

Marina de Souza Melchiors

**EFEITO DO TRATAMENTO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS
NA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA LISOZIMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof^o. Dr. Agenor Furigo Junior.

Coorientador: Dr. Josamaique Gilson Veneral.

Florianópolis
2017

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

Melchiors, Marina de Souza

Efeito do tratamento com fluidos pressurizados na conformação estrutural e atividade enzimática da Lisozima. / Marina de Souza Melchiors ; orientador, Agenor Furigo Junior ; coorientador, Josamaique Gilson Veneral - Florianópolis, SC, 2017.

98 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Alta pressão. 3. Dióxido de Carbono supercrítico. 4. Conformação estrutural. 5. Enzima. I. Furigo Junior, Agenor. II. Gilson Veneral, Josamaique. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Marina de Souza Melchiors

**EFEITO DO TRATAMENTO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS
NA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA LISOZIMA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 23 de Fevereiro de 2017.

Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a
Coordenador do Curso

Prof. Agenor Furigo Junior, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Josamaique Gilson Veneral, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Hernán Francisco Terenzi, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Lindomar Alberto Lerin, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Lanza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela constante presença em minha vida.

Agradeço aos meus queridos orientadores Dr. Agenor Furigo Junior e Dr. Josamaique Gilson Veneral pela confiança depositada, pelos ensinamentos e pela orientação deste trabalho.

À Dra. Débora de Oliveira pelas conversas, pelas sugestões, pela amizade e pelo incentivo. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao Dr. Marco Di Luccio pelos conhecimentos repassados, pelo apoio necessário e pelo fornecimento de materiais, possibilitando o desenvolvimento da dissertação.

Aos meus pais Ana Aparecida de Souza e Lotário Melchior por todo apoio necessário, por acreditarem em mim, pelo incentivo, pela paciência, pela compreensão. Vocês são meus pilares, obrigada por contribuir à formação da pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos Michele e Mathias pelo incentivo em mais esta conquista e por estarem ao meu lado mesmo com a distância.

Ao meu amor Bruno Facin, pelo carinho, compreensão, pela boa companhia, cumplicidade, amor e apoio oferecidos.

A todos meus familiares que independentemente de onde eu esteja estão sempre torcendo por mim, em especial a “Tia Fabi”, tia e amiga querida que me incentivou a trilhar este caminho.

Aos meus amigos queridos pelo apoio, pelo incentivo, pelas conversas, pela amizade, pelos momentos de felicidade e descontração.

Aos amigos do LABSEM e LATESC, que me acolheram, e sempre estiveram presentes durante esses dois anos de mestrado.

Ao aluno de iniciação científica Marcos Castiani pela ajuda.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural, Universidade Federal de Santa Catarina (CEBIME-UFSC), sob a coordenação do Prof. Dr. Hernán Terenzi, por todo apoio, carinho e disponibilidade na realização de análises importantes para o trabalho.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, e que contribuíram à minha formação profissional e pessoal.

“A única coisa que devemos temer é o próprio medo. Porque é limitante e evita avanços.”

Franklin Roosevelt

RESUMO

A possibilidade de incremento na atividade enzimática oriunda da interação entre as enzimas e os fluidos pressurizados vem impulsionando inúmeras pesquisas na área da enzimologia. A tecnologia de alta pressão é uma técnica promissora como pré-tratamento de enzimas e o estudo das alterações das estruturas dos biocatalisadores são importantes, uma vez que há poucos trabalhos publicados na literatura e existe a necessidade de desvendar algumas indefinições sobre a estabilidade e a atividade enzimática em fluidos pressurizados. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo investigar a influência da pressão, força iônica e taxa de despressurização na atividade e conformação estrutural da lisozima, utilizando CO₂ supercrítico (scCO₂), GLP e R134a como solventes. Para tanto, os experimentos foram realizados utilizando um reator de volume variável sob tempo de exposição de 2 h, temperatura de 40 °C, variando a pressão (100 a 200 bar), taxa de despressurização (10 a 50 bar.min⁻¹) e concentração de cloreto de sódio (0 a 50 mmol.L⁻¹). Planejamentos experimentais 2³ e 2² com três repetições no ponto central foram utilizados para identificar o efeito das variáveis do processo bem como das possíveis interações entre elas na perda/ganho da atividade da lisozima. Por fim, estudos de estabilidade da enzima em baixas temperaturas (4 °C e -10 °C) após tratamento com fluidos pressurizados também foram realizados. A maior atividade residual observada foi de 141,01 ± 1,80 % para a condição de 150 bar e taxa de despressurização de 30 bar.min⁻¹, sem o CO₂ em contato com a enzima. As análises de alterações conformacionais da enzima demonstraram que a estrutura primária permaneceu inalterada em todas as condições estudadas. Em termos de estrutura secundária e terciária as análises mostraram alterações conformacionais da lisozima para as condições testadas. Estes estudos permitiram uma melhor compreensão das alterações da estrutura da enzima em pressões elevadas, resultando em uma melhor utilização e otimização das condições experimentais em processos de biocatálise futuros.

Palavras-chave: Alta pressão. CO₂ supercrítico. GLP. R134a. Biocatálise. Conformação estrutural. Enzima.

ABSTRACT

The possibility of increase in the enzymatic activity from the interaction between the enzymes and the pressurized fluids has stimulated numerous researches in enzymology. High-pressure technology is a promising technique as a pretreatment enzyme and the study of changes in the structure of the biocatalysts are important, since there are few papers published in the literature and there is a need to reveal some uncertainties about the stability and enzymatic activity in pressurized fluids. In this context, the objective of this work was to investigate the influence of pressure, ionic strength and depressurizing rate on the activity and structural conformation of the lysozyme using supercritical CO₂ (scCO₂), GLP and R134a as solvents. For this purpose, the experiments were carried out using a variable volume reactor under a 2 h exposure time, at a temperature of 40 °C, varying the pressure (100 to 200 bar), the depressurizing rate (10 to 50 bar.min⁻¹) and concentration of sodium chloride (0 to 50 mmol.L⁻¹). Experimental design 2³ e 2² with three replications at the center point were used to identify the effect of process variables and the possible interactions among them in the loss/gain of the lysozyme activity. Finally, enzyme stability studies at low temperatures (4 °C and -10 °C) after treatment with pressurized fluids were also performed. The highest residual activity observed was 141.01 ± 1.80 % for the condition of 150 bar and depressurizing rate of 30 bar.min⁻¹, with no CO₂ in contact with the enzyme. The lowest residual activity was 88.3 % for the 200 bar condition and 10 bar.min⁻¹ depressurizing rate, with CO₂ in contact with the enzyme. Analyzes of conformational changes of the enzyme demonstrated that the primary structure remained unchanged in all conditions studied. The secondary and tertiary structure analyzes showed conformational changes of lysozyme for the conditions tested. These studies allowed a better understanding of the changes in the enzyme structure at high pressures, resulting in a better use and optimization of the experimental conditions in future biocatalysis processes.

Keywords: High pressure. Supercritical CO₂. GLP. R134a. Biocatalysis. Structural conformation. Enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.....	32
Figura 2 - Estrutura cristalográfica de raios-X da Lisozima. Os terminais N e C são indicados. As α -hélices 1-4 ($\alpha 1 - \alpha 4$) estão ilustrados como cilindros vermelhos e numerados sequencialmente a partir do N-terminal para o C-terminal. As β -folhas 1-3 ($\beta 1 - \beta 3$) são mostradas como setas amarelas que apontam da N- para a extremidade C-terminal. As localizações do domínio α (composto pelos resíduos 1-39 e 89-129), o domínio β (composto pelos resíduos 40-88) e a fenda catalítica entre estes dois domínios estão indicados. As espinhas dorsais polipeptídicas pertencentes às regiões de curva e de bobina aleatória são mostradas em azul e verde, respectivamente. Os oito resíduos de cisteína que formam as quatro ligações dissulfeto também estão identificados.	34
Figura 3 - Esquema de Dicroísmo Circular, em que a diferença na absorção é medida.	40
Figura 4 - Vista geral da unidade experimental para o tratamento das enzimas em fluido pressurizado. A – reservatório de solvente; B/H – banhos termostáticos; C – bombas de seringa; D – transdutor e indicador de pressão; E – célula encamisada de volume variável de aço inoxidável; F/G– válvulas micrométricas para alimentação e pressurização/despressurização, respectivamente, I – indicador de temperatura, J – Descarga do gás.	48
Figura 5 - Atividades residuais das enzimas PtpB, YopH e Lisozima tratada em sistema CO ₂ pressurizado. Condição experimental: 200 bar; taxa de depressurização 30 bar.min ⁻¹ ; temperatura de 32,0 ± 0,5 °C; tempo de exposição de 2 h, razão mássica de enzima:CO ₂ 1:1. Atividade média das enzimas controle: PtpB 20,30 ± 0,05 U.mg ⁻¹ , YopH 50,30 ± 0,42 U.mg ⁻¹ , Lisozima 114789,80 ± 1202,82 U.mg ⁻¹	56
Figura 6 - Diagrama de Pareto para a lisozima no sistema dióxido de carbono pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática residual obtida.	59
Figura 7 - Diagrama de Pareto para o tratamento (a alta pressão) da lisozima sem o uso de solvente em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática residual obtida.	60
Figura 8 - Dados de atividade residual variando força iônica. Condições Experimentais: Amostra tratada 150 bar, depressurização 30 bar.min ⁻¹ ; temperatura 40,0 ± 0,5 °C; tempo tratamento 2 h. As medidas de atividade foram realizadas a 25 ± 2 °C.	62

Figura 9 - Cinética do tratamento da lisozima com e sem o solvente scCO ₂ e com (25 mmol.L ⁻¹) e sem força iônica no meio. Condições experimentais: tempo de tratamento 2 horas; Temperatura de 40,0 ± 0,5 °C; Razão mássica de solução enzimática/solvente de 1:1 (m/m).	64
Figura 10 - Tratamento da lisozima com diferentes fluidos pressurizados (scCO ₂ /GLP/R134a). Condições experimentais: pressão de 150 bar; força iônica de 25 mmol.L ⁻¹ ; taxa de despressurização de 30 bar.min ⁻¹ ; tempo de tratamento de 2 horas; Temperatura de 40,0 ± 0,5 °C; Razão mássica de solução enzimática/solvente de 1:1 (m/m). Controle = solução enzimática sem tratamento.	65
Figura 11 - Espectros de massa da lisozima tratada em diferentes condições experimentais. (a) Amostra controle; (b) 150 bar; sem adição externa de força iônica; 30 bar.min ⁻¹ , sem o uso de solvente (scCO ₂); (c) 150 bar; 25 mmol.L ⁻¹ ; 30 bar.min ⁻¹ , com o uso de scCO ₂ como solvente para a solução enzimática; (d) 200 bar; sem adição externa de força iônica; 10bar.min ⁻¹ , com o uso de scCO ₂ como solvente para a solução enzimática.	68
Figura 12 - Espectros de massa da lisozima tratada com diferentes fluidos pressurizados na condição experimental de 150 bar; 25 mmol.L ⁻¹ ; 30 bar.min ⁻¹ . (a) Amostra controle; (b) Com GLP; (c) Com R134a.	69
Figura 13 - Espectros de dicroísmo circular da Lisozima em diferentes condições experimentais. Parâmetros utilizados: As medidas foram realizadas a 25 °C; concentração de 0,5 mg.mL ⁻¹ de lisozima em água Milli Q; espectro obtido como média de três leituras subtraído do espectro de água Milli Q no Espectropolarímetro J-815; varredura de 190-260 nm e cubeta de quartzo de 0,01 cm de caminho ótico.	71
Figura 14 - Espectros de dicroísmo circular da Lisozima tratada com GLP/scCO ₂ / R134a. Condição experimental: 150 bar, 30 bar.min ⁻¹ , 25 mmol.L ⁻¹ . Parâmetros utilizados: As medidas foram realizadas a 25 °C; concentração de 0,5 mg.mL ⁻¹ de lisozima em água Milli Q; espectro obtido como média de três leituras subtraído do espectro de água Milli Q no Espectropolarímetro J-815; varredura de 190-260 nm e cubeta de quartzo de 0,01 cm de caminho ótico.	73
Figura 15 - Espectro de emissão de fluorescência da Lisozima em diferentes condições experimentais. Medidas realizadas a 25 °C; comprimento de onda de excitação de 280 nm, dados de emissão de fluorescência coletados entre 300 a 500 nm; aberturas de fenda de 20 nm para excitação e emissão, espectros obtidos como média de três leituras.	76

Figura 16 - Espectro de emissão de fluorescência da Lisozima tratada com diferentes fluidos pressurizados. Condição experimental: 150 bar, 30 bar.min ⁻¹ , 25 mmol.L ⁻¹ . Medidas realizadas a 25 °C; comprimento de onda de excitação de 280 nm, dados de emissão de fluorescência coletados entre 300 a 500 nm; aberturas de fenda de 20 nm para excitação e emissão, espectros obtidos como média de três leituras.....	77
Figura 17 - Espectro de emissão de fluorescência da água mais GLP. Condição experimental: 150 bar, 30 bar.min ⁻¹ , 25 mmol.L ⁻¹ . Medidas realizadas a 25 °C; comprimento de onda de excitação de 280 nm, dados de emissão de fluorescência coletados entre 300 a 500 nm; aberturas de fenda de 20 nm para excitação e emissão, espectros obtidos como média de três leituras.	79
Figura 18 - Estabilidade da Lisozima tratada com (CO ₂ / GLP/ R134a) e sem solvente para as amostras armazenadas durante 6 horas a 4 °C e congelamento rápido em N ₂ líquido (-196 °C) seguido de armazenamento a -10 °C.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 (com triplicata no ponto central) para o tratamento com CO_2 pressurizado...	49
Tabela 2 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 (com triplicata no ponto central) para o tratamento sem CO_2 em contato com a solução de enzima.	50
Tabela 3 - Atividade residual (%) da lisozima na forma livre após tratamento com scCO_2 como solvente para a amostra. Condições operacionais: tempo de processamento de 2 h; Temperatura de trabalho de $40,0 \pm 0,5$ °C.	57
Tabela 4 - Atividade residual (%) da lisozima após tratamento com alta pressão e sem o uso de solvente para a amostra. Condições operacionais: tempo de processamento de 2 h; Temperatura de trabalho de $40,0 \pm 0,5$ °C; sem adição externa de força iônica no meio.....	60
Tabela 5 - Elementos de estrutura secundária da Lisozima antes e depois do tratamento com fluido pressurizado. As porcentagens de estruturas secundárias foram calculadas utilizando o programa K2D3 a partir dos valores de elipticidade molar obtidos na Figura 13.....	72
Tabela 6 - Elementos de estrutura secundária da Lisozima antes e depois do tratamento com $\text{GLP/scCO}_2/\text{R134a}$, condição experimental de 150 bar, 25 mmol.L^{-1} , 30 bar.min^{-1} . As porcentagens de estruturas secundárias foram calculadas utilizando o programa K2D3 a partir dos valores de elipticidade molar obtidos na Figura 14.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRL7	<i>Candida rugosa</i> Lip7
DC	Dicroísmo Circular
DTT	Ditiotreitól
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E _a	Energia de ativação
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GLP	Gás Liquefeito do Petróleo
K _m	Constante de Michaelis–Menten
LC-MS	Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida
m/z	Relação massa /carga
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
P	Pressão
P _c	Pressão crítica
pH	Potencial hidrogeniônico (-log [H ⁺])
pI	Ponto Isoelétrico
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfato
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B de <i>M. tuberculosis</i>
R134a	1,1,1,2-tetrafluoroetano
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
T	Temperatura
T _c	Temperatura crítica
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Tris	Tris-hidroximetilaminoetano
Trp	Triptofanos residuais
Try	Tirosinas residuais
UV	Ultravioleta
V _{máx}	Velocidade máxima
YopH	<i>Yersinia outer protein</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

A_E	Atividade específica
A_λ	Absorbância de um dado comprimento de onda
c	Concentração molar
l	Caminho ótico
ε	Coefficiente de extinção molar
ε'	Constante dielétrica
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Emissão máxima

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 Objetivo Geral	29
1.1.2 Objetivos Específicos.....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 ENZIMAS E ASPECTOS GERAIS DA ESTRUTURA	31
2.1.1 Proteínas tirosina fosfatases de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (PtpB) e <i>Yersinia enterocolitica</i> (YopH).....	32
2.1.2 Lisozima	33
2.2 PRINCÍPIO DA TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO.....	35
2.2.1 Tratamento de enzimas com fluidos pressurizados.....	36
2.2.2 Conformação estrutural de enzimas a alta pressão.....	37
2.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS	40
2.3.1 Dicroísmo circular	40
2.3.2 Espectroscopia de fluorescência.....	42
2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 MATERIAL	45
3.2 MÉTODOS	46
3.2.1 Tratamento com fluidos pressurizados	46
3.2.1.1 Aparato Experimental	47
3.2.1.2 Procedimento Experimental.....	48
3.2.2 Delineamento Experimental	49
3.2.3 Estudo cinético.....	50
3.2.4 Avaliações de estabilidade da Lisozima a baixas temperaturas	50
3.2.5 Determinação das atividades enzimáticas	50
3.2.5.1 PtpB e YopH.....	50
3.2.5.2 Lisozima	51
3.2.6 Determinações analíticas e caracterização da solução	52
3.2.6.1 Espectroscopia de Massa (MALDI-TOF)	52
3.2.6.2 Dicroísmo Circular (DC).....	52
3.2.6.3 Fluorescência.....	53
3.2.6.4 Determinação de Ácido Carbônico e pH	53
3.2.7 Análise estatística	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 SELEÇÃO DA ENZIMA DE TRABALHO.....	55

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LISOZIMA APÓS O TRATAMENTO A ALTA PRESSÃO	56
4.2.1 Tratamento com scCO₂ como solvente.....	56
4.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO PRESSURIZADO SEM O USO DE SOLVENTE.....	59
4.4 EFEITO DA FORÇA IÔNICA NO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM scCO ₂	61
4.5 ESTUDO CINÉTICO	63
4.6 ATIVIDADE DA LISOZIMA TRATADA COM DIFERENTES FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	64
4.7 MODIFICAÇÕES CONFORMACIONAIS DA LISOZIMA	67
4.7.1 Espectroscopia de Massa (MALDI-TOF)	67
4.7.2 Dicroísmo Circular (DC)	69
4.7.3 Alterações no microambiente dos triptofanos monitoradas por fluorescência	74
4.8 ESTABILIDADE DA LISOZIMA À BAIXA TEMPERATURA .	79
5 CONCLUSÃO	83
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os efeitos de vários compostos e técnicas convencionais sobre a atividade e estabilidade de enzimas têm sido extensivamente relatados e identificados. Estas melhorias têm sido abordadas por modificação química, física ou genética. No entanto, a influência de novas e promissoras abordagens, como por exemplo a modificação estrutural enzimática pelo uso de altas pressões ainda encontra-se em curso.

O método aplicando alta pressão consiste em submeter uma amostra, neste caso a solução com enzima, à alta pressão dentro de um vaso pressurizado utilizando um meio que transfere pressão à amostra (CAMPOS et al., 2003). A utilização de fluidos pressurizados como solventes para reações químicas e bioquímicas apresenta vantagens promissoras no sentido de eliminar traços de solventes líquidos convencionais dos produtos da reação. E, processos industriais empregando condições próximas ao ponto crítico podem ser vantajosos em termos de consumo de energia, facilidade de recuperação do produto e minimização da formação de produtos secundários (KNEZ et al., 1998; KNEZ, 2009; HABULIN; KNEZ, 2002).

Processos utilizando alta pressão mostraram potenciais para melhorar o desempenho de enzimas, aumentando a sua estabilidade e seletividade (MOZHAEV et al., 1996; EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009; HERBST; PEPPER; NIEMEYER, 2012; HERBST et al., 2014 e ZHAO et al., 2015). Contudo, a investigação da conformação estrutural enzimática (por diferentes métodos de análise) após a aplicação de altas pressões com o objetivo de melhorar a catálise enzimática têm sido pouco exploradas. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo, o emprego de diferentes meios pressurizados (diferentes solventes) sobre a atividade, estabilidade e conformação estrutural da lisozima.

A lisozima catalisa a quebra de ligações β 1-4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, presentes no peptidoglicano da parede celular bacteriana (JOLLÈS, 1969). Esta foi a primeira proteína a ter sua estrutura sequenciada, análise de cristalografia completa e mecanismo de ação detalhado (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984). Apresenta ampla aplicação em alimentos e nas áreas farmacológicas e terapêuticas (SARAVANAN et al., 2009; CALLEWAERT et al., 2011). A utilização dessa enzima como modelo

no presente trabalho justifica-se por ser uma proteína com estrutura amplamente conhecida, além de suas importantes aplicações acadêmica e industrial. Contudo, outras enzimas foram inicialmente testadas antes de definir a enzima a ser enfatizada.

A utilização da tecnologia de alta pressão é comumente conhecida como um método que provoca a desnaturação de proteínas (HEREMANS, 1982; MOZHAEV et al., 1996), no entanto, mais de 25 enzimas têm sido relatadas com melhores desempenhos sob pressões elevadas (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009). Enzimas submetidas às pressões elevadas sofrem alterações pontuais na estrutura da proteína, que pode ser utilizado para analisar as modificações estruturais e de função durante a reação catalítica. Essas mudanças podem afetar a atividade, seletividade e estabilidade da enzima (BALNY, 2004; EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009). Porém, o comportamento de uma proteína após o contato com meios pressurizados dificilmente pode ser definido a partir de características estruturais conhecidas e requer um estudo aprofundado pelo uso de testes individuais e específicos.

Contudo, mesmo após décadas de pesquisa explorando o uso de altas pressões como tratamento enzimático, muitas questões ainda carecem de respostas mais satisfatórias em relação ao comportamento físico-químico presente neste tipo de tecnologia. Boa parte destas questões surge devido ao uso ainda pouco explorado das técnicas óticas na leitura das modificações estruturais enzimáticas causadas pelo contato com fluidos à alta pressão. Neste sentido, boa parte dos trabalhos atêm-se a atividade residual e estabilidade de atividade enzimática obtidas pós-tratamento e não nas modificações estruturais enzimáticas causadas pelo tratamento.

Dessa forma, a presente pesquisa apresenta potencial em desvendar algumas indefinições sobre a estabilidade e atividade enzimática por meio de um estudo detalhado da conformação estrutural pós-tratamento a alta pressão com diferentes fluidos comerciais, bem como, ajudar a fomentar os bancos de dados experimentais da área. Para a medição das alterações conformacionais serão utilizados os métodos de espectroscopia de massa (MALDI-TOF/TOF), dicroísmo circular (DC) e espectroscopia de fluorescência.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as implicações do tratamento com fluidos pressurizados sobre a atividade, estabilidade e conformação estrutural da lisozima.

1.1.2 Objetivos Específicos

De forma a alcançar o objetivo geral almejado, lançou-se mão dos seguintes objetivos específicos:

- Estudar o efeito das variáveis de processo (pressão, taxa de despressurização e força iônica) na atividade específica residual da enzima comercial Lisozima (1,4- β -N-acetilmuramidase, EC 3.2.1.17) em sua forma livre;
- Avaliar o efeito de diferentes fluidos pressurizados (CO₂, GLP e R134a) sobre a atividade enzimática e conformação estrutural da enzima alvo;
- Avaliar o efeito de diferentes tempos de exposição na atividade enzimática da lisozima submetida ao tratamento pressurizado com scCO₂;
- Determinar as estruturas primária, secundária e terciária da enzima em seu estado livre tratada e não tratada com os fluidos pressurizados;
- Analisar as possíveis modificações estruturais da enzima quando submetidas a diferentes fluidos pressurizados;
- Avaliar a estabilidade enzimática (pós-tratamento em fluidos pressurizados) em relação ao tempo e temperatura de armazenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo expõe uma breve revisão da literatura sobre o contexto no qual o trabalho se insere. Primeiramente, será introduzida uma abordagem geral sobre a estrutura das proteínas e as principais características das enzimas utilizadas no trabalho. Em seguida serão abordados trabalhos que demonstram a utilização da alta pressão como tratamento prévio de enzimas. Serão apresentados conceitos teóricos sobre a técnica de alta pressão utilizando CO₂ supercrítico, gás liquefeito do petróleo (GLP) e 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134a). Uma breve revisão sobre os principais métodos para avaliação das alterações conformacionais: o dicróismo circular (DC), e espectroscopia de fluorescência também serão descritos.

2.1 ENZIMAS E ASPECTOS GERAIS DA ESTRUTURA

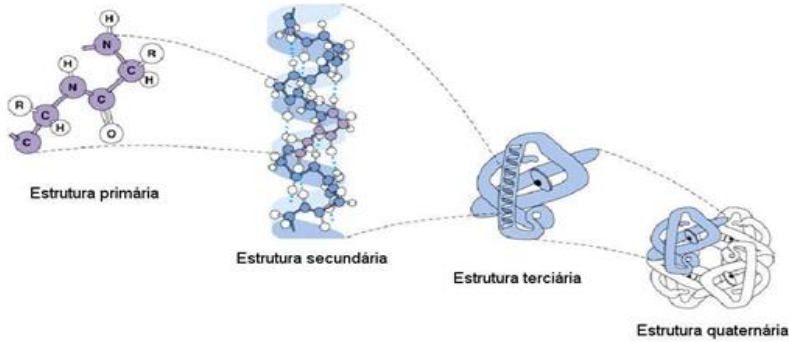
As enzimas são eficientes biocatalisadores de reações metabólicas sob diversas condições de pH, temperatura, meio iônico, pressão, concentrações salinas, entre outros. Elas possuem um sítio ativo, local específico para reações com determinado substrato. Esta região é geralmente constituída de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia proteica e de um grupo não-proteico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima, além de designar sua especificidade (ELLIOTT; ELLIOTT, 1997; LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A estrutura molecular das enzimas é dividida em níveis distintos de organização: primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 1) (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). A estrutura primária, a qual é definida como a sequência de aminoácidos e a localização das ligações dissulfeto (caso houver), fornece uma descrição completa das ligações covalentes de uma proteína. A estrutura secundária refere-se à forma em que as configurações da cadeia polipeptídica formada por α -hélices ou β -folhas intra ou intermoleculares estão organizadas por meio das ligações de hidrogênio. A estrutura terciária descreve a forma como os domínios da estrutura secundária dobram em uma configuração tridimensional, a partir de interações não covalentes entre cadeias laterais dos aminoácidos. A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial de subunidades, mantidas unidas por ligações não covalentes entre as subunidades polipeptídicas (proteínas multiméricas) (BERKOWITZ; HOUE, 2015).

As proteínas são estruturas sensíveis, mantidas através de interações dentro da cadeia, determinada pela sequência de aminoácidos

e por interações com o solvente circundante (JAENICKE, 1991). Mudanças nos fatores externos, como pressão e temperatura, podem perturbar o equilíbrio intramolecular e as interações solvente-proteína, podendo levar a um completo/parcial desdobramento, ocasionando a desnaturação da cadeia polipeptídica ou aumento da atividade catalítica (HENDRICKX et al., 1998).

Figura 1 - Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.



Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (1995).

2.1.1 Proteínas tirosina fosfatases de *Mycobacterium tuberculosis* (PtpB) e *Yersinia enterocolitica* (YopH)

As enzimas descritas a seguir são usadas no presente trabalho como enzimas modelo para os testes preliminares. Para tanto, foi realizado um levantamento bibliográfico das principais características pertinentes as duas enzimas não comerciais, em termos de função, estrutura, faixa ótima de pH e temperatura.

A YopH é uma tirosina fosfatase que atua desfosforilando moléculas sinalizadoras e impedindo a fagocitose em macrófagos (NAVARRO; ALTO; DIXON, 2005). Essa enzima é produzida pelas bactérias patogênicas do gênero *Yersinia* (KE et al., 2012), possui massa molecular de 51 kDa, 468 aminoácidos e dois domínios: o domínio N-terminal, que contém uma região ligadora de chaperona (molécula que auxilia a proteína a assumir a configuração apropriada ao desempenho de suas tarefas) (ALVES FILHO, 2008) e um domínio de ligação ao substrato (BLACK et al., 1998; KHANDELWAL et al., 2002) e o domínio C-terminal (aminoácidos 163 a 468), que possui atividade catalítica (WHITTIER; LORIA, 2013). Por fim, o sítio catalítico está

entre os resíduos de aminoácidos 403 e 410, onde a cisteína catalítica está na posição 403. Além disso, é uma proteína composta por uma mistura de padrões estruturais de folhas β e α -hélices (WHITTIER; LORIA, 2013). A temperatura ótima de atuação da enzima é de 37 °C e pH 5 (ZHANG et al., 1992; KIM et al., 2011).

A PtpB também é uma tirosina fosfatase, porém produzida pelo *Mycobacterium tuberculosis*, possui massa molecular de 30 kDa, tem tripla especificidade, sendo capaz de desfosforilar fosfoinositídeos, resíduos de fosfotirosina e fosfoserina/treonina (BERESFORD et al., 2007). A estrutura tridimensional da PtpB apresenta duas características distintas, com dois sítios de ligação ao fosfato e duas α -hélices que cobrem e protegem o sítio ativo como uma tampa (MENEGATTI, 2014). A faixa de pH ótimo de atuação da enzima é de 5,5 a 5,8 e temperatura de 37 °C (KOUL et al., 2000; BERESFORD et al., 2007).

Como a YopH e a PtpB são enzimas não comerciais, comumente utilizadas na área da bioquímica, farmacologia e química, optou-se em realizar testes a alta pressão, a fim de ampliar estudos das alterações de atividade catalítica após o tratamento. Ao mesmo tempo, não existem dados na literatura em que elas foram tratadas com fluidos supercríticos e há a necessidade de desvendar o comportamento de diferentes enzimas em tais fluidos.

2.1.2 Lisozima

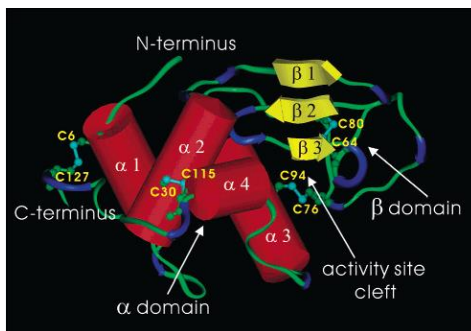
Outra enzima utilizada no trabalho foi a Lisozima (1,4- β -N-acetilmuramidase, EC 3.2.1.17), ela é um polipeptídeo de cadeia simples de 129 aminoácidos reticulada com quatro pontes dissulfeto (JOLLÈS, 1969). Foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming em 1922, pode ser encontrada nas lágrimas, saliva, mucosa nasal e outras secreções do corpo do homem e em bactérias, fungos, plantas e animais (CALLEWAERT; MICHIELS, 2010; LEYSEN et al., 2011). É uma enzima globular com atividade antibactericida, atua causando a lise de células bacterianas específicas por meio da hidrólise das ligações glicosídicas de oligossacarídeos presentes nas paredes celulares desses micro-organismos. Sua ação é mais efetiva em bactérias Gram-positivas, uma vez que, a parede celular é mais acessível (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005; HOLLER; RUPLEY; HESS, 1975).

A lisozima utilizada nesse trabalho é uma enzima pequena, proveniente da clara de ovo de galinha, possui massa molar média de 14400 Da e dimensões de 3,0 x 3,0 x 4,5 nm. Apresenta ponto

isoeletrico (pI) entre 10,5 – 11, sendo mais ativa entre pH 6,0 e 9,0, com pH ótimo em 6,24 (JOLLÈS, 1969).

A enzima possui dois domínios estruturais (Figura 2): um domínio alfa (α) e um domínio beta (β). Sendo o domínio α formado pela sequência de aminoácidos de 1-39 e 89-129, e composta por quatro α -hélices, duas próximas ao C-terminal, e as demais do N-terminal e um C-terminal com hélices 3_{10} (aminoácidos dispostos na estrutura helicoidal no sentido horário). Já o domínio β é formado pela sequência de aminoácidos de 40-88, apresentando uma cadeia tripla de folhas antiparalelas, uma hélice 3_{10} , e uma longa alça. Ainda, apresenta quatro ligações dissulfetos entre os resíduos de cisteína 6:127, 30:115, 64:80 e 76:94, que atuam para estabilizar a sua estrutura. Por fim, o sítio ativo da enzima é composto pelos aminoácidos nas posições 107 a 110 (BLAKE et al., 1967; JOLLÈS, 1969; MATAGNE; DOBSON, 1998; LIU; HSIEH; LIU, 2004).

Figura 2 - Estrutura cristalográfica de raios-X da Lisozima. Os terminais N e C são indicados. As α -hélices 1-4 ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) estão ilustrados como cilindros vermelhos e numerados sequencialmente a partir do N-terminal para o C-terminal. As β -folhas 1-3 ($\beta 1$ - $\beta 3$) são mostradas como setas amarelas que apontam da N- para a extremidade C-terminal. As localizações do domínio α (composto pelos resíduos 1-39 e 89-129), o domínio β (composto pelos resíduos 40-88) e a fenda catalítica entre estes dois domínios estão indicados. As espinhas dorsais polipeptídicas pertencentes às regiões de curva e de bobina aleatória são mostradas em azul e verde, respectivamente. Os oito resíduos de cisteína que formam as quatro ligações dissulfeto também estão identificados.



Fonte: Liu, Hsieh e Liu (2004).

A lisozima é uma enzima muito usada como aditivo conservante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SU; CHIANG, 2006). Sua importância comercial está relacionada a utilização como agente de

ruptura da parede celular para a extração de produtos intracelulares, como agente antibacteriano na produção de vinho e à produção de fármacos para o tratamento de úlceras e infecções (SARAVANAN et al., 2009). Ainda, a lisozima pode ser empregada no desenvolvimento de embalagens ativas e no auxílio ao diagnóstico de doenças (SARAVANAN et al., 2009; LI et al., 2014).

2.2 PRINCÍPIO DA TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO

Os ensaios de alta pressão são realizados em três etapas: um período inicial necessário para atingir a pressão, o tempo de processamento na pressão desejada ou tempo de retenção, e um curto período de tempo necessário para liberar a pressão (despressurização) (HOGAN; KELLY; SUN, 2005). O tratamento com alta pressão tem atraído interesses de investigações consideráveis. Como uma tecnologia verde, ele pode ser aplicado para modular as atividades, estabilidades e conformação estrutural de enzimas (MANERA et al., 2011; LIU et al. 2012; LIU; CHEN; WANG, 2013a).

Níveis de pressão muito elevados (> 400 MPa) podem conduzir a alterações estruturais irreversíveis em enzimas. No entanto, dentro da gama típica de pressão (10 - 40 MPa), aplicadas na maioria dos estudos, apenas certas alterações conformacionais reversíveis ocorrem (REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007).

A constatação de que as enzimas podem conservar a sua atividade biocatalítica, ou até mesmo aumentar a atividade a pressões elevadas tem encorajado a utilização de enzimas sob condições supercríticas (REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007; LIU et al., 2012; MELGOSA, et al., 2015). O estudo das mudanças de atividade e a melhoria da estabilidade da enzima são fatores importantes para a implantação de bioprocessos catalisados por enzimas em meio pressurizado. Mudanças de atividade e conformacionais podem ser observadas quando as enzimas são tratadas com CO₂ supercrítico, por exemplo (MELGOSA, et al., 2015).

Os fluidos supercríticos são uma classe única de meios não aquosos para reações enzimáticas, considerados como fluidos “verdes” (HOBBS; THOMAS, 2007). O CO₂ supercrítico é um dos fluidos popularmente utilizados como solvente em reações de biocatálise, devido às suas propriedades, como: fácil e completa remoção do solvente; a capacidade de manipular as propriedades físicas apenas alterando a pressão ou a temperatura; altas taxas de reação; bom controle da seletividade de enzimas; não-toxicidade e não

inflamabilidade (KNEZ; HABULIN, 2002; MATSUDA et al., 2004; MONHEMI; HOUSAINDOKHT, 2012).

Outro fluido pressurizado promissor econômica e industrialmente a ser utilizado como solvente em reações enzimáticas é o GLP (Gás Liquefeito de Petróleo). O GLP, ou gás de cozinha, é constituído por uma mistura gasosa de hidrocarbonetos, obtido do gás natural das reservas do subsolo ou do processo de refino do petróleo cru nas refinarias (COPAGAZ, 2005). Dentre as principais vantagens do GLP pressurizado com relação ao CO₂ supercrítico destaca-se seu preço relativamente mais baixo, o propano e o n-butano que são os principais gases que o compõe, não apresentam efeito deletério na atividade da enzima, como acontece com o dióxido de carbono supercrítico (HABULIN; KNEZ, 2002; OLIVEIRA et al, 2006; ORO et al., 2015; COMIM et al., 2015) e podem operar em pressões mais baixas quando comparado com o CO₂.

Mais recentemente, o 1,1,1,2-tetrafluoroetano R134a (Tc 101 °C, Pc 40 bar) tem emergido como potencial alternativa para o tratamento prévio de enzimas. Trata-se de um fluido relativamente polar ($\epsilon' = 9,5$ kHz) utilizado como gás refrigerante, embora tenha muitos estudos tanto para extrações subcríticas como supercríticas de produtos naturais e sínteses enzimáticas (GIMENO et al., 2006; LÓPEZ-LUNA et al., 2010; MENA et al., 2015), existem poucos trabalhos que utilizaram o solvente, com intuito de estudar o comportamento dos biocatalisadores em contato com o gás (YU et al., 2007). Além disso, o R134a comprimido é geralmente considerado como seguro (GRAS), inofensivo à camada de ozônio e não inflamável (CORR, 2002).

Tais características fazem do CO₂, GLP e R134a, excelentes escolhas sobre outros gases testados na literatura, como trifluorometano, etano, hexafluoreto de enxofre ou etileno. Muitos estudos têm demonstrado a capacidade destes fluidos pressurizados como meios adequados para reações enzimáticas (YU et al., 2007; MATSUDA et al., 2004; REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007; SILVA et al., 2013; COMIM et al., 2015; SANTOS; REZENDE; MARTÍNEZ, 2016), permitindo melhores rendimentos do que os solventes orgânicos tradicionais ou mesmo outros fluidos pressurizados mencionados acima.

2.2.1 Tratamento de enzimas com fluidos pressurizados

As enzimas são uma classe especial de proteínas em que a atividade biológica surge a partir de um local ativo, reunidos pela configuração tridimensional da molécula. Mesmo pequenas mudanças

no sítio ativo podem levar a uma perda ou aumento na atividade da enzima, uma vez que a desnaturação ou ativação das proteínas está associada com alterações conformacionais que podem alterar a funcionalidade da enzima (por exemplo, o aumento ou a perda de atividade biológica altera a especificidade do substrato) (TSOU, 1986).

Para o desenvolvimento e compreensão de todo o processo catalisado por enzimas no meio supercrítico é necessário avaliar a atividade das mesmas em altas pressões. A literatura é vasta na avaliação dos efeitos da pressão sobre a estabilidade das enzimas (SUN; CLARK, 2001; NORTHROP, 2002; HERBST et al., 2014; AKASAKA, 2014). A atividade enzimática e estabilidade podem depender de diversos fatores, como a espécie de enzima, características do fluido comprimido, pureza da enzima e das variáveis manipuladas no processo (MANERA et al., 2011).

A pressão modifica as taxas de reações catalisadas por enzimas através de alterações na estrutura da proteína ou alterações no mecanismo de reação. Dependendo do meio reacional em estudo, a reação pode ser acelerada ou desacelerada com o aumento de pressão (MORILD, 1981).

Ensaio experimental de pressão sobre a atividade enzimática iniciou-se com o estudo de Eyring, Johnson e Gensler (1946) com a enzima invertase. Subsequente com Morild (1981), que investigou efeitos positivos e negativos sobre a atividade aparente de 135 enzimas. A alta pressão tem sido utilizada para aumentar a atividade e/ou estabilidade de várias enzimas, dentre elas a lipase B de *C. antarctica* (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009), tripsina (LIU et al., 2010), β -galactosidase (MANERA et al., 2011) e lipase de *Candida rugosa* (ZHAO et al., 2015).

2.2.2 Conformação estrutural de enzimas a alta pressão

No estudo da conformação estrutural de proteínas tem sido relatado que ligações covalentes não são afetadas por alta pressão, mantendo assim sua estrutura primária intacta sob condições operacionais de pressões normais ou moderadas (10 a 40 MPa). Transições estruturais das proteínas sob alta pressão são muitas vezes impulsionadas pelas mudanças de hidratação que acompanham alterações conformacionais (RIVALAIN; ROQUAIN; DEMAZEAU, 2010).

A utilização de dióxido de carbono como solvente em processos a alta pressão pode causar mudanças na estrutura conformacional das

enzimas, devido às interações entre CO₂ supercrítico e os resíduos das enzimas, resultando possivelmente no aumento da atividade enzimática. A extensão das alterações de atividade depende da natureza e fonte da enzima, bem como sobre as condições experimentais (LIU; CHEN; WANG, 2013a).

Liao et al. (2009) estudaram as alterações de propriedades moleculares de lipoxigenase induzidos pelo dióxido de carbono. Os autores descobriram que o teor relativo α -hélice de lipoxigenase diminuiu consideravelmente com o aumento da pressão desde 0,1 MPa até 50 MPa pelo uso de dióxido de carbono. Constatou-se também que a intensidade de fluorescência foi reduzida com o aumento de pressão, uma maior pressão pode resultar numa maior redução na intensidade de fluorescência. Os autores propuseram que a diminuição na intensidade de fluorescência foi mais provável devido ao desdobramento das moléculas induzidas pelo dióxido de carbono. Em outros trabalhos usando espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular foram observadas alterações relevantes na estrutura secundária e terciária de proteínas de soro de leite e de tirosinase de cogumelos tratados em CO₂ supercrítico (XU et al., 2011; HU et al., 2013).

Liu et al. (2010) investigaram o efeito do tratamento de alta pressão sobre a conformação, atividade, estabilidade térmica e em pH da enzima tripsina. Os resultados revelaram alterações conformacionais da enzima, melhor estabilidade em pH e temperatura, mas não mostrou relevância sobre a atividade. As mudanças conformacionais na enzima e seu desdobramento refletiram no aumento da intensidade de emissão de fluorescência.

Manera et al. (2011) avaliaram as influências de pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização sobre a atividade β -galactosidase das células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus*. Os resultados demonstraram que as atividades deste biocatalisador foram superiores aos de uma amostra não-tratada, ao mesmo tempo constataram que o aumento da atividade estava relacionado com a mudança na estrutura terciária submetida a alta pressão com dióxido de carbono.

Liu et al. (2012) avaliaram o efeito do CO₂ sub/supercrítico sobre a estrutura e atividade de *Candida rugosa* Lip7 (CRL7). Os resultados revelaram que a estrutura primária permaneceu intacta depois do tratamento com alta pressão e a estrutura secundária foi alterada à pressão de 10 MPa a uma temperatura de 40 °C durante 30 minutos. Com o aumento do tempo para 150 min, a alteração da estrutura terciária conduziu a uma melhor atividade enzimática. A partir destes

dados, foi possível ter uma melhor compreensão da estrutura e atividade das CRL7 em sistema CO₂ sub/supercrítico para futuras aplicações em biocatálise.

Monhemi e Housaindokht (2012) examinaram as propriedades estruturais globais da lipase B de *Candida antarctica*. Eles verificaram que em CO₂ supercrítico há desvios estruturais elevados da enzima na forma nativa. Por meio dos resultados do trabalho foi possível verificar que a enzima se mantém estável em condições de alta pressão com gás comprimido. Além disso, uma simulação foi realizada mostrando que a enzima tem estrutura mais semelhante à nativa no propano subcrítico do que em CO₂ supercrítico.

Liu, Chen e Wang (2013) avaliaram o efeito do tratamento com CO₂ sub/supercrítico com pressões de 6 e 10 MPa, tempo de exposição de 20, 30 e 150 min e temperatura de 35 e 40 °C, sobre a conformação das estruturas primárias, secundárias e terciárias e das propriedades catalíticas de atividade residual, constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), energia de ativação (E_a), estabilidade térmica e tolerância a solvente orgânico, das enzimas comerciais, lipase B de *Candida antarctica* (CALB) e lipase PS de *Burkholderia cepacia*. Em comparação com a amostra controle, a estrutura primária de ambas as lipases tratadas não foi alterada, enquanto que as estruturas secundárias e terciárias foram alteradas. As maiores atividades relativas foram de 105 % e 116 % para CALB e lipase PS, respectivamente. Para CALB o valor de $V_{m\acute{a}x}/K_m$ aumentou significativamente, enquanto que para lipase PS, valor $V_{m\acute{a}x}/K_m$ foi quase constante. Ambas as enzimas tratadas mostraram elevada estabilidade térmica. As enzimas também apresentaram alta tolerância a solvente orgânico.

Chen et al. (2013b) estudaram as influências do tratamento com CO₂ supercrítico nas propriedades de lipase (PLC) de *Pseudomonas cepacia*, incluindo a sua atividade de esterificação e transesterificação, alterações estruturais e estabilidade. A análise conformacional por FT-IR e os espectros de emissão de fluorescência revelaram que as atividades melhoradas após o tratamento com CO₂ supercrítico foram correlacionadas com as mudanças estruturais secundárias e terciárias da PLC.

Melgosa et al. (2015) em seu trabalho estudaram a conformação e atividade enzimática de quatro lipases comerciais tratadas com dióxido de carbono supercrítico. As condições experimentais avaliadas foram temperaturas (35 a 70 °C), pressão (10 a 25 MPa), tempo de exposição (1 a 3 h) e etapas de despressurização (1 a 3). Verificou-se melhoria de atividade para as enzimas livres (Palatase 20000-G e Lipozyme CALB-

L) tratado em condições moderadas, enquanto que a alta temperatura e pressão e o tempo maior de exposição conduziu a perdas de atividade. Já com enzimas imobilizadas (Lipozyme IM RM e Lipozyme 435) não foram observadas perdas de atividade ou nenhum efeito significativo do tratamento na atividade das enzimas.

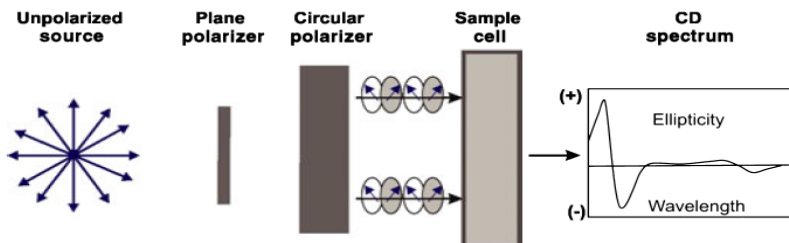
Santos, Rezende e Martínez (2016) estudaram o efeito da atividade da enzima Lipozyme 435 em processos com dióxido de carbono supercrítico. Avaliaram os efeitos da temperatura (40 a 60 °C), pressão (10 a 20 MPa), tempo de exposição (1 a 6 h) e etapas de despressurização (1 a 3) na atividade da enzima. Os resultados mostraram que a atividade da enzima diminuiu com o aumento da pressão, temperatura, tempo de exposição e número de ciclos de pressurização/despressurização. As análises de conformação estrutural por FTIR mostraram alteração na estrutura secundária da lipase imobilizada.

2.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS

2.3.1 Dicroísmo circular

Dicroísmo circular (DC) é um método de espectroscopia ótica particularmente útil para o estudo de moléculas quirais, tais como proteínas e carboidratos, que possuem unidades óticamente ativas. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração na luz incidente. O fenômeno do dicroísmo circular consiste da absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por essas moléculas quirais (Figura 3) (RANJBAR; GILL, 2009).

Figura 3 - Esquema de Dicroísmo Circular, em que a diferença na absorção é medida.



Fonte: Ranjbar e Gill (2009).

Quando aplicado em proteínas, os espectros de DC são geralmente divididos em três faixas de comprimento de onda, baseadas na energia das transições eletrônicas que predominam em determinada faixa: (1) UV distante (260 – 170 nm), em que podem ser utilizados para caracterizar e quantificar o conteúdo de estrutura secundária; (2) UV próximo, entre 250 e 300 nm, onde contribuem as cadeias laterais aromáticas e estrutura terciária e (3) UV próximo – região visível, entre 300 e 700 nm, onde os grupos cromóforos são os principais contribuintes, permitindo estudo de ligantes (MILES; WALLACE, 2015).

Um espectro típico de α -hélice é caracterizado por duas bandas negativas próximas a 222 e 208 nm e uma banda positiva próxima a 192 nm. Um espectro de DC característico de folhas- β , apresenta uma banda negativa em 215 nm e uma banda positiva em 198 nm. Bandas pequenas adicionais são frequentemente observadas próximo a 175 nm (negativa) e 168 nm (positiva) (SREERAMA; WOODY, 2004).

A magnitude de um espectro de DC depende da concentração da amostra e caminho ótico da célula. Para comparações espectrais significativas ou análises quantitativas de estrutura secundária, espectros devem ser normalizados para unidades que removem estes fatores a partir da lei de Lambert-Beer, Equação 1 (MILES; WALLACE, 2015).

$$A_{\lambda} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Onde: A_{λ} é a absorvância de um dado comprimento de onda; ε é o coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$); c é concentração molar; l o caminho ótico em centímetros.

No entanto, para a metodologia DC utiliza-se a Equação 2, em que, L e R referem-se à luz polarizada circular da esquerda e direita (MILES; WALLACE, 2015).

$$A_{L(\lambda)} - A_{R(\lambda)} = \Delta A = (\varepsilon_{L(\lambda)} - \varepsilon_{R(\lambda)}) \cdot c \cdot l = \Delta \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

A unidade principal foi definida para o dicroísmo circular como 'elipticidade', que é descrita como a tangente da relação do menor para o maior eixo elíptico (HAMMES, 2005). De acordo com a literatura para relatar o DC de uma amostra, a representação é dada por resíduo de elipticidade ($Graus \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}$), dicroísmo circular molar ou delta epsilon ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) (BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007).

2.3.2 Espectroscopia de fluorescência

A técnica de espectroscopia por fluorescência consiste na excitação de moléculas do analito, cujo espectro de emissão fornece informações para análises qualitativas e quantitativas, onde existem três métodos óticos relacionados entre si, a fluorescência molecular, a fosforescência e a quimioluminescência. A fluorescência ocorre em sistemas químicos gasosos, líquidos e sólidos simples, bem como em sistemas complexos, onde elétrons de um dado átomo (analito) são excitados por radiação em um determinado comprimento de onda, após um tempo que varia entre 10^{-5} e 10^{-8} s, os elétrons voltam ao estado fundamental e ao fazer isso emitem radiação em todas as direções (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

Para medidas de fluorescência intrínseca em estudos de proteínas dois tipos de fluoróforos são usados em análise de fluorescência de macromoléculas – fluoróforos intrínsecos (contidos nas macromoléculas) e fluoróforos extrínsecos (adicionados ao sistema, normalmente ligados a um de seus componentes). Para proteínas, há somente três fluoróforos intrínsecos – triptofano, tirosina e fenilalanina, absorve fluorescência no ultravioleta, na faixa de 250 – 400 nm. A fluorescência de resíduos aromáticos revela uma riqueza de informações sobre conformação, sítios de ligação, interações com solventes, grau de flexibilidade, distâncias intermoleculares e coeficiente de difusão rotacional de macromoléculas (CHAN et al., 2014).

Na instrumentação, dois tipos gerais de acessórios são utilizados, o filtro fluorímetros, que serve para isolar a luz incidente e a luz fluorescente, e o espectrofluorímetro, usado na difração de monocromadores para isolar a luz incidente e luz fluorescente. O procedimento consiste na passagem de uma luz de uma fonte de excitação através de um filtro ou monocromador, e é incidente sobre a amostra. Uma parte da luz incidente é absorvida pela amostra, e algumas das moléculas da amostra produzem fluorescência. A luz fluorescente é emitida em todas as direções. Parte desta luz fluorescente passa através de um segundo filtro ou monocromador e atinge um detector. Várias fontes de luz podem ser utilizadas como fontes de excitação, incluindo lasers, fotodiodos e lâmpadas (PAVONI et al., 2014).

2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE

Conforme pode ser constatado no levantamento bibliográfico realizado, a utilização da alta pressão como tratamento para aumentar a atividade catalítica e estabilidade frente a pH e temperatura foi investigada para vários tipos de enzimas. Contudo, poucos trabalhos estão publicados no meio científico referente a estudos de conformação estrutural. De maneira geral, percebe-se que tratamentos com pressões elevadas (≥ 100 MPa) podem diminuir acentuadamente a atividade enzimática devido a alterações irreversíveis na estrutura primária das enzimas (ZHANG et al., 2012). Porém, mantendo-se uma faixa de pressão moderada de 10 a 40 MPa, apenas certas alterações conformacionais reversíveis ocorrem, podendo melhorar o desempenho enzimático como um todo. Entre os fluidos comprimidos estudados na literatura, destaca-se o CO₂ supercrítico apresentando bons resultados em reações enzimáticas e no estudo da conformação estrutural de enzimas. Isso, possivelmente, está relacionado ao fato de que o fluido possui baixa polaridade, dissolvendo mais facilmente os compostos hidrofóbicos, além das propriedades críticas moderadas (7,38 MPa e 31,4 °C) que são compatíveis com a utilização de enzimas como catalisadores (SRIVASTAVA; MODAK; MADRAS, 2002). Porém, outros gases como o GLP e o R134a mostraram-se promissores como solventes em reações enzimáticas.

Nesse panorama, percebe-se uma lacuna em relação a estudos de conformação estrutural de enzimas pós-tratamento com fluidos pressurizados como CO₂ supercrítico, GLP e R134a. Neste contexto, a presente pesquisa poderá ajudar na elucidação de algumas indefinições sobre a estabilidade e atividade enzimática em meios pressurizados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentada uma descrição dos materiais utilizados, os métodos e o aparato experimental empregado para realização deste trabalho, bem como as metodologias de análises de conformação estrutural da enzima e caracterização. As análises de conformação foram realizadas no Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) e as demais análises no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) ambos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.1 MATERIAL

As três enzimas adotadas para os tratamentos a alta pressão foram utilizadas em sua forma livre, sendo duas não comerciais, a proteína tirosina fosfatase B (PtpB) de *Mycobacterium tuberculosis* e YopH de *Yersinia enterocolitica*. Ambas as enzimas não comerciais foram produzidas e purificadas no Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) da Universidade Federal de Santa Catarina, onde posteriormente foram doadas gentilmente para os testes preliminares. E uma enzima comercial liofilizada, a Lisozima (1,4- β -N-acetilmuramidase, EC 3.2.1.17) com pureza superior a 99 %, adquirida da Sigma-Aldrich.

Os fluidos empregados no trabalho foram o dióxido de carbono (CO₂), adquirido da White Martins com 99,9 % de pureza, o gás liquefeito de petróleo (GLP) fornecido pela Petrobras, constituído por uma mistura de propano (50,3 %), n-butano (28,4 %), isobutano (13,7 %), etano (4,8 %) e outros componentes secundários (metano, pentano, isopentano, entre outros) e o 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134a) com 100 % de pureza, adquirida da DuPont do Brasil S/A.

Para ajustar o pH da solução tampão utilizou-se hidróxido de potássio P.A. (KOH) a 1 mol.L⁻¹ e para administrar a força iônica dos experimentos usou-se o cloreto de sódio P.A. (NaCl), ambos da Vetec.

Para a determinação da atividade das enzimas não comerciais foram utilizados os seguintes reagentes:

- 4-nitrofenil palmitato (pNPP) 20 mmol.L⁻¹ (98 % de pureza, Sigma-Aldrich);
- Tampão Imidazol 20 mmol.L⁻¹ pH 7,0;
- Água ultrapura Milli-Q® (resistividade de 18,2 M Ω .cm a 25 °C).

Para determinação da atividade enzimática da Lisozima foram utilizados os seguintes reagentes:

- Células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* 0,1 mg.mL⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Tampão Fosfato de potássio P.A. (Vetec) 66 mmol.L⁻¹, pH 6,24;
- Água ultrapura Milli-Q® (resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Tratamento com fluidos pressurizados

Para os testes preliminares (visando definir a enzima a ser enfatizada no estudo), utilizou-se somente o scCO₂ como solvente no tratamento das duas enzimas não comerciais (PtpB e YopH) e da lisozima. As amostras foram tratadas com scCO₂ na razão mássica solução de enzima/fluido de 1:1 (m/m); pressão de trabalho de 200 bar; taxa de despressurização 30 bar.min⁻¹; temperatura de 32,0 ± 0,5 °C; tempo de exposição de 2 horas, com intuito de verificar o comportamento das enzimas após o tratamento com alta pressão.

Deve-se salientar que, as enzimas foram utilizadas na forma de solução enzimática, ou seja, antes de seu uso as enzimas não comerciais foram dissolvidas em meios tamponantes e a lisozima foi dissolvida em água. Para tanto, a enzima PtpB foi diluída em Tampão Tris HCl 20 mM, pH 8; NaCl 50 mM; EDTA 5 mM; DTT 5 mM; glicerol 20 %. A enzima YopH foi diluída em Tampão Acetato de sódio 100 mM, pH 5,7; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM. Ambas as enzimas não comerciais foram usadas com concentração final de 0,25 uM (na solução enzimática). A lisozima foi dissolvida em água Milli-Q e usada com concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ (na solução enzimática). Portanto, é importante salientar que os sistemas utilizados foram constituídos por enzima + cossolvente (meio tampão ou água) + fluido pressurizado (CO₂, GLP ou R134a).

A partir dos resultados obtidos com os testes preliminares, foram realizados diversos ensaios experimentais com a lisozima visando definir as melhores condições de tratamento enzimático, na busca por melhores atividades residuais específicas. Para tanto se utilizou primeiramente o CO₂ como solvente, onde as condições de operação foram baseadas em planejamentos experimentais (seção 3.2.2). Em

seguida os fluidos pressurizados GLP e R134a foram utilizados como solventes em ensaios realizados nas melhores condições experimentais observadas durante o emprego do CO₂ como solvente.

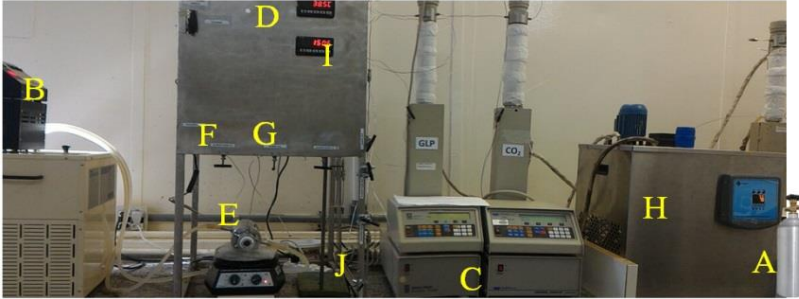
Estes ensaios tiveram por objetivo avaliar o efeito do uso de diferentes solventes pressurizados na busca pelo melhor desempenho enzimático pós-tratamento a alta pressão. Ainda, todos os experimentos foram realizados em duplicata, e os resultados expressos em termos de atividade residual \pm desvio padrão.

3.2.1.1 Aparato Experimental

O aparato experimental para a avaliação da atividade das enzimas em fluido pressurizado consiste basicamente em um reservatório de solvente; dois banhos termostáticos (Nova Ética, 521/2D) para controle da temperatura; uma bomba de seringa (ISCO, 260D); uma célula encamisada, de volume variável e aço inoxidável, com volume máximo de 28 mL e volume de trabalho de aproximadamente 12 mL, com 2 janelas de safira acopladas; um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) equipado com um indicador portátil (Smar, HT201) com uma precisão de $\pm 0,4$ bar (0,04 MPa).

A vista geral do equipamento é apresentada na Figura 4. O equipamento permite conduzir os experimentos até 350 bar e 80 °C (FRICKS et al., 2006; FRANKEN et al., 2010). Todas as linhas de montagem experimental empregam tubulações de diâmetro externo (OD) 1/16" de aço inoxidável (HIP) e entre a bomba e o reservatório de solvente há uma “*check-valve*” (HIP, 15-41AF1-T 316SS) para evitar o refluxo do solvente pressurizado. Duas outras válvulas micrométricas (HIP, 15-11AF2 316SS) completam o aparato experimental, uma localizada após a bomba de seringa, na entrada da célula de alta pressão para permitir o carregamento de solvente, e a outra para permitir a pressurização do pistão pelo fundo da célula.

Figura 4 - Vista geral da unidade experimental para o tratamento das enzimas em fluido pressurizado. A – reservatório de solvente; B/H – banhos termostáticos; C – bombas de seringa; D – transdutor e indicador de pressão; E – célula encamisada de volume variável de aço inoxidável; F/G– válvulas micrométricas para alimentação e pressurização/despressurização, respectivamente, I – indicador de temperatura, J – Descarga do gás.



3.2.1.2 Procedimento Experimental

O banho termostático para o resfriamento do fluido pressurizado das bombas seringas era ajustado a 7 °C. Em seguida o segundo banho termostático em que a célula encamisada estava conectada era ajustado a $40,0 \pm 0,5$ °C para todos os experimentos. Essa temperatura foi determinada com base na temperatura ótima de atuação da lisozima (BRENDA, 2016; SHU et al., 1998). Posteriormente, 6 mL de solução enzimática com concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ eram alimentados ao interior da célula, seguida da alimentação do solvente a uma pressão conhecida (100 bar) e na razão mássica (solução de enzima/solvente) definida 1:1, m/m. Após este procedimento, o sistema era submetido à pressurização até atingir a pressão desejada (por exemplo, 100 a 200 bar) e então se iniciava o tempo de tratamento enzimático (2 horas). Os níveis de pressão (100 a 200 bar), força iônica (0 a 50 mmol.L^{-1}) e taxa de depressurização (10 a 50 bar.min^{-1}) foram ajustados de acordo com as condições pré-estabelecidas na sequência dos planejamentos experimentais.

A atividade enzimática inicial foi determinada utilizando-se uma amostra controle, esta amostra permaneceu nas mesmas condições experimentais, temperatura de $40,0 \pm 0,5$ °C, tempo de exposição de 2 horas, solução enzimática a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, porém sem o tratamento com fluido pressurizado. Já a atividade enzimática final refere-se à amostra ao término do tratamento. As atividades foram determinadas utilizando os procedimentos descritos no item 3.2.5. Contudo, os resultados foram

expressos em termos de atividade residual, calculada segundo a Equação 3.

$$A_E \text{ Residual (\%)} = \frac{A_E \text{ final}}{A_E \text{ inicial}} \times 100 \quad (3)$$

Sendo, A_E atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

3.2.2 Delineamento Experimental

As condições experimentais tais como pressão, força iônica e taxa de despressurização variaram seguindo os planejamentos experimentais, conforme os níveis indicados nas Tabelas 1 e 2. A concentração de enzima ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) definida a partir de dados extraídos de outro grupo de pesquisa da área, o tempo de exposição ao tratamento (2 horas), temperatura $40,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e volume de solução (6 mL) foram fixados em todos os experimentos.

Tabela 1 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 (com triplicata no ponto central) para o tratamento com CO_2 pressurizado.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0*	1
Pressão (bar)	100	150	200
Força iônica ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	25	50
Taxa de despressurização ($\text{bar} \cdot \text{min}^{-1}$)	10	30	50

* Ponto Central

Paralelamente optou-se em realizar um experimento isolado variando a força iônica em 0 a $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ com e sem o contato do CO_2 com a enzima. Para tanto, adotou-se a condição experimental em que obteve-se o maior aumento de atividade enzimática promovido pelo planejamento descrito na Tabela 1, ou seja, empregando uma pressão de 150 bar e taxa de despressurização de $30 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$.

Para as condições experimentais sem o solvente (fluido pressurizado) em contato com a amostra, os ensaios variaram seguindo o planejamento experimental, conforme os níveis indicados na Tabela 2. Nesse planejamento optou-se por não administrar a força iônica no meio, pois verificou-se que as variações da força iônica não promoveram ganhos expressivos na atividade enzimática.

Tabela 2 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2² (com triplicata no ponto central) para o tratamento sem CO₂ em contato com a solução de enzima.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0*	1
Pressão (bar)	100	150	200
Taxa de depressurização (bar.min ⁻¹)	10	30	50

* Ponto Central

3.2.3 Estudo cinético

Após a realização dos planejamentos experimentais, a melhor condição foi definida e conduzida para a realização de um estudo cinético. Na qual, variou-se o tempo de exposição em 1, 2, 4, 6 e 8 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e a atividade residual no tempo zero (sem tratamento) foi definida como 100 %.

3.2.4 Avaliações de estabilidade da Lisozima a baixas temperaturas

Os ensaios de estabilidade da lisozima foram conduzidos na melhor condição experimental (definida em planejamento). A enzima tratada foi armazenada a 4 °C (geladeira) e congelada instantaneamente em nitrogênio líquido (-196 °C) seguido do armazenamento a -10 °C. As análises de atividade enzimática foram realizadas 30 minutos após o armazenamento e posteriormente a cada 1 hora (atividade em função do tempo). Uma amostra controle, ou seja, aquela não submetida ao tratamento foi realizada simultaneamente nestas mesmas condições. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e os resultados expressos em termos de atividade residual ± desvio padrão.

3.2.5 Determinação das atividades enzimáticas

3.2.5.1 *PtpB* e *YopH*

A atividade enzimática da *PtpB* e *YopH* foi mensurada a partir dos métodos descritos por Martins et al. (2013) e Mascarello et al. (2013) com algumas adaptações. A hidrólise do substrato artificial *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) a 37 °C foi monitorada por espectrofotometria (Hitachi modelo U-2910). Os ensaios foram realizados em uma reação

de 500 μL contendo 50 μL de imidazol pH 7,0 (20 mmol.L^{-1} final), 12,5 μL de pNPP (20 mmol.L^{-1} final), 5 μL de enzima (30 nmol.L^{-1} PtpB ou 14 nmol.L^{-1} YopH final) e 432,5 μL de água ultrapura. Foram adicionados na cubeta de quartzo todos os reagentes, porém a reação foi iniciada pela adição do substrato (20 mmol.L^{-1} pNPP). A quantidade de *p*-nitrofenol (pNP) produzida foi medida a 410 nm, durante 5 min (com leituras a cada 30 segundos) a 37 °C. O branco foi realizado na ausência de enzima, a amostra controle foi realizada na presença da enzima sem o tratamento e a amostra tratada foi realizado com a enzima que sofreu tratamento prévio com o fluido pressurizado. A atividade foi expressa em porcentagem de atividade residual, comparando-se a atividade enzimática da amostra controle com a amostra tratada. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

3.2.5.2 Lisozima

O método utilizado para determinação da atividade da lisozima foi adaptado a partir do método apresentado por Shugar (1952), na qual baseia-se na determinação da taxa de redução turbidimétrica de uma suspensão celular de *Micrococcus lysodeikticus* medida através da absorbância a 450 nm em função do tempo. Para tanto, utilizou-se um espectrofotômetro da marca FEMTO modelo 800 XI.

Em uma cubeta de quartzo a 25,0 °C, foi adicionado 2,5 mL de suspensão de *M. lysodeikticus* 0,1 mg.mL^{-1} preparada em tampão fosfato de potássio 66 mmol.L^{-1} , pH 6,24 e 100 μL de solução enzimática, preparada com Água ultrapura Milli-Q®. Imediatamente após a adição do substrato e enzima, a agitação foi realizada por inversão e registrou-se o decréscimo da absorbância a 450 nm por 5 min (com leituras a cada 30 s). Uma unidade enzimática produz uma variação de absorbância de 0,001 por minuto nas condições do ensaio. Por fim, a atividade específica (U.mg^{-1}) foi calculada através da Equação 4.

$$A_E = \frac{\left(\frac{\Delta A_{450}}{\text{min teste}} - \frac{\Delta A_{450}}{\text{min branco}} \right) \times (\text{df})}{(0,001)(0,1)(C)} \quad (4)$$

Em que, A_E é a atividade específica (U.mg^{-1}); $(\Delta A_{450 \text{ nm}} (\text{teste}) - \Delta A_{450 \text{ nm}} (\text{branco})) / \text{min}$ é a inclinação da curva da absorbância a 450 nm em função do tempo (descontando-se a diferença entre a inclinação para a amostra analisada e para seu branco); df é o fator de diluição; C é a concentração de proteína da solução

enzimática ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 0,1 é o volume de enzima adicionado na reação (mL); 0,001 é a variação da absorbância a 450 nm por definição de unidade.

3.2.6 Determinações analíticas e caracterização da solução

3.2.6.1 Espectroscopia de Massa (MALDI-TOF)

As massas moleculares da lisozima controle e tratada em diferentes condições experimentais foram determinadas utilizando o espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF modelo AutoFlex III Smartbean (Bruker Daltonics) mediante a calibração externa sob modo de operação linear positivo nas faixas de m/z de 2000 - 20000 Da, laser de nitrogênio ($\lambda = 337 \text{ nm}$), aceleração por 20 kV no modo linear para as proteínas intactas, intensidade do laser de 40 %, frequência de 200 Hz, somatória de 1500 disparos (500 por vez).

O volume de 1 μL de cada amostra foi homogeneizado com 1 μL de matriz composta de ácido sinapínico 38 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich), acetonitrila grau LC-MS 70 % (v/v), ácido trifluoracético 0,2 % (v/v) em água grau LC-MS. Em seguida, 1 μL dessa mistura foi aplicada diretamente na placa do espectrômetro MALDI-TOF, na qual ocorreu a cristalização a temperatura ambiente. Após a cristalização as amostras foram submetidas às análises espectrométricas. Os espectros gerados foram analisados com o programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

3.2.6.2 Dicroísmo Circular (DC)

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

A solução de enzima previamente tratada com os fluidos pressurizados foi utilizada para analisar a integridade das estruturas secundárias nas condições experimentais e monitorar as possíveis mudanças conformacionais induzidas por influência da pressão, força iônica e taxa de despressurização, bem como a interação com diferentes fluidos através das medidas de DC.

Os espectros DC foram coletados a temperatura controlada de 25 °C utilizando o espectropolarímetro DC (Jasco J, 815), em uma

cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, na faixa de comprimento de onda - UV (190 - 250 nm). Os espectros de DC foram tipicamente recuperados empregando-se médias de 3 varreduras. As contribuições da água ultrapura obtidos sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros foram corrigidos a fim de eliminar qualquer efeito de ruído.

Água ultrapura Milli-Q® foi utilizada para dissolver as amostras e como branco para todas as amostras. Os dados de DC foram expressos em termos de elipticidade molar [θ], em deg cm²/dmol. Uma redução na intensidade da banda negativa a 208 nm demonstra alterações na estrutura secundária da lisozima e um declínio no conteúdo de α-hélice (KELLY; JESS; PRICE, 2005; (KELLY; PRICE, 2000). A análise dos dados foi realizada usando o programa K2D3 Server, como descrito por Louis-Jeune, Andrade-Navarro e Perez-Iratxeta (2012), os resultados foram expressos em termos de conteúdo de α-hélice (%) e β-folhas (%).

3.2.6.3 Fluorescência

Utilizou-se o procedimento descrito por Chen et al. (2014) com algumas modificações. Logo, as medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Agilent Technologies modelo Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer com temperatura controlada a 25 °C, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. As amostras tratadas e a controle com concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ foram excitadas a 270 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 280 a 500 nm. A abertura da fenda, que compreende a quantidade de luz que atingirá a amostra, foi de 20 nm.

A emissão máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e intensidade de fluorescência foram determinadas de acordo com o pico dos espectros de emissão de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram recuperados empregando-se médias de 3 varreduras. As contribuições da água ultrapura obtidos sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros foram corrigidos a fim de eliminar qualquer efeito de ruído.

3.2.6.4 Determinação de Ácido Carbônico e pH

O pH das amostras foi determinado utilizando-se potenciômetro de bancada (QUIMIS, modelo 400A), devidamente calibrado. A determinação de ácido carbônico por titulação foi realizada de acordo com o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Todas as análises foram

realizadas em duplicata, os resultados com alterações foram repetidos e confirmados. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C.

3.2.7 Análise estatística

Os efeitos das variáveis independentes investigadas (pressão, força iônica e taxa de despressurização) sobre a atividade enzimática da lisozima foram avaliados estatisticamente mediante análise do planejamento fatorial 2³ e do planejamento fatorial 2², utilizando *software* STATISTICA versão 7.0, e a ferramenta estatística *Experimental design (DOE)*. Os resultados foram analisados estatisticamente considerando um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

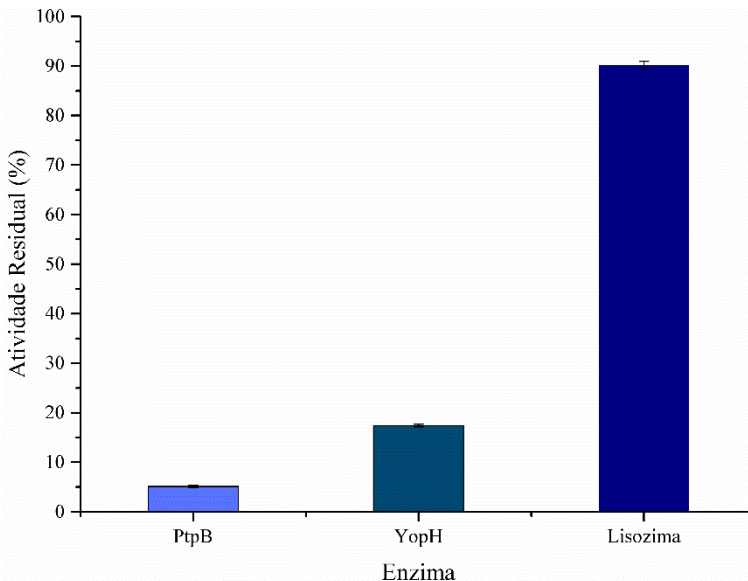
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo descreve os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, relacionados aos testes preliminares para a determinação da enzima alvo, bem como as avaliações da atividade e estabilidade enzimática da Lisozima (1,4- β -N-acetilmuramidase, EC 3.2.1.17) na forma livre após o processamento em dióxido de carbono (CO₂), gás liquefeito do petróleo (GLP) e R134a como solventes pressurizados. Por fim, são apresentados os resultados relacionadas às modificações de conformação estrutural da enzima.

4.1 SELEÇÃO DA ENZIMA DE TRABALHO

Experimentos preliminares relacionadas à definição da enzima a ser utilizada no trabalho foram realizados. Para tanto utilizou-se duas enzimas não comerciais, a tirosina fosfatase B (PtpB) de *Mycobacterium tuberculosis* e a YopH de *Yersinia enterocolitica*, e uma enzima comercial, a Lisozima (1,4- β -N-acetilmuramidase, EC 3.2.1.17). As soluções enzimáticas foram tratadas com scCO₂ na razão mássica de 1:1 (m/m); pressão de trabalho de 200 bar; taxa de despressurização 30 bar.min⁻¹; temperatura de 32,0 \pm 0,5 °C; tempo de exposição de 2 h. Os resultados destes ensaios estão descritos na Figura 5. Pode-se observar que as enzimas não comerciais sofrem maiores perdas de atividade residual em comparação com a enzima comercial. Sabe-se que, a extensão das alterações de atividade depende da natureza e fonte da enzima, bem como das condições experimentais testadas (LIU; CHEN e WANG, 2013). Logo, tais resultados podem estar relacionados a uma menor resistência das enzimas não comerciais em relação à lisozima no que tange as mudanças bruscas (despressurização) ou acentuadas (0 a 200 bar) de pressão. Contudo, cabe ressaltar-se que, os resultados obtidos são restritos aos sistemas estudados, devendo-se evitar generalizações, ou seja, outros meios, solventes ou condições experimentais podem resultar em melhores desempenhos por parte de tais enzimas não comerciais.

Figura 5 - Atividades residuais das enzimas PtpB, YopH e Lisozima tratada em sistema CO₂ pressurizado. Condição experimental: 200 bar; taxa de despressurização 30 bar.min⁻¹; temperatura de 32,0 ± 0,5 °C; tempo de exposição de 2 h, razão mássica de enzima:CO₂ 1:1. Atividade média das enzimas controle: PtpB 20,30 ± 0,05 U.mg⁻¹, YopH 50,30 ± 0,42 U.mg⁻¹, Lisozima 114789,80 ± 1202,82 U.mg⁻¹.



4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LISOZIMA APÓS O TRATAMENTO A ALTA PRESSÃO

4.2.1 Tratamento com scCO₂ como solvente

Os resultados obtidos para a atividade residual da lisozima na forma livre após tratamento com CO₂ como solvente são apresentados na Tabela 3. Pode-se notar que, aumentos na atividade da enzima foram alcançados após os tratamentos para a maioria das condições experimentais testadas, resultado interessante, considerando as possíveis aplicações da enzima como aditivo conservante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (MINE et al., 2004; SU e CHIANG, 2006), principalmente para alimentos com alto teor de água. Contudo, observa-se que, combinações distintas nos níveis das variáveis testadas podem levar a diminuições na atividade residual enzimática (Exp.; 2, 4, 6 e 8).

Neste contexto, a maior perda de atividade residual (perda de 11,7 % em relação à atividade inicial) foi observada na condição experimental 2, utilizando uma pressão de 200 bar, na ausência de sal, a uma taxa de depressurização lenta de 10 bar.min⁻¹.

Tabela 3 - Atividade residual (%) da lisozima na forma livre após tratamento com scCO₂ como solvente para a amostra. Condições operacionais: tempo de processamento de 2 h; Temperatura de trabalho de 40,0 ± 0,5 °C.

Exp.	Pressão (bar)	Força Iônica (mmol.L ⁻¹)	Taxa de Depressurização (bar.min ⁻¹)	Atividade Residual (%) ^a
1	100	0	10	114,13
2	200	0	10	88,35
3	100	50	10	105,27
4	200	50	10	94,23
5	100	0	50	106,28
6	200	0	50	96,24
7	100	50	50	109,60
8	200	50	50	97,60
11(C)	150	25	30	119,07 ± 3,41 ^b

^a Atividade Residual definida conforme Equação 3, pág. 49.

^b Resultado de triplicata.

Atividade da amostra controle = 118665,30 ± 6764,45 U.mg⁻¹

O maior aumento (atividade residual de 119,07 ± 3,41 %) foi observado na condição experimental referente ao ponto central, empregando uma pressão de 150 bar, força iônica de 25 mmol.L⁻¹, a uma taxa de depressurização média de 30 bar.min⁻¹ (Tabela 3). Alguns estudos têm mostrado que os fluidos comprimidos, tais como CO₂, podem manter ou aumentar a atividade da enzima (LIU et al., 2012; MANERA et al., 2011; MELGOSA, et al., 2015).

Ainda, observou-se na condição do ponto central uma diminuição expressiva do pH (4,8 ± 0,2) das amostras tratadas com scCO₂ quando comparadas com o pH (6,7 ± 0,3) das amostras controle. Esta queda no pH é atribuída à formação de ácido carbônico proveniente da dissolução do CO₂ na água. Fato este, confirmado por análises de acidez titulável (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) de tais amostras tratadas, as quais resultaram em níveis de acidez em solução molar de 0,110 ± 0,028 % v/m.

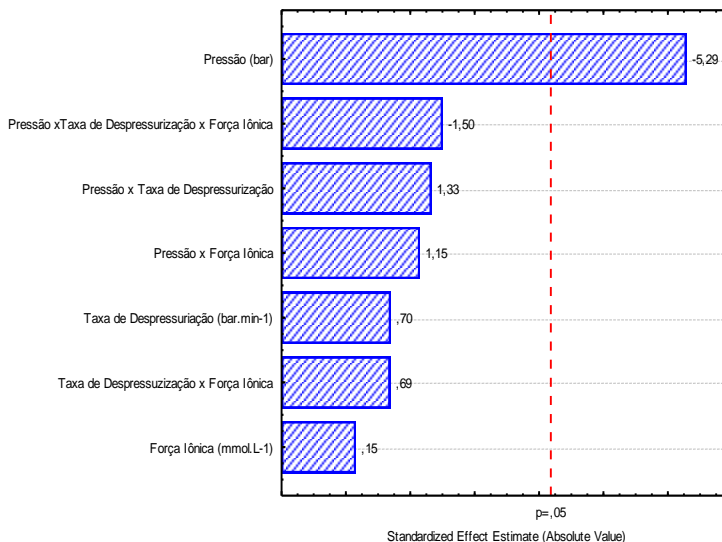
Outro efeito do dióxido de carbono, porém vinculada a estrutura da proteína está relacionado à formação de complexos de carbamatos entre grupos amino na superfície da enzima e moléculas de dióxido de

carbono. O dióxido de carbono, por ser uma molécula ácida, pode reagir com grupos amino básicos para formar carbamatos. O complexo formado depende da concentração relativa do CO₂, grupos aminas e basicidade das aminas envolvidas, para as enzimas, os resíduos de lisina podem estar relacionados à formação desses complexos (BECKMAN, 2004; KAMAT; BECKMAN; RUSSELL, 1995). A formação de tais complexos é relatada por alguns autores não ser benéfica nas reações enzimáticas (WRIGHT et al., 1944; MATSUDA et al., 2004), o que reforça a justificativa do porquê as condições estudadas não favoreceram ganhos expressivos de atividade residual.

Para avaliar os principais efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade da enzima, os dados apresentados na Tabela 3 foram tratados estatisticamente, considerando um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$), utilizando o software *Statistica* ® 7 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, EUA). A Figura 6 apresenta os efeitos dessas variáveis sobre a atividade final da enzima submetida a scCO₂.

Observou-se neste sistema, que apenas a variável pressão apresentou efeito significativo na atividade enzimática da lisozima, sendo este um efeito significativo negativo, indicando que menores níveis destas, levam a um aumento na atividade enzimática da lisozima. Segundo alguns autores, a pressão pode modificar o comportamento catalítico de enzimas, alterando a seletividade e modulação da enzima (JACKSON; ELLER, 2006) e segundo Cheftel (1995), o tratamento a alta pressão pode distorcer a estrutura secundária e terciária do polipeptídeo, o que resultaria numa conformação da enzima diferente da nativa, justificando o aumento e ligeira queda de atividade em algumas condições experimentais, sem que ocorra a desnaturação da proteína. Tais resultados corroboram com as análises realizadas de conformação da enzima (seção 4.7). Contudo deve-se ressaltar que, as enzimas podem exibir uma “memória de pH”, ou seja, a enzima “recordar-se-á” do pH da última solução aquosa com a qual estava em contato (XU; KLIBANOV, 1996). Logo, o desvio da região de pH ótimo da lisozima (devido a formação de ácido carbônico) pode também explicar o porquê das menores atividades enzimáticas para maiores níveis de pressão (Tabela 3 e Figura 6).

Figura 6 - Diagrama de Pareto para a lisozima no sistema dióxido de carbono pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática residual obtida.



4.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO PRESSURIZADO SEM O USO DE SOLVENTE

Visando uma maior definição do efeito do CO₂ como solvente pressurizado para meios enzimáticos, foram realizados tratamentos (a alta pressão) apenas com a solução enzimática (lisozima dissolvida em água), ou seja, sem o uso de solvente. Para tais experimentos a atividade enzimática residual variou de 94,6 % a 141,01 ± 1,80 %, ou seja, obteve-se atividades residuais maiores que as alcançadas para as soluções enzimáticas dissolvidas em scCO₂. As atividades residuais superiores as obtidas com o uso de scCO₂ como solvente, podem estar relacionadas à inexistência da dissolução do CO₂ na fase aquosa nessas condições, impedindo a formação de ácido carbônico (H₂CO₃) e evitando a acidificação do meio. De acordo com a Tabela 4, o melhor valor de atividade enzimática residual encontrado para a lisozima foi de 141,01 ± 1,80 %, quando foi submetida a 150 bar, com uma taxa de despressurização média de 30 bar.min⁻¹.

Tabela 4 - Atividade residual (%) da lisozima após tratamento com alta pressão e sem o uso de solvente para a amostra. Condições operacionais: tempo de processamento de 2 h; Temperatura de trabalho de $40,0 \pm 0,5$ °C; sem adição externa de força iônica no meio.

Exp.	Pressão (bar)	Taxa de Despressurização (bar.min ⁻¹)	Atividade Residual (%) ^a
1	100	10	116,67
2	100	50	132,16
3	200	10	94,57
4	200	50	120,35
5(C)	150	30	141,01 \pm 1,80 ^b

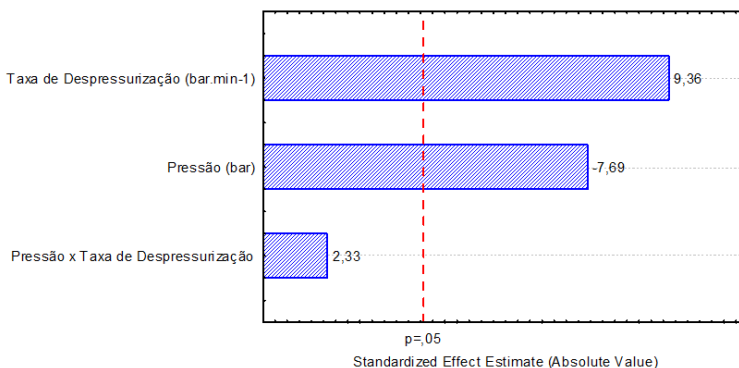
^a Atividade Residual definida conforme Equação 3, pág. 49.

^b Resultado de triplicata.

Atividade da amostra controle = $103759,20 \pm 6996,97$ U.mg⁻¹.

De forma a avaliar os principais efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade da enzima, os dados apresentados na Tabela 4 foram tratados estatisticamente, considerando um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$). A Figura 7 apresenta os efeitos dessas variáveis onde pode observar-se que, tanto a pressão como a taxa de despressurização mostraram-se significativas.

Figura 7 - Diagrama de Pareto para o tratamento (a alta pressão) da lisozima sem o uso de solvente em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática residual obtida.



O tratamento estatístico demonstra que, a variável com maior efeito significativo ($p < 0,05$) foi a taxa de despressurização, com efeito positivo, ou seja, quanto maior a taxa de despressurização maior poderá

ser a atividade residual obtida. De acordo com Knez e Habulin (2002) a taxa de depressurização é um passo determinante em relação à atividade da enzima pré-tratada em fluidos pressurizados. O contato do solvente com a estrutura terciária da enzima ocorre de modo lento. Quando o sistema é depressurizado rapidamente há uma expansão rápida do fluido, isso ocasiona uma diferença de pressão entre o ambiente onde se encontra a enzima e a sua pressão interna, promovendo possivelmente um desdobramento na estrutura da enzima, podendo levar a um aumento da sua atividade e a seletividade (KNEZ e HABULIN, 2002).

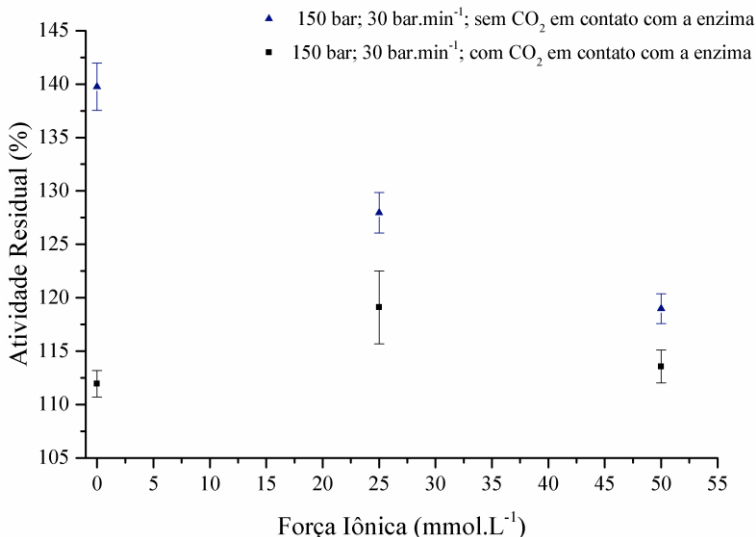
Quanto à pressão, a exemplo das respostas obtidas na seção anterior (seção 4.2.1), níveis de pressão < 200 bar produzem melhor efeito na atividade enzimática da lisozima.

Os resultados apresentados confirmam que a taxa de depressurização, pressão e suas interações promovem alterações na estrutura do biocatalizador e, conseqüentemente, levam à uma perda ou aumento de atividade enzimática.

4.4 EFEITO DA FORÇA IÔNICA NO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM scCO₂

A Figura 8 apresenta os resultados de atividade residual da lisozima em função da força iônica do meio para diferentes condições experimentais. A enzima foi tratada a uma pressão de 150 bar, taxa de depressurização 30 bar.min⁻¹, Força iônica (0 a 50 mmol.L⁻¹), com e sem o uso de solvente (scCO₂). De acordo com os resultados, para a condição experimental realizada sem o uso de solvente e sem adição externa de força iônica no meio foi obtida a maior atividade residual, de 141,01 ± 1,80 %. Já para a condição realizada com o uso de scCO₂ como solvente e força iônica de 25 mmol.L⁻¹ a atividade residual foi de 119,07 ± 3,41 %.

Figura 8 - Dados de atividade residual variando força iônica. Condições Experimentais: Amostra tratada 150 bar, despressurização 30 bar.min⁻¹; temperatura 40,0 ± 0,5 °C; tempo tratamento 2 h. As medidas de atividade foram realizadas a 25 ± 2 °C.



De acordo com Davies et al. (1969), na degradação das células do substrato pela lisozima, a primeira etapa é a de adsorção da molécula de lisozima na superfície da parede celular e essa ligação ocorre através de forças eletrostáticas. Como os grupos ionizáveis da parede celular do substrato *Micrococcus lysodeikticus* são predominantemente carregados por cargas negativas e a lisozima possui carga líquida positiva, quando o pH do meio é inferior ao ponto isoelétrico da proteína, espera-se que as forças eletrostáticas favoreçam a adsorção da lisozima pelas células. Essa interação eletrostática favorável irá diminuir quando a força iônica do meio aumentar, explicando assim por que a elevação da força iônica para 50 mmol.L⁻¹ não favoreceu o aumento de atividade residual da enzima.

Ou seja, quanto menor a força iônica e mais elevado o pH (pelo menos na gama 6,0 a 9,0), maior é a ligação desta enzima à célula bacteriana. Pois, a lisozima possui ligação de natureza eletrostática aos grupos acídicos da célula, sobretudo à parede bacteriana (SALTON, 1952), desta forma os resultados obtidos corroboram com a literatura, uma vez que a lisozima possui cargas positivas em sua cadeia, atraindo e

se ligando às moléculas com cargas negativas predominantes e com um ponto isoelétrico entre pH 10,5 e 11,0 (LEHNINGER, 1975).

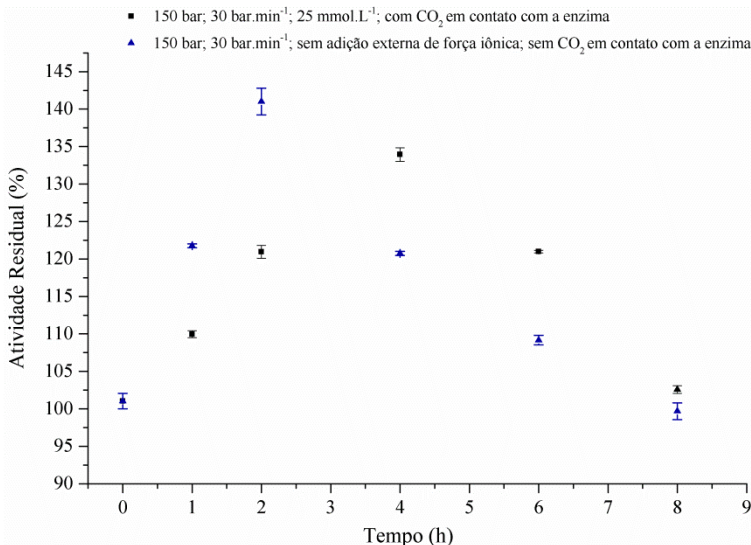
4.5 ESTUDO CINÉTICO

As melhores condições experimentais (de T, P, taxa de despressurização e força iônica) observadas durante os tratamentos com e sem o solvente (scCO₂) para a solução enzimática foram fixadas (ver seções 4.2.1 e 4.3) para um estudo cinético da atividade residual da lisozima.

A Figura 9 apresenta os resultados cinéticos para tempos de exposição (a alta pressão) de 1 a 8 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e a atividade residual no tempo zero (sem tratamento) foi definida como 100 %.

Pode-se observar na Figura 9, que a atividade específica residual da lisozima aumenta gradativamente até atingir seu máximo na condição sem o solvente em contato com a lisozima de $141,01 \pm 1,80$ % em 2 horas de exposição. A partir de então, a queda na atividade específica residual é observada, e com 6 horas de exposição a atividade residual foi de $109,16 \pm 0,64$ % praticamente alcançou à atividade específica residual inicial, 100 %, indicando que tempos longos de exposição não favorecem o aumento de atividade da enzima. Resultados similares são relatados por Santos, Rezende e Martínez (2016) que observaram também que o aumento do tempo de exposição promove queda na atividade residual. Na condição com uso do solvente scCO₂ em contato com a enzima o máximo de atividade residual foi de $133,93 \pm 0,91$ % em 4 horas de exposição, indicando ser o melhor tempo de tratamento. Observa-se que, para a condição experimental realizada sem o uso de solvente para a solução enzimática, atinge-se o máximo de atividade em menor tempo quando comparado aos experimentos realizados com o uso do solvente scCO₂.

Figura 9 - Cinética do tratamento da lisozima com e sem o solvente scCO₂ e com (25 mmol.L⁻¹) e sem força iônica no meio. Condições experimentais: tempo de tratamento 2 horas; Temperatura de 40,0 ± 0,5 °C; Razão mássica de solução enzimática/solvente de 1:1 (m/m).

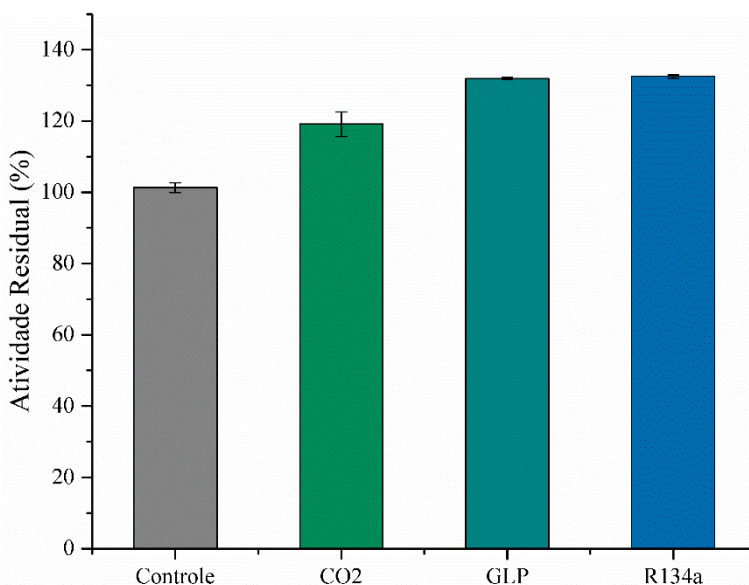


4.6 ATIVIDADE DA LISOZIMA TRATADA COM DIFERENTES FLUIDOS PRESSURIZADOS

Resultados obtidos para a atividade enzimática da lisozima tratada com scCO₂, GLP e R134a na condição experimental de 150 bar, taxa de depressurização de 30 bar.min⁻¹, concentração de enzima de 0,5 mg.L⁻¹ (na solução enzimática); razão mássica de solução enzimática/solvente de 1:1 (m/m) e força iônica de 25 mmol.L⁻¹ são apresentados na Figura 10. A comparação direta destes resultados com os obtidos após o tratamento com scCO₂ permite concluir que as atividades residuais no sistema com GLP e R134a foram ligeiramente superiores. Para o solvente GLP, o ganho de atividade enzimática foi de 31,91 ± 0,28 % e para o R134a o ganho foi de 32,51 ± 0,45 %, nas quais não houve diferença estatística pelo teste de t-Student considerando nível de confiança de 95 % (p<0,05). Desta forma, os valores de atividade residual usando o tratamento com GLP podem ser

considerados promissores economicamente, já que este solvente é constituído por uma mistura de gases hidrocarbonetos {maior fração é propano (50 %), seguida de butano (28 %)}, o qual é comercialmente usado como gás de cozinha e, portanto, tem um custo muito menor comparado ao CO₂ e ao R134a (KUHN et al., 2012).

Figura 10 - Tratamento da lisozima com diferentes fluidos pressurizados (scCO₂/GLP/R134a). Condições experimentais: pressão de 150 bar; força iônica de 25 mmol.L⁻¹; taxa de despressurização de 30 bar.min⁻¹; tempo de tratamento de 2 horas; Temperatura de 40,0 ± 0,5 °C; Razão mássica de solução enzimática/solvente de 1:1 (m/m). Controle = solução enzimática sem tratamento.



Observando os valores de atividade residual obtidos nos tratamentos com scCO₂, GLP e R134a, alguns autores relatam que gases com constantes dielétricas baixas favorecem a ativação interfacial das enzimas e, conseqüentemente, um aumento na atividade das mesmas (OLIVEIRA et al., 2006). Como o solvente GLP é constituído predominantemente de propano, assume-se que tal solvente possui baixa constante dielétrica, característica referente ao propano. Essa particularidade favorece a abertura do sítio ativo da enzima, relatado por alguns autores (HABULIN; KNEZ, 2002; ANDRADE et al., 2008). As

principais forças de estabilização das proteínas são o efeito hidrofóbico e o desenvolvimento de ligações de hidrogênio intramolecular, com isso o contato do solvente com a enzima possivelmente expõe seus resíduos apolares, promovendo o desdobramento da proteína (ANDRADE et al., 2008). Logo, o GLP pode ter contribuído para esse fenômeno, o que justifica o aumento de atividade residual, em comparação com o scCO₂. Não existem dados de tratamento da lisozima com esse fluido na literatura, porém Silva et al. (2013) também observaram um aumento da atividade residual relativa utilizando GLP como fluido pressurizado, porém com a enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-757.

Outro parâmetro importante é a solubilidade em água dos fluidos estudados, ambos os fluidos pressurizados, scCO₂ e R134a tem baixa solubilidade em água (maior componente presente na solução enzimática). Contudo, Jackson et al. (1995) demonstrou experimentalmente que sob condições de temperatura (50 °C) e pressão (344,8 bar), a água tem maior solubilidade no R134a (% molar = 1,23) do que no CO₂ (% molar = 0,75). Isso implica numa maior quantidade de moléculas do solvente R134a (em relação ao CO₂) em contato com as enzimas. Além disso, cabe lembrar que o CO₂ promove a acidificação do meio devido à formação de ácido carbônico. Tais diferenças possivelmente podem explicar o maior ganho de atividade residual para as enzimas tratadas com R134a em relação às tratadas com scCO₂. Yu et al. (2007) também relataram aumentos de atividades residuais de uma enzima tratada com o R134a, porém com diferentes pressões de trabalho.

Estudar diferentes gases para a substituição de um solvente orgânico por um fluido pressurizado em reações enzimáticas justifica-se pelo aumento das taxas de transferência de massa que tais solventes promovem (devido às propriedades favoráveis de transporte), além de uma menor agressão ao meio ambiente e maior facilidade de separação destes fluidos a partir do produto final da reação (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2001). Os resultados apresentados são promissores, uma vez que todos os gases estudados apresentaram efeitos positivos no aumento de atividade enzimática. Além disso, observou-se que o aumento de atividade enzimática depende das características dos solventes, do conteúdo de água na solução enzimática, do meio reacional e das variáveis de processo envolvidas (T e P), significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema investigado.

4.7 MODIFICAÇÕES CONFORMACIONAIS DA LISOZIMA

De forma a verificar as possíveis modificações conformacionais na lisozima lançou-se mão de diferentes metodologias analíticas para a identificação de modificações em nível de estrutura primária (seção 4.7.1), estrutura secundária (seção 4.7.2) e estrutura terciária (seção 4.7.3).

As amostras usadas para as análises mencionadas acima são oriundas de diferentes tratamentos enzimáticos (diferentes níveis de P, taxas de despressurização, força iônica e tipo de solvente pressurizado), porém, mesma temperatura $40,0 \pm 0,5$ °C e mesmo tempo de exposição (2 horas) aos tratamentos.

4.7.1 Espectroscopia de Massa (MALDI-TOF)

A fim de avaliar se houve alguma modificação na estrutura primária da lisozima, as amostras testadas nesse estudo, foram submetidas à análise por espectrometria de massa, pela técnica de ionização por eletropulverização, em espectrômetro de massa sistema MALDI-TOF/TOF.

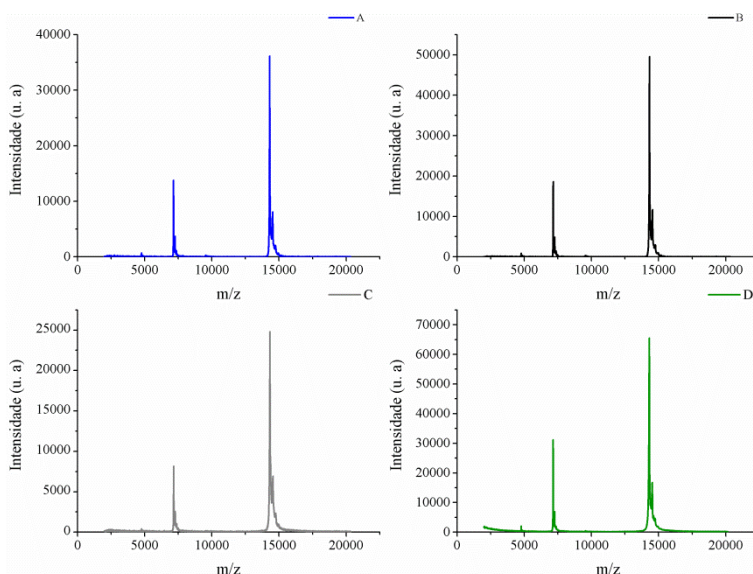
Como mostrado na Figura 11, os comportamentos de espectroscopia de massa da lisozima exposta aos diferentes tratamentos não foram alterados quando comparados com uma solução enzimática controle, ou seja, enzima sem tratamento a alta pressão. Estes resultados indicaram que não houve alterações na massa molecular ou ruptura da proteína. Demonstra ainda que, os peptídeos não foram decompostos após os tratamentos com scCO₂. Resultados similares foram reportados por Liu et al. (2012) e Liu, Chen e Wang (2013), na qual a estrutura primária das enzimas estudadas também permaneceu intacta depois do tratamento, o que foi justificado (segundo os autores) pela faixa de pressão empregada.

Dados importantes da literatura relataram que apenas pressões de 1000 a 2000 bar foram suficientes para provocar a dissociação de proteínas oligoméricas e complexos multiprotéicos (ZHANG et al., 2012). Além disso, Tang e Ma (2009) demonstraram que os agregados iniciais foram formados a pressão de 2000 bar utilizando a proteína isolada de soja. Portanto, uma vez que a intensidade de pressão usada neste estudo foi de apenas 100 a 200 bar, justifica-se a estrutura primária da lisozima permanecer inalterada.

Através dos resultados de espectroscopia de massa foi possível obter uma massa molecular de $14320,60 \pm 4,43$ Da para a lisozima, o

que dá uma diferença de apenas $0,10 \pm 0,03$ % de acordo com a massa teórica, que é 14307,0 Da (ZHONG et al., 2004), mostrando qualidade dos dados experimentais e na determinação das curvas.

Figura 11 - Espectros de massa da lisozima tratada em diferentes condições experimentais. (a) Amostra controle; (b) 150 bar; sem adição externa de força iônica; 30 bar.min⁻¹, sem o uso de solvente (scCO₂); (c) 150 bar; 25 mmol.L⁻¹; 30 bar.min⁻¹, com o uso de scCO₂ como solvente para a solução enzimática; (d) 200 bar; sem adição externa de força iônica; 10bar.min⁻¹, com o uso de scCO₂ como solvente para a solução enzimática.

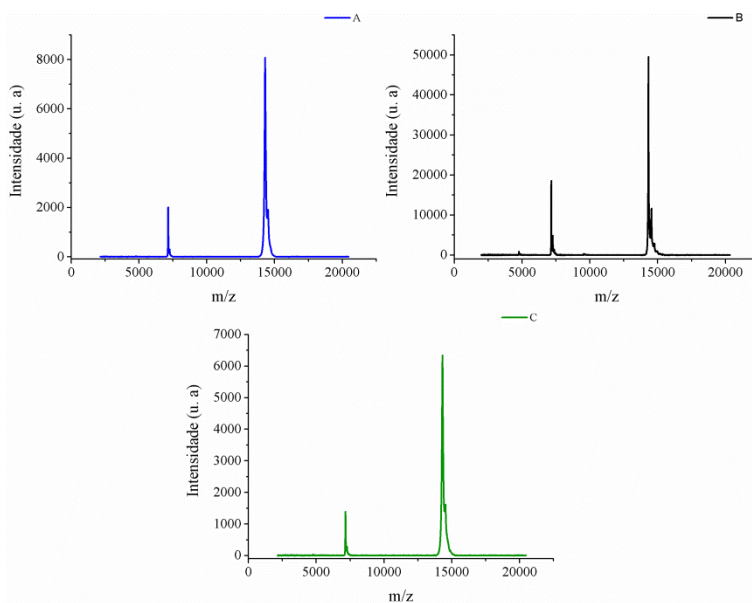


Do mesmo modo, a fim de avaliar se houve alguma modificação na estrutura primária da lisozima quando submetida ao tratamento com os fluidos pressurizados GLP e R134a como solventes para a solução enzimática, as amostras (previamente tratadas) foram submetidas à análise por espectrometria de massa. Para tanto, as amostras enzimáticas foram previamente tratadas com os solventes GLP e R134a a uma pressão de 150 bar, taxa de despressurização 30 bar.min⁻¹, Força iônica 25 mmol.L⁻¹.

Como mostrado na Figura 12, os comportamentos de espectroscopia de massa da lisozima exposta aos diferentes fluidos pressurizados não foram alterados quando comparados com o controle.

Estes resultados confirmam também que não houve alterações na massa molecular da lisozima. Ou seja, não houve modificação da enzima em nível de estrutura primária com o uso das diferentes metodologias experimentais adotadas no presente trabalho. Tais resultados corroboram com o exposto na literatura no que tange o uso de $scCO_2$ como solvente, bem como, a faixa de pressão adotada no presente estudo (ZHANG et al., 2012; LIU et al., 2012; LIU, CHEN e WANG, 2013).

Figura 12 - Espectros de massa da lisozima tratada com diferentes fluidos pressurizados na condição experimental de 150 bar; 25 mmol.L⁻¹; 30 bar.min⁻¹. (a) Amostra controle; (b) Com GLP; (c) Com R134a.



4.7.2 Dicroísmo Circular (DC)

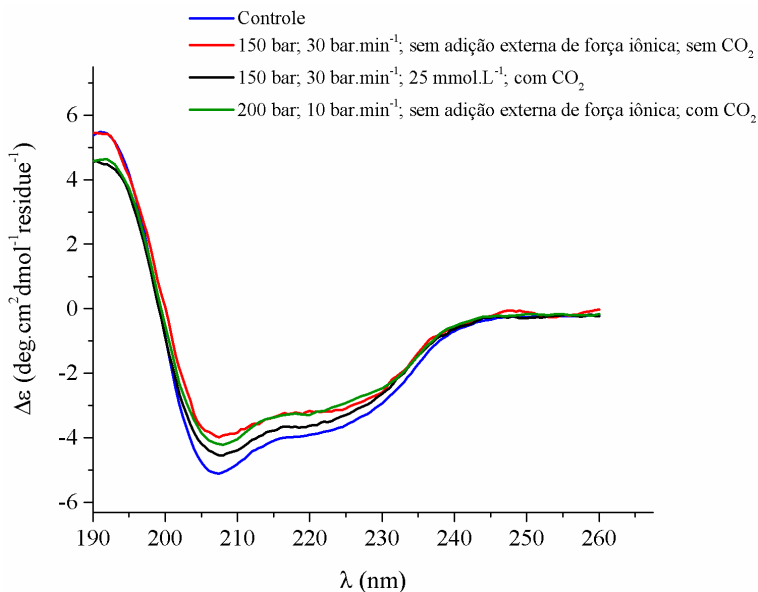
Visando verificar possíveis alterações na estrutura secundária da lisozima devido ao tratamento com fluidos pressurizados, a solução de enzima foi analisada por DC e seus espectros comparados com aqueles obtidos com a solução enzimática controle (sem tratamento prévio). A forma da curva dos espectros obtidos, bem como os comprimentos de onda máximo e mínimo de emissão, fornecem informações estruturais da proteína e de conteúdo de estruturas

secundárias, como conteúdo de α -hélice e folhas β (SREERAMA; WOODY, 2000).

A Figura 13 mostra espectros de DC de três diferentes amostras e compara com o espectro da amostra controle. O perfil de UV distante apresenta duas bandas negativas, uma em ≈ 208 nm e outra em ≈ 222 nm, características de proteínas com caráter predominante em α -hélice (KELLY; JESS; PRICE, 2005), além de uma banda positiva em ≈ 193 nm. Os cálculos de porcentagem de α -hélice e β -folha obtidos a partir das elipticidades molares em cada meio confirmam o alto conteúdo de estrutura α helicoidal (Tabela 5). Do mesmo modo, a análise dos espectros de DC para amostra controle forneceu as proporções relativas dos componentes da estrutura secundária da lisozima, em $34,16 \pm 2,20$ % de α -hélice e $14,18 \pm 1,60$ % de folhas β (Tabela 5), resultados semelhantes foram obtidos por alguns autores (DAY et al., 2014).

Os dados de DC das amostras de lisozima em diferentes tratamentos com fluido pressurizado revelaram que a lisozima preserva um enovelamento próximo ao nativo (amostra controle), confirmado pela semelhança nos espectros obtidos (Figura 13). Para a condição de 200 bar, taxa de despressurização de $10 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$, sem adição externa de força iônica e com scCO_2 como solvente para a solução enzimática é possível perceber que houve uma diminuição na intensidade do pico (negativo) a 208 nm, com alteração na intensidade do pico (negativo) a 222 nm, que provavelmente indica uma desestruturação da molécula com alteração na estrutura secundária (ROSSETO, 2011), em que há um decréscimo no teor de α -hélice de $34,16 \pm 2,20$ % para $30,17 \pm 0,07$ % e um ganho em β -folha de $14,18 \pm 1,60$ % para $17,91 \pm 0,03$ % (Tabela 5). Sugerindo que alterações na estrutura comprometem a funcionalidade do biocatalisador, o que explica a redução de 11,65 % na atividade residual nesse ensaio (exp. 2 - Tabela 3). Alterações na estrutura secundária da lisozima afetando a atividade biológica da enzima também foram relatados por Striolo et al. (2003). Têm-se também condição semelhante de espectro para o experimento a 150 bar, taxa de despressurização de $30 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$, sem força iônica e sem CO_2 em contato com a enzima, porém agora sem alterar a intensidade do pico (positivo) a 190 nm.

Figura 13 - Espectros de dicroísmo circular da Lisozima em diferentes condições experimentais. Parâmetros utilizados: As medidas foram realizadas a 25 °C; concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ de lisozima em água Milli Q; espectro obtido como média de três leituras subtraído do espectro de água Milli Q no Espectropolarímetro J-815; varredura de 190-260 nm e cubeta de quartzo de 0,01 cm de caminho ótico.



Em geral, percebe-se que o tratamento com CO₂ pressurizado não teve efeito significativo nos espectros obtidos, indicando que a composição estrutural secundária da enzima não foi significativamente alterada. Entretanto algumas diferenças espectrais foram observadas, como por exemplo, a variação de intensidades das curvas, que é devido a um rearranjo estrutural da proteína quando submetida aos tratamentos.

Os valores apresentados na Tabela 5 indicam que a diminuição no conteúdo de α -hélice observada nos ensaios a 150 bar, 30 bar.min⁻¹, 0 e 25 mmol.L⁻¹, com e sem contato do CO₂ com amostra não foram significativas ($p < 0,05$) em comparação com a amostra não tratada. Logo, pode concluir-se que o tratamento com fluido pressurizado não altera o seu conteúdo de α -hélice nestas condições experimentais estudadas.

Contudo o ganho em estrutura folha- β observado na condição 150 e 200 bar, 30 e 10 bar.min⁻¹, sem adição externa de força iônica foi

significativa ($p < 0,05$) e alguns autores relatam que está relacionado com uma possível agregação da enzima, causada pelo aumento de interações intermoleculares, ou ainda podem estar relacionadas às alterações em regiões próximas ao sítio ativo (GONÇALVES, 2013), uma vez que a lisozima apresenta folhas- β próximas ao sítio ativo, explicando a perda e aumento de atividade enzimática nessas condições (Tabela 3).

Salienta-se ainda, que, o resultado de atividade residual para o experimento realizado a 200 bar, $10 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$, sem adição externa de força iônica, com scCO_2 como solvente observado na Tabela 5 difere ligeiramente do resultado apresentado na Tabela 3 (seção 4.2.1) devido ter sido realizado novamente e em duplicata para as análises de conformação estrutural.

Já quando comparado com diferentes fluidos em contato com a enzima, as condições experimentais destas promoveram maiores alterações e significativas em termos de conteúdo de estrutura secundária (Tabela 6). Isso pode ser explicado, devido a maior interação dos gases com a enzima, quando se compara com o solvente CO_2 . Estes resultados apontaram que o aumento da atividade residual da enzima pode estar relacionado a mudanças na conformação induzido por tratamento com tais fluidos.

Tabela 5 - Elementos de estrutura secundária da Lisozima antes e depois do tratamento com fluido pressurizado. As porcentagens de estruturas secundárias foram calculadas utilizando o programa K2D3 a partir dos valores de elipticidade molar obtidos na Figura 13.

Tratamento	α -Hélice (%)	β -folha (%)	Atividade Residual (%)*
Controle	$34,16 \pm 2,20^a$	$14,18 \pm 1,60^a$	$101,33 \pm 1,33^a$
150 bar, $30 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$, sem adição externa de força iônica, sem scCO_2	$32,82 \pm 0,02^a$	$18,33 \pm 0,03^b$	$141,01 \pm 1,80^b$
150 bar, $30 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$, $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, com scCO_2	$31,11 \pm 0,03^a$	$16,56 \pm 0,04^a$	$119,07 \pm 3,41^b$
200 bar, $10 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$, sem adição externa de força iônica, com scCO_2	$30,17 \pm 0,07^a$	$17,91 \pm 0,03^b$	$89,39 \pm 1,04^a$

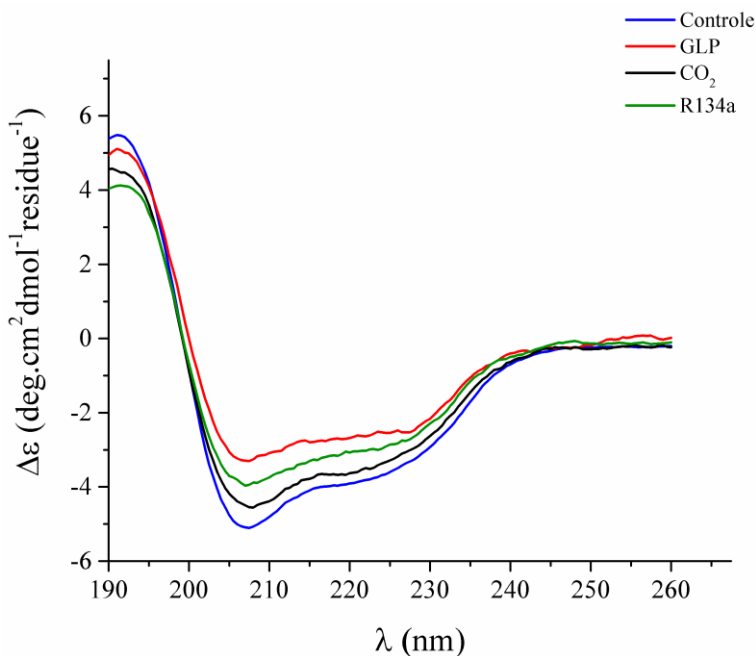
Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de t-Student a 5 % de probabilidade de erro.

* Atividade Residual definida conforme Equação 3, pág. 49.

A Figura 14 exhibe espectros de DC de três amostras tratadas com diferentes fluidos pressurizados e compara com o espectro da

amostra controle. O perfil de UV distante apresenta também duas bandas negativas, uma em ≈ 208 nm e outra em ≈ 222 nm, características de proteínas com caráter predominante em α -hélice (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Figura 14 - Espectros de dicroísmo circular da Lisozima tratada com GLP/scCO₂/ R134a. Condição experimental: 150 bar, 30 bar.min⁻¹, 25 mmol.L⁻¹. Parâmetros utilizados: As medidas foram realizadas a 25 °C; concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ de lisozima em água Milli Q; espectro obtido como média de três leituras subtraído do espectro de água Milli Q no Espectropolarímetro J-815; varredura de 190-260 nm e cubeta de quartzo de 0,01 cm de caminho ótico.



Os espectros de DC da lisozima apresentaram comportamentos distintos quando tratada com diferentes fluidos pressurizados (Figura 14). As fendas características da estrutura secundária alfa-hélice posicionados a 208 nm e 222 nm tornaram-se mais pronunciados quando em contato com o GLP e o R134a. A diminuição da elipticidade molar em 208 nm e em 222 nm foi em média de 33,33 % em contato com GLP e em média 22,06 % em contato com o gás R134a, portanto assume-se

que houve uma perda parcial da estrutura secundária da proteína, contudo tal condição foi favorável para o aumento de atividade, uma vez que observou-se ganho de atividade enzimática nessas condições experimentais (Figura 9), enquanto que para o tratamento com scCO_2 a diminuição da elipticidade molar foi em média 9,28 %.

Conforme descrito na Tabela 6, observa-se que o conteúdo de α -hélice diminuiu significativamente em comparação com a amostra controle, quando tratada com os solventes GLP e R134a, acompanhado por um aumento no conteúdo de β -folha. Pode-se observar que o aumento de atividade residual nessas condições experimentais tratadas com tais solventes originaram modificações similares na estrutura secundária da enzima, indicando que as alterações conformacionais podem ter promovido melhor acesso do substrato à região do sítio ativo, auxiliando na ativação enzimática.

Tabela 6 - Elementos de estrutura secundária da Lisozima antes e depois do tratamento com GLP/ scCO_2 /R134a, condição experimental de 150 bar, 25 mmol.L^{-1} , 30 bar.min^{-1} . As porcentagens de estruturas secundárias foram calculadas utilizando o programa K2D3 a partir dos valores de elipticidade molar obtidos na Figura 14.

Tratamento	α -Hélice (%)	β -folha (%)	Atividade Residual (%)*
Controle	$34,16 \pm 2,20^a$	$14,18 \pm 1,60^a$	$101,33 \pm 1,33^a$
Tratada com GLP	$27,17 \pm 0,02^b$	$22,05 \pm 0,05^b$	$131,90 \pm 0,28^b$
Tratada com CO_2	$31,11 \pm 0,03^a$	$16,56 \pm 0,04^a$	$119,07 \pm 3,41^c$
Tratada com R134a	$26,34 \pm 0,05^c$	$18,77 \pm 0,02^c$	$132,51 \pm 0,45^b$

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de t-Student a 5 % de probabilidade de erro.

* Atividade Residual definida conforme Equação 3, pág. 49.

4.7.3 Alterações no microambiente dos triptofanos monitoradas por fluorescência

Os resíduos de triptofano (Try) e tirosina (Tyr) presentes na sequência primária da lisozima foram monitorados pela espectroscopia de emissão de fluorescência a fim de explicar e confirmar as alterações conformacionais na estrutura terciária da enzima em diferentes tratamentos com fluido pressurizado.

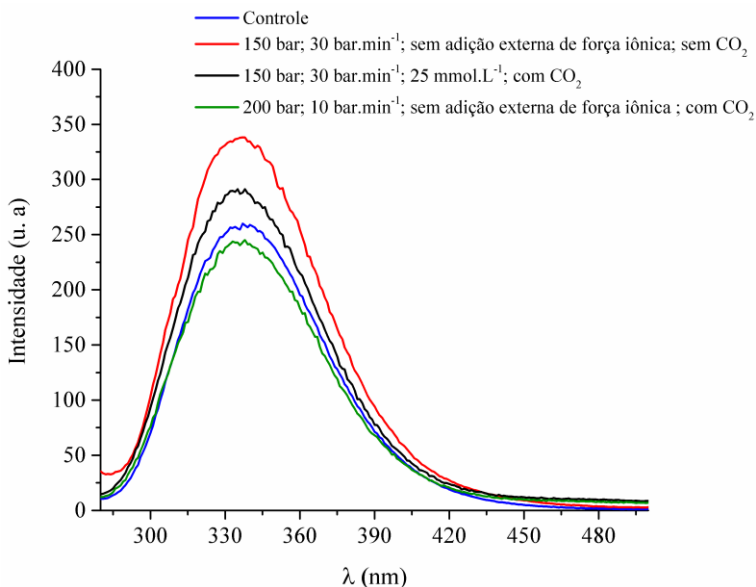
A lisozima possui seis triptofanos residuais (Trp) e três tirosinas residuais (Try), que resultam em um bom objeto de investigação para

análise, sendo que 80 % da fluorescência intrínseca da lisozima é proveniente de dois dos seis resíduos de triptofano (Trp 62 e 108) (IMOTO et al., 1972), e a partir da estrutura de cristalografia de raio-X sabe-se que estes dois resíduos de triptofano estão presentes no sítio ativo da enzima (BLAKE et al., 1967). A intensidade de emissão está relacionada com a conformação da proteína, a partir dos resultados pode-se concluir se os resíduos de triptofano internos estão mais expostos ou escondidos (LOPES et al., 2015).

As alterações na estrutura terciária da enzima tratada com e sem o scCO₂ como solvente para a amostra (solução enzimática) foram monitoradas e os espectros de emissão de fluorescência estão plotados na Figura 15. Como observado, o espectro de fluorescência para lisozima não tratada é caracterizado por um pico único, em $\lambda_{\text{máx}} \sim 338$ nm, resultados similares foram relatados por Mandal, Ghosh e Moulik (2016). Nas amostras tratadas o maior aumento na intensidade de fluorescência ocorreu com o ensaio a 150 bar, taxa de despressurização de 30 bar.min⁻¹, sem adição externa de força iônica e sem o scCO₂ como solvente para a amostra, sugerindo exposição de triptofanos mais internalizados. Além disso, sugere que o tratamento levou a enzima a adotar uma conformação aberta deixando mais exposto o sítio ativo. Sob tais condições, o substrato da enzima pode facilmente atingir o sítio ativo, resultando no aumento de atividade da enzima (HABULIN; KNEZ, 2002), o que explica o aumento da atividade residual nessa condição experimental (Tabela 4 – exp.5).

A redução na intensidade de emissão de fluorescência foi observada com o tratamento a 200 bar, 10 bar.min⁻¹, sem adição externa de força iônica no meio e com o uso de scCO₂ como solvente para a amostra (Figura 15), fator indicativo de uma diminuição na exposição dos resíduos (Try e Tyr) para a fase aquosa como consequência da compactação da proteína, o que coincide com a perda da atividade residual nessa condição (Tabela 3 – exp. 2). O tratamento com dióxido de carbono nestas condições pode ter induzido alterações na conformação estrutural, na qual os resíduos Trp e Tyr foram transferidos para um ambiente mais hidrofóbico (LIU; CHEN; WANG, 2013; CHEN et al., 2013b). Alguns autores sugeriram que, quando uma determinada pressão é atingida, as interações entre os resíduos de Trp e Tyr e CO₂ podem se tornar mais fortes, afetando negativamente a atividade enzimática (LIU et al., 2012; MELGOSA et al., 2015).

Figura 15 - Espectro de emissão de fluorescência da Lisozima em diferentes condições experimentais. Medidas realizadas a 25 °C; comprimento de onda de excitação de 280 nm, dados de emissão de fluorescência coletados entre 300 a 500 nm; aberturas de fenda de 20 nm para excitação e emissão, espectros obtidos como média de três leituras.

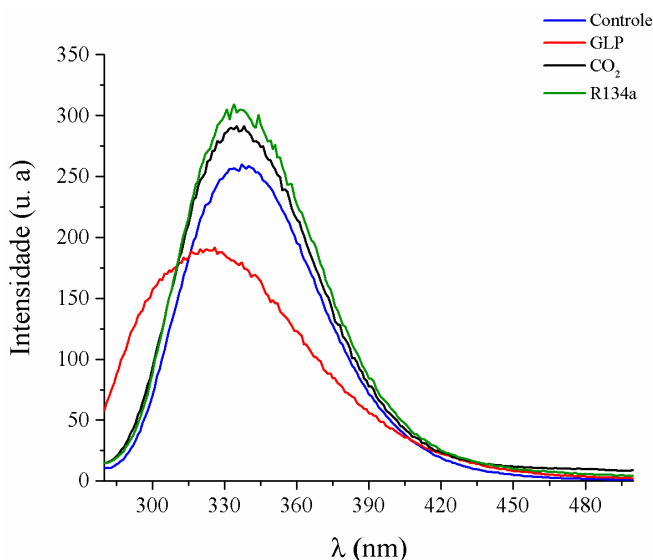


De modo geral, a intensidade de fluorescência apresentou uma dependência com a atividade enzimática, ou seja, quando a enzima apresentou maior ganho de atividade $141,01 \pm 1,80 \%$ a intensidade de fluorescência também aumentou em comparação com a amostra controle, seguida de uma atividade residual de $119,07 \pm 3,41 \%$, com intensidade de fluorescência intermediária entre a amostra controle e a amostra tratada na melhor condição experimental, por fim a menor intensidade de fluorescência foi observada na pior condição experimental, em que obteve-se uma atividade residual de $89,39 \pm 1,04 \%$. As mudanças na intensidade de fluorescência sem deslocamentos dos espectros indicam uma transição de desdobramento da enzima, que afeta, predominantemente a intensidade máxima (SACKETT; BHATTACHARYYA; WOLFF, 1994). Isso ocorre pelo desdobramento e/ou reestruturação das subunidades peptídicas (estrutura terciária) presentes na lisozima permitindo assim uma conformação mais ou menos favorável ao acesso do substrato no sítio ativo da proteína.

Isso pode conferir maior ou menor atividade enzimática dependendo do tipo de organização final da enzima.

Os resultados de emissão de fluorescência da enzima tratada com diferentes fluidos pressurizados estão plotados na Figura 16. Para o experimento com GLP é possível observar que houve diferença na intensidade de emissão quando comparado com amostra controle. Ainda, há um deslocamento do pico máximo de emissão de 12 nm em direção aos menores comprimentos de ondas, ou seja, passou de ~338 nm para ~326 nm. Segundo Faria et al. (2004), uma diminuição da polaridade do microambiente na vizinhança do triptofano induz um deslocamento da emissão máxima (desvio do máximo de emissão no sentido de comprimentos de onda mais baixos) provocado possivelmente pela interação do solvente com a enzima nessas condições.

Figura 16 - Espectro de emissão de fluorescência da Lisozima tratada com diferentes fluidos pressurizados. Condição experimental: 150 bar, 30 bar.min⁻¹, 25 mmol.L⁻¹. Medidas realizadas a 25 °C; comprimento de onda de excitação de 280 nm, dados de emissão de fluorescência coletados entre 300 a 500 nm; aberturas de fenda de 20 nm para excitação e emissão, espectros obtidos como média de três leituras.



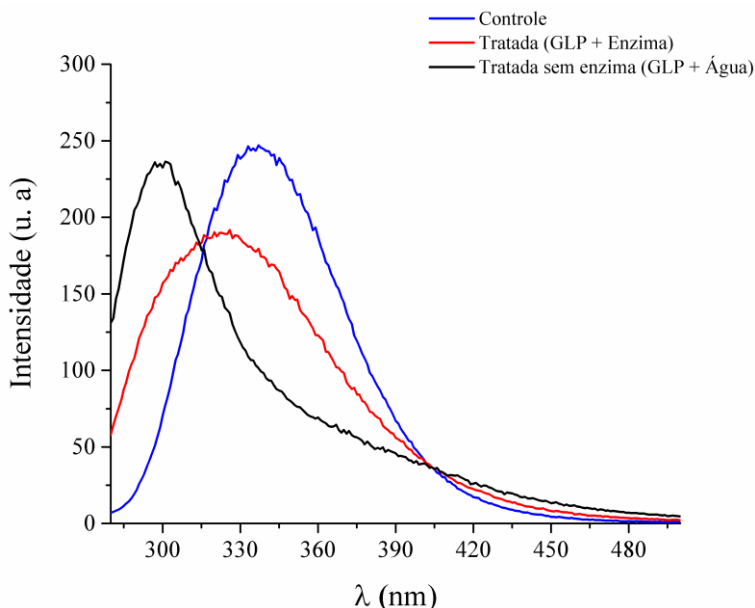
Nos demais espectros obtidos com as amostras tratadas com $scCO_2$ e R134a, novamente existe uma dependência da intensidade de fluorescência com a atividade residual, uma vez que o maior pico de intensidade foi observado quando a atividade residual atingiu $132,51 \pm 0,45$ % (para o R134a), confirmando novamente que a nova conformação da enzima beneficiou sua ativação.

Contudo, para explicar melhor o deslocamento do espectro de fluorescência obtida na condição que a enzima foi tratada com GLP, optou-se por realizar um experimento utilizando uma solução contendo água mais GLP, sem a enzima, nas mesmas condições experimentais. A fim de avaliar se existia alguma contribuição no espectro de fluorescência promovido pelos compostos presentes no GLP. Na Figura 17 foi possível constatar um pico de fluorescência em $\lambda_{m\acute{a}x} \sim 302$ nm para a amostra de água mais GLP, confirmando a existência de compostos fluorescentes no solvente, emitido provavelmente pelo enxofre encontrado na forma de mercaptana (radical R-S-H) (THOMPSON; ROBERTSON, 2000). Desta forma, o deslocamento do espectro possivelmente foi decorrente de uma interação/ligação entre tal composto (mercaptana) com a enzima, fornecendo um pico de fluorescência intermediário entre o espectro da enzima nativa e o espectro emitido pelo composto. Neste contexto, o real efeito do solvente GLP sobre os resíduos de Try e Tyr não pode ser avaliado com a metodologia padrão de espectroscopia de fluorescência, já que não se sabe ao certo qual a emissão líquida oriunda dos aminoácidos e qual a emitida pela mercaptana.

De modo geral (exceto para o GLP), os diferentes tratamentos a alta pressão para a lisozima originaram espectros muito semelhantes em termos de emissão máxima, revelando estabilidade estrutural da proteína. Esta estabilização estrutural observada pode ser atribuída à utilização de solventes com polaridade reduzida, logo as interações hidrofóbicas que estabilizaram a estrutura nativa foram enfraquecidas enquanto as ligações de hidrogênio foram fortalecidas (LIU; HSIEH; LIU, 2004). Porém diferenças nas intensidades dos picos foram percebidas, essas diferenças podem ser atribuídas a alterações no microambiente dos resíduos de triptofano e tirosina, além de diferentes estados de protonação da cadeia lateral de alguns resíduos de aminoácidos promovidos pela interação do $scCO_2$ ou aumento da força iônica do meio (FREITAS et al., 2011). Com estas observações, verifica-se que os dados obtidos por fluorescência corroboram com os dados obtidos com difrção circular, uma vez que estes mostraram

alterações estruturais quando expostas a diferentes tratamentos com diferentes fluidos pressurizados.

Figura 17 - Espectro de emissão de fluorescência da água mais GLP. Condição experimental: 150 bar, 30 bar.min⁻¹, 25 mmol.L⁻¹. Medidas realizadas a 25 °C; comprimento de onda de excitação de 280 nm, dados de emissão de fluorescência coletados entre 300 a 500 nm; aberturas de fenda de 20 nm para excitação e emissão, espectros obtidos como média de três leituras.



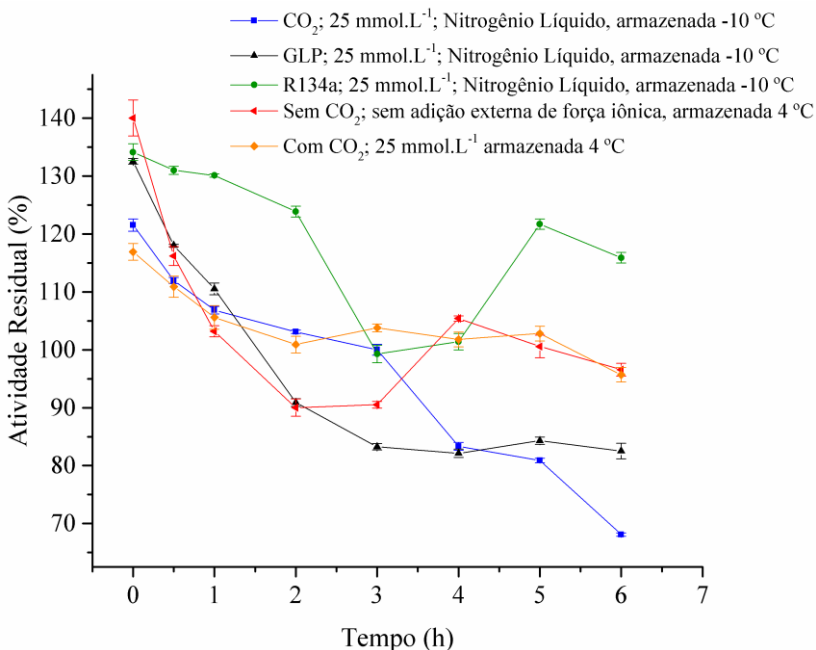
4.8 ESTABILIDADE DA LISOZIMA À BAIXA TEMPERATURA

De forma a definir a manutenção da atividade enzimática residual (após os diferentes tratamentos) sob diferentes condições de armazenamento, as amostras após tratamento com as melhores condições experimentais obtidas nas seções 4.2, 4.3 e 4.6 para 2 horas de tratamento foram monitoradas por até 6 horas para as seguintes condições de armazenamento:

a) armazenadas em geladeira a 4 °C, e b) congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido (-196 °C) seguido do armazenamento em congelador a -10 °C. Para a medida da atividade específica residual, todas as amostras eram ambientadas à temperatura de 25 °C em banho-

maria. Os resultados do estudo de estabilidade, em atividade específica residual (%), estão mostrados na Figura 18.

Figura 18 - Estabilidade da Lisozima tratada com (CO₂/ GLP/ R134a) e sem solvente para as amostras armazenadas durante 6 horas a 4 °C e congelamento rápido em N₂ líquido (-196 °C) seguido de armazenamento a -10 °C.



Pode-se observar na Figura 18, que a enzima tratada com os diferentes fluidos pressurizados perde atividade gradualmente com o passar do tempo de armazenamento a baixas temperaturas em todos os sistemas estudados. A enzima tratada sem o uso de solvente em contato com a amostra perde atividade nas primeiras horas de armazenamento, porém mantém em 5 horas a atividade residual superior a 100 %. No caso das enzimas tratadas com scCO₂ como solvente para a amostra, a queda de atividade residual é mais lenta com o passar do tempo, indicando que a interação do CO₂ com a enzima pode ter favorecido a estabilidade da enzima armazenada.

A enzima tratada com o R134a e congelada em nitrogênio líquido seguido de armazenamento em congelador, permaneceu com atividade específica residual inalterada nas primeiras horas de armazenamento

sofrendo uma queda brusca em 3 h e 4 h, mas reestabelecendo sua atividade residual nas horas seguintes.

Comparando os diferentes métodos de armazenamento a baixas temperaturas, verifica-se de um modo geral que, uma menor perda de atividade residual ocorreu quando a enzima sofreu congelamento rápido em nitrogênio líquido. No entanto, a maior perda de atividade específica residual foi observada para a enzima tratada com $scCO_2$ e congelada em nitrogênio líquido, demonstrando que o comportamento para cada sistema investigado é variável, dependendo do solvente e das variáveis manipuladas em cada experimento.

Contudo, todas as formas de tratamento enzimático estudadas, mostraram-se características de processos reversíveis, ou seja, a enzima tende a voltar a sua conformação inicial depois de um determinado tempo. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que a enzima nativa é mantida por balanços de forças não covalentes, como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, pareamento de íons e força de van der Waals. Quando ocorre o aumento de temperatura essas interações podem ser rompidas e a proteína se desdobra (ANFINSEN, 1973), adquirindo outra conformação, ou reestruturando-se para sua conformação nativa, refletindo na medida de atividade enzimática.

Neste contexto, o comportamento de diminuições e posteriores aumentos da atividade enzimática apresentado por algumas amostras na Figura 18 podem ser caracterizadas por uma modificação estrutural transitória da enzima modificada (pelo tratamento) durante o período de retorno e reestruturação ao seu estado nativo. Ou seja, o dobramento de alguma α -hélice ou β -folha nesse período pode causar uma maior ou menor atração do substrato ou mesmo diminuir a difusão dos substratos até o sítio ativo, o que pode explicar a oscilação na atividade enzimática.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, investigações acerca do comportamento da atividade enzimática da lisozima na forma livre, submetida a CO₂, GLP e R134a pressurizado foram realizadas a fim de fornecer uma melhor compreensão das alterações enzimáticas causadas por pressões elevadas. O uso do planejamento de experimentos para avaliar a atividade das enzimas mostrou ser uma ferramenta interessante para a investigação da influência das variáveis de processo no comportamento da enzima. Logo, as variáveis pressão e taxa de despressurização afetaram a atividade enzimática, porém a administração da força iônica não promoveu ganhos expressivos na atividade da enzima.

Incrementos na atividade residual da lisozima mostraram-se possíveis pelo uso das melhores condições experimentais de todas as abordagens metodológicas adotadas. Entretanto, a condição de maior aumento na atividade residual (de $41,01 \pm 1,80$ %) foi obtida quando submetida a um tratamento sem o uso de solvente para a amostra, sob pressão de 150 bar por 2 horas e despressurização a uma taxa de 30 bar.min⁻¹.

As análises de alterações conformacionais da enzima controle e tratada demonstraram que a estrutura primária da enzima permaneceu inalterada em todas as condições experimentais estudadas. Quanto as estruturas secundária e terciária, os espectros de DC e de fluorescência mostraram alterações conformacionais da lisozima para todas as condições testadas e os dados obtidos de elipticidade, intensidade de fluorescência; conteúdo relativo em α -hélice e β -folha forneceram informações importantes para desvendar o comportamento da enzima em fluidos pressurizados.

A avaliação da estabilidade de armazenamento em baixas temperaturas {4 °C e congelamento em nitrogênio líquido (-196 °C) seguido de armazenamento a -10 °C} da lisozima submetida ao tratamento em fluido pressurizado mostrou que a enzima não possui boa estabilidade sob tais condições de armazenamento. A enzima demonstrou ter adquirido uma conformação reversível, ou seja, a estrutura tende a voltar a sua conformação nativa após determinado tempo. No entanto, manteve-se atividades específicas residuais em valores acima de 100 % após 6 horas de armazenamento para algumas amostras.

Devido à carência de resultados na literatura sobre o comportamento e estudo de conformação estrutural de enzimas tratadas em fluidos pressurizados, o presente trabalho apresenta relevância para

fins de desenvolvimento de novas aplicações e/ou processos de catálise em reações de interesse, empregando a lisozima como biocatalizador, inseridas em diversas áreas, como na farmacologia, na indústria alimentícia e na engenharia química.

Ao mesmo tempo, a pesquisa revelou que a atividade enzimática e estabilidade podem depender de diversos fatores, como a espécie de enzima, características do fluido comprimido, pureza da enzima e das variáveis manipuladas no processo.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Tratamento a alta pressão das enzimas não comerciais com GLP e R134a;
- Explorar o uso do GLP e R134a em outras condições experimentais;
- Tratamento a alta pressão da lisozima manipulando a variável temperatura;
- Avaliar o efeito de outros sais para a administração da força iônica no meio;
- Tratamento enzimático a alta pressão com outras enzimas de interesse comercial;
- Tratamento enzimático a alta pressão seguida de reação química;
- Explorar a real contribuição da densidade de fluidos pressurizados na modificação do comportamento enzimático.
- Avaliar a liberação do sinal fluorescente utilizando sondas fluorogênicas;
- Utilizar os experimentos de DC e fluorescência para analisar a estabilidade e as possíveis mudanças conformacionais com adição conhecida de ligantes no sítio ativo da enzima;
- Predizer modelos de estruturas tridimensionais (3D) das enzimas estudadas a partir de modelagem molecular.

REFERÊNCIAS

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, n. 72, p.2-13, 2002.

AKASAKA, K. Pressure and protein dynamism. **High Pressure Research**, v. 34, n. 2, p.222-235, 3 abr. 2014.

ALVES FILHO, M. Chaperonas, as ‘damas de companhia’ das proteínas. **Jornal da Unicamp**. Campinas, p. 9-9. out. 2008. Disponível em:

<http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/outubro2008/ju413pdf/Pag09.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2017.

ANDRADE J. M.; OESTREICHER E. G.; OLIVEIRA J. V.; OLIVEIRA D.; ANTUNES O. A. C.; DARIVA C. Effect of treatment with compressed CO₂ and propane on d-hydantoinase activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 3, p.342-350, out. 2008.

ANFENSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. v.181, p. 223-230. (Nobel Lecture), 1973.

BALNY, C. Pressure effects on weak interactions in biological systems. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 16, n. 14, p.1245-1253, 26 mar. 2004.

BECKMAN, E. J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. **The Journal of Supercritical Fluids** v. 28, n. 2-3, p.121-191, mar. 2004.

BERESFORD N.; PATEL S.; ARMSTRONG J.; SZÖOR B.; FORDHAM-SKELTON A. P.; TABERNERO L. MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. **Biochemical Journal**, v. 406, n. 1, p. 13-18, 2007.

BERKOWITZ, S. A.; HOUDE, D. J. The Complexity of Protein Structure and the Challenges it Poses in Developing Biopharmaceuticals. **Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals**, p.1-21, 2015.

BEROVA, N.; BARI, L.; PESCIPELLI, G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 6, p.914-931, 2007.

BLACK D. S.; MONTAGNA L. G.; ZITSMANN S.; BLISKA J. B. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the Yersinia tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 1263-1274, 1998.

BLAKE C. C. F.; JOHNSON L. N.; MAIR G. A.; NORTH A. C. T.; PHILLIPS D. C.; SARMA V. R. Crystallographic Studies of the Activity of Hen Egg-White Lysozyme. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 167, n. 1009, p.378-388, 18 abr. 1967.

BRENDA. **Information on EC 3.2.1.17 - lysozyme**. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.17>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

CALLEWAERT L.; WALMAGH M.; MICHIELS C. W.; LAVIGNE R. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p.164-171, abr. 2011.

CALLEWAERT, L.; MICHIELS, C. W. Lysozymes in the animal kingdom. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p.127-160, 23 fev. 2010.

CAMPOS, F. P.; DOSUALDO G. L.; CRISTIANINI M. Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p. 351-357, jul./dez. 2003.

CHAN F. T. S.; PINOTSI D.; SCHIERLE G. S. K.; KAMINSKI C. F. Structure-Specific Intrinsic Fluorescence of Protein Amyloids Used to Study their Kinetics of Aggregation. **Bio-Nanoimaging**, p.147-155, 2014.

CHEFTEL, J. C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation / Revision. **Food Science and Technology International**, v. 1, n. 2-3, p.75-90, 1 jan. 1995.

CHEN B.; ZHANG H.; XI W.; ZHAO L.; LIANG L.; CHEN Y. Unfolding mechanism of lysozyme in various urea solutions: Insights from fluorescence spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1076, p.524-528, nov. 2014.

CHEN D.; PENG C.; ZHANG H.; YAN Y. Assessment of Activities and Conformation of Lipases Treated with Sub- and Supercritical Carbon Dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 7, p.2189-2201, 17 fev. 2013a.

CHEN D.; ZHANG H.; XU J.; YAN Y. Effect of sub- and supercritical CO₂ treatment on the properties of *Pseudomonas cepacia* lipase.

Enzyme and Microbial Technology, v. 53, n. 2, p.110-117, jul. 2013b.

COMIM, S. R. R.; VENERAL, J. G.; DE OLIVEIRA, D.; FERREIRA, S. R.; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in liquified petroleum gas and carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids* 96 (2015) 334–348.

COPAGAZ. **O que é GLP?** 2005. Disponível

em:<http://www.copagaz.com.br/representantes/o_que_e_glp.asp>

Acesso em: 05 jan. 2017.

CORR, S. 1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 118, n. 1-2, p.55-67, dez. 2002.

DAY, L.; ZHAI, J.; XU, M.; JONES, N. C.; HOFFMANN, S. V.; WOOSTER, T. J. Conformational changes of globular proteins adsorbed at oil-in-water emulsion interfaces examined by Synchrotron Radiation Circular Dichroism. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p.78-87, jan. 2014.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 5, p.331-347, nov. 2009.

ELLIOTT, W. H.; ELLIOTT, D. C. **Biochemistry and Molecular Biology**. New York: Oxford University, 1997. 437 p.

EYRING, H.; JOHNSON, F. H.; GENSLER, R. L. Pressure and reactivity of proteins, with particular reference to invertase. **Pressure and Reactivity of Proteins**, New Jersey, v. 50, p.453-464, ago. 1946.

FARIA T. Q.; LIMA J. C.; BASTOS M.; MAÇANITA A. L.; SANTOS H. Protein Stabilization by Osmolytes from Hyperthermophiles: Effect of *Mannosylglycerate* on the Thermal unfolding of recombinant nuclease A from *Staphylococcus Aureus* studied by picosecond time-resolved fluorescence and calorimetry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p.48680-48691, 4 set. 2004.

FRANKEN, L. P. G.; MARCON, N. S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DARIVA, C.; DESTAIN J.; OLIVEIRA, J. V. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 511 – 520, 2010.

FREITAS, C. D. T.; SOUZA LOPES, J. L.; BELTRAMINI, L. M.; OLIVEIRA, R. S. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; RAMOS, M. V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 10, p.2501-2507, out. 2011.

FRICKS, A. T.; SOUZA, D. P. B.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C.; GIRARDI, J. S.; OLIVEIRA D.; DARIVA, C. Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 347 – 353, 2006.

GIMENO M.; VENTOSA N.; SALA S.; VECIANA J. Use of 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R-134a)-Expanded Liquids as Solvent Media for Ecoefficient Particle Design with the DELOS Crystallization Process. **Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 1, p.23-25, jan. 2006.

GONÇALVES, K. M. **Relação estrutura-atividade de Lipases Comerciais Livres e em Micelas Reversas**. 2013. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

HABULIN, M.; KNEZ, Ž. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 12, p.1260-1266, 2001.

HAMMES, G. G. **Spectroscopy for the biological sciences**. John Wiley & Sons, 2005.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; WEEMAES, C. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 197-203, 1998.

HERBST, D.; PEPPER, S.; FERNÁNDEZ, J. F.; RUCK, W.; NIEMEYER, B. Pressure effects on activity and selectivity of *Candida rugosa* lipase in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p.104-110, fev. 2014.

HERBST, D.; PEPPER, S.; NIEMEYER, B. Enzyme catalysis in organic solvents: influence of water content, solvent composition and temperature on *Candida rugosa* lipase catalyzed transesterification. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p.398-403, dez. 2012.

HEREMANS, K. High Pressure Effects on Proteins and other Biomolecules. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 11, n. 1, p.1-21, jun. 1982.

HOBBS, H. R.; THOMAS, N. R. Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p.2786-2820, jun. 2007.

HOGAN, E.; KELLY, A. L.; SUN, D. W. High Pressure Processing of Foods: An Overview. Ed: Sun, DW. **Food Science and Technology, International Series. High Pressure Processing**, v. 1, p. 1-27, 2005.

HOLLER, E.; RUPLEY, J. A.; HESS, G. P. Productive and unproductive lysozyme-chitosaccharide complexes. Kinetic investigations. **Biochemistry**, v. 14, n. 11, p.2377-2385, jun. 1975.

HU, H.; WU, J.; LI-CHAN, E. C.; ZHU, L.; ZHANG, F.; XU, X.; PAN, S. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p.647-655, mar. 2013.

IMOTO, T.; FORSTER, L. S.; RUPLEY, J. A.; TANAKA, F. Fluorescence of Lysozyme: Emissions from Tryptophan Residues 62 and 108 and Energy Migration. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 69, n. 5, p.1151-1155, 1 maio 1972.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, n. 3, p.25-26, 1985.

JACKSON, K.; BOWMAN, L. E.; FULTON, J. L. Water Solubility Measurements in Supercritical Fluids and High-Pressure Liquids Using Near-Infrared Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 14, p.2368-2372, jul. 1995.

JACKSON, M. A.; ELLER, F. J. Isolation of long-chain aliphatic alcohols from beeswax using lipase-catalyzed methanolysis in supercritical carbon dioxide. **The Journal Of Supercritical Fluids**, v. 37, n. 2, p.173-177, abr. 2006.

JAENICKE, R. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. **Biochemistry**, v. 30, n. 13, p.3147-3161, abr. 1991.

JOLLÈS, P. Lysozymes: A Chapter of Molecular Biology. **Angewandte Chemie International Edition In English**, v. 8, n. 4, p.227-239, abr. 1969.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 63, n. 2, p.165-189, set. 1984.

KAMAT, S. V.; BECKMAN, E. J.; RUSSELL, Alan J. Enzyme Activity in Supercritical Fluids. **Critical Reviews In Biotechnology**, Pittsburgh, v. 1, n. 15, p.41-71, set. 1995.

KE S.; HO M. C.; ZHADIN N.; DENG H.; CALLENDER R. Investigation of catalytic loop structure, dynamics, and function relationship of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase by temperature-jump relaxation spectroscopy and X-ray structural determination. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 21, p. 6166-6176, 2012.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p.119-139, ago. 2005.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein And Peptide Science**, Scotland, v. 1, n. 4, p.349-384, nov. 2000.

KHANDELWAL, P.; KELIUKULI, K.; SMITH, C. L.; SAPER, M. A.; ZUIDERWEG, E. R. Solution structure and phosphopeptide binding to the N-terminal domain of *Yersinia* YopH: Comparison with a crystal structure. **Biochemistry**, v. 41, n. 38, p. 11425-11437, 2002.

KIM, S. E.; BAHTA, M.; LOUNTOS, G. T.; ULRICH, R. G.; BURKE, T. R.; WAUGH, D. S. Isothiazolidinone (IZD) as a phosphoryl mimetic in inhibitors of *theYersinia pestis* protein tyrosine phosphatase YopH. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 67, n. 7, p.639-645, 11 jun. 2011.

KNEZ, Z. Enzymatic reactions in dense gases. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 357 – 372, 2009.

KNEZ, Ž.; HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, n. 1, p.29-42, maio 2002.

KNEZ, Ž.; HABULIN, M.; KRMELJ, V. Enzyme catalyzed reactions in dense gases. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 1, p.17-29, out. 1998.

KOUL, A.; CHOIDAS, A.; TREDER, M.; TYAGI, A. K.; DRLICA, K.; SINGH, Y.; ULLRICH, A. Cloning and Characterization of Secretory

Tyrosine Phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p.5425-5432, 1 out. 2000.

KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; SILVA, M. F.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Synthesis of Fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* Commercial Inulinase Immobilized in Montmorillonite Pretreated in Pressurized Propane and LPG. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 3, p.750-760, 29 dez. 2012.

LEHNINGER, A. L. The Molecular Basis of Cell Structure and Function. **Biochemistry**, p.363-441, 1975.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX M. M. **Principles of biochemistry**. 4^a ed., New York: W. H. Freeman and Company, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier Editora, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a ed., São Paulo. Editora Sarvier, 2002.

LEYSSEN S.; VAN HERREWEGHE J. M.; CALLEWAERT L.; HEIRBAUT M.; BUNTINX P.; MICHIELS C. W.; STRELKOV S. V. Molecular Basis of Bacterial Defense against Host Lysozymes: X-ray Structures of Periplasmic Lysozyme Inhibitors PliI and PliC. **Journal of Molecular Biology**, v. 405, n. 5, p.1233-1245, fev. 2011.

LI, Z.; CAO, M.; ZHANG, W.; LIU, L.; WANG, J.; GE, W.; YUAN, Y.; YUE, T.; LI, R.; YU, W. W. Affinity adsorption of lysozyme with Reactive Red 120 modified magnetic chitosan microspheres. **Food Chemistry**, v. 145, p.749-755, fev. 2014.

LIAO X.; ZHANG Y.; BEI J.; HU X.; WU J. Alterations of molecular properties of lipoxxygenase induced by dense phase carbon dioxide. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p.47-53, jan. 2009.

LIU, H. I.; HSIEH, W. C.; LIU, H. S. Molecular Dynamics Simulations To Determine the Effect of Supercritical Carbon Dioxide on the Structural Integrity of Hen Egg White Lysozyme. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p.930-938, 4 jun. 2004.

LIU, W.; ZHANG, Z. Q.; LIU, C. M.; XIE, M. Y.; TU, Z. C.; LIU, J. H.; LIANG, R. H. The effect of dynamic high-pressure

microfluidization on the activity, stability and conformation of trypsin. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p.616-621, dez. 2010.

LIU, Y.; CHEN, D.; WANG, S. Effect of sub- and super-critical CO₂ pretreatment on conformation and catalytic properties evaluation of two commercial enzymes of CALB and Lipase PS. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 88, n. 9, p.1750-1756, 15 abr. 2013.

LIU, Y.; CHEN, D.; XU, L.; YAN, Y. Evaluation of structure and hydrolysis activity of *Candida rugosa* Lip7 in presence of sub-/super-critical CO₂. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 51, n. 6-7, p.354-358, dez. 2012.

LOPES, L. C.; BARRETO, M. T.; GONCALVES, K. M.; ALVAREZ, H. M.; HEREDIA, M. F.; SOUZA, R. O. M.; FRICKS, A. T. Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p.10-18, fev. 2015.

LÓPEZ-LUNA, A.; GALLEGOS, J. L.; GIMENO, M.; VIVALDO-LIMA, E.; BÁRZANA, E. Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p.143-149, nov. 2010.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 80, n. 12, p.2818-2818, 27 set. 2012.

MANDAL, B.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Detailed characterization of lysozyme (Lyz)–surfactant (SDDS) interaction and the structural transitions. **New J. Chem.**, v. 40, n. 5, p.4617-4624, 2016.

MANERA, A. P.; KUHN, G.; POLLONI, A.; MARANGONI, M.; ZABOT, G.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p.1235-1240, abr. 2011.

MARTINS, P. G. A.; MENEGATTI, A. C. O.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; DE OLIVEIRA, K. N.; GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; TERENCEZI, H. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine

phosphatase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p.35-41, jun. 2013.

MASCARELLO, A.; MORI, M.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; MENEGATTI, A. C. O.; DELLE MONACHE, F.; FERRARI, F.; BOTTA, M. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB) Inhibitors from Natural Products. **Plos One**, v. 8, n. 10, p.1-10, 14 out. 2013.

MATAGNE, A.; DOBSON, C. M. The folding process of hen lysozyme: a perspective from the 'new view'. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 54, n. 4, p.363-371, abr. 1998.

MATSUDA, T.; WATANABE, K.; HARADA, T.; NAKAMURA, K. Enzymatic reactions in supercritical CO₂: carboxylation, asymmetric reduction and esterification. **Catalysis Today**, v. 96, n. 3, p.103-111, out. 2004.

MELGOSA, R.; SANZ, M. T.; SOLAESA, Á. G.; BUCIO, S. L.; BELTRÁN, S. Enzymatic activity and conformational and morphological studies of four commercial lipases treated with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p.51-62, fev. 2015.

MENA, M.; SHIRAI, K.; TECANTE, A.; BÁRZANA, E.; GIMENO, M. Enzymatic syntheses of linear and hyperbranched poly-l-lactide using compressed R134a–ionic liquid media. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p.77-82, ago. 2015.

MENEGATTI, A. C. O. **Estudos de inibição de proteínas tirosina fosfatases de *Mycobacterium tuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*, e caracterização de uma proteína serina/treonina fosfatase de *Mycoplasma synoviae***. 2014. 211 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Circular Dichroism Spectroscopy for Protein Characterization. **Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals**, p.109-137, 2015.

MINE, Y., MA, F., LAURIAU, S. Antimicrobial peptides release by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **J.Agric. Food Chem.**, v. 52, p.1088-1094, 2004.

MONHEMI, H.; HOUSAINDOKHT, M. R. How enzymes can remain active and stable in a compressed gas? New insights into the conformational stability of *Candida antarctica* lipase B in near-critical propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p.161-167, dez. 2012.

MORILD, E. The Theory of Pressure Effects on Enzymes. **Advances in Protein Chemistry Volume 34**, p.93-166, 1981.

MOZHAEV, V. V.; HEREMANS, K.; FRANK, J.; MASSON, P.; BALNY, C. High pressure effects on protein structure and function. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 24, n. 1, p.81-91, jan. 1996.

NAVARRO, L; ALTO, N. M.; DIXON, J. E. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 21-27, 2005.

NORTHROP, D. B. Effects of high pressure on enzymatic activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1595, n. 1-2, p.71-79, mar. 2002.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V.; FREIRE, D. M. G. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 117 - 123, 2006.

OLIVEIRA, D; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, n. 2, p.141-148, fev. 2001.

OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Kinetics of the Enzymatic Alcoholysis of Palm Kernel Oil in Supercritical CO₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 12, p.4450-4454, dez. 2000.

ORO, C. D.; GAIO, I.; VALDUGA, E.; FURIGO JR. A.; NYARI, N., FERNANDES, I.; DARONCH, N. Avaliação da Estabilidade Térmica de Pectinases Comerciais Imobilizadas e Tratadas com Fluido Pressurizado. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - COBEQ IC 2015**, p.1127-1132, jun. 2015.

PAVONI, J. F.; NEVES-JUNIOR; W. F.; SPIROPULOS, M. A.; ARA, D.; ARAÚJO, D. Uma montagem experimental para a medida de

fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 36, n. 4, p.01-09, 2014.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p.101-120, ago. 2009.

REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p.272-280, may 2007.

RIVALAIN, N.; ROQUAIN, J.; DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p.659-672, nov. 2010.

ROSSETO, F. R. **Caracterização Bioquímica, Biofísica e Estrutural da Principal Endoglucanase Secretada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Física Aplicada – Opção Biomolecular, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SACKETT, D. L.; BHATTACHARYYA, B.; WOLFF, J. Local Unfolding and the Stepwise Loss of the Functional Properties of Tubulin. **Biochemistry**, v. 33, n. 43, p.12868-12878, nov. 1994.

SALTON, M. R. J. Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. **Nature**, London, v. 170, n. 4331, p.746-747, 1 nov. 1952.

SANTOS, P. REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p.170-178, jan. 2016.

SARAVANAN, R.; SHANMUGAM, A.; ASHOK, P.; KUMAR, D. S.; ANAND, K.; SUMAN, A.; DEVADOSS, F. R. Studies on isolation and partial purification of lysozyme from egg white of the lovebird (*Agapornis species*). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p.107-109, 05 jan. 2009.

SHU, Y.; MAKI, S.; NAKAMURA, S.; KATO, A. Double-Glycosylated Lysozyme at Positions 19 and 49 Constructed by Genetic

Modification and Its Surface Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p.2433-2438, jun. 1998.

SHUGAR, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 8, p.302-309, jan. 1952

SILVA, J. R.; CANTELLI, K. C.; TRES, M. V.; DALLA ROSA, C.; MEIRELLES, M. A. A.; SOARES, M. B.; MAZUTTI, M. A. Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p.102-107, abr. 2013.

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; GOLUNSKI, S.; OLIVEIRA KUHN, G.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic medium. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p.148-153, maio 2013.

SKOOG A. D.; HOLLER F. J.; NIEMAN A. T. **Princípios de Análise Instrumental**; 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p.836, 2002.

SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B. **Química orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 715, 2005.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, p.318-351, 2004.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p.252-260, dez. 2000.

SRIVASTAVA, S.; MODAK, J.; MADRAS, G. Enzymatic Synthesis of Flavors in Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 8, p.1940-1945, abr. 2002.

STRIOLO, A.; FAVARO, A.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A.; DI NOTO, V. Evidence of conformational changes for protein films exposed to high-pressure CO₂ by FT-IR spectroscopy. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 27, n. 3, p.283-295, dez. 2003.

SU, C. K.; CHIANG, B. H. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 257-263, 2006.

SUN, M. M. C.; CLARK, D. S. Pressure effects on activity and stability of hyperthermophilic enzymes. **Methods in Enzymology**, p.316-327, 2001.

TANG, C.; MA, C. Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p.606-611, mar. 2009.

THOMPSON, S. M.; ROBERTSON, G. Liquefied Petroleum Gas. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, p.1-14, 15 jun. 2000.

TSOU, C. Location of the active sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 11, n. 10, p. 427-429, 1986.

WHITTIER, S. K.; LORIA, J. P. ¹H, ¹⁵N, and ¹³C backbone resonance assignments for the yersinia protein tyrosine phosphatase YopH. **Biomolecular NMR Assignments**, p. 1-3, 2013.

WRIGHT, H. J.; SEGUR, J. B.; CLARK, H. V.; COBURN, S. K.; LANGDON, E. E.; DUPUIS, R. N. A report on ester interchange. **Oil & Soap**, v. 21, n. 5, p.145-148, maio 1944.

XU, D.; YUAN, F.; JIANG, J.; WANG, X.; HOU, Z.; GAO, Y. Structural and conformational modification of whey proteins induced by supercritical carbon dioxide. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 1, p.32-37, jan. 2011.

XU, K.; KLIBANOV, A. M. pH Control of the Catalytic Activity of Cross-Linked Enzyme Crystals in Organic Solvents. **Journal of The American Chemical Society**, v. 118, n. 41, p.9815-9819, jan. 1996.

YU, G.; XUE, Y.; XU, W.; ZHANG, J.; XUE, C. H. Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a). **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 12, p.793-798, 2 out. 2007.

ZHANG, T.; LV, C.; YUN, S.; LIAO, X.; ZHAO, G.; LENG, X. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) on structure and activity of phytoferritin. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p.273-278, jan. 2012.

ZHANG, Z. Y.; CLEMENS, J. C.; SCHUBERT, H. L.; STUCKEY, J. A.; FISCHER, M. W.; HUME, D. M.; DIXON, J. E. Expression, Purification, and Physicochemical Characterization of a Recombinant

Yersinia Protein Tyrosine Phosphatas. **The Journal of Biological Chemistry**, Michigan, v. 267, n. 33, p.23759-23766, nov. 1992.

ZHAO, Z.; HERBST, D.; NIEMEYER, B.; HE, L. High pressure enhances activity and selectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized onto silica nanoparticles in organic solvent. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p.240-244, out. 2015.

ZHONG, H.; ZHANG, Y.; WEN, Z.; LI, L. Protein sequencing by mass analysis of polypeptide ladders after controlled protein hydrolysis. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 10, p.1291-1296, 7 set. 2004.