

Palloma Rodrigues de Lima

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA
LISOZIMA DA CLARA DE OVO SUBMETIDA AO
TRATAMENTO COM CAMPO MAGNÉTICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lima, Palloma

Avaliação da atividade e estabilidade da lisozima da clara de ovo submetida ao tratamento com campo magnético / Palloma Lima ; orientador, Marco Di Luccio ; coorientador, José Vladimir - SC, 2017. 80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Engenharia de Alimentos. 3. Campo Magnético. 4. Lisozima da Clara do Ovo. 5. Atividade enzimática . I. Di Luccio, Marco . II. Vladimir, José . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA
LISOZIMA DA CLARA DE OVO SUBMETIDA AO
TRATAMENTO COM CAMPO MAGNÉTICO”**

Por

Palloma Rodrigues de Lima

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Orientador

Profa. Dr. José Vladimír
Coorientador

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Profa. Dra. Manuela Balen

Profa. Dra. Débora de Oliveira

Prof. Dr. Léo Serpa

Florianópolis, 1 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Em tudo agradeço a Deus, pois em todo momento me deu forças e nunca me desamparou.

À minha família por me apoiar, em especial à minha Vozinha linda e gordinha, Francisca, que mesmo em meio a distância geográfica sempre me acalmou, me deu ânimo e muito colo.

Aos meus orientadores: Marco Di Luccio e José Vladimir de Oliveira por toda a ajuda na realização deste trabalho, pela confiança depositada, por compartilharem de seus conhecimentos, por toda a imensa paciência, amizade e sabedoria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos e à Universidade Federal de Santa Catarina, bem como aos laboratórios CEBIME, CERMAT, LCP e LABMASSA.

À Capes pelo financiamento à pesquisa.

A toda equipe LABSEM, pelos momentos mais que agradáveis, incluindo trabalho, comidinhas, risadas e choros, em especial a Lídia por me ensinar grande parte do que sei hoje e por toda sua paciência e dedicação e ao Wantie, Cristiana e Katia pela amizade.

Às famílias Chagas e Mitt, em especial a Tia Magda e a Verônica que me adotaram em amor, à minha igreja SIBILHA, em especial aos meus amigos Brayan, Kettuly e Yasmin pelo conforto nos momentos mais difíceis e por confiarem em mim, e aos meus grandes amigos Hugo, Manim e Cibele, sem esquecer é claro da Lulupita, que sempre esteve presente em todos os puxões de orelha.

À Geisiane, pelos ensinamentos de sabedoria.

E a todos, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, sempre confiando em mim.

*“O amigo ama sempre, mas é na adversidade que ele se
torna um irmão”
Provérbios 17:17*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Disposição dos polos magnéticos em sentidos opostos (a) disposição dos polos magnéticos no mesmo sentido (b)	25
Figura 2	Equipamento para a eletroforese composto por dois itens: fonte de tensão e uma unidade de eletroforese	27
Figura 3	Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido (Adaptado de Espectroscopia, 2015).....	28
Figura 4	Curva de variação do potencial zeta com o pH (Adaptado de Malvern, 2012).....	30
Figura 5	Esquema de medição do LUMiSizer.....	31
Figura 6	Fluxograma simplificado do processo experimental...	32
Figura 7	- Amostra controle de solução de lisozima (a) Ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro (Nd ₂ Fe ₁₄ B) com densidade de fluxo de 0,71 T (b) Arranjo de Halbach com densidade de fluxo de 1,34 T (c).....	34
Figura 8	Diagrama esquemático da unidade experimental de ultrafiltração (Adaptado de ZIN, 2014).....	40
Figura 9	Diagrama de Pareto com os efeitos estimados para a atividade específica residual da lisozima ($p < 0,1$) em função do pH, densidade de fluxo magnético e força iônica.....	46
Figura 10	Diagrama de Pareto com os efeitos estimados para a atividade específica residual da lisozima ($p < 0,1$) em função do pH e força iônica para o planejamento 22	49
Figura 11	Perfil eletroforético da lisozima em gel de poli(acrilamida) – SDS.....	54
Figura 12	- Análise DC para: lisozima nativa (0 T); lisozima nativa (1,34 T); lisozima no pH de 13,7 e submetida a um campo magnético de 1,34 T, e lisozima no pH 13,7, sem ser submetida a campo magnético (0 T).	56
Figura 13	Perfil de estabilidade da lisozima não tratada, tratada com campo magnético com densidade de fluxo magnético 0,7 T, e 1,34 T, nas condições de pH 13,7	58

e força iônica de 50 mmol/L, armazenada a temperatura de 25 ± 2°C.....

Figura 14	Perfil de estabilidade da lisozima não tratada, tratada com campo magnético com densidade de fluxo magnético 0,7 T, e 1,34 T, nas condições de pH 13,7 e força iônica de 50 mmol/L, armazenada a temperatura de 4 ± 2°C.....	59
Figura 15	Distribuição do tamanho de Partícula em função do pH, densidade de fluxo magnético e força iônica: (a) força iônica de 0 mmol/L, (b) 25 mmol/Le (c) 50 mmol/L.....	61
Figura 16	Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica residual A.E.R. (%) da lisozima em função da força iônica (mM) e da densidade de fluxo magnético (T).....	72
Figura 17	Análise DC para: lisozima nativa (0,15 T); lisozima nativa (0 T); lisozima no pH de 13,7 e submetida a um campo magnético de 0,15 T.....	73
Figura 18	Análise DC para: lisozima nativa (0,15 T); lisozima nativa (0 T); lisozima no pH de 13,7 e submetida a um campo magnético de 0,15 T.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Campo magnético aplicado a sistemas biológicos	
Tabela 2 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 (com triplicata no ponto central) para o tratamento magnético.....	35
Tabela 3 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 (com triplicata no ponto central)	36
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com as respostas de atividade específica residual.....	43
Tabela 5 - Planejamento fatorial 2^2 e as respostas para atividade específica residual (%)	44
Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para atividade específica relativa (%) da lisozima para o planejamento 2^3	47
Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) para atividade específica residual (%) da lisozima para o planejamento 2^2	48
Tabela 8 - Respostas de atividade enzimática (kU/mg) da lisozima para o tratamento magnético em ímã invertido (0,15 T).....	50
Tabela 9 - Respostas de atividade enzimática (kU/mg) da lisozima para o tratamento magnético com recirculação em ímã de 1,34 T.....	52
Tabela 10 - Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento 2^3 para atividade específica residual da lisozima	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 ENZIMAS	14
3.1.1 Lisozima	15
3.1.1.1 Aplicações	16
3.2 TRATAMENTOS DE ENZIMAS	17
3.3 CAMPOS MAGNÉTICOS	17
3.3.1 Conceitos básicos	18
3.3.2 Polos invertidos	25
3.4 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO	26
3.4.1 Dicroísmos circular	26
3.4.2 Eletroforese	26
3.4.3 Potencial zeta da solução	28
3.4.4 Estabilidade	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAIS	33
4.1.1 Lisozima	33
4.1.2 Aparato experimental	33
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Procedimentos experimental	35
4.2.2 Determinação da atividade enzimática da lisozima	36
4.2.3 Atividade específica residual	37

4.2.4 Avaliações da estabilidade da atividade enzimática da lisozima	37
4.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO	37
4.3.1 Eletroforese	38
4.3.2 Dicroísmo circular (DC)	38
4.3.3 Determinação do potencial zeta	39
4.4 RECIRCULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LISOZIMA.....	39
4.4.1 Aparato experimental.....	39
4.4.2 Procedimento experimental.....	40
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM CAMPO MAGNÉTICO ...	42
5.1.1 Efeito do campo magnético estático e das condições operacionais na atividade da lisozima.....	42
5.1.1.1 <i>Análises estatística dos planejamentos para a atividade específica residual</i>	46
5.1.2 Efeito da orientação dos polos magnéticos na atividade da lisozima	50
5.1.3 Efeito da forma de exposição ao campo magnético na atividade da lisozima	52
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA LISOZIMA.....	53
5.2.1 Eletroforese	53
5.2.2 Dicroísmo Circular.....	54

5.2.3	Efeito do campo magnético na estabilidade da atividade enzimática.....	56
5.2.4	Tamanho de partícula da lisozima	59
6	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A.....	71
	ANEXO B.....	72
	ANEXO C.....	74

RESUMO

As enzimas, são catalisadores biológicos de várias reações bioquímicas por possuírem natureza principalmente proteica e apresentam uma grande especificidade pelo substrato. A lisozima é de particular interesse para o uso em sistemas alimentares, uma vez que é uma enzima que ocorre naturalmente com atividade antimicrobiana, possui ampla disponibilidade e um conhecimento detalhado de suas propriedades, moleculares, incluindo sequência e estrutura. Tratamento de enzimas com base em mudanças de temperatura e pressão, aplicação de ultrassom e de pulsos elétricos podem ser responsáveis por modificações nas suas propriedades e o resultado dessa mudança geralmente é um impedimento ou dificuldade de fixação do substrato na enzima. A aplicação de campos magnéticos, uma tecnologia de simples operação, baixo custo e mínimo impacto ambiental, vem sendo testado como meio de intensificar processos enzimáticos, uma vez que trabalhos na literatura relatam um aumento da atividade e estabilidade de certas enzimas tratadas por campos magnéticos. No entanto, estes trabalhos ainda são escassos e limitados, contemplando poucas enzimas, sendo que a maioria avalia apenas a atividade catalítica da enzima alvo sem estudar os mecanismos de ação do campo magnético e as possíveis alterações estruturais após o tratamento. Neste contexto, nesse trabalho teve-se por objetivo avaliar o efeito do campo magnético e das condições operacionais na atividade catalítica da lisozima da clara de ovo, uma proteína bastante utilizada como modelo pela ampla disponibilidade e conhecimento detalhado sobre sua estrutura nativa. Foram avaliados os efeitos do pH, força iônica e densidade de fluxo magnético sobre a atividade catalítica desta enzima. O pH e o campo magnético apresentaram efeito significativo sobre a atividade da lisozima, sendo que, o uso do pH na faixa alcalina mais extrema (13,7) e de campo magnético de maior densidade de fluxo magnético (1,34 T) permitiram uma atividade específica residual de 212%, ou seja, um incremento de três vezes a atividade específica da enzima. Os resultados sugerem que a ativação de lisozima causada pelo tratamento magnético pode estar relacionada com as alterações no teor de α -hélice na estrutura secundária, e com o incremento do tamanho de partícula médio, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. As modificações do estado natural da lisozima, função do pH e força iônica nas soluções, resultaram num aumento do tamanho de partícula médio e pequenas alterações do potencial zeta.

Palavras-chave: lisozima de clara de ovo, campo magnético, atividade enzimática, dicroísmo circular.

ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts involved in many biochemical reactions due mainly to their protein nature and because they present a great specificity for the substrate. The lysozyme is of particular interest for the use in food systems, once it is an enzyme with antimicrobial activity, it possesses a wide availability and detailed knowledge of its molecular properties, including sequence and structure. Enzymes treatment involving temperature and pressure changes, applications of ultrasound and electrical pulses can be responsible for modifications in its properties and the result of such changes are usually associated with stereo impediment or difficulty in substrate - enzyme interaction. The application of magnetic fields, a technology of simple operation, low cost and minimal environmental impact, is being tested as a way to intensify enzymatic processes, since literature reports an increase in activity and stability of certain enzymes treated by magnetic fields. However, these papers are still scarce and limited, contemplating few enzymes, and the majority evaluates only the catalytic activity of the target enzyme without studying the mechanisms of action and the possible structural changes after the treatment. In this context, this work aims to evaluate the effects of the magnetic field and the operational conditions on the catalytic activity of the egg white lysozyme, a protein very used as a model for its wide availability and detailed knowledge about its native structure. The pH and the magnetic field showed a significant effect on lysozyme activity at the highest pH value for the most strongly alkaline range (13.7) and a magnetic field with the highest magnetic flux density (1.34 T) allowed to achieve a residual specific activity of 212%, i.e. an increase of three times the original specific activity of the enzyme. The results suggest that the activation of lysozyme caused by the magnetic treatment may be related to the changes of the α -helix content in the secondary structure, and with the average particle size increase, facilitating the substrate access to the enzyme active site. As changes in the natural state of lysozyme pH function and the ionic strength in the solutions resulted in an increase of the average particle size and small changes on the zeta potential.

Keywords: egg white lysozyme, magnetic field, enzymatic activity, circular dichroism.

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de campo magnético em soluções proteicas vem sendo largamente estudada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Processos de Separação com Membranas da Universidade Federal de Santa Catarina (LABSEM). O campo magnético além de conferir uma melhora em diversos processos, apresenta vantagens como o baixo custo, facilidade de operação e o reduzido impacto ambiental.

Os trabalhos do grupo iniciaram após uma detalhada pesquisa da literatura com relação ao tratamento magnético de água e de sais inorgânicos, que mostra que o campo magnético age nas interações intermoleculares reduzindo a deposição de sais sobre a superfície de membranas.

Vardanega et al. (2013), Silva et al. (2015) e Zin et al. (2016) iniciaram os estudos do grupo aplicando campos magnéticos na UF de albumina de soro bovino (BSA). No entanto, apesar dos resultados promissores na recuperação do fluxo de permeado de BSA após tratamento magnético, sente-se a necessidade de investigar se esse efeito é extensivo a outras proteínas e de avaliar se o campo magnético acarreta alterações estruturais nestas, além das alterações físico-químicas já relatadas.

Dentre as proteínas modelo disponíveis comercialmente, a lisozima da clara de ovo possui ampla disponibilidade e um conhecimento detalhado de suas propriedades moleculares incluindo sequência de aminoácidos e estrutura, o que facilita a realização de estudos comparativos com relação aos efeitos de um dado tratamento. Além disso, por se tratar de uma proteína com atividade antimicrobiana, a lisozima da clara de ovo apresenta diversas aplicações para a indústria de alimentos, dando uma maior relevância a realização de estudos com esta proteína.

Sabe-se que a atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade das enzimas é função direta da sua estrutura e que as propriedades das enzimas podem ser modificadas após aplicação de diferentes tratamentos. Considerando nesta questão, o primeiro passo a se estudar no efeito do campo magnético em uma enzima seria o de avaliação da sua atividade catalítica antes e após o tratamento.

No entanto, além dos trabalhos com aplicação de campo magnético em enzimas serem escassos e limitados, contemplando poucas enzimas, como a celulase (RAN et al., 2009), a α -amilase (LIU et al., 2010), a maioria avalia apenas a atividade catalítica da enzima alvo sem estudar os mecanismos de ação do campo magnético e as possíveis alterações estruturais após o tratamento.

Tendo todas essas lacunas em vista, e após testes preliminares do grupo mostrarem alterações na atividade catalítica da lisozima da clara de ovo tratada magneticamente, é interessante se voltar em um primeiro momento, a avaliação dos diferentes parâmetros do campo magnético e das condições operacionais que levam a alterações na atividade enzimática, estudar a estabilidade, parâmetros físico-químicos e estruturais da lisozima antes e após o tratamento magnético.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o efeito do campo magnético e das condições operacionais na atividade catalítica da lisozima da clara de ovo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito das variáveis: pH, concentração de NaCl e densidade de fluxo magnético, aplicando a técnica de planejamento experimental, na atividade catalítica da lisozima;
- b) Estudar o efeito da orientação dos polos magnéticos (N-N; N-S; S-S) na atividade catalítica da lisozima;
- c) Avaliar a forma de exposição ao campo magnético (estática ou com recirculação) na atividade catalítica da lisozima;
- d) Estudar o efeito do campo magnético no potencial zeta, estabilidade e estrutura secundária da lisozima.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção será apresentado um levantamento aprofundado da literatura envolvendo uma abordagem da lisozima e suas aplicações, bem como seus possíveis tratamentos, déficits e potencialidades, enfatizando que o campo magnético se mostra em ascensão frente aos demais, como é apresentado na Tabela 1, e logo após uma breve discorrido sobre as análises a serem feitas na solução de lisozima submetida ao campo magnético a título de investigar as mudanças sofridas na mesma.

3.1 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos participantes de várias reações bioquímicas. Possuem natureza principalmente proteica e apresentam uma grande especificidade pelo substrato (ARANTES, 2008; COELHO, 2008). A estrutura tridimensional das enzimas é responsável pela sua atividade catalítica, estabilidade assim como especificidade. São altamente sensíveis a variações de pH, temperatura, força iônica do meio, concentração dentre outros fatores. Portanto, o conhecimento desses parâmetros sobre a reação enzimática, permite explorar melhor as propriedades catalíticas (LIMA et al., 2001; GOMES et al., 2006).

As reações enzimáticas são fortemente dependentes de uma temperatura ótima, sendo que temperaturas abaixo ou acima desta faixa, inibem a atividade enzimática, sendo essencial o conhecimento da faixa de temperatura ótima para cada enzima, para a otimização dos processos envolvendo-as.

A concentração de H⁺ também tem relevância sob a velocidade das reações químicas, valores extremos de pH podem levar a desnaturação das enzimas. O valor de pH ótimo varia para diferentes enzimas, por exemplo, a pepsina digestiva do estômago, é ativada em pH 2, enquanto que outras enzimas, destinadas a funcionarem em pH neutro, são desnaturadas neste pH ácido (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

Por último, destaca-se a importância da força iônica que é uma das principais características determinadas pelos íons dissolvidos em uma solução, além de um parâmetro de suma importância que afeta a atividade da enzima, Bilal et al., (2016) levando esse dado em consideração, observaram a influência da força iônica sobre a atividade do manganês peroxidase purificada a partir de *Ganoderma lucidum* IBL-05 imobilizada

em apoio agar-agar utilizando a técnica de aprisionamento na faixa de 20 a 250 mM de NaCl, os autores observaram um aumento significativo de 74,3 % da atividade residual até a concentração de 100 mM.

3.1.1 Lisozima

A lisozima é de particular interesse para o uso em sistemas alimentares, uma vez que é uma enzima que ocorre naturalmente com atividade antimicrobiana (ZHAO; YANG, 2008), possui ampla disponibilidade e um conhecimento detalhado quanto às suas propriedades moleculares incluindo sequência e estrutura.

A lisozima extraída da clara do ovo de galinhas possui tamanho relativamente pequeno. Trata-se de uma enzima secretora capaz de atacar muitas bactérias por lise ou dissolvendo a estrutura da parede celular. É uma proteína globular que contém 129 aminoácidos, constituída principalmente por três componentes estruturais. O primeiro componente é constituído por três extensões de α -hélice, o segundo é uma folha pregueada anti-paralela e o terceiro consta de uma sequência dobrada de forma aleatória. Possui massa molecular igual a 14300 Da e ponto isoelétrico igual a 10,7 (TORREGGIANI et al., 2005).

Além de estar presente na clara de ovo, a lisozima é encontrada em outros organismos vivos, desde insetos e nematoides a répteis e mamíferos, incluindo vírus e plantas, bem como em variados tecidos e suas secreções, tais como lágrimas, saliva, leite, músculos e órgãos (ALTINTAŞ et al., 2007; BAŞAR et al., 2007; THAMMASIRIRAK et al., 2006).

Dentre os poucos agentes antimicrobianos naturais aprovados pelas agências reguladoras para uso em alimentos, a lisozima se destaca, detendo uma série de estudos realizados quanto à sua aplicação em alimentos e ao seu efeito antimicrobiano (BRANEN e DAVIDSON, 2004; CALLEWAERT et al., 2011; CHUNG; HANCOCK, 2000; GILL; HOLLEY, 2000; NATTRESS; YOST; BAKER, 2001; QUINTAVALLA; VICINI, 2002; PADGETT et al., 1998).

A atividade específica antimicrobiana da lisozima é sobre bactérias gram-positivas, provocando hidrólise nas ligações α -1,4 entre a N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico do peptidoglicano da parede celular. No entanto, quando combinada com o EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético), pode desestabilizar a membrana externa protetora ao redor da camada de peptidoglicano das bactérias gram-negativas, promovendo um campo ainda maior da ação antimicrobiana da

lisozima (PADGETT et al., 1998; BRANEN ; DAVIDSON, 2004; CONTE; BRESCIA; DEL NOBILE, 2011).

3.1.1.1 Aplicações

Nos últimos anos a indústria de alimentos vem se preocupando com a substituição de conservantes químicos em consideração a atual conscientização dos consumidores em relação ao seu bem-estar e saúde, visando isso, a indústria vem traçando estratégias e pesquisas para encontrar bioconservantes naturais, assim como as enzimas antimicrobianas.

Nesse cenário, as enzimas antimicrobianas apresentam diversas vantagens quanto aos conservantes químicos para emprego nas indústrias de alimentos, visto que apresentam uma rápida velocidade de reação, são atóxicas, geralmente necessitam de uma baixa concentração para converter o substrato em produto e atuam sobre um substrato específico (COELHO, 2008).

A alta estabilidade térmica da lisozima faz com que seja atraente para sua utilização como agente antimicrobiano em produtos alimentares pasteurizados e esterilizados, possibilitando um menor processamento térmico com conseqüente minimização da perda de qualidade nutricional e sensorial. A lisozima apresenta diversas aplicações contra importantes patógenos alimentares, incluindo clostrídios termofílicos, certas cepas de *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (MAKKI; DURANCE, 1996).

Na Europa, a lisozima é usada no processamento de queijos, como o famoso queijo burrata, original da região de Puglia, na Itália com o intuito de aumentar sua vida de prateleira (CONTE; BRESCIA; DEL NOBILE, 2011). No Japão, ela é usada para a preservação de vegetais, frutos do mar, massas e até saladas (DAVIDSON, 2001). Outra aplicação importante inclui sua adição em queijos tipo Grana Padano e em queijos processados (“Polenguinho”, por exemplo) para proteção contra organismos formadores de esporos (DEEGAN et al., 2006).

Há também vários estudos de utilização de lisozima para o controle da fermentação em vinhos bem como empregada no Japão para estender o tempo de prateleira do saquê (GERBAUX et al., 1997; SOFOS et al., 1998) ou em combinação com nisina ou EDTA para a preservação da carne e produtos cárneos, como presunto e mortadela (CHUNG;

HANCOCK, 2000; GILL; HOLLEY, 2000; NATTRESS; YOST; BAKER., 2001; GILL; HOLLEY, 2003). A lisozima quando adicionada em fórmulas de produtos infantis ou ao leite, promove o crescimento de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium bifidus* no intestino de crianças as quais podem prevenir o crescimento de bactérias nocivas (DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2005).

A incorporação da enzima em filmes plásticos ou comestíveis para a produção de embalagem antimicrobiana é outro uso potencial da lisozima, estudos têm abordado o uso da lisozima na produção de filmes antimicrobianos para materiais plásticos, bem como para filmes comestíveis e biodegradáveis (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; PADGETT; HAN; DAWSON., 1998; BUONOCORE et al., 2003).

3.2 TRATAMENTOS DE ENZIMAS

3.2 TRATAMENTOS DE ENZIMAS

Tratamento de enzimas com base em mudanças de temperatura e pressão, aplicação de ultrassom e de pulsos elétricos podem ser responsáveis por modificações de suas propriedades e o resultado dessa mudança, geralmente é um impedimento ou dificuldade de fixação do substrato na enzima, todavia, também pode resultar em um aumento na sua atividade catalítica, que é em função direta da sua estrutura terciária e quaternária (SCRIBAN, 1985; LEHNINGER et al., 1995).

Diversos estudos têm relatado a influência da alta pressão (MANERA et al., 2011; KUHN, et al., 2013), de pulsos elétricos e do ultrassom (SULLIVAN, et al., 2014; JAMBRAK et al., 2014) na estrutura de proteínas e na atividade catalítica de enzimas. E mais recentemente, tem havido um interesse considerável nos efeitos de campos magnéticos em sistemas biológicos.

A ligação entre o campo magnético e os seus efeitos sobre os organismos vivos ainda intriga muitos pesquisadores e carece de estudos. Alguns autores justificam a ação do campo magnético em relação à ocorrência de estresse oxidativo nos sistemas. No entanto, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura aborda simples descrições fenomenológicas, com pouco controle e sem tentativas de definir um mecanismo de ação do campo magnético (ROSEN, 2003).

3.3 CAMPOS MAGNÉTICOS

3.3.1 Conceitos básicos

Quando um material é colocado em um campo magnético intenso esse campo tende a alinhar os momentos de dipolo magnético (sejam permanentes ou induzidos) no interior do material e o material ficará magnetizado. O dipolo magnético guarda uma estreita analogia com o dipolo elétrico. Quando submete-se uma substância qualquer a um campo magnético, cada elétron que se move nos átomos ou moléculas da substância fica sujeito a uma força adicional. A perturbação no movimento de cada elétron é equivalente a uma velocidade adicional e, portanto, a uma mudança no seu momento de dipolo magnético orbital (TIPLER; MOSCA, 2009).

A suscetibilidade magnética é uma medida da força exercida pelo campo magnético sobre a unidade de massa do corpo. É uma característica intrínseca do material e está relacionada ao número de elétrons desemparelhados por unidade de massa.

A valorização deste novo processo deve ocorrer em vista do tratamento magnético tem as vantagens do uso conveniente, baixo custo de funcionamento, não-tóxico, sem poluição secundária, ampla gama de aplicações e fácil de ser blindado. Ao longo das últimas décadas, a influência do campo magnético estático em sistemas biológicos foi investigada em alguns organismos modelo (TU *et al.*, 2015).

O estudo da influência do campo magnético em enzimas ainda se encontra em um estado superficial frente à abrangência do assunto. Segundo Liu et al. (2010) nos últimos anos têm surgido trabalhos em relação ao tratamento magnético das enzimas peroxidase, catalase, oxidase e celulase. Contudo, nestes trabalhos são apresentadas diversas respostas inconclusivas, seja devido à falta de estudos quanto à ação do campo magnético na estrutura destas enzimas ou pela falta de padronização do tratamento magnético.

Na Tabela 1 são apresentados os principais estudos disponíveis em relação à aplicação de campos magnéticos em enzimas e proteínas. Analisando os trabalhos para o tratamento magnético de enzimas é possível observar que a atividade das enzimas, na grande maioria dos casos, é significativamente alterada e que as justificativas para ação do tratamento magnético são superficiais e divergentes.

Os trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa LABSEM, como resumidamente descritos nos primeiros pontos da tabela, sugerem uma introdução do projeto de aplicação do campo magnético a soluções

enzimáticas, no qual notou – se que o campo magnético de fato influi em um aumento da permeação na ultrafiltração em conjunto a uma mudança no pH.

Em sequência destacamos alguns outros artigos, que buscaram variar um pouco mais as intensidades do campo magnético, aplicado diretamente sobre a solução enzimática, e sim, obtiveram um significativo aumento da atividade enzimática, contudo não realizaram análises profundas a título de averiguar o que de fato ocorreu na estrutura de suas respectivas enzimas submetidas ao processo.

Tabela 1 - Campo magnético aplicado a sistemas biológicos

Estudo	Intensidade do CM	Análises	Resultados	Justificativa do fenômeno	Autor/Ano
Efeito do campo magnético sobre a ultrafiltração de albumina de soro bovino	0,41 T	- Análise de proteína em espectrofotômetro a 280 nm Fluxo de permeado	Aumento na recuperação do fluxo de permeado inicial da água chegando a 100 % de recuperação para os ensaios com membranas novas na presença do campo em pH 3,0 e no efeito de memória magnética em pH 4,6.	A solução de BSA adquire uma memória magnética	VARDANEGA et al. 2013
Efeito de campo magnético no desempenho da ultrafiltração de soluções proteicas utilizando membrana polimérica	0,7 T por 2 horas	- Análise em espectrofotômetro UV; - Fluxo de permeado	Alta recuperação da permeabilidade após tratamento magnético da solução de BSA nos pH 4,0 e 6,5 chegando a 81,0 % e 94,0 % de recuperação respectivamente	O campo magnético teve um efeito positivo tanto para o fluxo permeado quanto para a recuperação da permeabilidade	ZIN, 2014

Efeito de campo magnético sobre as características físico-químicas de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) e seu desempenho na ultrafiltração	0,7 T	- Determinação do pH - Condutividade - Potencial zeta	Nas análises físico-químicas realizadas não foram observadas alterações das propriedades de pH, condutividade, viscosidade e tensão superficial, à exceção do potencial zeta da solução de BSA.	Este comportamento do potencial zeta com o tempo de indução magnética mostra que a estabilidade das proteínas é afetada pela presença do campo.	SILVA, 2015
Efeitos do campo magnético estático sobre a atividade e estabilidade de α -amilase imobilizada em quitosana	0,15 T	- Análise em espectrofotômetro UV	Atividade aumentou 19,5 %; Estabilidade operacional e pH melhoraram após o tratamento.	Campo magnético reforçou as interações entre enzima e suporte.	LIU et al., 2010

<p>Efeitos do tratamento magnético no crescimento e na atividade da enzima de pepino do mar <i>Apostichopus japonicus</i> (Selenka)</p>	<p>0,5 T, 0,3 T, 0,1 T</p>	<p>- Análise em espectrofotômetro UV</p>	<p>Tratamento magnético teve um efeito positivo sobre o crescimento do pepino do mar e na atividade das enzimas digestivas</p>	<p>Efeito significativo sobre a atividade das proteases, sugerindo que o tratamento magnético aumenta a eficiência da digestão de proteínas;</p>	<p>TANG et al., 2015</p>
<p>Caracterização de celulase sob várias intensidades de campos magnéticos estáticos</p>	<p>0,15 T, 0,30 T, 0,45 T</p>	<p>- Análise em espectrofotômetro UV - Dicroísmo circular far-UV</p>	<p>Diminuição de aproximadamente 24% na atividade enzimática. Melhora da estabilidade na gama de pH 3,0-6,0.</p>	<p>A aplicação de campos magnéticos diminui as oscilações nas respostas de atividade durante o armazenamento da enzima</p>	<p>RAN et al., 2009</p>
<p>Efeitos do campo magnético na Atividade do Superóxido Dismutase</p>	<p>2,9-4,6 mT nos intervalos de 2,2, de 2,2, no campo magnético de 19,8 e 33s</p>	<p>- Análise em espectrofotômetro UV</p>	<p>Aumento da atividade em 21,2 %;</p>	<p>Campo magnético causou desemparelhamento Dos elétrons das enzimas</p>	<p>BÜYÜKUSLU, ÇELİK, ATAK 2006</p>

3.3.2 Polos invertidos

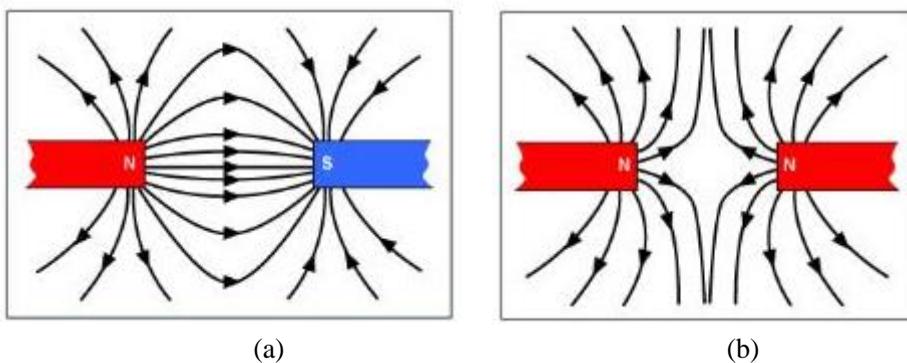
O campo de uma força é representado por linhas de campo, visualizando que em qualquer lugar do espaço, a força é tangencial à linha de campo e a intensidade da força é representada pelo número de linhas de campo por unidade de área da seção transversal (FILHO, 2016).

O ímã é constituído essencialmente por dois conjuntos de polo simetricamente opostos. Cada conjunto de polo consiste em um norte e um sul, e incorpora um caminho de retorno do fluxo. (MCGINLEY; RISTIC; YOUNG, 2016).

Aproximando-se o polo norte de um ímã ao polo sul de outro ímã, nota-se uma atração, medida pela forma magnética encontrada na região central, que no presente trabalho foi trabalhada em 0,7 T e 1,34 T, contudo quando os presentes ímãs são dispostos na mesma polaridade, os ímãs tendem a se repelir e a força tende a diminuir grandemente ou até mesmo zerar.

A partir da Figura 1, podemos enunciar esta lei da força magnética: polos da mesma natureza se repelem e de naturezas diferentes se atraem.

Figura 1 - Disposição dos polos magnéticos em sentidos opostos (a) disposição dos polos magnéticos no mesmo sentido (b)



3.4 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO

3.4.1 Dicroísmo circular (DC)

Desde a década de 1980, têm-se a necessidade crescente de se realizar estudos estruturais das enzimas sob as mesmas condições em que estas encontram naturalmente (condições nativas). Além disso, há bastante interesse em poder variar as condições do meio e o tratamento da enzima com um acompanhamento simultâneo das mudanças estruturais induzidas. Logo, a técnica de dicroísmo circular afirmou-se como uma técnica estrutural valiosa para direcionar esses ensaios.

A espectroscopia de DC se baseia na diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à esquerda e luz circularmente polarizada à direita, por uma amostra de proteína pura e solubilizada em solvente adequado. A análise de DC está intimamente relacionada à conformação da estrutura secundária das proteínas, indicando os teores de α -hélice e folhas- β destas (CITADINI, 2011).

Sendo assim, a presente técnica é de valor inestimável para estudos com proteínas, estas possuem centros assimétricos naturais como o carbono α e carbono β dos aminoácidos treonina e isoleucina. Tais ligações peptídicas absorvem energia entre 195 e 240 nm, particularmente, onde se encaixa a lisozima, bem como existem os aminoácidos aromáticos que absorvem na região de 260 e 320 nm.

Nesse aspecto, com o DC torna-se possível avaliar mudanças conformacionais, bem como obter - se uma estimativa do conteúdo da estrutura secundária, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm, região característica da lisozima (CITADINI, 2011).

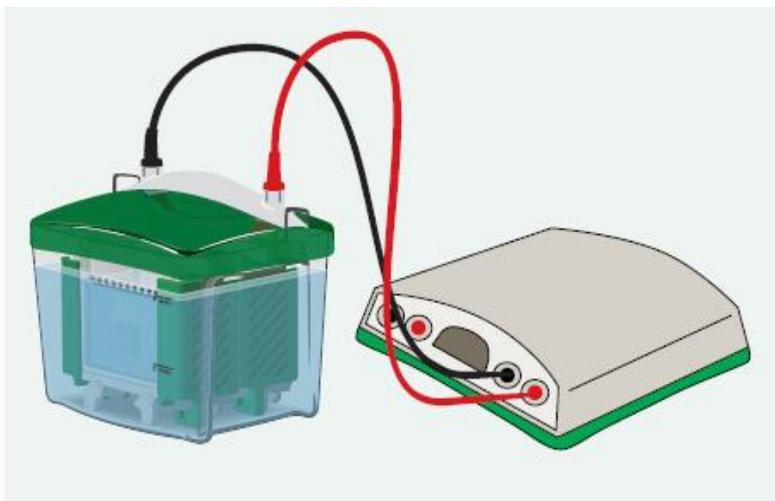
3.4.2 Eletroforese

O termo eletroforese descreve a migração de uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico. As biomoléculas, como aminoácidos, peptídeos, proteínas, nucleotídeos, e ácidos nucleicos, possuem grupos funcionais ionizáveis e, portanto, adquirem carga positiva ou negativa em um determinado valor de pH. Sendo assim, quando essas biomoléculas são submetidas a um campo elétrico, as

partículas carregadas irão migrar para o cátodo ou ânodo, dependendo de sua carga líquida.

O equipamento necessário para a eletroforese consiste basicamente de dois itens: uma fonte de tensão e uma unidade de eletroforese, essa unidade de eletroforese está disponível em duas formas, as quais permitem realizar migração na vertical ou na horizontal. O aparato mais comumente utilizado é mostrado na Figura 2 (WILSON; WALKER, 2010).

Figura 2 - Equipamento para a eletroforese composto por dois itens: fonte de tensão e uma unidade de eletroforese.

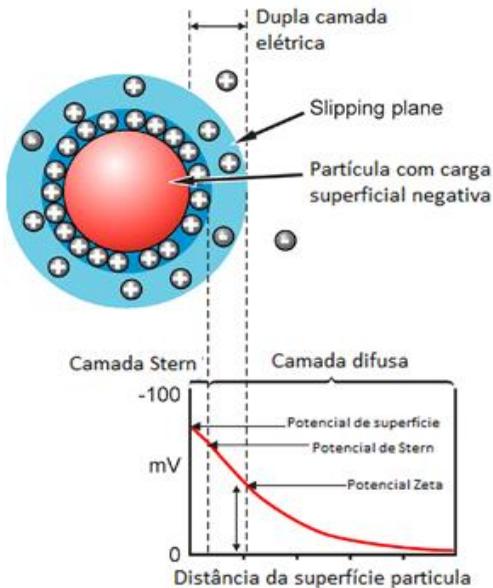


Dentre os géis e técnicas de eletroforese utilizados, o SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) é o método mais utilizado para análises qualitativas de proteínas. Trata-se de um método particularmente útil para acompanhar a purificação de proteínas, em que as proteínas são separadas segundo seu respectivo tamanho. A análise de proteínas por SDS-PAGE também é utilizado para a determinação da massa molecular relativa da proteína, corroborando para autenticar a pureza da proteína alvo (WILSON; WALKER, 2010).

3.4.3 Potencial zeta da solução

O potencial zeta é uma propriedade física que é obtida de partículas em suspensão, macromoléculas ou superfície de material. (MALVERN, 2012). Na Figura 3 é apresentado um esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada. As cargas positivas do líquido que estão perto da superfície da partícula interagem fortemente, e essa região é chamada de camada Stern. Já as cargas que estão mais afastadas apresentam interações mais fracas com a superfície, formando a camada difusa. Dentro da camada difusa, há um limite teórico no qual os íons e as partículas formam um sistema estável. Quando uma partícula se move (por exemplo, devido à gravidade), os íons dentro da camada se movem. Porém, qualquer íon que esteja além da camada difusa não irá se mover com a partícula. Essa fronteira é chamada de superfície de cisalhamento hidrodinâmico ou *slipping plane* (plano de deslizamento). O potencial que existe até essa fronteira (*slipping plane*) é conhecido como potencial zeta (MALVERN, 2012).

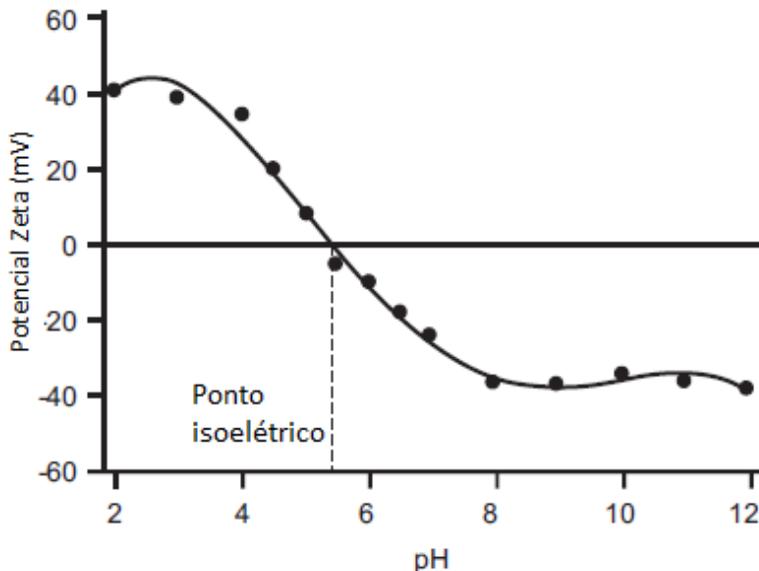
Figura 3 - Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido (Adaptado de Espectroscopia, 2015).



Para determinar a magnitude das interações entre as partículas do sistema, o potencial zeta é bastante utilizado determinando se as partículas em suspensão no líquido tenderão ou não a flocular. As partículas de um sistema coloidal podem se unir formando agregados que poderão sedimentar por ação da gravidade, este processo chama-se floculação e pode ser reversível ou irreversível. Quando os agregados se tornam maiores o processo é chamado de coagulação e é irreversível. Se as partículas em suspensão apresentam um alto valor de potencial zeta, seja ele positiva ou negativo, elas tenderão a se repelir, assim não haverá tendência para flocular. Todavia, se as partículas têm baixos valores de potencial zeta, não haverá força que previna a agregação das partículas, logo elas tendem a flocular. (LUXBACHER, 2014; MALVERN, 2012).

O fator que apresenta maior influência sobre potencial zeta é o pH. Se uma partícula está em suspensão e com um potencial zeta negativo, quanto mais alcalino for adicionado nessa suspensão, as partículas irão adquirir mais cargas negativas. Contudo, se for adicionado ácido na mesma suspensão, as partículas irão adquirir cargas positivas até a neutralização, adquirindo cargas positivas caso mais ácido seja adicionado. Logo a curva de potencial zeta versus pH será positiva para valores de pH mais baixos e negativa para valores de pH elevados (MALVERN, 2012). Na Figura 4, apresenta-se a curva de variação do potencial zeta com o pH.

Figura 4 - Curva de variação do potencial zeta com o pH (Adaptado de Malvern, 2012).



3.4.4 Estabilidade

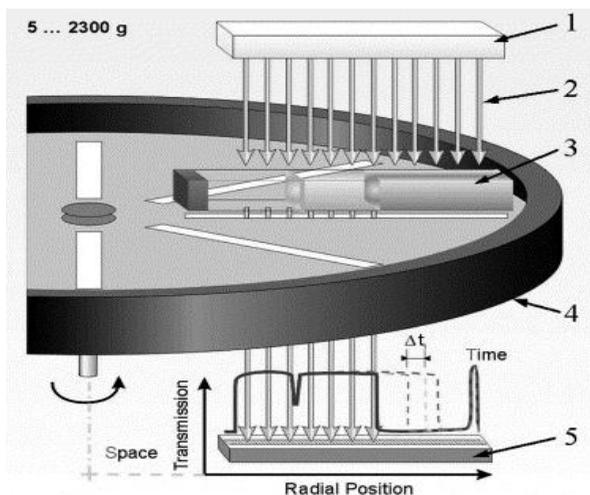
Observar e analisar o comportamento das dispersões é um conceito amplamente utilizado na pesquisa, indústria, agricultura, alimentação, farmácia ou em casa e cuidados de saúde, visto que o estado da dispersão das partículas regula o comportamento de produtos intermediários durante o processamento, bem como muitos aspectos funcionais do produto final e a sua vida de prateleira, observando os aspectos que resultam na desestabilização da dispersão (LERCHE; SOBISCH, 2014)

A estabilidade física das soluções e tamanho das partículas pode ser medida pelo equipamento LUMiSizer (LUM GmbH, Dispersion & Stability Analyses), um novo instrumento, de simples operação, que emprega sedimentação centrífuga para acelerar a ocorrência de fenômenos de instabilidade (LUMISIZER, 2016).

A centrífuga analítica de multi amostras - LUMiSizer® (LUM GmbH, Dispersion & Stability Analyses) permite medir a intensidade da luz transmitida em função do tempo e a posição ao longo de todo o

comprimento da amostra ao mesmo tempo. O sistema de medição é mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema de medição do LUMiSizer



Fonte: DETLOFF; SOBISCH; LERCHE, (2007).

(1) Uma fonte de luz emite luz NIR-Paralela (2) emitida através das células das amostras (3) que se encontram no rotor (4). A distribuição de transmissão local é registrada ao longo de todo o comprimento da amostra pelo detector.

Os dados são apresentados como uma função da posição no interior da amostra, como a distância a partir do centro de rotação, denominados perfis de transmissão. A progressão destes contém informações sobre a cinética do processo de separação e permite a caracterização de partículas.

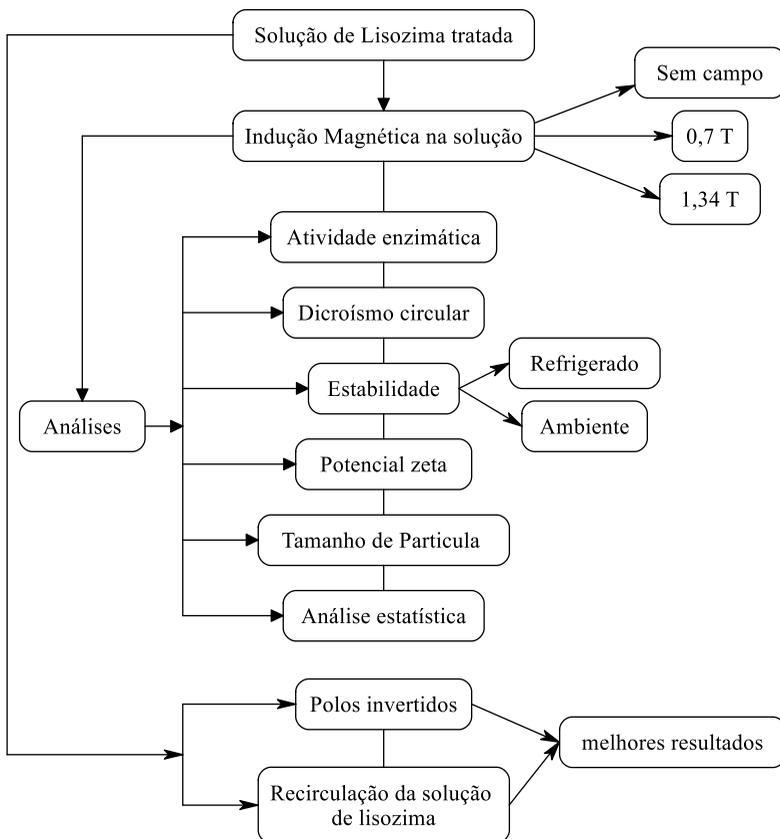
Ao mesmo tempo, até 12 diferentes amostras podem ser analisadas simultaneamente, ajustando os parâmetros instrumentais de medição: velocidade de rotação, temperatura, tempo de análise e números de leituras.

A partir desse levantamento bibliográfico que foi abordado, incluindo o conhecimento dos processos e da matéria prima a ser tratada, foi dado início aos processos experimentais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais e métodos adotados para a realização dos experimentos, assim como os procedimentos laboratoriais utilizados. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de de Separação por Membranas LABSEM, Laboratório de Controle de Processos LCP, Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural CEBIME, núcleo de pesquisas em materiais cerâmicos e compósitos CERMAT, e Laboratórios de Simulação Numérica de Sistemas Químicos e de Transferência de Massa LABMASSA – LABSIN todos pertencentes ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Figura 6: Fluxograma simplificado do processos experimentais



4.1 MATERIAIS

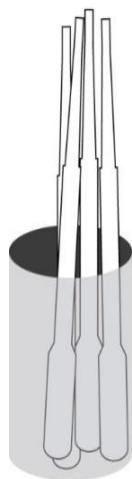
4.1.1 Lisozima

A lisozima da clara do ovo de galinha utilizada nos ensaios foi adquirida da Sigma-Aldrich, com pureza superior a 99%, massa molecular média de 13,4 kDa e ponto isoelétrico de 10,7.

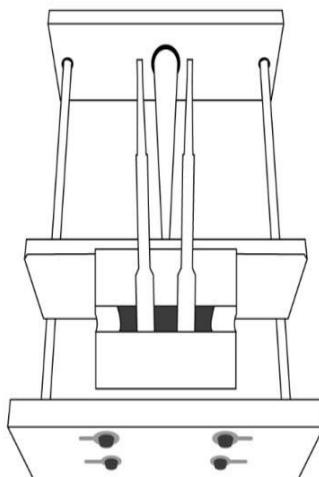
4.1.2 Aparato experimental

O aparato experimental é composto por um campo magnético gerado pela presença de dois ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$) com dimensões de 50 x 50 x 25 mm, permitindo uma densidade de fluxo de 0,7 T e também pelo posicionamento de ímãs permanentes de $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ no formato de arranjos de *Halbach*, permitindo uma densidade de fluxo de 1,34 T. A intensidade do campo magnético foi medida com um transdutor de campo magnético (modelo TMAG-1T, Globalmag Ltda, Brasil). Neste processo, pequenas quantidades de solução de lisozima foram expostas ao campo dentro de pipetas Pasteur, como mostra a Figura 7. Ímãs com pólos magnéticos invertidos, ou seja, com o mesmo pólo direcionados em paralelo, com densidade de fluxo de 0,15 T também foram rearranjados a partir dos ímãs permanentes de 0,7 T.

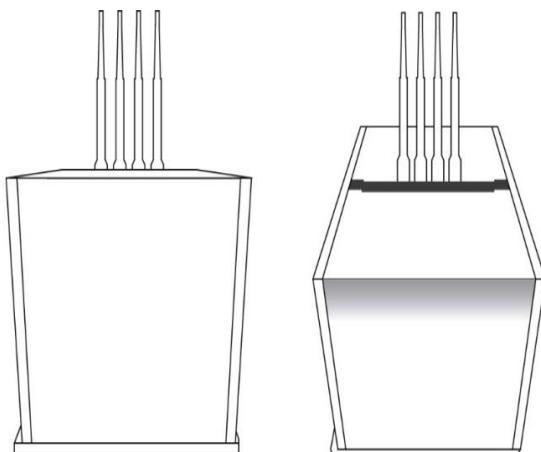
Figura 7 - Amostra controle de solução de lisozima (a) Ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$) com densidade de fluxo de 0,71 T (b) Arranjo de *Halbach* com densidade de fluxo de 1,34 T (c).



(a)



(b)



(c)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Procedimentos experimental

Os ensaios de lisozima foram realizados seguindo um planejamento fatorial 2^3 variando as condições experimentais: pH, força iônica e densidade de fluxo magnético, como pode ser observado na Tabela 2. A concentração de enzima ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), o tempo de exposição ao campo magnético (2 h) e o volume de solução submetida ao campo (2 mL) foram fixados.

Tabela 2 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 (com triplicata no ponto central) para o tratamento magnético.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0*	1
pH	8,7	11,7	13,7
Força iônica (mM)	0	25	50
Densidade de fluxo magnético (tesla)	0	0,7	1,4

* Ponto Central

No preparo das soluções enzimáticas de lisozima utilizou-se água ultrapura (Millipore Direct - Q® 3 UV with Pump), obtida com resistividade igual a $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A quantidade de lisozima a ser utilizada nos experimentos foi determinada por trabalhos anteriores realizados pelo grupo LABSEM com albumina de soro bovino, trabalhando-se com a mesma concentração molar, resultando no valor de $0,5 \text{ g/L}$, que foi fixado para todos os ensaios.

Para ajustar o pH das soluções utilizou-se o hidróxido de potássio (KOH), nas concentrações de $0,25$, $0,1$ e 1 M e cloreto de sódio (NaCl) para modificar a força iônica.

As soluções foram posicionadas no centro dos campos magnéticos, com tempo de exposição de 2h a temperatura ambiente. Amostras de

soluções enzimáticas que não sofreram indução magnética, foram denominadas de ensaios controle, realizados nas mesmas condições que os demais ensaios. Sendo assim, foi possível avaliar o efeito do campo magnético, pH e força iônica na atividade enzimática da lisozima.

Como o pH teve uma forte influência sobre a atividade enzimática, deslocou-se os níveis para valores menores e intermediários de pH sem o uso do campo magnético, no intuito de averiguar se de fato o campo magnético era um fator fundamental para o aumento da atividade enzimática. Estes experimentos foram realizados com a intenção de avaliar se apenas com a alteração do pH e da força iônica, se alcançaria uma resposta semelhante aos ensaios com campo magnético. Para essa etapa, utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 cujos níveis são mostrados na Tabela 3:

Tabela 3 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 (com triplicata no ponto central).

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0*	1
pH	7	10	13
Força iônica (mM)	0	25	50

O rearranjo do aparato experimental com ímãs invertidos, ou seja, direcionados com o mesmo pólo (N-N; S-S), gerando uma densidade de fluxo de 0,15 T, foi realizado em triplicata para o ensaio a pH 13 e também para o ensaio a pH nativo de 10

4.2.2 Determinação da atividade enzimática da lisozima

A atividade enzimática da lisozima foi realizada de acordo com o método Shugar (1952). A lise da membrana bacteriana provoca uma diminuição na absorbância a 450 nm, sendo que esta foi avaliada a cada 0,5 s durante um período total de incubação de 5 min a 25 °C utilizando-se um espectrofotômetro (UV-Vis Hitachi, U -1900).

Uma suspensão fresca de *Micrococcus lysodeikticus* a 0,01 % (w/v) [18 mg de sólido em 100 mL de tampão de fosfato (66 mM, pH 6,2)] foi utilizada como substrato no ensaio de atividade padrão da lisozima. Para

cada determinação 100 µL de uma solução de lisozima apropriadamente diluída foram adicionados a 2,5 mL de suspensão bacteriana.

A atividade enzimática foi calculada definindo-se que uma unidade de lisozima produz uma alteração de absorbância da suspensão (ΔA) a 450 nanômetros de 0,001 unidade de absorbância (u.a.) por minuto a um pH de 6,2 na temperatura de 25 °C, conforme a equação 1:

Equação 1:

$$\text{Atividade em } \frac{\text{U}}{\text{mL}} = \frac{\Delta Abs_{450} / \text{min} \times 1000}{0,1}$$

4.2.3 Atividade enzimática residual

A atividade enzimática residual da lisozima (A.E.R) foi definida como a porcentagem da atividade da solução de lisozima exposta ao campo magnético em relação ao controle, a qual se tratava da lisozima tratada, mas sem exposição ao campo magnético.

4.2.4 Avaliações da estabilidade da atividade enzimática da lisozima

Os ensaios que apresentaram maior efeito na atividade enzimática foram submetidos à análise de estabilidade. Os ensaios de estabilidade foram realizados durante o armazenamento à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e à temperatura de refrigeração (4 °C). O tempo de armazenamento foi contado após as 2h de indução magnética (25 °C).

Análises de atividade enzimática foram realizadas a cada 1 hora, observando o comportamento da atividade em função do tempo. Ensaios de estabilidade da amostra controle, ou seja, aquela não submetida ao campo magnético foram realizados simultaneamente.

4.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO

4.3.1 Eletroforese

Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) é a técnica mais utilizada para separar proteínas de amostras de mistura, desempenhando um papel-chave na biologia molecular e ampla gama de subcampo da pesquisa biológica, por autenticar a pureza da proteína, bem como é utilizada para averiguar a pureza de uma amostra, ao qual foi o objetivo da mesma nesta pesquisa.

As amostras foram desnaturadas por aquecimento a 95 °C, depois incubadas em um tampão contendo 5 mM de β-mercaptoetanol e em seguida adicionadas ao gel. A corrida foi realizada em um gel 10 % por 2h usando uma amperagem de 40 mA.

4.3.2 Dicroísmo circular (DC)

A estrutura secundária de uma molécula pode ser determinada pela espectroscopia Dicroísmo Circular (DC), que baseia-se na diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à esquerda e luz circularmente polarizada à direita.

Espectros de DC da enzima foram analisados na faixa de comprimento de onda - UV (190 - 250 nm) com um espectropolarímetro DC (Jasco J, 715), em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de percurso óptico. O tampão de fosfato utilizado para dissolver a lisozima foi utilizado como solução em branco para todas as amostras. Os dados de DC foram expressos em termos de elipticidade molar, em grau $\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. A diminuição da intensidade da banda negativa a 208 nm, demonstra alterações na estrutura secundária de lisozima e um declínio particular no conteúdo de α-hélice (PENG; HIDAJAT; UDDIN, 2004; RAN et al., 2009; ZHONG et al., 2005). O teor de α-hélice de lisozima foi calculado a partir da $[\theta]$ a 208 nm utilizando a equação 2 e 3 (GREENFIELD e FASMAN, 1969):

Equação 2:

$$\%hélice = \frac{-([\theta]_{208} + 4000)}{29.000} \times 100$$

E o teor de α-hélice relativo foi calculado com a equação 3:

Equação 3:

$$\begin{aligned} & \text{Teor de } \alpha \text{ hélice relativo} \\ &= \frac{\text{Conteúdo de } \alpha \text{ hélice depois da indução magnética}}{\text{Conteúdo de } \alpha \text{ hélice antes da indução magnética}} \\ &= \frac{-([\theta]_{208} + 4000)_{\text{depois da indução}}}{-([\theta]_{208} + 4000)_{\text{antes da indução}}} \end{aligned}$$

4.3.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das amostras dos ensaios controle e após a indução magnética de 2 h foi medido utilizando-se uma célula capilar com dois eletrodos em um instrumento de dispersão de luz dinâmica (DLS), utilizando uma alíquota de cada amostra, ao qual o próprio equipamento fornece os cálculos (Zetasizer Nano-S, Malvern Instruments, 2004).

4.4 RECIRCULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LISOZIMA

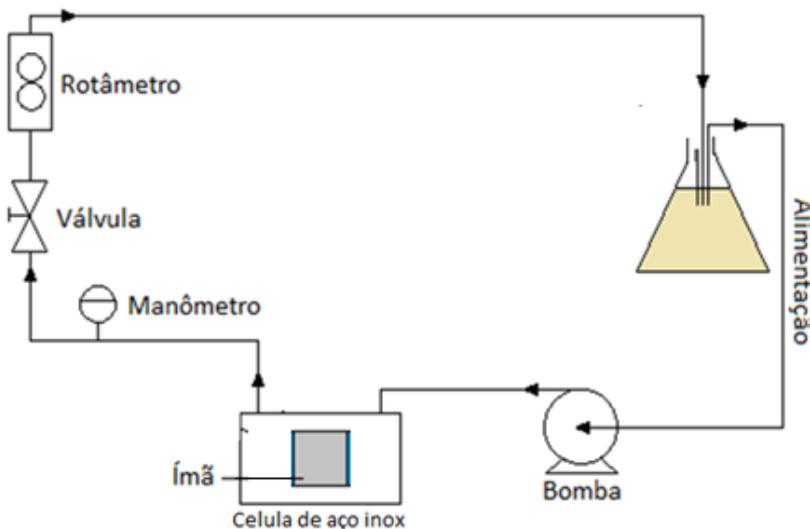
A título de experimento inicial, foi submetida a solução de lisozima tratada por uma unidade de ultra filtração, disposta do LABSEM, contudo não acompanhada de membrana.

4.4.1 Aparato experimental

A unidade de recirculação opera em escoamento tangencial (*cross flow filtration*) e com reciclo total que consiste em recircular para o tanque de alimentação como pode ser observado na Figura 7, para manter a concentração da alimentação constante. O aparato é composto por um tanque de alimentação com capacidade de 1L, uma bomba de deslocamento positivo (Micropump), e um módulo feito de aço inoxidável com dimensões de 120x90x10 mm. Nos ensaios com campo magnético foram utilizados os ímãs permanentes de Nd₂Fe₁₄B no formato de arranjos de *Halbach*, permitindo uma densidade de fluxo de 1,34 T. A solução de lisozima era bombeada do tanque de alimentação para o módulo onde sofre indução magnética. O sistema também é composto por um rotâmetro (Blaster Controles) capaz de medir vazão de alimentação

de 0,06 a 0,6 L.min⁻¹. A Figura 8 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no estudo.

Figura 8 - Diagrama esquemático da unidade experimental de ultrafiltração (Adaptado de ZIN, 2014).



4.4.2. Procedimento experimental

Os ensaios de recirculação foram realizados em duplicata em um ambiente climatizado em temperatura média de 25 °C ± 2 °C. As permeações utilizando amostras de soluções proteicas que não sofreram indução magnética foram denominados ensaios controle.

Os ensaios realizados foram a lisozima no seu estado nativo com e sem campo, e tratada sobre pH 13,7, força iônica 50 mM com e sem campo. A concentração de enzima (0,5 g.L⁻¹), o tempo de exposição ao campo magnético (2 h) e o volume de solução submetida ao campo (1L), foram fixados.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos das variáveis independentes (pH, força iônica e densidade de fluxo magnético) sobre a atividade enzimática da lisozima

foram avaliados estatisticamente mediante análise do planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central, utilizando erro puro (que avalia os 3 pontos centrais para o cálculo do erro experimental) utilizando *software* STATISTICA versão 7.0 e a ferramenta estatística *Experimental design* (DOE). Os resultados foram analisados com nível de confiança de 90 %.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa, referentes à avaliação da atividade e estabilidade da lisozima da clara de ovo submetida ao tratamento com campo magnético. São apresentados também as análises que foram realizadas para melhor entender o processo, eletroforese, difractoísmo circular, potencial zeta, tamanho de partícula, e uma discussão sobre o planejamento fatorial realizado, bem como a estabilidade do aumento a atividade enzimática e o seu aumento quando submetido a unidade de recirculação.

5.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM CAMPO MAGNÉTICO

5.1.1 Efeito do campo magnético estático e das condições operacionais na atividade da lisozima

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados dos experimentos realizados em função do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade específica residual (%) em função do pH, força iônica e densidade de fluxo magnético. É importante ressaltar que todos os ensaios do planejamento 2^3 foram realizados de forma estática, ou seja, sem a influência da recirculação da solução de lisozima e que as condições: tempo de exposição ao campo (2 h), concentração de enzima ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e volume de enzima (2 mL) foram fixadas.

A cada ensaio do planejamento a atividade da lisozima nativa (nas condições originais de pH e força iônica) era medida novamente para fins comparativos. As respostas para atividade específica residual (AER) foram calculadas pela diferença entre a atividade específica da lisozima em cada ensaio e a atividade específica da lisozima nativa (não tratada), expressa em percentual (%).

Os ensaios 12 e 13 não fazem parte do planejamento, mas suas respostas foram adicionadas para avaliar o efeito do pH e da força iônica no seu valor intermediário (11,7 e 25 mM, respectivamente) sem a influência do campo magnético.

Na tabela 4 os experimentos (2, 4, 6 e 8) apresentaram um aumento significativo na atividade específica residual da lisozima (134; 136; 179 e 212%, respectivamente) enquanto que, na maioria dos experimentos se manteve praticamente inalterada ou com uma pequena redução (ensaos 3, 12 e 13).

Os grandes destaques de valores de atividade específica residual foram reportados nos ensaios 6 (179%) e 8 (212%), aos quais foram utilizados valores maiores de pH (13,7) e de densidade de fluxo magnético (1,34 T). A aplicação de campo magnético nos maiores valores de densidade de fluxo magnético, pH e força iônica (ensaio 8), resultou em um aumento de 56% na atividade enzimática se comparado ao seu controle (ensaio 4) sem campo magnético.

Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com as respostas de atividade específica residual.

Ensaio	pH	Força iônica(mM)	Densidade	Atividade Enzimática Residual (%)	Potencial Zeta
			de fluxo magnético (T)		
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	8,7	0	0	92	12,4±0,2
2	13,7	0	0	134	-17,5±0,9
3	8,7	50	0	79	-5,69±0,3
4	13,7	50	0	136	-20,4± ,9
5	8,7	0	1,34	98	7,8 ± 0,6
6	13,7	0	1,34	179	-17,0±1,3
7	8,7	50	1,34	99	-2,1±0,9
8	13,7	50	1,34	212	-20,0±1,3
9	11,7	25	0,7	94	-11,0±0,4
10	11,7	25	0,7	100	-10,5±0,7
11	11,7	25	0,7	98	-11,8±0,2
12	11,7	25	0	74	-12,7±1,2
13	11,7	25	0	73	-13,5±0,8
Lisozima Nativa	10,1	0	0	100 _(116 kU/g)	2,28±0,3

Liu et al. (2010) observou um aumento de 20% na atividade da α -amilase imobilizada em quitosana após tratamento com campo magnético estático (sem recirculação) de 0,15 T durante 1 hora. Tang et al. (2015) avaliaram a influência do campo magnético estacionário em enzimas digestivas de pepino do mar obtendo um aumento significativo na atividade enzimática para as enzimas fosfatase ácida, fosfatase alcalina e superóxido dismutase a 0,5 T por 1 h.

Mais destaques frente ao campo magnético foram observados por Katsenios et al. (2016), no qual o tratamento com campo eletromagnético pulsado em amplitude da ordem de 12,5 mT foi utilizado a um tempo de duração de 30 e 45 min em sementes de trigo duro, verificando que a exposição de sementes em campo eletromagnético aumenta a atividade da α -amilase no terceiro e quarto dias após a semeadura, proporcionando assim uma vantagem durante a germinação.

Em relação às respostas para o potencial zeta, conforme tratado na revisão, esse parâmetro auxilia na avaliação da magnitude das interações entre as partículas do sistema (LUXBACHER, 2014; MALVERN, 2012) podendo dar um indicativo de possíveis mudanças na magnitude da repulsão ou atração eletrostática das cargas da solução de lisozima, resultantes da aplicação dos diferentes tratamentos do planejamento experimental.

Observando a Tabela 4, é possível verificar que o potencial zeta da solução de lisozima não sofre influência do campo magnético. Contudo, o aumento do pH e da força iônica (pela adição de NaCl) tornam esse potencial mais negativo.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, decidiu-se deslocar os valores de pH do planejamento 2³, visto o efeito pronunciado pH na atividade catalítica da lisozima, para avaliar se haveria a possibilidade de observar um aumento de atividade semelhante aos 56% obtido para o tratamento magnético. Dúvida a qual foi sanada pela realização do planejamento 2² apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Planejamento fatorial 2² e as respostas para atividade enzimática residual (%).

Ensaio	pH	NaCl (mM)	Campo (T)	Atividade Enzimática Residual (kU.mg ⁻¹)
1	7	0	0	118 ^a
3	7	50	0	123 ^a
2	13	0	0	112 ^a
4	13	50	0	147 ^b
5	10	25	0	100 ^c
6	10	25	0	103 ^c
7	10	25	0	105 ^c
8	13,7	50	1,4	212 ^d

Os ensaios foram realizados seguindo os demais padrões experimentais fixados apresentados na Tabela 4, contudo nesse caso foi retirado o campo magnético. Pela análise da Tabela 5 fica clara a influência do campo magnético sobre a atividade enzimática. Os ensaios mostraram que o pH e a força iônica exercem certa influência, mas que o fator campo é fundamental para um aumento da atividade enzimática.

O ensaio controle 4 (pH 13 e força iônica 50) dentre os demais, foi o que apresentou maior valor significativo. Em virtude disso, foi realizado o ensaio 8 (pH 13, força iônica 50 e densidade magnética de 1,4T), que não estava dentro do planejamento, mas foi acrescentado no intuito de enfatizar e comprovar a influência do campo. Pode-se observar um aumento significativo de 44 %, frente ao controle.

Essa mesma influência significativa frente à exposição do campo magnético foi observada por Vashisth e Nagarajan (2010), que submeteram sementes de girassol (*Helianthus annuus*) em lotes a campos magnéticos estáticos de densidade, de 50 e 200 mT durante 2 h. Os referidos autores obtiveram resultados satisfatórios quanto às atividades enzimáticas da α -amilase, desidrogenase e protease, as quais foram significativamente mais elevadas nas sementes tratadas em contraste com amostras controle.

Influência pronunciada também foi encontrada em sementes de pepino que foram expostas a uma intensidade de campo magnético

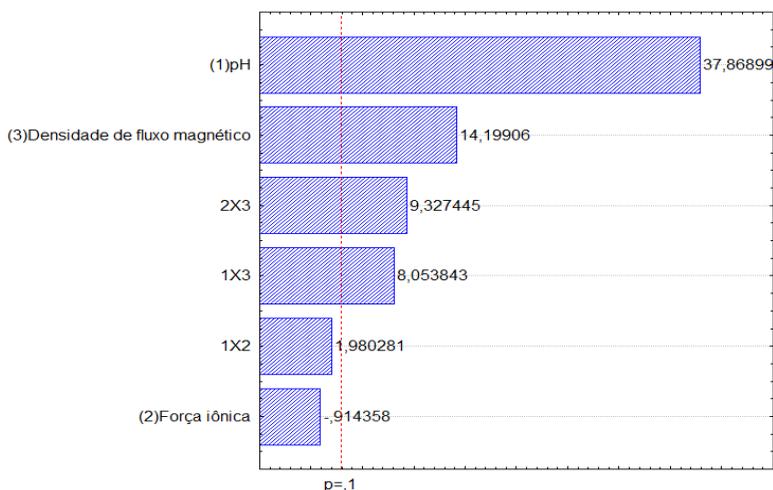
estático de 100 a 250 mT durante 1, 2 ou 3 h, resultando em atividades aumentadas das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (8%), catalase (83%) e redutase (77%) em relação as amostras controle (BHARDWAJ; ANAND; NAGARAJAN, 2012).

Apesar dos resultados deste trabalho indicarem alterações na atividade catalítica e na estabilidade ao pH, da lisozima submetida ao tratamento com campo magnético, os trabalhos reportados na literatura necessitam de um aprofundamento no estudo dos efeitos do tratamento magnético. Nosso trabalho visa ir mais além, analisando estatisticamente o efeito do campo magnético, pH e força iônica na atividade e no potencial zeta e avaliar possíveis alterações no tamanho de partícula, estabilidade e conformação da lisozima submetida ao campo magnético, conforme será discutido nos itens a seguir.

5.1.1.1 Análises estatística dos planejamentos para a atividade específica residual

O resultado da análise estatística dos resultados da Tabela 5 foi expresso na forma de um diagrama de Pareto, apresentado na Figura 9, que permite observar os efeitos significativos negativos e positivos das variáveis estudadas sobre a atividade específica residual da lisozima.

Figura 9 - Diagrama de Pareto do primeiro planejamento fatorial 2^3 com os efeitos estimados para a atividade específica residual da lisozima ($p < 0,1$) em função do pH, densidade de fluxo magnético e força iônica.



As variáveis independentes pH e densidade de fluxo magnético influenciaram significativamente e positivamente a atividade específica residual da lisozima, bem como as interações: Força iônica x Densidade de fluxo magnético e pH x Densidade de fluxo magnético, como pode-se observar na Figura 8. Induzindo um aumento nessa faixa estudada, obtém-se aumento da atividade enzimática. A variável força iônica não apresentou efeito significativo ao nível de 90% de confiança.

Na Tabela 10 que encontra-se no Anexo A estão apresentados os coeficientes de regressão, desvio padrão e os limites de confiança para a AER. da lisozima para o tratamento estatístico dos dados por erro puro, a um nível de confiança de 90%, bem como as superfícies de respostas Anexo B fixando uma comprovação estatística da influência satisfatória do campo magnético sobre a atividade enzimática.

Pela análise de variância (ANOVA) Tabela 6 obtiveram-se o coeficiente de correlação (0,88) e o F-calculado (1,5 vezes maior que o F-tabelado), que permitem afirmar que o modelo matemático gerado apresentado na Equação 4 é válido para a faixa estudada.

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para atividade específica relativa (%) da lisozima para o planejamento 2³

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	14477,3	6	3619,3	4,9
Resíduo	4402,1	4	733,7	
Falta de ajuste	4385,9	2		
Erro Puro	16,2	2		
Total	18879,5	10		

Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de correlação R= 0,88; F_{tab,90%}= 3,18.

A Equação 4 apresenta o modelo empírico codificado de primeira ordem que descreve a atividade específica residual em função das variáveis significativas independentes analisadas (pH e densidade de fluxo magnética) dentro da faixa estudada.

Equação 4:

$$\text{AER}(\%) = 120,81 + 75,79 \cdot X_1 + 28,57 \cdot X_3 + 16,21X_1 \cdot X_3 + 18,77X_2 \cdot X_3$$

Onde:

X_1 = pH;

X_2 = força iônica;

X_3 = densidade de fluxo magnético

Na Tabela 7 está apresentada a análise de variância (ANOVA) para atividade específica residual (%) da lisozima para o planejamento 2^2 .

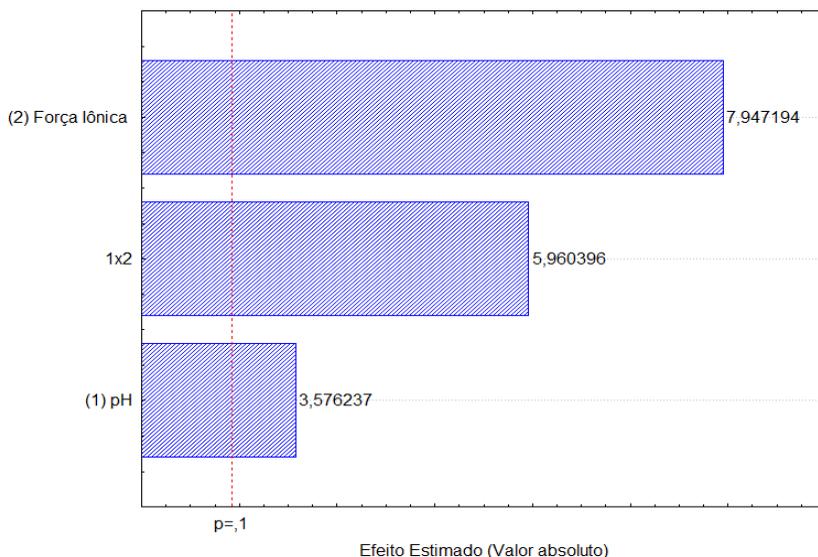
Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) para atividade específica residual (%) da lisozima para o planejamento 2^2 .

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	706	3	235,3	0,81
Resíduo	867,7	3	289,2	
Falta de ajuste	855,05	1		
Erro Puro	12,7	2		
Total	1573,7	6		

Resíduo= Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de correlação $R= 0,66$; $F_{\text{tab},95\%}= 9,3$

Pela análise de variância (ANOVA) Tabela 7 obteve-se o coeficiente de correlação (0,66) e o F-tabelado maior que o F-calculado, apesar de não permitir a geração de modelo matemático, possibilitou a geração do diagrama de Pareto apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados para a atividade específica residual da lisozima ($p < 0,1$) em função do pH e força iônica para o planejamento 2^2 .



Na Figura 10 é possível observar o efeito positivo significativo ($p < 0,1$) do pH, da força iônica e das interações pH x força iônica, ou seja, os maiores valores de pH e de força iônica permitem a obtenção de um maior valor de atividade enzimática para a lisozima.

5.1.2 Efeito da orientação dos polos magnéticos na atividade da lisozima

Após os estudos sobre a aplicação de campo magnético estático na atividade enzimática da lisozima apresentarem um incremento significativo nessa resposta, despertou-se a curiosidade em verificar a orientação dos polos magnéticos no sentido invertido, ou seja, polos iguais em uma mesma direção (N-N ou S-S), traria alguma resposta na atividade catalítica.

Ao invertermos os polos magnéticos do sistema apresentado na Figura 6b em um mesmo sentido (N-N ou S-S) ainda teremos regiões com campo magnético de aproximadamente 0,15 T, porém, com as linhas de campo orientadas no sentido oposto.

É importante ressaltar que a densidade de fluxo magnético de 0,15 T não é uniforme entre os dois magnetos e ao afastarmos os ímãs essa densidade de fluxo magnético reduz, sendo nula no centro (0 T). Essa redução da densidade do fluxo magnético está associada ao aumento da distância entre os polos N-S.

A Tabela 8 apresenta os resultados de atividade enzimática para a lisozima tratada em ímã invertido (0,15 T). Para fins comparativos testou-se a melhor condição de pH e força iônica do planejamento 2³ (pH 13,7 e 50 mM de NaCl) e a lisozima em sua condição nativa.

Tabela 8 - Respostas de atividade enzimática (kU.mg⁻¹) da lisozima para o tratamento magnético em ímã invertido (0,15 T).

Ensaio	Lisozima nativa		pH 13,7	
	Sem Campo	Com Campo (0,15 T) *	Sem Campo	Com Campo (0,15 T) *
1	112,3	77,9	140,7	102,1
2	106,2	71,8	131,1	108,4
Média	109,2 ± 4,3	74,9 ± 4,3	135,9 ± 6,7	105,2 ± 4,4
Incremento		-31,4%		-22,5%

* tempo de exposição de 2 horas

Na Tabela 8 é possível observar que ocorreram reduções significativas na atividade da lisozima nativa e a pH 13,7 de 31,4% e 22,5%, respectivamente, após tratamento em ímã invertido de 0,15 T. As menores respostas de atividade enzimática após tratamento em ímã invertido podem estar relacionadas as questões levantadas por Albuquerque *et al.* (2016) em que, segundo esses autores proteínas com estrutura predominantemente α -hélice podem sofrer anisotropia diamagnética. Essa anisotropia leva a uma magnetização negativa contrária ao campo magnético aplicado e pode gerar alterações subsequentes na estrutura das proteínas.

No campo magnético invertido temos forças de repulsão entre os polos (N-N ou S-S), linhas de campo contrárias a do alinhamento padrão (N-S), além de zonas com diferentes densidades de fluxo magnético (de 0,15 a 0 T). Esses fatores podem ter “prejudicado” a orientação das ligações planares que compõem a estrutura da lisozima e gerado alterações na estrutura da mesma.

Tentando responder a essa questão, realizamos testes preliminares de DC e não observamos diferenças significativas na estrutura secundária da lisozima (Figura apresentada no Anexo C). No entanto, essas modificações podem ter sido mais sutis, na estrutura terciária da enzima, que podem ser verificadas em análises de fluorescência. Essas análises não foram realizadas no presente estudo devido à falta de disponibilidade das análises, contudo seriam de extrema importância para justificar nossos resultados.

Ran *et al.* (2009) investigaram os efeitos do campo magnético estático de 0,15 T sobre a atividade e a estrutura secundária da celulase e também observaram uma redução na atividade enzimática (24 %) após 2 horas de tratamento magnético. No entanto, ao contrário do nosso estudo, esses autores verificaram alterações significativas na estrutura secundária da celulase. Como se trata de outra enzima e de um tratamento magnético com ímãs no sentido padrão (N-S) respostas distintas são justificáveis.

É importante ressaltar que não encontramos outros trabalhos na literatura que tenham estudado a orientação dos polos magnéticos, para fins comparativos.

5.1.3 Efeito da forma de exposição ao campo magnético na atividade da lisozima

Até o momento todos os resultados apresentados tratavam de estudos conduzidos de forma estática, em que pequenas quantidades de enzima (2 mL) eram expostas ao tratamento magnético. No entanto, pensando na viabilidade industrial seria interessante o tratamento magnético de grandes volumes de amostra. Tendo essa questão em vista, despertou-se o interesse de investigar o efeito do campo magnético recirculando um dado volume de solução pelo ímã de 1,34 T.

Nos experimentos de recirculação utilizou-se o aparato experimental apresentado na Figura 7 da metodologia, aos quais, 1 L de solução de lisozima na melhor condição do planejamento 2³ (pH 13,7 e 50 mM de NaCl) e da lisozima em sua condição nativa foram recirculadas durante 2 horas com ou sem a presença do campo magnético (1,34 T). O volume de 1 L de solução e o tempo tratamento magnético (2h) foram fixados de acordo com trabalhos anteriores de indução magnética de soluções proteicas do grupo.

A Tabela 9 apresenta as respostas de atividade enzimática da lisozima para o tratamento magnético com recirculação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 9 - Respostas de atividade enzimática (kU.mg⁻¹) da lisozima para o tratamento magnético com recirculação em ímã de 1,34 T

Ensaio	Lisozima Nativa		pH 13,7	
	Sem Campo	1,34 T*	Sem Campo	1,34 T*
1	121,8	151,3	157,2	250,2
2	115,3	143,3	143,9	246,9
Média	118,6 ± 4,6	147,3 ± 5,6	150,5 ± 9,4	248,5 ± 2,2
Incremento	31,20%		65,10%	

* Recirculação da solução por 2 horas

Enquanto que, no tratamento magnético estático obtivemos um incremento de 56% na atividade enzimática, no tratamento magnético com recirculação encontramos um aumento de até 65% (pH 13,7, força iônica de 50 mM e densidade de fluxo magnético de 1,34 T) nessa resposta.

Pensando no processo industrial, o tratamento magnético com recirculação permitiu a exposição de um maior volume de amostra ao campo magnético e um aumento superior na atividade catalítica da lisozima. A maior resposta na atividade catalítica, comparando ao tratamento estático, deve estar relacionada à maior agitação da solução e a maior velocidade das partículas carregadas que passam pelo campo magnético. Contudo esse experimento foi realizado em caráter inicial, necessitando de aprofundamentos futuros.

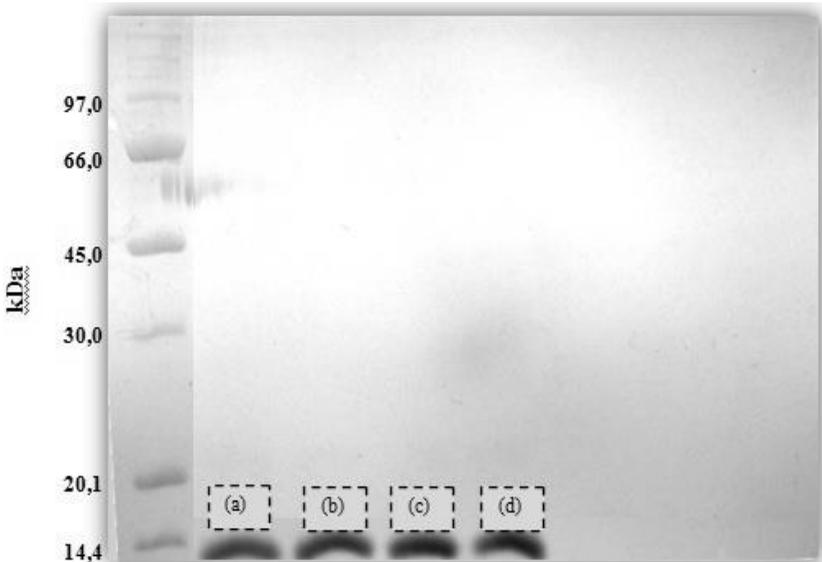
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA LISOZIMA

É importante ressaltar que em todos os experimentos de caracterização, utilizou-se o tratamento magnético estático a fim de facilitar o processo em nível de laboratório e para um menor consumo de lisozima. As caracterizações apresentadas a seguir, com exceção da análise de tamanho de partícula, são em relação à melhor condição do planejamento fatorial completo 2^3 (pH 13,7 e 50 mM de NaCl), comparando-as com a lisozima em sua condição nativa.

5.2.1 Eletroforese

A fim de realizar uma análise posterior de dicroísmo circular, com alta qualidade, o primeiro passo é verificar a pureza das amostras. A presença de apenas uma banda característica no gel de eletroforese fornece um bom indicativo da pureza das amostras. Pela Figura 11 é possível observar bandas únicas a 14,4 kDa para todos os ensaios, mostrando que a proteína está pura e apresenta massa molar de acordo com o reportado pela literatura e fornecedor (CITADINI, 2011).

Figura 11 - Perfil eletroforético da lisozima em gel de poliacrilamida - SDS



(a) lisozima; pH 13,7; força iônica 50 mM; 2 horas com campo (1,4 tesla); (b) lisozima; pH 13,7; força iônica 50 mM; sem campo; (c) lisozima; pH 13,7; força iônica 0; 2 horas com campo (1,4 Tesla); (d) lisozima; pH 13,7; força iônica 0; sem campo.

5.2.2 Dicroísmo Circular

Nos espectros de dicroísmo circular, bandas a 208 nm e 222 nm são predominantemente associadas com as estruturas em α -hélice, e bandas características em 198 e 206 nm podem estar associadas com outros elementos de estrutura secundária na proteína, como estruturas folhas- β (BARROW et al., 1992). Conforme apresentado na Figura 11, para os espectros de DC, é possível observar que todas as amostras de lisozima possuem 2 bandas características de estruturas de α -hélice próximas a 208 e a 222 nm.

O DC pode dar um bom indicativo de alterações conformacionais na estrutura secundária das enzimas. Uma diminuição da intensidade das bandas a 208 e a 222 nm (negativo) representa uma redução do conteúdo de α -hélice (PENG; HIDAJAT; UDDIN, 2004).

Observando-se a Figura 12 quanto ao conteúdo de α -hélice para os ensaios de lisozima nativa sem exposição ao campo magnético (0 T),

lisozima nativa submetida ao campo magnético (1,34 T), lisozima no maior pH (13,7) com campo magnético (1,34 T) e lisozima no pH mais alto (13,7) sem campo magnético foram de 32%, 29%, 26% e 24%, respectivamente.

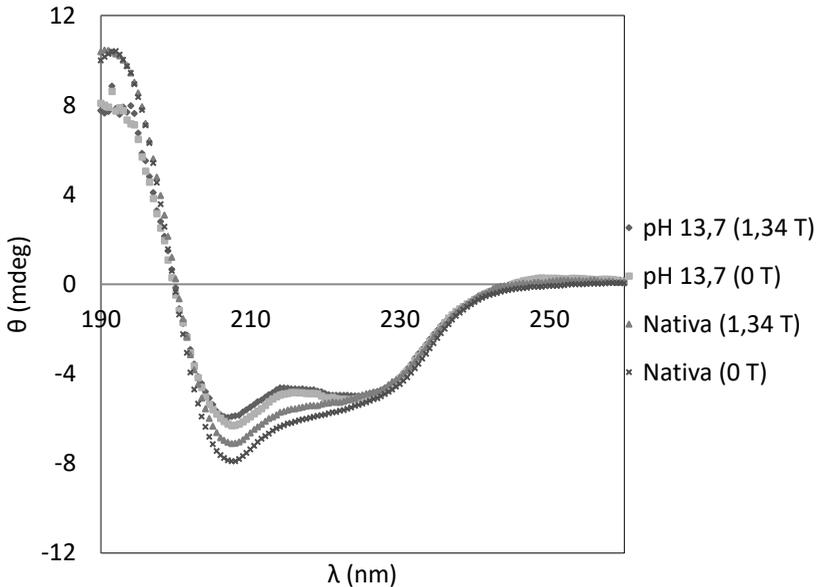
De acordo com os resultados descritos anteriormente, destaca-se a diferença pronunciada entre o ensaio de pH 13,7 e mais alto campo magnético (1,34 T), em comparação com a lisozima nativa, relativo as alterações na estrutura secundária, com perda de 25% da estrutura secundária em relação ao ensaio controle, essa diminuição foi acompanhada por uma forte ativação da enzima (AER 212%), como foi descrito mais detalhadamente na Tabela 4.

Fato que também foi observado por Subhedar e Gogate (2014) que avaliaram a atividade da celulase tratada com ultrassom a intensidade de $17,33 \text{ W/cm}^2$ durante 30 min, no qual a atividade da enzima aumentou 25% em comparação com a amostra não tratada, observando por meio do dicróismo circular uma redução de 12,4% do conteúdo de α -hélice em comparação com a enzima não tratada. Estas alterações na celulase levaram a uma maior flexibilidade da molécula de enzima, e portanto, gerando uma maior eficiência catalítica pela melhor exposição dos locais ativos de enzima.

Lopes et al. (2015) observaram efeitos parecidos com o presente estudo, avaliando a peroxidase ao qual foi aplicado aquecimento convencional e micro-ondas, avaliando seus efeitos sobre as estruturas e a atividade. A estrutura secundária também foi analisada por dicróismo circular observando uma redução de 22% do conteúdo de α -hélice durante o tratamento de aquecimento convencional a 40°C durante 12h. A atividade enzimática sofreu um aumento, que os autores atribuem à função de que um menor conteúdo de α -hélice leva a um acesso facilitado do substrato ao local do sítio ativo da peroxidase.

Resultados similares também foram encontrados para o tratamento com ultrassonografia na enzima glicose-oxidase, com redução do teor de alfa-hélice na estrutura secundária e aumento da atividade enzimática (GUISEPPI-ELIE; CHOI; GECKELER, 2009) alterações similares também foram encontradas para α -amilase, papaína e pepsina (YU et al., 2014).

Figura 12 - Análise DC para: lisozima nativa (0 T); lisozima nativa (1,34 T); lisozima no pH de 13,7 e submetida a um campo magnético de 1,34 T, e lisozima no pH 13,7, sem ser submetida a campo magnético (0 T).



5.2.3 Efeito do campo magnético na estabilidade da atividade enzimática

Para avaliação da durabilidade do efeito do campo magnético aplicado a lisozima, foram realizados dois experimentos variando a temperatura de armazenamento. No primeiro momento a solução enzimática foi exposta à temperatura ambiente (25°C), com medições realizadas no espectrofotômetro a cada 1h acompanhando ponto a ponto o comportamento enzimático. Em um segundo momento os mesmos ensaios foram realizados à temperatura refrigerada (4°C) mantendo os ensaios sob a mesma temperatura durante as medições.

Pode-se observar na Figura 13, que a lisozima tratada por campo magnético perde atividade gradualmente com o passar do tempo de armazenamento a temperatura ambiente (25°C). Enquanto que, para a

lisozima armazenada a 4°C, Figura 14, essa redução de atividade é mais acentuada nas primeiras 2h, mantendo-se superior a 140% nas horas seguintes para o ensaio a pH 13,7, submetido a tratamento com campo magnético de alta densidade de fluxo (1,34 T). Resultados relevantes, uma vez que mostram que as densidades magnéticas perduram por pouco tempo à temperatura ambiente, contudo pode ser prolongada em baixa temperatura (4°C).

Martínez et al. (2016) também observaram a influência da temperatura sobre a lisozima, avaliou a temperatura de desnaturação, afim de sanar os três principais processos de degradação das proteínas: formação de agregados, desnaturação pela temperatura e pela hidrólise, observando intimamente a influência do teor específico de umidade de 6,5% para que a mesma não desnaturasse, bem como LI et al. (2016) investiram em estudos específicos afim de encontrar um valor de temperatura e pH ótimo para o funcionamento da lisozima.

Figura 13 - Perfil de estabilidade da lisozima não tratada, tratada com campo magnético com densidade de fluxo magnético 0,7 T, e 1,34 T, nas condições de pH 13,7 e força iônica de 50 mmol/L, armazenada a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

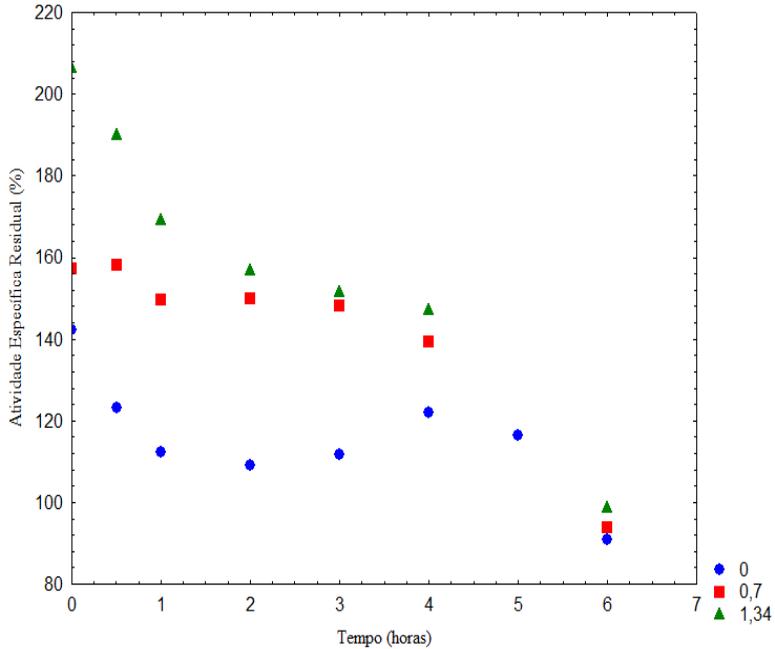
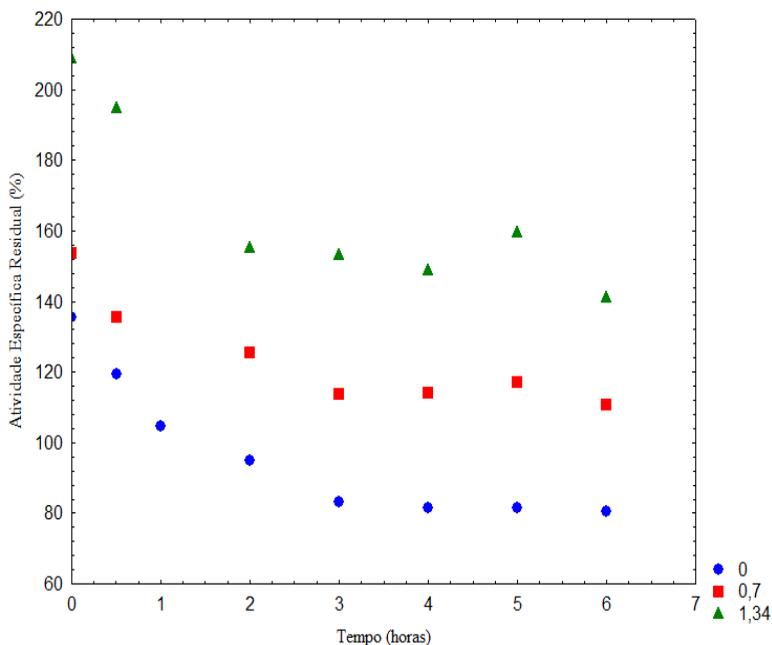


Figura 14 - Perfil de estabilidade da lisozima não tratada, tratada com campo magnético com densidade de fluxo magnético 0,7 T, e 1,34 T, nas condições de pH 13,7 e força iônica de 50 mmol/L, armazenada a temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$.



5.2.4 Tamanho de partícula da lisozima

A Figura 15 mostra as distribuições de tamanho de partícula obtidas para cada ensaio do planejamento experimental, em função das variáveis independentes pH, força iônica e densidade de fluxo magnético.

Como foi apresentado na revisão, o potencial zeta é explicitamente dependente do pH, ou seja, quanto mais extremos forem os valores de pH maiores serão os valores de potencial zeta, tanto para valores negativos como positivos, fato que está diretamente proporcional a repulsão das partículas, logo o inverso as atrai, gerando aglomerado das mesmas. Feita as devidas explicações fica fácil observar na Figura 15a e 15c um aumento significativo da solução de lisozima, também influenciado pela densidade de fluxo de 1,34 T, no qual o ensaio que apresentou o maior tamanho de

partícula médio (1574 nm) foi o ensaio com força iônica de 50 mM, densidade de fluxo magnético de 1,34 T e pH de 8,7 (Figura 15c).

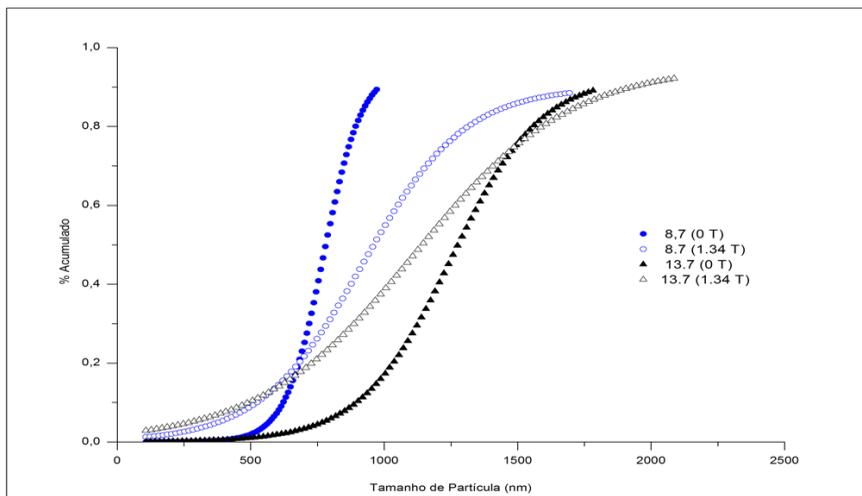
De acordo com Fayad et al. (2015) o aumento da força iônica do meio levou ao aumento do diâmetro médio e da polidispersidade das partículas, O aumento da força iônica promove a contração da camada elétrica difusa de íons ao redor das partículas e conseqüentemente, diminui o potencial de repulsão. Desta maneira, processos degradativos tal como a floculação e coagulação das partículas justificam o aumento do tamanho e a alta polidispersidade nas formulações com maior força iônica.

O qual é possível observar quando na Tabela 4, o ensaio 7, que mostra que a solução de lisozima que apresenta menor valor absoluto de potencial zeta ($\zeta = -2,1$) corresponde ao valor muito próximo ao ponto isoelétrico ($\zeta = 0$), corroborando com a teoria de DLVO (DERJAGIN; LANDAU; VERWEY; OVERBEEK, 1948). Esta descreve que quando a proteína apresenta ausência de cargas, as forças repulsivas são mínimas e as proteínas não são impedidas de aglomerar (Luxbacher (2014) e Malvern (2012)).

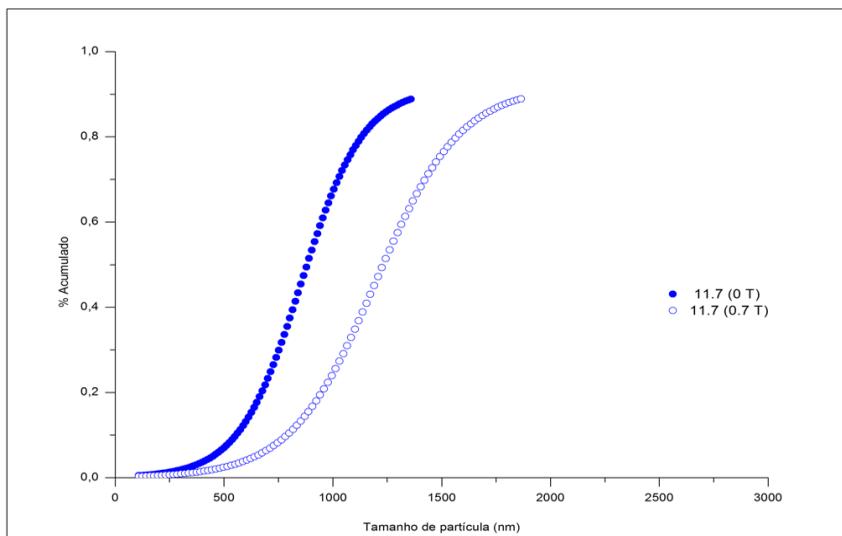
Estas justificativas também podem ser observadas na Figura 15 c, uma vez que o tamanho médio da lisozima a pH 13,7 apresentou um dos maiores valores absolutos de potencial zeta ($\zeta = 20$) sendo significativamente menor do que a solução de lisozima em pH 8,7 com potencial zeta ($\zeta = -2$).

Sendo assim, as maiores respostas de atividade enzimática foram encontradas nas soluções em que a combinação dos fatores: pH alcalino (13,7) e campo magnético na maior densidade de fluxo magnético (1,34 T), em que possivelmente ocasionaram em um desdobramento parcial da estrutura da lisozima, como foi observado pela análise de DC com a redução do teor de α -hélice, gerando um maior tamanho de partícula médio após exposição ao campo (Figura 15a e 15c) como conseqüência, os resíduos de aminoácidos que estão parcialmente desprotonados nesse pH, ficaram mais expostos e acessíveis a ionização pela ação do campo magnético, aumentando a atividade enzimática.

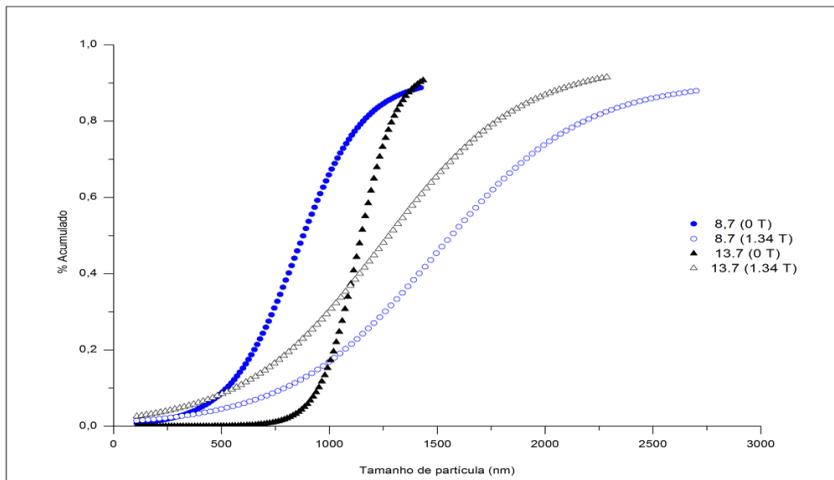
Figura 15 - Distribuição do tamanho de Partícula em função do pH, densidade de fluxo magnético e força iônica: (a) força iônica de 0 mmol.L^{-1} , (b) 25 mmol.L^{-1} e (c) 50 mmol.L^{-1} .



(a)



(b)



(c)

Estas observações estão em concordância com o encontrado por Schutz et al., (2008) os quais avaliaram o tamanho da enzima CALA em diferentes pHs. Os autores perceberam que quando o pH estava próximo ao ponto isoelétrico da enzima o tamanho da enzima aumentava drasticamente.

Reus (2006) avaliou a estabilidade *in vitro* de nanoesferas na presença de componentes de lisozima, observando que o tamanho de partícula das formulações sofreu uma elevação significativa, após duas horas de incubação com a solução de lisozima (ANOVA, $p < 0,05$). Comportamento, provavelmente, decorrente da interação da enzima com este sistema coloidal, já que, devido ao seu caráter catiônico, a lisozima apresenta capacidade de adsorver-se à superfície negativa das nanopartículas formadas modificando assim o diâmetro médio das partículas.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou o efeito do tratamento magnético estático, nas condições operacionais pH, força iônica e densidade de fluxo magnético na atividade catalítica da lisozima da clara de ovo, além de pequenos experimentos com recirculação e em ímã invertido.

Adicionalmente, foram realizadas caracterizações para a melhor condição do planejamento fatorial 2^3 comparando-a com a lisozima nativa.

O emprego da técnica de planejamento experimental mostrou que as variáveis de processo densidade de fluxo magnético e pH e a interação densidade de fluxo magnético e força iônica (NaCl) apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática da lisozima.

A aplicação de campo magnético na maior densidade de fluxo magnético (1,34 T) nos experimentos com maior pH (13,7) e força iônica (50 mM) resultou em um aumento de 56% na atividade enzimática, quando comparado a amostra nas mesmas condições de pH e força iônica mas sem exposição ao campo magnético.

A orientação dos polos magnéticos no formato de ímã invertido (N-N ou S-S) acarretou uma redução significativa da atividade catalítica da lisozima. Após estudos adicionais de fluorescência e testes com outras enzimas esta técnica de tratamento magnético, ao que parece, pode vir a auxiliar em processos de inativação enzimática.

O tratamento magnético da solução de lisozima nas melhores condições de pH (13,7) e força iônica (50 mM), recirculando a solução durante 2h em campo magnético de 1,34 T permitiu um aumento de 65% na atividade enzimática da lisozima. O tratamento magnético com recirculação da solução mostra-se mais vantajoso a nível industrial que o tratamento estático, permitindo o tratamento de maiores volumes de enzima em um curto tempo.

O aumento da ativação da lisozima causada pelo tratamento com campo magnético pode estar relacionado à redução do teor de α -hélice na estrutura secundária bem como o aumento da dimensão das partículas de lisozima, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

A lisozima submetida ao campo magnético estático de 1,34 T, tem sua atividade reduzida com o passar do tempo quando armazenada a temperatura ambiente de (25 °C), contudo a lisozima também tratada magneticamente, mas armazenada a 4 °C conserva sua atividade específica residual superior a 140% pelo período armazenado de 6h.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, W. W. C. et al. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 121, n. 1, p. 16–28, 2016.

APPENDINI, P., HOTCHKISS, J. H. Análise de embalagens de alimentos antimicrobiano inovador. **Food Science and Emerging Technologies**, v 3, n. 2, p. 113-126, 2002.

ALTINTAŞ, E. B. et al. Use of magnetic poly (glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. **Journal of Chromatography B**, v. 853, n. 1, p. 105–113, 2007.

ARANTES, Guilherme M.. Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 377-383, 2008.

BAŞAR, N. et al. Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 234–242, 2007.

BARROW, C. J. et al. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. **Journal of Molecular Biology**, v. 225, n. 4, p. 1075–1093, 1992.

BÜYÜKUSLU, N.; ÇELİK, Ö.; ATAK, Ç. The effect of magnetic field on the activity of superoxide dismutase. **Journal of Cell and Molecular Biology** v. 500, n. 1973, p. 57–62, 2006.

BUONOCORE, G. G. et al. Modeling the lysozyme release kinetics from antimicrobial films intended for food packaging applications. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1365-1370, 2003.

BILAL, M. et al. Characteristic features and dye degrading capability of agar-agar gel immobilized manganese peroxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 728–740, 2016.

BHARDWAJ, J.; ANAND, A.; NAGARAJAN, S. Biochemical and biophysical changes associated with magnetopriming in germinating

cucumber seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 67–73, 2012.

BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 63–74, 2004.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de Enzimas na Alimentação Animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259–272, 2005.

CALLEWAERT, L. et al. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 164–171, 2011.

CITADINI, A.P.S. **Estudos da dinâmica estrutural da proteína ligante de cálcio S100A12 humana e da lisozima T4**. 2011. Tese (Doutorado – Programa de Pós – Graduação em Ciência. Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, 2011.

COELHO, M.A.Z. **Tecnologia enzimática**. p. 8, 2008. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books/enzima>> Acesso em: 01 jun 2016.

CHUNG, W.; HANCOCK, R. E. . Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 25–32, 2000.

CONTE, A.; BRESCIA, I.; DEL NOBILE, M. A. Lysozyme/EDTA disodium salt and modified-atmosphere packaging to prolong the shelf life of burrata cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5289–5297, 2011.

DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, L. **Antimicrobials in food**. 3. ed. New York: Taylor & Francis, 2005. 706 p.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: **Biological tools**, 2006.

DLVO: K. J. IVES, J. Gregory, Surface forces in filtration, Proc. **Water Treat- ment Examination**, v. 15, p. 93-116, 1966.

DETLOFF, T.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems). **Powder Technology**, v. 174, n. 1-2, p. 50–55, 2007.

FAYAD, S. J. et al. Nanopartículas De Proteína Isolada De Soja Em Água: Efeito Da Força Iônica E Das Concentrações De Proteína E Surfactante Nanoparticles From Soybean Protein Isolate By Coacervation in Water: Effect of Ionic Strength and Concentration of Protein and. **Química Nova**, v. 38, n. 1, p. 91–96, 2015.

FILHO, M.S.D. **Campo magnético**. p. 3, 2005. Disponível em: <http://www.iag.usp.br/~eder/campo_magnetico.pdf>. Acesso em: 15 de dez 2016.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 83–90, 2000.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 83–90, 2003.

GERBAUX, V. et al. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* v. 48, p. 49-54, 1997.

GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 710–718, 2006.

GUISEPPI-ELIE, A.; CHOI, S. H.; GECKELER, K. E. Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 118–123, 2009.

GREENFIELD, N. J. FASMAN, G.D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, p. 4108 – 4116, out. 1969.

JAMBRAK, A. R. et al. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 121, n. 1, p. 15–23, 2014.

KASCHE, V.; SCHLOTHAUER, R.; BRUNNER, G. Enzyme denaturation in supercritical CO₂: Stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step. **Biotechnology Letters**, p. 569–574, 1988.

KATSENIOS, N. et al. Role of pulsed electromagnetic field on enzyme activity, germination, plant growth and yield of durum wheat. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 152–158, 2016.

KOBE, S. et al. Nucleation and crystallization of CaCO₃ in applied magnetic fields. **Crystal Engineering**, v. 5, n. 3-4, p. 243–253, set. 2002.

KUHN, G. O. et al. Synthesis of fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* commercial inulinase immobilized in montmorillonite pretreated in pressurized propane and LPG. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 750 – 760, 2013.

LERCHE, D.; SOBISCH, T. Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 440, p. 122–130, 2014.

LIU, Y. et al. Effects of static magnetic field on activity and stability of immobilized α -amylase in chitosan bead. **Catalysis Communications**, v. 11, n. 5, p. 364–367, 2010.

LI-CHAN, E. C.; POWRIE, W. D.; NAKAI, S. The chemistry of eggs and egg products. In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg science and technology**, Food Product Press, p 105-175, 1995.

LI, Q. et al. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 2016.

LIMA, U. A.; et al. **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: EdgardBlüncher Ltda, 2001..

LOPES, L. C. et al.; for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, p. 1058. 2015.

LUXBACHER, T. **The zeta guide**: principles of the streaming potential technique. 1.ed. Anton Paar GmgH, 2014. 123p.

MANERA, A. P. et al. Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of [beta]-galactosidase. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1235–1240, 2011.

MCGINLEY, J. V. M.; RISTIC, M.; YOUNG, I. R. A permanent MRI magnet for magic angle imaging having its field parallel to the poles. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 271, p. 60–67, 2016.

MALVERN. **Zetasizer Nano Series User Manual**. Malvern Instruments Ltd., 2012. 270p. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/user-manuals/MAN0485EN.aspx>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

MAKKI, F.; DURANCE, T. D. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 635–645, 1996.

NATTRESS, F.; YOST, C.; BAKER, L. . Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 111–119, 2001.

PADGETT, T.; HAN, I.Y. e DAWSON, P.L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal of Food Protection**, n.10, p 1265 – 1407, out. 1998.

PENG, Z. G.; HIDAJAT, K.; UDDIN, M. S. Adsorption and desorption of lysozyme on nano-sized magnetic particles and its conformational changes. **Colloids and surfaces, Biointerfaces**, v. 35, n. 3-4, p. 169–74, 1 jun. 2004.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 373–380, 2002.

RAN, J. et al. Characterization of cellulase under various intensities of static magnetic fields. **Catalysis Communications**, v. 11, n. 2, p. 91–95, out. 2009.

REUS, M. Desenvolvimento E Avaliação Biofarmacêutica De Sistemas Coloidais Como Carreadores Para a Administração Ocular Do Agente Antitumoral 5-Fluorouracil. 2006. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ROSEN, A. D. Mechanism of Action of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Biological Systems. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 39, p. 163–173, out. 2003.

SILVA, F. L. Efeito de campo magnetico sobre as características fisico-químicas de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) e seu desempenho na ultrafiltração. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SOFOS, J. N. et al. Naturally occurring antimicrobials in foods. **Council for Agricultural Science and Technology**. p.103, 1998

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 108–114, 2014.

SULLIVAN, J. et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 386–396, 2014.

SCHULTZ, N. et al. Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 39–44, 2008.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1985.

TANG, J. et al. Effects of magnetic treatment on growth and immune and digestive enzyme activity in the juvenile sea cucumber *apostichopus japonicus* (Selenka). **Aquaculture**, v. 435, p. 437–441, 2015.

TIPLER, P. A.; MOSCA, G. **Física para cientistas e engenheiros: eletricidade e magnetismo, óptica**. v. 2. 499 p, 2009.

TU, R. et al. Effect of static magnetic field on the oxygen production of

Scenedesmus obliquus cultivated in municipal wastewater. **Water Research**, v. 86, p. 132–138, 2015.

THAMMASIRIRAK, S. et al. Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 209–217, 2006.

TORREGGIANI, A. et al. Radiation damage of lysozyme in a biomimetic model: some insights by Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 744-747, p. 767–773, jun. 2005.

VARDANEGA, R. et al. Effect of magnetic field on the ultrafiltration of bovine serum albumin. **Bioprocess Biosyst Eng.** p. 1087–1093, 2013.

VASHISTH, A.; NAGARAJAN, S. Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. **Journal of Plant Physiology**, p 149 - 146, 2010.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. Cambridge: United Kingdom, 2010. 399 p.

YU, Z. et al. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 930–936, 2014.

ZIN, G. Efeito de campo magnético no desempenho da ultrafiltração de soluções proteicas utilizando membrana polimérica. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ZHAO, W.; YANG, R. The effect of pulsed electric fields on the inactivation and structure of lysozyme. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 334–343, 2008.

ZHONG, K. et al. Inactivation and conformational change of horseradish peroxidase induced by pulsed electric field. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 473–479, set. 2005.

ANEXO A

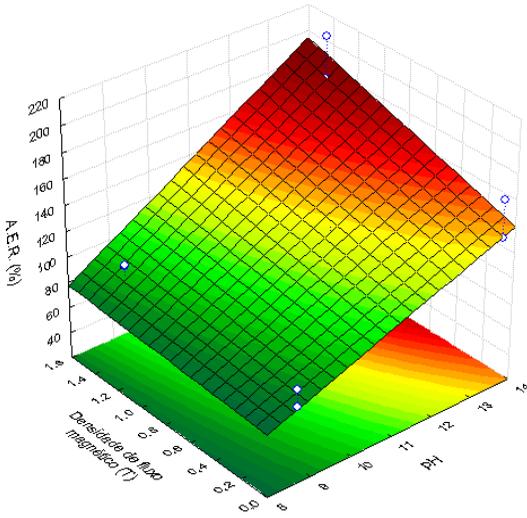
Tabela 10 - Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento 2^3 para atividade específica residual da lisozima.

Fatores	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(2)	<i>p</i>
Média*	120,82	0,86	140,51	0,000051
(1) pH*	75,79	2,01	37,87	0,00069
(2) Força iônica	-1,84	2,01	-0,91	0,46
(3) Densidade de fluxo magnético*	28,57	2,01	14,19	0,0049
1X2	3,98	2,01	1,98	0,18
1X3*	16,21	2,01	8,053	0,015
2X3*	18,77	2,01	9,33	0,011

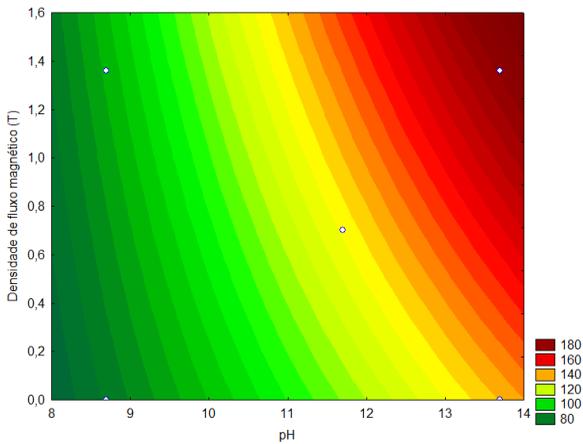
*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,1$)

ANEXO B

Figura 16 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica residual AER (%) da lisozima em função da força iônica (Mm) e da densidade de fluxo magnético (T).

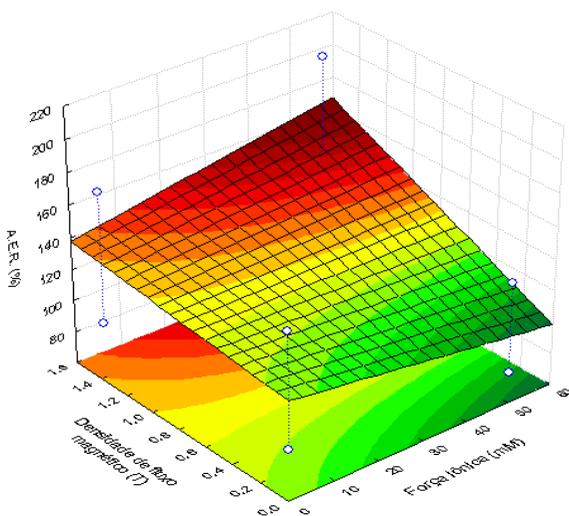


(a)

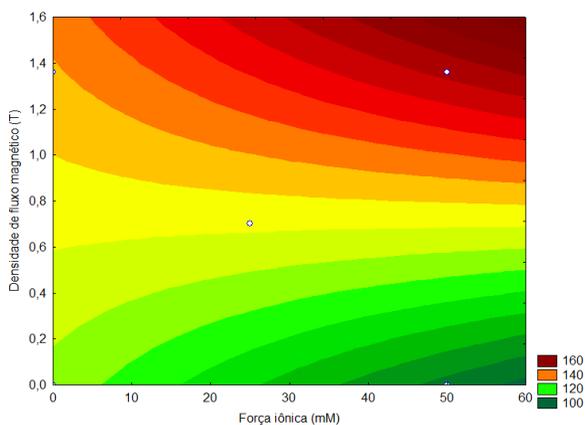


(b)

Figura 17 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica residual AER (%) da lisozima em função da força iônica (mM) e da densidade de fluxo magnético (T).



(a)



(b)

ANEXO C

Figura 18 - Análise DC para: lisozima nativa (0,15 T); lisozima nativa (0 T); lisozima no pH de 13,7 e submetida a um campo magnético de 0,15 T.

