversity of produced minerals and magnetosome biomineralizing species.

The scarce geological record does not favor any of these hypotheses. The oldest fossil magnetosomes ever found are magnetite crystals 2 billion years old (Chang et al. 1989), when oxygenic photosynthesis was already in place and there were dissolved oxygen in seawater, at least periodically and in certain places, along with anaerobic environments in soils, sediments, and stagnant water (Planavsky et al. 2014).

9 Conclusions

Magnetosome biomineralization is very well-controlled by several proteins working in concert to produce crystals with defined composition, size, shape, and position within the cell. Such strict control results in unique magnetic properties enabling several applications, ranging from sediment paleomagnetism to biotechnology.

Despite the complexity, magnetite biomineralization in magnetosomes is among the best-known examples of biomineralization in prokaryotes. Many advances were attained in the last years due to technical improvements, and much more can be done with further technical advances, particularly in the cultivation of new strains of microorganisms, the use of new molecular tools, and transmission electron microscopy techniques.

Acknowledgments This work was supported by the Brazilian agencies CNPq, CAPES and FAPERJ.

References

- Abreu F, Martins JL, Silveira TS, Keim CN, de Barros HGPL, Gueiros-Filho FJ, Lins U (2007) ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’, a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1318–1322. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64857-0>
- Abreu F, Cantão ME, Nicolás MF, Barcellos FG, Morillo V, Almeida LGP, Nascimento FF, Lefèvre CT, Bazylnski DA, Vasconcelos ATR, Lins U (2011) Common ancestry of iron oxide- and iron-sulfide-based biomineralization in magnetotactic bacteria. *ISME J* 5:1634–1640. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.35>

- Abreu F, Araujo ACV, Leão P, Silva KT, Carvalho FM, Cunha OL, Almeida LG, Geurink C, Farina M, Rodelli D, Jovane L, Pellizari VH, Vasconcelos AT, Bazylinski DA, Lins U (2016) Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. *Environ Microbiol* 18:4426–4441. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13388>
- Abreu F, Leão P, Vargas G, Cypriano J, Figueiredo V, Enrich-Prast A, Bazylinski DA, Lins U (2018) Culture-independent characterization of a novel uncultivated magnetotactic member of the *Betaproteobacteria* class of the *Proteobacteria* phylum from an acidic lagoon. *Environ Microbiol* 20:2615–2624. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14286>
- Albrecht M, Janke V, Sievers S, Siegner U, Schüler D, Heyen U (2005) Scanning force microscopy study of biogenic nanoparticles for medical applications. *J Magn Magn Mater* 290–291:269–271. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.11.206>
- Almeida FP, Viana NB, Lins U, Farina M, Keim CN (2013) Swimming behaviour of the multicellular magnetotactic prokaryote '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' under applied magnetic fields and ultraviolet light. *Ant Leeu* 103:845–857. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9866-0>
- Amemiya Y, Arakaki A, Staniland SS, Tanaka T, Matsunaga T (2007) Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. *Biomaterials* 28:5381–5389. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.051>
- Amor M, Busigny V, Durand-Dubief M, Tharaud M, Ona-Nguema G, Gélaberta A, Alphanbéry E, Menguy N, Benedetti MF, Chebbi I, Guyot F (2015) Chemical signature of magnetotactic bacteria. *Proc Nat Acad Sci USA* 112:1699–1703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414112112>
- Amor M, Busigny V, Louvat P, Tharaud M, Gélabert A, Cartigny P, Carlut J, Isambert A, Durand-Dubief M, Ona-Nguema G, Alphanbéry E, Chebbi I, Guyot F (2018) Iron uptake and magnetite biomineralization in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1: An iron isotope study. *Geochim Cosmochim Acta* 232:225–243. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.04.020>
- Amor M, Ceballos A, Wan J, Simon CP, Aron AT, Chang CJ, Hellman F, Komeili A (2020a) Magnetotactic bacteria accumulate a large pool of iron distinct from their magnetite crystals. *Appl Environ Microbiol* 86:e01278–e01220. <https://doi.org/10.1128/AEM.01278-20>
- Amor M, Mathon FP, Monteil CL, Busigny V, Lefèvre C (2020b) Iron-biomineralizing organelle in magnetotactic bacteria: function, synthesis and preservation in ancient rock samples. *Environ Microbiol* 22:3611–3632. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15098>
- Arakaki A, Masuda F, Amemiya Y, Tanaka T, Matsunaga T (2010) Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria. *J Col Inter Sci* 343:65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.043>
- Arakaki A, Yamagishi A, Fukuyo A, Tanaka M, Matsunaga T (2014) Co-ordinated functions of Mms proteins define the surface structure of cubo-octahedral magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Mol Microbiol* 93:554–567. <https://doi.org/10.1111/mmi.12683>
- Arakaki A, Kikuchi D, Tanaka M, Yamagishi A, Yoda T, Matsunaga T (2016) Comparative subcellular localization analysis of magnetosome proteins reveals a unique localization behavior of Mms6 protein onto magnetite crystals. *J Bacteriol* 198:2794–2802. <https://doi.org/10.1128/JB.00280-16>
- Araujo ACV, Morillo V, Cypriano J, Teixeira LCRS, Leão P, Lyra S, Almeida LG, Bazylinski DA, Vasconcelos ATR, Abreu F, Lins U (2016) Combined genomic and structural analyses of a cultured magnetotactic bacterium reveals its niche adaptation to a dynamic environment. *BMC Genomics* 17(suppl. 8):726. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3064-9>
- Balkwill DL, Maratea D, Blakemore RP (1980) Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J Bacteriol* 141:1399–1408
- Barber-Zucker S, Zarivach R (2017) A look into the biochemistry of magnetosome biosynthesis in magnetotactic bacteria. *ACS Chem Biol* 12:13–22. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01000>

- Barber-Zucker S, Keren-Khadmy N, Zarivach R (2016) From invagination to navigation: the story of magnetosome-associated proteins in magnetotactic bacteria. *Protein Sci* 25:338–351. <https://doi.org/10.1002/pro.2827>
- Baumgartner J, Morin G, Menguy N, Perez-Gonzalez T, Widdrat M, Cosmidis J, Faivre D (2013) Magnetotactic bacteria form magnetite from a phosphate-rich ferric hydroxide via nanometric ferric (oxyhydr)oxide intermediates. *Proc Nat Acad Sci USA* 110:14883–14888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307119110>
- Bazylinski DA, Frankel RB (2004) Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat Rev Microbiol* 2:217–230. <https://doi.org/10.1038/nrmicro842>
- Bazylinski DA, Garratt-Reed AJ, Abedi A, Frankel RB (1993) Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium. *Arch Microbiol* 160:35–42. <https://doi.org/10.1007/BF00258143>
- Bazylinski DA, Garratt-Reed AJ, Frankel RB (1994) Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc Res Tech* 27:389–401. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270505>
- Bazylinski DA, Frankel RB, Heywood BR, Mann S, King JW, Donaghay PL, Hanson AK (1995) Controlled biomineralization of magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) in a magnetotactic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 61:3232–3239
- Bazylinski DA, Williams TJ, Lefèvre CT, Berg RJ, Zhang CL, Bowser SS, Dean AJ, Beveridge TJ (2013a) *Magnetococcus marinus* gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (*Magnetococcaceae* fam. nov., *Magnetococcales* ord. nov.) at the base of the *Alphaproteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:801–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038927-0>
- Bazylinski DA, Williams TJ, Lefèvre CT, Trubitsyn D, Fang J, Beveridge TJ, Moskowitz BM, Ward B, Schübbe S, Dubbels BL, Simpson B (2013b) *Magnetovibrio blakemorei* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium (*Alphaproteobacteria: Rhodospirillaceae*) isolated from a salt marsh. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1824–1833. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.044453-0>
- Bean CP, Livingston JD (1959) Superparamagnetism. *J Appl Phys* 30:S120–S129. <https://doi.org/10.1063/1.2185850>
- Bennet M, Bertinetti L, Neely RK, Schertel A, Körnig A, Flors C, Müller FD, Schüler D, Klumpp S, Faivre D (2015) Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles. *Faraday Discuss* 181:71–83. <https://doi.org/10.1039/C4FD00240G>
- Blakemore R (1975) Magnetotactic bacteria. *Science* 190:377–379. <https://doi.org/10.1126/science.170679>
- Bohra M, Agarwal N, Singh V (2019) A short review on Verwey transition in nanostructured Fe₃O₄ materials. *J Nanomat* 2019:8457383. <https://doi.org/10.1155/2019/8457383>
- Boutroy E, Dare SAS, Beaudoin G, Barnes SJ, Lightfoot PC (2014) Magnetite composition in Ni-Cu-PGE deposits worldwide: application to mineral exploration. *J Geochem Explor* 145:64–81. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.05.010>
- Brune A, Frenzel P, Cypionka H (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol Rev* 24:691–710. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00567.x>
- Butler RF, Banerjee SK (1975) Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. *J Geophys Res* 80:4049–4058. <https://doi.org/10.1029/JB080i029p04049>
- Calugay RJ, Miyashita H, Okamura Y, Matsunaga T (2003) Siderophore production by the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEMS Microbiol Lett* 218:371–375. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01188-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01188-6)
- Chang SBR, Stolz JF, Kirschvink JL, Awramik SM (1989) Biogenic magnetite in stromatolites. II. Occurrence in ancient sedimentary environments. *Precamb Res* 43:305–315. [https://doi.org/10.1016/0301-9268\(89\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0301-9268(89)90062-4)
- Clark TM, Evans J (1997) Influence of chemical composition on the crystalline morphologies of magnetite. *IEEE T Magn* 33:4257–4259. <https://doi.org/10.1109/20.619728>

- Clemett SJ, Thomas-Keprta KL, Shimmin J, Morphew M, McIntosh JR, Bazylinski DA, Kirschvink JL, Wentworth S, McKay DS, Vali H, Gibson EK Jr, Romanex CS (2002) Crystal morphology of MV-1 magnetite. *Am Mineral* 87:1727–1730. <https://doi.org/10.2138/am-2002-11-1223>
- Cox BL, Popa R, Bazylinski DA, Lanoil B, Douglas S, Belz A, Engler DL, Neelson KH (2002) Organization and elemental analysis of P-, S-, and Fe- rich inclusions in a population of freshwater magnetococci. *Geomicrobiol J* 19:387–406. <https://doi.org/10.1080/01490450290098504>
- DeLong EF, Frankel RB, Bazylinski DA (1993) Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science* 259:803–806. <https://doi.org/10.1126/science.259.5096.803>
- Descamps ECT, Monteil CL, Menguy N, Ginet N, Pignol D, Bazylinski DA, Lefèvre CT (2017) *Desulfamplus magnetovallimortis* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium from a brackish desert spring able to biomineralize greigite and magnetite, that represents a novel lineage in the *Desulfobacteraceae*. *Syst Appl Microbiol* 40:280–289. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.05.001>
- Devouard B, Pósfai M, Hua X, Bazylinski DA, Frankel RB, Buseck PR (1998) Magnetite from magnetotactic bacteria: size distributions and twinning. *Am Mineral* 83:1387–1398. <https://doi.org/10.2138/am-1998-11-1228>
- Dubbels BL, DiSpirito AA, Morton JD, Semrau JD, Neto JNE, Bazylinski DA (2004) Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. *Microbiology* 150:2931–2945. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27233-0>
- Dunin-Borkowski RE, McCartney MR, Frankel RB, Bazylinski DA, Pósfai M, Buseck PR (1998) Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science* 282:1868–1870. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1868>
- Dunlop DJ, Özdemir Ö (1997) *Rock Magnetism*. Cambridge University Press, Cambridge
- Faivre D, Schüler D (2008) Magnetotactic bacteria and magnetosomes. *Chem Rev* 108:4875–4898. <https://doi.org/10.1021/cr078258w>
- Faivre D, Zuddas P (2006) Mineralogical and isotopic properties of biogenic nanocrystalline magnetites. In: Schüler D (ed) *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 175–196. https://doi.org/10.1007/7171_043
- Faivre D, Böttger LH, Matzanke BF, Schüler D (2007) Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds by a distinct pathway involving membrane-bound ferritin and an iron (II) species. *Angew Chemie Int Ed* 46:8495–8499. <https://doi.org/10.1002/anie.200700927>
- Faivre D, Menguy N, Pósfai M, Schüler D (2008) Environmental parameters affect the physical properties of fast-growing magnetosomes. *Am Mineral* 93:463–469. <https://doi.org/10.2138/am.2008.2678>
- Faivre D, Fischer A, Garcia-Rubio I, Mastrogiacomo G, Gehring AU (2010) Development of cellular magnetic dipoles in magnetotactic bacteria. *Biophys J* 99:1268–1273. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.05.034>
- Farina M, Esquivel DMS, De Barros HGPL (1990) Magnetic iron-sulphur crystals from a magnetotactic microorganism. *Nature* 343:256–258. <https://doi.org/10.1038/343256a0>
- Fdez-Gubieda ML, Muela A, Alonso J, García-Prieto A, Olivi L, Fernández-Pacheco R, Barandiarán JM (2013) Magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: time-resolved magnetic and structural studies. *ACS Nano* 7:3297–3305. <https://doi.org/10.1021/nn3059983>
- Fenchel T (2002) Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science* 296:1068–1071. <https://doi.org/10.1126/science.1070118>
- Fischer H, Mastrogiacomo G, Löffler JF, Warthmann RJ, Weidler PG, Gehring AU (2008) Ferromagnetic resonance and magnetic characteristics of intact magnetosome chains in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Earth Planet Sci Let* 270:200–208. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2008.03.022>
- Frankel RB, Blakemore RP, Wolfe RS (1979) Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* 203:1355–1356. <https://doi.org/10.1126/science.203.4387.1355>

- Frankel RB, Papaefthymiou GC, Blakemore RP, O'Brien W (1983) Fe_3O_4 precipitation in magnetotactic bacteria. *BBA - Mol Cell Res* 763:147–159. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(83\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0167-4889(83)90038-1)
- Frankel RB, Bazylinski DA, Johnson MS, Taylor BL (1997) Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys J* 73:994–1000. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78132-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78132-3)
- Frankel RB, Williams TJ, Bazylinski DA (2006) Magneto-aerotaxis. In: Schüler D (ed) *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–24. https://doi.org/10.1007/7171_2006_036
- Greening C, Lithgow T (2020) Formation and function of bacterial organelles. *Nat Rev Microbiol* 18:677–689. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0413-0>
- Grünberg K, Müller E, Otto A, Reszka R, Linder D, Kube M, Reinhardt R, Schüler D (2004) Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl Environ Microbiol* 70:1040–1050. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1040-1050.2004>
- Han L, Li SY, Yang Y, Zhao FM, Huang J, Chang J (2008) Research on the structure and performance of bacterial magnetic nanoparticles. *J Biomater Appl* 22:433–448. <https://doi.org/10.1177/0885328207079064>
- Heywood BR, Bazylinski DA, Garratt-Reed A, Mann S, Frankel RB (1990) Controlled biosynthesis of greigite (Fe_3S_4) in magnetotactic bacteria. *Naturwissenschaften* 77:536–538. <https://doi.org/10.1007/BF01139266>
- Heywood BR, Mann S, Frankel RB (1991) Structure, morphology and growth of biogenic greigite (Fe_3S_4). *Mat Res Soc Symp Proc* 218:93–108
- Jogler C, Schüler D (2009) Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation. *Ann Rev Microbiol* 63:501–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162908>
- Jogler C, Kube M, Schütte S, Ullrich S, Teeling H, Bazylinski DA, Reinhardt R, Schüler D (2009) Comparative analysis of magnetosome gene clusters in magnetotactic bacteria provides further evidence for horizontal gene transfer. *Environ Microbiol* 11:1267–1277. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01854.x>
- Jones SR, Wilson TD, Brown ME, Rahn-Lee L, Yu Y, Fredriksen LL, Ozyamak E, Komeili A, Chang MCY (2015) Genetic and biochemical investigations of the role of MamP in redox control of iron biomineralization in *Magnetospirillum magneticum*. *Proc Nat Acad Sci U S A* 112:3904–3909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417614112>
- Jovane L, Florindo F, Bazylinski DA, Lins U (2012) Prismatic magnetite magnetosomes from cultivated *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1: a magnetic fingerprint in marine sediments? *Environ Microbiol Rep* 4:664–668. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12000>
- Kakol Z, Sabol J, Stickler J, Kozłowski A, Honig JM (1994) Influence of titanium doping on the magnetocrystalline anisotropy of magnetite. *Phys. Rev. B* 49:12767–12772. <https://doi.org/10.1103/physrevb.49.12767>
- Kasama T, Pósfai M, Chong RKK, Finlayson AP, Dunin-Borkowski RE, Frankel RB (2006a) Magnetic microstructure of iron sulfide crystals in magnetotactic bacteria from off-axis electron holography. *Phys B Condens Matter* 384:249–252. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2006.06.002>
- Kasama T, Pósfai M, Chong RKK, Finlayson AP, Buseck PR, Frankel RB, Dunin-Borkowski RE (2006b) Magnetic properties, microstructure, composition, and morphology of greigite nanocrystals in magnetotactic bacteria from electron holography and tomography. *Am Mineral* 91:1216–1229. <https://doi.org/10.2138/am.2006.2227>
- Katzmann E, Eibauer M, Lin W, Pan Y, Plitzko JM, Schüler D (2013) Analysis of magnetosome chains in magnetotactic bacteria by magnetic measurements and automated image analysis of electron micrographs. *Appl Environ Microbiol* 79:7755–7762. <https://doi.org/10.1128/AEM.02143-13>
- Keim CN, Lins U, Farina M (2009) Manganese in biogenic magnetite crystals from magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 292:250–253. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01499.x>

- Keim CN, de Melo RD, Almeida FP, Lins de Barros HGP, Farina M, Acosta-Avalos D (2018) Effect of applied magnetic fields on motility and magnetotaxis in the uncultured magnetotactic multicellular prokaryote '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'. *Environ Microbiol Rep* 10:465–474. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12640>
- Kerans FFA, Lungaro L, Azfer A, Salter DM (2018) The potential of intrinsically magnetic mesenchymal stem cells for tissue engineering. *Int J Mol Sci* 19:3159. <https://doi.org/10.3390/ijms19103159>
- Kirschvink JL (1992) On the magnetostatic control of crystal orientation and iron accumulation in magnetosomes. *Automedica* 14:257–269
- Klumpp S, Faivre D (2016) Magnetotactic bacteria - magnetic navigation on the microscale. *Eur Phys J Special Topics* 225:2173–2188. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2016-60055-y>
- Kolinko S, Jogler C, Katzmann E, Wanner G, Peplies J, Schüler D (2012) Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3. *Environ Microbiol* 14:1709–1721. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02609.x>
- Kolinko S, Richter M, Glöckner F, Brachmann A, Schüler D (2014) Single-cell genomics reveals potential for magnetite and greigite biomineralization in an uncultivated multicellular magnetotactic prokaryote. *Environ Microbiol Rep* 6:524–531. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12198>
- Komeili A (2006) Cell biology of magnetosome formation. In: Schüler D (ed) *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 163–174. https://doi.org/10.1007/7171_042
- Komeili A, Vali H, Beveridge TJ, Newman DK (2004) Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3839–3844. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400391101>
- Komeili A, Li Z, Newman DK, Jensen GJ (2006) Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* 311:242–245. <https://doi.org/10.1126/science.1123231>
- Kopp RE, Kirschvink JL (2008) The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria. *Earth-Science Rev* 86:42–61. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2007.08.001>
- Kopp RE, Weiss BP, Maloof AC, Vali H, Nash CZ, Kirschvink JL (2006) Chains, clumps, and strings: magnetofossil taphonomy with ferromagnetic resonance spectroscopy. *Earth Planet Sci Lett* 247:10–25. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2006.05.001>
- Koziaeva V, Dziuba M, Leão P, Uzun M, Krutkina M, Grouzdev D (2019) Genome-based metabolic reconstruction of a novel uncultivated freshwater magnetotactic coccus "*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*" UR-1, and proposal of a candidate family "*Ca. Magnetaquicoccaceae*". *Front Microbiol* 10:2290. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02290>
- Kumari M, Hirt AM, Uebe R, Schüler D, Tompa E, Pósfai M, Lorenz W, Ahrentorp F, Jonasson C, Johansson C (2015) Experimental mixtures of superparamagnetic and single-domain magnetite with respect to Day-Dunlop plots. *Geochem Geophys Geosys* 16:1739–1752. <https://doi.org/10.1002/2015GC005744>
- Lang C, Schüler D (2008) Expression of green fluorescent protein fused to magnetosome proteins in microaerophilic magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 74:4944–4953. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-08>
- Leão P, Nagard L, Yuan H, Cypriano J, Silva-Neto I, Bazylnski DA, Acosta-Avalos D, Barros HL, Hitchcock AP, Lins U, Abreu F (2020) Magnetosome magnetite biomineralization in a flagellated protist: evidence for an early evolutionary origin for magnetoreception in eukaryotes. *Environ Microbiol* 22:1495–1506. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14711>
- Lefèvre CT, Bernadac A, Yu-Zhang K, Pradel N, Wu LF (2009) Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* 11:1646–1657. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01887.x>

- Lefèvre CT, Abreu F, Schmidt ML, Lins U, Frankel RB, Hedlund BP, Bazylinski DA (2010) Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. *Appl Environ Microbiol* 76:3740–3743. <https://doi.org/10.1128/AEM.03018-09>
- Lefèvre CT, Menguy N, Abreu F, Lins U, Pósfai M, Prozorov T, Pignol D, Frankel RB, Bazylinski DA (2011a) A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. *Science* 334:1720–1723. <https://doi.org/10.1126/science.1212596>
- Lefèvre CT, Pósfai M, Abreu F, Lins U, Frankel RB, Bazylinski DA (2011b) Morphological features of elongated-anisotropic magnetosome crystals in magnetotactic bacteria of the *Nitrospirae* phylum and the *Deltaproteobacteria* class. *Earth Planet Sci Lett* 312:194–200. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2011.10.003>
- Lefèvre CT, Vilorio N, Schmidt ML, Pósfai M, Frankel RB, Bazylinski DA (2012) Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the *Gammaproteobacteria*. *ISME J* 6:440–450. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.97>
- Lefèvre CT, Bazylinski DA (2013) Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:497–526. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-13>
- Lefèvre CT, Trubitsyn D, Abreu F, Kolinko S, Jogler C, Almeida LGP, Vasconcelos ATR, Kube M, Reinhardt R, Lins U, Pignol D, Schüler D, Bazylinski DA, Ginet N (2013a) Comparative genomic analysis of magnetotactic bacteria from the *Deltaproteobacteria* provides new insights into magnetite and greigite magnetosome genes required for magnetotaxis. *Environ Microbiol* 15:2712–2735. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12128>
- Lefèvre CT, Trubitsyn D, Abreu F, Kolinko S, Jogler C, Almeida LGP, Vasconcelos ATR, Lins U, Schüler D, Ginet N, Pignol D, Bazylinski DA (2013b) Monophyletic origin of magnetotaxis and the first magnetosomes. *Environ Microbiol* 15:2267–2274. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12097>
- Lefèvre CT, Bennet M, Landau L, Vach P, Pignol D, Bazylinski D, Frankel RB, Klumpp S, Faivre D (2014) Diversity of magneto-aerotactic behaviors and oxygen sensing mechanisms in cultured magnetotactic bacteria. *Biophys J* 107:527–538. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.043>
- Lelis MFF, Fabris JD, Mussel WN, Takeuchi AY (2003) Preparation and characterization of nickel- and cobalt-doped magnetites. *Mater Res* 6:145–150. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000200006>
- Li J, Pan Y (2012) Environmental factors affect magnetite magnetosome synthesis in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1: implications for biologically controlled mineralization. *Geomicrobiol J* 29:362–373. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.565401>
- Li J, Pan Y, Chen G, Liu Q, Tian L, Lin W (2009) Magnetite magnetosome and fragmental chain formation of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1: transmission electron microscopy and magnetic observations. *Geophys J Int* 177:33–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.2009.04043.x>
- Li J, Pan Y, Liu Q, Yu-Zhang K, Menguy N, Che R, Qin H, Lin W, Wu W, Petersen N, Yang X (2010) Biomineralization, crystallography and magnetic properties of bullet-shaped magnetite magnetosomes in giant rod magnetotactic bacteria. *Earth Planet Sci Lett* 293:368–376. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2010.03.007>
- Lin W, Pan Y (2014) A putative greigite-type magnetosome gene cluster from the candidate phylum *Latescibacteria*. *Environ Microbiol Rep* 7:237–242. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12234>
- Lin W, Li J, Pan Y (2012) Newly isolated but uncultivated magnetotactic bacterium of the phylum *Nitrospirae* from Beijing, China. *Appl Environ Microbiol* 78:668–675. <https://doi.org/10.1128/AEM.06764-11>
- Lin W, Pan Y, Bazylinski DA (2017) Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. *Environ Microbiol Rep* 9:345–356. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12550>
- Lin W, Zhang W, Zhao X, Roberts AP, Paterson GA, Bazylinski DA, Pan Y (2018) Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. *ISME J* 12:1508–1519. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0098-9>

- Lins U, Farina M (1998) Magnetosome size distribution in uncultured rod-shaped bacteria as determined by electron microscopy and electron spectroscopic imaging. *Microsc Res Tech* 42:459–464. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980915\)42:6<459::AID-JEMT8>3.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980915)42:6<459::AID-JEMT8>3.CO;2-H)
- Lins U, Farina M (2001) Amorphous mineral phases in magnetotactic multicellular aggregates. *Arch Microbiol* 176:323–328. <https://doi.org/10.1007/s002030100328>
- Lins U, McCartney MR, Farina M, Frankel RB, Buseck PR (2005) Habits of magnetosome crystals in coccoid magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:4902–4905. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4902-4905.2005>
- Lins U, Keim CN, Evans FF, Farina M, Buseck PR (2007) Magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) crystals in multicellular magnetotactic prokaryotes. *Geomicrobiol J* 24:43–50. <https://doi.org/10.1080/01490450601134317>
- Lohsse A, Borg S, Raschdorf O, Kolinko I, Tompa E, Pósfai M, Faivre D, Baumgartner J, Schüler D (2014) Genetic dissection of the mamAB and mms6 operons reveals a gene set essential for magnetosome biogenesis in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J Bacteriol* 196:2658–2669. <https://doi.org/10.1128/JB.01716-14>
- Lohsse A, Kolinko I, Raschdorf O, Uebe R, Borg S, Brachmann A, Plitzko JM, Müller R, Zhang Y, Schüler D (2016) Overproduction of magnetosomes by genomic amplification of biosynthesis-related gene clusters in a magnetotactic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 82:3032–3041. <https://doi.org/10.1128/AEM.03860-15>
- Mandernack KW, Bazylinski DA, Shanks WC, Bullen TD (1999) Oxygen and iron isotope studies of magnetite produced by magnetotactic bacteria. *Science* 285:1892–1896. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1892>
- Mann S, Moench TT, Williams RJP (1984) A high resolution electron microscopic investigation of bacterial magnetite. Implications for crystal growth. *Proc R Soc Lond B* 221:385–393. <https://doi.org/10.1098/rspb.1984.0040>
- Mann S, Sparks NHC, Blakemore RP (1987) Structure, morphology and crystal growth of anisotropic magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Proc R Soc B* 231:477–487. <https://doi.org/10.1098/rspb.1987.0056>
- Mann S, Sparks NHC, Frankel RB, Bazylinski DA, Jannasch HW (1990) Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* 343:258–261. <https://doi.org/10.1038/343258a0>
- Mao X, Egli R, Petersen N, Hanzlik M, Zhao X (2014) Magnetotaxis and acquisition of detrital remanent magnetization by magnetotactic bacteria in natural sediment: first experimental results and theory. *Geochem Geophys Geosys* 15:255–283. <https://doi.org/10.1002/2013GC005034>
- Marcano L, Orue I, García-Prieto A, Abrudan R, Alonso J, Barquín LF, Valencia S, Muela A, Fdez-Gubieda L (2020) Controlled magnetic anisotropy in single domain Mn-doped biosynthesized nanoparticles. *J Phys Chem C* 124:22827–22838. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07018>
- Matsuda T, Endo J, Osakabe N, Tonomura A, Arai T (1983) Morphology and structure of biogenic magnetite particles. *Nature* 302:411–412. <https://doi.org/10.1038/302411a0>
- McCartney MR, Lins U, Farina M, Buseck PR, Frankel RB (2001) Magnetic microstructure of bacterial magnetite by electron holography. *Eur J Mineral* 13:685–689. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2001/0013-0685>
- McCausland HC, Komeili A (2020) Magnetic genes: studying the genetics of biomineralization in magnetotactic bacteria. *PLoS Genetics* 16:e1008499. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008499>
- Meldrum FC, Mann S, Heywood BR, Frankel RB, Bazylinski DA (1993a) Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *Proc R Soc London Ser B* 251:231–236. <https://doi.org/10.1098/rspb.1993.0034>
- Meldrum FC, Mann S, Heywood BR, Frankel RB, Bazylinski DA (1993b) Electron microscopy study of magnetosomes in two cultured vibrioid magnetotactic bacteria. *Proc R Soc London Ser B* 251:237–242. <https://doi.org/10.1098/rspb.1993.0035>

- Moiescu C, Ardelean II, Benning LG (2014) The effect and role of environmental conditions on magnetosome synthesis. *Front Microbiol* 5:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00049>
- Morillo V, Abreu F, Araujo AC, Almeida LGP, Enrich-Prast A, Farina M, Vasconcelos ATR, Bazylinski DA, Lins U (2014) Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the *Alphaproteobacteria*. *Front Microbiol* 5:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00072>
- Moskowitz BM (1995) Biomineralization of magnetic minerals. *Rev Geophys* 33:123–128. <https://doi.org/10.1029/95RG00443>
- Moskowitz BM, Frankel RB, Flanders PJ, Blakemore RP, Schwartz BB (1988) Magnetic properties of magnetotactic bacteria. *J Magn Magn Mater* 73:273–288. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(88\)90093-5](https://doi.org/10.1016/0304-8853(88)90093-5)
- Moskowitz BM, Frankel RB, Bazylinski DA, Jannasch HW, Lovley DR (1989) A comparison of magnetite produced anaerobically by magnetotactic and dissimilatory iron-reducing bacteria. *Geophys Res Lett* 16:665–668. <https://doi.org/10.1029/GL016i007p00665>
- Moskowitz BM, Frankel RB, Bazylinski DA (1993) Rock magnetic criteria for the detection of biogenic magnetite. *Earth Planet Sci Lett* 120:283–300. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(93\)90245-5](https://doi.org/10.1016/0012-821X(93)90245-5)
- Muñoz D, Marcano L, Martín-Rodríguez R, Simonelli L, Serrano A, García-Prieto A, Fdez-Gubieda ML, Muela A (2020) Magnetosomes could be protective shields against metal stress in magnetotactic bacteria. *Sci Rep* 10:11430. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68183-z>
- Murat D, Quinlan A, Vali H, Komeili A (2010) Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Proc Nat Acad Sci USA* 107:5593–5598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914439107>
- Muxworthy AR, Williams W, Roberts AP, Winklhofer M, Chang L, Pósfai M (2013) Critical single domain grain sizes in chains of interacting greigite particles: implications for magnetosome crystals. *Geochem Geophys Geosyst* 14:5430–5441. <https://doi.org/10.1002/2013GC004973>
- Nagard L, Zhu X, Yuan H, Benzerara K, Bazylinski DA, Fradin C, Besson A, Swaraj S, Stanescu S, Belkhou R, Hitchcock AP (2019) Magnetite magnetosome biomineralization in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1: a time course study. *Chem Geol* 530:119348. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.119348>
- Nakamura N, Hashimoto K, Matsunaga T (1991) Immunoassay method for the determination of immunoglobulin-G using bacterial magnetic particles. *Anal Chem* 63:268–272. <https://doi.org/10.1021/ac00003a015>
- Nealson KH (1997) Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? *Annu Rev Earth Planet Sci* 25:403–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.25.1.403>
- Nudelman H, Valverde-Tercedor C, Kolusheva S, Perez Gonzalez T, Widdrat M, Grimberg N, Levi H, Nelkenbaum O, Davidov G, Faivre D, Jimenez-Lopez C, Zarivach R (2016) Structure-function studies of the magnetite-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. *J Struct Biol* 194:244–252. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.001>
- Palache C, Dana JD, Dana ES, Berman H, Frondel C (1944) The system of mineralogy of James Dwight Dana and Edward Salisbury Dana, Yale University, 1837–1892
- Pan Y, Petersen N, Winklhofer M, Davila AF, Liu Q, Frederichs T, Hanzlik M, Zhu R (2005) Rock magnetic properties of uncultured magnetotactic bacteria. *Earth Planet Sci Lett* 237:311–325. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2005.06.029>
- Pan H, Zhu K, Song T, Yu-Zhang K, Lefèvre C, Xing S, Liu M, Zhao S, Xiao T, Wu LF (2008) Characterization of a homogeneous taxonomic group of marine magnetotactic cocci within a low tide zone in the China sea. *Environ Microbiol* 10:1158–1164. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01532.x>
- Peigneux A, Valverde-Tercedor C, López-Moreno R, Pérez-González T, Fernández-Vivas MA, Jiménez-López C (2016) Learning from magnetotactic bacteria: a review on the synthesis of biomimetic nanoparticles mediated by magnetosome-associated proteins. *J Struct Biol* 196:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.026>

- Planavsky NJ, Asael D, Hofmann A, Reinhard CT, Lalonde SV, Knudsen A, Wang X, Ossa FO, Pecoits E, Smith AJB, Beukes NJ, Bekker A, Johnson TM, Konhauser KO, Lyons TW, Rouxel OJ (2014) Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the great Oxidation event. *Nat Geosci* 7:283–286. <https://doi.org/10.1038/NGEO2122>
- Pósfai M, Buseck PR, Bazylinski DA, Frankel RB (1998a) Iron sulfides from magnetotactic bacteria: structure, composition, and phase transitions. *Am Mineral* 83:1469–1481. <https://doi.org/10.2138/am-1998-11-1235>
- Pósfai M, Buseck PR, Bazylinski DA, Frankel RB (1998b) Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science* 280:880–883. <https://doi.org/10.1126/science.280.5365.880>
- Pósfai M, Kasama T, Dunin-Borkowski RE (2006a) Characterization of bacterial magnetic nanostructures using high-resolution transmission electron microscopy and off-axis electron holography. In: Schüler D (ed) *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 197–225. https://doi.org/10.1007/7171_044
- Pósfai M, Moskowitz BM, Arató B, Schüler D, Flies C, Bazylinski DA, Frankel RB (2006b) Properties of intracellular magnetite crystals produced by *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1. *Earth Planet Sci Lett* 249:444–455. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2006.06.036>
- Pósfai M, Lefèvre CT, Trubitsyn D, Bazylinski DA, Frankel RB (2013) Phylogenetic significance of composition and crystal morphology of magnetosome minerals. *Front Microbiol* 4:344. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00344>
- Prozorov T, Perez-Gonzalez T, Valverde-Tercedor C, Jimenez-Lopez C, Yebra-Rodriguez A, Körnig A, Favre D, Mallapragada SK, Howse PA, Bazylinski DA, Prozorov R (2014) Manganese incorporation into the magnetosome magnetite: magnetic signature of doping. *Eur J Mineral* 26:457–471. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2014/0026-2388>
- Quinlan A, Murat D, Vali H, Komeili A (2011) The HtrA/DegP family protease MamE is a bifunctional protein with roles in magnetosome protein localization and magnetite biomineralization. *Mol Microbiol* 80:1075–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07631.x>
- Rahn-Lee L, Komeili A (2013) The magnetosome model: insights into the mechanisms of bacterial biomineralization. *Front Microbiol* 4:352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00352>
- Raschdorf O, Müller FD, Pósfai M, Plitzko JM, Schüler D (2013) The magnetosome proteins MamX, MamZ and MamH are involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Mol Microbiol* 89:872–886. <https://doi.org/10.1111/mmi.12317>
- Rawlings AE, Bramble JP, Walker R, Bain J, Galloway JM, Staniland S (2014) Self-assembled MmsF proteinosomes control magnetite nanoparticle formation in vitro. *Proc Nat Acad Sci USA* 111:16094–16099. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409256111>
- Rayan DA, Zayed MA, Maqsood AA (2019) Structure, optical, and magnetic properties of magnetite nanoparticles doped with zinc and lanthanum and prepared in oxygen and nitrogen atmosphere. *J Trans Metal Compl* 2:236083. <https://doi.org/10.32371/jtmc/236083>
- Richter M, Kube M, Bazylinski DA, Lombardot T, Glöckner FO, Reinhardt R, Schüler D (2007) Comparative genome analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group-specific genes implicated in magnetosome biomineralization and function. *J Bacteriol* 189:4899–4910. <https://doi.org/10.1128/JB.00119-07>
- Rong C, Huang Y, Zhang W, Jiang W, Li Y, Li J (2008) Ferrous iron transport protein B gene (feoB1) plays an accessory role in magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1. *Res Microbiol* 159:530–536. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.06.005>
- Saravanan P, Alam S, Kandpal D, Mathur GN (2002) Effect of substitution of Mn ion on magnetic properties of Fe₃O₄ nanocrystallites. *J Mater Sci Lett* 21:1135–1137. <https://doi.org/10.1023/A:1016527004381>
- Scheffel A, Gärdes A, Grünberg K, Wanner G, Schüler D (2008) The major magnetosome proteins MamGFDC are not essential for magnetite biomineralization in *Magnetospirillum*

- gryphiswaldense* but regulate the size of magnetosome crystals. *J Bacteriol* 190:377–386. <https://doi.org/10.1128/JB.01371-07>
- Schübbe S, Williams TJ, Xie G, Kiss HE, Brettin TS, Martinez D, Ross CA, Schüler D, Cox BL, Nealson KH, Bazylinski DA (2009) Complete genome sequence of the chemolithoautotrophic marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl Environ Microbiol* 75:4835–4852. <https://doi.org/10.1128/AEM.02874-08>
- Schüler D, Baeuerlein E (1996) Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch Microbiol* 166:301–307. <https://doi.org/10.1007/s002030050387>
- Schüler D, Baeuerlein E (1998) Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J Bacteriol* 180:159–162. <https://doi.org/10.1128/JB.180.1.159-162.1998>
- Shimoshige H, Nakajima Y, Kobayashi H, Yanagisawa K, Nagaoka Y, Shimamura S, Mizuki T, Inoue A, Maekawa T (2017) Formation of core-shell nanoparticles composed of magnetite and samarium oxide in *Magnetospirillum magneticum* Strain RSS-1. *PLoS ONE* 12:e0170932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170932>
- Siponen MI, Legrand P, Widdrat M, Jones SR, Zhang WJ, Chang MCY, Faivre D, Arnoux P, Pignol D (2013) Structural insight into magnetochrome-mediated magnetite biomineralization. *Nature* 502:681–684. <https://doi.org/10.1038/nature12573>
- Sparks NHC, Mann S, Bazylinski DA, Lovley DR, Jannasch HW, Frankel RB (1990) Structure and morphology of magnetite anaerobically-produced by a marine magnetotactic bacterium and a dissimilatory iron-reducing bacterium. *Earth Planet Sci Lett* 98:14–22. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(90\)90084-B](https://doi.org/10.1016/0012-821X(90)90084-B)
- Spring S, Lins U, Amann R, Schleifer KH, Ferreira LC, Esquivel DMS, Farina M (1998) Phylogenetic affiliation and ultrastructure of uncultured magnetic bacteria with unusually large magnetosomes. *Arch Microbiol* 169:136–147. <https://doi.org/10.1007/s002030050553>
- Staniland SS, Rawlings AE (2016) Crystallizing the function of the magnetosome membrane mineralization protein Mms6. *Biochem Soc Trans* 44:883–890. <https://doi.org/10.1042/BST20160057>
- Staniland S, Ward B, Harrison A, Van Der Laan G, Telling N (2007) Rapid magnetosome formation shown by real-time x-ray magnetic circular dichroism. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19524–19528. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704879104>
- Staniland S, Williams W, Telling N, Van Der Laan G, Harrison A, Ward B (2008) Controlled cobalt doping of magnetosomes in vivo. *Nat Nanotechnol* 3:158–162. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.35>
- Tanaka M, Okamura Y, Arakaki A, Tanaka T, Takeyama H, Matsunaga T (2006) Origin of magnetosome membrane: proteomic analysis of magnetosome membrane and comparison with cytoplasmic membrane. *Proteomics* 6:5234–5247. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500887>
- Tanaka M, Brown R, Hondow N, Arakaki A, Matsunaga T, Staniland S (2012) Highest levels of Cu, Mn and Co doped into nanomagnetic magnetosomes through optimized biomineralisation. *J Mater Chem* 22:11919. <https://doi.org/10.1039/c2jm31520c>
- Tanaka M, Knowles W, Brown R, Hondow N, Arakaki A, Baldwin S, Staniland S, Matsunaga T (2016) Biomagnetic recovery and bioaccumulation of selenium granules in magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 82:3886–3891. <https://doi.org/10.1128/AEM.00508-16>
- Taoka A, Kondo J, Oestreicher Z, Fukumori Y (2014) Characterization of uncultured giant rod-shaped magnetotactic *Gammaproteobacteria* from a freshwater pond in Kanazawa, Japan. *Microbiology* 160:2226–2234. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078717-0>
- Taoka A, Kiyokawa A, Uesugi C, Kikuchi Y, Oestreicher Z, Morii K, Eguchi Y, Fukumori Y (2017) Tethered magnets are the key to magnetotaxis: direct observations of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 show that MamK distributes magnetosome organelles equally to daughter cells. *mBio* 8:e00679-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00679-17>

- Taylor AP, Barry JC (2004) Magnetosomal matrix: ultrafine structure may template biomineralization of magnetosomes. *J Microsc* 213:180–197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2004.01287.x>
- Taylor AP, Barry JC, Webb RI (2001) Structural and morphological anomalies in magnetosomes: possible biogenic origin for magnetite in ALH84001. *J Microsc* 201:84–106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2001.00760.x>
- Thomas-Keppta KL, Bazylinski DA, Kirschvink JL, Clemett SJ, McKay DS, Wentworth SJ, Vali H, Gibson EK Jr, Romanek CS (2000) Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: Potential Martian magnetofossils. *Geochim Cosmochim Acta* 64:4049–4081. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00481-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00481-6)
- Torres de Araujo FF, Pires MA, Frankel RB, Bicudo CEM (1986) Magnetite and magnetotaxis in algae. *Biophys J* 50:375–378. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83471-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83471-3)
- Uebe R, Schüler D (2016) Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14:621–637. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.99>
- Uebe R, Ahrens F, Stang J, Jäger K, Böttger LH, Schmidt C, Matzanke BF, Schüler D (2019) Bacterioferritin of *Magnetospirillum gryphiswaldense* is a heterotetraicosameric complex composed of functionally distinct subunits but Is not involved in magnetite biomineralization. *MBio* 10:e02795–e02718. <https://doi.org/10.1128/mBio.02795-18>
- Vargas G, Cypriano J, Correa T, Leão P, Bazylinski DA, Abreu F (2018) Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review. *Molecules* 23:2438. <https://doi.org/10.3390/molecules23102438>
- Wang Y, Lin W, Li J, Pana Y (2013) High diversity of magnetotactic *Deltaproteobacteria* in a freshwater niche. *Appl Environ Microbiol* 79:2813–2817. <https://doi.org/10.1128/AEM.03635-12>
- Weiss BP, Kim SS, Kirschvink JL, Kopp RE, Sankaran M, Kobayashi A, Komeili A (2004) Ferromagnetic resonance and low-temperature magnetic tests for biogenic magnetite. *Earth Planet Sci Let* 224:73–89. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2004.04.024>
- Wenter R, Wanner G, Schüler D, Overmann J (2009) Ultrastructure, tactic behaviour and potential for sulfate reduction of a novel multicellular magnetotactic prokaryote from North Sea sediments. *Environ Microbiol* 11:1493–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01877.x>
- Werckmann J, Cypriano J, Lefèvre CT, Dembelé K, Ersen O, Bazylinski DA, Lins U, Farina M (2017) Localized iron accumulation precedes nucleation and growth of magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Sci Rep* 7:8291. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08994-9>
- Winklhofer M, Chang L, Eder SHK (2014) On the magnetocrystalline anisotropy of greigite (Fe₃S₄). *Geochem Geophys Geosys* 15:1558–1579. <https://doi.org/10.1002/2013GC005121>
- Yamagishi A, Tanaka M, Lenders JJM, Thiesbrummel J, Sommerdijk NAJM, Matsunaga T, Arakaki A (2016) Control of magnetite nanocrystal morphology in magnetotactic bacteria by regulation of *mms7* gene expression. *Sci Rep* 6:29785. <https://doi.org/10.1038/srep29785>
- Yiriletu, Iwasa T (2015) Magnetic properties of magnetite synthesized by *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 cultured with different concentrations of ferric iron. *Biotechnol Lett* 37:2427–2433. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1928-8>
- Zélis PM, Pasquevich GA, Stewart SJ, Fernandez van Raap MB, Apesteguy J, Bruvera IJ, Laborde C, Pianciola B, Jacobo S, Sanchez FH (2013) Structural and magnetic study of zinc-doped magnetite nanoparticles and ferrofluids for hyperthermia applications. *Phys D: Appl Phys* 46:125006. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/12/125006>
- Zhang T, Pan Y (2018) Constraining the magnetic properties of ultrafine and fine-grained biogenic magnetite. *Earth Planets Space* 70:206. <https://doi.org/10.1186/s40623-018-0978-2>
- Zhang WY, Zhou K, Pan HM, Yue HD, Jiang M, Xiao T, Wu LF (2012) Two genera of magnetococci with bean-like morphology from intertidal sediments of the Yellow sea, China. *Appl Environ Microbiol* 78:5606–5611. <https://doi.org/10.1128/AEM.00081-12>
- Zhang H, Menguy N, Wang F, Benzerara K, Leroy E, Liu P, Liu W, Wang C, Pan Y, Chen Z, Li J (2017) Magnetotactic coccus strain SHHC-1 affiliated to *Alphaproteobacteria* forms octahedral magnetite magnetosomes. *Front Microbiol* 8:969. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00969>

PROCESSO PARA RECUPERAÇÃO DE MICROALGAS UTILIZANDO
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ORIGEM BACTERIANA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A invenção pertence aos métodos de separação de microrganismos a partir de seus meios de cultivo e tem particular aplicação à concentração e purificação de microalgas. O método descrito visa propiciar uma maneira mais custo-efetiva de fornecer biomassa de microalgas oleaginosas para processos de produção de biocombustíveis.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Nos últimos anos vem sendo dado um destaque maior às microalgas devido à sua possível utilização como substituto sustentável para derivados de petróleo e produtos combustíveis. A tecnologia de produção de biocombustíveis avançados e demais bioprodutos a partir de microalgas se encaixa no contexto da transição para uma economia de baixo carbono, já eleita como estratégia nacional por países altamente desenvolvidos como Suécia e Suíça.

[003] No entanto, um dos maiores desafios sobre a utilização da biomassa de microalgas como matéria-prima para biocombustíveis e demais aplicações biotecnológicas é encontrar um meio econômico e eficaz para separação da biomassa de microalgas e utilização desta em aplicações comerciais. Para se utilizar a biomassa, inicialmente ela deve ser extraída do meio de cultura líquido e concentrada para que o seu processamento seja eficaz.

[004] Segundo a literatura a concentração de biomassa pode contribuir com 20 a 30% nos custos totais de um processo de produção de biocombustíveis, sendo o tempo total de separação um dos principais responsáveis pelo custo elevado das técnicas convencionais, como centrifugação, filtração e floculação. Além disso, o elevado custo para recuperação está associado ao tamanho reduzido das células e às baixas

[005] concentrações de biomassa que não permitem que métodos convencionais de separação, tais como filtração e centrifugação sejam usados, já que para tais condições são requeridas elevadas quantidades de energia.

[006] A expansão da produção de microalgas para obtenção de bioprodutos depende de uma série de fatores que possam viabilizar a economicidade dos processos envolvidos na obtenção de biomassa ("upstream") e no seu refino ("downstream"). Um dos aspectos críticos para o atingimento da economicidade se destaca a etapa de coleta (separação).

[007] Na busca por uma maneira mais econômica e eficaz para realizar a coleta da biomassa de microalgas produzida, existe a necessidade de encontrar um processo de baixa energia e de tempo total reduzido. A sedimentação, mesmo após a floculação, é relativamente lenta, o que leva a longos tempos de processamento. Além disso, a maioria dos floculantes poliméricos ainda possuem um preço relativamente alto e uma eficiência limitada de remoção de sólidos suspensos. Diante disso, a utilização de nanopartículas magnéticas passou a ser explorada como alternativa ou suplemento à utilização de agentes coagulantes e floculantes convencionais.

[008] As principais vantagens de nanopartículas magnéticas são a alta área de superfície de materiais nanométricos, que levam a uma maior eficiência de remoção, a rápida separação dos sólidos adsorvidos através da aplicação de campo magnético e a reutilização, facilitada pela recuperação magnética do agente floculante. Entretanto, os elevados custos dos processos químicos de produção de nanopartículas magnéticas sintéticas e os impactos ambientais - relacionados principalmente ao revestimento das nanopartículas - são as principais limitações ao seu uso na remoção de sólidos suspensos.

[009] Por exemplo, Zhu *et al.* (2017) descrevem um método para recuperação de microalgas utilizando nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4) ou óxido de ítrio com ferro ($\text{Y}_3\text{Fe}_5\text{O}_{12}$) sem revestimento. Apesar das nanopartículas de Zhu *et al.* promoverem a recuperação de microalgas, o emprego de tais formas não revestidas não é sustentável. É sabido que nanopartículas sintéticas possuem menor vida útil em razão da ausência de revestimento (Klektoka *et al.*, 2021). Somado a isso, em decorrência da degradação natural destas nanopartículas, há elevada liberação de cátions di- e tri- valentes de ferro.

[0010] As nanopartículas magnéticas sintéticas são cristalograficamente imperfeitas com forma e faces pouco definidas, o que facilita sua oxidação, perda de propriedade magnética e dissolução do nanocristal. Diversos autores apontam a degradação/dissolução de nanopartículas de magnetita em soluções com pH ácido, condição necessária à separação das células (Ike e Duke, 2018). Tal liberação abrupta de ferro resulta em efeitos tóxicos às células alvos, o que pode prejudicar aplicações downstream durante o processamento que necessitem da célula viável ou sem extravasamento de conteúdo citoplasmático (Lei *et al.*, 2016).

[0011] Ademais, o aumento do ferro em tanques de produção de microalgas tende a ocasionar o aumento da comunidade bacteriana, inclusive de patógenos, e relações de competição, o que seria um problema adicional em escala industrial por diminuir a produtividade (Fuentes *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2021).

[0012] Por sua vez, documento KR20140133311 revela um método para recuperação de microalgas utilizando nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana. O revestimento com o polissacarídeo supostamente permite a

preservação da nanopartícula e sua reutilização em procedimentos seguidos.

[0013] No entanto, o revestimento das nanopartículas com quitosana emprega Pluronic F-127 – um copolímero surfactante hidrofílico não iônico. Este é um composto com conhecida toxicidade para diversos organismos marinhos (Hering *et al.*, 2020; Rahdar *et al.*, 2020). O processo de revestimento de nanopartículas magnéticas com quitosana também faz o uso de tripolifosfato de sódio (STPP), um poluente aquático que não é removido por estações de tratamento de água e vai atuar na eutrofização de ecossistemas de água doce (Lu *et al.*, 2014).

[0014] Ademais, a quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido a partir da desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos. Apesar de ser um revestimento natural, ou seja, de baixo impacto ambiental, sua produção é custosa e, por isso, tem impacto deletério sobre a viabilidade econômica de processos de coleta de microalgas que fazem uso deste tipo de nanopartícula.

[0015] A limitação dos flocculantes já descritos em promover a coleta de microalgas marinhas em meios de alta salinidade (Vandamme *et al.*, 2010; Roselet *et al.*, 2017) assevera as questões de sustentabilidade e viabilidade econômica. Nestes casos é descrita a perda de eficiência do flocculante ou o aumento demasiado de sua concentração (Lam *et al.*, 2015) para que haja efeito de floculação das microalgas.

[0016] Com a necessidade de otimização do processo de concentração de células para sua recuperação objetivando redução de custo e sustentabilidade dos bioprodutos derivados (p.ex. biocombustíveis, biofertilizantes ou biostimulantes), foi proposta a utilização de nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs). A presente invenção

descreve a utilização de nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs), que já possuem revestimento natural, o que reduz extraordinariamente o custo de produção, além de ser um processo verde sem a geração de resíduos tóxicos.

[0017] A utilização de NMOBs promoveu a concentração e recuperação das células alvo em segundos nos experimentos de bancada, o que indica grande potencial para resolver o problema técnico relatado.

[0018] As NMOBs apresentam-se, portanto, como uma ferramenta inovadora, uma vez que já possuem naturalmente uma membrana biológica, a qual pode atuar na interação mais eficiente entre nanopartícula e óleo, além de possuírem propriedades químicas e físicas que os tornam altamente estáveis. Além disso, são produzidos pelo crescimento de bactérias em fermentadores, sendo processos sustentáveis e de baixo custo comparativamente às nanopartículas magnéticas sintéticas com propriedades semelhantes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0019] A invenção emprega nanopartículas magnéticas de origem bacteriana para aprimorar a recuperação de microalgas a partir de uma suspensão, seja uma cultura de células, uma suspensão de água salgada, uma suspensão de água doce ou um efluente.

[0020] Em uma modalidade, a invenção prevê o uso de nanopartículas magnéticas de origem bacteriana (NMOBs) para recuperar microalgas presentes em uma suspensão.

[0021] Em uma modalidade preferencial, o uso de NMOBs previsto pela invenção é para recuperação de microalgas a partir de uma suspensão com concentração de sal igual ou superior a 5 g/mL.

[0022] Conforme a invenção, as microalgas podem ser selecionadas de *Chlorella* sp., *Cryptocodinium* sp., *Cylindrotheca* sp., *Desmodesmus* sp., *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp., *Monoraphidium* sp., *Nannochloris* sp.,

Nannochloropsis, *Neochloris* sp., *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum* sp., *Porphyridium* sp., *Scenedesmus* sp., *Schizochytrium* sp., *Tetraselmis* sp. ou quaisquer outros gêneros sabidamente úteis à produção de bio-óleos.

[0023] Em outra modalidade, a invenção fornece um processo para recuperação de microalgas em uma suspensão utilizando NMOBs como agente flocculante. O processo da invenção compreende protonar a superfície celular das microalgas, adicionar nanopartículas magnéticas de origem bacteriana à suspensão e aplicar uma carga magnética externa, assim promovendo a floculação das microalgas.

[0024] Em um aspecto, o processo da invenção prevê que a suspensão de microalgas é selecionada de: uma cultura de microalgas, uma fonte de água salgada, uma fonte de água doce ou um efluente.

[0025] Em outro aspecto, o processo da invenção prevê que a suspensão tem concentração de sal igual ou superior a 5 g/mL.

[0026] Ainda, em um aspecto adicional, o dito processo prevê que a superfície celular das microalgas é protonada pela adição de um tampão ácido à suspensão.

[0027] Em um outro aspecto, o processo compreende a adição de NMOBs à suspensão de microalgas em uma concentração entre 50 e 100 µg/mL.

[0028] Finalmente, conforme o processo da invenção, as microalgas podem ser selecionadas de *Chlorella* sp., *Cryptocodinium* sp., *Cylindrotheca* sp., *Desmodesmus* sp., *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp., *Monoraphidium* sp., *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis*, *Neochloris* sp., *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum* sp., *Porphyridium* sp., *Scenedesmus* sp., *Schizochytrium* sp., *Tetraselmis* sp. ou quaisquer outros gêneros sabidamente úteis à produção de bio-óleos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0029] A Figura 1 ilustra NMOBs octaédricas produzidas por *Mf. australis* cepa IT-1 (A) e NMOBs prismáticas produzidas por *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T (B).

[0030] A Figura 2 resulta da avaliação da concentração magnética de *Scenedesmus* sp. pela utilização de NMOBs octaédricas e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0031] A Figura 3 resulta da avaliação da concentração magnética de *Desmodesmus* sp. pela utilização de NMOBs octaédricas e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0032] A Figura 4 resulta da avaliação da concentração magnética de *Monoraphidium* sp. pela utilização de NMOBs octaédricas e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0033] A Figura 5 resulta da avaliação da concentração magnética de *Nannochloropsis* sp. pela utilização de NMOBs octaédricas e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0034] A Figura 6 resulta da avaliação da concentração magnética de *Dunaliella* sp. pela utilização de NMOBs octaédricas e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0035] A Figura 7 apresenta imagens obtidas por vídeos de cultura de *Desmodesmus* sp. contendo ou não NMOBs octaédricas antes da aplicação do campo magnético (A) e após a aplicação do campo magnético por 20 segundos (B). Note que a clarificação do sobrenadante do tubo contendo a cultura de células e NMOBs em (B) após a aplicação do campo magnético

em comparação com o controle (cultura sem adição de NMOBs). Em (B) é possível observar o acúmulo de células na parede do tubo próxima ao ímã no tubo contendo a cultura e NMOBs. O mesmo resultado foi observado para as outras culturas avaliadas, exceto *Monoraphidium* sp.

[0036] A Figura 8 apresenta fotomicrografias derivadas de microscopia de contraste interferencial diferencial de culturas de *Desmodesmus* sp. submetidas a diferentes condições de pH e a NMOBs octaédricas (A-D). As condições controle (sem adição de NMOBs) estão representadas de (E-H).

[0037] A Figura 9 apresenta fotomicrografias derivadas de microscopia de contraste interferencial diferencial de culturas de *Scenedesmus* sp. submetidas a diferentes condições de pH e a NMOBs octaédricas (A-D). As condições controle (sem adição de NMOBs) estão representadas de (E-H).

[0038] A Figura 10 apresenta fotomicrografias derivadas de microscopia de contraste interferencial diferencial de culturas de *Monoraphidium* sp. submetidas a diferentes condições de pH e a NMOBs octaédricas (A-D). As condições controle (sem adição de NMOBs) estão representadas de (E-H).

[0039] A Figura 11 resulta da avaliação da concentração magnética de *Scenedesmus* sp. pela utilização de NMOBs prismáticas e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0040] A Figura 12 resulta da avaliação da concentração magnética de *Monoraphidium* sp. pela utilização de NMOBs prismáticas e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0041] A Figura 13 resulta da avaliação da concentração magnética de *Scenedesmus* sp. pela utilização de NPSS e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no

sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0042] A Figura 14 resulta da Avaliação da concentração magnética de *Desmodesmus* sp. pela utilização de NPSs e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0043] A Figura 15 resulta da avaliação da concentração magnética de *Nannochloropsis* sp. pela utilização de NPSs e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0044] A Figura 16 resulta da avaliação da concentração magnética de *Monoraphidium* sp. pela utilização de NPSs e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0045] A Figura 17 resulta da avaliação da concentração magnética de *Dunaliella* sp. pela utilização de NPSs e aplicação de campo magnético externo. (A) Células no sobrenadante após recuperação magnética. (B) Taxa de recuperação de células em função do pH.

[0046] A Figura 18 ilustra o comportamento de uma cultura de *Scenedesmus* sp., contendo ou não NPSs, antes da aplicação do campo magnético (A) e após a aplicação do campo magnético por 20 segundos (B). Destaque-se que não há clarificação do sobrenadante do tubo contendo a cultura de células e NPSs em (B) após a aplicação do campo magnético em comparação com o controle. O mesmo resultado foi observado para as outras culturas avaliadas.

[0047] A Figura 19 ilustra o comportamento de NPSs de magnetita. (A) Nanopartículas sintéticas obtidas por coprecipitação e utilizadas nos ensaios de coleta magnética título de comparação com a eficiência das NMOBs. (B)

Nanopartículas de magnetita sintética similares às utilizadas na referência D1 (Leon-Reyes et al., 2014).

[0048] A Figura 20 demonstra a taxa de recuperação de microalgas do gênero *Nannochloropsis*. A. Taxa de recuperação estatisticamente significativa de $23,01 \pm 4,94\%$ e (***) $17,31 \pm 3,27\%$ (**) em tampão citrato com pH 3,1 e 6,4, respectivamente. B. Taxa de recuperação estatisticamente significativa apenas em tampão citrato com pH 3,1 (**). C. Não houve recuperação estatisticamente significativa ao utilizar o floculante ($4,30 \pm 1,81\%$) na condição de cultivo com pH 8,0.

[0049] A Figura 21 mostra a superfície de resposta da taxa de recuperação de *Nannochloropsis* sp. utilizando NMOBs variando as condições de pH e concentração de NaCl. A., B. e C. Superfície de resposta projetada em três dimensões com valores de pH fixados nos níveis -1, 0 e 1 correspondentes a valores de pH de 3,1, 4,8 e 6,4, respectivamente. Valores da concentração de NaCl foram fixados nos níveis -1, 0 e 1 que correspondem a 0, 20 e 40 g/L, respectivamente. D. Projeção em duas dimensões da superfície de resposta. São mostrados o ponto ótimo (cabeça de seta laranja), o ponto da acidificação da condição de cultivo com 40 g NaCl/L (cabeça de seta vermelha) e o ponto de acidificação na condição central da concentração de NaCl (20 g/L; cabeça de seta azul).

[0050] A Figura 22 ilustra a coleta e separação magnética de microalgas do gênero *Nannochloropsis*. Ensaio realizado com células ressuspensas em tampão citrato com pH fixo em 3,1 e variações na condição de salinidade. O campo magnético foi gerado a partir do posicionamento de um ímã de neodímio-boro na lateral do tubo. A., B. e C. Ensaio em *Nannochloropsis* sp. após a concentração magnética da biomassa na parede do tubo próxima ao ímã. Foi possível observar resposta ao campo magnético gerado nas condições de

0, 20 e 40 g/L. Em cada imagem à esquerda está posicionado o tubo controle com a espécie de microalga sem adição de NMOBs e à direita está posicionada a condição de tratamento com a adição de NMOBs.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0051] A menos que especificado de maneira distinta, os termos usados ao longo deste relatório descritivo têm seus significados comuns na técnica, dentro do contexto da divulgação e no contexto específico em que cada termo é usado. Certos termos que são usados para descrever a divulgação são discutidos abaixo, ou em outro lugar na especificação, para fornecer orientação adicional ao profissional em relação à descrição da divulgação. As publicações aqui citadas e o material para o qual são citados são especificamente incorporados por referência em sua totalidade.

[0052] Será apreciado que a mesma coisa pode ser dita de maneiras distintas. Consequentemente, linguagem alternativa e sinônimos podem ser usados para qualquer um ou mais dos termos aqui discutidos. Nenhum significado especial deve ser colocado sobre se um termo é elaborado ou discutido aqui. Sinônimos para certos termos são fornecidos, mas a exemplificação de alguns sinônimos não exclui o potencial uso de outros porventura não listados aqui.

[0053] Conforme empregado nesta descrição, o termo nanopartícula denota estruturas ou partículas de matéria possuindo tamanho na escala nanométrica (nm). Portanto, no contexto da invenção uma nanopartícula, em geral, tem um tamanho de partícula médio inferior a 1000 nm, por exemplo, cerca de 1 nm, cerca, de 10 nm, cerca de 100, nm, cerca de 250 nm, cerca de 500 nm, ou de 500 a 999 nm.

[0054] O termo "nanopartícula magnética", no contexto desta invenção, denota uma nanopartícula possuindo propriedades magnéticas. As "nanopartículas magnéticas"

podem ser compostas de metais, ligas metálicas, sulfetos e/ou óxidos metálicos de um ou mais elementos metálicos, tais como, por exemplo, ferro, níquel, cobalto, manganês, bismuto, zinco, gadolínio, estrôncio, cobre, prata, ouro, zinco, cádmio, prata, alumínio ou outros reconhecidos pelo técnico no assunto.

[0055] Uma nanopartícula magnética de origem biológica, também referida por NMOB ao longo desta descrição, diz respeito à estrutura formada pelo isolamento de magnetossomos, uma organela presente em bactérias magnetotáticas. Tais magnetossomos são cadeias de grânulos de óxidos ou sulfetos metálicos, geralmente de tamanho uniforme, perfilados nos citoplasmas das bactérias magnetotáticas. Na maioria das vezes, são constituídos por óxido de ferro (Fe_3O_4), conhecido por magnetita, ou sulfeto de ferro (Fe_3S_4), conhecido por greigita). São os magnetossomos que conferem a capacidade a bactérias magnetotáticas de se deslocarem em resposta a campos magnéticos.

[0056] Diversos tipos de bactérias, incluindo cocos, bacilos, vibriões e espirilos possuem capacidade de realizar biomineralização - processo pelo qual são formados minerais que compõem os magnetossomos. Na natureza, magnetossomos podem ser de tamanhos que variam entre 35 e 250 nm e podem assumir formas distintas como, por exemplo, cubooctaédricos, prismáticos ou em forma de paralelepípedo.

[0057] Uma das principais vantagens dos magnetossomos para processos de recuperação de microalgas é a membrana fosfolipídica que os envolve naturalmente, conferindo aos magnetossomos natural compatibilidade com sistemas biológicos. Em geral, o invólucro dos magnetossomos é composto por 98% de lipídeos e 2% de outros componentes, incluindo proteínas. A maior parte dos lipídeos, particularmente, fosfolipídeos (Yoshino *et al.*, 2008).

[0058] Magnetossomos podem ser obtidos de células selvagens bem como de células geneticamente modificadas para produzi-los artificialmente e/ou para sintetizar magnetossomos com funcionalidades introduzidas artificialmente (e.g. moléculas de vetorização como, por exemplo, anticorpos). Por exemplo, o documento US6251365B1 ensina o isolamento de magnetossomos da bactéria *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Já Yoshino et al (2008) ensinam que uma bactéria *Magnetospirillum magneticum* da cepa AMB-1 pode ser geneticamente manipulada para expressar proteínas quiméricas contendo um domínio de proteína A na membrana do magnetossomo, aprimorando o uso destes para recuperação de células opsonizadas com anticorpos. Outra possibilidade, conforme ensina US20100297022A1, é promover a expressão de magnetossomos artificialmente em células eucarióticas e delas extrair as nanopartículas magnéticas.

[0059] No contexto desta invenção, o termo "microalga" representa um grupo de microrganismos unicelulares, autotróficos, procarióticos ou eucarióticos. Diversos gêneros de microrganismos se enquadram na classificação de microalga, como por exemplo, *Chlorella* sp., *Cryptothecodinium* sp., *Cylindrotheca* sp., *Desmodesmus* sp., *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp., *Monoraphidium* sp., *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis*, *Neochloris* sp., *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum* sp., *Porphyridium* sp., *Scenedesmus* sp., *Schizochytrium* sp., *Tetraselmis* sp. ou quaisquer outros gêneros sabidamente úteis à produção de bio-óleos.

[0060] Microalgas podem ser cultivadas ou obtidas a partir de uma fonte natural. Por exemplo, microalgas podem ser cultivadas por técnicas conhecidas de um técnico no assunto, como aquelas divulgadas, ilustrativamente, em Yoshino et al (2008), US6251365B1 e US20100297022A1, incorporados aqui por referência. Ainda, microalgas podem ser isoladas a partir de suspensões obtidas na natureza,

tais como água do mar, fontes de água doce e/ou efluentes orgânicos.

[0061] A invenção é particularmente aplicável ao isolamento de microalgas a partir de suspensões com alta salinidade. No contexto da presente invenção, a expressão "alta salinidade" e o termo análogo "hipersalina(o)" dizem respeito a soluções aquosas de qualquer natureza com concentração de sal (e.g., NaCl) igual ou maior a pelo menos 5 g/L, pelo menos 10 g/L, pelo menos 15 g/L, pelo menos 20 g/L, pelo menos 30 g/L ou pelo menos 40 g/L.

[0062] Pela presente invenção, microalgas podem ser isoladas a partir de uma suspensão de maneira simples. Com o emprego das NMOBs, é possível isolar microalgas a partir de uma cultura com cerca de 80% de eficiência em um pequeno número de passos, a saber: (1) resolução de conflito de cargas, (2) incubação com nanopartículas magnéticas de origem biológica e (3) aplicação de campo magnético externo.

[0063] Posto que a membrana lipídica que reveste as NMOBs tende a possuir carga líquida negativa, pode-se protonar a superfície das microalgas através da acidificação do meio com um tampão de caráter ácido como, por exemplo, tampão citrato para favorecer a interação eletrostática entre as microalgas e NMOBs. O pH do tampão pode ser fixado em pelo menos 3,0, pelo menos 4,0, pelo menos 5,0 ou pelo menos 6,0.

[0064] Em seguida, as microalgas da cultura são incubadas com as NMOBs por um tempo que pode variar entre cerca de 1 e cerca de 20 minutos. Nesta etapa, as NMOBs são adicionadas à cultura de microalgas a uma concentração que pode variar de acordo com o número de células de microalgas na cultura. Por exemplo, NMOBs podem ser adicionadas à cultura em quantidade suficiente para atingir uma concentração final de pelo menos $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, pelo menos $80 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ou pelo menos $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$.

[0065] Finalmente, uma fonte de força magnética externa é aplicada sobre a cultura de microalgas incubadas com NMOBs, promovendo a floculação das microalgas e favorecendo então a sua separação do meio. A aplicação de campo magnético alternado em etapa posterior pode danificar a parede celular das microalgas e facilitar a extração de lipídeos destas. O processo de recuperação magnética pode ter sua eficiência aumentada pela associação à eletrofloculação.

[0066] No contexto da presente invenção, o termo "floculação" e variantes dizem respeito ao processo pelo qual pequenas partículas presentes em uma suspensão se agregam, formando flocos. Tais flocos podem então ser recuperados por, por exemplo, decantação. O fenômeno de floculação pode ser induzido por um agente químico (e.g., floculante químico) ou físico (e.g., eletrofloculação). A presente invenção fornece um meio físico de promover a floculação de microalgas através do uso de NMOBs, que são responsivas à aplicação de uma força magnética externa.

[0067] Posteriormente, as NMOBs podem ser recuperadas e separadas das microalgas por processo químico ou físico, garantindo alta concentração e pureza do material de interesse, e possibilidade de reuso das NMOBs, o que reduz custos e é uma característica de processos sustentáveis.

[0068] A seguir, a invenção passa a ser ilustrada através de exemplos de concretizações, que não exaurem todas as possibilidades alcançáveis pelo conceito inventivo aqui descrito, mas representam todas as modalidades. Os exemplos adiante são apresentados de modo a fornecer ao técnico no assunto descrição completa de como são preparadas, avaliadas e empregadas as composições de clareamento dental desta invenção. Um técnico no assunto, à luz da presente divulgação, reconhecerá que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são divulgadas e ainda

assim obter um resultado semelhante ou equivalente sem se afastar do espírito e do escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Obtenção de nanopartículas magnéticas bacterianas

Cultivo de bactérias magnetotáticas

[0069] Nesta etapa foram utilizadas as bactérias magnetotáticas *Magnetovibrio blakemorei*, cepa MV-1^T, e *Magnetofaba australis*, cepa IT-1. Volumes correspondentes a uma concentração final de 10^8 células·mL⁻¹ foram inoculados em um biorreator de bancada de 5 L (volume de trabalho de 2 L) (Minifors, Infors HT - Basileia, Suíça) contendo meio de crescimento fresco. Os parâmetros de cultura foram estabelecidos como se segue: pH 7,0 (ajustado com 1,0 N NaOH ou HCl), velocidade de agitação de 100 RPM, 28°C. Antes do inóculo a condição anaeróbica foi alcançada pela purga de nitrogênio (N₂) estéril e em meio fresco até a leitura do sensor de O₂ chegar a zero. Em seguida, o meio foi purgado com N₂O por 15 min no caso de *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T e foi permitida a entrada de O₂, sendo o mesmo mantido a 0,5% de para *Magnetofaba australis* cepa IT-1. Os cultivos foram realizados por 120 horas.

Extração e purificação de nanopartículas magnéticas bacterianas (magnetossomos)

[0070] Ao fim do período de crescimento em biorreator, as células foram coletadas por centrifugação a $6100 \times g$ a 4 °C por 15 min. Os pellets de células foram lavados e ressuspensos em 15 mL de tampão Hepes (20 mM, pH 6,8). Em seguida, as células foram submetidas à lise por disrupção ultrassônica em sonicador de ponteiros (VCX500, Sonics, Newtown, EUA) na amplitude de 40%, frequência 20 kHz, em 60 ciclos de 30 s com intervalos de 30 s. Os NMOBs foram concentrados magneticamente por um ímã de neodímio-boro fixado na parte externa do tubo por 12 h a 4 °C. Os cristais

foram transferidos para tubos de polipropileno de 1,5 mL e ressuspensos em tampão Hepes (10 mM, pH 6,8) com NaCl (200 mM). Em seguida os cristais foram lavados em banho de ultrassom (Branson 2200, Emerson, Rochester, EUA) por 4 ciclos de 30 min, com concentração magnética e troca do tampão a cada ciclo. Observação: as células podem ser recuperadas por uso do campo magnético, mas pela facilidade em laboratório foi feita a centrifugação.

Caracterização das nanopartículas

[0071] Células e NMOBs purificados foram adicionados sobre grades de cobre revestidas com filme-suporte de polivinilformal e carbono, sendo secas ao ar para observação em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Morgagni, Hillsboro, EUA) operando a 80 kV em um aumento direto de 36.000 e 89.000 vezes para cada caso, respectivamente. O número médio de NMOBs por célula é determinado pelo número médio de NMOBs em 30 células para cada ponto de amostragem. A massa de NMOBs extraídos foi quantificada pelo método descrito por Yoshino et al. (2008).

Exemplo 2 - Recuperação magnética de microalgas

[0072] Para os ensaios de coleta magnética de microalgas foram utilizadas as células: *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Dunaliella* sp. As células foram cultivadas no meio de cultura estabelecido. Como estratégia de floculação para resolução do conflito entre cargas de superfície, a superfície das microalgas foi protonada utilizando: (i) tampão citrato preparado nas faixas de pH 3,1, 4,8 e 6,4; e (ii) tampão fosfato preparado em pH 7,2. As amostras foram preparadas em triplicata para cada condição e tipo celular. As amostras foram tratadas com NMOBs prismáticos e octaédricos na concentração final de $80 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ e incubadas durante 5 min. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Paraná, Brasil) para

densidade óptica em 680 nm. Paralelamente a isso, as amostras também foram observadas em microscopia óptica em contraste interferencial diferencial. O mesmo experimento foi feito com nanopartículas magnéticas sintéticas produzidas pelo método de coprecipitação descrito por Santos e colaboradores (2018).

[0073] Nos ensaios de coleta magnética de microalgas a utilização de NMOBs octaédricas (Figura 1A) promoveu a remoção de células no sobrenadante em culturas de *Scenedesmus* sp. (Figura 2), *Desmodesmus* sp. (Figura 3), *Monoraphidium* sp. (Figura 4), *Nannochloropsis* sp. (Figura 5) e *Dunaliella* sp. (Figura 6). Em todos os casos a eficiência da taxa de recuperação de células foi diretamente relacionada à acidificação do meio, atingindo valores próximos a 70% de recuperação celular nos 5 minutos de aplicação de campo magnético externo. De fato, a aplicação de ímã por 20 segundos e registro por vídeo (Figura 7) indica que o tempo de recuperação é bem inferior aos 5 minutos estabelecidos na metodologia. Exceções a essa taxa de recuperação foram encontrados para as espécies *Dunaliella* sp. (melhor taxa de recuperação próxima a 60%) e *Monoraphidium* sp. (melhor taxa de recuperação próxima a 12%).

[0074] A observação da interação de NMOBs octaédricas com as células por microscopia óptica mostrou que a adição das nanopartículas magnéticas promove agregação das células com as mesmas (Figuras 8 e 9). Exceto por *Monoraphidium* sp. que parece excluir as NMOBs, aglomerando-as isoladamente (Figura 10), o que mostra que existe alguma característica físico-química desta célula que impede a interação com NMOBs. Não é descrito na literatura a razão exata de tal fenômeno. No entanto, um estudo e experimentação detalhada pode vir a resolver esta questão e possibilitar a utilização de NMOBs na coleta de *Monoraphidium* sp. Nos ensaios de coleta de microalgas utilizando NMOBs prismáticas (Figura 1B) foram

utilizadas *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium* sp., uma vez que essas células apresentaram o melhor e pior resultado na avaliação anterior utilizando NMOBs octaédricos. NMOBs prismáticos promoveram a coleta de células em culturas de *Scenedesmus* sp. (Figura 11) e *Monoraphidium* sp. (Figura 12). A eficiência de recuperação de células através da aplicação de campo magnético foi superior no caso da cultura de *Scenedesmus* sp. (recuperação de $82,03 \pm 6,55\%$ em pH 3,1) como observado anteriormente utilizando NMOBs octaédricas. A eficiência da taxa de recuperação de células foi diretamente relacionada à acidificação do meio, atingindo valores próximos a 80% de recuperação celular em 5 minutos de aplicação de campo magnético externo. Novamente foi observado que a aplicação de ímã por 20 segundos é suficiente para determinar a agregação de células visualmente.

[0075] Quando nanopartículas magnéticas sintéticas foram utilizadas, taxas de recuperação inferiores à NMOBs octaédricas e prismáticas foram observadas para *Scenedesmus* sp. (Figura 13), *Desmodesmus* sp. (Figura 14), *Monoraphidium* sp. (Figura 15), *Nannochloropsis* sp. (Figura 16) e *Dunaliella* sp. (Figura 17).

[0076] Contrariando os resultados de coleta de microalgas baseados em absorbância mostrado acima, a avaliação visual da recuperação de microalgas por nanopartículas sintéticas através da aplicação de campo magnético externo nos mostrou que não havia aglomeração de células, o que inviabiliza a coleta magnética (exemplificação com ensaio de coleta magnética de *Scenedesmus* sp.; Figura 18). Apesar de a Figura 18 ser a representação do experimento de coleta magnética com a cultura de *Scenedesmus* sp. submetida a recuperação magnética por nanopartículas sintéticas, o mesmo resultado, isto é, a ausência de aglomeração/concentração de células quando campo

magnético foi aplicado, se repetiu nos experimentos com as outras culturas de células.

[0077] É provável que devido ao fato de nanopartículas sintéticas não serem cristais com faces bem definidas e cristalograficamente perfeitos, estas nanopartículas magnéticas sintéticas estejam sendo dissolvidas no meio, o que causaria a liberação de grande quantidade de ferro e alterações celulares, inclusive a lise celular. Diversos autores apontam a dissolução de nanopartículas magnéticas sintéticas de magnetita em soluções com pH ácido, condição necessária à separação das células (Ike e Duke, 2018), o que gera danos celulares, inclusive extravasamento de conteúdo citoplasmático (Lei et al., 2016).

[0078] No caso dos experimentos mostrados acima, nos quais a coleta magnética de microalgas é baseada na absorvância, há indicação de que a dissolução das nanopartículas magnéticas sintéticas causa a "falsa recuperação de células". É importante salientar que as nanopartículas sintéticas utilizadas neste experimento são similares as utilizadas em KR20140133311 (Figura 19). Assim, o desempenho de NMOBs se mostrou significativamente superior ao exibido por nanopartículas magnéticas sintéticas, pois NMOBs são estáveis e, de fato, promovem a aglomeração/concentração celular quando campo magnético externo (ímã) é aplicado.

Exemplo 3 - Recuperação magnética de microalgas em meios hipersalinos

[0079] Para demonstrar a capacidade de NMOBs promoverem a recuperação de microalgas a partir de meios com alta salinidade, avaliou-se a eficiência de coleta magnética de células *Nannochloropsis* sp. suspensas em meio com salinidade de 40 g/L, tendo como comparação a utilização de nanopartículas e de um flocculante químico padrão. Diversos ensaios foram realizados para investigar o efeito de

diferentes condições de salinidade e pH na eficiência das NMOBs.

Estabelecimento de modelo matemático para determinação de condições de salinidade e pH

[0080] Células *Nannochloropsis* sp. foram cultivadas em meio BG11 contendo 40 g/L de NaCl. Para o ensaio preliminar comparativo de coleta de microalgas por NMOBs, nanopartículas magnéticas sintéticas e floculante (composto mantido sob sigilo), a cultura foi utilizada diretamente no ensaio sendo acrescentada a mesma quantidade de NMOBs e nanopartículas para que a concentração final de 80 µg/mL fosse atingida. A concentração do floculante utilizado foi de 1:5 de amostra. O experimento foi realizado em pH 3,1 e 6,4. Após a concentração magnética, no caso de utilização de NMOBs ou nanopartículas magnéticas sintéticas, e da espera de floculação, no caso da utilização do floculante, o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Essas amostras foram lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Paraná, Brasil) na densidade óptica em 680 nm para determinação da taxa de recuperação das microalgas. As nanopartículas magnéticas sintéticas utilizadas foram produzidas pelo método de coprecipitação descrito por Santos e colaboradores (2018). A inferência estatística pelo teste de ANOVA de duas vias com pós-teste de comparações múltiplas de Sidak foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad, EUA).

[0081] Para o planejamento experimental no qual diferentes condições de salinidade e pH foram testadas, as algas obtidas na cultura em meio BG11, como descrito acima, foram coletadas e centrifugadas a 3.000 rpm a 24 °C por 10 minutos em microtubos de polipropileno de 1,5 mL. As células foram ressuspensas em soluções tampão citrato em diferentes salinidades, conforme delineado em planejamento experimental. O planejamento experimental realizado foi do

tipo Box-Benkhen para duas variáveis, i.e., pH e salinidade (indiretamente pela concentração de NaCl presente no meio), em 3 níveis para cada variável.

[0082] As faixas de pH foram os valores de 3,1, 4,8 e 6,4, relativas aos níveis -1, 0 e +1. As faixas de salinidade, indiretamente conferida pela adição de NaCl no meio, foram de 0, 20 e 40 g/L, relativas aos níveis -1, 0 e +1, respectivamente, para *Nannochloropsis* sp. O desenho do planejamento, geração da matriz do modelo, cálculo dos coeficientes e plotagem dos resultados foram realizadas utilizando o software Microsoft Excel 2016 (Microsoft, EUA). O planejamento obedeceu ao modelo descrito abaixo:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$$

[0083] Após a ressuspensão das células em cada condição prevista no planejamento do tipo Box-Benkhen, foi adicionado suspensão de NMOBs prismáticas extraídas de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T na concentração final de 80 µg/mL. A taxa de eficiência da recuperação das células foi calculada a partir da diferença entre o sobrenadante do material concentrado magneticamente e a condição controle sem separação magnética. A diferença entre cada leitura considerando a etapa de concentração foi de 5 min. A densidade óptica (OD) das suspensões foram lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Brasil) em comprimento de onda de 680 nm. A conversão da OD 680 nm em densidade celular, i.e., células/mL, foi obtida após prévia correlação estabelecida pelo grupo de pesquisa.

[0084] Foi realizado ensaio de coleta e separação magnética no qual as NMOBs foram desafiadas frente a nanopartículas de magnetita sintética e ao floculante, mantido sob sigilo, utilizado na etapa de recuperação da biomassa (Figura 20). Na condição de cultivo hipersalina de 40 g/L de NaCl e com pH 3,1 ou 6,4, as NMOBs apresentaram taxa de recuperação estatisticamente significativa de 23,01

$\pm 4,94\%$ e (***) $17,31 \pm 3,27\%$ (**), respectivamente (Figura 20A). nanopartículas sintéticas obtiveram taxa de recuperação estatisticamente significativa de $6,22 \pm 2,88\%$ (**) em pH 3,1 (Figura 20B). Não houve recuperação estatisticamente significativa ao utilizar o floculante ($4,30 \pm 1,81\%$), na condição de cultivo com pH 8,0 (Figura 20C).

[0085] *Recuperação de Nannochloropsis sp. em variadas condições de salinidade e pH*

[0086] Conforme descrito anteriormente, foram plotadas as superfícies de resposta conforme o modelo descrito em diferentes rotações a fim de facilitar a visualização e interpretação (Figura 21). Após o cálculo dos coeficientes, foi previsto o modelo a seguir para *Nannochloropsis sp.*:

$$y = 39,12 - 14,09x_1 - 1,19x_2 + 4,11x_1x_2 + 11,59x_1^2 - 8,92x_2^2$$

[0087] Nas superfícies de resposta plotadas conforme o modelo descrito em diferentes rotações a fim de facilitar a visualização e interpretação foi possível observar o ponto ótimo (Figura 2; cabeça de seta laranja), ponto da condição de cultivo (Figura 21; cabeça de seta vermelha) e ponto intermediário quanto ao ajuste de pH e salinidade (Figura 21; cabeça de seta azul). O ponto ótimo, conforme previamente descrito nessa NI, foi atingido no pH 3,1 e sem adição de NaCl ao meio de cultura (Figura 2; cabeça de seta laranja) correspondendo à recuperação de 59,52%. O ponto da condição de cultivo (Figura 2; cabeça de seta vermelha), i.e., NaCl a 40 g/L, obteve recuperação de 52,08%, correspondendo a uma queda pouco significativa ao consideramos as condições do processo. Além disso, ponto intermediário da salinidade do cultivo (Figura 21; cabeça de seta vermelha), i.e., NaCl a 20 g/L, obteve recuperação de 64,93%, correspondendo a um aumento ligeiramente superior ao esperado para o ponto ótimo, previamente descrito. Portanto, foi novamente possível observar que houve recuperação da célula nas condições mais

próximas possíveis da etapa de coleta em tanques e raceways de cultivo de microalgas, adicionando as etapas de acidificação do meio e coleta e separação magnética pela adição de NMOBs.

[0088] Por fim, após a coletada dos dados para geração da superfície de resposta, foi registrada a concentração magnética do material (Figura 22). Foi posicionado um ímã de neodímio-boro e a biomassa de microalgas floculada pelas NMOBs foi concentrada na lateral do tubo em resposta ao campo magnético gerado. Foi possível observar a resposta ao campo em todas as condições de salinidade propostas.

[0089] Após a realização do planejamento experimental e o desafio de NMOBs frente a nanopartículas de magnetita sintética e ao floculante foi possível observar que as NMOBs descritas no presente trabalho possuem capacidade de coletar magneticamente e atuar na separação magnética de espécies de microalgas em condições hipersalinas. A utilização de nanopartículas no desafio mostrou que são ineficientes no processo de coleta de células nas condições de alta salinidade, bem como o floculante químico. A observação visual da coleta magnética como mostrado na Figura 22 para NMOBs não foi vista no desafio com nanopartículas sintéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[0090] Ike, I. A., & Duke, M. (2018). Synthetic magnetite, maghemite, and haematite activation of persulphate for orange G degradation. *Journal of contaminant hydrology*, 215, 73-85.

[0091] Lam G. P., Zegeye E. K., Vermuë M.H., Kleinegris D. M.M., Eppink M. H. M., Wijffels R. H., Olivieri G. 2015. Dosage effect of cationic polymers on the flocculation efficiency of the marine microalga *Neochloris oleoabundans*, *Bioresour. Technol.* 198: 797-802.

[0092] Lei, C., Zhang, L., Yang, K. et al. (2016) Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: effects

of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. *Environ Pollut* 218, 505-512.

[0093] Leon-Reyes, A., Epifani, M., Chávez-Capilla, T., Palma, J., & Díaz, R. (2014). Analysis of the different mechanisms of electrochemical energy storage in magnetite nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci*, 9(7), 3837-3845.

[0094] Roselet, F., Vandamme, D., Roselet, M. et al. 2017. Effects of pH, Salinity, Biomass Concentration, and Algal Organic Matter on Flocculant Efficiency of Synthetic Versus Natural Polymers for Harvesting Microalgae Biomass. *Bioenerg. Res.* 10, 427-437 (2017).

[0095] Santos, E. C. D. S., Watanabe, A., Vargas, M. D., Tanaka, M. N., Garcia, F., & Ronconi, C. M. (2018). AMF responsive doxorubicin loaded β -cyclodextrin-decorated superparamagnetic nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 42(1), 671-680.

[0096] Yoshino, T., Hirabe, H., Takahashi, M., Kuhara, M., Takeyama, H., & Matsunaga, T. (2008). Magnetic cell separation using nano-sized bacterial magnetic particles with reconstructed magnetosome membrane. *Biotechnology and bioengineering*, 101(3), 470-477.

[0097] Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B., Muylaert, K. 2010. Flocculation of microalgae using cationic starch. *J. Appl. Phycol.* 22, 525-530.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de nanopartículas magnéticas de origem bacteriana, caracterizado pelo fato de ser para recuperar microalgas presentes em uma suspensão.
2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a suspensão de microalgas é selecionada de: uma cultura de microalgas, uma fonte de água salgada, uma fonte de água doce ou um efluente.
3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a suspensão tem concentração de sal igual ou superior a 5 g/mL.
4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que as microalgas podem ser selecionadas de *Chlorella* sp., *Cryptocodinium* sp., *Cylindrotheca* sp., *Desmodesmus* sp., *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp., *Monoraphidium* sp., *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis*, *Neochloris* sp., *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum* sp., *Porphyridium* sp., *Scenedesmus* sp., *Schizochytrium* sp., *Tetraselmis* sp. ou quaisquer outros gêneros sabidamente úteis à produção de bio-óleos.
5. Processo para recuperação de microalgas em uma suspensão, caracterizado pelo fato de que compreende protonar a superfície celular das microalgas, adicionar nanopartículas magnéticas de origem bacteriana à suspensão e aplicar uma carga magnética externa, assim promovendo a floculação das microalgas.
6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a suspensão de microalgas é selecionada de: uma cultura de microalgas, uma fonte de água salgada, uma fonte de água doce ou um efluente.
7. Processo, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a suspensão tem concentração de sal igual ou superior a 5 g/mL.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de que a superfície celular das microalgas é protonada pela adição de um tampão ácido à suspensão.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que as NMOBs são adicionadas em uma concentração entre 50 e 100 µg/mL.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 9, caracterizado pelo fato de que as microalgas podem ser selecionadas de *Chlorella* sp., *Cryptocodinium* sp., *Cylindrotheca* sp., *Desmodesmus* sp., *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp., *Monoraphidium* sp., *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis*, *Neochloris* sp., *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum* sp., *Porphyridium* sp., *Scenedesmus* sp., *Schizochytrium* sp., *Tetraselmis* sp. ou quaisquer outros gêneros sabidamente úteis à produção de bio-óleos.

RESUMO

PROCESSO PARA RECUPERAÇÃO DE MICROALGAS UTILIZANDO

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ORIGEM BACTERIANA

A invenção se enquadra nos métodos de separação de microrganismos a partir de seus meios de cultivo e visa solucionar a baixa eficiência e o alto impacto ambiental de processos para recuperação de microalgas produtoras de óleos. Com esta finalidade, a invenção prevê a aplicação de nanopartículas magnéticas de origem bacteriana (NMOBs) em processos para isolamento de microalgas a partir de uma cultura de células ou de uma suspensão de água salgada, água doce ou de um efluente. As NMOBs são particularmente capazes de recuperar microalgas a partir de suspensões hipersalinas, favorecendo o emprego de microalgas marinhas na produção de óleos com potencial aplicação em processos de produção de bio-óleos e biocombustíveis. Além do uso das NMOBs, a invenção prevê também um processo para recuperação de microalgas tendo por base a adição de NMOBs à suspensão de microalgas e posterior aplicação de força magnética externa. A presente invenção permite recuperar cerca de 80% das microalgas em uma suspensão e segue funcional em meios hipersalinos, quando outras nanopartículas magnéticas e flocculantes químicos perdem função.

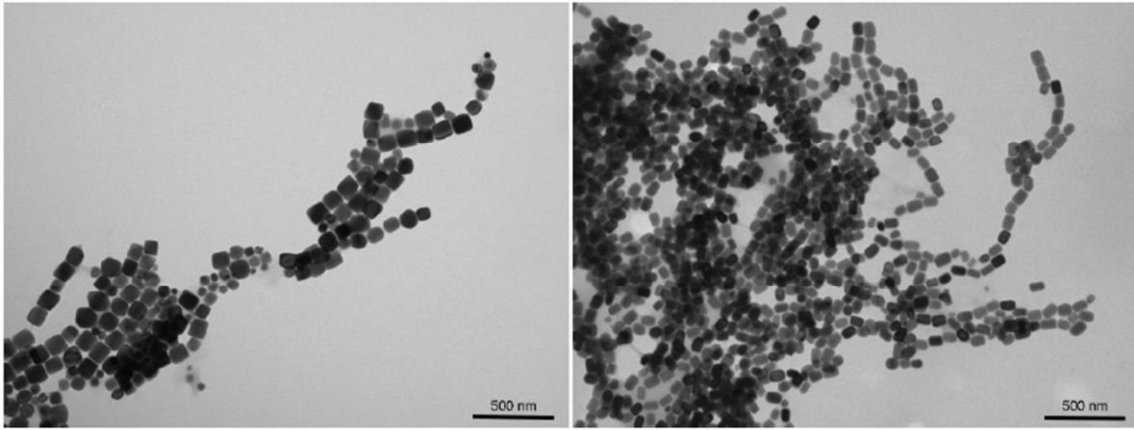


FIGURA 1

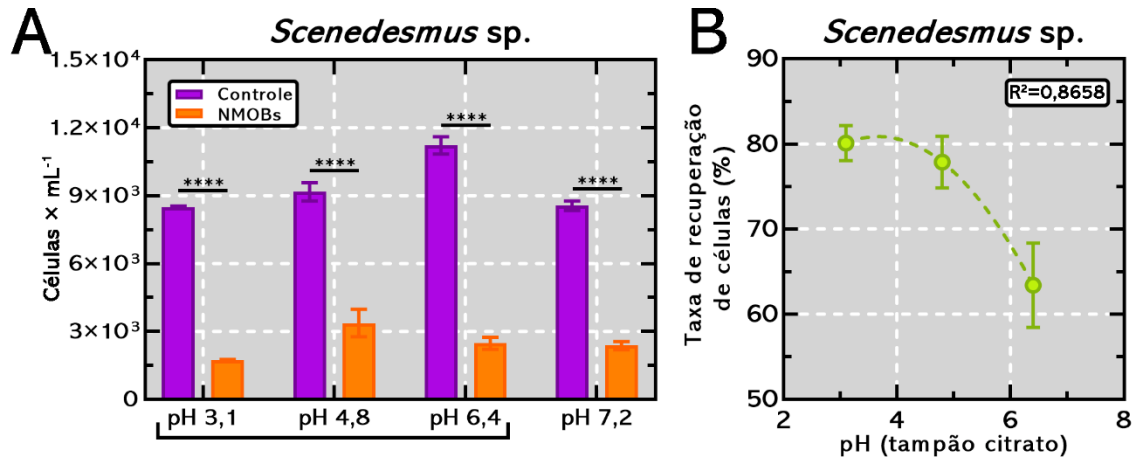


FIGURA 2

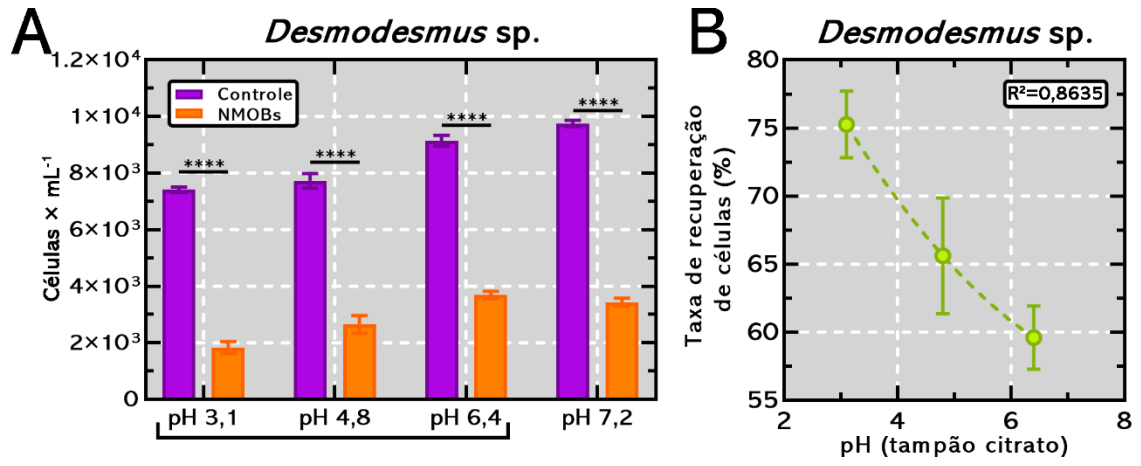


FIGURA 3

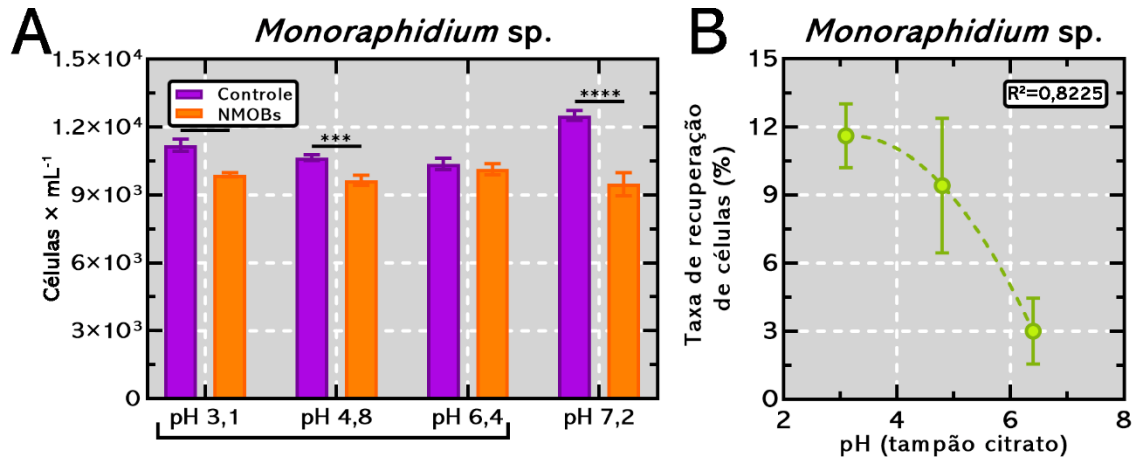


FIGURA 4

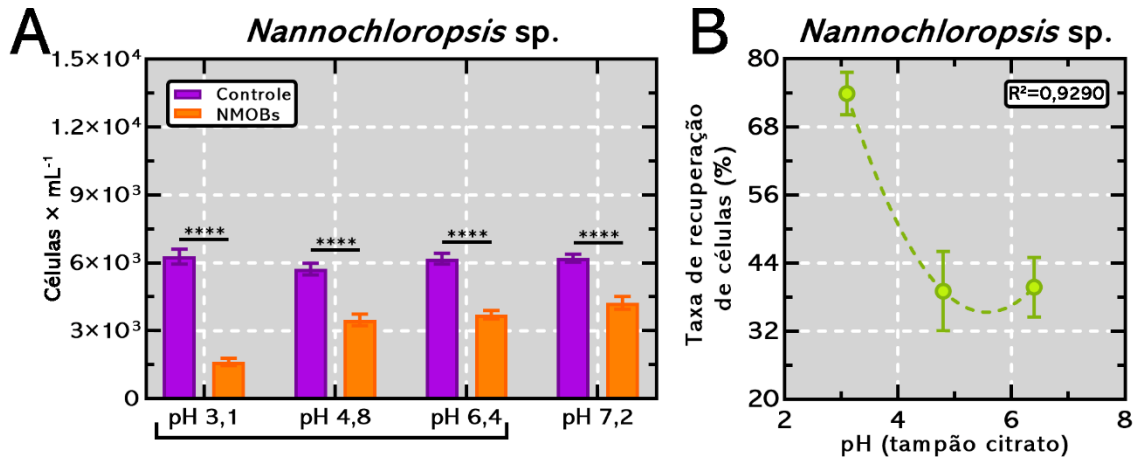


FIGURA 5

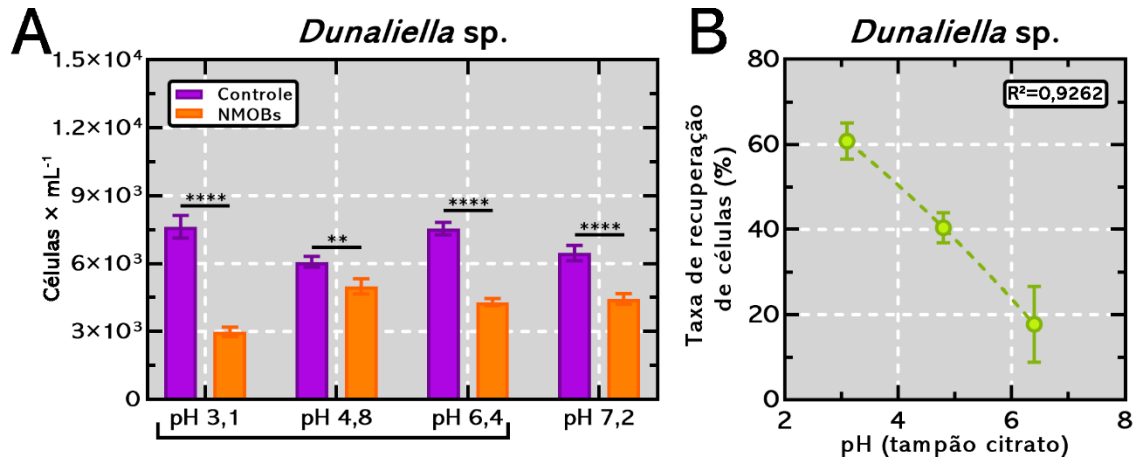


FIGURA 6

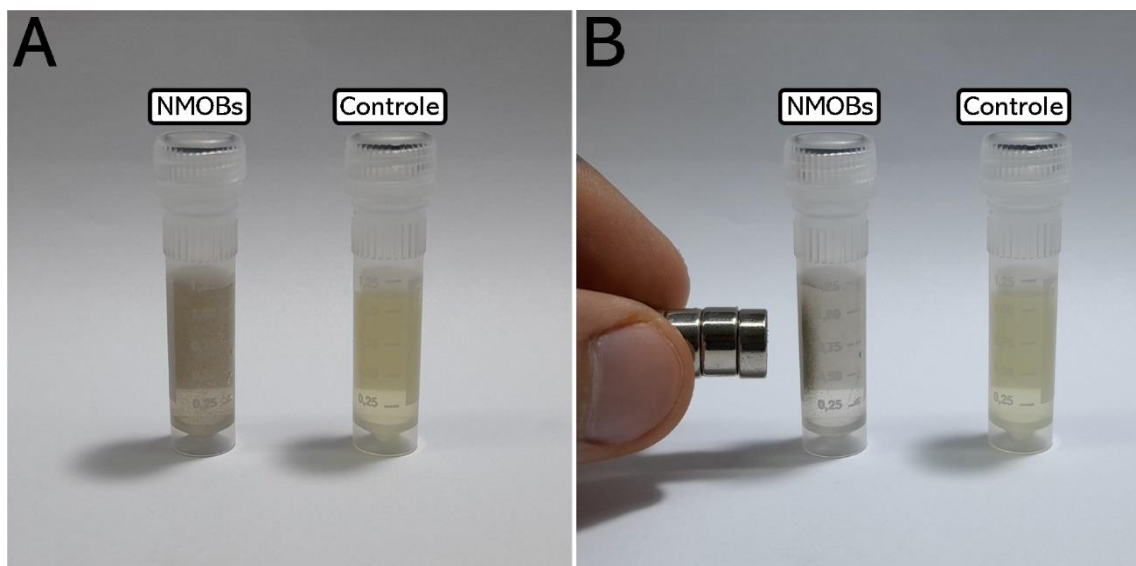


FIGURA 7

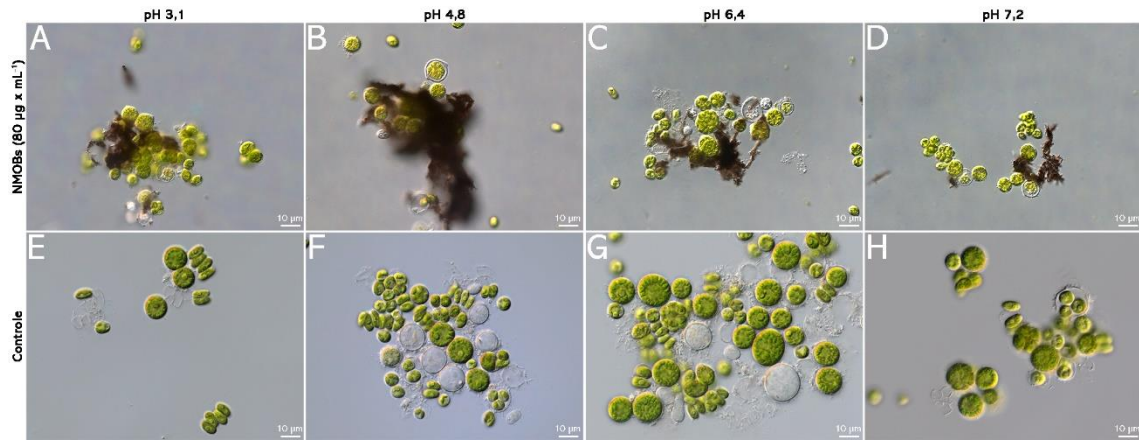


FIGURA 8

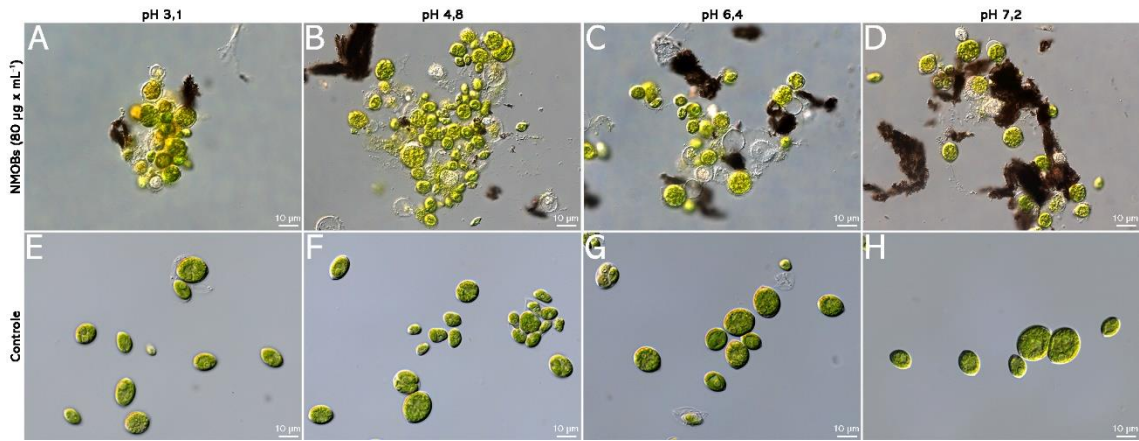


FIGURA 9

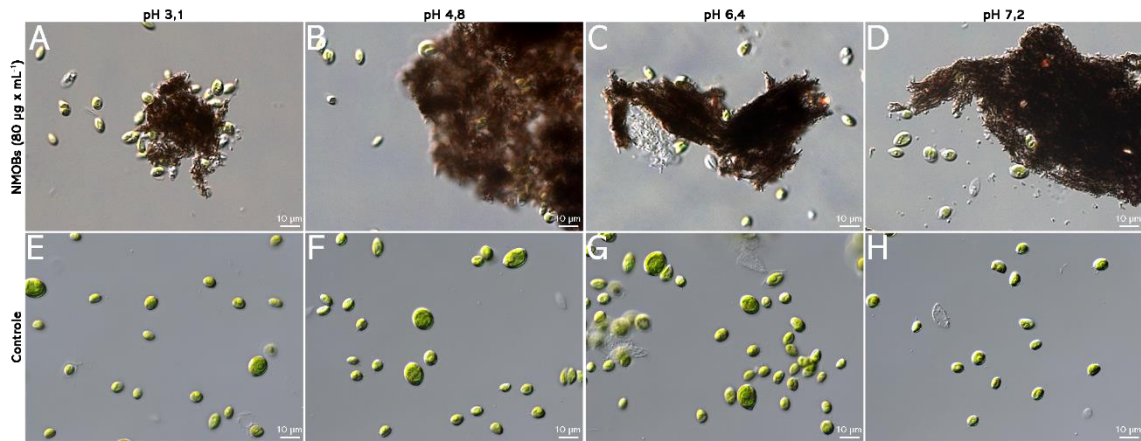


FIGURA 10

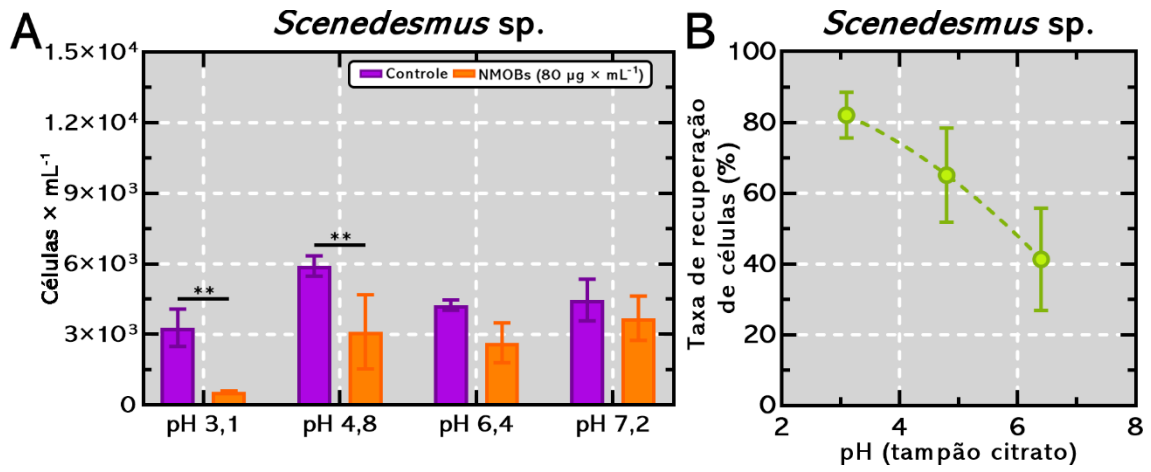


FIGURA 11

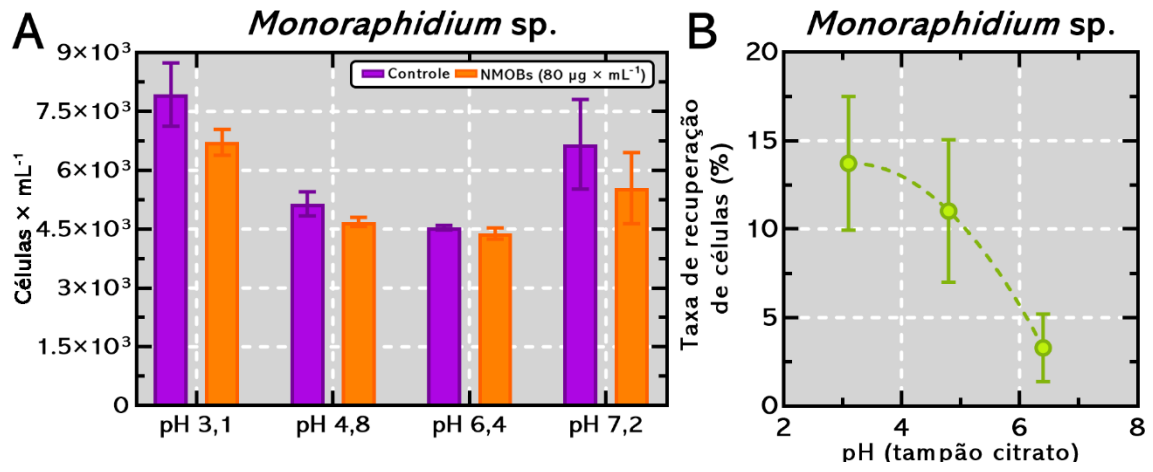


FIGURA 12

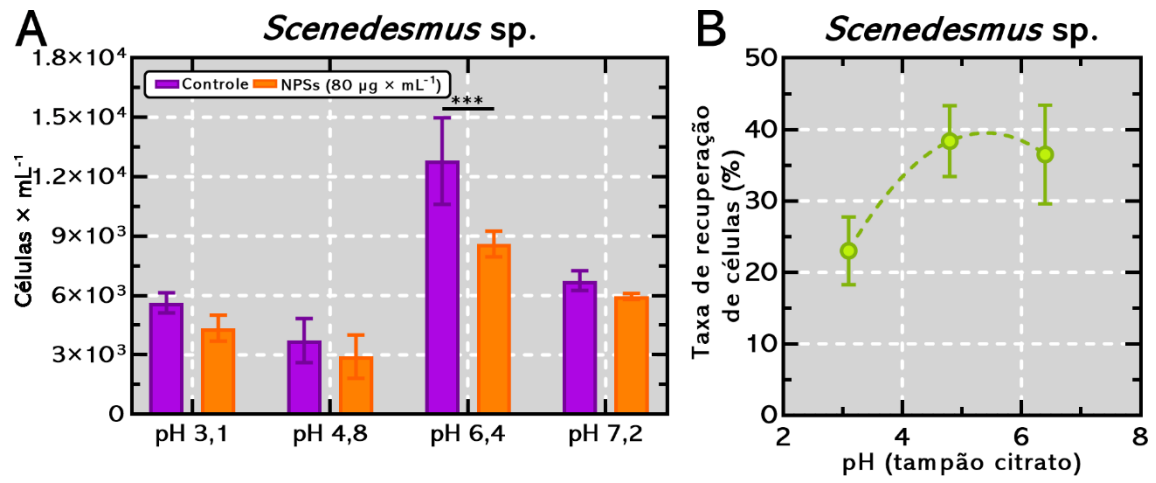


FIGURA 13

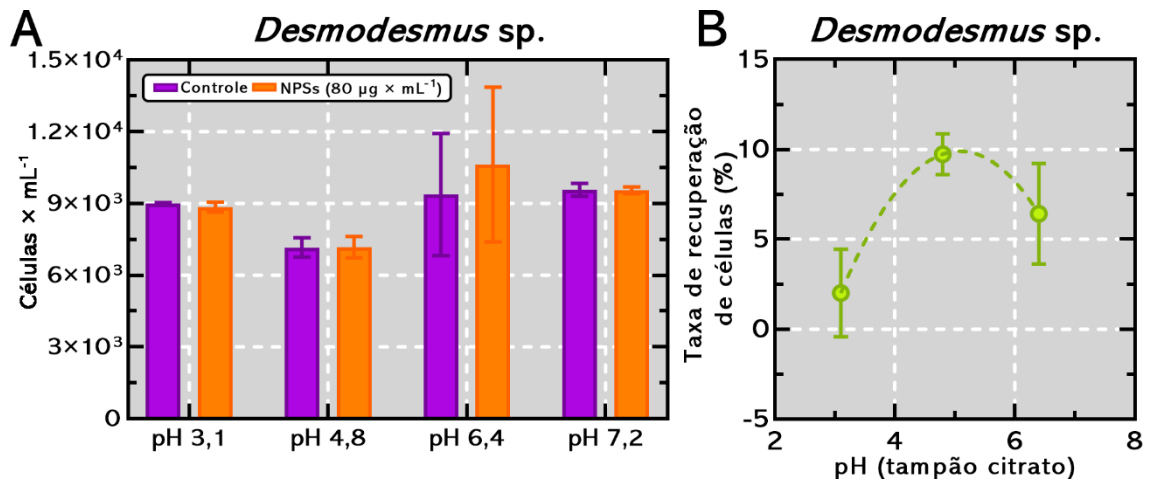


FIGURA 14

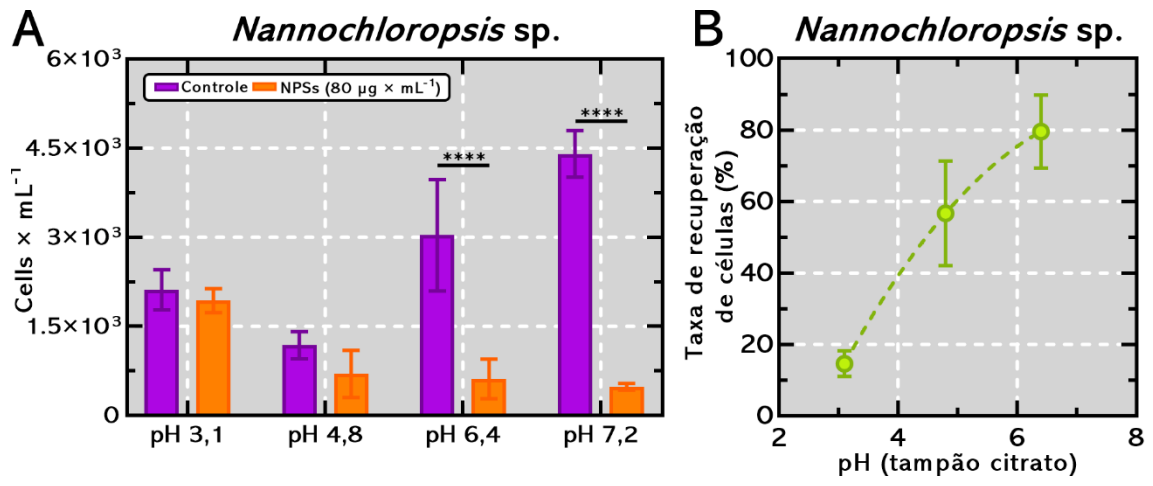


FIGURA 15

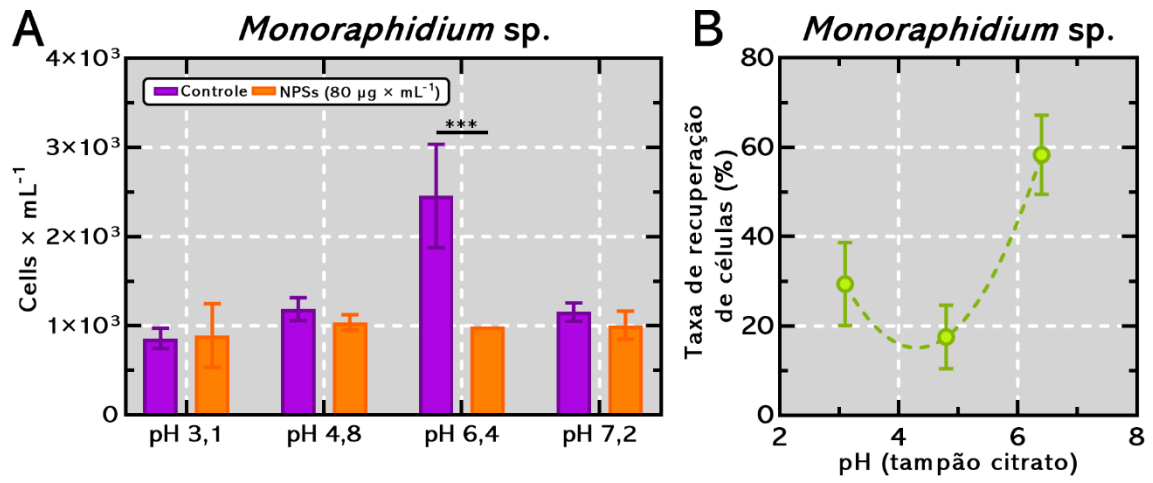


FIGURA 16

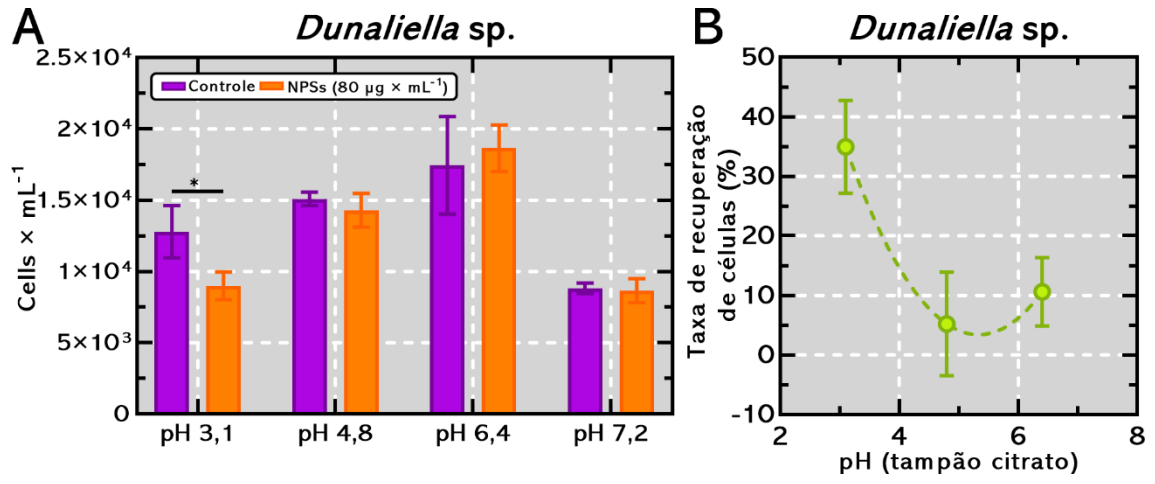


FIGURA 17

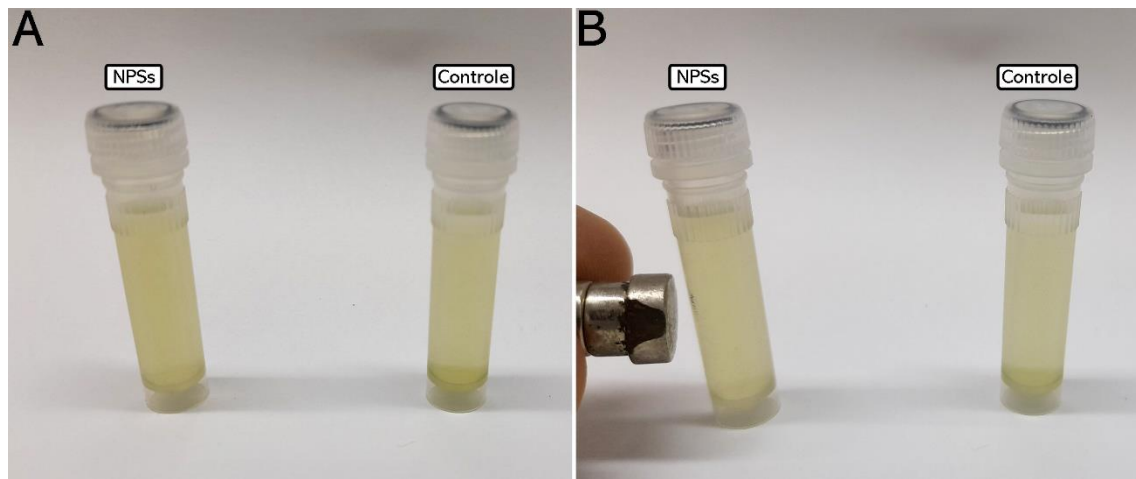


FIGURA 18

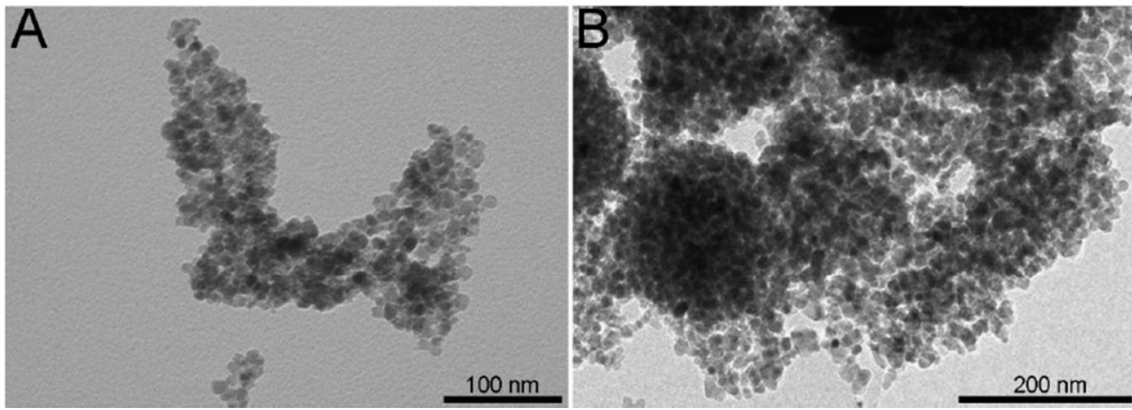


FIGURA 19

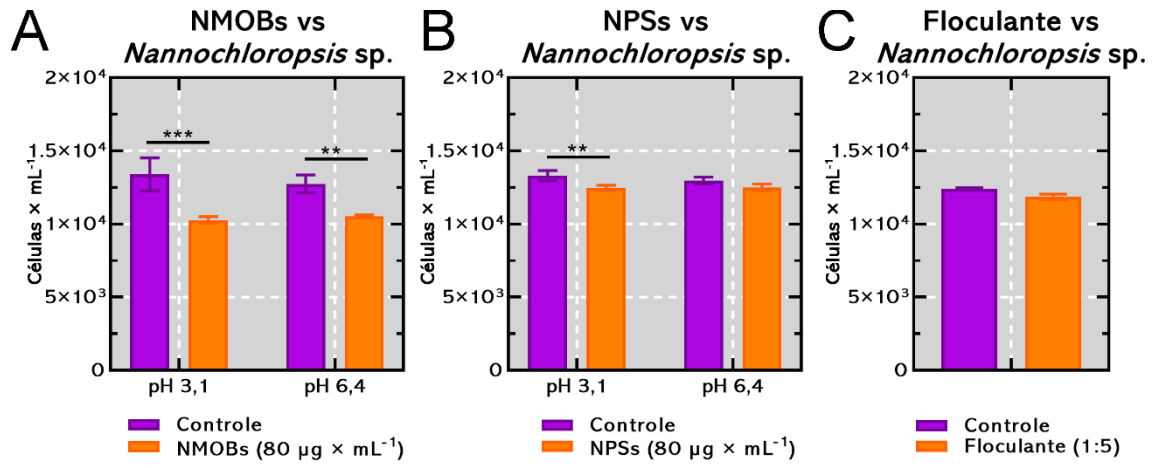


FIGURA 20

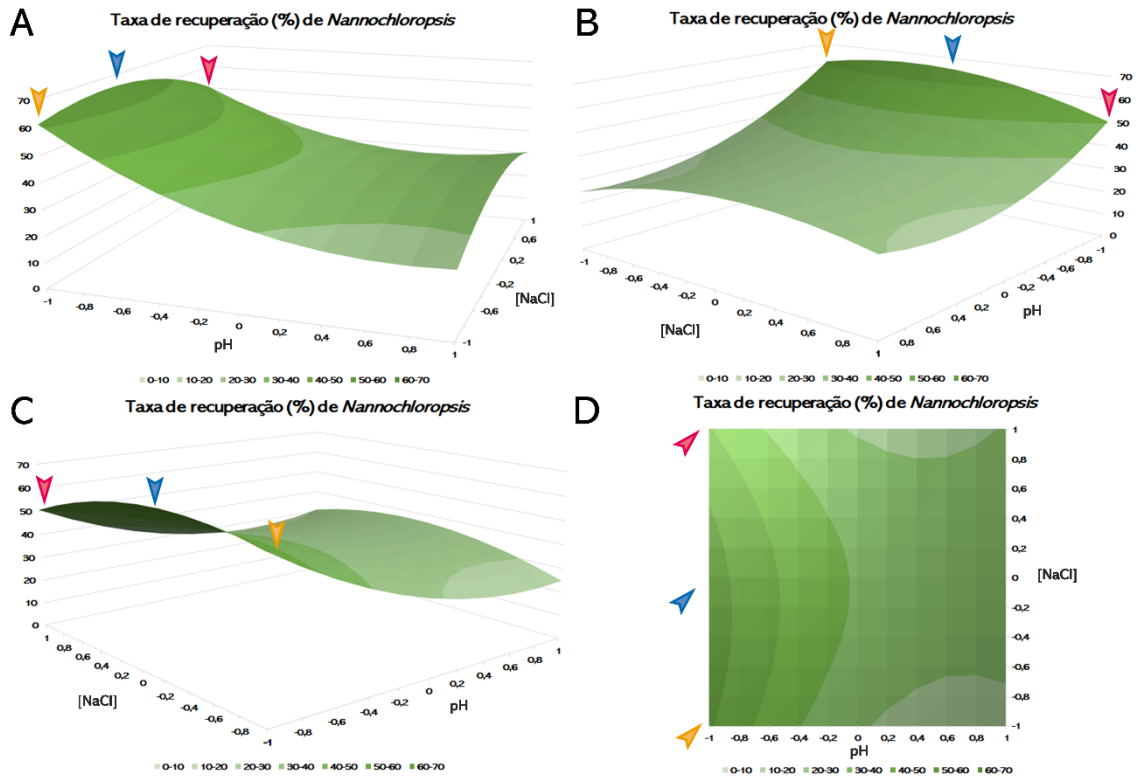


FIGURA 21

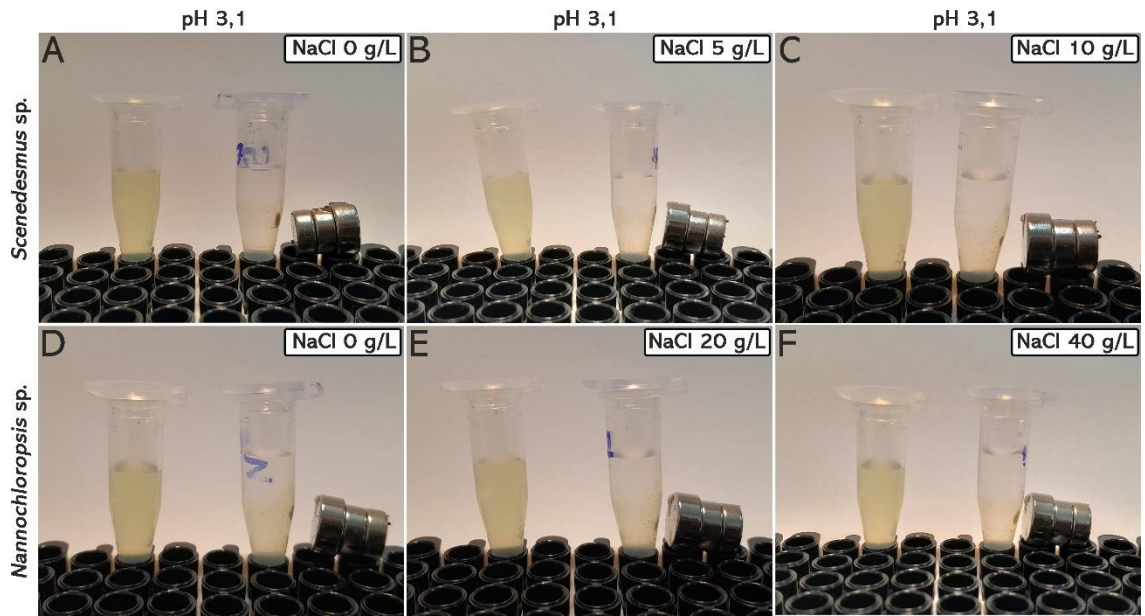


FIGURA 22

REVIEW



Drugs and nanoformulations for the management of *Leishmania* infection: a patent and literature review (2015–2022)

Mariana Verdan[#], Igor Taveira[#], Flávia Lima, Fernanda Abreu and Dirlei Nico

Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is an important disease caused by parasites of the *Leishmania*. Due to the urgent need for financial incentives and research and development of new anti-*Leishmania*, a point that stands out is the creation of patents that comprise drugs and nanoformulations in treating the disease.

Areas covered: Information on individual patents and patent families containing potential drugs and nanoformulations were obtained by searching the Orbit software (QUESTEL SAS, France) using the following terms: *Leishmania*; treatment; nanoparticle*; drugx. The data obtained ranged from 2015 to 2022.

Expert opinion: Meglumine antimoniate is a pentavalent antimonial widely used in the classic treatment of leishmaniasis. It is part of the classic treatment recommended by WHO, being the first-choice drug globally about 75 years ago. Thus, the need to introduce new anti-*Leishmania* therapies into clinical medicine is evident since cases of resistance to monotherapy and multitherapy have increased greatly. Associated with this, the search for patents that are good candidates in treating this disease assures interest in investments of financial resources and raises a ray of hope for safe, effective, and low-cost therapies to become licensed for the treatment of leishmaniasis.

ARTICLE HISTORY

Received 21 December 2022

Accepted 6 April 2023

KEYWORDS

Patent; *Leishmania*; drug; nanotechnology; nanoformulation; treatment

1. Introduction

Leishmaniasis is classified as a vector-borne Neglected Tropical Disease (NTD) [1]. This disease is caused by *Leishmania* protozoa and transmitted to mammals by the bite of a phlebotomine sand fly. It is the second most relevant parasitic disease, surpassed only by malaria. According to the World Health Organization, about one billion people are at risk of infection worldwide [2]. However, besides the efforts toward reducing the disease's burden, there is no universal treatment in endemic areas and no human vaccine approved for prevention worldwide [3].

About twenty species of the genus *Leishmania* can cause leishmaniasis [4]. The disease shows three different clinical manifestations: visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL), and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). VL, also known as kala-azar, is the most lethal of the three forms if left untreated [5]. Furthermore, the increase in coinfection cases with human immunodeficiency virus (HIV) represents a significant challenge in treating VL [6]. The infection by HIV promotes intense immunosuppression, resistance to the recommended treatment, and, unfortunately, the patient's death [6]. Systemic effects of the VL are characterized by fever, weight loss, anemia, and hepatosplenomegaly [7]. VL patients may develop chronic leishmaniasis called post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL), mainly in East Africa and India. The clinical manifestation includes macular, papular, or nodular rash. Patients with PKDL are considered reservoirs of *Leishmania* [7].

CL is the form of leishmaniasis diagnosed more frequently [2,8]. Ten countries were responsible for 85% of

new CL cases in 2020: Afghanistan, Algeria, Brazil, Colombia, Iraq, Libya, Pakistan, Peru, the Syrian Arab Republic, and Tunisia [2]. The clinical manifestation of CL includes skin lesions that progressively ulcerate [9]. Usually, the lesions self-cure within a few months [10]. However, CL lesions may cause severe disfigurement, skin malformation, and even life-lasting disabilities [11].

MCL affects mucous membranes, leading to the partial and complete destruction of the nose, mouth, and throat mucosae. MCL consequences may include severe respiratory obstruction, damage to the nasal cartilage and vocal cords, and tooth loss [12,13]. According to WHO, over 90% of MCL cases occur in Bolivia, Brazil, Peru, and Ethiopia [2]. In addition, human migration and globalization have rapidly increased infections in non-endemic countries [14].

Leishmania parasites have two distinct evolutionary forms [15]. A motile form in the insect vector is the promastigote form. The immobile and intracellular amastigote form is present in the vertebrate host, proliferating in macrophages, specifically within phagolysosomes [16]. An environment rich in certain amino acids is the ideal place for maintaining the metabolism of amastigotes, favoring their growth and escape from the host's immune system [16].

In the genus *Leishmania*, as well as in trypanosomatids, a particular organelle deserves prominence. These protozoans have a single mitochondrion in their internal cellular structure. Furthermore, alterations in mitochondrial membrane potential

Article highlights

- Most of the patents found used metallic, or lipid nanoparticles in formulation with antileishmanial drugs;
- Gold nanoparticles showed promising results in vitro and in vivo with no signs of aggregation, good stability, and storage half-life;
- The highest number of nanoparticle formulations to treat leishmaniasis was deposited by Indian inventors in the Indian Patent Office;
- Most nanoparticles relied on polyene therapy, i.e., Amphotericin B, with minor approaches regarding meglumine antimoniate and natural product extracts with antileishmanial activity;
- Regarding Amphotericin B nanoformulations, many inventions aim to target both fungal and leishmanial pathological conditions based on the same drug mechanism of action, thus, developing a versatile nanotool;
- The highest number of invented nanoformulations were deposited in 2016 and 2021 by India, Germany and US research institutes' and universities.

occur, i.e., depolarization, hindering the production of ATP, leading to the parasite's death [17].

The prevention of the disease's transmission consists of vector control, case finding diagnosis, and treatment of the patients [18]. The success of treating leishmaniasis depends on multiple factors, such as the disease's clinical manifestation, concomitant pathologies, or infections. Or the parasite species and geographic location [19,20]. Associated with these factors, the patient's nutrition, immunity, drug metabolism, and dropout during treatment are fundamental for disease evolution [21–23].

The immune response promoted by *Leishmania* infection is highly complex. It depends on the intrinsic factors of the parasite species involved in the disease and on the characteristics of the host. The presence of TH1 and TH2 cells marks the cellular immune response involved in chronic infection. A TH1 profile response formed by the presence of CD4+ and CD8+ T cells producing INF- γ characterizes a protective reaction against the evolution of disease by the parasites [24]. Although long neglected, the involvement of B cells in forming immunity against leishmaniasis as they are likely intimately involved in modulating the immune response against *Leishmania* [25].

Therefore, this review aims to review the drugs available for the treatment of leishmaniasis as well as to perform a global search on patents published from 2015 to 2022 related to drugs and nanoformulations used in *Leishmania* infections.

2. Licensed drugs for the treatment of leishmaniasis

Currently, a limited number of drugs are available for leishmaniasis treatment [26,27]. Antimonials pentavalent, amphotericin B, pentamidine, paromomycin, and miltefosine are drugs licensed for chemotherapy to CL and VL (Figure 1, Table 1) [27]. These drugs follow a division into first-choice, second-choice, and alternative drugs or treatments. Although the WHO recommends dosage and duration of therapy, the clinical conduct and adaptation of chemotherapy regimens are made on the epidemiological conditions, type of leishmaniasis, comorbidities, and management of health programs in each geographic area (Table 1) [20]. The first-choice drugs include meglumine antimoniate (Glucantime) (Figure 1), used

in Brazil (Table 2), a pentavalent antimonial, and the second-choice drug, represented by amphotericin B deoxycholate or liposomal amphotericin B (AmBisome). Second-choice drugs are required when treatment failure with first-choice is detected. Amphotericin B (Figure 1) is also indicated in the treatment of pregnant women [28]. Miltefosine (Figure 1) is the first oral drug used globally against leishmaniasis but shows inconsistent results depending on geographic region [29]. Besides, miltefosine is a teratogenic drug and is not recommended for women of childbearing age unless effective contraception is being used. In addition, pentamidine (Figure 1) and paromomycin (Figure 1) can be used in combination therapy schemes and treatment failure with other therapies [30,31]. Table 2 shows the chemotherapy regimens adopted by the Ministry of Health in Brazil.

The success of treating VL or CL depends on multiple factors. Patient adherence until the end of therapy, nutritional status, immunity, and comorbidities are the most important criteria [32]. For example, micronutrients such as vitamin D levels are essential in healing and inflammation [33]. Other factors like the high cost of treatment, serious side effects, and the emergence of resistant strains worldwide are also noteworthy [34]. Therefore, the development of new drugs and intelligent nanoformulations to deliver drugs and reduce the dose, treatment time, and route of administration, which are effective, safe, and low-cost, contribute to the ideal drug model against *Leishmania* infection.

2.1. Pentavalent antimonials

Pentavalent antimonials embrace sodium stibogluconate and meglumine antimoniate (Sb^{5+}). In Brazil, meglumine antimoniate is the pentavalent antimonial distributed free of charge by the health ministry to treat infected individuals. These drugs have been used in treating leishmaniasis for over 70 years and remain the principal drug available. As the primary proposed mechanism of action, these drugs are known to act as prodrugs. After administration of the drug, the Sb^{5+} form is reduced to Sb^{3+} , with Sb^{3+} coordinating with cysteine in glutathione and trypanothione [35]. The chemotherapy with meglumine antimoniate is realized via intravenous administration and under hospitalization of the patient since daily monitoring is necessary. Cardiotoxicity [36], nephrotoxicity [37], neurotoxicity [38], and hepatotoxicity [39] need to be evaluated throughout the treatment. The usual dose is shown in Tables 1 and 2.

2.2. Amphotericin B and formulations of lipidic

Amphotericin B is a polyene initially employed as an antifungal agent and is commercially available as deoxycholate (DAmB) or liposomal forms [40]. It is recommended as a first-choice drug in pregnant infected women [41]. This polyene binds to ergosterol from the *Leishmania* membrane, thus forming pores in the cellular membrane, leading to apoptosis [42]. Consequently, amphotericin B can cause severe and irreversible nephrotoxicity [43].

The liposomal formulation shows minor side effects, and the nephrotoxicity is rather temporary because this formulation is

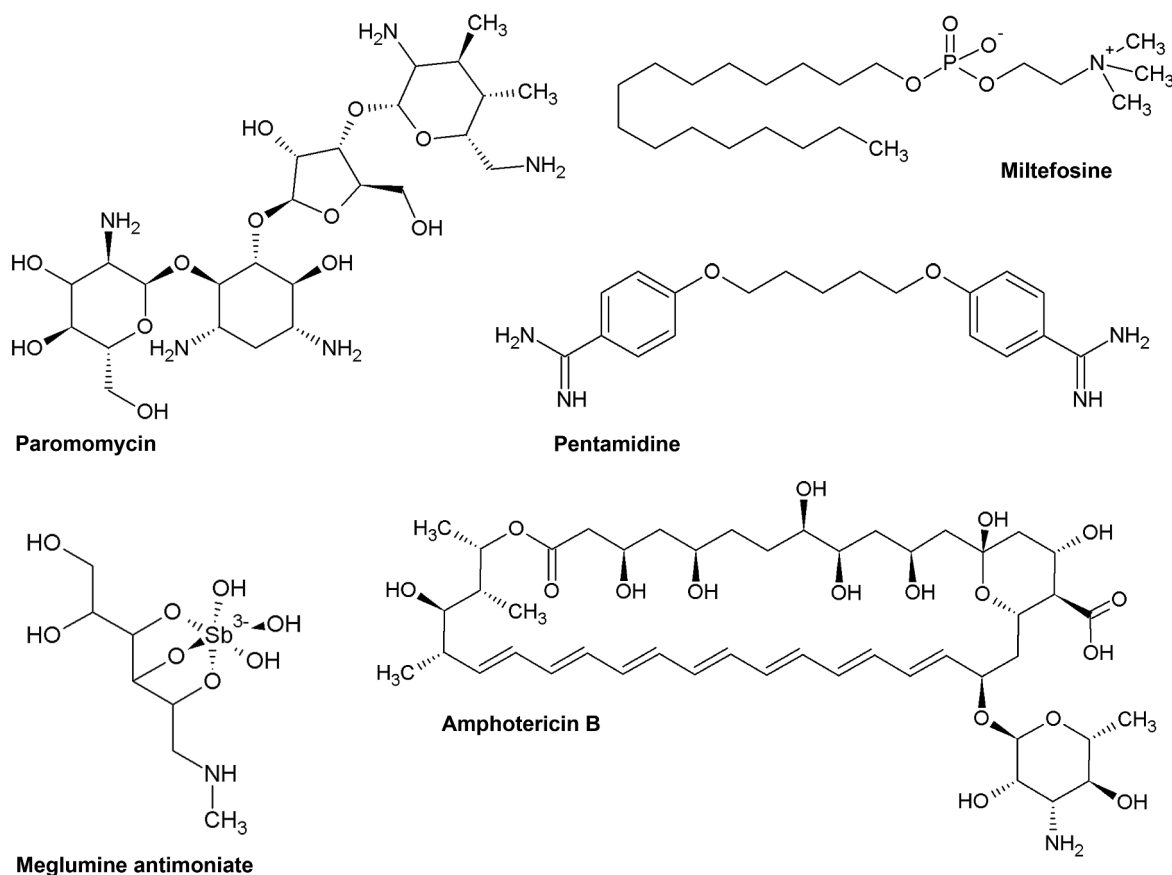


Figure 1. Chemical structures of the classical drugs available for the treatment of leishmaniasis: (i) amphotericin B, a polyene; (ii) miltefosine, an alkyl phospholipid; (iii) meglumine antimoniate, a trivalent antimonial; (iv) paromomycin, an aminoglycoside; and (v) pentamidine, an aromatic diamidine.

better tolerated. The usual dose of amphotericin B is parenteral administered (Table 1).

2.3. Miltefosine

Miltefosine is an alkyl phospholipid (hexadecylphosphocholine) administered orally to VL and TL [44,45]. More recently, it was registered for its antileishmanial effect in treating VL in 2002 in India [46]. Two years later, it was registered for VL in Germany, including immunosuppressed individuals [47]. In Brazil, administering miltefosine orally in dogs for four weeks exhibited promising results in VL therapy [48]. This drug promotes apoptosis in *Leishmania*, affecting mitochondrial membrane potential [49]. Miltefosine is contraindicated for pregnant women as it causes teratogenic effects [50]. The dose recommended can be observed in table 1

2.4. Pentamidine

Pentamidine is an aromatic diamine that enters into promastigote forms via polyamine and arginine transporters. This drug accumulates in the parasite's mitochondrion and causes inhibition of the topoisomerase II [51]. The toxicity is promoted by poor accumulation within the mitochondrion, necessitating a high dose to achieve the accumulation ideal for killing the parasites. Pentamidine probably shares polyamine carrier systems in *Leishmania* [52]. In addition to renal toxicity, pancreatic toxicity

and the onset of insulin-dependent diabetes have been observed [53]. The dose is administered via the parenteral route (Table 1).

2.5. Paromomycin

Paromomycin is an aminoglycosidic antibiotic used to treat leishmaniasis. It also has activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, mycobacteria, and *Cestoda* [54,55]. Paromomycin was licensed in India in 2007 for the treatment of LV and showed equal efficacy compared with amphotericin B [56]. The main side effects observed are nephrotoxicity and ototoxicity [57]. The drug inhibits protein synthesis due to linkage into the parasite's ribosomal RNA [58]. Recently, African and Indian patients were enrolled in a clinical trial, and the kinetics of paromomycin were evaluated [59]. The recommendation is shown in Table 1.

3. Combination therapies

The combination of classical drugs in treating leishmaniasis is an alternative to achieve success in chemotherapy and patient compliance. Generally, combining different licensed drugs is associated with the emergence of strains resistant to the recommended monotherapy [60]. On the other hand, the combination of therapies can contribute to new protocols that reduce the total concentration of individual drugs and

Table 1. Therapeutic scheme of treatment recommended globally by the World Health Organization.

WHO recommended treatment						
Drug	Species	Disease form	Age	Treatment regimen		
				Dose	Therapeutical scheme	Administration route
Liposomal amphotericin B	<i>L. donovani</i>	VL	–	3–5 mg/kg	3–5 days (Bangladesh, Bhutan, India and Nepal); 6–10 days (East Africa)	Infusion
	<i>L. donovani</i>	VL	–	10 mg/kg	Single dose	Infusion
	<i>L. infantum</i>	VL	–	3–5 mg/kg/day	3–6 days	Infusion
	–	PKDL	–	2.5 mg/kg/day	20 days	Infusion
	<i>L. braziliensis</i>	CL	–	2–3 mg/kg/day	20–40 mg/kg total dose	Infusion
	All species	MCL	–	2–3 mg/kg/day	Daily, total dose of 40–60 mg/kg	Infusion
Amphotericin B deoxycholate	<i>L. donovani</i>	VL	–	0.75–1.0 mg/kg/day	Daily or on alternate days for 15–20 doses	Infusion
	<i>L. infantum</i>	VL	–	0.75–1.0 mg/kg/day	Daily or on alternate days for 20–30 doses	Infusion
	–	PKDL	–	1 mg/kg/day	60–80 doses, over 4 months	Infusion
	<i>L. braziliensis</i>	CL	–	0.7 mg/kg/day	25–30 doses	Infusion
	All species	MCL	–	0.7–1 mg/kg/day	25–45 doses	Infusion
	Miltefosine	<i>L. donovani</i>	VL	2–11 years	2.5 mg/kg	28 days
<i>L. donovani</i>		VL	≥12 years	50 mg/kg	28 days	Oral
<i>L. donovani</i>		VL	–	(< 25 kg body weight) 100 mg/kg	29 days	Oral
<i>L. donovani</i>		VL	–	(25–50 kg body weight) 150 mg/kg	30 days	Oral
<i>L. donovani</i>		VL	–	(> 50 kg body weight) 150 mg/kg	30 days	Oral
–		PKDL	–	–	As above	–
<i>L. guyanensis</i>		CL	–	2.5 mg/kg/day	28 days	Oral
<i>L. mexicana</i>		CL	–	–	–	–
<i>L. panamensis</i>		CL	–	–	–	–
<i>L. donovani</i>		VL	–	15 mg/kg/day	21 days	Intramuscular
Paromomycin Pentavalent antimonials	<i>L. donovani</i>	VL	–	20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	30 days	Intramuscular or intravenous
	<i>L. infantum</i>	VL	–	20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	28 days	Intramuscular or intravenous
	–	PKDL	–	20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	30–60 days	Intramuscular or intravenous
	<i>L. infantum</i>	CL	–	20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	10–20 days	Intramuscular or intravenous
	<i>L. major</i>	CL	–	–	–	–
	<i>L. tropica</i>	CL	–	–	–	–
	<i>L. aethiopica</i>	CL	–	1–5 mL/session (1–5 sessions)	3–7 days	Intralesional
	<i>L. infantum</i>	CL	–	–	–	–
	<i>L. major</i>	CL	–	–	–	–
	All species for New World	CL	–	–	–	–
	<i>L. amazonensis</i>	CL	–	20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	20 days	Intramuscular or intravenous
	<i>L. braziliensis</i>	CL	–	–	–	–
	<i>L. guyanensis</i>	CL	–	–	–	–
<i>L. panamensis</i>	CL	–	–	–	–	
<i>L. peruviana</i>	CL	–	–	–	–	
<i>L. venezuelensis</i>	CL	–	–	–	–	
All species	MCL	–	20 mg/kg/day	30 days	Intramuscular or intravenous	
Pentamidine	<i>L. guyanensis</i>	CL	–	4 mg salt/kg/dose	3 doses on alternate days	Intramuscular or brief infusions
	<i>L. panamensis</i>	CL	–	–	–	–

treatment duration. Moreover, by reducing the treatment time and dose of the drugs proportionally, there will be a reduction in the cost of treating the disease.

The use of pentoxifylline (PTX) in combination with first or second-choice drugs has been an alternative to alleviate the adverse effects caused by chemotherapy. Pentoxifylline acts by suppressing gene transcription of the cytokine TNF- α and decreasing leukocyte migration and adhesion, working as an immunomodulator [61]. As the increased production of TNF- α is associated with MCL pathology, an improvement in response to treatment is expected. Lessa *et al.*, 2001] evaluated the efficiency of the combination of pentoxifylline with pentavalent antimonial [62]. A total of 10 treatment-

refractory patients received the combination therapy, and 9 out of 10 patients fulfilled the criteria of success and cure of the disease. TNF- α levels after treatment proved to be eight times lower than at the beginning of treatment. Interestingly, the ability of renal protection promoted using pentoxifylline and nephrotoxic drugs was evaluated [63]. Although success was detected in the treatment of MCL, no benefits were found from the combination of pentoxifylline in the treatment of CL [64–66].

A combination of miltefosine with amphotericin B or paromomycin has been shown to improve the *in vivo* efficacy of miltefosine [67]. The effectiveness of the combination of paromomycin and pentavalent antimony has also been

Table 2. Therapeutic scheme of treatment in Brazil (Brazilian Health Ministry, 2014; 2017).

Brazilian Health Ministry recommended treatment				
Drug	Disease form	Treatment regimen		
		Dose	Therapeutical scheme	Administration route
Liposomal amphotericin B	VL	1–1.5 mg/kg/day	21 days	Intravenous
	CL	2–5 mg/kg/day	Total dose of 25–40 mg/kg	Intravenous
	MCL	3–5 mg/kg/day	Total dose of 30–40 mg/kg	Intravenous
Amphotericin B deoxycholate	VL	1 mg/kg/day	Doses on alternate days. Total dose of 3 mg for adults and 15–25 mg/kg for children	Slow intravenous infusion (4–6 h)
	CL	0.7–1.0 mg/kg/day (50 mg maximum daily dose)	Total dose of 20–40 mg/kg	Intravenous slow infusion (4–6 h)
	MCL	0.7–1.0 mg/kg/day, on alternate days (50 mg maximum daily dose)	Total dose of 25–40 mg/kg	Intravenous
Pentoxifylline*	CL	400 mg pill (3× times/day)	30 days	Oral
Pentavalent antimonials	VL	20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	20–40 doses	Intramuscular or intravenous
	CL	10–20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	–	Intramuscular or intravenous
	CL	5 mL/session	1–3 session, 15 days interval between each session	Intralesional
Pentamidine	MCL	10–20 mg Sb ⁵⁺ /kg/day	30 days	Intramuscular or intravenous
	VL	4 mg/kg/day	15 doses on alternate days (Total dose of 2 g)	Slow intravenous infusion (1–2 h) or intramuscular
	CL	3–4 mg/kg/day	3–10 doses on alternate days	Slow intravenous infusion (1–2 h) or intramuscular
	MCL	3–4 mg/kg/day	7–10 doses on alternate days	Slow intravenous infusion (1–2 h) or intramuscular

*Used in association with pentavalent antimonials, not indicated as an isolated therapy.

evaluated in clinical trials. This combination of drugs generated more than 90% efficacy in the patients who received the treatment [68].

It is noteworthy in this section to show the *in vivo* study in the model of murine visceral leishmaniasis using the combination of amphotericin B and paromomycin encapsulated with a lipid nanoparticle [69]. The *in vivo* toxicity tests showed that the nanoparticle presented less toxicity when compared to the non-encapsulated amphotericin b. Likewise, a greater reduction in the parasitic load was observed in animals treated with the combination of drugs formulated with the nanoparticle [69], indicating the potential use of this nanoformulation in the future.

4. Molecular targets

According to advances in the complete genome sequencing of *Leishmania* species searching for new molecular targets in the parasite is a hot point in developing new anti-*Leishmania* drugs. Enzymes are attractive molecular targets since they participate in metabolic pathways essential to the parasite's survival and thus ensure its survival in the vertebrate host. Therefore, DNA topoisomerases from *Leishmania* assume an essential study target for designing new drugs capable of causing enzymatic inhibition [70]. Topoisomerases are involved in fundamental stages of the parasite's life cycle and in the parasite DNA replication and transcription processes [71]. Parasites of the genus *Leishmania* have a specific structure called kinetoplast formed by circular DNA called kDNA, whose duplication undergoes the action of specific topoisomerases, making these excellent molecular targets [72].

In *Leishmania*, the cytoplasmic membrane has ergosterol as a constituent, while the cytoplasmic membrane of mammals has cholesterol as the principal constituent [73]. The enzyme squalene synthase participates in the biosynthesis

of ergosterol, therefore being a target enzyme that deserves attention. Wadanambi and colleagues recently demonstrated the inhibitory activity of seven phytochemicals that bind to the active site of the squalene synthase of *Leishmania donovani* and, consequently, promote enzymatic inhibition. Ergosterol biosynthesis is already a target used by amphotericin B, which corroborates the use of this pathway as a potential therapeutic target [74]. Another peculiar metabolic target in *Leishmania* is the thiol redox, in which the trypanothione reductase system participates in the parasite's redox homeostasis. The increase in reactive oxygen species consequently breaks this redox homeostasis causing cellular damage [75].

Polyamines play a fundamental role in cell growth and differentiation. Arginine is an amino acid necessary for *Leishmania* and host metabolism [76]. Arginase is an enzyme responsible for the cleavage of arginine, producing ornithine and urea. In *Leishmania*, arginase is one of the relevant enzymes in the polyamine biosynthesis pathway, which is responsible for converting arginine into ornithine [77]. In the *Leishmania* glycosome, arginase is also involved in trypanothione biosynthesis. Da Silva and colleagues demonstrated fundamental arginase activity in *L. amazonensis*, confirming arginase as an essential molecular target [78]. This study showed that *Leishmania* mutants for arginase decreased the power of infection *in vitro*. By the way, any other critical metabolic marks are under investigation. We will not extend our discussion on this issue so as not to deviate from the topic.

5. Drug resistance

Chemotherapy against leishmaniasis is the principal way to combat the disease. Therefore, failures in treatment are

incredibly worrying. One of the worst scenarios of resistance to antileishmanial drugs is found in India, where a high number of cases of VL, almost 100%, are resistant to treatment with pentavalent antimonials [79]. These absurd levels of resistance to pentavalent antimonials are probably related to the expression of ABC-type transporters close to the parasite's flagellar pocket [80]. It is also worth mentioning the important role of aquaglyceroporins [81] and high levels of trypanothione and trypanothione peroxidase in clinical isolates [82]. Due to the long duration of the treatment and the high toxicity, the patient gives up the treatment and does not complete the necessary cycle for the success of the treatment. This also contributes to the emergence of treatment failures and drug resistance.

When the use of meglumine antimoniate is not indicated, the best alternative is amphotericin B. However, the emergence of resistance has become a concern because there are few options for replacing chemotherapy. For instance, L-asparaginase has a role in cases of amphotericin B resistance. The use of L-asparaginase inhibitors in the presence of *L. donovani* parasites has been shown to alter the viability of the parasites [83]. L-asparaginase from *L. donovani* may protect parasites against the mechanism of action of amphotericin B, thus causing treatment failures [83]. The combination of conventional drugs has shown success in several cases, being a successful strategy in many scenarios [84–87].

The cases of a strain resistant to drugs are a global problem [88]. A significant obstacle present in the treatment of leishmaniasis is the access of the drug to the parasites, which, in mammals, are found in amastigote forms within the phagolysosome of macrophages [89]. On the other hand, thiol metabolism has been suggested to be an essential player in developing resistance found in *Leishmania*. Thus, thiol levels are altered in resistant strains [90].

However, it is essential to inform that failures in the treatment with the combination of drugs have been experimentally demonstrated in the *L. donovani* model [91]. The following combinations of classic or available drugs were used: amphotericin B and miltefosine, amphotericin B and paromomycin, amphotericin B and trivalent antimonials, miltefosine and paromomycin, and trivalent antimonials and paromomycin [91].

Pentamidine also showed cases of resistance. In *L. donovani*, pentamidine resistance is associated with mitochondrial changes and reduced intracellular drug accumulation [92].

6. Nanotechnology and nanoparticles

Nanotechnology is the study and application of nanoscale particles, especially those under 100 nm [93]. In this size range, the particles have unique physical and chemical properties that contribute to their application in several areas, such as biomedicine [94,95]. Nanoparticles (NPs) can be grouped according to their chemical properties: metals, oxides, and polymers [96]. The possibility to control the nanoparticle size, surface properties, location, and drug release of the functionalized nanoparticle makes the use of nanoparticles for drug delivery attractive in the nanomedicine field [97]. Therefore, drug-containing nanoparticles can improve the

pharmacokinetics and pharmacodynamics of this drug and reduce the dose and duration of treatment.

For instance, applications that use polymeric nanoparticles, such as polymersomes, dendrimers, polymer micelles, and nanospheres, have strict control of particle characteristics and can have their surface easily modified regarding molecule or enzyme functionalization and charge alteration. However, they tend to exhibit some traits of particle aggregation and toxicity, which need to be overcome. On the other hand, inorganic nanoparticles, such as silica, iron oxides and gold NPs, and quantum dots, possess unique electrical, magnetic, and optical properties. They also have a wide variation regarding their size, structure organization, and particle geometry, which can be optimized depending on each occasion, making them well suited for theranostic applications. Nevertheless, some issues related to particle toxicity must be addressed. At last, lipid-based NPs such as liposomes, lipid NPs and nanoemulsions present formulation simplicity and high bioavailability despite presenting low encapsulation efficiency [98].

Over the last decade, we have observed accelerated development in nanotechnology in patents involved in nanotechnology. To overcome challenges regarding anti-*Leishmania* drugs, nanotechnological solutions have grown as an option to create new therapeutic approaches, especially nanocarriers in drug delivery systems. Nanoparticles have a significant advantage in biomedical applications because their size allows their interaction with single targets. They possess similar dimensions to biomolecules, viruses, and cell targets, such as organelles [99,100]. This technology brings innovation, improving the bioavailability of drugs, reducing toxicity, and enhancing the effectiveness of treatments. Therefore, nanotechnology offers promising tools for treating infectious diseases, including NTDs [101–103].

Nanoparticles can be functionalized with antileishmanial drugs using devices such as electrostatic forces or binding to functional groups exposed on the nanoparticle's surface [104]. Gold nanoparticles have been very successful in the application for the delivery of antiparasitic drugs [105]. These nanoparticles are easily synthesized and functionalized.

Nanocarriers have become an innovation in treating leishmaniasis because they have specific physical-chemical and structural properties that promote drug delivery where the intracellular amastigotes are found, *i.e.*, the phagolysosome. In this way, in treating VL, for example, the drug can be directed to macrophages belonging to the liver, spleen, and bone marrow, which are the organs affected by VL during its evolution in the patient [106].

Success has been observed in applying lipid and polymeric nanoparticles in treating VL [107]. In contrast, nanoparticles composed of metals in treating CL have achieved good results [108]. Therefore, we can conclude that different constitutions of nanoparticles are indicated for different forms of leishmaniasis. These results can be explained by the need for nanoparticles to reach the internal organs of the sick patient while in the treatment of CL; the external wounds on the patient's skin end up becoming a site for local topical application [109–111].

Curcumin is classified as an immunomodulator with leishmanicidal properties already described in the literature [112]. The construction of a nanoparticle with curcumin called

'nanocurcumin' was evaluated in the model of visceral leishmaniasis in hamsters infected by *L. donovani* and proved to be an excellent candidate for therapy against leishmaniasis [113]. At the same time, other nanoformulations using curcumin have been tested. Nanoliposomal curcumin was evaluated against *L. major* and showed significant effects against promastigotes *in vitro* [114].

Due to their enormous surface area and tiny size, one of the significant challenges of *in vivo* and commercial nanoparticle applications is to avoid nanoparticle aggregation [115–117].

The encapsulation of amphotericin B in a lipid nanoparticle composed of carboxymethyl chitosan showed promising results in terms of safety, biocompatibility, and safety in treating leishmaniasis [118]. An improvement in the bioavailability of amphotericin was demonstrated using the nanoparticle, which led to success in reducing the parasite load in the liver. In addition, the safety of using the nanoformulation orally was demonstrated [118].

7. Protein corona: a challenge to overcome in nanoparticle formulations

The protein corona is a decisive component when controlling the biological activity of NPs *in vivo* assays, as it is described as a biomolecular shell that forms and surrounds those particles while interacting with biological fluids due to the adherence of host proteins on the NPs surface (*e.g.*, blood) [119]. Many physicochemical parameters influence protein corona formation in NPs, such as hydrophobicity, size, morphology, surface charge, presence of ligands, and interactions with medium composition, pH, and exposure time [120].

Concerning NP-host interactions, protein corona affects mainly biodistribution and half-life. Strategies to enhance NP half-life are in development, such as coating with PEG poloxamer and dextran [121–123]. For instance, for PEGylated NPs, increasing the molecular weight of PEG is shown to inhibit protein corona formation [124]. Thus, the kinetic evaluation of this physiological process has been studied regarding its pharmacokinetics, toxicity, and novel cellular interactions. An important aspect is the differentiation between 'hard' (HC) and 'soft' corona (SC) proteins. For instance, HC proteins comprise proteins with high binding affinity yet possessing a low dissociation rate, as they remain solidly bound within NP, while SC proteins bind with less affinity, being constantly replaced [125]. Some issues still need addressing, such as whether SC proteins are different from HC and if there is a role for SC proteins in determining specific cellular interactions.

Thus, strictly controlling nanoparticles' shell and surface properties are crucial to propose drug-delivery and release mechanisms related to *in vivo* models that could be safely applied in human therapeutics. Despite a long way to go, nanoformulations are gaining strong scientific support for their use in nanomedicine as different nanocarrier platforms could be adaptable between different pathological conditions, such as the development of the drug, gene therapy, and vaccinal delivery systems. In addition, reproducibility issues in methodological approaches to determine the interactions between HC and SC still need better sharpening to accelerate the technology implementation in safe, stable, and durable conditions.

8. Patents include drugs and nanoformulations for leishmaniasis

Information on individual patents and patent families containing potential drugs and nanoformulations were obtained by searching the Orbit software (QUESTEL SAS, France) using the following terms: *Leishmania*; treatment; nanoparticle*; drug*. The data obtained ranged from 2015 to 2022, as it comprised 11 patent families and 19 patent documents (Figure 2).

Table 3 summarizes all patents and patent families found within this search [126–140]. These data reflect that approximately 2 (2.25) patents and one patent family (FamPat; 1.25), related to this topic are deposited per year around global patent offices. India, with private research institutes, is the highest depositing country within the Indian Patent Office, with 4 patent families from 2015 to 2018 comprised of lipidic nanoformulations, on the majority (Figure 3). On those lipidic NPs, the aim was to load amphotericin B and natural product extracts in order to assess antileishmanial activity. On the other hand, inventors from Max Planck Institute (Germany) deposited two in the European Patent Office and World Intellectual Property Organization (WIPO), under PCT agreement, regarding technologies based on amphotericin B loaded gold nanoparticles stabilized with thio-hexoses or -pentoses. An interesting feature is that

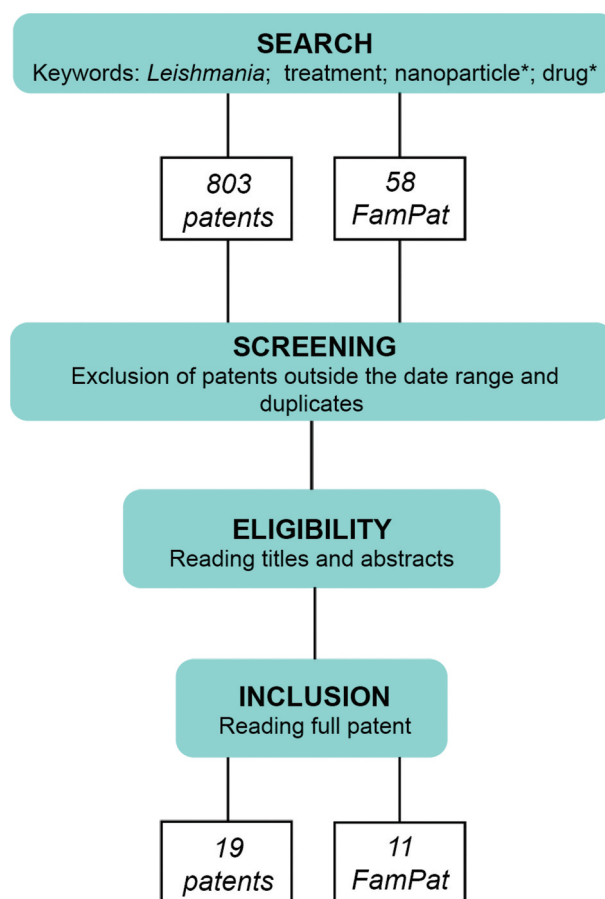


Figure 2. Flowchart of patent search. The following terms were searched on Orbit software: *Leishmania*, treatment, nanoparticle*, drug*. Only patents deposited from 2015 to 2022 were included in this search. After manual curation, the final count of patents and patent families (FamPat) were 19 and 11, respectively.

Table 3. Patent Search in the Orbit software. Patents recovered from 2015 to 2022 belonged to six countries: Italy, India, France, Brazil, US and Germany.

Publication number	Publication year	Inventors' country	Deposit office	Nanoparticle	Reference
WO2015/177820	2015	Italy	World Intellectual Property Organization	PLA nanoparticles loaded with antimonials or compounds containing antimony	[127]
IN2015DE01450	2016	India	Indian Patent Office	Lipid conjugates of hydrophilic or amphiphilic drugs nanoformulations	[128]
IN2015DE00125	2016	India	Indian Patent Office	Polymeric nanoparticles loaded with compounds belonging to the series of (2Z,2'Z)-3,3'-(alkane-1,2-diylbis(azanediyl))bis(6-hydroxy-1-aryl/fluorenyl-hex-2-en-1-one)	[129]
WO2016113763	2016		World Intellectual Property Organization		[130]
US10172947	2019	France	United States Patent and Trademark Office	Hydrophobized chitosan nanoparticles with antiparasitic and antifungal agents	[131]
US20160243243	2016				[132]
BR102013017881	2020	Brazil	Instituto Nacional da Propriedade Intelectual	Chondroitin and chitosan nanoparticles loaded with antileishmanial drugs	[133]
BR102013017881	2016				
BR102013017881	2016				
BR102014031328	2021	Brazil	Instituto Nacional da Propriedade Intelectual	Hemicellulose nanoparticles with essential oils	[134]
BR102014031328	2016				
BR102014031328	2016				
IN279598	2017	India	Indian Patent Office	Solid lipid nanoparticles loaded with amphotericin B	[135]
US10174072	2019	USA	United States Patent and Trademark Office	Liposomal nanoparticles loaded with antileishmanial sterol compounds	[136]
US20170305959	2017				[137]
IN201611009768	2018	India	Indian Patent Office	Chitosan-cholesterol nanocarrier loaded with amphotericin B	[138]
US20210330598	2021	USA	United States Patent and Trademark Office	Amphotericin B Loaded Pegylated Lipid Nanoparticles	[139]
WO2021/116475	2021	Germany	World Intellectual Property Organization	Gold nanoparticles stabilized with thiohexoses or thiopentoses conjugated to amphotericin B	[140]
EP3834848	2021		European Patent Office		[141]

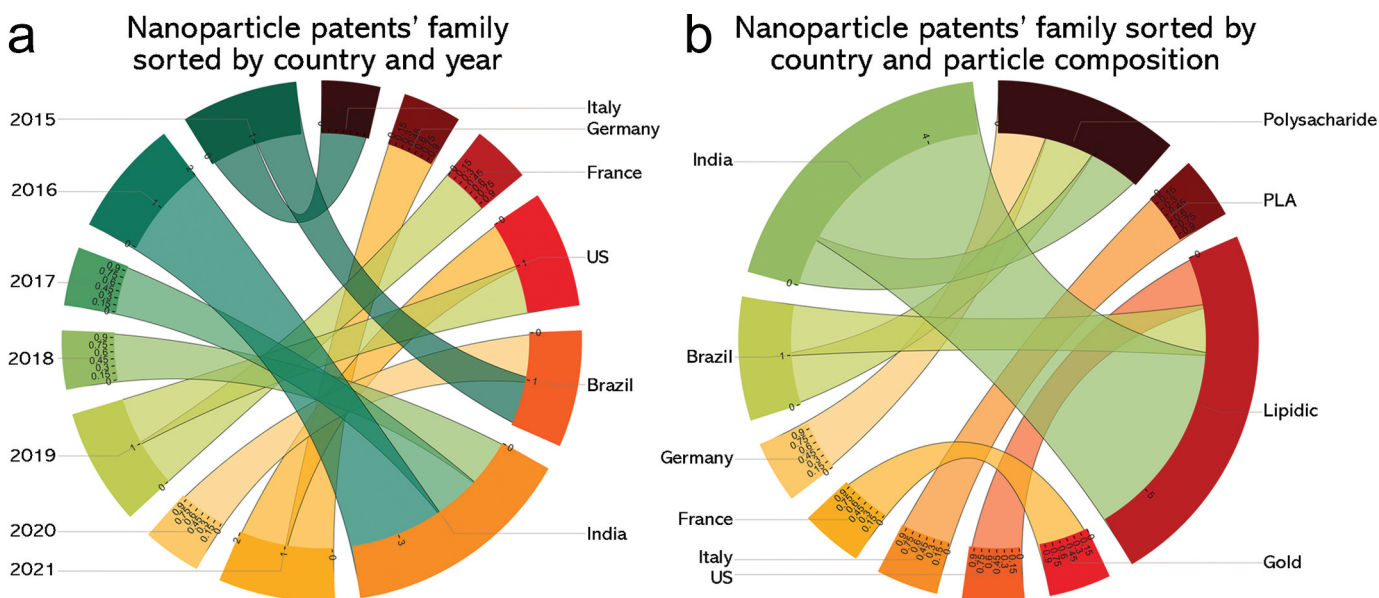


Figure 3. Chord diagram of patents with nanoparticles with antileishmanial activity from 2016 to 2021. a. Nanoparticle patents' family sorted by country and year from 2015 to 2022. The most-depositing country is India, in their national patent office. b. Nanoparticle patent's family sorted by country and nanoparticle composition. The majority of the inventions rely on lipidic nanoparticles, followed by polysaccharide shell NPs, gold, and polyacetic acid NPs.

most NP formulations target fungal and leishmanial infections, as some drugs (e.g., polyenes) are used as therapy for both. Regarding loaded molecules on NP, 9 relied on Amphotericin B as 3 relied on natural product extracts, and one based on meglumine antimoniate. So far, no patent was deposited in 2022 regarding nanoformulations with antileishmanial activity.

For instance, a polymeric nanoparticle was developed in patent WO2015177820 deposited under the PCT agreement, as a vehicle for compounds containing antimony and/or antimonials, such as meglumine antimoniate [126]. The nanoparticle capsule was made of polylactic acid polymer (PLA), and the active principle was trapped in its aqueous core. There was an encapsulation efficiency of 70% of 10 mg of meglumine

antimoniate used for the formulation. Under these conditions, the nanoparticle had an average diameter of approximately 309 nm and great uniformity. The Sb release pattern consisted of a fast release of approximately 50% of the active principle in the first 4 hours at 37°C. Then, a slow and gradual release was observed in the following hours until reaching almost 100% release at 24 hours of follow-up [126].

PLA nanoparticles loaded with the equivalent of 10 µM of pentavalent antimony reached optimal interaction with J774A.1 macrophage after 2 hours of incubation, maintaining the same level of interaction for 12 hours. After 24 hours, there was a decline in the interaction. This observed result is probably due to the cells' metabolization of PLA nanoparticles. Furthermore, when observing the accumulation of the active principle into macrophage cells, it was shown that cells treated with nanoformulation presented over 10 times more accumulation of Sb than the non-encapsulated drug. In addition, it was observed that the nanocapsules were internalized and accumulated into the cell's cytoplasm [126].

Toxicity assays on macrophages infected with *L. tropica* exhibited a reduction in the amount of pentavalent antimonial needed and an increase in effectiveness compared to meglumine antimoniate. In addition, an *in vivo* study of nanoformulation biodistribution demonstrated its ability to reduce the accumulation of the active principle in the kidneys and heart while increasing its bioavailability in the bloodstream compared to the free drug. This result is a positive aspect that can lead to a decrease in drug toxicity to these organs [126].

In sum, the invention described a biodegradable and biocompatible PLA polymeric capsule where pentavalent antimonials are carried and concentrated within infected macrophages. When biodegraded, the active principle will be released inside the cell [126]. Such a mechanism increases the intracellular bioavailability of the drug, reducing its side effects.

Patent EP3834848 by the Max Planck Institute describes gold nanoparticles stabilized with thiohexoses or thiopentoses functionalized with amphotericin B [140]. The nanoformulation was more effective against extra- and intracellular forms of *L. major* and *L. mexicana* than unconjugated amphotericin B. In addition to *Leishmania*, the nanoparticle is promising against infections caused by *Cryptococcus* sp. The particle had a size range of 5–12 nm diameter and a hydrodynamic radius of 20 nm. Toxicity assessment of the nanoformulation showed they were less toxic to red blood cells and macrophages than free amphotericin B. Hemolysis occurred only at high concentrations of 64 µg/ml, while free amphotericin B showed toxicity at 12.5 µg/ml. In J774.1 macrophages, the nanoformulation did not indicate toxicity to cells up to 16 µg/mL, while the free drug was toxic at 4 µg/mL [140].

In addition, the invention also allows the dispersibility of amphotericin B in water since the free molecule is poorly water-soluble. The nanoformulation with gold nanoparticles stabilized with thiohexose or thiopentose was stable for over 6 months when stored between 4–8°C, demonstrating no signs of aggregation or significant loss of the antimicrobial activity of amphotericin B [140].

Regarding patent IN2015DE00125, deposited by All India Institute of Medical Sciences (AIIMS), inventors developed a nanocarrier (NC) system based on cholesterol-maleic anhydride and combining this complex with the chitosan backbone to produce chitosan-cholesterol complex and loading it with

Amphotericin B [128]. The NC system yielded NPs from 180 to 250 nm with a loading efficiency of 52 ± 5.3 to $75 \pm 3.5\%$. Manose-coating was performed to target macrophages. NC was effectively internalized at 30 minutes in J774 A.1 lineage and is colocalized with parasitophorous vacuoles harboring the *L. donovani* bodies (LD-bodies). Macropinocytosis was the preferable route for NC uptake, and the nanoformulation reduced the number of LD-bodies per macrophage in addition to providing a lower IC₅₀ than liposomal amphotericin B formulation [128]. The NC system is a promising therapy as it has proven to be effective in animal models by different administration routes (*e.g.*, oral, parenteral, injection, transdermal, transmucosal, or inhalation).

Despite being promising in treating leishmaniasis, there are few patented nanoparticles to treat this disease compared with published scientific articles. In a brief search on the Web of Science platform, using the same terms and period of time from the patent search on Orbit platform, 148 articles were found (Figure 4). This difference between research articles and patent publications is not exclusive to the application in leishmaniasis but is a trend observed in the entire nanotechnology area. Perhaps, the difficulty in patenting nanotechnology products is due to the difficulty in standardizing the definition of nanotechnology for patent claims [141]. The lack of a standardized definition of what nanoparticles are increases the risk of a patent being invalidated due to how nanotechnology can have different interpretations [141]. In addition, patent agencies face challenges because of the multi-disciplinarity of nanotechnology-based products and inventions. In addition, another factor that might influence this research on the patents gap is the very different nature of scientific articles and patents. Scientific articles have structures that are much easier to find since their aim is to communicate a new finding. On the other hand, patents are generally more difficult to search. They often require a paid search engine and search refinement depending on the topic (*e.g.*, usage of IPC classification codes instead of keywords). In addition, patents are frequently written in a way to generate the broadest legal protection, which may hinder proper research [142].

9. Conclusions

NTD, such as leishmaniasis in its three major clinical manifestations — *i.e.*, VL, CL, and MCL — has unique challenges to be dealt with related to human health, such as interventions for control,

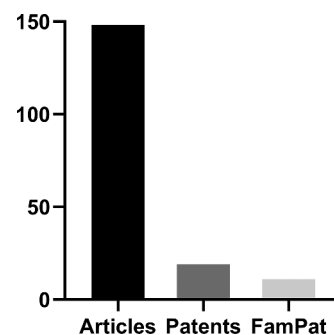


Figure 4. Comparison between articles, patents and patent families (FamPat) in the same time period (2015–2022). Patent research was made in the Orbit software, while articles research was made in the Web of Science platform. The terms searched were: Leishmania; treatment; nanoparticle*; drug*. Data obtained was: 148 scientific articles, 19 patents and 11 patent families (FamPat).

prevention, diagnosis, and treatment. However, NTDs, which affect mainly poor and developing countries, do not attract substantial financial investments that aim for new therapy strategies. Chiefly, because it is a high-investment and low-return market, thus, resulting in a finite number of chemotherapeutics available. In this context, chemotherapy of leishmaniasis sometimes is unsatisfactory related to drug resistance, short half-life, and toxic side effects. Hence, in this field, NPs development is designed to overcome conventional therapeutics, which transpasses the biological barriers at systemic, microenvironmental, or at cellular levels. The progress of NPs usage in nanomedicine is related to their unique delivery capabilities, thus, resulting in exponential growth in the last decades of new nanoformulations and nanotools. However, this trend does not reflect the number of deposited and conceded inventions in the last eight years as we search for nanodelivery systems for leishmaniasis therapeutics. As we observed, approximately two patent documents and one patent family are annually deposited if we consider the NP approach to the problem. Hence, once again, leishmaniasis therapeutics' development does not follow the global trend that demands new solutions for well-established pathologies. On this matter, there is still a long way to go through when it comes to alleviating or eradicating outcomes of leishmaniasis in developing countries. Nevertheless, nanotechnology emerges as an innovative and potential tool to address the challenge of developing therapeutic advances in NTDs, such as leishmaniasis.

10. Expert opinion

Leishmaniasis is a neglected tropical disease that presents more than 1 billion individuals at risk of contracting the disease. The treatment of leishmaniasis shows highly toxic drugs with a high cost, besides a restricted number of drugs available that need hospitalization and monitorization of clinical parameters daily. The emergence of resistance to monotherapy or the combination of therapies has been increasingly reported. Therefore, the need for new drugs, new treatment options is necessary, and innovation is urgent. On this matter, the use of nanocarriers systems is a potent ally to create new approaches for existing drugs and even for new therapeutic compounds.

Leishmaniasis presents different clinical manifestations depending on the species of parasite that infects the vertebrate host. The disease can be divided into tegumentary leishmaniasis (cutaneous and mucocutaneous) and visceral leishmaniasis, which can be fatal if not treated correctly. The visceral form mainly affects the spleen, liver, and bone marrow. While the tegumentary form of the disease presents superficial lesions, topical formulations can help the treatment, although treatment with classic drugs is also recommended. In this case, as wound closure is the main objective, inserting locally acting formulations could accelerate the patient's healing time.

An essential feature is that drugs for treating leishmaniasis must have sufficient lipophilicity to cross the barrier between the cell's cytoplasmic membrane and the phagolysosome membrane. This characteristic could be produced in intelligent nanoformulations directed to the place of need for the action of the drug. Literature shows us that success was achieved with nanoformulations that use nanoparticles with metallic, polymeric and lipid composition

once they have the size, surface area, and ability to cross the barriers imposed by the infection. For instance, lipid-based NPs display some advantages in this set of applications, such as higher bioavailability and facilitating formulation manufacturing. Inorganic and polymeric NPs, on the other hand, are more prone to aggregation and exhibit toxicity features that need to be overcome. In this scenario, patenting drugs or nanoformulations is a vital alternative to attract investments.

During our search on the *Orbit platform*, 803 patents were found, although after screening and applying our exclusion criteria, we only worked with 19 patents published from 2015 to 2022. Within the selected patents, Brazil, France, Germany, India, Italy and US were the depositing countries. India was the top depositing country in this date range, with 4 patent families published in their national patent office.

In Brazil, the number of patents has increased in recent years, although less than other countries. The effort for this change of scenario is mostly caused by Brazilian Federal Universities and Institutes of Research, where most patents are produced. Our Universities and Institutes, such as *Universidade Federal do Rio de Janeiro* and *Instituto Oswaldo Cruz*, tirelessly encourage their students to apply for patents on new drugs and nanoformulations that show promising *in vitro* and *in vivo* results for clinical trials.

In the near future, indeed, an even more significant number of patents may be observed in our country, and also worldwide, with a focus on nanoformulations capable of helping to reduce treatment time as well as the emergence of cases of resistance, reduction of toxic effects, and, consequently, the cost of treatment. Nevertheless, it is still necessary to narrow the gap between scientific research and the actual market. Patented works are more easily targeted by pharmaceutical industries, and, thus, are more likely to become end-user products in the future. The patent protection of these novel nanotechnology may open the way to pharmaceutical industries and consequently, to new and efficient approaches for leishmaniasis treatment.

Funding

This paper was not funded.

Declaration of interests

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Reviewer disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

Author contribution statement

M Verdan and I Taveira did the design of the work, the first draft of the manuscript, the analysis, and interpretation of data, and produced figures and tables; FL Carmo made the data acquisition in the Orbit software; F Abreu did the manuscript revision; D Nico did the conceptualization, the final revision and the final approval to be published.

References

- Kuzuki T, Perry B, Mowbray C. NTD drug discovery booster, achievements and next steps. *Yakugaku Zasshi*. 2022;142(7):685–689.
- WHO, 2022 https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1
- Volpedo G, Huston RH, Holcomb EA, et al. From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global leishmaniasis protection. *Expert Rev Vaccines*. 2021;20(11):1431–1446. DOI:10.1080/14760584.2021.1969231
- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604–615.
- van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):309–322.
- Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl)*. 15 2018;10: 193–201. DOI:10.2147/HIV.S143929
- Sundar S, Chakravarty J. Visceral leishmaniasis. Ponte-Sucré A, Padrón-Nieves M, editors. Cham (Switzerland): Springer; 2018. p. 159–176.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. WHO leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e35671. DOI:10.1371/journal.pone.0035671
- Mokni M. Leishmanioses cutanées [Cutaneous leishmaniasis]. *Ann Dermatol Venereol*. 2019;146(3):232–246.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(7):581–596. DOI:10.1016/S1473-3099(07)70209-8
- Gabriel Á, Valério-Bolas A, Palma-Marques J, et al. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *J Immunol Res*. 2019;2603730:1–16.
- Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *BioMed Res Int*. 2013;2013:1–7.
- Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2021;112(7):601–618. DOI:10.1016/j.ad.2021.02.008
- Stamm LV. Human migration and leishmaniasis-on the move. *JAMA Dermatol*. 2016;152(4):373–374.
- Channon JY, Roberts MB, Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*. 1984;53(2):345–355.
- McConville MJ, de Souza D, Saunders E, et al. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol*. 2007;23(8):368–375. DOI:10.1016/j.pt.2007.06.009
- Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res*. 2011;28(11):2758–2770.
- Desjeux P. Prevention of *Leishmania donovani* infection. *BMJ*. 2010;29(341):c6751.
- Handler MZ, Patel PA, Kapila R, et al. Cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis: clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(6):897–908. DOI:10.1016/j.jaad.2014.08.051
- World Health Organization (WHO). Control of leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniasis, Geneva. Geneva: World Health Organ; 2010.
- Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Durães J, et al. Thymic micro-environment is modified by malnutrition and *Leishmania infantum* infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 12 2019;9: 252.doi: 10.3389/fcimb.2019.00252
- Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2012;34(12):551–561.
- Rojas R, Valderama L, Valderama M, et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis*. 2006;193(10):1375–1383. DOI:10.1086/503371
- Hohman LS, Peters NC. CD4+ T cell-mediated immunity against the phagosomal pathogen *Leishmania*: implications for Vaccination. *Trends Parasitol*. 2019;35(6):423–435.
- Rodriguez-Pinto D, Saravia NG, McMahon-Pratt D. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania (Viannia)* infection. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):108. 25. DOI:10.1186/1471-2334-14-108
- Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr Med Chem*. 2009;16(5):599–614. DOI:10.2174/092986709787458489
- Soni M, Pratap JV. Development of novel anti-leishmanials: the case for structure-based approaches. *Pathogens*. 2022;11(8):950. 22. DOI:10.3390/pathogens11080950
- Briggs N, Wei BM, Ahuja C, et al. Mucocutaneous Leishmaniasis in a pregnant immigrant. *Open Forum Infect Dis*. 2022;9(8):ofac360. 22. DOI:10.1093/ofid/ofac360
- Monge-Maillo B, López-Vélez R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clin Infect Dis*. 2015;60(9):1398–1404. 1. DOI:10.1093/cid/civ004
- Amato V, Amato J, Nicodemo A, et al. Traitement par iséthionate de pentamidine de la leishmaniose muqueuse [Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate]. *Ann Dermatol Venereol*. 1998;125(8):492–495.
- Sundar S, Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17(5):787–794.
- Conceição-Silva F, Leite-Silva J, Morgado FN. The binomial parasite-host immunity in the healing process and in reactivation of human tegumentary Leishmaniasis. *Front Microbiol*. 2018;9:1308. 19. DOI:10.3389/fmicb.2018.01308
- Kumar VU, Kt MF, Sharma A, et al. The possible role of selected vitamins and minerals in the therapeutic outcomes of Leishmaniasis. *Biol Trace Elem Res*. 2023;2(4):1672–1688. Epub ahead of print. 2022. DOI:10.1007/s12011-022-03311-6
- Galvão EL, Pedras MJ, Cota GF, et al. How cutaneous leishmaniasis and treatment impacts patients' lives: a cross-sectional study. *PLoS ONE*. 2019;14(1):e0211374. 25. DOI:10.1371/journal.pone.0211374
- dos Santos Ferreira C, Martins PS, Demicheli C, et al. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine, and glutathione. *Biomaterials*. 2003;16(3):441–446. DOI:10.1023/A:1022823605068
- Matoussi N, Ameer HB, Amor SB, et al. Toxicité cardiaque de l'antimoniato de méglumine (Glucantime). A propos d'une observation [Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report]. *Med Mal Infect*. 2007;37(3):S257–9. DOI:10.1016/j.medmal.2007.08.001
- Veiga JP, Wolff ER, Sampaio RN, et al. Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Lancet*. 1983;2(8349):569. 3. DOI:10.1016/S0140-6736(83)90595-0
- Maristany Bosch M, Cuervo G, Matas Martín E, et al. Neurological toxicity due to antimonial treatment for refractory visceral leishmaniasis. *Clin Neurophysiol Pract*. 25 2021;6: 164–167. DOI:10.1016/j.cnp.2021.03.008
- Kato KC, Morais-Teixeira E, Reis PG, et al. Hepatotoxicity of the pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb(III) and protective effect of ascorbic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):481–488. DOI:10.1128/AAC.01499-13
- Liu M, Chen M, Yang Z. Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. *Drug Deliv*. 2017;24(1):1–9.
- Stone NR, Bicanic T, Salim R, et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs*. 2016;76(4):485–500.
- Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, et al. Amphotericin B: delivery system. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(3):381–384. DOI:10.1128/AAC.34.3.381
- Sabra R, Branch RA. Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Saf*. 1990;5(2):94–108.
- Kaminsky R. Miltefosine Zentaris. *Curr Opin Invest Drugs*. 2002;3(4):550–554.
- Berman J. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2005 Jul;6(8):1381–1388.

46. ZENTARIS AG: impavido registration certificate for Miltefosine capsules 10 mg and 50 mg. Issued by Drug Controller General India. 2002.
47. ZENTARIS AG: impavido registration certificate for Miltefosine capsules 10 mg and 50 mg. Issued by German Registration Authority. 2004.
48. Santos Nogueira F D, Avino VC, Galvis-Ovallos F, et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites Vectors*. 2019;12(1):79. DOI:10.1186/s13071-019-3323-0
49. Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol*. 2007;116(1):1–13.
50. Schlossberg D, Samuel R. Miltefosine (Impavido, Miltex). Antibiot manual a Guid to commonly used anti-microbials. 287–288, 2011.
51. Singh G, Dey CS. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. *Acta Trop*. 2007;103(3):172–185.
52. Basselin M, Lawrence F, Robert-Gero M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem J*. 1996;15(2):315.
53. Naafs B. Pentamidine-induced diabetes mellitus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79(1):141.
54. Kanyok TP, Reddy MV, Chinnaswamy J, et al. In vivo activity of paromomycin against susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(2):170–173. DOI:10.1128/AAC.38.2.170
55. Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(7):653–660.
56. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, et al. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*. 2007;356(25):2571–2581. DOI:10.1056/NEJMoa066536
57. Kasabalis D, Chatzis MK, Apostolidis K, et al. Evaluation of nephrotoxicity and ototoxicity of aminosidine (paromomycin)-allopurinol combination in dogs with leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: a randomized, blinded, controlled study. *Exp Parasitol*. 2019;206:107768.
58. Letzring DP, Wolf AS, Brule CE, et al. Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *RNA*. 2013;9(9):1208–1217. DOI:10.1261/rna.039446.113
59. Verrest L, Wasunna M, Kokwaro G, et al. Geographical Variability in Paromomycin Pharmacokinetics Does Not Explain Efficacy Differences between Eastern African and Indian Visceral Leishmaniasis Patients. *Clin Pharmacokinet*. 2021;60(11):1463–1473. DOI:10.1007/s40262-021-01036-8
60. White NJ. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parasitologia*. 1999;41(1–3):301–308.
61. Maldonado V, Loza-Mejía MA, Chávez-Alderete J. Repositioning of pentoxifylline as an immunomodulator and regulator of the renin-angiotensin system in the treatment of COVID-19. *Med Hypotheses*. 2020;144:109988.
62. Lessa HA, Machado P, Lima F, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(2):87–89. DOI:10.4269/ajtmh.2001.65.87
63. Nasiri-Toosi Z, Dashti-Khavidaki S, Khalili H, et al. A review of the potential protective effects of pentoxifylline against drug-induced nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69(5):1057–1073. DOI:10.1007/s00228-012-1452-x
64. Cincura C, Costa RS, De Lima CMF, et al. Assessment of Immune and Clinical Response in Patients with Mucosal Leishmaniasis Treated with Pentavalent Antimony and Pentoxifylline. *Trop Med Infect Dis*. 2022;7(11):383. DOI:10.3390/tropicalmed7110383
65. Brito G, Dourado M, Guimarães LH, et al. Oral Pentoxifylline Associated with Pentavalent Antimony: a Randomized Trial for Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96(5):1155–1159. DOI:10.4269/ajtmh.16-0435
66. Castro MDM, Cossio A, Navas A, et al. Pentoxifylline in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: a Randomized Clinical Trial in Colombia. *Pathogens*. 2022;11(3):378. DOI:10.3390/pathogens11030378
67. Seifert K, Croft SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):73–79.
68. Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, et al. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(4):429–431. DOI:10.1016/S0035-9203(00)90130-5
69. Parvez S, Yadagiri G, Gedda MR, et al. Modified solid lipid nanoparticles encapsulated with Amphotericin B and Paromomycin: an effective oral combination against experimental murine visceral leishmaniasis. *Sci Rep*. 2020;10(1):12243. DOI:10.1038/s41598-020-69276-5
70. Lee H, Baek KH, Phan TN, et al. Discovery of *Leishmania donovani* topoisomerase IB selective inhibitors by targeting protein-protein interactions between the large and small subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;569:193–198.
71. Marquis JF, Drolet M, Olivier M. Consequence of Hoechst 33342-mediated *Leishmania* DNA topoisomerase-I inhibition on parasite replication. *Parasitology*. 2003;26(1):21–30.
72. Singh G, Jayanarayan KG, Dey CS. Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite-resistant *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;141(1):57–65.
73. Feng M, Jin Y, Yang S, et al. Sterol profiling of *Leishmania* parasites using a new HPLC-tandem mass spectrometry-based method and antifungal azoles as chemical probes reveals a key intermediate sterol that supports a branched ergosterol biosynthetic pathway. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2022;20:27–42.
74. Wadanambi PM, Mannapperuma U. Computational study to discover potent phytochemical inhibitors against drug target, squalene synthase from *Leishmania donovani*. *Heliyon*. 2021;7(6):e07178.
75. Leroux AE, Krauth-Siegel RL. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol*. 2016;206(1–2):67–74.
76. Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res*. 2008;41(1):15–25.
77. da Silva ER, Maquiaveli Cdo C, Magalhães PP. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Exp Parasitol*. 2012;130(3):183–188.
78. da Silva ER, Boechat N, Pinheiro LC, et al. Novel selective inhibitor of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Chem Biol Drug Des*. 2015;86(5):969–978. DOI:10.1111/cbdd.12566
79. Perry MR, Prajapati VK, Menten J, et al. Arsenic exposure and outcomes of antimonial treatment in visceral leishmaniasis patients in Bihar, India: a retrospective cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003518. DOI:10.1371/journal.pntd.0003518
80. Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, et al. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem*. 2001;276(28):26301–7. DOI:10.1074/jbc.M102351200
81. Mandal G, Mandal S, Sharma M, et al. Species-specific antimonial sensitivity in *Leishmania* is driven by post-transcriptional regulation of AQP1. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003500. DOI:10.1371/journal.pntd.0003500
82. Nateghi-Rostami M, Tasbihi M, Darzi F. Involvement of trypanothione peroxidase (TryP) and trypanothione reductase (TryR) in antimony unresponsive of *Leishmania tropica* clinical isolates of Iran. *Acta Trop*. 2022;230:106392.
83. Singh J, Khan MI, Singh Yadav SP, et al. L-Asparaginase of *Leishmania donovani*: metabolic target and its role in Amphotericin B resistance. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2017;7(3):337–349. DOI:10.1016/j.ijpddr.2017.09.003
84. Rebello KM, Andrade-Neto VV, Gomes CRB, et al. Miltefosine-Lopinavir Combination Therapy Against *Leishmania infantum* Infection: *in vitro* and *in vivo* Approaches. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:229. DOI:10.3389/fcimb.2019.00229

85. Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;21(21):8965–8977. DOI:10.1007/s00253-020-10856-w
86. Ahmed H, Curtis CR, Tur-Gracia S, et al. Drug combinations as effective anti-leishmaniasis against drug resistant *Leishmania mexicana*. *RSC Med Chem.* 2020;11(8):905–912. DOI:10.1039/D0MD00101E
87. Andrade-Neto VV, Rebello KM, Pereira TM, et al. Effect of Itraconazole-Ezetimibe-Miltefosine Ternary Therapy in Murine Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(5):e02676-20. DOI:10.1128/AAC.02676-20
88. Yang YH, Buttery J. Antimicrobial resistance: a global one-health problem for all ages. *World J Pediatr.* 2018;6(6):521–522.
89. Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol.* 1999;44:1–39.
90. Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, et al. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10383–10387. DOI:10.1073/pnas.93.19.10383
91. García-Hernández R, Manzano JI, Castanys S, et al. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12):e1974. DOI:10.1371/journal.pntd.0001974
92. Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, et al. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;145(1):1–10. DOI:10.1016/j.molbiopara.2005.08.016
93. Whatmore RW. Nanotechnology—what is it? Should we be worried? *Occup Med.* 2006;56(5):295–299.
94. Heath JR. Nanotechnologies for biomedical science and translational medicine. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(47):14436–14443.
95. Kumar N, Kumbhat S. *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*, 1st ed. Hoboken (USA): Wiley, 2016:p. 326–360. Chapter 8, Unique properties.
96. Stark WJ, Stoessel PR, Wohlleben, et al. A Industrial applications of nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2014;46(38).
97. Jamshaid H, Ud DF, Khan GM. Nanotechnology-based solutions for anti-leishmanial impediments: a detailed insight. *J Nanobiotechnology.* 2021;19(1):1–51.
98. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(2):101–124. DOI:10.1038/s41573-020-0090-8
99. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology.* 2004;6:1–6.
100. Thomas TC, Acuña-Narvaez R. The convergence of biotechnology and nanotechnology: why here, why now? *J Commer Biotechnol.* 2006;12(2):105–110.
101. Kirtane AR, Verma M, Karandikar P, et al. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nat Nanotechnol.* 2021;16(4):369–384. DOI:10.1038/s41565-021-00866-8
102. Joshi G, Quadir SS, Yadav KS. Road map to the treatment of neglected tropical diseases: nanocarriers interventions. *J Control Release.* 2021;339:51–74.
103. Pandian SRK, Panneerselvam T, Pavada P, et al. Nano Based Approach for the Treatment of Neglected Tropical Diseases. *Front Nanotechnol.* 2021;3(3):1–21. DOI:10.3389/fnano.2021.665274
104. Zhang B, Chen J, Cao Y, et al. Ligand Design in Ligand-Protected Gold Nanoclusters. *Small.* 2021 Jul;17(27):e2004381.
105. Benelli G. Gold nanoparticles – against parasites and insect vectors. *Acta Trop.* 2018;178:73–80.
106. Saleem K, Khurshed Z, Hano C, et al. Applications of Nanomaterials in Leishmaniasis: a Focus on Recent Advances and Challenges. *Nanomaterials.* 2019;9(12):1749. DOI:10.3390/nano9121749
107. Smith L, Serrano DR, Mauger M, et al. Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis. *Mol Pharm.* 2018;15(7):2570–2583. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00097
108. El-Khadragy M, Alolayan EM, Metwally DM, et al. Clinical Efficacy Associated with Enhanced Antioxidant Enzyme Activities of Silver Nanoparticles Biosynthesized Using *Moringa oleifera* Leaf Extract, Against Cutaneous Leishmaniasis in a Murine Model of *Leishmania major*. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(5):1037. DOI:10.3390/ijerph15051037
109. Ahmad A, Wei Y, Syed F, et al. Isatis tinctoria mediated synthesis of amphotericin B-bound silver nanoparticles with enhanced photo-induced antileishmanial activity: a novel green approach. *J Photochem Photobiol B.* 2016;161:17–24.
110. Ahmad A, Wei Y, Ullah S, et al. Synthesis of phytochemicals-stabilized gold nanoparticles and their biological activities against bacteria and *Leishmania*. *Microb Pathog.* 2017;110:304–312.
111. Ahmad A, Ullah S, Syed F, et al. Biogenic metal nanoparticles as a potential class of antileishmanial agents: mechanisms and molecular targets. *Nanomedicine (Lond).* 2020;15(8):809–828. DOI:10.2217/nmm-2019-0413
112. Albalawi AE, Alanazi AD, Sharifi I, et al. A Systematic Review of Curcumin and its Derivatives as Valuable Sources of Antileishmanial Agents. *Acta Parasitol.* 2021 Sep;66(3):797–811.
113. Tiwari B, Pahuja R, Kumar P, et al. Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(3):2323. DOI:10.1128/AAC.01169-16
114. Fattahi Bafghi A, Haghirosadat BF, Yazdian F, et al. A novel delivery of curcumin by the efficient nanoliposomal approach against *Leishmania major*. *Prep Biochem Biotechnol.* 2021;51(10):990–997. DOI:10.1080/10826068.2021.1885045
115. Tang H, Ye H, Zhang H, et al. Aggregation of nanoparticles regulated by mechanical properties of the nanoparticle-membrane system. *Nanotechnology.* 2018;29(40):405102. DOI:10.1088/1361-6528/aad443
116. Laradji M, Kumar PBS, Spangler EJ. Adhesion and Aggregation of Spherical Nanoparticles on Lipid Membranes. *Chem Phys Lipids.* 2020;233:104989.
117. Lavagna E, Barnoud J, Rossi G, et al. Size-dependent aggregation of hydrophobic nanoparticles in lipid membranes. *Nanoscale.* 2020;12(17):9452–9461. DOI:10.1039/D0NR00868K
118. Singh A, Yadagiri G, Negi M, et al. Carboxymethyl chitosan modified lipid nanoformulations as a highly efficacious and biocompatible oral anti-leishmanial drug carrier system. *Int j biol macromol.* 2022;04:373–385.
119. Mahmoudi M. The need for improved methodology in protein corona analysis. *Nat Commun.* 2022;13(1):1–4.
120. Tekie FSM, Hajramezani M, Geramifard P, et al. Controlling evolution of protein corona: a prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–14. DOI:10.1038/s41598-020-66572-y
121. Sacchetti C, Motamedchaboki K, Magrini A, et al. Surface polyethylene glycol conformation influences the protein corona of polyethylene glycol-modified single-walled carbon nanotubes: potential implications on biological performance. *ACS Nano.* 2013;7(3):1974–1989. DOI:10.1021/nn400409h
122. Sanchez-Moreno P, Buzon P, Boulaiz H, et al. Balancing the effect of corona on therapeutic efficacy and macrophage uptake of lipid nanocapsules. *Biomaterials.* 2015;61:266–278.
123. Peng M, Li H, Luo Z, et al. Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles as potential cancer drug carriers in vivo. *Nanoscale.* 2015;7(25):11155–11162. DOI:10.1039/C5NR01382H
124. Natte K, Friedrich JF, Wohlrab S, et al. Impact of polymer shell on the formation and time evolution of nanoparticle–protein corona. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;104:213–220.
125. Mohammad-Beigi H, Hayashi Y, Zeuthen CM, et al. Mapping and identification of soft corona proteins at nanoparticles and their impact on cellular association. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–16. DOI:10.1038/s41467-020-18237-7
126. Domenico B, Donato C, Massimo F, et al., Inventors; Università Degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, assignee. Nanoparticulate systems for vehiculating drugs for the treatment of leishmania infection-related pathologies. PCT patent WO2015/177820. 2015.
127. Sanyog J, Kaushik T, inventors; National Institute Of Pharmaceutical Education & Research, assignee. Novel lipid drug conjugates for improved oral delivery of amphotericin B and nanoformulations thereof. India patent IN2015DE01450. 2016.

128. Neena G, Sonali G, Kala SAK, et al., inventors; Council of Scientific & Industrial Research, Assignee. A novel antileishmanial formulation. India patent IN2015DE00125. 2016.
129. Neena G, Sonali G, Kala SAK, et al., inventors; Council of Scientific & Industrial Research, assignee. A novel antileishmanial formulation. PCT patent WO2016113763. 2016.
130. Kawthar B, Christian B, Philippe L, et al., inventors; Centre National De La Recherche Scientifique, Universite Paris Saclay, assignees. Antiparasitic and/or antifungal composition comprising hydrophobized chitosan. United States patent US10172947. 2019.
131. Kawthar B, Christian B, Philippe L, et al., inventors; Centre National De La Recherche Scientifique, Universite Paris Saclay, assignees. Antiparasitic and/or antifungal composition comprising hydrophobized chitosan. United States patent US20160243243. 2016.
132. Faraco AAG, Coelho EAF, Franca JR, et al., inventors; Universidade Federal De Minas Gerais, assignee. Uso de nanopartículas de quitosana e condroitina para o tratamento de leishmaniose. Brazil patent BR102013017881. 2020 Mar 4.
133. Moreira ACOM, da Costa FN, Moreira RA, inventors; Fundação Edson Queiroz, assignee. Processo de obtenção e uso de nanopartícula a base de hemicelulose contendo óleos essenciais com atividade antiparasitária em doenças negligenciadas. Brazil patent BR102014031328. 2021.
134. Bharat PV, Anilbhai PP, inventors. Lipidic nanoparticles based composition and method of formulation and use thereof. India patent IN279598. 2017.
135. Satoskar AR, Fuchs JF, Kinghorn AD, et al., inventors; Ohio State Innovation Foundation, assignee. Antileishmanial compositions and methods of use. United States patent US10174072. 2019.
136. Satoskar AR, Fuchs JF, Kinghorn AD, et al., inventors; Ohio State Innovation Foundation, assignee. Antileishmanial compositions and methods of use. United States patent US20170305959. 2017.
137. Madhusudan B, Ranjan MA, Susmita M, et al., inventors; All India Institute of Medical Sciences, assignee. Novel nanocarrier for efficient drug delivery. India patent IN201611009768. 2018.
138. Soumyajit M, Akash P, Prit P, inventors; University of Mississippi, assignee. Amphotericin Loaded Pegylated Lipid Nanoparticles and Methods of Use. United States patent US20210330598. 2021.
139. Chandradhish G, Peter S, inventors; Max Planck Institute, assignee. Amphotericin B conjugated stabilized gold nanoparticles and uses thereof. PCT patent WO2021/116475. 2021.
140. Chandradhish G, Peter S, inventors; Max Planck Institute, assignee. Amphotericin B conjugated stabilized gold nanoparticles and uses thereof. Europe Patent Office EP3834848. 2021.
141. WIPO [Internet]. Geneva, Switzerland: world Intellectual Property; c1967-2022. Patenting Nanotechnology: exploring the Challenges; 2011 Apr [cited 2022 Dec 13]; [about 7 screens]. Available from: https://www.wipo.int/wipo_magazine/en/2011/02/article_0009.html
142. Peters P Mind the gap: spanning the divide between patents and journal articles [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Dec 13]. Available from: <https://www.cas.org/resources/blog/mind-gap-spanning-divide-between-patents-and-journal-articles>

Applications of Biological Magnetic Nanoparticles in Nanobiotechnology

**Juliana G. Ferreira¹, Vinavadini Ramnarain², Igor Taveira¹, Júlia de Castro¹, Rogério Presciliano¹,
Beatriz A. Vessalli¹, Dris Ihiawakrim², Ovidiu Ersen², Fernanda Abreu¹**

¹Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Rio de Janeiro, Brazil

julianaguimaraes@micro.ufrj.br; taveira@micro.ufrj.br; julia.castro@micro.ufrj.br; rogeriopsfilho@micro.ufrj.br;
b.vessalli@gmail.com; fernandaaabreu@micro.ufrj.br

²Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg

23 rue du Loess, 67200, Strasbourg, France

vinavadini.ramnarain@ipcms.unistra.fr; dris.ihiawakrim@ipcms.unistra.fr; ovidiu.ersen@ipcms.unistra.fr

Extended Abstract

Magnetotactic bacteria (MTB) are a diverse group of aquatics, flagellated Gram-negative prokaryotes that biomineralize magnetosomes [1]. These structures are ferrimagnetic nanocrystals composed of magnetite (Fe₃O₄) or greigite (Fe₃S₄) surrounded by a biological membrane. Magnetosomes are diverse in shape and size and usually aligned in chains along within the cell. These structures allow bacteria to align themselves along the geomagnetic field. This passive alignment associated with MTB active swimming through flagellar propulsion is a behavior called magnetotaxis [2]. Magnetosomes are single-magnetic domains, therefore permanently magnetized. Furthermore, they are chemically pure, crystallographically perfect, biocompatible, and temperature resistant, which are valuable properties in biotechnological applications, distinguishing them from most chemically synthesized magnetic nanoparticles [3]. The natural enveloping membrane is beneficial because it adds colloidal stability to the magnetosome and anchorage sites for functionalizing molecules, including enzymes, genes, antibodies, binding proteins, drugs, and many others. The protein content of the magnetosome's membrane seems to be species-specific, even though the crystals may have similar morphologies. Therefore, it is crucial to stimulate research regarding this topic so that we can understand and direct the best functionalization methods.

Magnetosomes can be extracted from the cell and magnetically purified to be used as an eco-friendly and low-cost nanotool [4]. Their applications have been described in different areas, such as cell separation, drug delivery, DNA and food analysis, enzyme immobilization, bioremediation, contrast enhancement of magnetic resonance imaging, and magnetic hyperthermia [5]. In this meta-analysis review, we aim to gather updated information on the applications of magnetosomes in nanotechnology to understand the relationship among the MTB species, the morphology of magnetosomes, and their areas of application. Hence, a meta-analysis considering the synthetic magnetite nanoparticles and magnetosomes in nanotechnological application is still in progress. The database chosen was Web Of Science and an advanced research code will be written. We expect to find the synthesis methodology of synthetic nanoparticles to be more laborious and high-costing than the magnetosome production, since it usually requires high temperature and a coating step, besides generating chemical waste. Magnetosomes, on the other hand, are an eco-friendly nanotool that already has a biological membrane, which reduces the process cost and time.

Articles regarding MTB date from 1975, but it was not until 1990 that magnetosome's biotechnological application was explored. We observed that magnetosome applications cover approximately 10% of articles published about MTB throughout the years, showing that it is still a vast and unexplored topic. The main MTB used in studies synthesizes cuboctahedral magnetosomes belonging to the *Magnetospirillum* genus, which are strains MSR-1, AMB-1, and MS-1. Nonetheless, recent reports indicate efficient use of the prismatic magnetosomes of *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1^T in magnetic hyperthermia [6] and demonstrated that they display high binding efficiency regarding drug functionalization [4]. Authors have developed a nanoformulation with Amphotericin B, exploring unique properties related to these magnetosomes' surface chemistry and surface area [4].

In alignment with the global demand for new approaches to treat antibiotic resistant infections, we have been exploring the potential of magnetosome based antimicrobial formulations. By pre-treating magnetosomes with the cationic polymer, poly-L-lysine, the β -lactam antibiotic, ampicillin, and the β -lactamase inhibitor, clavulanate were successfully bound to prismatic magnetosomes. For 100 μg of magnetosomes, mean capture capacities were $15,6 \pm 3,37 \mu\text{g}$ and $21,2 \pm 4,16 \mu\text{g}$ for ampicillin and clavulanate, respectively. In microdilution assays against a susceptible strain of *Staphylococcus aureus* the developed nanoformulation had a significantly higher effect on disrupting cell growth compared to the antibiotic alone in the same concentrations. In future research, the antimicrobial potential of the nanoformulation will be evaluated under the application of magnetic hyperthermia.

Even though magnetosomes' applications were explored in several areas, magnetic hyperthermia and drug delivery are the most studied topic, especially in cancer treatment, which covers 57.14% of publications. Thus, magnetosomes from strains AMB-1 and MSR-1 are the most used in these cases, which may be due to their well-established culture and optimised yield. Nevertheless, reports have also shown magnetosomes' potential in bioremediation. In this scenario, a wide variety of magnetosomes and their applications are still undiscovered, opening a great field of possibilities in Nanobiotechnology. Hopefully, the meta-analysis proposed here will indicate approaches in which magnetosomes could be efficiently applied.

References

- [1] R. Blakemore "Magnetotactic bacteria," *Science*, vol. 190, no. 4212, pp. 377-379, 1975.
- [2] D. A. Bazylinski and R. B. Frankel, "Magnetosome formation in prokaryotes," *Nat. Rev. Microbiol*, vol. 2, no. 3, pp. 217-230, 2004.
- [3] M. Amor., V. Busigny., M. Durand-Dubief., M. Tharaud., G. Ona-Nguema., A. Gélabert., E. Alphanféry., N. Menguy., M. F. Benedetti., I. Chebbi., and F. Guyot. "Chemical signature of magnetotactic bacteria," *PNAS*, vol. 112, n. 6, pp. 1699-1703, 2015.
- [4] T. Correa, D. A. Bazylinski., F. Garcia., F. Abreu. "A rapid and simple preparation of amphotericin B-loaded bacterial magnetite nanoparticles," *RSC advances*, vol. 11, no. 45, pp. 28000-28007, 2021.
- [5] G. Vargas., J. Cypriano., T. Correa., P. Leão., D. A. Bazylinski., F. Abreu. "Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review," *Molecules*, vol. 23, no. 10, pp. 2438, 2018.
- [6] J. Cypriano., M. Bahri., K. Dembelé., W. Baaziz., P. Leão., D. A. Bazylinski., F. Abreu., O. Ersen., M. Farina., J. Werckmann. "Insight on thermal stability of magnetite magnetosomes: Implications for the fossil record and biotechnology," *Scientific reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1-10, 2020.

**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
BIOGÊNICAS E USO DAS MESMAS**

CAMPO DE APLICAÇÃO

[0001] A presente invenção se aplica à área da nanotecnologia e biotecnologia, voltando-se para o uso em áreas laboratoriais, industriais e ambientais, e revela um processo de produção de nanopartículas magnéticas biogênicas e os seus usos, em voga, na descoloração de corantes têxteis da classe azo.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] A poluição causada por corantes presentes em efluentes industriais é um importante problema do ponto de vista socioambiental. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 17 a 20% da poluição industrial da água provém da etapa de tingimentos de material têxtil. Estima-se, que cerca de 80% dos corantes utilizados pelas indústrias têxteis são da classe azo e que 10 a 15% dos corantes são perdidos para o efluente. Este tipo de poluição é de alta importância para o Brasil, uma vez que nele está instalado o quarto maior parque têxtil produtivo do mundo, com uma produção média anual de 1,3 milhão de toneladas de tecidos.

[0003] Esse setor é, ainda, um forte segmento produtivo do Estado do Rio de Janeiro, contando com aproximadamente 330 indústrias instaladas. O despejo do efluentes dessas indústrias em corpos d'água pode afetar a atividade fotossintética de microrganismos e plantas, pois bloqueia a penetração da luz solar, reduzindo assim a quantidade de

oxigênio dissolvido disponível para os organismos aquáticos. Além de reduzir a disponibilidade de oxigênio no corpo d'água receptor, os corantes da classe azo podem se reduzir no ambiente em aminas aromáticas, que apresentam propriedades cancerígenas e podem desencadear uma série de efeitos deletérios à saúde humana como dermatites, alergias, náusea, hemorragia, ulcerações de mucosas e na pele e, em casos mais graves, atingem o sistema reprodutivo, renal, fígado, cérebro e sistema nervoso central.

[0004] Devido à sua natureza química, a maioria dos corantes é de baixa biodegradabilidade, permanecendo no meio ambiente por longos períodos, podendo persistir por mais de 50 anos. Por esse motivo, tecnologias de tratamento de efluentes têm sido aprimoradas para melhorar a remediação desse tipo específico de poluente. Os métodos físico-químicos como coagulação, adsorção à carbono ativado, coaglutinação, osmose reversa, oxidação avançada, ozonização, degradação fotoquímica, reação de Fenton, oxidação eletroquímica, filtração, fotocatalise, catalise química apresentam resultados promissores em termos de desempenho, porém do ponto de vista econômico e ambiental sua aplicação é um desafio, porque podem produzir lodo com resíduos de aminas, formam poluição secundária e ainda podem não degradar completamente os corantes.

[0005] Frente ao exposto, os métodos de degradação dos corantes através de técnicas biológicas e enzimáticas surgem como alternativas mais eficientes e acessíveis. A degradação

microbiana é o método mais viável economicamente, porém nem sempre os microrganismos são capazes de prosperar nas condições do efluente, mas suas enzimas podem ser produzidas em condições controladas e aplicadas diretamente no efluente. A utilização de enzimas microbianas pode ser otimizada através da sua imobilização, que permite sua recuperação e reutilização por vários ciclos de degradação. Lacases, azoredutases, lignina peroxidases e manganês peroxidases são as enzimas amplamente estudadas na descoloração de corantes devido as suas amplas gamas de substratos e excelentes eficiências catalíticas. Nanopartículas magnéticas são ferramentas conhecidas para imobilização enzimática, porém nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs) como suporte para oxiredutases aplicadas à degradação de corantes é uma novidade. As NMOBs são obtidas através de processo sustentável e possuem baixo custo quando comparadas às nanopartículas magnéticas sintéticas de características semelhantes. O emprego de enzimas microbianas imobilizadas em suportes magnéticos vem sendo explorado intensamente devido à facilidade de recuperação dos biocatalisadores para reutilização em vários ciclos de degradação.

[0006] As principais vantagens da utilização de NMOBs contendo enzimas é que (i) NMOBs são mais sustentáveis e menos onerosas quando comparados com nanopartículas magnéticas sintéticas e possuem uma estabilidade maior em relação à degradação; (ii) a utilização de enzimas aderidas

a um suporte magnético permite que estas sejam reaproveitadas por vários ciclos; (iii) NMOBs são nanopartículas magnéticas de características químicas únicas por apresentarem membrana lipídica e proteínas associadas que por si podem apresentar atividade descorante. Essa membrana também atua como região de captura de moléculas de interesse, como as enzimas descorantes de interesse nesta invenção. Além disso, a perfeição estrutural do núcleo magnético das NMOBs garante sua alta estabilidade frente a condições variadas.

[0007] Por uma questão de custo e falta de novas alternativas técnicas que apresentem bom custo-benefício para o tratamento biológico de águas residuais, atualmente se utilizam lagoas aeradas, tanques de percolação e reatores de membrana contendo micro-organismos ao invés das suas enzimas. O tratamento biológico gera lodo, que precisa passar por tratamento posterior. A utilização de enzimas reduz a formação desse lodo e permite trabalhar em faixas de condições de pH e temperatura mais ampliadas, entretanto seu custo ainda é proibitivo para aplicação em estações de tratamentos. A possibilidade de reaproveitamento com recuperação magnética simples dessas enzimas reduz seu custo a longo prazo e torna a tecnologia competitiva e aplicável para este fim. Lacases e peroxidases são comercialmente produzidas para aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e para deslignificação de celulose na produção de papel.

[0008] Embora ainda não haja uma nanopartícula magnética sintética comercial com estas enzimas, há trabalhos que descrevem sua utilização e produção para tratamento de corantes, entretanto, tal tecnologia utiliza nanopartículas de óxido de ferro sintético, por vezes depositados sobre óxido de grafeno. Tais nanopartículas tem um tempo de uso limitado e requerem procedimentos adicionais para aquisição de grupos funcionais para imobilização das enzimas.

[0009] Assim, com o intuito de solucionar os problemas apresentados anteriormente, a presente invenção utiliza nanopartículas magnéticas de origem biogênica (NMOBs), mais sustentáveis, estáveis e inovadoras. A estabilidade garante a possibilidade de reutilização e eficiência das nanoferramentas, o que difere essencialmente das tecnologias estudadas. Assim, é apresentado um processo de descoloração de efluentes baseado em um produto inovador totalmente de base biológica.

ESTADO DA TÉCNICA

[0010] O documento BR1020200158317 descreve um processo de produção contínua e em larga escala de magnetossomos através do cultivo de bactérias magnetotáticas *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1T em biorreator. Este processo em larga escala possui maior produtividade de magnetossomos, com baixo custo e características físico-químicas controladas, tornando viável a sua aplicação. A otimização do cultivo de *Mv. blakemorei* cepa MV-1 T em biorreator é vantajosa, pois seus magnetossomos prismáticos apresentam uma superfície

disponível maior que a dos magnetossomos cuboetaédricos do gênero *Magnetospirillum*. Adicionalmente, o invento promove uma produção estável de magnetossomos por períodos mais extensos de cultivo, sendo uma das vantagens da invenção frente as outras técnicas existentes do mercado. As aplicações dos magnetossomos incluem o carreamento e liberação de fármacos, hipertermia induzida magneticamente, separação de células e biomoléculas e imobilização de enzimas.

[0011] No entanto, o documento acima difere da presente invenção, quanto ao ponto defendido. Nesse sentido, o documento BR1020200158317 caracteriza o processo de produção de NMOBs que são obtidas a partir do cultivo da bactéria magnetotática (BM) *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T ao passo que a presente invenção emprega tais partículas, anteriormente produzidas e purificadas, em um processo de produção de nanoferramenta magnética, oferecendo uma funcionalidade inexistente na patente BR1020200158317 e um processo de descoloração da classe de corantes azo através do uso da nanoferramenta desenvolvida. Portanto, o documento acima prioriza a caracterização do processo de cultivo bacteriano e a purificação de seus metabólitos (*i.e.*, NMOBs) ao passo que a presente invenção discorre sobre a aplicação destas nanopartículas. Na presente invenção, esta classe de nanopartículas é funcionalizada com extrato enzimático extracelular bruto produzido por *Bacillus sp.*

[0012] A dissertação intitulada "Imobilização de Lacase em Partículas Magnéticas Recobertas com Quitosana para Aplicação na Degradação de Corantes Têxteis" aponta que a capacidade de oxidação de uma grande variedade de substratos e a autonomia relativa das lacases frente a outras enzimas têm atraído grande interesse no desenvolvimento de tecnologias para aplicações na área industrial e ambiental como um catalisador verde. A baixa estabilidade e o elevado custo de produção são os principais fatores que limitam o uso de enzimas em processos de tratamento de efluentes. Desta forma, o principal objetivo do trabalho foi sintetizar um suporte magnético, recobrir com quitosana e imobilizar a enzima lacase, a fim de aplicar o biocatalisador imobilizado na degradação de corantes sintéticos presentes em efluentes têxteis. Foram utilizadas duas lacases para o estudo, uma de *Marasmiellus palmivorus* (bruta e purificada) e outra de *Trametes versicolor* (comercial). As proteínas do extrato bruto enzimático produzido pelo fungo *M. palmivorus* foram concentradas e a lacase foi imobilizada em partículas de magnetita sintetizadas pelo método de co-precipitação e recobertas com quitosana por gelificação ionotrópica. O suporte foi funcionalizado com glutaraldeído e caracterizado por VSM, método de BET, MEV e FTIR. A maior atividade da lacase bruta imobilizada de *M. palmivorus* foi obtida com 25 mg proteína.g suporte seco⁻¹ e 90 mM de glutaraldeído e foi de 139,84 U.g suporte seco⁻¹, com eficiência de 48,74% e rendimento acima de 99%; enquanto que para a lacase

purificada imobilizada de *M. palmivorus* obteve-se 268,40 U.g suporte seco⁻¹ com 15 mg proteína.g suporte seco⁻¹ e o rendimento e eficiência foram de 98,02% e 27,15%, respectivamente. Para a lacase comercial imobilizada, a maior atividade foi alcançada com 571 mg proteína.g suporte seco⁻¹ e foi de 74,92 U.g suporte seco⁻¹, com eficiência de 45,30% e rendimento de 97,58%. O pH ótimo da lacase bruta solúvel e imobilizada foi de 5,5 e a temperatura ótima variou entre 40-50°C para a forma solúvel e entre 25-35°C para a forma imobilizada. Já para a enzima comercial, o pH ótimo foi em 4 e a temperatura ótima variou de 30-40°C para a enzima solúvel, e foi de 25°C para a enzima imobilizada. A imobilização aumentou a estabilidade térmica de ambas as enzimas, entretanto as formas solúvel e imobilizada da lacase bruta perderam atividade quando armazenadas em tampão a 4°C. Por fim, a reação de descoloração do alaranjado de metila com o uso de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazole-6-ácido sulfônico) (ABTS) como mediador, possibilitou 30 ciclos de reuso com percentual de descoloração acima de 60%.

[0013] O pedido de patente CN113073095 ensina o uso de enzimas imobilizadas por partículas magnéticas para descoloração de corantes, com objetivo de despoluição de efluentes, onde a enzima utilizada é a lacase e a partícula magnética é a ferrita de zinco ($ZnFe_2O_4$), produzida a partir da adição de poliol e polietilenoglicol a uma fonte de ferro, uma fonte de zinco e acetato de sódio, levados a alta temperatura, seguido de lavagem e separação das

nanopartículas, as quais são levadas para reagir com agente de acoplamento de silano para ficarem aminadas. Posteriormente, as partículas magnéticas aminadas são tratadas por um reagente bifuncional para então serem usadas na imobilização da lacase. As enzimas imobilizadas do documento citado são eficazes na degradação de corantes trifenilmetano, corantes azo e antraquinona.

[0014] Todavia, os processos descritos pela dissertação acima e pelo documento CN113073095 diferem em inúmeros aspectos da presente invenção, mas principalmente por utilizar uma NP magnética sintética, a qual é produzida in vitro através de uma reação química, com revestimento adicional de quitosana e silano, respectivamente. Dessa forma, o processo de revestimento das NPs magnéticas com quitosana faz o uso de tripolifosfato de sódio (STPP), um poluente aquático que não é removido por estações de tratamento de água e contribui para eutrofização de ecossistemas aquáticos. Também é necessário considerar o custo do revestimento artificial de NPs sintéticas com quitosana bem como o impacto ambiental gerado por esta. A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido a partir da desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos, sua síntese ocorre devido à alcalinização da quitina sob altas temperaturas, semelhante ao processo de funcionalização das NPs sintéticas com aminosilano, conforme aponta CN113073095. A quitosana vem sendo amplamente

utilizada em ensaios de adsorção de nanopartículas a outras moléculas ou células, conforme descrito em inúmeros trabalhos e na dissertação acima. Ao contrário da presente invenção, em que o processo de descoloração de corantes azo e posterior separação magnética das NMOBs, descrito, não há utilização de qualquer reagente tóxico ou recalcitrante no ambiente para a obtenção de uma nanopartícula funcional, uma vez que o processo de imobilização da NMOBs pode ser feito por adsorção, o que torna o processo atrativo sob o ponto de vista industrial pela inexistência de etapas de tratamento de efluentes, o que deve desonerar, dispensar e/ou facilitar o licenciamento ambiental. Ressalta-se que a invenção descrita aqui é de base totalmente biológica, diferentemente dos documentos supracitados.

[0015] Ademais, é necessário avaliar o encarecimento dos processos que usam NPs sintéticas quando se faz necessário seu revestimento artificial. Embora não tenham sido encontrados valores diretamente associados ao custo do processo utilizando NPs revestidas com quitosana há outros exemplos que permitem a comparação em relação às NMOBs. A título de exemplo, o custo (US\$) por kg de NP sintética é estimado em: (i) revestimento com PEG, 32 mil dólares; (ii) revestimento grupamento amino, 40 mil; e (iii) revestimento com ácido carboxílico, 100 mil dólares (Augusto *et al.*, 2020). O custo de venda de NMOBs, por sua vez, varia entre 10 a 11 mil dólares a depender da metodologia de cultivo, isto é, caso seja optado por batelada alimentada ou cultivo

contínuo. Sobre o revestimento com quitosana, sabe-se que esta é solúvel em pH ácido, o que é uma desvantagem para a versatilidade do processo de floculação descrito em D1 e recuperação das NPs sintéticas para reuso. A utilização de NPs sensíveis a fatores físicos e químicos pode inviabilizar a característica cíclica do processo descrito em BR1020200158317 e tornar o processo de floculação mais custoso e muito menos sustentável. Reforçando, mais uma vez, a viabilidade econômica e originalidade da presente invenção.

[0016] Em relação ainda à dissertação e ao documento CN113073095, ambos utilizam NPs sintéticas, diferindo em relação à natureza sustentável da presente invenção. Outro fator a ser considerado é a viabilidade das aplicações *downstream* à separação magnética das NMOBs após o processo de descoloração de corantes, como processo integrado ao tratamento de efluentes. É sabido que NPs sintéticas possuem menor vida útil em razão da ausência de revestimento. Somado a isso, em decorrência da degradação natural destas NPs, há elevada liberação de cátions di- e tri- valentes de ferro. Diversos autores apontam a degradação de NPs de magnetita em soluções com pH ácido. Além disso, mesmo em pH ácido NMOBs não são dissolvidos e assim não liberam ferro no meio, sendo considerados estruturas persistentes no ambiente e ambientalmente seguras. Por exemplo, fósseis de nano partículas magnéticas de origem biológica permanecem em sedimentos de ambientes marinhos, por milhares de anos, sem

a dissolução do ferro presente no núcleo mineral destas NPs. O processo de recuperação enzimática proposto se torna menos custoso devido ao fato de as NMOBs serem reutilizáveis, uma vez que as propriedades magnéticas são constantes.

[0017] Dentro do contexto da aplicação de NPs em tratamentos de efluentes, tal qual descreve a presente invenção, a liberação abrupta de ferro durante esse processo pode resultar em eventos de eutrofização indesejáveis após o tratamento do rejeito. Nesse sentido, a aplicação de NMOBs no lugar de NPs sintéticas de magnetita torna-se mais vantajosa não só pela capacidade de reaproveitamento das NMOBs após a separação magnética, uma vez que a partícula não é dissolvida, como também por evitar impactos ambientais indesejáveis, como florações de cianobactérias produtoras de neurotoxinas, como a *Mycrocistis* sp. que produz microcistina.

[0018] O documento WO2017077114 revela o preparo de bactérias magnetotáticas geneticamente modificadas para realizar a produção de metalóforos, bem como a extração de magnetossomos de tais bactérias, que podem ter diversas aplicações, como uso no tratamento antitumoral, recuperação de metais e biorremediação. A biorremediação revelada no documento consiste na retirada de metais pesados através de permeases produzidas pelas bactérias.

[0019] Conforme apontado, a biorremediação descrita em WO2017077114 consiste na retirada de metais pesados (i.e., cobalto, níquel) através de permeases (i.e., estafilopina e

pseudopalina) produzidas pelas bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*, cujos genes foram clonados em plasmídeo pBBR1-MCS2, inseridos na bactéria magnetotática *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 para expressão fusionada junto às proteínas MamF e MamR. Logo, os microrganismos são modificados geneticamente para a produção de enzimas permeases, cuja intenção é retirar metais pesados do meio ambiente e não degradar corantes, conforme ensina a presente invenção. Dessa forma, a natureza de confecção das NMOBs é essencialmente diferente, além de que, na presente invenção, é investigada a ação das oxirredutases das classes azoredutase, lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, uma vez que estas demonstram atividade tanto no sobrenadante de cultura quanto no extrato intracelular.

[0020] Portanto, cabe ressaltar que ambas estratégias, embora diferentes, são válidas e aplicam-se a cenários diferentes, onde: (i) a primeira, descrita em WO2017077114, busca a remoção de metais como níquel e cobalto a partir da expressão de permeases fusionadas a proteínas da membrana do magnetossomo; (ii) enquanto que a presente invenção busca a descoloração de azo corantes a partir do extrato enzimático obtido do sobrenadante de cultivo de bactéria do gênero *Bacillus* sp. e imobilizado em NMOBs cuboetaédricas funcionalizadas, extraídas previamente de *Ms. magneticum* cepa AMB-1. NMOBs produzidas por outras bactérias magnetotáticas poderiam ser utilizadas no processo de imobilização, tais como: *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-

1^T, *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1, *Magnetospirillum magneticum* cepa MGT-1, *Magnetospirillum magneticum* cepa RSS-1, *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1, *Magnetospirillum magnetotacticum* cepa MS-1, *Magnetospirillum* sp. cepa ME-1, *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-2, *Magnetospira thiophila* cepa MMS-1, *Magnetococcus marinus* cepa MC-1 e *Magnetofaba australis* cepa IT-1 e combinações entre as mesmas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0021] A poluição causada por corantes presentes em efluentes industriais é um importante problema do ponto de vista socioambiental. Este tipo de poluição é de alta importância para o Brasil, uma vez que nele está instalado o quarto maior parque têxtil produtivo do mundo. Devido à sua natureza química, a maioria dos corantes é de baixa biodegradabilidade, permanecendo no meio ambiente por longos períodos, por mais de 50 anos. Por esse motivo, tecnologias de tratamento de efluentes têm sido aprimoradas para melhorar a remediação desse tipo específico de poluente.

[0022] Em vista desse contexto, a presente invenção revela o processo de obtenção de uma nanoferramenta composta por nanopartículas magnéticas de origem biogênicas (NMOBs) e enzimas de *Bacillus* sp. cepa C7.1, mais sustentáveis, estáveis e inovadoras. A estabilidade garante a possibilidade de reutilização e eficiência das nanoferramentas, o que difere essencialmente das tecnologias atuais. Assim é apresentado também o seu uso em processos de

descoloração de efluentes baseado em um produto inovador totalmente de base biológica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0023] A presente invenção poderá ser mais bem compreendida através da breve descrição das figuras a seguir: A Figura 1A ilustra os magnetossomos da bactéria magnetotática *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 antes e a Figura 1B, após a funcionalização e imobilização enzimática.

A Figura 2 ilustra a porcentagem de descoloração do corante laranja de metila por nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0024] A invenção poderá ser mais bem compreendida através da seguinte descrição detalhada, em consonância com as figuras em anexo.

[0025] A presente invenção descreve o processo de obtenção e o uso de nanopartículas magnéticas biogênicas (NMOBs) enzimáticas na aplicação da descoloração de corantes azo em efluentes. NMOBs enzimáticos são feitos a partir da imobilização de extrato enzimático de *Bacillus* sp. C7.1, definido pela SEQ ID NO: 1; *Trametes versicolor*, definido pela SEQ ID NO: 2; *Aspergillus oryzae*, definido pela SEQ ID NO: 3; *Pleurotus ostreatus*, definido pela SEQ ID NO: 4; *Pseudomonas aeruginosa* cepa OS4, definido pela SEQ ID NO: 5; *Ganoderma lucidum* IBL-05, definido pela SEQ ID NO: 6; *Pleurotus eryngii*, definido pela SEQ ID NO: 7; *Halomonas*

alkaliantartica, definido pela SEQ ID NO: 8; *Bacillus velezensis*, definido pela SEQ ID NO: 9; *Exiguobacterium* sp. RD3, definido pela SEQ ID NO: 10; *Shewanella oneidensis* MR-1, definido pela SEQ ID NO: 11; *Bacillus odysseyi*, definido pela SEQ ID NO: 12; *Morganella morgani*, definido pela SEQ ID NO: 13; *Galactomyces geotrichum*, definido pela SEQ ID NO: 14; *Brevibacillus laterosporus*, definido pela SEQ ID NO: 15; *Sphingobacterium* sp. AT, definido pela SEQ ID NO: 16; *Enterococcus faecalis*, definido pela SEQ ID NO: 17; *Acinetobacter calcoaceticus*, definido pela SEQ ID NO: 18; sendo preferencialmente *Bacillus* sp. C7.1, contendo lacases, lignina peroxidases (LiP), azoredutase, manganês peroxidases (MnP), peroxidase híbrida, que carrega as atividades catalíticas de MnP e LiP (*versatile* peroxidase), peroxidase de rábano (*horseradish* peroxidase - HPR), monoxidase, polifenol oxidase e tirosinase, em especial, lacases, lignina peroxidases, azoredutase e manganês peroxidases.

[0026] O processo de produção das nanopartículas magnéticas biogênicas (NMOBs) enzimáticas compreende as etapas de:

- (a) Cultivar as bactérias produtoras de nanopartículas magnéticas biogênicas (NMOBs) enzimáticas;
- (b) Recuperar as bactérias produtoras de NMOBs para a extração dessas NMOBs;
- (c) Obter os extratos enzimáticos;

- (d) Imobilizar as enzimas nos suportes sintéticos e de origem biológica;
 - (d1) Imobilizar por ligação covalente;
 - (d2) Imobilizar por adsorção.

[0027] Na etapa (a) é realizado um cultivo em biorreator de volume operacional de 2 L com meio de cultivo e condições operacionais descritas por Heyen e Schuler (2003). O meio utilizado contém (por L de água deionizada) 0,1 g de KH_2PO_4 , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,38 g de Hepes, 0,34 g de NaNO_3 , 0,1 g de extrato de levedura, 3 g de peptona de soja, 1 mL de mistura de elementos traço aditivada com EDTA, 27 mM de L-lactato de potássio e 100 μM de citrato férrico. Durante o cultivo em biorreator, o pH do meio é controlado em $7,0 \pm 0,1$ pela adição de 1 M de HCl ou 1 M NaOH via bombas peristálticas. A concentração de oxigênio na fase líquida é continuamente medida usando uma sonda de oxigênio, de forma a garantir a anaerobiose.

[0028] Na etapa (b), após o cultivo celular, as bactérias são recuperadas por centrifugação por 10 minutos a 7000 rpm e suspensas em 20 mM de tampão Hepes para extração das NMOBs por sonicação, em amplitude de 40% e frequência de 20 kHz por 15 minutos. Após a sonicação, os cristais são concentrados utilizando um ímã de neodímio durante 12 horas sob refrigeração entre 4°C a 8°C . O sobrenadante é substituído por tampão 10 mM de Hepes contendo 200 mM de NaCl para lavagem dos magnetossomos em sonicador de bancada, com 4 ciclos de lavagens de 30 minutos cada, com intervalos

de 12 h. Em seguida, as NMOBs são suspensas e mantidas em solução tampão, como 10 mM de Tris-HCl, 0,1 M de PBS, ou Hepes, sendo preferencialmente 10 mM de tampão Hepes.

[0029] Na etapa (c) para a obtenção do extrato enzimático bruto, 400 µl da suspensão estoque de *Bacillus sp.* C7.1 é transferido para o meio Luria Bertani (LB - 10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l NaCl) e mantido sob agitação de 120 rpm a 28°C por 48 h para obtenção de massa celular. As células são recuperadas por centrifugação, suspendidas em salina estéril e a densidade celular é medida em espectrofotômetro a 600 nm. O equivalente a 0,3 de Densidade Ótica (DO) por ml é transferido para o meio de produção enzimática, contendo 7,5 g/l de Na₂HPO₄.7H₂O, 7,13 g/l de NaH₂PO₄.H₂O, 1 g/l de NH₄Cl, 0,5 g/l de NaCl, 2 g/l de extrato de levedura, 1 g/l de glicose, acrescido com lactato de sódio a 20 mM e 2,5 mg/l de laranja de metila e incubado a 28°C por 48 h. Para a obtenção do extrato enzimático extracelular, as células são separadas por centrifugação e o sobrenadante submetido à precipitação das proteínas através da adição de sulfato de amônio até 72% e mantidas sob refrigeração a 4°C por até 48 h. O precipitado é recuperado por centrifugação, suspenso em tampão fosfato 50 mM, com pH 7,2 e dialisado em saco de diálise de 9000 Da contra 10x o volume do saco de diálise com tampão fosfato 50 mM, com pH 7,2 por 4 vezes durante 1 hora cada.

[0030] O extrato enzimático bruto dialisado é então concentrado por liofilização e armazenado a -20° C. Para a

quantificação da concentração de proteínas no extrato enzimático, é utilizado o método de Lowry com soro albumina bovina como padrão proteico. Para tal, é diluído 20 µL das amostras em 180 µL de água deionizada, seguida da adição de uma solução alcalina contendo carbonato de sódio e cobre; incubação por 10 minutos; adição do reagente Folin-Ciocalteu diluído e incubação por 30 minutos. A curva padrão é construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações. Após o período de reação, as amostras são analisadas em espectrofotômetro a 617 nm.

[0031] Ensaaios de cinética enzimática para detecção de azoredutase, lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase são realizados no extrato enzimático bruto após a concentração de proteínas, com o objetivo de verificar a manutenção da atividade enzimática e a preservação e qualidade das enzimas após a purificação parcial por precipitação e diálise.

[0032] Todos os ensaios enzimáticos são realizados em triplicata. Mais de 50% da atividade das enzimas se mantem, mesmo após precipitação, diálise e liofilização.

[0033] Na etapa (d) para imobilização das enzimas nos suportes sintéticos e de origem biológica, emprega-se os métodos de ligação covalente (d1) e por adsorção (d2):

(d1) A imobilização através de ligação covalente é realizada em suportes NMOBs funcionalizados, segundo Jacob e Suthindhiran (2021). Para a funcionalização das NMOBs de AMB-1, o equivalente a 3,13 µg de NMOBs é adicionado à uma

solução de 1 ml de glutaraldeído (GA) em concentração final 2,5% e mantida em agitação por 150 minutos, seguida de precipitação magnética e lavagem com água deionizada. A nanopartícula magnética biológica funcionalizada com glutaraldeído, por meio de ligação covalente, (NMOB@GA) é armazenada em 50 mM de tampão fosfato a 4°C. Para a imobilização das enzimas, é adicionando às NMOB@GAs a mesma quantidade em µg do extrato enzimático. A mistura reacional é mantida sob agitação de 170 rpm durante 4 h em banho de gelo. As NMOBs ativadas por glutaraldeído contendo as enzimas imobilizadas são precipitadas magneticamente e lavadas 1 vez com o mesmo tampão utilizado na reação e armazenadas neste mesmo tampão sob refrigeração.

(d2) A imobilização por adsorção baseia-se em Vishnu et al. (2017), como descrito a seguir. A mobilização por adsorção consiste na adição de NMOBs e extrato enzimático na mesma proporção (1/1) em 50 mM de tampão fosfato, com pH 7,2 em banho de gelo e submetidos a agitação orbital de 170 rpm durante 4h, gerando NMOB@EE. As nanopartículas magnéticas biológicas com enzimas adsorvidas (NMOB@EE) são lavadas com 50 mM de tampão fosfato, com pH 7,2 e armazenadas no mesmo tampão sob refrigeração. Durante esse processo as enzimas lacase lignina peroxidase e manganês peroxidase são imobilizadas nas nanopartículas magnéticas.

[0034] As nanopartículas são observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) antes (Figura 2A) e após (Figura 2B) a imobilização enzimática. As micrografias

obtidas das NMOBs (nanopartículas puras) e NMOBs@GA@EE (nanopartículas com enzimas ligadas covalentemente a elas) mostram que há a formação de uma camada amorfa sobre as NMOBs, aumentando seu diâmetro e dificultando a observação das suas formas geométricas bem definidas, sugerindo a ligação das proteínas presentes no extrato enzimático bruto à superfície das NMOBs. Através da quantificação da concentração de proteínas na mistura de reação de imobilização, é observado que 33% das proteínas presentes no extrato enzimático bruto aderem às NMOBs através da técnica de adsorção e 54% através da técnica de ligação covalente.

[0035] Após, são realizados ensaios de descoloração do corante azo Laranja de Metila (LM) com objetivo de verificar a capacidade de degradação do corante pela nanopartícula magnética-enzimática.

Exemplos

Exemplo 1: Ensaio da atividade da azoredutase

[0036] O ensaio da atividade da azoredutase foi realizado com objetivo de detectar a presença da enzima azoredutase antes e após a concentração de proteínas nas nanopartículas magnéticas.

[0037] Para o ensaio da azoredutase foram adaptados os trabalhos de Liu et al. (2017) e Zimmerman et al. (1982) utilizando laranja de metila (LM) como substrato de reação e NADH como cofator, de modo que uma mistura de reação (0,2 ml) contendo tampão fosfato, 3 µl de solução estoque de laranja de metila (1mg/ml), 10 µl de extrato enzimático e 50

μL de NADH 0,35 mM (adicionado imediatamente antes do início da leitura) é levada ao espectrofotômetro configurado previamente no modo cinética, onde a absorbância no comprimento de onda de 455 nm é acompanhada durante 5 minutos. Nos brancos, o extrato enzimático foi substituído por tampão. A remoção do corante foi calculada a partir de uma curva padrão de laranja de metila e uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar 1 μmol do corante por minuto. A leitura foi realizada no modo cinética, no comprimento de onda de 455 nm por 5 minutos. A redução do corante foi calculada a partir de uma curva padrão de laranja de metila e uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar 1 μmol do corante por minuto.

Exemplo 2: Ensaio da atividade de lacase

[0038] Com o objetivo de verificar a presença de atividade da enzima lacase no extrato enzimático utilizado, foi realizado o ensaio de atividade de lacase de acordo com os protocolos descritos por Lu et al. (2012) e Martins et al. (2002), descrito a seguir. Em um microtubo, foram adicionados 158 μl de tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 5), 34 μl de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) 1mM e 8 μl de extrato enzimático. Nos brancos (controles reacionais) o extrato enzimático foi substituído por tampão. Após a adição de todos os componentes da reação, a solução foi levada a um espectrofotômetro para leitura em modo cinético

a 420 nm por 5 minutos, com leituras a cada 60 segundos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 μ M de ABTS, considerando seu coeficiente de extinção molar como $\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Exemplo 3: Ensaio da atividade de lignina peroxidase

[0039] O teste da atividade de lignina peroxidase foi realizado com o objetivo de detectar a presença de lignina peroxidase e foi determinado pelo aumento da absorbância devido a oxidação de álcool veratrílico a veratraldeído na presença de peróxido de hidrogênio, monitorada a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por 5 minutos, conforme protocolo adaptado de Arora e Gill (2001) e Vishnu et al (2017). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 μ M do substrato.

Exemplo 4: Ensaio da atividade de manganês peroxidase

[0040] O ensaio da atividade de manganês peroxidase foi realizado com objetivo de detectar a presença de manganês peroxidase nos extratos enzimáticos e processado de acordo com a metodologia descrita por Heinfling et al. (1998), Martinez et al. (1996) e Mizuno et al. (2009) que se baseia na oxidação de duas moléculas de 2,6-dimetoxifenol (DMP) formando uma molécula de coerulignona (3,3',5,5'-tetrametoxi-p, p'-difenoquinona), reação mensurada por espectrofotometria a 469 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 μ M do substrato.

[0041] Para realizar o ensaio, foi feito o seguinte: em uma reação de volume 200 μl , adicionou-se 100 μl de tampão tartarato de sódio 100 mM (pH 4,5), 20 μl de solução 10 mM de 2,6-dimetoxifenol (DMP), 20 μl de solução 10 mM de sulfato de manganês, 40 μl do extrato enzimático, e 20 μl de H_2O_2 imediatamente antes da leitura. Nos brancos não foi adicionada a solução de sulfato de manganês. O coeficiente de extinção molar considerado para o cálculo da atividade foi $27.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Exemplo 5: Ensaio de remoção de laranja de metila (LM)

[0042] Os ensaios de remoção de LM foram realizados com o objetivo de avaliar a eficiência de remoção do corante pelas NMOBs (nanopartículas puras) pelas NMOBs@GA@EE (nanopartículas com enzimas ligadas covalentemente a elas) e pelas NMOBs@EE (nanopartículas com enzimas adsorvidas), consistindo na análise de descoloração do corante por espectrofotometria. O presente ensaio serve como parâmetro para avaliar se após a imobilização há maior descoloração do corante quando comparado ao extrato enzimático bruto.

[0043] Para tal, foi adicionando 2 μg de NMOBs contendo enzimas imobilizadas por adsorção ou NMOBs puras ou enzima livre à uma solução de 1 ml de tampão fosfato 50 mM pH 7,2 e laranja de metila em concentração final de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

[0044] A presente invenção foi revelada neste relatório descritivo em termos de sua modalidade preferida. Entretanto, outras modificações e variações são possíveis a

partir da presente descrição, estando ainda inseridas no escopo da invenção aqui revelada.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de nanopartículas magnéticas biogênicas **CARACTERIZADO** por compreender as etapas de:

(a) Cultivar as bactérias produtoras de nanopartículas magnéticas biogênicas (NMOBs) enzimáticas;

(b) Recuperar as bactérias produtoras de NMOBs para a extração dessas NMOBs;

(c) Obter os extratos enzimáticos;

(d) Imobilizar as enzimas nos suportes sintéticos e de origem biológica, em que as enzimas podem ser imobilizadas:

(d1) por ligação covalente; ou

(d2) por adsorção.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as NMOBs enzimáticas são feitas a partir da imobilização de extrato enzimático de *Bacillus sp. C7.1*, definido pela SEQ ID NO: 1; *Trametes versicolor*, definido pela SEQ ID NO: 2; *Aspergillus oryzae*, definido pela SEQ ID NO: 3; *Pleurotus ostreatus*, definido pela SEQ ID NO: 4; *Pseudomonas aeruginosa* cepa OS4, definido pela SEQ ID NO: 5; *Ganoderma lucidum* IBL-05, definido pela SEQ ID NO: 6; *Pleurotus eryngii*, definido pela SEQ ID NO: 7; *Halomonas alkaliantartica*, definido pela SEQ ID NO: 8; *Bacillus velezensis*, definido pela SEQ ID NO: 9; *Exiguobacterium sp. RD3*, definido pela SEQ ID NO: 10;

Shewanella oneidensis MR-1, definido pela SEQ ID NO: 11; *Bacillus odysseyi*, definido pela SEQ ID NO: 12; *Morganella morganii*, definido pela SEQ ID NO: 13; *Galactomyces geotrichum*, definido pela SEQ ID NO: 14; *Brevibacillus laterosporus*, definido pela SEQ ID NO: 15; *Sphingobacterium* sp. AT, definido pela SEQ ID NO: 16; *Enterococcus faecalis*, definido pela SEQ ID NO: 17; *Acinetobacter calcoaceticus*, definido pela SEQ ID NO: 18; sendo preferencialmente *Bacillus* sp. C7.1.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, pelo fato de que na etapa (a) é realizado um cultivo em biorreator de volume operacional de 2 L com meio de cultivo contendo 0,1 g de KH_2PO_4 , 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,38 g de HEPES, 0,34 g de NaNO_3 , 0,1 g de extrato de levedura, 3 g de peptona de soja, 1 mL de mistura de elementos traço aditivada com EDTA, 27 mM de L-lactato de potássio e 100 μM de citrato férrico, com pH do meio em $7,0 \pm 0,1$ pela adição de 1 M de HCl ou 1 M de NaOH via bombas peristálticas, e a concentração de oxigênio na fase líquida é continuamente medida usando uma sonda de oxigênio, de forma a garantir a anaerobiose.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (b) as bactérias são recuperadas, após o cultivo celular, por centrifugação por 10 minutos a 7000 rpm e suspensas em 20 mM de tampão HEPES para extração das NMOBs por sonicação em amplitude de 40% e frequência de 20 kHz por 15 minutos.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (b), após a sonicação, os cristais são concentrados utilizando um ímã de neodímio durante 12 horas sob refrigeração entre 4°C a 8°C, com o sobrenadante sendo substituído por 10 mM de tampão Hepes contendo 200 mM de NaCl para lavagem dos magnetossomos em sonicador de bancada, com 4 ciclos de lavagens de 30 minutos cada, com intervalos de 12 h, e em seguida as NMOBs são suspensas e mantidas em solução tampão, com 10 mM de Tris-HCl, 0,1 M de PBS, ou Hepes, sendo preferencialmente o tampão 10 mM de Hepes.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (c) o extrato enzimático bruto é obtido com a suspensão de 400 µl de estoque enzimático, transferido para o meio Luria Bertani, contendo 10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l NaCl e mantido sob agitação de 120 rpm a 28°C por 48 h para obtenção de massa celular, sendo as células recuperadas por centrifugação, suspendidas em salina estéril e a densidade celular é medida em espectrofotômetro a 600 nm para equivalência de 0,3 de Densidade Ótica (DO) por ml.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (c) as células recuperadas são transferidas para o meio de produção enzimática, contendo 7,5 g/l de Na₂HPO₄.7H₂O, 7,13 g/l de NaH₂PO₄.H₂O, 1 g/l de NH₄Cl, 0,5 g/l de NaCl, 2 g/l de extrato de levedura, 1 g/l de glicose, acrescido com

lactato de sódio a 20 mM e 2,5 mg/l de laranja de metila, e incubadas a 28°C por 48 h.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 6 ou 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (c) as células são separadas por centrifugação para obtenção do extrato enzimático e o sobrenadante é submetido à precipitação das proteínas através da adição de sulfato de amônio até 72% e mantidas sob refrigeração a 4°C por até 48 h, e em seguida o precipitado é recuperado por centrifugação, suspenso em tampão fosfato 50 mM, com pH 7,2 e dialisado em saco de diálise de 9000 Da contra 10x o volume do saco de diálise com 50 mM de tampão fosfato, com pH 7,2 por 4 vezes durante 1 hora cada.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 6, 7 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (c) o extrato enzimático bruto dialisado é concentrado por liofilização e armazenado a -20°C e a quantificação da concentração de proteínas é realizado pelo método de Lowry com soro albumina bovina como padrão proteico, seguida de análise enzimática.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (d) ocorre a imobilização das enzimas nos suportes sintéticos e de origem biológica pelos métodos de ligação covalente (d1) ou por adsorção (d2).

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (d1) a imobilização

é realizada através de ligação covalente, com a adição de 3,13 µg de NMOBs à uma solução de 1 ml de glutaraldeído (GA) em concentração final 2,5% e mantida em agitação por 150 minutos, seguida de precipitação magnética e lavagem com água deionizada e armazenada em 50 mM de tampão fosfato a 4°C, gerando NMOB@GAs, e é adicionando às NMOB@GAs a mesma quantidade em µg do extrato enzimático (1/1) e mantidos sob agitação de 170 rpm durante 4 h em banho de gelo e precipitadas magneticamente e lavadas 1 vez com o mesmo tampão utilizado na reação e armazenadas neste tampão sob refrigeração.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na etapa (d2) é realizada a mobilização por adsorção, com adição de NMOBs e extrato enzimático na mesma proporção (1/1) em 50 mM de tampão fosfato, com pH 7,2 em banho de gelo e submetidos a agitação orbital de 170 rpm durante 4 h, gerando NMOB@EE, que são lavadas com 50 mM de tampão fosfato, com pH 7,2 e armazenadas no mesmo tampão sob refrigeração.

13. Uso de nanopartículas magnéticas biogênicas **CARACTERIZADO** por serem para uso em processos de descoloração de corantes em efluentes, compreendendo a descoloração de azo corantes.

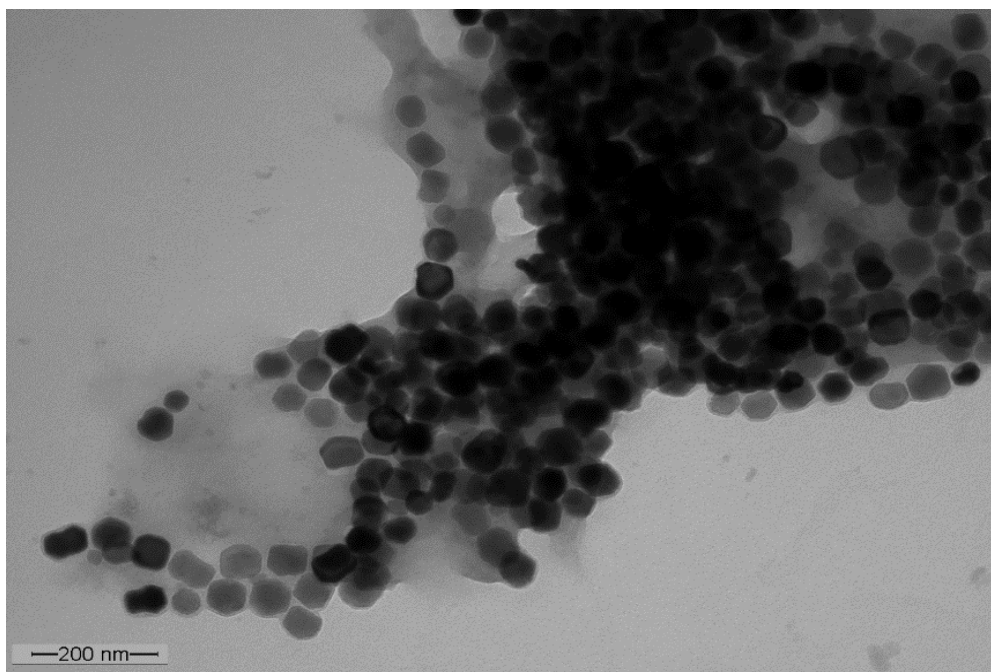


Figura 1A

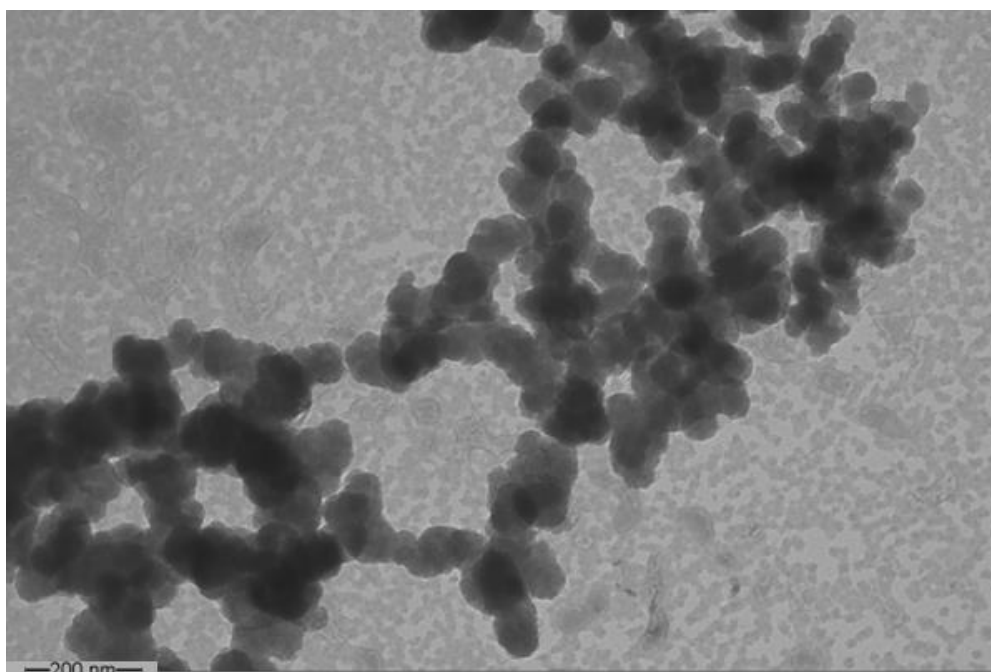


Figura 1B

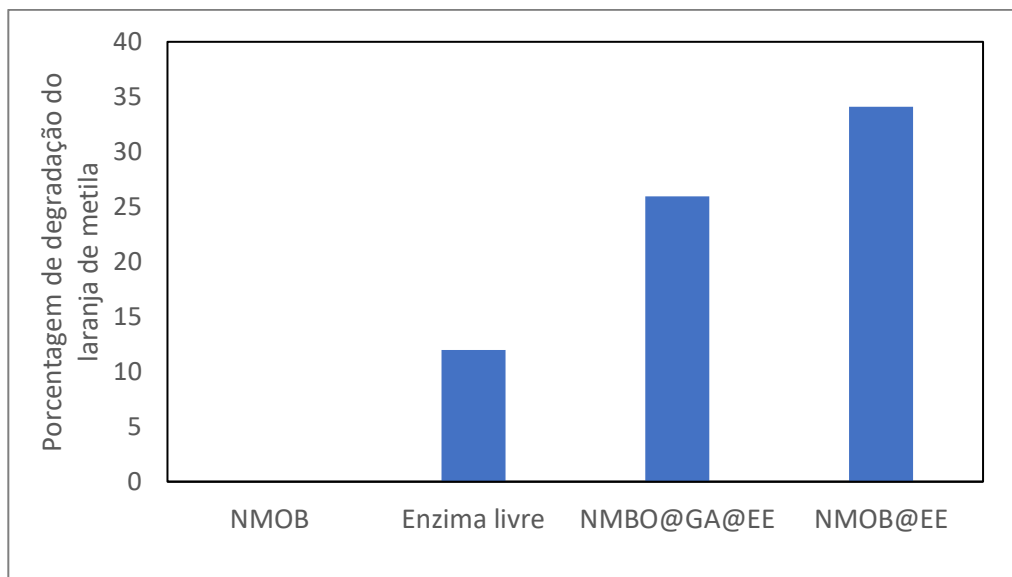


Figura 2

RESUMO**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
BIOGÊNICAS E USO DAS MESMAS**

A presente invenção se aplica à área da nanotecnologia e biotecnologia, voltando-se para o uso em áreas laboratoriais e ambientais. A poluição causada por corantes presentes em efluentes industriais é um importante problema do ponto de vista socioambiental. Este tipo de poluição é de alta importância para o Brasil, uma vez que nele está instalado o quarto maior parque têxtil produtivo do mundo. Devido à sua natureza química, a maioria dos corantes é de baixa biodegradabilidade, permanecendo no meio ambiente por longos períodos, por mais de 50 anos. Por esse motivo, tecnologias de tratamento de efluentes têm sido aprimoradas para melhorar a remediação desse tipo específico de poluente. Em vista desse contexto, a presente invenção revela o processo de obtenção de nanopartículas magnéticas de origem biogênica (NMOBs), mais sustentáveis, estáveis e inovadoras. A estabilidade garante a possibilidade de reutilização e eficiência das nanoferramentas, o que difere essencialmente das tecnologias atuais. Assim, é apresentado também o seu uso em processos de descoloração de efluentes baseado em um produto inovador totalmente de base biológica.

Bacterial-origin magnetic nanoparticles for decolorization of methyl blue dye

Tarcísio Correa^a, Igor Taveira^a and Fernanda Abreu^{a*}

^a Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

* Corresponding author at: Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: fernandaabreu@micro.ufrj.br.

Abstract: Magnetotactic bacteria are the main microbial source of biogenic magnetic nanoparticles (BMs). The structure of BMs comprises an iron mineral core and an external biological membrane, which is made up of phospholipids and proteins dedicated to the biosynthesis of these nanostructures. Because BM proteins are diverse in biochemical function, BM might display intrinsic activities yet to be explored in nanobiotechnology. Thus, the present work aims at the application of non-modified BMs extracted from the marine magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1^T for the decolorization of methyl blue (MB) dye. The experiments were carried out in the presence and absence of hydrogen peroxide (H₂O₂) and the degradation kinetics was evaluated, as well as BM reusability. At a concentration of 80 mg/L, BMs were able to degrade 90% of MB within 5 min in the absence of H₂O₂. In the presence of H₂O₂, the removal achieved in the first 1 min was over 80%. Kinetic studies revealed a first-order degradation kinetics without H₂O₂ and a second-order kinetics with H₂O₂. BM performance is optimal at neutral pH and removal of BM membrane caused dye degrading activity to cease. BMs can be recovered and reused for, at least, 4 cycles while retaining an activity over 75% in the presence of H₂O₂. Despite a slightly lower activity, their reusability is also possible at the absence of H₂O₂. Taken together, these findings uncover the use of BMs as naturally-derived and recoverable nanocatalyst for dye wastewater treatment. Moreover, their possible use without highly oxidizing H₂O₂ further support BM potential in environmental remediation.

Keywords: magnetic nanoparticles, dye degradation, magnetosomes, magnetotactic bacteria

1. Introduction

Since the patenting of production and large-scale commercialization of mauveine by William Perkin in 1857, synthetic dyes have been in use in different industries, making it a billion-dollar market worldwide (Hagan & Poulin, 2021; Zanoni & Yanamaka, 2016). Despite its market value, estimates are that 20-50% of dyes used in textile industries are discharged in wastewater while approximately 70% of those in hair coloring are flushed into sewage (Zanoni & Yanamaka, 2016).

Because traditional treatment processes remove only a fraction of dyes in wastewaters, receptive waterbodies remain vulnerable to impacts related to these substances (Cardoso et al., 2016). An evident impact of dyes in the environment is the absorption of sun light and inhibition of photosynthesis by plants and microorganisms (Cai et al., 2020; Pereira & Alves, 2012). Further impacts are linked to their chemical nature, which makes dyes poorly biodegradable and with a complex toxicity profiles to aquatic organisms (Cai et al., 2020; Lellis et al., 2019).

To reduce ecotoxicity, new technologies have been developed for the treatment of high-dye content wastewaters (Katheresan et al., 2018). Some of the advanced dye removal methods

include biocatalysis, photooxidation, and electrochemical processes (Choi, 2021; Katheresan et al., 2018). More recently, the use of nanobased technologies, especially magnetic nanoparticles (MNPs), have been intensely explored for decolorization and detoxication of dyes (Mondal et al., 2020).

Magnetic nanoparticles have been used in dye removal as supports for immobilized enzymes (Darwesh et al., 2019) as heterogeneous catalysts in Fenton or Fenton-like reactions (Zhiqiang Wang et al., 2014; Weng et al., 2013) and as sorption agents (Zhenxing Wang et al., 2015). The use of magnetic nanotools is advantageous because they can be easily recovery by magnetic collection. The recoverability might cheapen dye treatment processes as removal agent can reused multiple times.

Biosynthesized magnetic nanoparticles (BMs) are promising for application in dye removal with additional environmental benefits as their manufacture dispenses the use of potentially toxic chemicals (Vargas et al., 2018). The main microbial route for BMs synthesis is biomineralization by magnetotactic bacteria (Vargas et al., 2018). BMs are composed of a mineral iron core (magnetite - Fe_3O_4 or greigite - Fe_3S_4), which is surrounded by a biological membrane. The biological control of the synthesis gives these nanoparticles properties superior to those of artificial nanoparticles, such as controlled size and shape, chemical purity and unique magnetic domain per particle (Correa et al., 2020). Nevertheless, although frequently applied for biomedical purposes, BMs are still underexplored in environmental applications.

In the present work, we have applied non-modified BMs extracted from the marine magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1^T for the decolorization of methyl blue (MB) dye. The experiments were carried out in the presence and absence of hydrogen peroxide (H_2O_2) and the degradation kinetics was evaluated, as well as BM reusability.

2. Methodology

2.1. Bacterial culture

A large-scale cultivation of *M. blakemorei* strain MV-1^T was carried out in a 5-L bioreactor (3 L working volume) using culture media and conditions (28°C, 192 h) as in Silva et al, 2013 for obtaining prismatic BMs. An additional culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 (DMS 6361) was performed in the same bioreactor (30 °C, 80 h) with medium and operational settings described as in Heyen & Schüler, 2003.

2.2. Bacterial cell lysis and BM extraction

After bioreactor cultivations, MTB cells were harvested by centrifugation at 5,700 x g for 30 min at 4 °C and lysed by ultrasonic disruption following the method of Cypriano et al., 2019. BMs were concentrated from magnetic cell lysate with a boron-neodymium permanent magnet (1.5 cm h x 2.5 cm ø) and washed repeatedly with 20 mM HEPES buffer until total removal of debris as observed under electron microscope.

2.3. BM membrane removal

Membranes from *M. blakemorei* strain MV-1^T BMs were removed using a protocol adapted from Yoshino et al., 2008. Membrane proteins were removed by treating 1 mg BMs with a boiling alkaline detergent solution (1% w/v sodium dodecylsulfate, pH 9) for 30 min. Afterwards, BMs were repeatedly washed with MilliQ with in-between magnetic collections until no foam formation were observed. Phospholipids were then removed with a

chloroform-methanol (1:1 v/v) solution with occasional stirring for 2 h. The BM-solvent suspension was stored overnight at 4 °C. Finally, BMs were magnetically collected and washed with MilliQ water.

2.4. Preparation of sMNPs

Synthetic iron-oxide nanoparticles were prepared by a co-precipitation method as described by Santos et al., 2018.

2.5. Transmission electron microscopy

All tested magnetic nanoparticles were examined under transmission electron microscopy (TEM) using a FEI Morgagni apparatus (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) operated at 80 kV. The integrity of BMs mineral core and membrane were evaluated. Changes in membrane thickness were measured using ImageJ (NIH, USA) image analysis software.

2.6. Dye removal assays

The removal of MB from aqueous solution by BMs extracted from *M. blakemorei* strain MV-1^T (unless otherwise stated) was investigated in kinetic experiments (10 min) by examining the disappearance of color in solution during 10 min. Ultra-violet-visible (UV-Vis) spectra of MB in solution were obtained by scanning spectrophotometry (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) in 225-700 nm wavelength range. Discoloration kinetics were measured spectrophotometrically at 600 nm wavelength at samples collected at 0-, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- and 10-min intervals.

Experiments were performed using a 15 mg/L MB solution, which was prepared using MilliQ water. The first batch of experiment, removal was carried out with different BM concentrations (20, 40 and 80 µg/L), and no H₂O₂ was added. The second raw of experiments was carried with the BM concentration with the best removal profile with the addition of 0, 18 and 36 mM H₂O₂ from a 10% stock solution. Control experiments were also run in absence of BMs to record the MB removal by H₂O₂. A third batch of experiments were performed with varying pHs from 7.0 to 4.8 and 8.2 using both BM and H₂O₂-optimized concentrations. pHs were adjusted by adding 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. Membrane-removed BMs were then used in additional experiments in the presence and absence of H₂O₂ in optimized BM concentration and medium pH.

Two comparative experiments, one using BMs from *M. gryphiswaldense* MSR-1 and another with synthetic MNPs (sMNPs), were run using optimized conditions. All experiments were carried out in duplicates.

2.7. Reusability and iron leaching

After each degradation experiment, BMs were magnetically concentrated, washed with distilled water and reused in new degradation reactions. The separated supernatants were used in quantification of iron to investigate possible iron ions leaching from tested nanoparticles. Soluble iron determination was done by colorimetric ferrozine method (Viollier et al., 2000).

2.8. Molecular modeling of BM membrane proteins

Amino acid sequences from Mam and Mms proteins of *Mv. blakemorei* strain MV-1 were retrieved from NCBI Nucleotide and Protein databases (Mizrachi et al., 2007). Molecular modeling was performed into the SWISS-MODEL platform (Guex et al., 2009) using reference sequences from PDB (Burley et al., 2017) or constructed by AlphaFold DB v2 (Ruff et al., 2021)

computing global model quality estimate (GMQE) and predicted local distance difference test (pLDDT) quality parameters, and prediction of transmembrane insertion. Electrostatic surface potential was calculated in the APBS server using the PARSE forcefield set at pH 7.2 (Unni et al., 2021). Surface hydrophobicity was assessed using the transmembrane tendency (tt) scale (Zhao & London, 2009). Molecular visualization was performed using UCSF Chimera and PyMOL tools (DeLano, 2002; Pettersen et al., 2004). The solvent-accessible surface (SAS) with relative surface accessibility (RSA) and absolute surface accessibility (ASA) was predicted using NetSurfP 3.0 webserver (Høie et al., 2022) and UCSF Chimera, as well as flexibility metric of probability of disorder (P_{disorder}) per residue.

2.9. Molecular docking and energy binding score

Methyl blue dye molecular structure was retrieved from PubChem (Kim et al., 2016). Molecular docking was performed on AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010). BM membrane molecular models were set as receptors, methyl blue as ligand, and the interaction box on the cytoplasmic side of BM proteins, excluding the mangetosomal lumen side. Docking results were ranked by lowest energy score function result and proximal RMSD (<2.0). The intermolecular interaction network was obtained using BIOVIA Discovery Studio (Baroroh et al., 2023) and the PLIP platform (Salentin et al., 2015) and displayed within the 5 Å threshold distance within the ligand.

3. Results and discussion

3.1. Dye chemical profile

MB is a synthetic dye widely used for histological and botanical staining and in colorization of stationery, detergents, and personal care products (Clariant, 2013; Sabnis, 2010). Its structure possesses both aniline and triarylmethane moieties (**Figure 1A**), which are linked to considerable aquatic ecotoxicity (Bhunja et al., 2003; Chen et al., 2019). Two prominent peaks are visible in MB UV-Vis spectrum (**Figure 1B**): a sharper one – assigned peak *a* – ranging from 290-310 nm, relative to aniline (NIST, 2018), and a broader one – peak *b* – in 580-620 nm, which is due to its highly conjugated organic structure (**Figure 1A**).

3.2. Influence of BM concentration on MB removal

In the first group of experiments, we tested different BM concentrations for the degradation of 15 mg/L MB in the absence of H₂O₂ (**Figure 2A**). Among the tested concentrations (20, 40 and 80 mg/L), the greatest concentration led to the fastest degradation, with over 90% of MB being degraded within 5 min. Thus, reaction kinetics is directly proportional to the nanoparticle concentration. Both 40 and 80 mg/L were capable of virtually total removal of MB within 10 min (**Figure 2A**).

3.3. Influence of hydrogen peroxide

In the second set of experiment, the influence of H₂O₂ of MB degradation rate was investigated (**Figure 2B**). Using BMs with and without 36 mM H₂O₂ led approximately to the same removal rate within 5 min. Nevertheless, in the presence of H₂O₂, the removal achieved in the first 1 min was over 80%, while this value was ~20% lower for the reaction using solely BM. This finding indicates BMs may act as a catalyst by accelerating MB degradation by H₂O₂. However,

the use of BM in the absence of H₂O₂ may have a greener character because it avoids a toxic, oxidizing reagent that can be potentially hazardous itself.

3.4. Influence of reaction pH

All the results described to this point were obtained using a medium pH of 7.0. The third set of experiments was performed to evaluate the influence of different pHs on the MB removal kinetics using 80 mg/L BM and 36 mM H₂O₂ (**Figure 2C**). When pH was set at 4.8, there was a reduction in the initial removal rate: only 38% of MB was removed at 1 min and 64% at 2 min. This is an important reduction in removal ability from pH 7.0, which led to approximately 90% degradation at 2 min. The decrease in removal activity was more dramatic when the pH was 8.2. In that case, only a 30% removal was achieved in 10 min. The highest activity in neutral pH is an indication that the degradation mechanism is a biological catalysis rather than Fenton's oxidation. This hypothesis is in tandem with the work of Darwesh et al., 2019, which that demonstrated that an MNP-immobilized peroxidase has its peak textile-dye-degrading activity at a pH 6 and approximately 90% active in a pH 7. In that work, a substantial reduction of the activity is also observed pHs over 7.5 and under 5.5, which further corroborates our hypothesis. On the other hand, Fenton reactions rely on the iron-catalyzed formation of reactive oxygen species like hydroxyl radicals (OH·) (Pignatello et al., 2006). Fenton's reactions, which commonly applies magnetic nanoparticles, are favored and accelerated in acidic media (Jung et al., 2009) while BM-mediated degradation is optimal at neutrality.

3.5. Effect of membrane removal

To the fourth set of experiments, BMs were subject to membrane removal to investigate the effect of the external coating on their activity in the presence and absence of H₂O₂. In the absence of H₂O₂, little MB degradation was observed and 82% of MB remained in medium after 10 min (**Figure 2D**). The dramatic decline in MB removal performance is a strong evidence that most catalytic activity is performed by membrane components, probably anchored proteins. This finding also reinforces a non-Fenton mechanism underlying MB degradation. Due to crystallographic precision of BM magnetite core, iron atoms are orderly confined within the mineral structure and might not be available to perform Fenton's oxidations. Intriguingly, even in the presence of H₂O₂ at the same concentration of the previous experiments (36 mM), the degradation of MB was significantly hindered when bare BMs were used. This is probably because of H₂O₂ decomposition into H₂O and O₂, but not OH· radicals, as observed for other heterogeneous catalysts with ordered crystalline surfaces.

These findings further support the importance of BM membrane to biotechnological applications. The phospholipid portion of the biological membrane causes a negative external charge and, thus provides BMs aqueous suspensions with colloidal stability (Vargas et al., 2018). Proteins, whose functions in biomineralization process include iron uptake, crystal nucleation and growth and pH and redox control, are also components of BM membrane (Correa et al., 2020). These intrinsic BM protein functions could be explored for real-world applications. As described in earlier studies, some of these proteins could be acting as natural catalysts for MB degradation by oxidation. BMs extracted from *M. gryphiswaldense* strain MSR-1 (Guo et al., 2012) and *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 (Li et al., 2015) have already been assigned peroxidase-like activity linked to BMs. MSR-1 BMs also displayed a more intense activity when applied with its original membrane than after membrane removal (Guo et al., 2012).

3.6. Kinetic profile

From the experiments using 80 mg/L BM, 36 mM H₂O₂ and a combination of both, we used the variation of MB concentrations along reaction time to calculate the kinetic law of the reactions, as well as the rate constants (k). Linear regressions were performed with ln[MB] (for first order kinetics) and 1/[MB] (for second order kinetics) versus time (**Figure 3**). The angular coefficients correspond to k (k₁ for 1st order and k₂ for 2nd order) and R² values were used to evaluate the fitness of removal data to each kinetic model (either 1st or 2nd order). Results for rate constants and kinetic modelling are on table 1. While removal with BM only resulted in a first order kinetics, the other two treatments are second order. When both BM and H₂O₂ were employed, k₂ equaled to 0.242 L.mg⁻¹.min⁻¹, which is about 4 times that of H₂O₂ only. These results suggest that, when used alongside, BMs accelerates the degradation of MB by H₂O₂. However, the degradation of MB by BM only probably occurs through an intrinsic mechanism, with is complementary to the catalysis.

Linear regression analysis of kinetic data also allowed us to compare the removal efficiencies of prismatic BMs from *M. blakemorei* strain MV-1^T, with integer and removed membrane, with those of cubooctahedral BMs from *M. gryphiswaldense* strain MSR-1 and sMNPs (**Table 2**). All nanoparticles displayed a second-order kinetics, with MV-1^T BMs displaying the highest activity among them. Nevertheless, cubooctahedral BMs from MSR-1 also showed a superior activity compared to sMNPs. This result coincides with previous work (Guo et al., 2012) in which degrading activity of MSR-1 BMs was more similar to that of peroxidase than to synthetic nanoparticles. Dye-degrading activities found for BMs are among the highest among nanoparticles claiming a green synthetic route (**Table 3**). In a MB adsorption process using mussel-inspired MNPs, Wang and coauthors reached up to 95% removal rate. Nevertheless, the highest performance was reached at a pH = 4, which requires acidification during decolorization. Considering a second-order kinetics, dye-removing activity of BMs still seems significantly higher than that of mussel-inspired MNPs (**Table 3**). Hence, the efficient decolorizing character along with a sustainable bioproduction provide BMs with a high competitiveness due to the increased environmental performance.

Furthermore, iron leaching from nanoparticles to the reaction media was measured. Significant iron leaching (4% of Fe mass) was only detected using sMNPs (**Table 2**). This result indicates that membranes surrounding MV-1^T and MSR-1 BMs also act as a protective layer against iron mobilization from Fe₃O₄ core.

3.7. Reusability

Following MB degradation experiments with and without H₂O₂, BMs were recovered through magnetic collection and their reusability was tested. The results (**Figure 4**) indicate BMs can be recovered and reused for, at least, 4 cycles while maintaining an activity over 75% that of the first use in the presence of H₂O₂. In the absence of H₂O₂, the reduction in activity after the first use was more pronounced. Nevertheless, over 40% activity was retained for three reuse cycles. In environmental applications, such reusability is a major advantage of biogenic nanomagnets. Costs and resource utilization for production of novel BMs, as well as disposal volumes of used nanoparticles, are significantly reduced. In comparison with an MNP-immobilized peroxidase, which could be reused in up to 100 cycles (Darwesh et al. 2019), BMs seemed less resilient to sequential reutilizations. However, the reported tests were performed against azo-dyes, whose chemical degradability is different from triarylmethanes like MB. Despite a better reuse characteristic, MNP-immobilized peroxidase takes about 6 h to achieve a complete decolorization.

Membrane integrity, which is important to maintain BM activity between reuse cycles, was investigated by BM observation and membrane measurement under transmission electron microscopy (**Figure 5**). In the experiments with H₂O₂, membrane thickness was virtually preserved from first to third utilization (**Figure 5A-C, Table 4**) while a significantly (**Table S1**) shrinking (**Figure 5C, Table S1**) was observed after the fourth reuse cycle. The 23-% reduction in the mean membrane thickness is related to a 57-% decrease in dye degradation activity (**Figure 4 and Table 4**), evidencing that membrane disruption hinders BM catalytic activity. Moreover, **Figure 4D** evidences the accumulation of a nebulous substance between BMs after 4th reuse. This observation might suggest the accumulation of MB degradation products and detachment of BM membrane components. A significant reduction (77%) in BM activity is also observed when reuse is performed in the absence of H₂O₂. However, as measured by microscopy (**Figure S1**), the observed decrease in membrane thickness was only 6.7%. On the other hand, material accumulation, presumably degradation products, onto the surface of BMs (**Figure S1**) might prevent the contact between BM surface proteins and soluble dye, thus hindering BM degradation. It might be suggested that, in the presence of H₂O₂, MB degradation products are further decomposed by peroxidation while they accumulate in the absence of the oxidative agent.

3.8. Possible reaction mechanism

UV-Vis spectrometry analyses of treated dye samples were also performed to investigate spectral changes arising from dye degradation after treatments. The characteristic blue chromophore peak *b* decreases in magnitude in all treatments, but the sharpest reduction (98%) occurs with BMs and H₂O₂ treatment, which is in good agreement with spectrophotometric experiment results (**Figure 1B**). The peak *b* also shows 27% reduction with H₂O₂ and 68% with BMs. Conversely, the sharp peak *a*, relative to aniline, increased after all treatments but that using solely H₂O₂. The observed increase in the peak *a* could be associated to an accumulation of degradation MB products, like aniline, and, thus, further supports a predominantly degradative mechanism of MB removal by BMs. This suggestion is further supported by the fact the highest peak, 13% higher than raw dye, is formed in the presence of BMs only. The slightly lower peaks in the treatments with H₂O₂ (with and without BMs) are an indication of unspecific oxidation of both MB and its BM-formed degradation products by peroxidation.

3.9. In silico structural basis of methyl blue interaction with magnetosome membrane proteins

After homology modeling *M. blakemorei* strain MV-1^T BMs, the best protein-ligand interaction profile was achieved in the MamZ model with -9.6 kcal·mol⁻¹ binding score and overall mean score was -8.1 ± 0.7 kcal·mol⁻¹ with predicted BM transmembrane proteins (**Sup Table S2; Fig. 6**). A robust molecular model of MamZ was obtained, with a mean pLDDT = 81.53 ± 12.95 and GMQE = 0.82 (Sup. Fig. 2A-). Mean P_{disorder} = 0.05 ± 0.15 is dictated by loop-flexible regions faced to the cytoplasm and magnetosome lumen and rigid transmembrane helices, and mean RSA = 28.22 ± 21.06%, indicating that most buried residues (<0.25) are within MFS (α1-α16) and FRS (α17-α22) channels located in transmembrane helices. No Ramachandran outliers were detected (97.77% favored) with MolProbity = 0.91, and only 4 rotamer outliers (*i.e.*, I47, L65, W529, and 594) (**Sup. Fig. 2**). The MamZ binding pocket is found within the cytoplasmic side of ferric-reduction superfamily (FRS) domain with a positive electrostatic surface potential, possibly due to protonation states of the R486, H572, R499, and R483 residues. Surface hydrophobicity is provided by W568, I575, and F618 residues. The binding pocket SAS is represented by mean RSA of 22.98 ± 20.50 % and ASA of 31.65 ± 28.66 Å², with 5 buried and 3

solvent-exposed residues (*i.e.*, R483, F618, and T621), representing a partially solvent-exposed pocket with a robust mean pLDDT = 84.13 ± 8.62 and well organized ($P_{\text{disorder}} = 1.38 \pm 1.52 \cdot 10^{-3}$). The intermolecular network interaction between MamZ and methyl blue is described by: (i) 5 H-bonds from S479, R573 (2), F618, and T621 residues within sulfonate groups and anilinic nitrogen from dye; (ii) 3 hydrophobic interactions from C γ of R573, C β of H572, and C δ of I575 residues within dye's aromatic rings; (iii) 1 pi-pi interaction (π - π ; T-shaped) with W568 and 2 pi-cation (π -cation) with imidazole nitrogen from H572 and terminal aminic nitrogen from R483 residues; and (iv) 1 salt bridge between a sulfonate group and guanidino group of R483 (**Sup. Video 1**). Thus, we hypothesize that interactions with the three solvent-exposed residues (*i.e.*, 2 H-bonds within carbonyl from F618 backbone and hydroxyl of lateral chain from T621, 1 salt bridge and 1 π -cation with guanidino group of lateral chain of R483) are essential for the first stabilization of the methyl blue dye in the docking site, in order for the whole intermolecular network to occur. Additionally, dye degradation does not occur when BM's membrane is removed (**Figure 2**), and activity diminishes in accordance with particle reusability (**Figure 4**). Together, these data suggest that the BM degradation is not Fenton related and possibly the phenom is associated with a membrane component, possibly being the magnetosome proteins such as MamZ or other high-score methyl blue-docked proteins as well as the MamZ activity might diminish due to saturation of dye degradation or steric-hindrance due to byproducts accumulation on BM surface (**Sup. Table 2**).

4. Conclusion

In this paper, we have explored intrinsic protein-mediated activities of BMs for decolorization of MB, an industrially important dye. BMs were capable of removing MB in the presence and absence of H₂O₂ and, despite commonplace for other MNPs, removal mechanism is different from a Fenton's catalysis. The sustainable characteristic of BM production by magnetotactic bacteria-based bioprocesses, added to a highly efficient removal and reusability prompt BMs for use as a green nanocatalyst in wastewater decolorization. Further research is needed to assess BMs in the degradation of other pollutants, including other dyes, and examine the toxicity of degradation products. Finally, due to the complexity of BMs proteome, there could be other natural activities of BM without surface functionalization still to be explored in environmental remediation.

5. References

- Baroroh, U., Biotek, M., Muscifa, Z. S., Destiarani, W., Rohmatullah, F. G., & Yusuf, M. (2023). Molecular interaction analysis and visualization of protein-ligand docking using Biovia Discovery Studio Visualizer. *Indonesian Journal of Computational Biology (IJCB)*, 2(1), 22-30. <https://doi.org/10.24198/ijcb.v2i1.46322>
- Bhunja, F., Saha, N. C., & Kaviraj, A. (2003). Effects of Aniline - An Aromatic Amine to Some Freshwater Organisms. *Ecotoxicology*, 12(5), 397-404. <https://doi.org/10.1023/A:1026104205847>
- Burley, S. K., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Markley, J. L., Nakamura, H., & Velankar, S. (2017). Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Protein crystallography: methods and protocols*, 627-641. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_26

- Cai, H., Liang, J., Ning, X. an, Lai, X., & Li, Y. (2020). Algal toxicity induced by effluents from textile-dyeing wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *91*(2015), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.01.004>
- Cardoso, J. C., Bessegato, G. G., & Zanoni, M. V. B. (2016). Análise crítica dos processos empregados no tratamento de efluentes têxteis. In M. V. B. Zanoni & H. Yanamaka (Eds.), *Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento* (pp. 215–239). Cultura Acadêmica Ed.
- Chen, S. H., Cheow, Y. L., Ng, S. L., & Ting, A. S. Y. (2019). Biodegradation of Triphenylmethane Dyes by Non-white Rot Fungus *Penicillium simplicissimum*: Enzymatic and Toxicity Studies. *International Journal of Environmental Research*, *13*(2), 273–282. <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00171-2>
- Choi, K. Y. (2021). Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. *Dyes and Pigments*, *184*(July 2020), 108749. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108749>
- Clariant. (2013). Duasyn Ink Blue SLK. In *Pigments special applications*.
- Correa, T., Taveira, I., Souza-Filho, R., & Abreu, F. (2020). Biomineralization of Magnetosomes: Billion-Year Evolution Shaping Modern Nanotools. In *Biomineralization*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94465>
- Cypriano, J., Werckmann, J., Vargas, G., Dos Santos, A. L., Silva, K. T., Leão, P., Almeida, F. P., Bazylnski, D. A., Farina, M., Lins, U., & Abreu, F. (2019). Uptake and persistence of bacterial magnetite magnetosomes in a mammalian cell line: Implications for medical and biotechnological applications. *PLoS ONE*, *14*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215657>
- Darwesh, O. M., Matter, I. A., & Eida, M. F. (2019). Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *7*(1), 102805. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.11.049>
- DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, *40*(1), 82-92. <https://pymol.org/2/>
- Guo, F. F., Yang, W., Jiang, W., Geng, S., Peng, T., & Li, J. L. (2012). Magnetosomes eliminate intracellular reactive oxygen species in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Environmental Microbiology*, *14*(7), 1722–1729. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02707.x>
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, *30*(S1), S162-S173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Hagan, E., & Poulin, J. (2021). Statistics of the early synthetic dye industry. *Heritage Science*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40494-021-00493-5>
- Heyen, U., & Schüler, D. (2003). Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *61*, 536–544. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1219-x>
- Høie, M. H., Kiehl, E. N., Petersen, B., Nielsen, M., Winther, O., Nielsen, H., & Marcatili, P. (2022). NetSurfP-3.0: accurate and fast prediction of protein structural features by protein language models and deep learning. *Nucleic Acids Research*, *50*(W1), W510-W515. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac439>

- Jung, Y. S., Lim, W. T., Park, J. Y., & Kim, Y. H. (2009). Effect of pH on Fenton and Fenton-like oxidation. *Environmental Technology*, 30(2), 183–190. <https://doi.org/10.1080/09593330802468848>
- Katheresan, V., Kansedo, J., & Lau, S. Y. (2018). Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4676–4697. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.06.060>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., & Bryant, S. H. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Lellis, B., Fávoro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A., & Polonio, J. C. (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 275–290. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>
- Li, K., Chen, C., Chen, C., Wang, Y., Wei, Z., Pan, W., & Song, T. (2015). Magnetosomes extracted from *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 showed enhanced peroxidase-like activity under visible-light irradiation. *Enzyme and Microbial Technology*, 72, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.009>
- Mondal, P., Anweshan, A., & Purkait, M. K. (2020). Green synthesis and environmental application of iron-based nanomaterials and nanocomposite: A review. *Chemosphere*, 259, 127509. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127509>
- Mizrachi, I. (2007). GenBank: the nucleotide sequence database. The NCBI handbook [Internet], updated, 22.
- NIST. (2018). *Aniline*. NIST Chemistry WebBook. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C62533&Type=IR-SPEC&Index=1>
- Pereira, L., & Alves, M. (2012). Dyes—Environmental Impact and Remediation. In *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development* (Vol. 55, Issue 12, pp. 111–162). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1591-2_4
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pignatello, J. J., Oliveros, E., & Mackay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1–84.
- Ruff, K. M., & Pappu, R. V. (2021). AlphaFold and implications for intrinsically disordered proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(20), 167208. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167208>
- Sabnis, R. W. (2010). Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications. In *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*. <https://doi.org/10.1002/9780470586242>
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*, 43(W1), W443–W447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>

- Santos, E. C. D. S., Watanabe, A., Vargas, M. D., Tanaka, M. N., Garcia, F., & Ronconi, C. M. (2018). AMF-responsive doxorubicin loaded β -cyclodextrin-decorated superparamagnetic nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 42(1), 671–680. <https://doi.org/10.1039/c7nj02860a>
- Silva, K. T., Leão, P. E., Abreu, F., López, J. A., Gutarra, M. L., Farina, M., Bazylnski, D. A., Freire, D. M. G., & Lins, U. (2013). Optimization of magnetosome production and growth by the magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1 through a statistics-based experimental design. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2823–2827. <https://doi.org/10.1128/AEM.03740-12>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Unni, S., Huang, Y., Hanson, R. M., Tobias, M., Krishnan, S., Li, W. W., & Baker, N. A. (2011). Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *Journal of computational chemistry*, 32(7), 1488–1491. <https://doi.org/10.1002/jcc.21720>
- Vargas, G., Cypriano, J., Correa, T., Leão, P., Bazylnski, D., & Abreu, F. (2018). Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review. *Molecules*, 23(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules23102438>
- Viollier, E., Inglett, P. ., Hunter, K., Roychoudhury, A. ., & Van Cappellen, P. (2000). The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry*, 15(6), 785–790. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(99\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00097-9)
- Wang, Zhenxing, Guo, J., Ma, J., & Shao, L. (2015). Highly regenerable alkali-resistant magnetic nanoparticles inspired by mussels for rapid selective dye removal offer high-efficiency environmental remediation. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(39), 19960–19968. <https://doi.org/10.1039/c5ta04840k>
- Wang, Zhiqiang, Fang, C., & Megharaj, M. (2014). Characterization of iron-polyphenol nanoparticles synthesized by three plant extracts and their fenton oxidation of azo dye. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(4), 1022–1025. <https://doi.org/10.1021/sc500021n>
- Weng, X., Huang, L., Chen, Z., Megharaj, M., & Naidu, R. (2013). Synthesis of iron-based nanoparticles by green tea extract and their degradation of malachite. *Industrial Crops and Products*, 51, 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.024>
- Yoshino, T., Hirabe, H., Takahashi, M., Kuhara, M., Takeyama, H., & Matsunaga, T. (2008). Magnetic cell separation using nano-sized bacterial magnetic particles with reconstructed magnetosome membrane. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(3), 470–477. <https://doi.org/10.1002/bit.21912>
- Zanoni, M. V. B., & Yanamaka, H. (2016). *Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. Cultura Acadêmica Ed.
- Zhao, G., & London, E. (2006). An amino acid “transmembrane tendency” scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: relationship to biological hydrophobicity. *Protein Science*, 15(8), 1987–2001. <https://doi.org/10.1110/ps.062286306>

Table 1. Rate constants obtained from linear regression analysis of the dye removal data by *M. blakemorei* strain MV-1^T BMs in different conditions. Results in bold indicate best fit to the corresponding kinetic law.

Treatment	First order		Second order	
	k_1 (min ⁻¹)	R ²	k_2 (L.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	R ²
BM	0.3583	0.9686	0.0726	0.9042
H ₂ O ₂	0.2955	0.7620	0.0565	0.9203
BM + H ₂ O ₂	0.5185	0.7836	0.242	0.9869

Table 2. Comparison between rate constants obtained from linear regression analysis of the dye removal data from experiments using *M. blakemorei* strain MV-1^T BMs, *M. gryphiswaldense* strain MSR-1 BMs and synthetic MNPs. Results in bold indicate best fit to the corresponding kinetic law.

	First order		Second order		Iron leaching % (m/m)
	k_1 (min ⁻¹)	R ²	k_2 (L.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	R ²	
MV-1	0.5185	0.7836	0.242	0.9869	0,2083
MSR-1	0.7800	0.9652	0.081	0.9852	0,182263
MNP	0.1950	0.9634	0.021	0.9903	4,27015

Table 3. Comparison between kinetic data from the present work and results available in the literature. For this comparison, only MNPs claiming a green synthetic route were considered.

Nanoparticle	dye	Removal mechanism	Reaction order	k	additional results	reference
Green tea-stabilized iron oxide NPs	methylene blue	Fenton-like catalysis	Second	0.0039 L.mg ⁻¹ .min ⁻¹	> 99% removal within 6 h	Shahwan et al., 2011
	methyl orange		First	0,019 min ⁻¹		
Green tea γ -Fe ₂ O ₃ /Fe ₃ O ₄ NPs	malachite green	Direct degradation	First	0.057 min ⁻¹	96% removal within 60 min	Weng et al., 2013
<i>Eucalyptus tereticornis</i> iron-polyphenol NPs						
<i>Melaleuca nesophila</i> iron-polyphenol NPs	acid black 194	Fenton-like catalysis	First	~0.017 min ⁻¹	100% removal within 200 min	Wang et al., 2014
<i>Rosemarinus officinalis</i> iron-polyphenol NPs						

Mussel-inspired Fe ₃ O ₄ -PDA/PEI NPs	methyl blue	Adsorption	Pseudo-second	0.0034 L.mg ⁻¹ .min ⁻¹	>95% removal in 5 min	Wang et al., 2015
	bengal rose			0.052 L.mg ⁻¹ .min ⁻¹	> 90% activity after 10 cycles	
Humic acid-stabilized Fe ₃ O ₄ NPs	malachite green	Adsorption	Pseudo-first	0.02811 min ⁻¹		Abate et al., 2020

NP = nanoparticles; PDA = poly-dopamine; PEI = polyethylenimine; k = rate constant

Table 4. Average activity (% in relation to first use) and mean values (nm) of membrane thickness of BM after each reuse cycle in the presence of H₂O₂.

	Reuse cycle				
	Raw	1st	2nd	3rd	4th
Activity	100	87.76	78.97	81.31	43.46
sd	-	1.43	1.98	3.97	11.24
Thickness	7,215	7,428	7,414	7,307	5,54
sd	1,225	2,709	1,917	1,749	1,281
n	225	399	446	333	292

Figure 1. Chemical structure of MB dye (A), showing aniline (encircled in purple dashed line) and triarylmethane (central, encircled in green dotted line). UV-Vis spectrum of raw and treated MB (B) indicating typical absorption peaks a, at 300 nm, and b at 600 nm. Treatment agents are BM solely, H₂O₂ solely and a mixture of both.

Figure 2. Kinetics of dye concentration along 10-min treatments. Effects of BM concentration (A) in absence of H₂O₂, H₂O₂ concentration (B) in the presence and absence of BM, pH (C) and BM membrane removal (D) are plotted.

Figure 3. Linear regression plots for first (A-C) and second (D-F) order kinetics. These plots were used to determine kinetics parameters of MB removal by 80 mg/L BMs (A and D), 36 mM H₂O₂ (B and E) and both (C and F). Note that time considered here was only 5 min because, in most cases, MB concentration at later times were zero.

Figure 4. Relative activity retention of BMs after four reuse cycles in removal of MB in concentrations of 0 and 36 mM H₂O₂.

Figure 5. Transmission electron microscopy of BMs after first to fourth (A-D, respectively) reuse cycles. Arrows indicate BM membranes. * indicates a nebulous substance, presumably degradation products, accumulated between BMs after four cycles.

Figure 6. In silico structural basis of aniline blue interaction with MamZ protein in *M. blakemorei* strain MV-1^T BMs. Surface mapping of electrostatic potential (A), transmembrane hydrophobicity tendency (B) and relative solvent accessible area (RSA) (C) with 0.25 buried-residue threshold. Binding pocket (<5Å) within the network of intermolecular interactions comprising hydrogen bonds, salt bridges and hydrophobic interactions (D).

Figure 1.

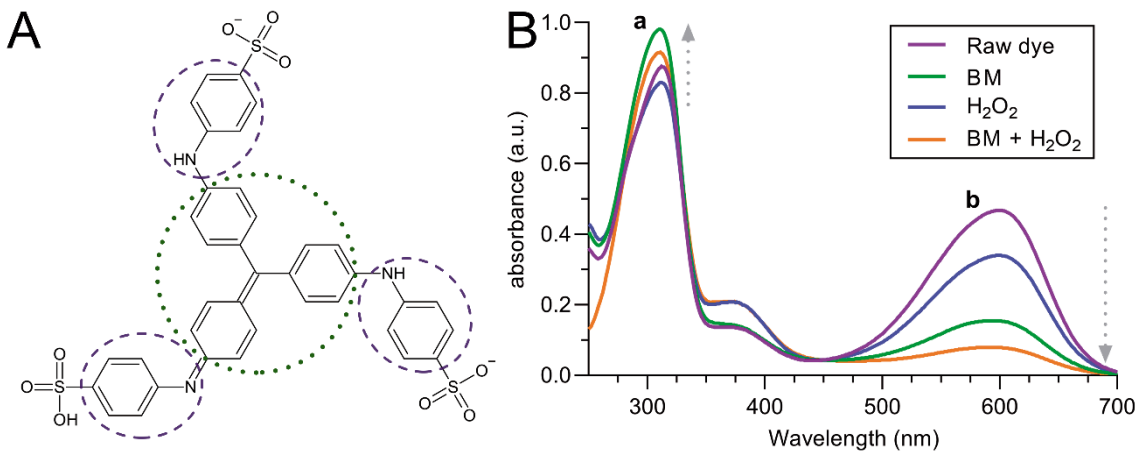


Figure 2.

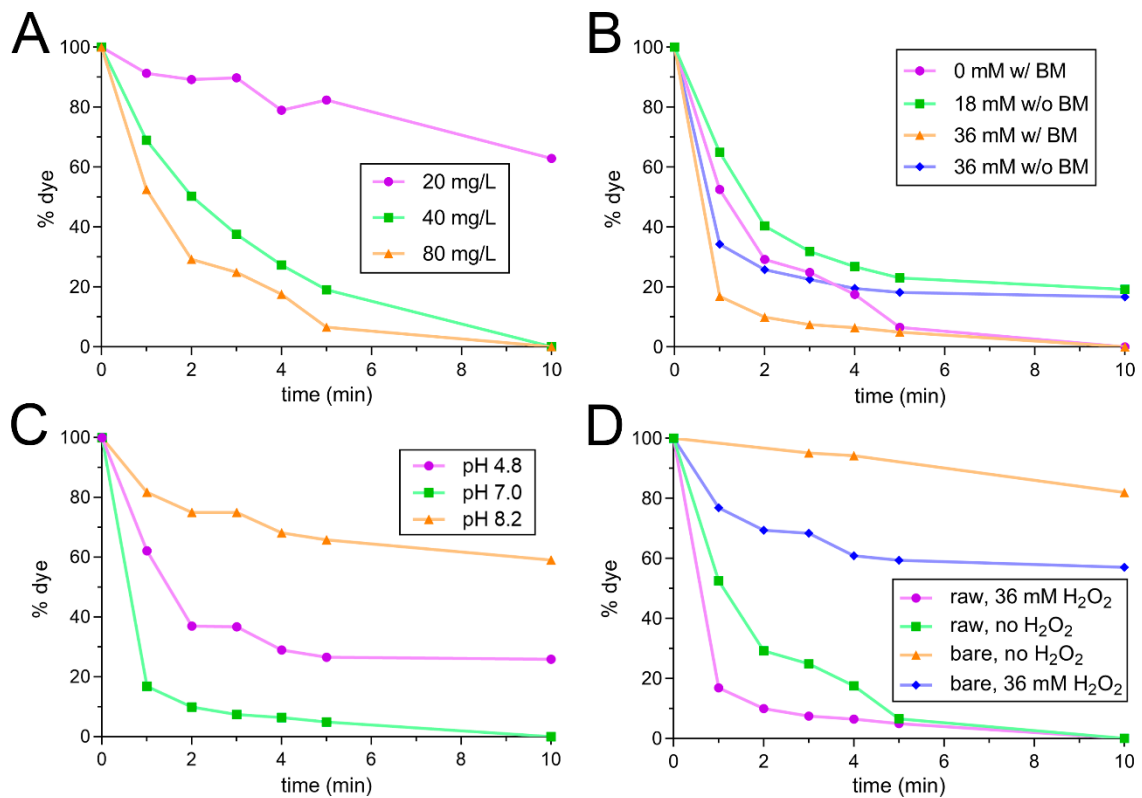


Figure 3.

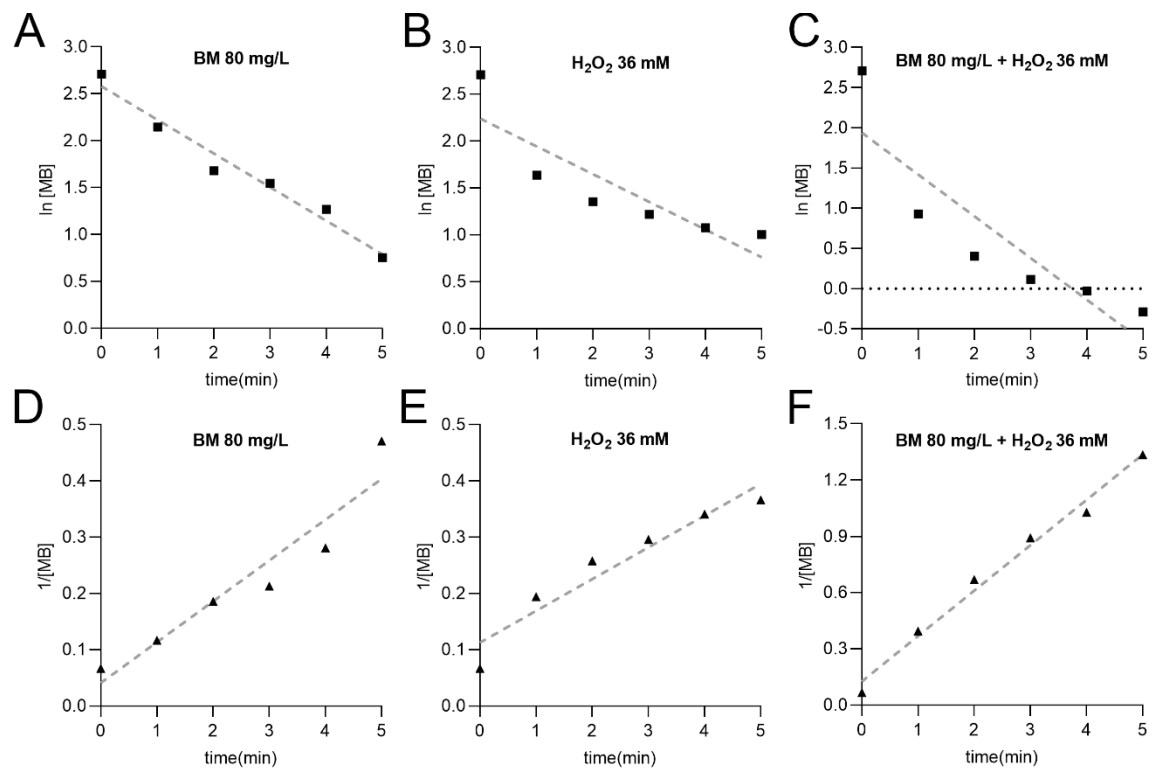


Figure 4.

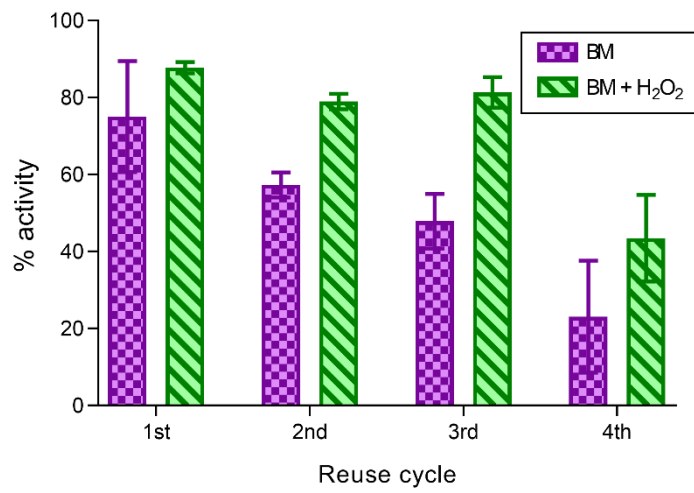


Figure 5.

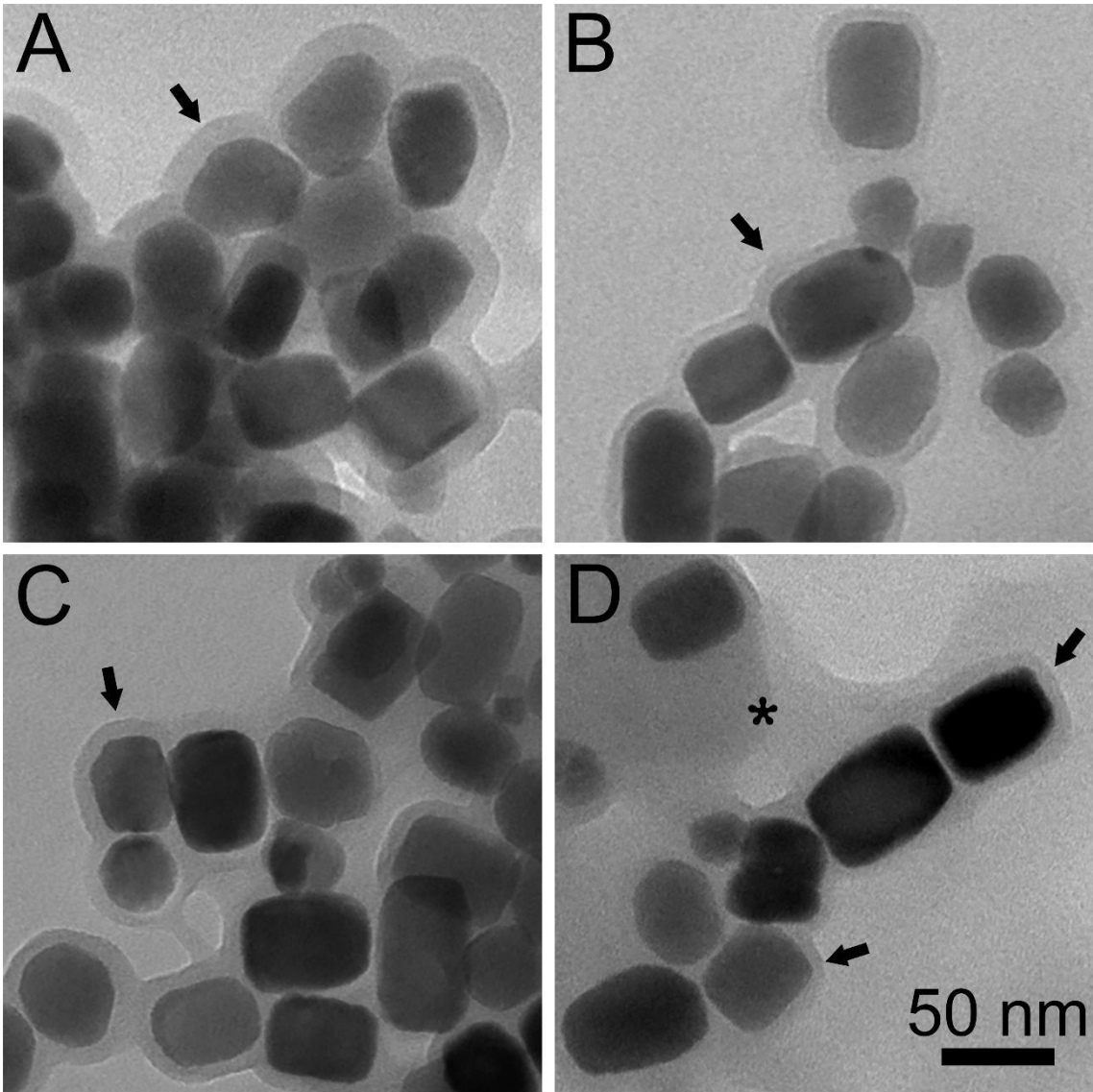
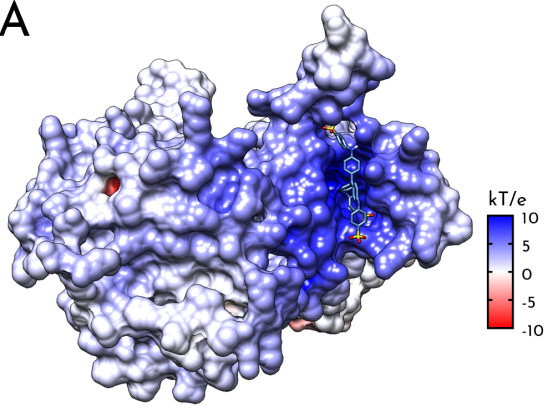
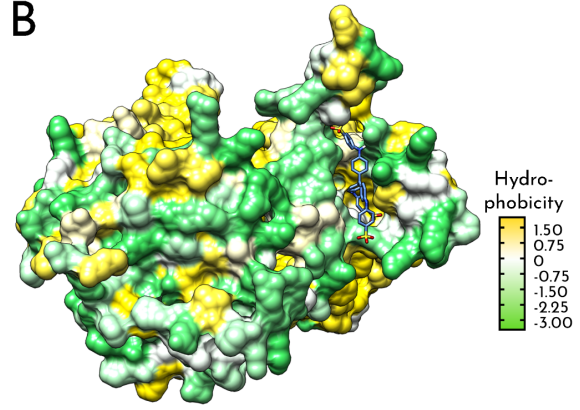
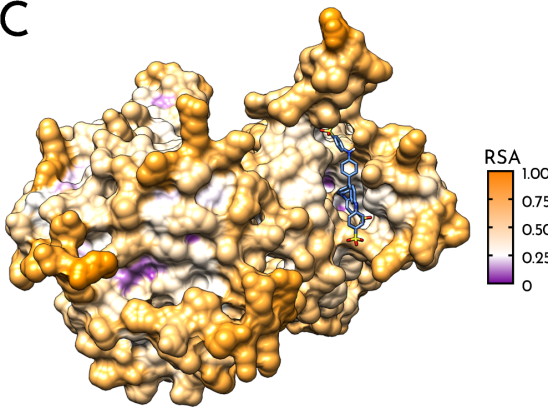
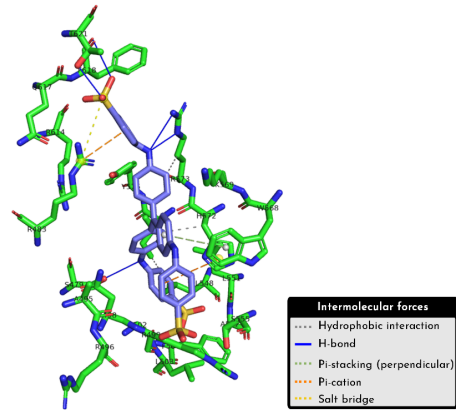


Figure 6.

A**B****C****D**

Supplementary material

Bacterial-origin magnetic nanoparticles for decolorization of methyl blue dye

Tarcísio Correa^a and Fernanda Abreu^{a*}

^a Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

* Corresponding author at: Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail address: fernandaabreu@micro.ufrj.br.

Figure S1. Transmission electron microscopy of BMs after four reuse cycles in the absence of H₂O₂. Arrows indicate BM membranes. * indicates a nebulous substance, presumably degradation products, accumulated between BMs after four cycles.

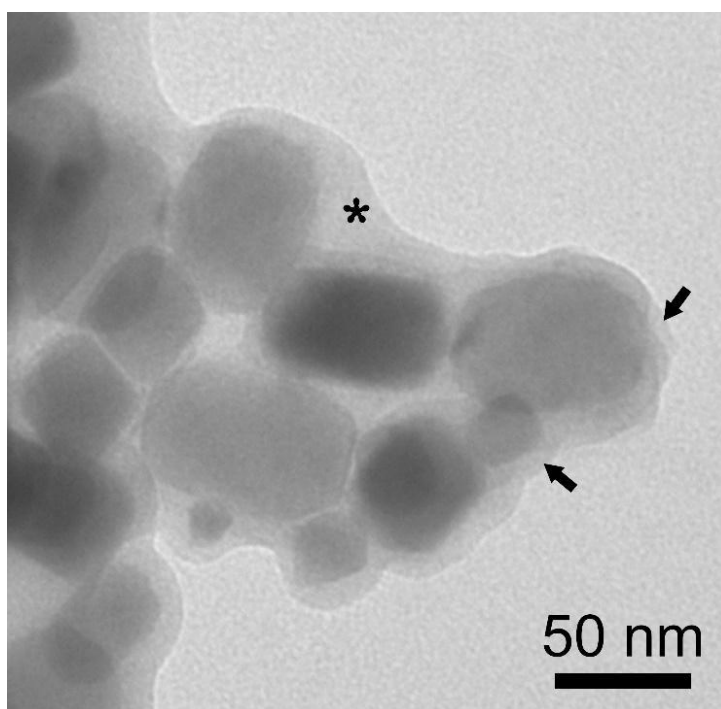


Figure S2. MamZ molecular model based on amino acid sequence. MFS and FRS domains. Model confidence based on predicted local distance difference test (pLDDT) provided by AlphaFold DB v2 (B). Model quality assessed by Ramachandran plot with phi-psi angles (C) and pLDDT with probability of disorder (Pdisorder) per residue (D) and relative solvent-accessible area (RSA) based on exposed and buried residues (E).

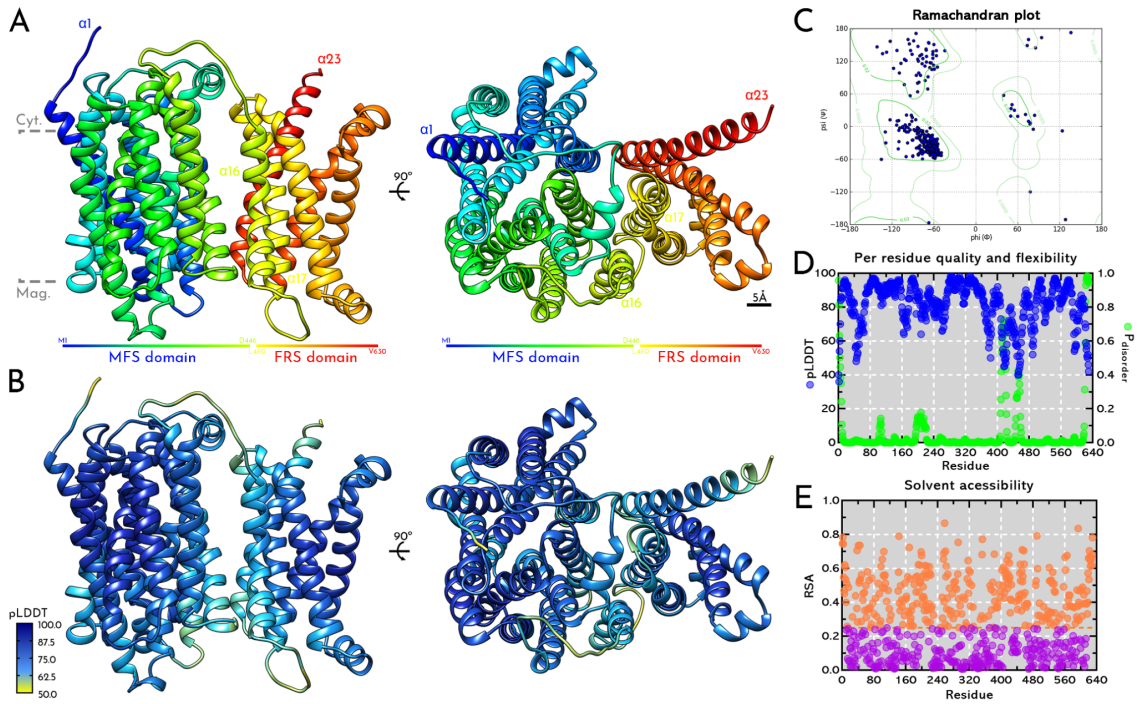


Figure S3. Network of intermolecular interactions of the methyl blue dye with interaction site in MamZ. The interaction site is described by the interactions: (i) 5 H-bonds of residues S479, F618, T621, and R573 (2)with the sulfonate groups and the anilinic nitrogen of the dye; (ii) 3 hydrophobic interactions residues R573, H572, and I575; (iii) 1 pi-pi (π - π ; T-shaped) interaction with W568 and 2 pi-cation (π -cation) interactions with the imidazolic nitrogen of H572 and the terminal aminic nitrogen of R483; and (iv) 1 salt bridge with sulfonate and R483 groups (A, B, C, and D).

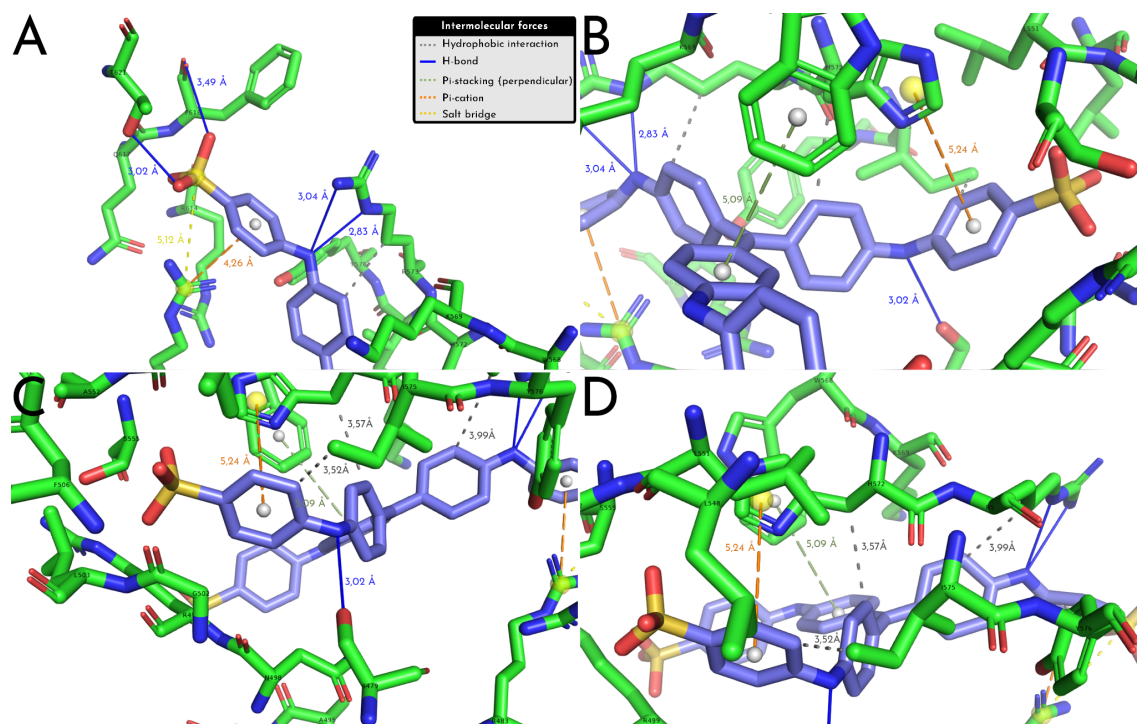
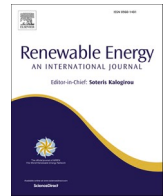


Table S1. Adjusted P values in nonparametric, *posthoc* multiple-comparison tests (MCTs) between membrane thicknesses of BMNs after each reuse cycle in the presence of H₂O₂.

Dunns's MCT				
	Raw	1st cycle	2nd cycle	3rd cycle
1st cycle	0,6586			
2nd cycle	>0,9999	0,1047		
3rd cycle	>0,9999	0,9735	>0,9999	
4th cycle	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Dunnett's MCT (considering raw BMNs as control group)				
	1st cycle	2nd cycle	3rd cycle	4th cycle
Raw	0,445	0,4886	0,938	<0,0001

Table S2. Methyl blue docking score in *M. blakemorei* strain MV-1^T BMs proteins

Receptor	Binding score (kcal/mol)
MamZ	-9.6
MamY	-9.1
MamH	-9.0
MamB	-8.8
MamO	-8.6
MamC	-8.5
MamN	-8.5
MamM	-8.4
MamA	-8.2
MamP	-8.2
MamS	-8.1
MamK	-7.9
MamX	-7.8
MamL	-7.7
MamQ	-7.7
MmsF	-7.4
MamD	-7.1
MamR	-6.7
MamI	-6.6



Biogas potential of biowaste: A case study in the state of Rio de Janeiro, Brazil

Helena Rodrigues Oliveira^{a,b}, Betina Kozlowsky-Suzuki^{c,d,e}, Annika Björn^{f,g},
 Sepehr Shakeri Yekta^{f,g}, Cristiane Fonseca Caetano^{a,b}, Érika Flávia Machado Pinheiro^h,
 Humberto Marottaⁱ, João Paulo Bassin^j, Luciano Oliveira^k, Marcelo de Miranda Reis^l,
 Mario Sérgio Schultz^m, Norberto Mangiavacchiⁿ, Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{o,p},
 Daniel Oluwagbotemi Fasheun^{o,p}, Fernanda Geraldo Silvaⁿ, Igor Taveira^{a,q},
 Ingrid Roberta de França Soares Alves^l, Júlia Castro^{q,r}, Juliana Velloso Durão^k,
 Juliana Guimarães^{a,q}, Mariana Erthal Rochaⁿ, Marina Tomasini^{o,p},
 Pedro Vitor de Oliveira Martins^o, Rogerio Presciliano^q, Stella Buback dos Santos^{o,p},
 Tamires Marques Faria^s, Tarcísio Corrêa^a, Thiago de Nuno Mendes Pery de Linde^t,
 Fernanda Abreu^{a,q}, Alex Enrich-Prast^{b,f,g,u,*}

^a Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Unidade Multiusuário de Análises Ambientais, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Departamento de Ecologia e Recursos Marinhos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 22290-240, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Biodiversidade Neotropical, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 22290-240, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Programa de Pós-graduação em Ecoturismo e Conservação, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 22290-240, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^f Department of Thematic Studies, Environmental Change, Linköping University, 581 83, Linköping, Sweden

^g Biogas Solution Research Center, Linköping University, 581 83, Linköping, Sweden

^h Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil

ⁱ Department of Geography, Graduate Program in Geosciences (Environmental Geochemistry), Biomass and Water Management Research Center (NAB-UFF), Ecosystems and Global Change Laboratory (LEMG-UFF)/International Laboratory of Global Change (LINCGlobal), Universidade Federal Fluminense, 24210-310, Niterói, RJ, Brazil

^j COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-594, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^k Energy Research Office, Environmental Department, 20091-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^l Defense Engineering Program, Instituto Militar de Engenharia (IME), 22290-270, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^m Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 27965-045, Macaé, RJ, Brazil

ⁿ Department of Mechanical Engineering, Group for Environmental Studies and Simulations (GESAR), Rio de Janeiro State University, 20940-903, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^o National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology, and Innovation (MCTI), Laboratory of Biocatalysis, 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^p Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^q Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^r Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^s Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/USP - SP), University of São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

^t Oceans and Land Dynamics Program, Geosciences Institute, Universidade Federal Fluminense, 24210-310, Niterói, RJ, Brazil

^u Institute of Marine Science, Federal University of São Paulo (IMar/UNIFESP), 11015-020, Santos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Anaerobic digestion
 Organic residues
 Biogas potential estimation
 Agricultural residues
 Bioelectricity

ABSTRACT

Anaerobic digestion has been widely applied for waste treatment, renewable energy generation and biofertilizer production. The biogas potential in Brazil is sizable, but the state of Rio de Janeiro is largely dependent on fossil fuels, and there is a lack of biogas potential assessments in the state. Thus, this study evaluated biomethane, electricity and biofertilizer potentials in the region. Three different scenarios of biomass supply were considered for four major biowaste streams: sewage sludge; cattle manure; sugarcane processing waste; and food waste. Biomethane generation from the assessed sources could reach 0.6–1.3 billion Nm³ year⁻¹, corresponding to

* Corresponding author. Dept. of Thematic Studies – Environmental Change, Linköping University, 581 83, Linköping, Sweden.

E-mail address: alex.enrich.prast@liu.se (A. Enrich-Prast).

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119751>

Received 18 January 2023; Received in revised form 29 October 2023; Accepted 25 November 2023

Available online 29 November 2023

0960-1481/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1,768–3,961 GWh year⁻¹ of electricity and 1.6–3.3 million Mg year⁻¹ of biofertilizer. Cattle manure was responsible for 73–84% of the projected biomethane production, presenting an opportunity to reduce the significant emissions from livestock farming. The estimated biofertilizer production could meet the demands of the state, and the produced electricity could offset up to 10% of the demand. The gas grid could facilitate the distribution of upgraded biomethane, and 10–22% of the natural gas demand could be met. The findings of this work highlight the high potential for biogas generation in Rio de Janeiro, which is up to seven times larger than the current production.

Abbreviations

AD	Anaerobic Digestion
ANP	National Agency for Petroleum, Natural Gas and Biofuels
CAM	Campos dos Goytacazes
COD	Chemical Oxygen Demand
CHP	Combined Heat and Power
DM	Dry Mass
FW	Food Waste
GHG	Greenhouse Gases
LPG	Liquefied Petroleum Gas
MRC	Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio
MSW	Municipal Solid Waste
OFMSW	Organic Fraction of Municipal Solid Waste
PET	Petrópolis
RJA	Rio de Janeiro
SS	Sewage Sludge
RJ	State of Rio de Janeiro
VS	Volatile Solids
VRB	Volta Redonda-Barra Mansa

1. Introduction

To meet the rise in energy consumption and the Sustainable Development Goals of the United Nations 2030 Agenda (SDG), a significant effort should be made to increase renewable energy production. Bio-based residues have been increasingly used to produce fuels, electricity and heat worldwide, increasing the valorization of organic wastes and demonstrating the concept of a circular bio-based economy [1]. The conversion of biowaste into valuable products such as biogas and biofertilizers via anaerobic digestion (AD) represents a strategic circular biotechnology contributing to the offset of a fossil fuel-based economy. AD is applied to several organic substrates, e.g., animal manure, agricultural-based residues, food waste, and sewage sludge, to produce biogas, which is mainly composed of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) [2].

Biogas can be directly converted into energy and heat or upgraded to biomethane and injected into a natural gas grid, providing a renewable and clean energy source [3]. Furthermore, the residue from AD processes, called digestate, is commonly applied as biofertilizer, since it is usually rich in several nutrients, including nitrogen, potassium, and phosphorus [4,5]. Biofertilizers can reduce the use of NPK mineral fertilizers by 50%, resulting in better conditions for plant growth and decreased energy consumption [6,7]. Therefore, it is imperative that countries with agricultural production and low mineral fertilizer production, such as Brazil, implement sustainable solutions to ensure the supply of nutrients necessary for agriculture.

Denmark, Sweden and Germany are examples of European countries that successfully apply AD processes for waste treatment and energy generation, with strategic investments and policies that encourage biogas production and use [8,9]. In 2020, 18 billion m³ of biogas was

produced in Europe, and the aim is to reach 35 billion m³ by 2030 [10]. Although developing countries have large potential for the implementation of biogas solutions, they have a much lower biogas production rate, which is only 2.35 billion m³ year⁻¹ in Brazil, for example [11].

During the 21st Conference of the Parties (COP 21) of the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC), held in 2015, Brazil presented its Intended Nationally Determined Contribution to reduce greenhouse gas (GHG) emissions by 43% until 2030 compared to 2005 levels [12]. The state of Rio de Janeiro (RJ) has the third largest population in Brazil, with over 17 million inhabitants living in a densely populated area [13], and accounts for 10% of the Brazilian gross domestic product [14]. Although it is one of the most developed states in Brazil, RJ relies heavily on nonrenewable fossil-based energy sources [15]. Furthermore, it exhibits high discharges of urban sewage [16] and biomass from rural areas [17], in addition to organic urban waste landfilling [18], which are important sources of soil, air and water degradation.

Therefore, the aim of this study is to assess the potential for biomethane and biofertilizer production associated with electrical power generation from major biowaste sources in RJ. Considering the lack of similar assessments in the region, this work could contribute to the promotion of biogas technology as a sustainable pathway to replace the current predominant fossil fuel-based economy and as a model for developing countries.

2. Material and methods

2.1. Study design and data compilation

Biogas potential was estimated for the five regions of RJ: Rio de Janeiro (RJA), Volta Redonda-Barra Mansa (VRB), Petrópolis (PET), Campos dos Goytacazes (CAM), and Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio (MRC). RJA is the most populous region; it is highly urbanized and houses the state's capital. CAM is the largest region, characterized by significant livestock and agricultural production, which is also seen to a lesser extent in PET. VRB also has some livestock production, while MRC is responsible for 13% of the state's crop production.

Based on their availability in RJ, four sources of biowaste were considered for AD: sewage sludge (SS), cattle manure, sugarcane processing waste, and food waste (FW). FW and SS are two major waste streams in highly populated and urban areas [19], which is the case for RJ [13]. Nearly 500 million m³ year⁻¹ of sewage is treated in the 371 treatment plants in RJ [20,21]. Although agricultural production in the state is less expressive than in other areas of Brazil, the sugarcane production of 2.4 million Mg year⁻¹ comprises almost 61% of the crop production in RJ [22]. With 2.6 million animals [23], cattle are the largest livestock source in the state and represents the largest contribution of RJ to Brazilian animal production [24].

A dataset was compiled from trusted public and private sources, as specified in the following sections. Three scenarios for potential biogas production were considered: minimum, medium and maximum, defined by different assumptions of substrate availability (Table 1). As a prospective approach to support the implementation of AD in developing countries, the potential for biomethane, electricity and biofertilizer production in the different regions of RJ was estimated by applying conversion values from the literature for each available biowaste

Table 1

Minimum, medium and maximum scenarios considered for the estimation of the biogas potential in the state of Rio de Janeiro.

Biowaste	Scenario		
	Minimum	Medium	Maximum
Sewage sludge	Sludge from 50% of treated sewage	Sludge from 100% of treated sewage	Sludge from 100% of collected sewage
Cattle manure	Dairy cattle and feedlot beef cattle manure	Dairy cattle and 50% beef cattle manure	Dairy cattle and 100% of beef cattle manure
Sugarcane processing waste	Waste from ethanol production (2021–2022 harvest season)	Waste from operation with 50% capacity in ethanol plants	Waste from 100% capacity in ethanol plants
Food waste	25% of the generated food waste	50% of the generated food waste	100% of the generated food waste

(Table 2).

2.2. Waste and biomethane production estimation

2.2.1. Sewage sludge

The data on the amount of collected and treated sewage were obtained from the Water and Sewage Services Diagnosis of 2019, released by the Brazilian National System of Information on Water and Sanitation [20]. The minimum and medium potential scenarios considered only treated sewage for the estimation of SS availability for biogas production, while the maximum potential was based on all collected sewage. The biomethane production potential was calculated assuming a solid sludge generation of 350 g m^{-3} of treated sewage [25], a volatile solids (VS) content of 77.5% of dry mass (DM) [26] and an average biomethane yield for a mixture of primary and secondary sludge of $249.3 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1} \text{ VS}$ [27–29].

2.2.2. Cattle manure

The amount of cattle manure was estimated based on the total number of cows in RJ [23] and the percentage of feedlot beef cattle was obtained from the agricultural census [36]. The scenarios for the estimation of biogas and biofertilizer potential were designed according to the ease of manure collection, with the minimum potential scenario considering only feedlot cattle and the maximum potential scenario taking manure from all cattle into account. Manure production, VS content and biomethane yield were estimated according to Mito et al. [30]. For beef and dairy cattle, the daily manure production per animal was 43.9 and 93.7 L d^{-1} , the VS content was 80.19 and 68.59 g L^{-1} , and the biomethane yield was 230 and $210 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1} \text{ VS}$, respectively. For biofertilizer estimation, DM was calculated considering a VS/DM content of 83.7% and 85.3% in beef and dairy manure, respectively [37].

2.2.3. Sugarcane processing waste

Quantification of sugarcane processing waste was conducted based on the ethanol production in the 2021/2022 harvesting season, according to the National Supply Company [33] or the ethanol production capacities of plants in RJ, as obtained from the National Agency for Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP) database for biofuel producers [38]. The minimum potential scenario considered the ethanol production in RJ, while the medium and maximum scenarios considered 50% and 100% of the ethanol plants capacities, respectively. An average vinasse production of $13 \text{ L L}^{-1} \text{ ethanol}$ [31] and an ethanol production of $72.4 \text{ L Mg}_{\text{sugarcane}}^{-1}$ [33] were considered. The amounts of sugarcane straw and filter cake were $140 \text{ kg Mg}_{\text{sugarcane}}^{-1}$ and $35 \text{ kg Mg}_{\text{sugarcane}}^{-1}$, respectively [34]. While all vinasse and filter cake generated were considered for AD, only 50% of the sugarcane straw was assumed to be available, as half of it is usually left in the field [39,40]. The chemical oxygen demand (COD), DM and VS contents of sugarcane processing

Table 2

Equations used to calculate the biomethane potential of different biowaste sources.

Equations	Variables
(1) $SS_t = \frac{SG \times Sewage}{10^6}$	<ul style="list-style-type: none"> SS_t: sewage sludge (Mg DM year^{-1}) SG: solid sludge generation (350 g DM m^{-3}) [25] $Sewage$: volume of sewage ($\text{m}^3 \text{ year}^{-1}$) [20]
(2) $BMP_{SS} = SS_t \times SS_{VS} \times Y_{SS}$	<ul style="list-style-type: none"> BMP_{SS}: sewage sludge biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$) SS_{VS}: sewage sludge volatile solids ($77.5\% \text{ DM}$) [26] Y_{SS}: sewage sludge biomethane yield ($249.3 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1} \text{ VS}$) [27–29]
(3) $BMP_{Dairy} = \frac{M_{Dairy} \times VS_{Dairy}}{10^6} \times Y_{Dairy} \times 365$	<ul style="list-style-type: none"> BMP_{Dairy}: dairy cattle manure biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$) M_{Dairy}: dairy cattle daily manure production (93.7 L d^{-1}) [30] VS_{Dairy}: dairy manure VS content (68.59 g L^{-1}) Y_{Dairy}: dairy cattle manure biomethane yield ($210 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1} \text{ VS}$) [30]
(4) $BMP_{Beef} = \frac{M_{Beef} \times VS_{Beef}}{10^6} \times Y_{Beef} \times 365$	<ul style="list-style-type: none"> BMP_{Beef}: beef cattle manure biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$) M_{Beef}: beef cattle daily manure production (43.9 L d^{-1}) [30] VS_{Beef}: cattle manure VS content (80.19 g L^{-1}) Y_{Beef}: beef cattle manure biomethane yield ($230 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1} \text{ VS}$) [30]
(5) $BMP_{CM} = BMP_{Dairy} + BMP_{Beef}$	<ul style="list-style-type: none"> BMP_{CM}: cattle manure biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$)
(6) $BMP_{Vin} = E \times SP_{Vin} \times \frac{COD_{Vin}}{1000} \times Y_{Vin}$	<ul style="list-style-type: none"> BMP_{Vin}: sugarcane vinasse biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$) E: ethanol production ($\text{m}^3 \text{ year}^{-1}$) SP_{Vin}: vinasse specific production ($13 \text{ m}^3 \text{ m}_{\text{ethanol}}^{-3}$) [31] COD_{Vin}: sugarcane vinasse COD (27.25 g L^{-1}) [32] Y_{Vin}: vinasse biomethane yield ($274 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1} \text{ COD}$) [32]
(7) $SC = \frac{E}{SP_E} \times 1000$	<ul style="list-style-type: none"> SC: sugarcane used for ethanol production (Mg year^{-1}) SP_E: ethanol specific production ($72.4 \text{ L Mg}_{\text{sugarcane}}^{-1}$) [33]
(8) $BMP_{Str/FC} = \frac{SC \times SP_{Str/FC}}{1000} \times Y_{Str/FC}$	<ul style="list-style-type: none"> $BMP_{Str/FC}$: sugarcane straw or filter cake biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$) $SP_{Str/FC}$: sugarcane straw or filter cake specific production yield ($140 \text{ kg Mg}_{\text{sugarcane}}^{-1}$ and $35 \text{ kg Mg}_{\text{sugarcane}}^{-1}$, respectively) [34] $Y_{Str/FC}$: sugarcane straw or filter cake biomethane yield ($129 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1}$ and $54 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1}$, respectively) [32]
(9) $BMP_{SW} = BMP_{vinasse} + \frac{BMP_{Str}}{2} + BMP_{FC}$	<ul style="list-style-type: none"> BMP_{SW}: sugarcane processing waste biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$)
(10) $MSW_i = 365 \times \sum_i MSW_i \times Pop_i$	<ul style="list-style-type: none"> MSW_i: Municipal solid waste (Mg year^{-1}) MSW_i: per capita municipal solid waste generation of each municipality ($\text{Mg inhab}^{-1} \text{ d}^{-1}$) [25] Pop_i: population of each municipality [13, 25]
(11) $FW = MSW_i \times \%OFMSW \times \%FW$	<ul style="list-style-type: none"> FW: food waste (Mg year^{-1}) $\%OFMSW$: organic fraction of municipal solid waste (53%) [25] $\%FW$: food waste fraction of OFMSW (73%) [35]
(12) $BMP_{FW} = FW \times VS_{FW} \times Y_{FW}$	<ul style="list-style-type: none"> BMP_{FW}: food waste biomethane potential ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$) VS_{FW}: food waste volatile solids content (%) [35] Y_{FW}: food waste biomethane yield ($341 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1} \text{ VS}$) [35]

wastes were estimated according to Janke et al. [32]. The biomethane potentials for vinasse, straw and filter cake were $274 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}_{\text{COD}}^{-1}$, $129 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1}$ and $54 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1}$, respectively [32].

2.2.4. Food waste

FW generation was estimated based on municipal solid waste (MSW) production, with 53% of the total MSW produced annually considered as the organic fraction of MSW (OFMSW) [25], while FW content was assumed to be 73% of OFMSW [35]. MSW production was based on the population [13] and per capita MSW generation index of the municipalities, provided by the State's Solid Waste Plan [25]. The minimum and medium potential scenarios considered that 25% and 50% of MSW would be destined for AD, which are the mid- and long-term goals of energy recovery from waste in the state [25]. The maximum scenario estimated the biogas potential from 100% of the FW generated in RJ. A biomethane potential of $341 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ Mg}^{-1}$ VS was considered for FW, assuming that all components of the OFMSW contribute equally to the mass of VS, so the average DM and VS contents for FW are 229.5 kg Mg^{-1} and 200.5 kg Mg^{-1} , respectively [35].

2.3. Biofertilizer potential

The potential for biofertilizer production (in DM) from the digestate generated in the biogas process of each biowaste stream considered in this study was calculated according to Eq. (13) [41]. The estimated DM and VS contents of the different biomasses were obtained from previous studies, as detailed in Sections 2.2.1-2.2.5 [26,30,37,32,35].

$$\text{Biofertilizer} = \text{DM} - \text{VS} + 0.4 \times \text{VS} \quad (13)$$

where DM is the dry mass and VS is the volatile solids of the biowaste (Mg).

2.4. Electricity production from biomethane

The potential electricity generation from the biomethane produced from each biowaste source was calculated using Eq. (14).

$$P = V_{\text{CH}_4} \times \text{LHV} \times \eta \quad (14)$$

where P is the potential electricity generated from biomethane (kWh year^{-1}), V_{CH_4} is the volume of biomethane produced ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$), LHV is the lower heating value of methane ($9.97 \text{ kWh Nm}^{-3} \text{ CH}_4$) and η is the engine's conversion efficiency (30%) [35].

2.5. Greenhouse gases avoided emissions

The avoidance of GHG emissions by the implementation of AD to generate electricity and biomethane was calculated based on the emissions from conventional energy sources that would be replaced [35]. Net electricity generation from AD was calculated considering the difference between electricity produced from biomethane and electricity consumed in the AD process, which was 67.9 kWh Mg^{-1} DM of waste [42]. Avoided emissions were then calculated considering the net electricity generation and the current emissions of the Brazilian electricity mix ($78.8 \text{ kg CO}_{2\text{eq}} \text{ MWh}^{-1}$) [43]. For biomethane application as vehicle fuel, only the replacement of fossil fuels by biomethane in passenger cars was considered for the estimation of avoided emissions. Emission factors for gasoline and natural gas of 164 and $124 \text{ g CO}_{2\text{eq}} \text{ km}^{-1}$, respectively [44], and a biomethane consumption yield of 2.02 km Nm^{-3} [35] were applied in the calculations.

3. Results and discussion

A total annual production of up to 1324 million Nm^3 of CH_4 , 3961 GWh of electricity and 3.3 million Mg of biofertilizer could be obtained in RJ with the implementation of AD for treating the biowaste streams

assessed in this study (Table 3). The total potential from the medium and maximum scenarios was approximately 1.5 and 2.2 times higher than that from the minimum scenario. Cattle manure had by far the highest potential, being responsible for 73–84% of the total projected biomethane and electricity production and 78–87% of the biofertilizer production, while sewage sludge had the lowest potential (3–5%). Brazil is one of the largest cattle producers in the world; therefore, cattle manure management and its AD potential are important in the country [45].

3.1. Biomethane potential

Even the lowest estimated biomethane potential of 591 million $\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$ is considerably larger than the current biogas production in RJ of 327 million $\text{m}^3 \text{ year}^{-1}$ [11]. Assuming a CH_4 content in biogas of 60% [46,47], the biomethane potentials calculated in the minimum and maximum scenarios were, respectively, 3.0 and 6.7 times larger than the current methane production in RJ. Among the different regions of RJ, the estimated potentials were much higher than the current production, except in RJA (Fig. 1). In this region, which is responsible for 88% of the state's biogas production, the minimum potential did not surpass the current production. This may be due to an underestimation of the potential in the minimum scenario, in addition to the presence of biogas production from industrial residues in RJA [11], which were not considered in this study. Furthermore, it is noteworthy that the region with the largest potential, CAM, is also the one with the least amount of biogas currently produced, since most of the production in the state comes from MSW and sewage treatment and is concentrated in the metropolitan area of the capital [11].

The geographical distribution of biomethane potential in RJ was different among the biowaste streams (Fig. 2). This is directly related to the different biowaste generation rates across the regions of the state (Table S1).

SS production from treatment plants in RJ was estimated to be $174,641 \text{ Mg DM year}^{-1}$, resulting in a potential biomethane production of $17\text{--}54 \text{ million Nm}^3 \text{ year}^{-1}$. RJA contains more than 3/4 of the total state population and presents by far the largest potential (83%) for biomethane production (Fig. 2A). Although it has the third largest population, VRB has the lowest methane potential (2% of the SS potential) in the minimum and medium scenarios, as less than 30% of the sludge is treated; in the maximum scenario, which considers the potential production if all collected sewage was treated, the contribution of this region increased to 5%. Conversely, the MRC region has one of the highest collected sewage treatment indices (85.8%), being responsible for a potential biomethane production of $2.5 \text{ million Nm}^3 \text{ year}^{-1}$ in the medium scenario.

Table 3

Potential biomethane, electricity and biofertilizer production from different biowaste sources in the state of Rio de Janeiro.

	Scenario	Biomethane (10^6 Nm^3 year^{-1})	Electricity (GWh year^{-1})	Biofertilizer (10^3 Mg year^{-1})
Sewage sludge	Minimum	16.9	50.5	46.7
	Medium	33.7	100.9	93.4
	Maximum	54.2	162.2	150.1
Cattle manure	Minimum	498.0	1489.6	1356.8
	Medium	733.6	2194.2	1966.0
	Maximum	972.6	2909.1	2584.0
Sugarcane processing waste	Minimum	30.6	91.5	74.3
	Medium	57.5	171.8	139.6
	Maximum	114.9	343.7	279.2
Food waste	Minimum	45.6	136.5	72.9
	Medium	91.3	272.9	145.8
	Maximum	182.5	545.9	291.5
Total	Minimum	591.1	1768.1	1550.7
	Medium	916.1	2739.8	2344.8
	Maximum	1324.3	3960.9	3304.8

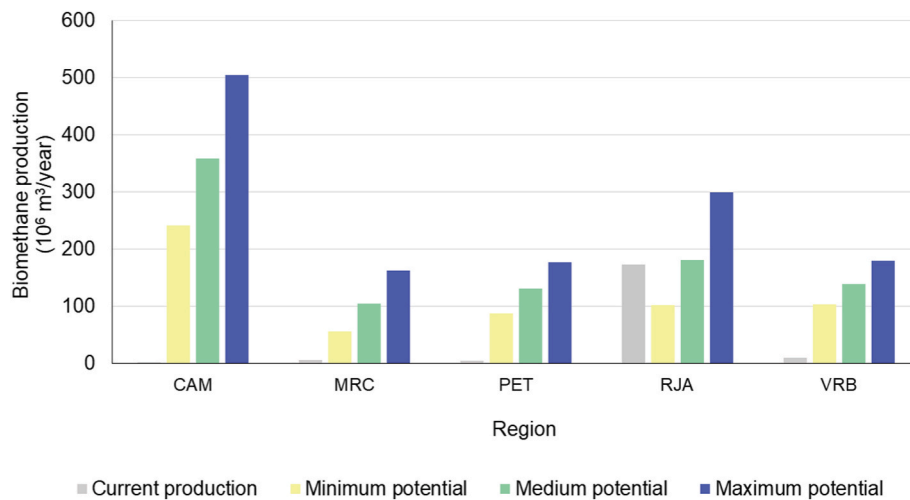


Fig. 1. Comparison of estimated biomethane potential with current production [11] considering a methane content of 60% in biogas. CAM: Campos dos Goytacazes; MRC: Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio; PET: Petrópolis; RJA: Rio de Janeiro; VRB: Volta Redonda-Barra Mansa.

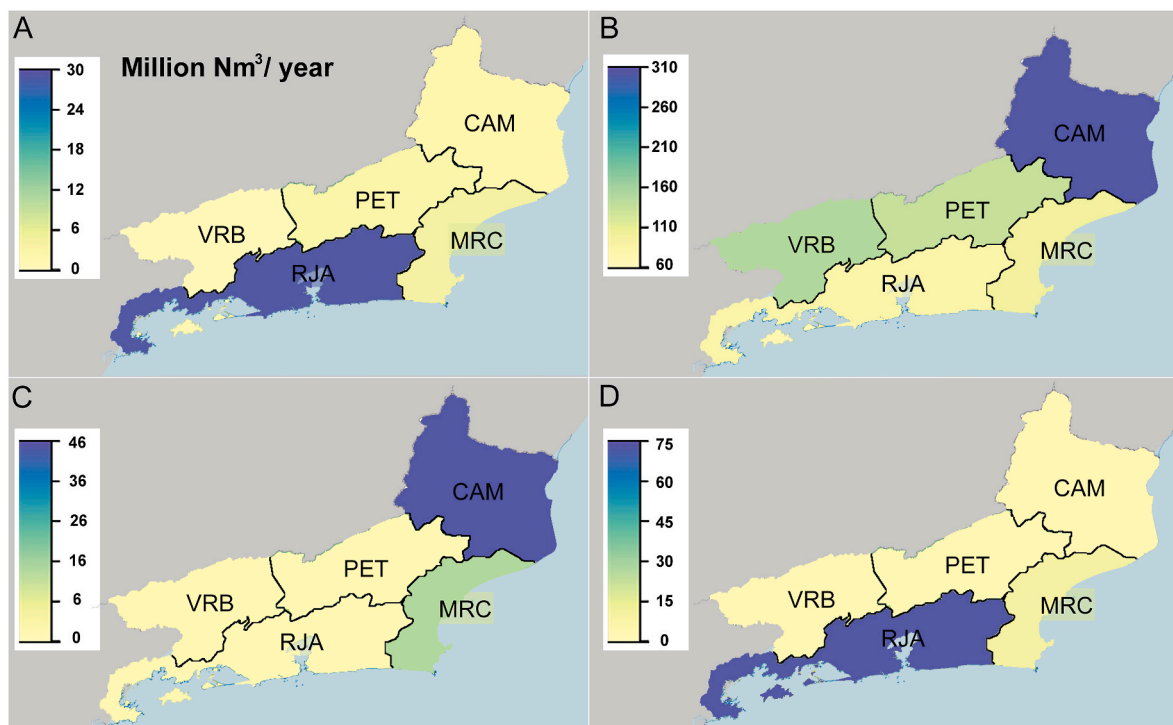


Fig. 2. Potential production of biomethane (million Nm³ year⁻¹) in the medium scenario from sewage sludge (A), cattle manure (B), sugarcane processing waste (C), and food waste (D) in the regions of the state of Rio de Janeiro. RJA: Rio de Janeiro; VRB: Volta Redonda-Barra Mansa; PET: Petrópolis; CAM: Campos dos Goytacazes. MRC: Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio.

When sludge from all collected sewage was considered (maximum scenario), the biomethane potential from SS increased by 61% in comparison with the scenario in which only sludge from treated sewage was considered for biogas production (medium scenario). Moreover, the potential for biomethane production from sewage that is neither collected nor treated also exists. In RJ, only 64% of the population has access to sanitation, 63% of the collected sewage is treated [20], and the development of sewage collection and treatment infrastructure would be needed for AD. The possibility for biogas production could become an additional motivation to develop more extensive sanitation programs.

According to the State's Solid Waste Plan [25], the generated sludge is placed in sanitary landfills throughout RJ. Therefore, the application of AD to treat this waste would allow for the recycling of nutrients and a

reduction in operating costs due to energy generation.

There are 2.6 million cattle heads in RJ, with 1.6 million beef cattle and 1.0 million dairy cattle. As most of the cattle in the state come from CAM, this region has the highest potential for biomethane production (42%) from cattle manure (Fig. 2B). The other regions each account for 9–20% of the potential CH₄ generation, with the lowest potential in RJA, a highly urbanized area.

The cattle industry is responsible for 80% of the emissions from agricultural activities in RJ, with manure management alone contributing to the emission of 232 Gg CO_{2eq} in 2015 [48]. Worldwide, less than 9% of the generated manure is treated, with most of it being left in the fields [49]. According to the World Biogas Association, livestock manure is one of the main sources of energy generation through AD [50] and is

expected to play a crucial role in most countries in future years, achieving up to 1900 million Nm³ of methane every day [51]. Even if livestock farming is not the main economic activity of a region, this study shows that biogas production from livestock residues could be of extremely high value. Legislation to enforce and encourage manure treatment via AD and to stimulate its energetic use are needed to realize the global potential for biogas generation from manure [50].

Cattle for milk production are usually placed in a confined space twice a day; therefore, a significant amount of manure could be concentrated in these locations, which facilitates manure management. On the other hand, beef cattle are more dispersed, which makes manure management more difficult and expensive. As a result, 64% of dairy manure is treated in some way, while only 1% of beef cattle manure is adequately managed [49]. In RJ, most of the cattle production farms have relatively small pasture areas (<20 ha), especially in RJA, where 57% of the establishments have less than 10 ha of pasture, which could facilitate manure management [36]. There is a need to encourage the appropriate management of manure, especially that from beef cattle, to achieve a more sustainable production process.

Family farming is the basis for the cattle industry in RJ [22], with the average number of heads per producer being between 74 (PET) and 142 (VRB) [36]. Solutions for small producers depend on collaboration among farmers, who must gather enough raw material to enable biogas production. Most local milk producers are associated with cooperatives, and more than 65% of them use collective cooling tanks [52]. This indicates an existing relationship among farmers that could facilitate the development of joint AD facilities to collectively treat wastes and allow for an increase in scale. Another possibility is the establishment of centralized AD facilities near large producers, which would allow for high-capacity biogas plants, decreasing specific capital and operational costs of production [53].

There are four large sugar-ethanol processing plants in RJ, three of which are in CAM and one in MRC [38]. Altogether, they have the capacity to produce 1270 m³_{ethanol} d⁻¹, which would generate 6 million m³ year⁻¹ of vinasse, 896 thousand Mg year⁻¹ of straw (with only half being considered for AD), and 224 thousand Mg year⁻¹ of filter cake. This capacity is much higher than the actual ethanol production, which was reported to be only 123,400 m³_{ethanol} year⁻¹ in the 2021/2022 harvest season. The biomethane potential would increase 276% if the full capacity was utilized (maximum scenario) in comparison to the current ethanol production (minimum scenario), presenting the potential to improve both bioethanol and biogas production in RJ. CAM is responsible for 79% of the biomethane production potential (Fig. 2C).

Vinasse and filter cake are generally used as fertilizers, but this practice might affect soil structure and cause contamination, salinization and acidification of soil, and surface and groundwaters [54,55]. Therefore, AD of these wastes could help to reduce the environmental impacts of ethanol production and allow for the recovery of energy and nutrients. However, low pH, low C:N ratio, and macro- and micro-nutrient deficiency [56] could hamper biogas production from vinasse. Vinasse also contains high concentrations of sulfur, leading to the formation of H₂S, which can impair biogas production and decrease biogas quality, requiring a desulfurization step [56].

RJA, where the state capital is located, has the highest population density [13] and per capita MSW generation index in the state (1.19 kg inhabitant⁻¹ d⁻¹) [25] and thus has the highest potential for biomethane production from the AD of FW (82%) (Fig. 2D).

Source-segregated organic waste is preferable for AD since it facilitates reactor maintenance and digestate processing, allowing the digestate to meet the criteria needed to be used in food production [57]. In RJ, there is no collection of source-separated organic waste, but some municipalities have specific legislation [25] for the separate collection of organic residues from large waste generators, such as restaurants and supermarkets.

Although this residue is usually disposed in sanitary landfills, which wastes opportunities for resource recovery and energy generation,

organic waste from large generators is currently being used in a pilot plant in Rio de Janeiro City for the production of biomethane [35]. According to the National Solid Residue Plan [58], this is the only facility in RJ where AD technology is applied to OFMSW, of which 73% is FW [35], and the facility can treat up to 30 Mg d⁻¹, producing 1000 Nm³ d⁻¹ of biomethane. This plant also produces digestate, which is used by the municipality in reforestation programs [59]. However, the treatment capacity of this facility corresponds to only 0.4% of the FW production in RJ, showing the need for the implementation of policies to increase sustainable organic waste management.

Solid waste management measures in Brazil are focused on eliminating improper waste disposal, so the implementation of source-segregation could be difficult, requiring a change in societal behavior and the enforcement and promotion of new public policies. Thus, post-separation technologies would be essential at present for separating FW from MSW.

3.2. Application of biogas to offset electricity and fossil-fuel demands in the state of Rio de Janeiro

The produced biogas could be used as a substitute for cooking gas. The application of biogas from small-scale plants for cooking has environmental, economic, and social benefits for rural and low-income areas [60,61]. This could help offset the effects of the rising liquefied petroleum gas (LPG) prices in RJ. In 2020, 3.2 million tons of LPG were used in the whole Southeast region of Brazil [62], which is equivalent to nearly 41,464 GWh [63], which could be offset by 14–32% by the energetic potential of methane estimated in this study.

RJ already has a natural gas distribution grid connecting its five regions, covering almost 60% of the municipalities (Fig. 3), that could be used for biomethane distribution. RJA has several municipalities connected to the grid, while CAM, which has the highest biomethane potential, has only one. However, the only two current biogas facilities that produce biomethane in the state do not inject it into the gas grid; instead, they sell it directly to the final consumer (e.g., gas stations and industrial clients) [46], which can be attributed to inconsistencies in the legislation for biomethane distribution (Section 3.5).

The produced biomethane could be easily distributed to households and businesses connected to the natural gas distribution grid. According to the natural gas distributor in RJ, Naturgy, 16.6 million m³ of gas is distributed every day, which would be equivalent to a demand of nearly 6.1 billion m³ every year [64,65]. The estimated biomethane production could provide between 10 and 22% of this demand, reducing dependency on fossil fuels and improving the contribution of renewable energy sources in the state. Biomethane is commonly applied in the vehicle fuel sector in countries such as Sweden [8]. Although the number of vehicles that use biomethane in RJ is quite low (286), more than 1.3 million vehicles run on natural gas (Fig. S1), highlighting an enormous market for biomethane. Almost 3.4 million m³ day⁻¹ of natural gas is commercially used as vehicle fuel [64,65], and all this demand could be supplied by biogas production from the sources selected in this study. The development of biogas solutions in the state could encourage a shift in vehicle fuel consumption, along with government policies and incentives for the production and use of renewable energy.

Despite economic advantages, the initial investments into biogas upgrading can be costly [66], and the produced biomethane would have to be competitive with natural gas. Alternatively, biogas could be used for heat and electricity production in a CHP system. The electricity could help supply the biogas plant and waste-generating activities (e.g., farms, sugar-ethanol plants, and wastewater treatment systems). For example, sewage treatment plants that use activated sludge systems have very high electricity demands associated with the aeration of reactors, and the integration of CHP is the most accepted option to increase energy recovery [67]. In RJ, the total electricity consumption in sewage systems is approximately 107 GWh year⁻¹ [20], of which 47% could be supplied by electricity generation from biogas from SS in the more conservative

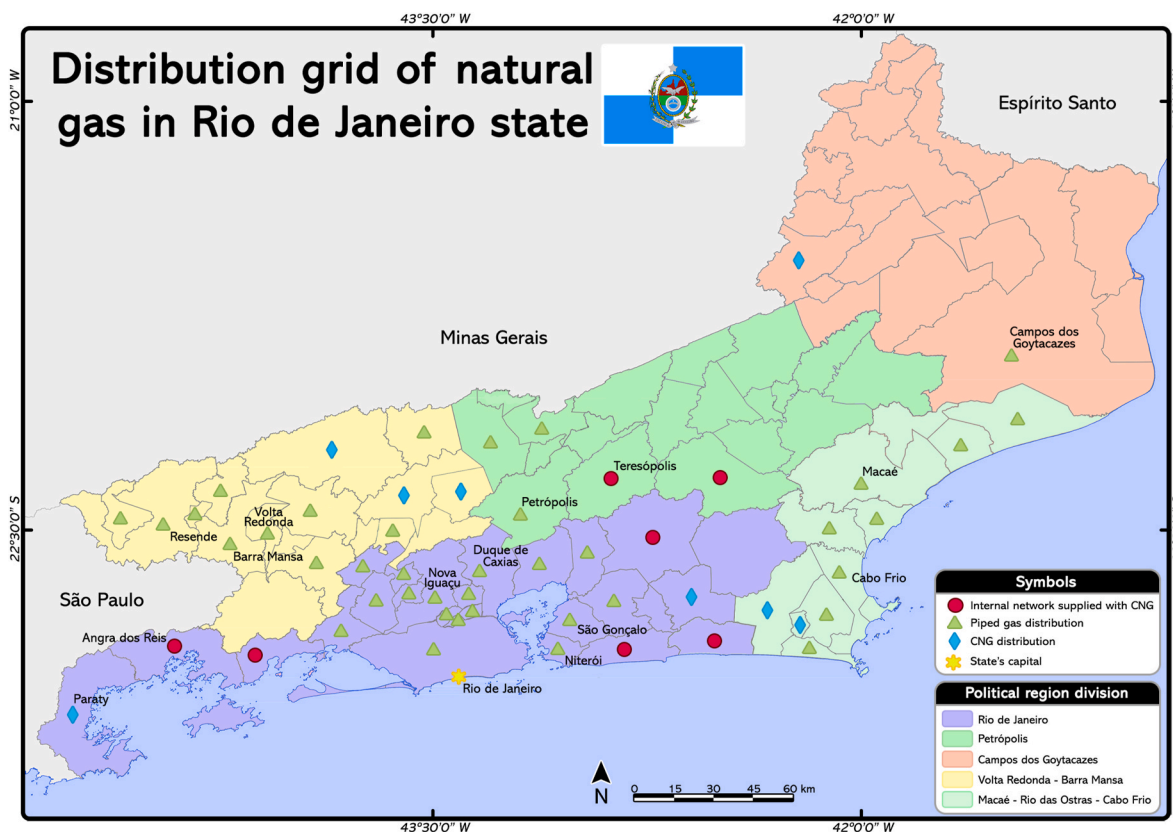


Fig. 3. Gas distribution in the state of Rio de Janeiro [64,65]. Compressed Natural Gas (CNG).

scenario. With the expansion of sewage treatment and the AD of sewage sludge (maximum potential scenario), all electricity could be provided by biogas, and profits could be obtained from selling the excess energy.

If the electricity is not used within the biogas plant, it could be distributed locally. A total of 39,244 GWh was consumed in RJ in 2019 [68]; thus, the electricity potential estimated from all streams considered in our study could offset 5–10% of the electricity from the power grid. Heat is also generated within the system, which could be utilized in other parts of the process, such as during pretreatment or for heating reactors.

3.3. Digestate utilization: achieving a circular economy

Digestate can help neutralize acid soils, since its pH usually ranges from 7 to 8.5, and enhance soil fertility, both as a source of nutrients [69] and by improving soil cation exchange capacity, which is crucial for RJ low fertility soils. It can also be used as a substrate for plant beds, especially for Atlantic Forest trees in RJ [70]. In summary, digestates from suitable feedstocks could act as secondary nutrient sources, promoting a circular biobased economy.

CAM has the highest potential for biofertilizer production from AD of

Table 4

Biofertilizer and nutrient production from digestate and demand in each region of the state of Rio de Janeiro. CAM: Campos dos Goytacazes; MRC: Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio; PET: Petrópolis; RJA: Rio de Janeiro; VRB: Volta Redonda-Barra Mansa.

Region	Scenario	Biofertilizer (Mg year ⁻¹)	N (Mg year ⁻¹)	P (Mg year ⁻¹)	K (Mg year ⁻¹)
CAM	Minimum	648,331	29,160	7,923	41,299
	Medium	947,999	41,580	11,297	60,582
	Maximum	1,314,190	54,696	14,841	84,604
MRC	Minimum	148,853	6,633	1,861	9,237
	Medium	271,945	12,091	3,404	16,832
	Maximum	413,827	17,691	4,941	25,811
PET	Minimum	304,847	14,918	4,096	18,968
	Medium	415,815	20,354	5,613	25,741
	Maximum	531,559	26,015	7,215	32,658
RJA	Minimum	238,257	11,947	4,052	10,840
	Medium	407,069	20,498	7,181	17,313
	Maximum	643,417	31,907	11,314	25,760
VRB	Minimum	210,423	10,283	2,822	13,071
	Medium	301,928	14,750	4,063	18,662
	Maximum	401,849	19,691	5,510	24,445
Total	Minimum	1,550,711	72,941	20,754	93,416
	Medium	2,344,756	109,274	31,557	139,130
	Maximum	3,304,842	150,000	43,820	193,279
RJ Demand ^a	-	52,802	8,976 ^b	5,280 ^b	7,920 ^b

^a Source: NPCT [72].

^b Considering the N–P–K composition of the southeast region of Brazil (17-10-15%).

the studied biowastes, with more than twice the potential of any other region, while MRC has the lowest potential (Table 4). The produced biofertilizer can be used in agricultural production, since CAM is responsible for 61% of the state's production, mainly related to sugarcane [22]. Alternatively, the biofertilizer could be used for the cultivation of soybean and other grains, which has been encouraged and identified as one alternative to occupy the areas that were previously used by sugarcane in the North and Northwest of Rio de Janeiro [71].

The biofertilizer production projected in this study could surpass the fertilizer demand in RJ, of 52,802 Mg year⁻¹ [72], providing at least 8, 4 and 12 times the amount of N, P and K needed, respectively. In the maximum potential scenario, the application of AD to treat the studied wastes could provide up to 17, 8 and 24 times the needed N, P and K, respectively. The replacement of mineral fertilizers for biofertilizers usually results in a reduction in GHG emissions and energy consumption in fertilizer production, reducing the use of fossil fuels [7,73].

Digestate characteristics vary widely with feedstock. Digestate from FW has the highest nitrogen (N) content, while that from SS has the highest phosphorus (P) concentration, and those from cattle manure and sugarcane waste have the highest potassium (K) content (Table S2). Biosolids produced from sewage treatment stations in RJ after AD and drying are suitable for agricultural application, complying with the legal quality requirements [70,74], but sludge is landfilled due to the absence of a state sludge recycling program [25,70]. Cattle manure and OFMSW-based digestates can have pathogens, impurities and contaminants, which negatively affect digestate processing and the possibility of land application [57,75,76].

Furthermore, for farmland application, the land should be located near the biogas plant, and for land that is farther away, volume reduction and digestate treatment must be considered to reduce transportation costs [5,57]. For longer distances, ammonia stripping can result in cost reduction, and if a CHP system is used, excess heat can be used to increase stripping efficiency [5]. Additionally, pelletization of the end-product may improve its fertilization properties, reduce transportation costs and facilitate land application [75].

Since the calculated digestate potential is much higher than the fertilizer demand in RJ, alternative uses in addition to soil application should be considered. For example, co-combustion of digestate can be performed for power generation [57]. Thermal conversion technologies such as combustion, pyrolysis and gasification are usually applied for energy recovery from digestate while also producing biochar, which could be utilized as a soil amendment [75]. Gasification is commercially available for urban digestates, and several operating plants exist in the United States [75]. The produced gas could be used either in pretreatment steps, to heat the reactor or in the digestate drying process.

3.4. Avoided greenhouse gas emissions

Brazil has one of the most sustainable energy matrices mainly due to the contribution of sugarcane biomass (19%) and hydropower (13%), with 48% of the energy produced coming from renewable sources (Fig. S2A) in 2020, in comparison with 14% in the world [77]. However, in 2016 (the latest available data), RJ was strongly dependent on nonrenewable sources for energy (88%) and electricity (78%) production [15] (Fig. S2).

Studies have noted that the energy produced from biogas contributes to lower GHG emissions compared to fossil fuels [78,79]; therefore, the implementation of AD technology can help improve the energetic status of RJ. Emissions of up to 439 thousand Mg CO_{2eq} could be avoided if gasoline was replaced by the estimated biomethane produced from the studied biowaste streams as vehicle fuel. A total of 332 thousand Mg CO_{2eq} would be avoided if natural gas was replaced. In this study, only passenger vehicles were considered, and further opportunities for GHG reduction exist if biomethane was used in heavy transportation.

If biogas is used to generate electricity, the emission of 275 thousand Mg CO_{2eq} could be avoided based on the Brazilian electricity mix. If the

RJ electricity mix were to be considered, this impact would be even higher due to the higher dependency of the state on nonrenewable sources (Fig. S2B). However, it is important to emphasize that anaerobic digester energy and GHG emissions can differ depending on the input substrates and end-use applications [80], which could change the value of the calculated avoided emissions.

Due to its higher biomethane potential, CAM is the region that could have the largest avoided GHG emissions, with 104, 167 and 126 thousand Mg CO_{2eq} avoided when biomethane is used to substitute electricity, gasoline, and natural gas, respectively (Fig. S3). Conversely, the MRC region has the lowest reduction potential, with less than 54 thousand Mg CO_{2eq} avoided for these applications. RJA, which is the most urbanized region, could achieve up to 99 thousand Mg CO_{2eq} avoided.

3.5. Current legal framework

In Brazil, in addition to legislation regulating biogas production and its subsequent commercialization and consumption, there are also policies to encourage or enforce the use of renewable energy sources (Table S3). One of the most important policies in the biogas scenario is the National Biofuels Policy (RenovaBio - law 13,576/2017). It aims to promote the increase of biofuel contribution in the energy matrix, with an emphasis on energy security and efficiency, predictability in the fuel market and reduction of GHG emissions at all stages.

The Brazilian Electricity Regulatory Agency (ANEEL) provides tax reductions for power plants that use biodigestion (Normative Resolution 77/2004) and allows that the energy generated from renewable sources to be used by producers or be distributed in the local electricity grid (Normative Resolution 482/2012). Additionally, ANP sets standards for quality control and specifications for biomethane destined for vehicular use and use in residential, industrial, and commercial installations to be sold throughout Brazil (Normative Resolution 685/2017, Resolution 08/2015). This allowed the first authorization for commercialization of biomethane from landfills in the state (ANP Dispatch 1,084/2017).

In RJ, there is also a legal framework that could influence the development of the biogas sector, with the aim being to increase energy generation from renewable sources (Decree 41,318/2008, Law 5,690/2010, Resolution 65/2012, Law 6,361/2012, Decree 46,476/2018). However, many of the goals have not yet been executed or evaluated. The State Policy of Renewable Gas should be highlighted, as it encourages the production and consumption of biomethane in RJ and states that gas distributors must replace 10 % natural gas with biomethane when available. However, it also establishes a maximum price for biomethane sale to natural gas distribution companies, which is often not advantageous for biomethane producers, who currently choose to sell biomethane directly to the final consumer.

Despite the number of policies in place that encourage the production and use of renewable energy, few are focused on biogas and other AD products. This clearly indicates that a governmental agenda focused on legal, political, and regulatory challenges is necessary to allow for the development of AD technology in Brazil [81].

3.6. Challenges for biogas production in the state of Rio de Janeiro and comparison with other regions

Despite the importance of RJ to the national economy, the state has only 10 (out of 755) biogas plants under operation, that are responsible for approximately 17% of the biogas in Brazil [47]. Our estimates, however, indicate that RJ alone could approach the current biogas production of the entire Southeast region (1.42 billion Nm³) [47]. This region, which comprises RJ, São Paulo, Minas Gerais and Espírito Santo, is responsible for 60% of the current national production, with São Paulo being the largest regional and national producer. Despite the fact that 84% of the biogas plants in the Southeast region belong to the agricultural and livestock sectors, and the enormous biogas potential of cattle

manure in RJ, no biogas plant in the state currently treats these feedstocks. A previous assessment of the biomethane potential in the state of São Paulo [82], estimated a potential production of 2,992 million m^3 year⁻¹, which is 3.5 times higher than the estimated potential in our maximum scenario. This difference was expected, since São Paulo has a much larger population and more expressive agricultural activity [13, 24,83]. Similar to our findings, the estimation was significantly higher than the current biogas production in the state.

In spite of all this potential, hindrances to expansion are manifold. They include a low level of knowledge about biogas and the use of cheaper and less technologically challenging options (e.g., composting), a mismatch in funding opportunities and financial requirements for biogas projects, poor interactions among actors, and high variability in geography and types of feedstocks, which collide with a highly centralized policy development, and the lack of a national biogas agenda [84–86]. Many of the specific barriers for biogas development noted in the present study, such as poor collection and segregation of waste, long digestate transportation distances, and lack of political support are also present in other Latin American and developing countries [87].

We compared our estimates with some recently published biomethane potential data from the world's leading producers of sugarcane and cattle manure and/or upper middle-income level countries with considerable agriculture production. Large variation in biomethane potential between regions or states is, for instance, also observed in India, China, Thailand and Turkey [88–91]. In our study, the largest potential comes from CAM mostly due to a combined potential of cattle manure and sugarcane processing waste (Figs. 1 and 2) with estimates that are comparable to those from regions with low to moderate potentials from animal and agricultural residues in Turkey (52–472 million Nm^3 year⁻¹) [90], India (150–600 million Nm^3 year⁻¹) [88]; Thailand (<819 million Nm^3 year⁻¹) [91] or in the Hubei Province in China (<494 million Nm^3 year⁻¹) [89]. Although Brazil is the world's largest producer of sugarcane and one of the largest cattle producers, production in RJ is not as expressive. For instance, while the Southeast region is responsible for 63% of the sugarcane produced in Brazil, the contribution of RJ is only 0.3% [33].

The International Energy Agency [92] reported the potential for biogas generation throughout the world. While Europe generates more than twice the biogas of China, which is the second largest producer, Asia, Central and South America have much higher potential than Europe. Successful biogas production has been shaped by the application of policies and incentives to realize existing potential. Therefore, developing countries located in Asia, and in Central and South America have much scope for increasing biogas production, if adequately supported. Accordingly, assessing the potential in these regions is the first step to promote a discussion of the development of AD.

Regarding biogas end utilization, almost two-thirds of the global biogas generated in 2018 was used for electricity and heat generation, with only a small share upgraded to biomethane [92]. One reason for this is a gap between natural gas and biomethane prices in Central and South America. Biomethane production from landfill gas upgrading is typically the least expensive option.

Northern Europe has the largest proportion of renewable energy within Europe, with most of it coming from bioenergy generation [93], and can be used as an example of successful implementation of bioenergy. In Germany, which is the largest biogas producer in the region, 92% of biogas comes from agricultural plants [93]. This highlights that the development of biogas solutions in rural areas may be an important driving force in establishing a strong biogas sector. The benefits go beyond bioenergy and biofuel production, and the abatement of GHG emissions, with clear positive outcomes regarding employment and development of rural areas and an increase in energy security [93,94].

4. Conclusion

This study showed substantial potential for biogas generation from

different biowastes in RJ, especially via AD of cattle manure, which was the substrate with the highest estimated potential. Potential biomethane generation from the assessed biowaste streams was at least three and up to seven times greater than the current production in RJ and would be able to considerably offset the cooking gas, natural gas, or electricity demands of the state. The presence of a gas distribution grid throughout the state could be an important factor promoting the utilization of the produced biomethane as a substitute for natural gas. Furthermore, the biofertilizer potential would be enough to supply the nutrient demand for agriculture in the state, even in the most conservative scenario, and the digestate could be valorized in other ways. To date, the existing legal framework does not consider the specificities of the biogas industry, and policy implementation needs to be improved.

CRedit authorship contribution statement

Helena Rodrigues Oliveira: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Betina Kozłowsky-Suzuki:** Writing – original draft, Conceptualization, Writing – review & editing. **Annika Björn:** Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. **Sepehr Shakeri Yekta:** Supervision, Writing – review & editing. **Cristiane Fonseca Caetano:** Writing – review & editing. **Érika Flávia Machado Pinheiro:** Writing – review & editing. **Humberto Marotta:** Writing – review & editing. **João Paulo Bassin:** Writing – review & editing. **Luciano Oliveira:** Writing – review & editing. **Marcelo de Miranda Reis:** Writing – review & editing. **Mario Sérgio Schultz:** Writing – review & editing. **Norberto Mangiavacchi:** Writing – review & editing. **Viridiana Santana Ferreira-Leitão:** Writing – review & editing. **Daniel Oluwagbotemi Fasheun:** Methodology, Investigation. **Fernanda Geraldo Silva:** Methodology, Investigation. **Igor Taveira:** Methodology, Investigation. **Ingrid Roberta de França Soares Alves:** Methodology, Investigation. **Júlia Castro:** Methodology, Investigation. **Juliana Velloso Durão:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Juliana Guimarães:** Methodology, Investigation. **Mariana Erthal Rocha:** Methodology, Investigation. **Marina Tomasinini:** Methodology, Investigation. **Pedro Vitor de Oliveira Martins:** Methodology, Investigation. **Rogério Presciliano:** Methodology, Investigation. **Stella Buback dos Santos:** Methodology, Investigation. **Tamires Marques Faria:** Methodology, Investigation. **Tarcísio Corrêa:** Methodology, Investigation. **Thiago de Nuno Mendes Pery de Linde:** Methodology, Investigation. **Fernanda Abreu:** Supervision, Writing – review & editing, Visualization, Writing – review & editing. **Alex Enrich-Prast:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was developed during the course “Biogas and biofertilizer production” coordinated by Linköping University, Sweden, and the authors thank the Graduate Program in Biological Sciences (Neotropical Biodiversity) - PPGBio at Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) for hosting the course. The study received financial support from Vinnova (project number 2019–05382) by the Swedish Energy Agency [Grant number: 35624-2] conducted within the Biogas Research Solution Center hosted by Linköping University, Sweden and by the funding agency Formas [Grant number: 2021-02429]. The authors also thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

- [54] L.T. Fuess, M.L. Garcia, Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation, *J. Environ. Manag.* 145 (2014) 210–229, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003>.
- [55] J.C. Delvaux, R. Carmargo, R.M.Q. Lana, M.H.R. Franco, M.C. Stanger, R. A. Gonçalves, E.M. Lemes, P.S.B. Miguel, Soil quality bioindicators in initial eucalyptus growth under organomineral fertilization based on sugarcane filter cake, *Aust. J. Crop. Sci.* 15 (2021) 602–609, <https://doi.org/10.21475/ajcs.21.15.04.p3071>.
- [56] M. Parsaee, M. Kiani Deh Kiani, K. Karimi, A review of biogas production from sugarcane vinasse, *Biomass Bioenergy* 122 (2019) 117–125, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>.
- [57] M. Logan, C. Visvanathan, Management strategies for anaerobic digestate of organic fraction of municipal solid waste: current status and future prospects, *Waste Manag. Res.* 37 (2019) 27–39, <https://doi.org/10.1177/0734242X18816793>.
- [58] Brasil, Plano Nacional de Resíduos Sólidos, 2020. Brasília, <http://consultaspublica.smma.gov.br/planares/wp-content/uploads/2020/07/Plano-Nacional-de-Residuo-s-Solidos-Consulta-Publica.pdf>.
- [59] Rio de Janeiro, PMGIRS - Plano Municipal de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos da Cidade do Rio de Janeiro, 2017. Rio de Janeiro, <http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/3372233/4123401/PMGIRS.pdf>.
- [60] H. Roubík, J. Mazancová, Small-scale biogas plants in central Vietnam and biogas appliances with a focus on a flue gas analysis of biogas cook stoves, *Renew. Energy* 131 (2019) 1138–1145, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.054>.
- [61] S.P. Lohani, B. Dhungana, H. Horn, D. Khatiwada, Small-scale biogas technology and clean cooking fuel: assessing the potential and links with SDGs in low-income countries – a case study of Nepal, *Sustain. Energy Technol. Assessments* 46 (2021), 101301, <https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101301>.
- [62] Sindigas, GLP EM MOVIMENTO: PANORAMA DO SETOR DE GLP EM MOVIMENTO Janeiro 2021-44^a Edição, 2021. https://www.sindigas.org.br/Download/PANORAMAS/NOVO_GLP_EM_MOVIMENTO_JANEIRO_2021_Rev5.pdf. (Accessed 20 July 2022).
- [63] Bp, Approximate Conversion Factors - Statistical Review of World Energy, 2021, <https://doi.org/10.1016/b978-075067856-8/50028-1>.
- [64] Naturgy, Informe Anual Integrado 2019 - CEG Rio, 2019. <http://www.grupobimbo.com/informe/Bimbo-Informe-Anual-2011/descargas/Grupo-Bimbo-Informe-Anual-Integrado-2011.pdf>.
- [65] Naturgy, Informe Anual Integrado 2019 - CEG, 2019. <http://www.grupobimbo.com/informe/Bimbo-Informe-Anual-2011/descargas/Grupo-Bimbo-Informe-Anual-Integrado-2011.pdf>.
- [66] B. Morero, R. Vicentin, E.A. Campanella, Assessment of biogas production in Argentina from co-digestion of sludge and municipal solid waste, *Waste Manag.* 61 (2017) 195–205, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.033>.
- [67] G. Kor-Bicakci, C. Eskicioglu, Recent developments on thermal municipal sludge pretreatment technologies for enhanced anaerobic digestion, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 110 (2019) 423–443, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.002>.
- [68] EPE, 2020 Statistical Yearbook of Electricity: 2019 Baseline Year, 2020. <https://www.epe.gov.br/pt%0A>. <http://www.epe.gov.br>.
- [69] C.F. Matos, J.L. Paes, É.F.M. Pinheiro, D.V.B. de Campos, Biogas production from dairy cattle manure, under organic and conventional production systems, *J. Brazilian Assoc. Agric. Eng.* 37 (2017) 1081–1090.
- [70] A.H.M. De Abreu, P.S.D.S. Leles, J.M. Alonso, E.L.D.S. Abel, R.R. De Oliveira, Characterization of sewage sludge generated in Rio de Janeiro, Brazil, and perspectives for agricultural recycling, *Semin. Agrar.* 38 (2017) 2433–2448, <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4Sup1p2433>.
- [71] A.L. Ferreira, Pesquisa revela vocação do norte fluminense para o plantio de grãos, *Embrapa*, 2021. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/64381034/pesquisa-revela-vocacao-do-norte-fluminense-para-o-plantio-de-graos>. (Accessed 25 May 2022).
- [72] NPCT, Fertilizantes, 2017. <https://www.npct.com.br/npctweb/npct.nsf/article/BRS-3132#consumo>. (Accessed 5 July 2021).
- [73] K. Timonen, T. Sinkko, S. Luostarinen, E. Tampio, K. Joensuu, LCA of anaerobic digestion: emission allocation for energy and digestate, *J. Clean. Prod.* 235 (2019) 1567–1579, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.085>.
- [74] T. Campos, G. Chaer, P. dos S. Leles, M. Silva, F. Santos, Leaching of heavy metals in soils conditioned with biosolids from sewage sludge, *Floresta e Ambiente* 26 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1590/2179-8087.039918>.
- [75] F. Guilayn, M. Rouez, M. Crest, D. Patureau, J. Jimenez, Valorization of digestates from urban or centralized biogas plants: a critical review, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19 (2020) 419–462, <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09531-3>.
- [76] C. Le Maréchal, C. Druilhe, E. Repérant, E. Boscher, S. Rouxel, S. Le Roux, T. Požévara, C. Ziebal, C. Houdayer, B. Nagard, F. Barbut, A.M. Pourcher, M. Denis, Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants, *Microbiol.* 8 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1002/mb3.872>.
- [77] EPE, Brazilian Energy Balance 2021 Year 2020, 2021. Rio de Janeiro, <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-o-nacional-ben>.
- [78] E.M.M. Esteves, A.M.N. Herrera, V.P.P. Esteves, C. do R.V. Morgado, Life cycle assessment of manure biogas production: a review, *J. Clean. Prod.* 219 (2019) 411–423, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.091>.
- [79] N.I.H.A. Aziz, M.M. Hanafiah, S.H. Gheewala, A review on life cycle assessment of biogas production: challenges and future perspectives in Malaysia, *Biomass Bioenergy* 122 (2019) 361–374, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.047>.
- [80] W.G. Mezzullo, M.C. Mcmanus, G.P. Hammond, Life cycle assessment of a small-scale anaerobic digestion plant from cattle waste, *Appl. Energy* 102 (2013) 657–664, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.008>.
- [81] M.C.P.P. Mathias, J.F.C.M. Mathias, Biogas in Brazil: a governmental agenda, *J. Energy Power Eng.* 9 (2015), <https://doi.org/10.17265/1934-8975/2015.01.001>.
- [82] C.L. Joppert, V.P. Garcilasso, M.M. Santos, A.S. Pereira, D. Perecin, M. Poveda, S. T. Coelho, The perspectives of biomethane to contribute to increase the natural gas supply in the state of São Paulo, *Eur. Biomass Conf. Exhib. Proc.* (2018) 1503–1511, <https://doi.org/10.5071/26thEUBCE2018-SBV.3.10>.
- [83] IBGE, Produção Agrícola Municipal, 2019. <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. (Accessed 20 October 2020).
- [84] Brazil Energy Programme – BEP (Brazil), Biogas in Brazil: Barriers and Recommendations for Sector Development, São Paulo, 2021. <https://i17.eco.br/wp-content/uploads/2022/11/RT01-2021.pdf>.
- [85] L.G.S. de Oliveira, Informing Systemic Policies to Promote Emerging Technologies: Fostering the Brazilian Biogas Innovation System, Utrecht University, 2022. <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/416882%0A>. <https://dspace.library.uu.nl/bitstream/handle/1874/416882/informing-systemic-policies-to-promote-emerging-technologies-fostering-the-bra-62746fc934deb.pdf?sequence=1>.
- [86] W. Kanda, H. Zanatta, T. Magnusson, O. Hjelm, M. Larsson, Policy coherence in a fragmented context: the case of biogas systems in Brazil, *Energy Res. Social Sci.* 87 (2022), 102454, <https://doi.org/10.1016/j.erss.2021.102454>.
- [87] T. Nevzorova, V. Kutcherov, Barriers to the wider implementation of biogas as a source of energy: a state-of-the-art review, *Energy Strategy Rev.* 26 (2019), 100414, <https://doi.org/10.1016/j.esr.2019.100414>.
- [88] P. Singh, A.S. Kalamdhad, A comprehensive assessment of state-wise biogas potential and its utilization in India, *Biomass Convers. Biorefinery.* 13 (2023) 12557–12579, <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02001-y>.
- [89] T. Liu, G. Ferrari, A. Pezzuolo, A. Alengebawy, K. Jin, G. Yang, Q. Li, P. Ai, Evaluation and analysis of biogas potential from agricultural waste in Hubei Province, China, *Agric. Syst.* 205 (2023), 103577, <https://doi.org/10.1016/j.agry.2022.103577>.
- [90] M.V. Aksay, A. Tabak, Mapping of biogas potential of animal and agricultural wastes in Turkey, *Biomass Convers. Biorefinery.* 12 (2022) 5345–5362, <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02538-6>.
- [91] W. Wang, K. Porninta, P. Aggarangsi, N. Leksawasdi, L. Li, X. Chen, X. Zhuang, Z. Yuan, W. Qi, Bioenergy development in Thailand based on the potential estimation from crop residues and livestock manures, *Biomass Bioenergy* 144 (2021), 105914, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105914>.
- [92] IEA, Outlook for biogas and biomethane, Prospects for Organic Growth, 2020.
- [93] M.J. Stolarski, K. Warmiński, M. Krzyżaniak, E. Olba-Zięty, M. Akinca, Bioenergy technologies and biomass potential vary in Northern European countries, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 133 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110238>.
- [94] G. Ślusarz, D. Twaróg, B. Gołębiowska, M. Cierpiał-Wolan, J. Gołębiwski, P. Plutecki, The role of biogas potential in building the energy independence of the three seas initiative countries, *Energies* 16 (2023), <https://doi.org/10.3390/en16031366>.