

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

TALYTA MAYARA SILVA TORRES

INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO NAS LIPASES *CANDIDA*
ANTARCTICA B (CALB) E NS-40116

Florianópolis - SC

2017

Talyta Mayara Silva Torres

**INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO NAS LIPASES
*CANDIDA ANTARCTICA B (CALB) E NS-40116***

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

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio.

Florianópolis – SC

2017

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

Torres, Talyta Mayara Silva
INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO NAS LIPASES CANDIDA
ANTARCTICA B (CALB) E NS-40116 / Talyta Mayara
Silva Torres ; orientador, José Vladimir de
Oliveira, coorientador, Marco Di Luccio, 2017.
93 p.

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

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. enzima. 3.
lipase. 4. campo magnético. 5. atividade. I.
Oliveira, José Vladimir de. II. Luccio, Marco Di.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e orientação em todos os momentos do curso e na realização deste trabalho.

À minha família, em especial meus pais Maria Francisca e Geraldo, que mesmo de longe, foram minha base e motivação. À minha irmã Tamyla pelo amor e carinho.

Às minhas amigas Joyce, Priscylla e Marcele pelo companheirismo regado a longas conversas (online e/ou pessoalmente) e cafés...

Expresso meus sinceros agradecimentos aos meus orientadores José Vladimir de Oliveira e Marco Di Luccio pela confiança na realização deste trabalho, pela dedicação e suporte empenhados, sempre me auxiliando com muita paciência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC pelos conhecimentos assimilados no decorrer de 2 anos de mestrado.

A Universidade Federal de Santa Catarina, em especial os laboratórios LABSEM, LTBR, Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), CEBIME e CERMAT pela estrutura disponibilizada para realização dos experimentos.

Ao CNPq pelo financiamento à pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado e amigos, em especial “os chegados”, pelas experiências compartilhadas.

Quero agradecer imensamente aos meus colegas do LABSEM, em especial Lídia e Ingrid, pela amizade, apoio, confiança, e por me auxiliarem na realização deste trabalho.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação, o meu sincero obrigado.

RESUMO

As lipases são um grupo de enzimas de grande importância para a indústria de alimentos. Dessa forma, a realização de estudos que visem aumento da atividade e da estabilidade da enzima se faz necessário. Modificações genéticas, imobilização, alterações de condições do meio e aplicação de tecnologias não-térmicas são algumas das alternativas utilizadas para aumentar a competitividade e usabilidade das enzimas como catalisadores na indústria. O uso de campos magnéticos tem se destacado nesse contexto por ser uma tecnologia de simples operação, baixo custo, baixa demanda energética e mínimo impacto ambiental. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do campo magnético na atividade das lipases CalB e NS-40116. Formulações líquidas das enzimas (soluções de proteína enzimática em água com vários aditivos, incluindo sais e estabilizadores), fornecidas pela Novozymes, foram submetidas a módulos com ímãs que produzem campo magnético de intensidades 0,7 e 1,34 T, e os valores foram comparados com ensaios sem a influência do campo magnético (controle). Foram testadas condições de campo estático e por recirculação. O efeito do campo não foi significativo para a NS-40116 em nenhum dos tratamentos no modo estático. Contudo, observou-se incremento de atividade de 22% na condição de recirculação no campo de 1,34 T. O campo magnético estático teve efeito positivo para a CalB, e este foi maior em campo de intensidade 0,7 T. Desta forma, foi fixada essa intensidade, e testados a influência do pH da solução na atividade da enzima tratada magneticamente, as temperaturas do meio (25, 45 e 65 °C) para as amostras submetidas ao campo, e o tempo de indução, de 2, 3 ou 4 h. A melhor condição de incremento de atividade (134%), foi para a lipase CalB, diluída em tampão pH 7 (1:5), a 65 °C, por 2 horas. Para investigar a influência do campo na estrutura da molécula, estudos de caracterização foram conduzidos pelas técnicas de potencial zeta, infravermelho e espectroscopia de fluorescência. Os resultados sugerem aumento da ação do campo pelo aumento das cargas superficiais na condição ótima de incremento de atividade.

Palavras-chave: *enzima, lipase, campo magnético, atividade.*

ABSTRACT

Lipases are a group of enzymes of great importance to food industry. Thus, an assay of studies aimed at increasing the activity and stability of the enzyme is necessary. Genetic modifications, immobilization, changing conditions of use and non-thermal technologies are some of the alternatives used to increase the competitiveness and usability of enzymes as catalysts in the industry. Magnetic fields is a simple operation technology, with low cost, low energy demand and minimal environmental impact. The aim of this work was to evaluate the effect of the magnetic field on the activity of CalB and NS-40116 lipases. Liquid enzyme formulations (enzyme solutions in water with various additives, including salts and stabilizers), supplied by Novozymes, were submitted to modules producing 0.7 and 1.34 T magnetic field intensities, and the values were compared with tests without the influence of the magnetic field. Static and recirculation field conditions were tested. The field effect was not significant for NS-40116 in any of the static-mode treatments. However, the activity increment of 22% was observed in the recirculation condition of 1.34 T. The static magnetic field had a positive effect for a CalB, and it was higher at 0.7 T. The intensity of 0,7 T was fixed, and the influence of the pH of the solution, medium temperatures (25, 45 and 65 ° C) and the induction time (2, 3 or 4 h) were tested. The best activity increase condition was 134% for a CalB lipase, diluted in pH 7 buffer (1: 5), 65 ° C, 2 hours. To investigate an influence of the field on the structure of the molecule, characterization studies were conducted in zeta potential, infrared and fluorescence spectroscopy techniques. The results suggest the increase of the field action by the increase of the surface loads in the optimum condition of the increase of the activity.

Keywords: Enzyme. Magnetic field. Activity. Lipase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalina de alta resolução da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CalB), Protein Data Bank (PDB ID: 1LBS).....	27
Figura 2 - Estrutura cristalina de alta resolução da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> , Protein Data Bank (a-PDB ID: 1DT3; b-PDB ID: 4ZGB)..	29
Figura 3 – Principais métodos de espectroscopia de FTIR. (a) Transmissão; (b) Transflexão; (c) FTIR-ATR.....	36
Figura 4 – Esquema dos ensaios realizados com as enzimas CalB e NS-40116.....	41
Figura 5 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para ensaios com recirculação.....	43
Figura 6 – Amostra controle (a), ensaio utilizando ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro (Nd ₂ Fe ₁₄ B) com densidade de fluxo de 0,71 T (b), ensaio utilizando arranjo de Halbach com densidade de fluxo de 1,34 T (c).....	44
Figura 7 – Sistema para ensaios com variação de temperatura. (a) Tanque contendo módulo de ímãs permanentes (0,7 T) (b) Banho termostaticado.....	44
Figura 8 – Cinética de reação para a hidrólise de óleo de soja pela ação da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> submetida ao campo magnético (0,7 T e 1,34 T) e controle. (a) Estático; (b) Recirculação.....	53
Figura 9 – Cinética de reação para a hidrólise de óleo de soja pela ação da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> , com diferentes teores de água no meio reacional.....	54
Figura 10 – Atividade da lipase NS-40116 após exposição ao campo magnético e controle nos modos estático e recirculação.....	55
Figura 11 – Atividade específica residual da lipase CalB diluída em diferentes tampões fosfato (pHs 6,0, 7,0 e 8,0, diluição 1:5) após tratamento magnético (0,7 T, 2h, 25°C) e controle (0 T, 2h, 25°C).....	59
Figura 12 – Atividade específica residual (AER) da lipase CalB diluída em tampão fosfato pH 7 (1:5) submetida a campo magnético (0,7 T, 2h) e controle (0 T, 2h), em diferentes temperaturas.....	60
Figura 13 – Atividade específica residual (AER) da lipase CalB diluída em tampão fosfato pH 7 (1:5) submetida a campo magnético (0,7 T) e controle (0 T), a 65 °C, em diferentes tempos.....	62

Figura 14 – Espectro de infravermelho por reflexão atenuada (FTIR – ATR) para amostras de lipase líquida CalB diluídas em tampão pH 7 (1:5), submetida ao campo de intensidade 0,7 T, a 65 °C e controle na mesma temperatura e temperatura ambiente.....	65
Figura 15 – Espectro de infravermelho por reflexão atenuada (FTIR – ATR) nos números de onda relativos à estrutura secundária da proteína (1500 – 1700 cm ⁻¹) para amostras de lipase líquida de <i>Candida antarctica</i> B diluídas em tampão pH 7 (1:5), submetida ao campo de intensidade 0,7 T, a 65 °C e controle na mesma temperatura e temperatura ambiente.....	66
Figura 16 – Representação gráfica da CalB: Ligantes não conectados entre os resíduos, a largura da linha listrada é proporcional ao número de ligantes atômicos.....	68
Figura 17 – Espectros de emissão de fluorescência para a lipase CalB pH 7 (0,7 T, 65 °C) e lipase CalB pH 7 (0 T, 65 °C).....	69
Figura 18 – Estabilidade da lipase líquida CalB tratada com campo magnético de intensidade de 0,7 T e controle (sem tratamento magnético) nas condições de diluição em tampão fosfato pH 7 e 65 °C, armazenada a temperatura de 4 ± 2 °C.....	70
Figura 19 – Curva de concentração de proteína (BSA) vs absorvância....	89
Figura 20 – Curva de calibração p-nitrofenol gerada no <i>software</i> Statistica 7, Na ₂ CO ₃ 1 mol.L ⁻¹ , pH 12.....	91
Figura 21 – Curva de calibração p-nitrofenol gerada no <i>software</i> Statistica 7, NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ pH 14, 400 nm.....	92
Figura 22 – Curva de calibração p-nitrofenol gerada no <i>software</i> Statistica 7, Tampão fosfato pH 7.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos sobre efeito do campo magnético em enzimas.....	33
Tabela 2 – Teor de ácidos graxos livres produzidos por hidrólise do óleo de soja pela lipase NS-40116 (m/m, %).....	51
Tabela 3 – Atividade específica da lipase CalB após tratamento magnético e controle (lipase não diluída).....	57
Tabela 4 – Potencial Zeta para a solução de lipase (tampão fosfato pH 7 1:5) tratada (0,7 T, 65 °C, 2 horas) e controle (0 T, 65 °C/25 °C, 2 horas).....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVO GERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1. ENZIMAS	25
3.1.1. Lipases	25
3.1.1.1. Lipase B de Candida antarctica (CalB)	26
3.1.1.2. Lipase NS-40116.....	28
3.2. TRATAMENTOS DE ENZIMAS POR PROCESSOS NÃO TÉRMICOS.....	29
3.3. CAMPO MAGNÉTICO.....	31
3.4. TRATAMENTO DE ENZIMAS COM CAMPOS MAGNÉTICOS.....	32
3.5. TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO NAS LIPASES CALB E NS-40116.....	35
3.5.1. Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	35
3.5.2. Potencial Zeta	36
3.5.3. Espectroscopia de Fluorescência	37
3.5.4. Estabilidade ao armazenamento	37
3.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. ENSAIOS REALIZADOS COM AS LIPASES CALB E NS- 40116.....	41

4.2. MATERIAIS	42
4.2.1. Enzimas e Reagentes	42
4.3. APARATO EXPERIMENTAL	43
4.4. MÉTODOS.....	45
4.4.1. Procedimento experimental	45
4.4.1.1. Lipase NS-40116.....	45
4.4.1.2. Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CalB)	45
4.4.2. Determinação da atividade enzimática das lipases	46
4.4.2.1. Teor de ácidos graxos livres (AGL)	46
4.4.2.2. Hidrólise do p-nPP	46
4.4.3. Determinação do teor de proteína	47
4.4.4. Avaliação da estabilidade da lipase	48
4.4.5. Determinação do Potencial Zeta	48
4.4.6. Espectroscopia de Fluorescência	48
4.4.7. Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	48
4.4.8. Análise estatística	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. LIPASE NS-40116.....	51
5.1.1. Efeito do campo magnético sobre a atividade de hidrólise do óleo de soja	51
5.1.2. Efeito sobre a atividade de hidrólise do p-nPP	54
5.2. LIPASE B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> B	56
5.2.1. Efeito do campo sobre a atividade de hidrólise do óleo de soja	56

5.2.2. Efeito do campo sobre a atividade de hidrólise do p-nPP	56
5.2.3. Efeito do campo sobre a atividade de hidrólise do p-nPP (metodologia modificada)	57
5.2.3.1. Efeito do campo magnético a diferentes pHs	57
5.2.3.2. Efeito do campo magnético a diferentes temperaturas	59
5.2.3.3. Efeito do tempo de exposição ao campo magnético	61
5.2.4. Efeito do campo no Potencial Zeta das soluções de lipase	62
5.2.5. Efeito do campo magnético sobre a estrutura da lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CalB)	65
5.2.5.1. Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	65
5.2.5.2. Espectroscopia de Fluorescência	67
5.2.6. Efeito do campo sobre a estabilidade da lipase CalB	70
6. CONCLUSÕES	73
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
8. REFERÊNCIAS	77
9. APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA	89
10. APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA (p-nitrofenol)	91

1. INTRODUÇÃO

O crescente uso de enzimas como biocatalisadores em vários processos tem como meta a redução do uso de catalisadores tóxicos e poluentes, propiciando a redução de impactos negativos para o ambiente. O uso generalizado dos biocatalisadores reduz em 30% a dispersão tóxica, o consumo de água e a intensidade do material químico residual (ANGAJALA et al., 2015).

As enzimas são classificadas de acordo com seu mecanismo de catálise em vários grupos. As lipases fazem parte do grupo das hidrolases, enzimas que em meio aquoso promovem a quebra de ligações covalentes. Lipases hidrolisam ligações de acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. São enzimas de intensa aplicação industrial, como, por exemplo, na produção de ácidos graxos essenciais (MESSIAS et al., 2011) e biodiesel (CESARINE et al., 2014).

O campo magnético vem sendo muito estudado por ser uma tecnologia limpa, de fácil manuseio, baixo custo de operação, e por apresentar efeitos positivos em muitos processos, como na redução de incrustação de membranas, tratamento de água, efeitos em enzimas, entre outros.

No Laboratório de Separação de Membranas (LABSEM) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC têm-se avaliado o efeito do campo magnético na redução de incrustações de membranas de ultrafiltração e microfiltração (ZIN et al., 2016; SILVA, 2015; VARDANEGA et al., 2013) e seu efeito em soluções proteicas. Até então foram avaliadas apenas soluções modelo, soluções de albumina de soro bovino (BSA) e lisozima de clara de ovo, ambas as proteínas com alto grau de pureza e características físico-químicas e bioquímicas vastamente exploradas e conhecidas na literatura.

Com o intuito de verificar se os efeitos de campos magnéticos são extensíveis a outras proteínas, decidiu-se então por estudar o efeito do campo magnético em uma enzima de conhecida aplicação industrial, a lipase. A ideia foi verificar o efeito do campo no aumento da atividade da enzima, para posterior uso deste método como pré-tratamento no processo de produção industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da aplicação campo magnético sobre as lipases de *Candida antarctica* B (CalB) e de *Thermomyces lanuginosus* (NS-40116).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da intensidade do campo e o efeito da indução magnética na atividade catalítica das lipases de *Candida antarctica* B (CalB) e de *Thermomyces lanuginosus* (NS-40116).
- Avaliar a influência de diferentes concentrações de lipase, pH, tempo, temperatura e do método de indução (estático ou recirculação) na magnetização da solução enzimática.
- Avaliar as mudanças nas propriedades físico-químicas e na conformação das enzimas submetidas ao campo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem como objetivo apresentar a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento deste trabalho, incluindo tópicos sobre enzimas, em especial as lipases, campo magnético como tecnologia promissora para pré-tratamento de proteínas, e outros estudos envolvendo tecnologias emergentes e seus efeitos na atividade enzimática.

3.1. ENZIMAS

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico, todas as enzimas são proteínas. Elas são moléculas que possuem atividade catalítica, acelerando a velocidade de reação sem que elas mesmas sofram qualquer modificação química líquida, ou seja, sem que ocorram modificações irreversíveis da estrutura da enzima. A atividade catalítica de uma proteína depende da integridade da sua conformação nativa, e a reação se dá numa região específica da enzima conhecida como sítio ativo (LEHNINGER et al., 1995; ERGINER et al., 2000).

As enzimas são conhecidas como biocatalisadores de várias reações químicas em processos industriais. Sua aplicabilidade e especificidade de atuação em reações químicas são muito úteis para aplicações em larga escala (KUMAR et al., 2014).

Na crescente preocupação com questões ambientais, a utilização de enzimas tem se tornado essencial para o desenvolvimento sustentável de processos industriais envolvendo bioenergia e fabricação de produtos químicos (FOURAGE et al., 2013).

Em 2012, o mercado global de enzimas arrecadou cerca de US\$ 4,5 bilhões, com previsão de 7,1 bilhões para 2018 (DEWAN, 2014).

3.1.1. Lipases

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam as reações de hidrólise de acilglicerídeos de cadeia longa. Dependendo das condições do meio de reação, as lipases também catalisam reações de síntese, como de esterificação e transesterificação

(alcóolise e acidólise). São enzimas altamente aplicáveis na indústria devido às suas características de estabilidade a altas temperaturas e ampla faixa de pH, elevada especificidade ao substrato e propriedades de quimio, régio e enantioselectividade, e, por pertencerem ao grupo de serina hidrolases, não requerem cofatores para sua ação catalítica (ANGAJALA et al., 2016).

A reação da lipase com o substrato ocorre na camada lipídico/água, sendo o sítio ativo composto principalmente de uma tríade de aminoácidos contendo serina, histidina e aspartato. Esse sítio ativo é protegido por uma estrutura helicoidal oligopeptídica, que forma uma “tampa”, que se desloca quando a lipase se liga à interface lipídica, abrindo caminho para o substrato (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

As hidrolases são o grupo de enzimas mais utilizadas na indústria, quase 75 %, sendo as lipases, proteases e carboidrases aquelas com maior representação no mercado. As lipases se destacam nesse grupo por suas múltiplas aplicações, seja em indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, tratamento de efluentes, entre outras. Em alimentos é muito comum o uso para produção de ácidos graxos essenciais, como o ácido linolênico e α -linolênico, assim como para a produção de margarina (interesterificação) e reações de desacetilação da quitosana para produção de oligossacarídeos (MESSIAS et al., 2011; LI et al., 2012).

As lipases podem ser encontradas em várias espécies de animais, plantas, bactérias e fungos. As enzimas produzidas por micro-organismos são as mais utilizadas no mercado devido aos altos rendimentos possíveis, a facilidade de manipulação genética, a oferta regular devido à ausência de fatores sazonais, rápido crescimento de micro-organismos em meios baratos, geralmente resíduos de indústrias de alimentos, e maior estabilidade dessas enzimas comparadas às vegetais e animais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

3.1.1.1. Lipase B de *Candida antarctica* (CalB)

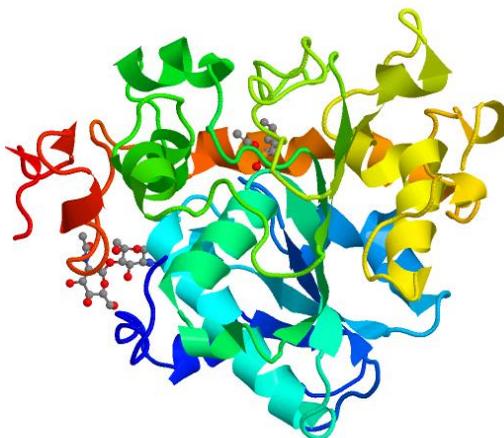
A lipase B de *Candida antarctica* (CalB) é umas das enzimas mais utilizadas em biocatálise para a conversão estereoseletiva de álcoois secundários. É bastante eficiente para reações de hidrólise em meio

aquoso e reações de esterificação em solventes orgânicos (RABBANI et al., 2015; LUTZ, 2004).

A CalB é um monômero, globular, do tipo α/β -hidrolase, com dimensões 30 Å x 40 Å x 50 Å, peso molecular 33,273 Da, e estrutura multitriptofano e multitirosina. Possui 317 resíduos de aminoácidos, e as pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de cisteína ajudam a manter a estabilidade conformacional da proteína, diminuindo a entropia, que está diretamente relacionada com a termoestabilidade da lipase (RABBANI et al., 2015; GUPTA et al., 2015). A estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica* (CalB) está apresentada na Figura 1.

Como as outras lipases, seu sítio ativo é a tríade catalítica Serina-Histidina-Aspartato, contudo possui uma característica que a diferencia do grupo, a de não possuir ativação interfacial, ou seja, não tem uma “tampa” que controle a entrada do substrato no sítio ativo, estando este prontamente disponível. A estrutura dos canais do sítio ativo a tornam altamente régio e enantioesetivas para álcoois e aminas e pouco enantioesetivas para ácidos carboxílicos (BLANK et al., 2006; TSAI, 2016).

Figura 1 – Estrutura cristalina de alta resolução da lipase B de *Candida antarctica* (CalB), Protein Data Bank (PDB ID: 1LBS).



Fonte: Uppenberg e colaboradores (1995).

3.1.1.2. Lipase NS-40116

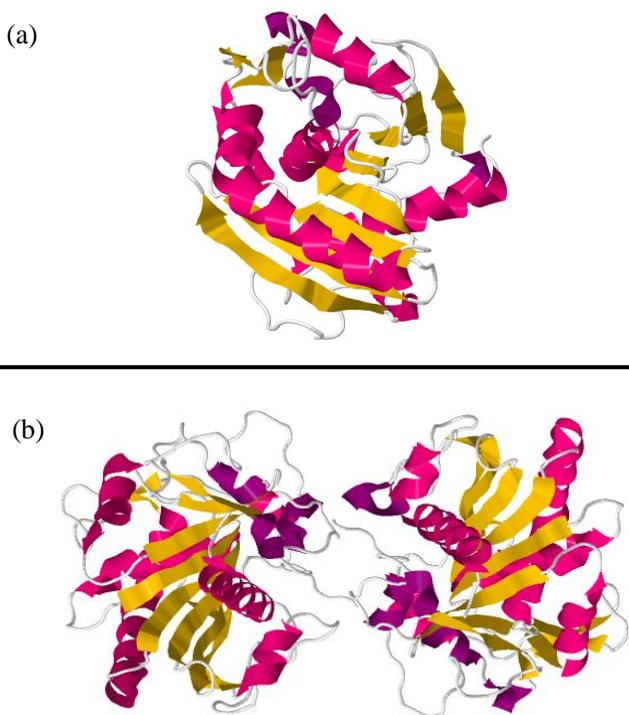
A lipase NS-40116 ou Callera Trans L[®] (Novozymes) é uma enzima de *Thermomyces lanuginosus* modificada (PRICE et al., 2014; PRICE et al., 2016). Ela é comercializada como uma formulação líquida, o que para alguns processos industriais é vantajoso, visto que a alternativa é a utilização de enzimas imobilizadas, que encarecem o processo.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é um monômero, com 269 aminoácidos, massa molecular 31,700 g/mol e ponto isoelétrico (pI) de 4,4. Ela possui forma estrutural esférica, de dimensões 35Å x 45Å x 50Å, e uma pequena α -hélice (86 a 93 aminoácidos) como ‘tampa’. Como lipase, seu sítio ativo é composto de uma tríade catalítica Serina-Histidina-Aspartato, e possui na ‘tampa’ um resíduo de triptofano (RODRIGUES et al., 2009; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A estabilidade da lipase de *Thermomyces lanuginosus* a temperaturas de 55-60°C, e atividade em pH alcalino, próximo de 9, faz com que seu uso seja desejável para diversos processos industriais. Apesar de ser um monômero, esta proteína tem uma forte tendência a formar dímeros (agregados bimoleculares) que são mais estáveis que os monômeros, sendo necessário algumas vezes diluir a enzima na presença de detergentes para se ter a forma monométrica em solução (RODRIGUES et al., 2009). A Figura 2 apresenta a estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus* obtida por meio de análise de cristalografia por método de difração de raio-X em forma de monômero (a) e dímero (b).

Alguns autores têm feito estudos utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* na sua forma líquida (Callera Trans L[®], Novozymes) para produção de biodiesel. Cesarine, Diaz e Nielsen (2013) observaram altas taxa de transesterificação e atividade de esterificação com o uso da lipase Callera Trans L e Pedersen e colaboradores (2014) também obtiveram bons resultados aplicando a enzima na forma líquida.

Figura 2 - Estrutura cristalina de alta resolução da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, Protein Data Bank (a-PDB ID: 1DT3; b-PDB ID: 4ZGB).



Fontes: Brzozowski e colaboradores (2000) e Kumar e colaboradores (2015).

3.2. TRATAMENTOS DE ENZIMAS POR PROCESSOS NÃO TÉRMICOS

O uso de enzimas como biocatalisadores tem tido cada vez mais visibilidade na indústria devido à crescente preocupação com questões ambientais. Apesar das vantagens do uso de enzimas no lugar de catalisadores químicos, ainda há alguns fatores que dificultam a aplicação desses biocatalisadores em larga escala, como o custo (no caso de enzimas imobilizadas) e baixa estabilidade no estado nativo. Para aumentar a usabilidade e competitividade das enzimas para aplicações industriais, tem-se desenvolvido alternativas como modificação genética,

imobilização, alterações de condições do meio e aplicações de tecnologias para aumentar a atividade e estabilidade desses catalisadores.

Na literatura podem ser encontrados estudos avaliando o efeito da alta pressão hidrostática, pulsos elétricos, ultrassom e campos magnéticos em enzimas e proteínas.

Há estudos que evidenciam o aumento da estabilidade e atividade de algumas enzimas quando aplicada a tecnologia de alta pressão hidrostática. Eisenmenger e Reyes-de-Corcuera (2009), por exemplo, observaram redução da inativação térmica de lipase CalB imobilizada em 152% depois de 4 horas de tratamento a 80°C e 400 MPa. Osorio e colaboradores (2008) avaliaram a atividade de interesterificação da lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada a 60°C e pressões de 0,1 a 150 MPa e observaram que com o aumento da pressão aumentou a seletividade para ácido láurico, contudo o tratamento diminuiu a estabilidade. No entanto, apesar de algumas vantagens na sua utilização, a alta pressão ainda é uma tecnologia de alto custo inicial e que necessita de mão de obra especializada para sua aplicação.

Outra tecnologia que vem sendo investigada com esse fim é a aplicação de pulsos elétricos. Wang e colaboradores (2014) avaliaram o efeito da atividade antioxidante (método de inibição de radicais DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) da enzima glutatona e observaram aumento dessa atividade de 81,83% para 97,40% após tratamento da enzima numa concentração de 8,86 mg/mL com pulsos de 9,74 kV/cm de intensidade e 2549,08 Hz de frequência.

O ultrassom também é outra tecnologia emergente que vem sendo explorado como alternativa, visando aumentar a atividade de enzimas comerciais. Subhedar e Gogate (2014) observaram aumento de 25% na atividade de celulase após tratamento por 30 min, em banho de ultrassom a 40 Hz. Yu e colaboradores (2013) também observaram aumento de atividade ao aplicar ultrassom a 40 Hz por 2,5 horas para a tirosinase, de 17,3 %.

O efeito do campo magnético também tem sido investigado em proteínas (ZIN et al., 2016; ASTIER; VEESLER e BOISTELLE, 1998; SAZAKI et al., 1997). No entanto, são muito poucos os estudos que tentam elucidar os mecanismos de atuação e efeito do campo na estrutura dessas moléculas.

3.3. CAMPO MAGNÉTICO

O campo magnético pode ser definido como a região onde se manifesta o magnetismo, seja ela ao redor de um ímã ou gerada por meio de cargas elétricas em movimento (SOARES, 2013). Os campos magnéticos podem ser classificados em relação à sua intensidade como fracos (< 1 mT), moderados (1 mT e 1 T), fortes (1-5 T) e ultra-fortes (> 5 T) e pelo tipo de campo, em estático ou oscilatório (DINI e ABBRO, 2005). Os campos magnéticos de interesse desse estudo são os de intensidade moderada e forte.

A descoberta nos anos 1960 de materiais que podiam gerar ímãs permanentes de alta intensidade gerou uma mudança no cenário tecnológico e científico, permitindo explorar seus efeitos. O ímã mais frequentemente utilizado é o ímã de neodímio-ferro-boro (NdFeB), também chamado de ímã de terras raras, que pode produzir campos de até 1,48 T (INSINGA et al., 2016).

O uso desses materiais se tornou ainda mais interessante com a invenção em 1973 do arranjo de Halbach, que é um arranjo de ímãs permanentes que aumenta o campo magnético em um lado do campo, enquanto cancela o campo do outro lado a quase zero (YOU et al., 2016). Esse arranjo se tornou um avanço para a aplicação do campo magnético em vários sistemas, permitindo o uso de alta intensidade sem afetar o ambiente em que está inserido.

Os materiais podem ser classificados de acordo com a sua susceptibilidade magnética em diamagnéticos, paramagnéticos, e ferromagnéticos. A susceptibilidade magnética é a força exercida pelo campo sobre a unidade de massa do corpo, então quanto maior esse valor for para um material, maior será a capacidade de magnetização pelo campo. Os diamagnéticos são materiais que possuem susceptibilidade pequena e negativa, que diferentemente dos demais não depende da temperatura. Os materiais paramagnéticos possuem elétrons desemparelhados que se aliam formando um campo magnético, sendo o composto fracamente atraído (susceptibilidade pequena e positiva). Já os materiais ferromagnéticos são fortemente atraídos pelo campo (susceptibilidade grande e positiva) (SOARES, 2013; ZAIDI et al., 2013).

Na literatura é possível encontrar uma gama de estudos que avaliam a influência dos campos magnéticos em sistemas biológicos (YAKIR-BLUMKIN, 2014; GREHL et al., 2014; DINI E ABBRO,

2005). Esse crescente interesse se dá pelas preocupações com a exposição diária a vários dispositivos que podem emitir ou produzir campos eletromagnéticos, mesmo que de baixa intensidade.

Além de atuar em sistemas biológicos, o campo magnético também tem sido utilizado como alternativa para prevenir e diminuir a formação de incrustações na superfície de membranas (VARDANEGA et al., 2013; ZIN et al., 2016), no tratamento de águas residuais (ZAIDI et al., 2013; RODRÍGUEZ-CHUECA et al., 2014), em sistemas de purificação de água (AMBASHTA, SILLANPÄÄ, 2010), modificação de proteínas (LIU et al., 2010; MAJOUGA et al., 2015), entre outras.

3.4. TRATAMENTO DE ENZIMAS COM CAMPOS MAGNÉTICOS

O estudo da influência do campo magnético em enzimas ainda é muito recente, com poucas investigações sobre o mecanismo de ação e efeito deste em enzimas comerciais. Na Tabela 1 está apresentada uma compilação de trabalhos que estudaram o efeito do campo magnético na atividade de algumas enzimas.

Alguns autores observaram aumento de atividade enzimática e outros, redução. Uma comparação entre os efeitos causados nas enzimas nem sempre é possível devido às diferentes condições do tratamento, das características do meio, como a intensidade do campo e das características da própria enzima. É possível encontrar uma grande variação nas intensidades de campo magnético utilizadas nos estudos, bem como tempo de exposição, tipo de ímã utilizado (eletroímã ou permanente), modo de aplicação (pulsado ou contínuo), entre outras condições.

Ran e colaboradores (2009) encontraram efeito positivo de aplicação do campo magnético em solução de celulase (0,5 mg/mL). Eles observaram que o tratamento aumentou a estabilidade da enzima em pHs 3-6 e obtiveram aumento de atividade de 37,01%. Em contrapartida, Majouga e colaboradores (2015) obtiveram efeito de redução da atividade enzimática com a aplicação do campo magnético para a α -quimotripsina imobilizada em relação ao controle (sem exposição ao campo).

Tabela 1 - Estudos sobre efeito do campo magnético em enzimas.

Enzima/Meio	Intensidade (T)	Tempo de exposição	Efeitos	Particularidades do sistema	Autor
Superóxido dismutase (SOD)	$2,9-4,6 \times 10^{-3}$	2,2, 19,8 e 33 s	Não houve aumento significativo da atividade em nenhuma das intensidades avaliadas	Contínuo, V=1m/s	BÜYÜKUSLU et al., 2006
Tecido de soja	$2,9-4,6 \times 10^{-3}$	2,2 e 19,8 s	Não houve aumento significativo da atividade de SOD (superóxido dismutase)	Contínuo, V=1m/s	ATAK et al., 2007
Sementes de trigo	5×10^{-3}	2 h	Redução de atividade de α e β amilases e aumento da atividade da glutatona-S-transferase	Campo magnético alternado (16Hz)	ROCHALSKA e GRABOWSKA, 2007
Suspensão de células vegetais de tabaco	1×10^{-2} e 3×10^{-2}	5 dias, 5 h cada	Aumento de atividade de superóxido dismutase (SOD) e redução de atividade de catalase.		SAHEBJAMEI et al., 2007
Cultura de alga <i>Chlorella vulgaris</i>	$1-5 \times 10^{-2}$	12 h	Aumento de atividade de peroxidase e SOD ($10-35 \times 10^{-3}$) e catalase ($45-50 \times 10^{-3}$)		WANG et al., 2008

α -amilase	0,15, 0,30 e 0,45	2 h	Aumento de atividade em 27%, 34,1% e 37,8%, respectivamente	0,02 mol/L; pH6,0; T=25°C	JIA et al., 2009
Celulase	0,15, 0,30 e 0,45	1-12 h	Aumento da atividade em 37,01%	0,5 mg/mL; T=4°C	RAN et al., 2009
Cérebro de rato	128×10^{-3}	1 h/dia, 30 dias	Redução de atividade de glutathiona peroxidase, SOD e catalase.		AMARA et al., 2009
α -amilase	0,15	1-9 h	Aumento de atividade 19,53%	Imobilizada; T=4°C	LIU et al., 2010
α - quimotripsina	250×10^{-3}	5,5 min (2x2,5 min e 0,5 pausa)	Redução da atividade.	Imobilizada; pH 8,2; alternado (50Hz)	MAJOUGA et al., 2015

3.5 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO NAS LIPASES CALB E NS-40116

3.5.1. Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)

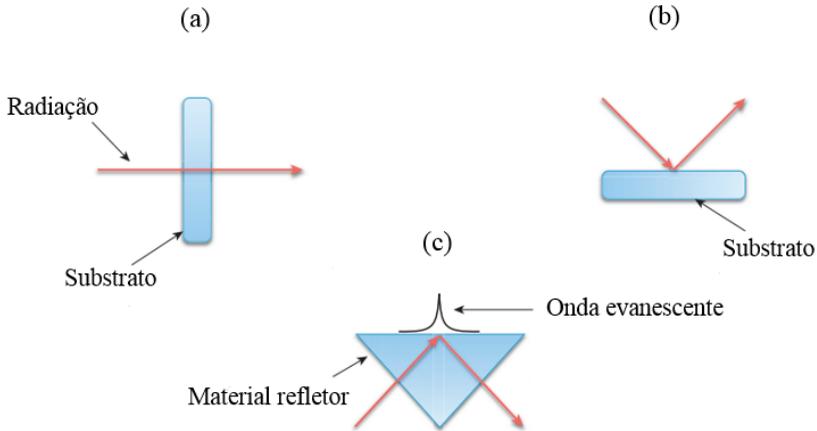
A espectroscopia de infravermelho é um dos métodos clássicos para determinação de estrutura de pequenas moléculas (BARTH, 2007). Tem tido como vantagem em relação a outros métodos, a rapidez de detecção, a facilidade de uso e a efetividade de custo (HANDS et al., 2014).

A espectroscopia por infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica que produz espectros que resumem picos de absorção de infravermelho numa gama de comprimentos de onda limitada que pode ser explicada por vibrações moleculares dentro de uma amostra que foi exposta a uma fonte de radiação infravermelha (DORLING; BAKER, 2013).

Existem três principais métodos de espectroscopia de FTIR (Figura 3), de transmissão, na qual o equipamento transmite irradiação através da amostra e detecta a radiação não absorvida. Nela são utilizados substratos transparentes para permitir que a radiação atravesse a amostra; de transflexão, na qual a radiação passa pela amostra e é refletida no substrato de volta para a amostra; e de reflexão total atenuada (ATR), que induz a luz infravermelha em uma interface entre um material transparente com alto índice de refração (maior que a amostra) e uma amostra na superfície desse material, ocorrendo então reflexão interna total. Na superfície refletora se estabelece uma onda evanescente que atenua o feixe de luz que sai do refletor, e interage com a amostra (DORLING; BAKER, 2013; GLASSFORD et al., 2013).

A análise por FTIR-ATR pode ser usada para analisar a estrutura secundária de proteínas. As bandas de absorção relativas às estruturas de α -hélice folhas- β estão localizadas na região de 1500 a 1700 cm^{-1} , sendo as bandas 1638 e 1694 cm^{-1} onde se encontram as estruturas folha- β (paralelas e antiparalelas, respectivamente), e na banda de 1655 cm^{-1} se encontra estrutura α -hélice (KHURANA e FINK, 2000; BARTH, 2007; MOVASAGHI et al., 2008).

Figura 3 – Principais métodos de espectroscopia de FTIR. (a) Transmissão; (b) Transflexão; (c) FTIR-ATR.



Fonte: Adaptado de Dorling e Baker (2013).

3.5.2. Potencial Zeta

O Potencial Zeta é o potencial na dupla camada elétrica, gerada na interface sólido-líquido de um material em solução aquosa, e é fortemente afetado pelo pH e força iônica da água (CHEN et al., 2014).

Um elevado valor absoluto (negativo ou positivo) do potencial zeta dá maior estabilidade aos sistemas coloidais, por causa das repulsões eletrostáticas que são originadas impedindo a agregação de partículas dispersas. Se o valor absoluto do potencial é perto de 0, há forte tendência de coagulação e floculação. Geralmente, a linha de separação entre suspensões estáveis e instáveis é tomada de -30 mV para +30 mV (POLLASTRI et al., 2014).

O potencial zeta pode ser usado como indicador da eficiência de ligação em processos de imobilização, uma vez que quantifica as interações eletrostáticas entre enzima e matriz de partículas. Schultz (2008) utilizou dessa ferramenta para avaliar a relação entre o potencial zeta e a eficiência de ligação da lipase A de *Candida Antarctica* em um suporte não poroso (micropartículas magnéticas com terminações epóxi, carboxi e amina).

As cargas superficiais estão relacionadas às interações que envolvem afinidade. Dessa forma, a avaliação do potencial zeta para soluções enzimáticas no presente estudo se apresenta como alternativa para analisar se ocorrem mudanças nas cargas superficiais da enzima e como pode estar relacionado à mudança de atividade após aplicação do tratamento.

3.5.3. Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que avalia as propriedades físico-químicas de uma substância analisando a intensidade e característica de luz emitida em forma de fluorescência. O processo se dá pela emissão de um fóton luminoso que ativa a molécula, e esta libera um fóton de remissão em um processo chamado de fluorescência. O comprimento de onda de ativação é chamado de comprimento de excitação e o comprimento de onda do fóton emitido, de emissão. Espectroscopia de fluorescência é a detecção e análise desse sinal ótico reemitido. Os espectros de fluorescência podem ser produzidos tanto fixando o comprimento de onda de excitação e “varrendo” os comprimentos de emissão, como o contrário (GILLENWATER; JACOB; RICHARDS-KORTUM, 1998).

As moléculas que emitem fluorescência possuem um comprimento de onda de excitação e emissão específico. Para avaliação da estrutura de proteínas é interessante avaliar essas características, levando em consideração os resíduos de aminoácidos, ligantes e outros compostos que fazem parte da molécula.

3.5.4. Estabilidade ao armazenamento

O estudo da estabilidade ao armazenamento se faz muito importante quando avaliando o efeito de modificação na atividade enzimática. É interessante avaliar a duração dos efeitos, se reversíveis ou não e a aplicabilidade desse efeito em situações reais de produção e armazenamento de produtos e insumos.

Para a indústria, a aplicabilidade de qualquer enzima é julgada pelo conhecimento de sua estabilidade (SRIVASTAVA et al., 2014). Sendo assim, para validar qualquer estudo de um processo que altere a

atividade enzimática é necessário fazer um estudo de estabilidade dos seus efeitos.

3.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

A revisão bibliográfica buscou apresentar um embasamento teórico sobre a tecnologia utilizada nesse estudo, as lipases e suas características e uma síntese dos estudos já realizados na área com relação à influência do campo magnético na atividade enzimática.

Há na literatura alguns estudos que observaram aumento da atividade enzimática, e outros que obtiveram resultados de redução dessa atividade após exposição a um dado campo magnético. Ambos os resultados são interessantes para indústria, visto que por vezes há intenção de desativar enzimas deteriorantes em produtos. Foi visto que é difícil uma comparação entre os efeitos dos campos estudados, devido à grande variação nas condições experimentais, além de diferentes enzimas que foram avaliadas. Cada molécula pode reagir de uma forma única estando sob o efeito do campo, isso depende das suas características físico-químicas e bioquímicas.

A maioria das pesquisas que avaliam o efeito do campo magnético foca na mudança na atividade enzimática, sendo poucos os estudos que tentam elucidar os mecanismos de ação do campo nessas moléculas. Ran e colaboradores (2009) além de verificarem aumento da atividade em 31,01 %, observaram diferença na estrutura secundária da celulase (análise de dicróismo circular) depois da aplicação de campos de intensidades 0,15, 0,30 e 0,45 T.

Albuquerque e colaboradores (2016) revisaram estudos sobre a influência de campo magnético estático em sistemas celulares. Devido à complexidade desses sistemas, eles estudaram a influência do campo em várias moléculas que podem estar presentes nesses sistemas, incluindo enzimas. Eles concluíram que são escassos os estudos que avaliam as interações do campo e enzima. Algumas teorias sugerem que a ação do campo se dá pela orientação dos elétrons desemparelhados de íons metálicos, assim iniciando reação em cadeia que vai incrementar a velocidade da reação, outras que o campo pode afetar as concentrações de substrato e enzimas pela ação em compostos diamagnéticos.

O uso das enzimas como biocatalisadores está cada vez mais amplo devido ao crescente interesse em diminuir o uso de solventes orgânicos de natureza tóxica e poluente. Nesse contexto, a lipase é uma enzima de grande importância e aplicação industrial, sendo interessante aprofundar estudos que aumentem a competitividade e usabilidade destas para processos de alto valor agregado.

O campo magnético se inclui nesse contexto como uma alternativa de melhorar a atividade da lipase em sistemas para aplicação industrial. Apesar de a lipase ser uma categoria de enzima bastante utilizada e explorada na literatura, ainda não há pesquisas publicadas envolvendo a avaliação do efeito do campo magnético nessas enzimas, justificando o objetivo do presente trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

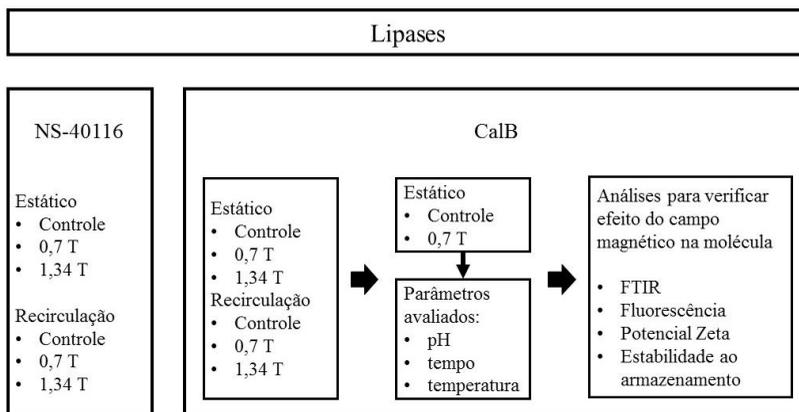
Neste capítulo será apresentada uma descrição dos materiais utilizados e dos métodos e equipamentos empregados para realização deste trabalho.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Separação por Membranas (LABSEM), Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) e Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT) da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.1. ENSAIOS REALIZADOS COM AS LIPASES CALB E NS-40116

Na Figura 4 é apresentado um esquema que resume os ensaios realizados nesse trabalho, visando facilitar a visualização das atividades executadas.

Figura 4 – Esquema dos ensaios realizados com as enzimas CalB e NS-40116.



4.2. MATERIAIS

4.2.1. Enzimas e Reagentes

Foram utilizadas formulações líquidas de lipase de *Candida antarctica* B e NS-40116 gentilmente cedidas pela Novozymes.

Os pHs dessas formulações foram medidos em pHmetro digital (modelo QUIMISQ 400A) e os valores encontrados foram de pH 5,2 e 4,3 para as lipases NS-40116 e CalB, respectivamente.

A seguir estão listados os reagentes utilizados para determinação da atividade enzimática.

- Palmitato de *p*-nitrofenila (Sigma-Aldrich)
- *p*-nitrofenol (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (pureza mín. 98%, LAFAN)
- Fosfato de sódio bibásico anidro P.A. (pureza mín. 98%, NEON)
- Etanol P.A. (Synth)
- Hidróxido de sódio perolado (pureza mín. 97%, LAFAN)
- Carbonato de sódio (Sigma-Aldrich)
- Óleo de soja (Liza, Cargill)
- Fenolftaleína P.A. (NUCLEAR)
- Água destilada

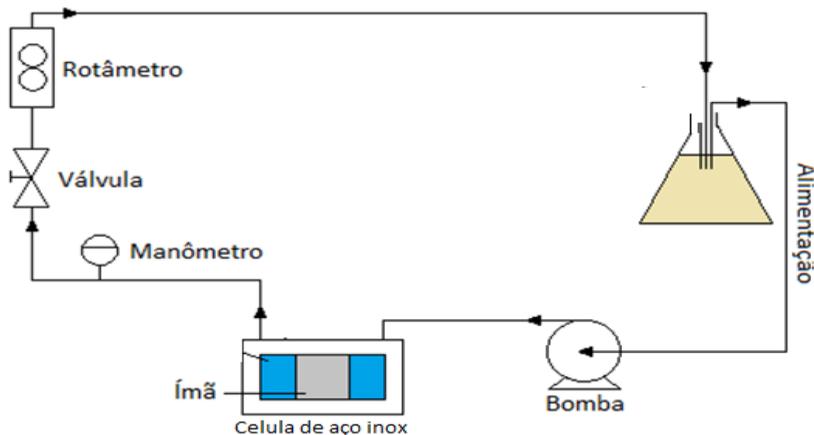
Para a determinação do teor de proteína foram utilizados os seguintes reagentes.

- Ácido Fosfórico (Orto) P.A. (pureza 85%, VETEC)
- Albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Corante Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich)
- Água destilada

4.3. APARATO EXPERIMENTAL

Os ensaios em campo magnético realizados com recirculação foram conduzidos no sistema composto por um tanque de alimentação com volume de até 300 mL, uma bomba de deslocamento positivo (Micropump), um módulo de aço inoxidável com dimensões de 120x90x10 mm, no qual foram posicionados os ímãs permanentes, um manômetro (Fiedler), uma válvula tipo agulha (Swagelok, Nupro Company, SS4BK) e um rotâmetro (Baster Controles) para medição da vazão de alimentação de 0,03 a 0,3 L/min. O diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para ensaios com recirculação está apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para ensaios com recirculação.

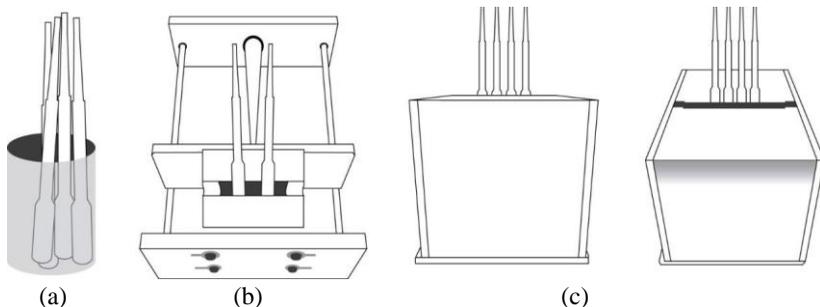


Fonte: Adaptado de Zin (2014).

Os ensaios em campo magnético no módulo estático foram realizados utilizando ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$). Os experimentos foram conduzidos sob duas condições diferentes, a primeira utilizando dois ímãs de dimensões de 50 x 50 x 25 mm que geraram campo magnético de intensidade 0,7 T e a segunda utilizando ímãs no formato de arranjo de Halbach (HALBACH, 1980), gerando uma densidade de fluxo magnético de 1,34 T (Figura 6). Esse último arranjo foi utilizado apenas a temperatura ambiente. Para medição

da intensidade de fluxo magnético, foi utilizado transdutor de campo magnético (modelo TMAG-1T, Globalmag Ltda, Brasil).

Figura 6 – Amostra controle (a), ensaio utilizando ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$) com densidade de fluxo de 0,71 T (b), ensaio utilizando arranjo de Halbach com densidade de fluxo de 1,34 T (c).



Foi utilizado um sistema de controle de temperatura para as amostras submetidas a temperaturas acima da temperatura ambiente. Nesse sistema, um tanque, contendo os ímãs permanentes que geram campo magnético de intensidade 0,7 T, foi acoplado a um banho termostatizado (Nova Ética) (Figura 7).

Figura 7 – Sistema para ensaios com variação de temperatura. (a) Tanque contendo módulo de ímãs permanentes (0,7 T) (b) Banho termostatizado.



As soluções de lipase foram submetidas ao campo acondicionadas em pipetas de *Pasteur*, devidamente posicionadas no centro do campo. As amostras não submetidas à indução magnética foram denominadas de amostras controle.

4.4. MÉTODOS

4.4.1. Procedimento experimental

4.4.1.1. Lipase NS-40116

Para verificar o efeito do campo magnético na lipase NS-40116, aproximadamente 1,5 mL da formulação líquida foram colocados em pipetas *Pasteur* sob indução nos campos de 0,7 T e 1,4 T, de forma estática e por recirculação. A atividade da enzima foi avaliada por meio de dois métodos, por quantificação do p-nitrofenol gerado na hidrólise do p-nitrofenilpalmitato (p-nPP) e por meio do aumento da acidez pela hidrólise do óleo de soja.

4.4.1.2. Lipase B de *Candida antarctica* (CalB)

O efeito do campo magnético na atividade da enzima CalB também foi verificado. Foram feitos ensaios no modo estático e recirculação com os campos de intensidades 0,7 T e 1,4 T. A atividade foi avaliada pelo aumento da acidez por meio de hidrólise do óleo de soja. A atividade da CalB também foi determinada após indução nos campos 0,7 T e 1,4 T em modo estático por meio do método de hidrólise do p-NPP.

Devido a variações nos valores de atividade da lipase CalB com experimentos nas mesmas condições, decidiu-se por adaptar a metodologia descrita por Chiou e Wu (2004). E a partir dessa mudança foram realizados ensaios diluindo-se a formulação enzimática antes da indução no campo, em tampões PBS (fosfato salino) de pHs 6, 7 e 8, e submetidos a temperaturas de 25, 45 e 65 °C. O tempo de exposição ao campo também foi avaliado nesses pHs (2, 3 e 4 horas).

Foram então feitas análises de estabilidade, Potencial Zeta, espectroscopia de fluorescência e Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR) para a melhor condição experimental.

4.4.2. Determinação da atividade enzimática das lipases

4.4.2.1. Teor de ácidos graxos livres (AGL)

A atividade de hidrólise do óleo de soja pela ação da lipase foi determinada pelo teor de acidez do óleo de soja. A reação foi iniciada com a adição de 0,5 g da enzima a 100 g de óleo de soja e 4 g de água, sendo mantidos a temperatura de 40-45 °C utilizando reator encamisado, e agitação, por 120 minutos.

Alíquotas de 1,5 g foram retiradas nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos e adicionadas em 40 mL de etanol P.A. A quantidade de ácido graxo produzida pela hidrólise foi medida por meio de titulação com NaOH 0,1 mol.L⁻¹ na presença de fenolftaleína 1% (w/v).

O teor de AGL no óleo foi então calculada de acordo com a Equação 1:

$$AGL = \frac{V_{NaOH} \cdot MM \cdot M_{NaOH}}{m} * 100 \quad (1)$$

Sendo,

AGL = Acidez (m/m, %);

V_{NaOH} = Volume de base gasto na titulação (L);

PM = Peso molecular do substrato – ácido oleico (PMAO = 282,0 g/mol);

M_{NaOH} = Concentração molar do NaOH (0,1 mol.L⁻¹);

m = massa da amostra utilizada na reação (g).

4.4.2.2. Hidrólise do p-nPP

A metodologia de determinação da atividade da lipase por hidrólise de p-nPP (p-nitrofenilfosfato) utilizada nesse estudo foi adaptada de Chiou e Wu (2004). A metodologia foi adaptada para cada enzima levando-se em conta a velocidade de reação e parâmetros particulares observados durante a realização dos experimentos.

A atividade das lipases foi determinada utilizando 0,5 g de p-nPP (p-nitrofenilfosfato) dissolvido em 100 mL de etanol como substrato. O

aumento da absorvância a 400 nm causado pela liberação de p-nitrofenol na hidrólise do p-nPP foi medido espectrofotometricamente.

0,1 g da lipase livre foram adicionados a uma mistura contendo 1 mL da solução p-NPP 0,5 % (w/v) e 1 mL de PBS (tampão fosfato salino) 0,05 mol.L⁻¹ (pH 7,0), e incubados por 5 min a 30 °C.

A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (pH 13-14) para a enzima NS-40116 ou de 2 mL de Na₂CO₃ 1 mol.L⁻¹ (pH 12) para a CalB, seguido de centrifugação (Eppendorf, 5810 R) por 10 min (10.000 rpm). Uma alíquota de 0,1 mL foi diluída em 10 mL de água destilada e avaliada em espectrofotômetro UV-VIS (HACH, DR 5000) a 400 nm.

O coeficiente de extensão molar (ϵ_{400}) de 15000 L.mol⁻¹.m⁻¹ foi utilizado para o p-nitrofenol. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto, sob condições experimentais.

A atividade específica residual (AER, %) foi calculada como sendo a proporção de atividade específica da enzima tratada magneticamente para a atividade específica nas condições controle (sem tratamento magnético).

Devido à grande variação nos valores específicos das atividades da CalB, a determinação da atividade para essa enzima nos ensaios posteriores foi feita medindo-se a alteração de absorvância no tempo ($\Delta A/t$), a 410 nm em espectrofotômetro UV-VIS (QUIMIS modelo Q898U2M5), após a adição de 200 μ L de substrato p-nPP 0,5 % (w/v) em 20 μ L de solução enzimática diluída em 20 mL de PBS (tampão fosfato) 0,05 mol.L⁻¹ (pH 7,0). A atividade foi calculada a partir de uma curva de calibração com p-nitrofenol e PBS (tampão fosfato) 0,05 mol.L⁻¹ (pH 7,0), de acordo com a Equação 2, sendo f o fator de diluição.

$$\textit{Atividade} \left(\frac{U}{mL} \right) = \alpha_{\textit{Curva}} \cdot \alpha_{(\Delta A/t)} \cdot f \quad (2)$$

4.4.3. Determinação do teor de proteína

O teor de proteína das formulações líquidas de lipase foi medido pelo método de Bradford (1976) modificado, usando como corante o Comassie Brilliant Blue. Nesse método, 2,5 mL de reagente de Bradford são adicionados a uma alíquota de 50 μ L da amostra a ser analisada. A

amostra é agitada e submetida à leitura em espectrofotômetro UV/VIS (QUIMIS modelo Q898U2M5) a 595 nm, após 5 minutos em câmara escura.

A curva de calibração foi elaborada a partir de soluções de diversas concentrações (0-50 mg/mL) de soroalbumina bovina (BSA).

4.4.4. Avaliação da estabilidade da lipase

Também foi avaliado o tempo de duração do efeito do campo magnético na lipase CalB por meio de ensaios de estabilidade na melhor condição encontrada nos ensaios realizados. Foram avaliados por meio de armazenamento à temperatura de refrigeração (4°C).

4.4.5. Determinação do Potencial Zeta

Foi feita a determinação do potencial zeta das amostras controle e após indução por anemometria laser Doppler utilizando-se o equipamento Zeta Sizer Nano ZS3600 (Malvern Instruments Ltd., UK), disponível no laboratório (CERMAT/CTC/UFSC).

4.4.6. Espectroscopia de Fluorescência

Para análise de fluorescência, foram preparadas amostras na melhor condição experimental obtida, e controle (sem tratamento do campo magnético). As amostras foram mantidas a 4°C até o momento da análise com o intuito de manter ao máximo o efeito do campo magnético. O espectro de excitação foi testado em vários comprimentos de onda (270, 350 e 447 nm) e foi feita uma varredura de comprimento de onda para obtenção do espectro de fluorescência (mín. 200, máx. 1100 nm) (fendas de excitação e emissão de 20 nm e voltagem da fotomultiplicadora 800 V).

4.4.7. Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)

Essa análise teve como objetivo verificar as oscilações na estrutura secundária da proteína (α -hélice e folha- β) pela aplicação do

campo magnético. A análise foi feita no espectrofotômetro (AGILENT TECHNOLOGIES modelo Cary 600) da Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. As bandas de absorção observadas foram as localizadas na região de 1500 a 1700 cm^{-1} , sendo que as bandas 1638 e 1694 cm^{-1} se referem às estruturas folha- β (paralelas e antiparalelas, respectivamente), e a banda de 1655 cm^{-1} se refere à estrutura α -hélice (KHURANA e FINK, 2000; BARTH, 2007; MOVASAGHI et al., 2008).

4.4.8. Análise estatística

Os efeitos do campo nas atividades específicas das lipases foram avaliados utilizando *software* STATISTICA versão 7.0, com análise de variância ao nível de 5% de significância e teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na realização deste trabalho. Serão apresentados e discutidos os resultados relacionados ao efeito do campo magnético nas atividades de hidrólise do óleo de soja e hidrólise do para-nitrofenilpalmitato (p-nPP) da lipase NS-40116 e lipase B de *Candida antarctica*.

5.1. LIPASE NS-40116

5.1.1. Efeito do campo magnético sobre a atividade de hidrólise do óleo de soja

O teor de ácidos graxos livres produzidos pela hidrólise do óleo de soja por via enzimática foi medido para amostras submetidas à ação do campo em intensidades de 0,7 T e 1,34 T por 2 horas, a 25 °C, e comparados com amostra controle (não tratada). A hidrólise do óleo de soja pela enzima foi realizada de acordo com o item 4.3.2.1 e o teor de ácidos graxos livres (m/m, %) da amostra foi medido a cada 15 minutos até o tempo final de reação de 2 horas. Na Tabela 2 estão apresentados os valores de conversão de ácidos graxos para os ensaios estático e com recirculação após duas horas de reação.

Tabela 2 – Teor de ácidos graxos livres produzidos por hidrólise do óleo de soja pela lipase NS-40116 (m/m, %).

Tratamento	Estático	Recirculação
Controle	21,39 ± 0,09 ^a	18,99 ± 1,88 ^a
0,7 T	21,35 ± 1,47 ^a	18,62 ± 1,10 ^a
1,34 T	20,91 ± 0,82 ^a	20,55 ± 0,32 ^a

*médias seguidas pela mesma letra em uma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05).

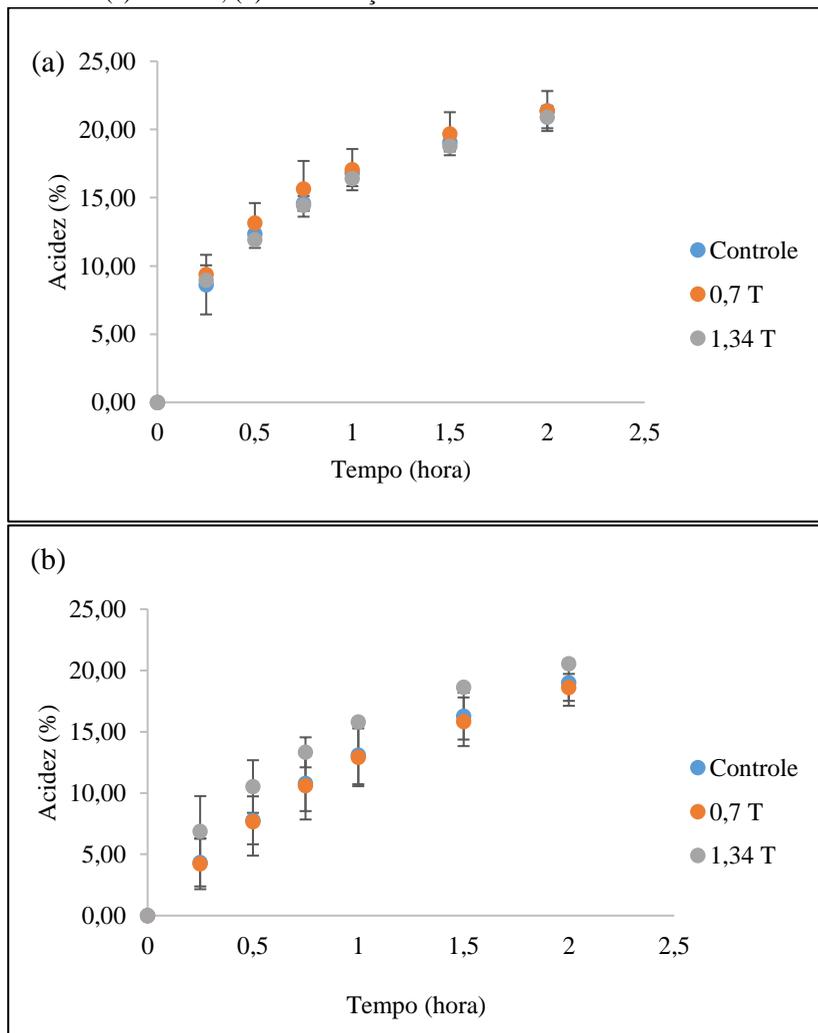
A conversão em ácidos graxos ficou em torno de 20 % (0,5 % de enzima, 4 % água, 45 °C, 2 horas), não havendo diferença significativa para nenhuma das condições avaliadas (p < 0,05). A produção de ácidos graxos livres decorrente da hidrólise enzimática está diretamente associada à atividade hidrolítica da enzima, sendo assim, quanto maior a

taxa de conversão de ácidos graxos, maior a atividade de hidrólise do óleo de soja.

Rodrigues e Ayub (2011) encontraram taxa de conversão próxima ao encontrado nesse estudo, em torno de 25 % para hidrólise enzimática de óleo de soja, utilizando uma combinação de lipases de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*, em um tempo de 2 horas, a 30 °C, 200 rpm, 25 % de enzima e razão molar 3:1 (água/óleo). Nesse mesmo estudo foi encontrada taxa de conversão máxima de 95 %, após tempo de reação de 10 horas. Babicz e colaboradores (2010) também avaliaram a produção de ácidos graxos pela hidrólise enzimática de óleo de soja utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM). O teor de enzima foi de 1 % no meio reacional, a 55 °C e 700 rpm por 1,5 hora. Nessas condições eles obtiveram 21 % de produção de diacilgliceróis. Valores similares também foram encontrados por Freitas e colaboradores (2007) para hidrólise de óleo de soja catalisada por lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase). Eles encontraram taxa de conversão de 25 % em 2 horas de reação de em meio com óleo e água (1:4), 2,5 % goma arábica e 1 % de enzima, a 40 °C, 200 rpm. Após 24 horas, a taxa de conversão foi para 53 %.

Maiores valores de conversão podem ser encontrados aumentando o tempo de reação. Como é possível observar na Figura 8, a taxa de conversão de ácidos graxos aumenta em função do tempo.

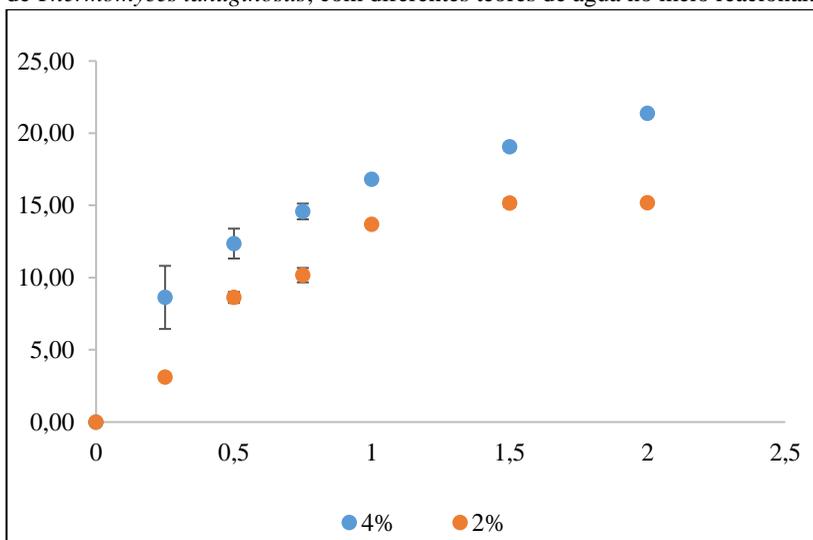
Figura 8 – Cinética de reação para a hidrólise de óleo de soja pela ação da lipase de *Thermomyces lanuginosus* submetida ao campo magnético (0,7 T e 1,34 T) e controle. (a) Estático; (b) Recirculação.



Em contrapartida, Tan, Nie e Wang (2004) encontraram altas taxas de conversão (96 %) ao utilizar maior teor de água (15 %, m/m). A relação água / óleo é um fator importante que influencia a taxa de reação, que está relacionada com a área interfacial. Baixas taxas de hidrólise

lipídica estão geralmente relacionadas à limitação da área interfacial. Dessa forma, quanto maior for o teor de água no meio reacional, maior será a área interfacial, e, portanto, maior será a ativação enzimática. Para efeito de comparação, foi realizada uma cinética de hidrólise enzimática do óleo de soja, na condição do controle estático (0,5 % de enzima, 45 °C, 2 horas) e adicionando 2 % e 4% de água ao meio (Figura 9).

Figura 9 – Cinética de reação para a hidrólise de óleo de soja pela ação da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, com diferentes teores de água no meio reacional.



É possível observar que o aumento do teor de água no meio reacional, aumentou o teor de ácidos graxos produzidos, no tempo observado.

Não se observou diferença significativa para os tratamentos com campo magnético em comparação com o controle nos ensaios de atividade de hidrólise do óleo de soja por ação da enzima NS-40116.

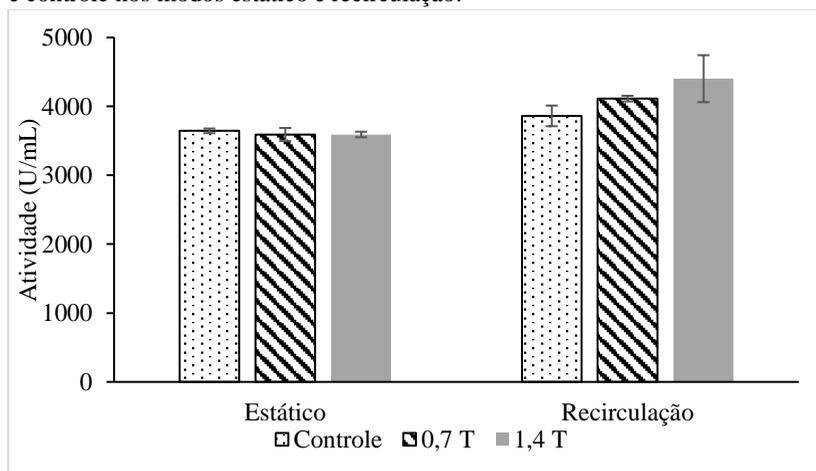
5.1.2. Efeito sobre a atividade de hidrólise do p-nPP

O efeito do campo magnético na atividade de hidrólise do p-nPP da NS-40116 foi avaliado. No modo estático, alíquotas de aproximadamente 1,5 mL foram submetidas aos campos de intensidade 0,7 T e 1,34 T à temperatura ambiente, por 2 horas. Paralelamente a essas

amostras, havia uma amostra sem tratamento magnético (controle). Para os ensaios com recirculação, um volume de enzima maior foi necessário, em torno de 400 mL para preencher o ‘volume morto’ do sistema descrito no item 4.3.

Na Figura 10 são mostradas as atividades da lipase com e sem tratamento magnético. As atividades específicas encontradas para as amostras submetidas ao campo magnético não diferem das atividades específicas da amostra controle em nenhum dos ensaios (estático e recirculação), a nível de 5 % de significância, com exceção do ensaio com recirculação e indução de 1,34 T, que se mostrou significativamente diferente dos ensaios no modo estático, com incremento na atividade em torno de 22 %.

Figura 10 – Atividade da lipase NS-40116 após exposição ao campo magnético e controle nos modos estático e recirculação.



A atividade encontrada para a lipase NS-40116 (lipase de micro-organismo *Thermomyces lanuginosus* modificado) para o pH nativo da formulação líquida (pH 4,5) foi de 3644,66 U/mL (136045,60 U/g). Segundo especificações da Sigma-Aldrich® para lipase de *Thermomyces lanuginosus*, a atividade específica da solução comercial é ≥ 100000 U/g, o que corrobora com valores encontrados neste estudo. Cavalcanti-Oliveira e colaboradores (2010), em um estudo sobre a aplicação de óleo

de soja, hidrolisado via lipase de *Thermomyces lanuginosus*, na produção de biodiesel por hidroesterificação, encontraram atividade de 1064 ± 31 U/mL por meio de hidrólise do óleo de soja. Uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzimas que produziram 1 μ mol de AGL por min nas condições de ensaio, valor abaixo do valor obtido nesse estudo para hidrólise do p-NPP.

5.2. LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA* B

5.2.1. Efeito do campo sobre a atividade de hidrólise do óleo de soja

A lipase B de *Candida antarctica* (CalB) não apresentou atividade de hidrólise de soja, com taxa de conversão de triglicérides em torno de 0,6 % (m/m). Comparada às outras lipases, a CalB não é tão eficiente na hidrólise de triglicérides, isso se deve à sua estrutura, por não apresentar uma ativação interfacial, tendo um sítio ativo com um acesso estreito (IDRIS; BOKHARI, 2012).

5.2.2. Efeito do campo sobre a atividade de hidrólise do p-nPP

Os ensaios para avaliar o efeito do campo magnético sobre a atividade de hidrólise do p-nPP da CalB seguiram o item 4.4.1.2 e a atividade foi determinada de acordo com o item 4.4.2.2.

Inicialmente foram realizados testes submetendo aproximadamente 1,5 mL da formulação líquida da enzima (não diluída) em pipetas *Pasteur* nos módulos de campo magnético de densidade de fluxo 0,7 T e 1,34 T por duas horas. Os ensaios controle foram amostras não submetidas ao campo. A atividade foi determinada em seguida ao tempo de exposição ao campo. As análises foram feitas em duplicata. A Tabela 3 mostra os valores de atividade específica obtidos para essas condições.

Tabela 3 – Atividade específica da lipase CalB após tratamento magnético e controle (lipase não diluída).

Tratamento	Atividade específica (U/mL)	Incremento (%)
Controle	93,36 ± 14,47 ^a	
0,7 T	153,72 ± 8,68 ^b	65
1,4 T	103,08 ± 2,17 ^a	10

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05).

O valor de atividade encontrado para a enzima no pH nativo da lipase líquida (pH 4,5) foi de 93,35 U/mL, valor um pouco maior que o encontrado por Fernandes e colaboradores (2014) para a mesma enzima livre, de 75 U/mL. Souza (2013) encontrou um valor de atividade de 93 U/mL para a lipase CalB incubada em tampão fosfato de sódio 0,025 mol.L⁻¹, pH 7,0, a 60 °C.

O campo magnético de intensidade 0,7 T mostrou influência positiva na atividade enzimática (diferença significativa a nível de 5 % de significância), apresentando incremento de 65% em relação ao controle (sem tratamento). Para os ensaios posteriores decidiu-se então adotar a intensidade fixa de 0,7 T, modificando outras condições do meio.

Para observar o efeito do pH da solução enzimática, decidiu-se então por diluir a lipase líquida em soluções tampão fosfato de pHs 6,0, 7,0 e 8,0. Os pHs utilizados foram baseados em dados encontrados na literatura de pH ótimo da lipase B de *Candida antarctica* (BARBOSA et al., 2012; RABBANI et al., 2015).

5.2.3. Efeito do campo sobre a atividade de hidrólise do p-nPP (metodologia modificada)

5.2.3.1. Efeito do campo magnético a diferentes pHs

O método de medição de atividade enzimática descrito por Chiou e Wu (2004) foi modificado para este estudo, medindo-se a atividade pelo monitoramento da velocidade de reação numa curva absorbância vs. tempo.

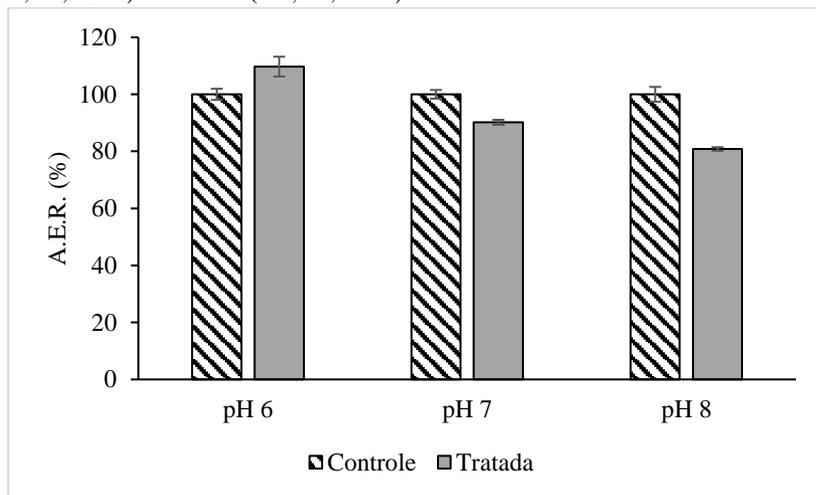
A lipase, diluída em diferentes soluções tampão fosfato (pHs 6,0, 7,0 e 8,0, diluição 1:5), foi submetida ao campo magnético de 0,7 T por 2

horas, na temperatura de 25 °C, e suas atividades específicas comparadas ao controle (sem tratamento).

Na Figura 11 estão apresentados os valores de atividade específica residual (AER) obtidos para essas condições, sendo o valor de atividade específica encontrado para a enzima nas condições controle (sem tratamento magnético) considerado 100 %. A lipase no pH 6,0 foi a única que apresentou incremento de atividade no campo (14 %), contudo essa diferença não foi significativa ($p < 0,05$). O pH 7 foi o que teve maior valor de atividade ($165,76 \pm 0,65$ U/mL para a amostra controle e $149,51 \pm 0,22$ U/mL para a amostra tratada) dentre os pHs testados, sendo este selecionado para as próximas etapas.

O pH 7 também foi escolhido por estar na faixa ótima de trabalho da lipase de *Candida antarctica* B (Lipozyme® CALB), como especificado pela Novozymes (pH 5-9 e temperatura 30-60 °C). Barbosa e colaboradores (2012), ao avaliar propriedades de lipase CalB imobilizada com modificações químicas, obtiveram pH ótimo de 7-7,5 para a CalB livre e imobilizada sem modificações, sendo a imobilizada quase inativada em pH 10, confirmando esses valores. Outras lipases também são conhecidas por ter pH ótimo nessa faixa. Como por exemplo, Gomes e colaboradores (2006) encontraram atividade máxima em pH 7 para lipase livre de *Candida rugosa*.

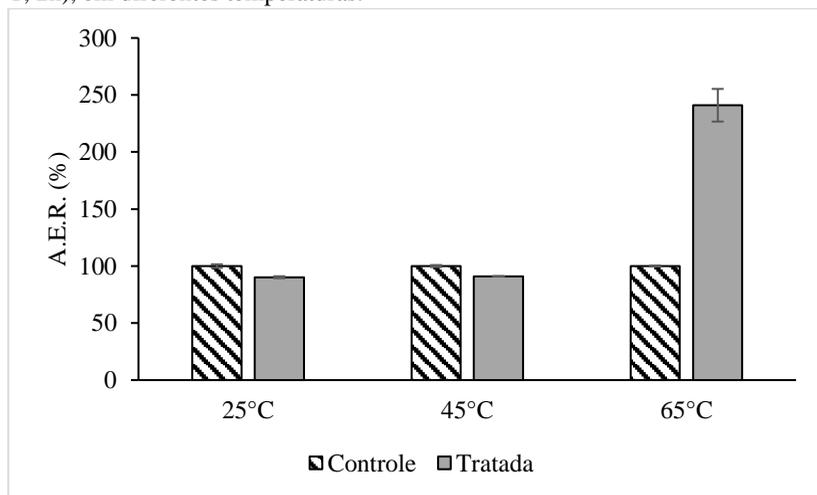
Figura 11 – Atividade específica residual da lipase CalB diluída em diferentes tampões fosfato (pHs 6,0, 7,0 e 8,0, diluição 1:5) após tratamento magnético (0,7 T, 2h, 25°C) e controle (0 T, 2h, 25°C).



5.2.3.2. Efeito do campo magnético a diferentes temperaturas

Para avaliar o efeito da temperatura e indução magnética na atividade da lipase de *Candida antarctica* B, foram realizados ensaios de indução magnética (0,7 T, 2 horas), em diferentes temperaturas (25, 45 e 65 °C) com enzima diluída em tampão pH 7. A Figura 12 mostra a influência do campo magnético nessas condições testadas. A atividade apresentada está na forma de atividade específica residual (AER), sendo o valor de atividade encontrado para a condição controle considerado 100 %.

Figura 12 – Atividade específica residual (AER) da lipase CalB diluída em tampão fosfato pH 7 (1:5) submetida a campo magnético (0,7 T, 2h) e controle (0 T, 2h), em diferentes temperaturas.



Nos ensaios com temperaturas de 25 e 45 °C, a atividade específica residual das amostras submetidas ao campo magnético foi menor que a atividade das amostras controle. Já na temperatura de 65 °C, pode-se observar um efeito inverso, com atividade específica residual das amostras tratadas no campo magnético significativamente maior que o valor encontrado para o controle ($p < 0,05$). O incremento de atividade nesse ensaio foi de 134 % (em relação ao controle, nas mesmas condições).

O incremento da atividade pela ação do campo também foi encontrado por Ran e colaboradores (2009). Eles obtiveram aumento de 37,01 % na atividade da celulase ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) submetida a campos estáticos de intensidade 0,15, 0,30 e 0,45 T (1-12 horas), a uma temperatura constante de 4 °C. Os valores de atividade residual encontrados nesse trabalho através da aplicação do campo são maiores que os encontrados por Liu, Chen e Wang (2013), ao estudar o efeito do CO_2 sub e supercrítico na atividade das lipases de *Candida antarctica* B e lipase PS, 105 % e 116 %, respectivamente. As condições ótimas foram de 6 MPa, 35 °C e 30 min para a CalB e 10 MPa, 40 °C e 30 min para a lipase PS.

Na temperatura de 65 °C, o valor da atividade no controle foi bem menor do que na temperatura de 25 °C, o que pode ser justificado pela menor estabilidade da lipase CalB livre nessa temperatura. Segundo Chodorge e colaboradores (2005), as enzimas livres, em soluções aquosas, têm baixa estabilidade às temperaturas acima de 40 °C, sendo mais suscetíveis à desnaturação. Resultados encontrados por Cui e colaboradores (2013) para lipase (Lip 2) imobilizada de *Yarrowia lipolytica* corroboram com essa afirmação. Nesse estudo eles avaliaram a estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada. A enzima livre perdeu quase toda sua atividade inicial depois de 30 minutos de incubação a 50 °C, e para ambas as enzimas, a temperatura de maior atividade hidrolítica foi de 40 °C.

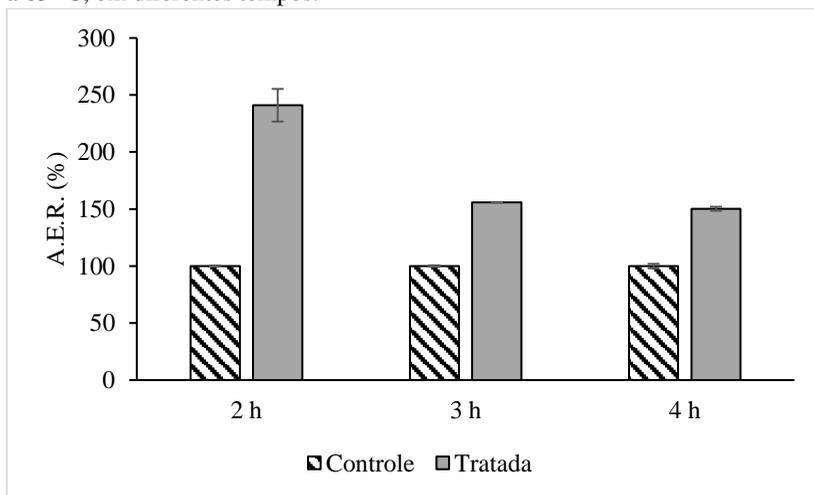
Já a amostra tratada com o campo magnético, na mesma condição de 65 °C, apresentou um valor de atividade muito maior que o controle, sugerindo uma 'blindagem' do campo contra a ação da alta temperatura. As amostras controle parecem mais suscetíveis à ação da temperatura que aquelas tratadas com campo magnético. Análises de conformação e potencial zeta foram realizadas para tentar elucidar o efeito do campo na lipase tratada com 0,7 T, a 65 °C.

5.2.3.3. Efeito do tempo de exposição ao campo magnético

Até então todos os ensaios foram realizados submetendo a amostra à ação do campo pelo tempo de 2 horas. Para avaliar a influência de diferentes tempos de exposição na atividade enzimática, foram realizados ensaios com lipase CalB diluída em tampão fosfato pH 7 (1:5), na temperatura de 65 °C (maior incremento) e campo magnético estático de intensidade 0,7 T.

Na Figura 13 encontram-se os valores de atividade específica residual para as amostras submetidas à indução magnética (0,7 T) e controle (0 T). Os tempos de indução avaliados foram de 2, 3 e 4 horas. Observa-se que o tempo de 2 horas foi o que apresentou maior diferença entre as atividades específicas residuais (AER) da amostra controle e tratada, sendo a amostra induzida magneticamente aquela com maior atividade. Os tempos de 3 e 4 horas de indução magnética também apresentaram incremento da atividade enzimática da amostra tratada em relação à amostra controle, de 51 e 46 %, respectivamente.

Figura 13 – Atividade específica residual (AER) da lipase CalB diluída em tampão fosfato pH 7 (1:5) submetida a campo magnético (0,7 T) e controle (0 T), a 65 °C, em diferentes tempos.



Jia e colaboradores (2009) também avaliaram a influência do tempo de exposição ao campo magnético na atividade enzimática. Os tempos avaliados foram de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h e a enzima foi a α -amilase ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6, 25 °C), submetida a intensidades de 0,15, 0,30 e 0,45 T e comparadas ao controle (sem tratamento magnético). Os melhores resultados obtidos para esses autores também foram para o tempo de 2 horas, com incremento de 27, 34,1 e 37,8 % para as intensidades de 0,15, 0,30 e 0,45 T, respectivamente, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo.

5.2.4. Efeito do campo no Potencial Zeta das soluções de lipase

Dentre as condições testadas, a combinação que resultou no maior incremento de atividade foi a enzima diluída em tampão fosfato pH 7 (1:5), submetida ao campo magnético estático de intensidade 0,7 T, a 65 °C, por 2 horas. Com o intuito de avaliar possíveis mudanças na magnitude da repulsão ou atração eletrostática das cargas da solução enzimática, o potencial zeta foi avaliado para a condição de maior incremento de atividade.

Tabela 4 – Potencial Zeta para a solução de lipase (tampão fosfato pH 7 1:5) tratada (0,7 T, 65 °C, 2 horas) e controle (0 T, 65 °C/25 °C, 2 horas).

Tratamento	Potencial Zeta
Controle (25 °C)	-2,25 ± 0,25 ^a
Controle (65 °C)	-6,57 ± 0,50 ^b
0,7 T (65 °C)	-6,36 ± 0,19 ^b

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05).

O potencial zeta de uma proteína será positivo se a molécula tiver mais aminoácidos carregados positivamente que negativamente e será negativo se tiver mais aminoácidos carregados negativamente que positivamente (BOUZID et al., 2008). O potencial zeta da formulação de lipase líquida CalB não diluída em tampão fosfato foi medido, sendo um valor positivo e igual a $0,16 \pm 0,02$. Isso indica maior quantidade de resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Quando o pH da enzima está acima do ponto isoelétrico, o meio fica com cargas negativas, assim como o potencial zeta. O pH da formulação enzimática, sem diluição em tampão é de pH 4,5, valor abaixo do ponto isoelétrico da lipase CalB (pI 6,0), o que justifica o valor positivo (FERNANDEZ et al., 2014). A diluição em tampão fosfato pH 7 resultou em mudança do potencial zeta para valores negativos. Schultz (2008) também verificou valores positivos de potencial zeta para pHs abaixo do ponto isoelétrico da lipase de *Candida antarctica* tipo A (CalA) e valores negativos em pHs acima desse ponto. Mesmo comportamento foi obtido por Peng e colaboradores (2004) para albumina de soro bovina.

É possível observar que nos ensaios para a CalB, o campo magnético (0,7 T) não alterou o potencial zeta da solução, não tendo nenhuma diferença significativa quando comparado com o controle (p<0,05). Já se comparados com controle à temperatura ambiente (25 °C), percebe-se que o aumento da temperatura influenciou significativamente o potencial zeta da lipase diluída em tampão, tornando esse valor mais negativo. Apesar de não ter diferença significativa entre o potencial zeta da amostra controle e tratada a 65 °C, o campo parece atuar melhor em potenciais mais negativos.

Na literatura, vários estudos mostram o aumento da magnitude do potencial zeta com a temperatura (VENDITTI; XUAN; LI, 2006; PENGRA et al., 1999; DUNSTAN, 1994; REVIL et al., 1999), mas

poucos são os que tentam esclarecer a relação entre esses dois parâmetros. Reppert e Morgan (2003) revisaram estudos que avaliaram a influência da temperatura nos valores de potencial zeta e, por meio de modelagem matemática, concluíram que a dependência da temperatura com o potencial zeta parece ser controlada pelas propriedades de absorção da superfície avaliada. A densidade da dupla camada elétrica, o pH e a constante de dissociação intrínseca são parâmetros que vão controlar a dependência do potencial zeta com a temperatura. Dessa forma, é necessário um estudo mais aprofundado da relação do aumento da temperatura com o aumento nos valores de potencial zeta, encontrados nesse estudo.

Como foi discutido no item 5.3.3.2, o campo pode ter atuado de forma a proteger a enzima da ação da alta temperatura, influenciando as cargas superficiais, que estão maiores nessa condição de tratamento.

Albuquerque e colaboradores (2016) revisaram estudos que avaliam a influência do campo magnético em sistemas biológicos, e concluíram que proteínas (principalmente aquelas com estrutura secundária α -hélice) expostas a um dado campo magnético recebem torques, resultando em um certo movimento. Com o aumento da temperatura, ocorre aumento da energia cinética do sistema, podendo ocorrer modificações na conformação molécula.

Apesar da ausência de atividade interfacial da CalB ser bem conhecida na literatura, há estudos que põem em dúvida essa teoria. Isso porque, a CalB possui, ao redor do sítio ativo duas estruturas α -hélices que têm se mostrado muito flexíveis, podendo atuar como uma “tampa” nessa molécula. Os movimentos dessas estruturas em meio aquoso não são grandes o suficiente para bloquear o acesso ao sítio ativo, contudo elas têm mostrado influência significativa nas propriedades catalíticas da enzima (enantioseletividade) (STAUCH; FISHER; CIANCI, 2015).

O aumento da temperatura pode ocasionado uma abertura dessas estruturas α -hélice ao redor do sítio ativo, aumentando a superfície catalítica. E o campo pode ter atuado estabilizando a molécula, o que pode ter ocasionado o incremento de atividade. Maiores valores de potencial zeta indicam maior repulsão eletrostática entre as moléculas, o que evita a agregação e aumenta a estabilidade da solução.

5.2.5. Efeito do campo magnético sobre a estrutura da lipase de *Candida antarctica* B (CalB)

5.2.5.1. Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)

A análise de espectroscopia por infravermelho foi realizada para as amostras do ensaio que apresentou maior incremento de atividade enzimática (lipase líquida de *Candida antarctica* B diluídas em tampão pH 7 (1:5), submetida ao campo de intensidade 0,7 T, a 65 °C) e controle.

Na Figura 14 são apresentados os espectros de infravermelho para amostras de lipase líquida de *Candida antarctica* B diluídas em tampão pH 7 (1:5), submetida ao campo de intensidade 0,7 T, a 65 °C e controle na mesma temperatura e temperatura ambiente (25 °C) nos números de onda de 650 a 4000 cm^{-1} .

Figura 14 – Espectro de infravermelho por reflexão atenuada (FTIR – ATR) para amostras de lipase líquida CalB diluídas em tampão pH 7 (1:5), submetida ao campo de intensidade 0,7 T, a 65 °C e controle na mesma temperatura e temperatura ambiente.

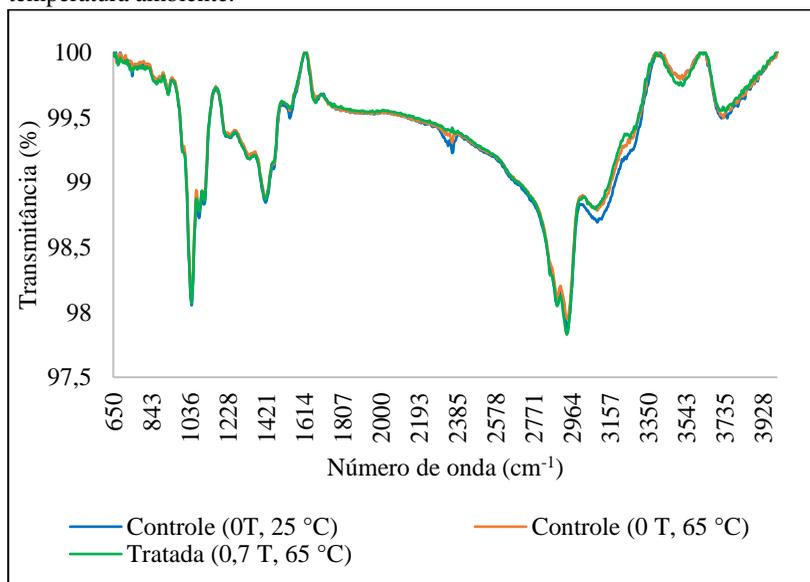
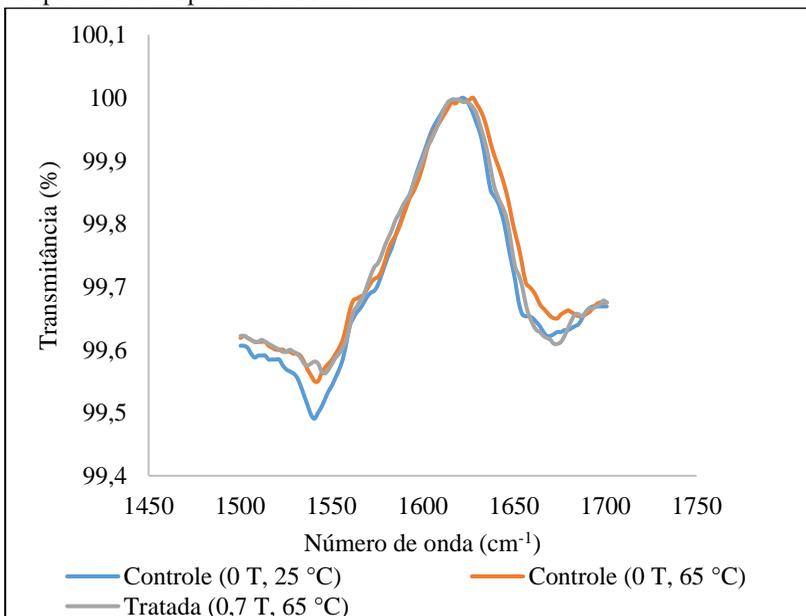


Figura 15 – Espectro de infravermelho por reflexão atenuada (FTIR – ATR) nos números de onda relativos à estrutura secundária da proteína (1500 – 1700 cm^{-1}) para amostras de lipase líquida de *Candida antarctica* B diluídas em tampão pH 7 (1:5), submetida ao campo de intensidade 0,7 T, a 65 °C e controle na mesma temperatura e temperatura ambiente.



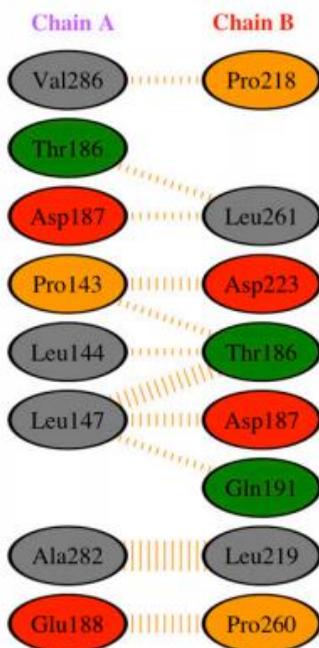
Os três espectros FTIR obtidos não apresentaram diferença nos picos de vibração correspondentes às estruturas de α -hélice (1655 cm^{-1}) e folhas- β (1638 cm^{-1} – paralelas; 1694 cm^{-1} – antiparalelas) da proteína (Figura 16). Resultado diferente foi encontrado por Gulseren e colaboradores (2007), após submeterem solução de soro albumina bovina (BSA) na concentração de $3.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, à ação de ultrassom de intensidade 20 W.cm^{-2} . Eles perceberam um pequeno aumento da absorvância na faixa de 1660 cm^{-1} com o aumento do tempo de exposição, sugerindo alteração no teor de α -hélice da proteína.

5.2.5.2. Espectroscopia de Fluorescência

A análise de espectroscopia de fluorescência foi realizada para o ensaio a pH 7 e 65 °C com e sem exposição ao campo estático 0,7 T. A leitura foi feita subsequente ao tratamento magnético. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento da análise com o intuito de manter ao máximo o efeito do campo. Nessa análise, o equipamento mostra um espectro característico da emissão fluorescente de um composto fluórofo. Esses compostos são moléculas que emitem fluorescência, quando na presença de luz, em um espectro de emissão e excitação específico (ARAÚJO, 2010). Alguns aminoácidos e enzimas possuem essa característica, o que faz desta análise muito útil para identificação e caracterização de biomoléculas.

Os aminoácidos fluórofos são o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. A lipase de *Candida antarctica* B possui 317 resíduos de aminoácidos na sua estrutura, contendo vários triptofanos (Figura 16) (STAUCH; FISHER; CIANCI, 2015).

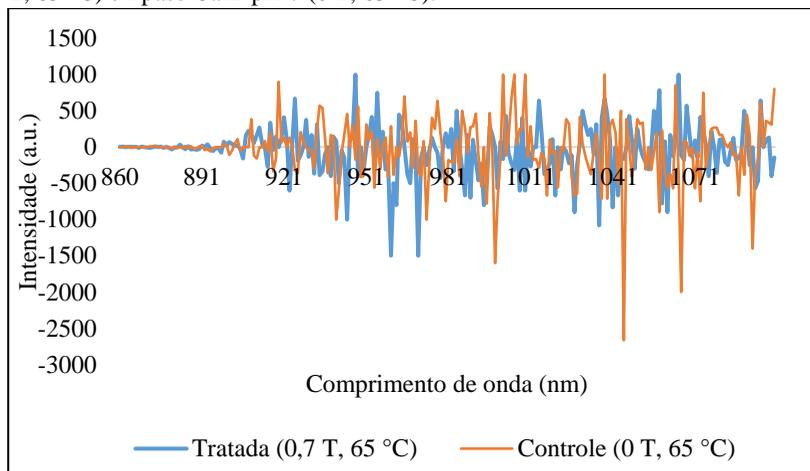
Figura 16 – Representação gráfica da CalB: Ligantes não conectados entre os resíduos, a largura da linha listrada é proporcional ao número de ligantes atômicos.



Fonte: Stauch, Fisher e Cianci (2015).

Foi então realizada a análise com o intuito de verificar a influência do campo na estrutura terciária da lipase CalB (resíduos de triptofanos). Foi inicialmente fixado o espectro de excitação de 270 nm e espectro de emissão variando de 280 a 500 nm para observar a emissão do triptofano. Contudo, não foi observada nenhuma curva de emissão nessa faixa testada. Com base nos parâmetros utilizados por Nalder e colaboradores (2016) para avaliar a atividade de lipases por espectroscopia de fluorescência, testou-se a espectro de excitação de 447 nm e emissão na faixa de 280 a 555 nm. Ainda assim não foi possível perceber nenhuma alteração no leitor do equipamento. Somente testando espectro de excitação de 350 nm e fazendo uma leitura numa ampla faixa (500 a 1100 nm), obteve-se dados de fluorescência (Figura 17).

Figura 17 – Espectros de emissão de fluorescência para a lipase CalB pH 7 (0,7 T, 65 °C) e lipase CalB pH 7 (0 T, 65 °C).



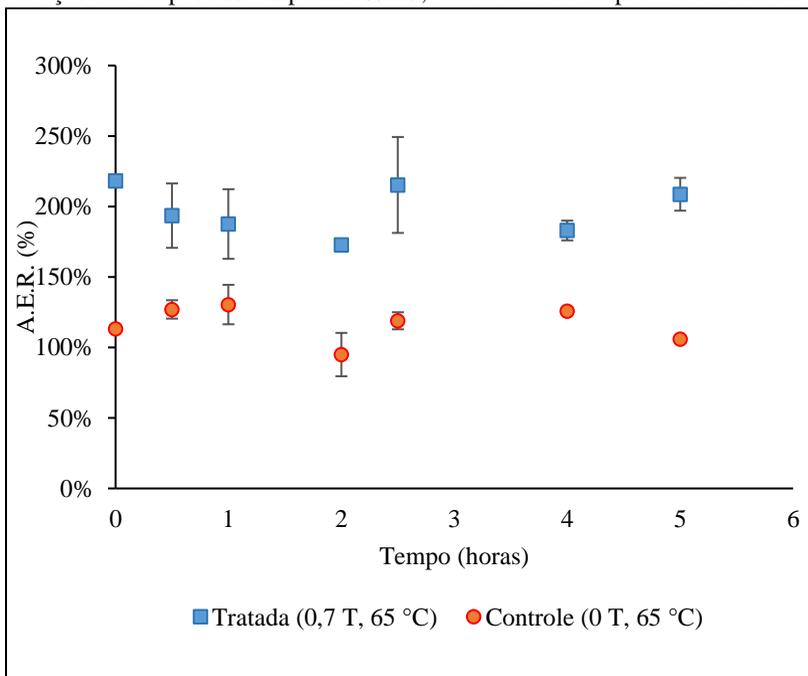
Os picos de fluorescência obtidos só aparecem após os comprimentos de onda de 800 nm. Algumas dessas faixas de fluorescência são correspondentes a solventes com propriedades fluorescentes. A presença de solvente na solução pode ocasionar em desvios espectrais dos componentes fluóforos. A polaridade do solvente e o meio gerado por ele pode induzir uma gama de interações entre ele e essas moléculas (GOES FILHO, 2011).

A lipase líquida utilizada nesse estudo é uma solução de proteína enzimática em água com vários aditivos, incluindo sais e estabilizadores. Por não ser uma solução pura, os aditivos presentes na formulação líquida podem estar interferindo na leitura do espectro de fluorescência do componente fluóforo desejado (triptofano), que poderá fornecer informações sobre a estrutura terciária da enzima. Desta forma, seria interessante realizar essa análise com a enzima purificada, para obter espectros mais padronizados, ou adicionar um composto fluorescente que funcione como biomarcador, ou seja, um componente que se ligue à molécula e pode emitir sinais mais ou menos intensos, dependendo da interação. Ele atua basicamente como um sequestrante, um meio de identificar e caracterizar a molécula sem purificar a formulação da enzima livre.

5.2.6. Efeito do campo sobre a estabilidade da lipase CalB

Na Figura 18 é apresentado um estudo da estabilidade da lipase de *Candida antarctica* B diluída em tampão fosfato pH 7 (1:5) antes e após tratamento magnético (0,7 T), durante armazenamento à temperatura de refrigeração (4 ± 2 °C).

Figura 18 – Estabilidade da lipase líquida CalB tratada com campo magnético de intensidade de 0,7 T e controle (sem tratamento magnético) nas condições de diluição em tampão fosfato pH 7 e 65 °C, armazenada a temperatura de 4 ± 2 °C.



A partir dos dados da Figura 19, é possível observar que a atividade da enzima se manteve relativamente estável num período de 5 horas de armazenamento, tanto na amostra tratada quanto no controle. O incremento de atividade do campo se manteve (95 %), mostrando uma “memória magnética” da molécula, para a temperatura de refrigeração num período de 5 horas de observação. O valor de incremento encontrado para esta condição, de 134 %, não foi reproduzido no estudo de estabilidade de armazenamento. Possivelmente devido ao longo período

de estocagem do lote utilizado nos experimentos anteriores. A enzima pode ter perdido sua atividade com o armazenamento.

Resultados similares de estabilidade das amostras submetidas ao campo magnético estão descritas na literatura. Ran e colaboradores (2009) avaliaram a estabilidade da celulase por 10 dias, a 4 °C, após tratamento magnético em campos de intensidades 0,15, 0,30 e 0,45 T, com tempo de exposição de 1-12 horas. A amostra controle perdeu cerca de 35 % da atividade inicial, enquanto que a amostra tratada não teve perda significativa. Liu e colaboradores (2010) também fizeram um estudo de estabilidade para avaliar a ação do campo magnético na atividade da enzima α -amilase imobilizada em quitosana, com o tempo. A enzima, diluída na concentração de 0,5 mol.L⁻¹ em tampão fosfato pH 7, foi armazenada a 4 °C, e sua atividade avaliada a cada 5 dias, por 30 dias. Nesse estudo foi observado que a amostra não exposta perdeu 50 % da atividade inicial, enquanto que a amostra submetida ao campo de intensidade 10⁴ T só perdeu 19,4 % da atividade.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A atividade do preparado enzimático lipolítico NS-40116 (Callera Trans L) não sofreu alterações com a exposição ao campo magnético para a atividade de hidrólise do óleo de soja.
- ✓ Houve incremento de atividade hidrolítica (p-nPP) para a lipase NS-40116 na condição de recirculação com indução 1,34 T (22 %).
- ✓ A exposição da lipase CALB a um campo magnético estático (0,7 T, pH 7, diluição 1:5, 65 °C) gerou um incremento de atividade de 134 % na sua atividade hidrolítica (p-NPP).
- ✓ O efeito do campo na maior temperatura pode estar relacionado ao aumento das cargas superficiais (potencial zeta) observado a 65 °C.
- ✓ Não se observou mudança aparente na estrutura secundária, causada pelo campo (utilizando as técnicas de FTIR e fluorescência). Porém, é necessário purificar a enzima para resultados mais conclusivos.
- ✓ O uso do campo magnético como pré-tratamento de CALB é interessante, uma vez que foi possível aumentar a atividade específica dessa enzima. O efeito é persistente por até 5 h a 4 °C.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar a estabilidade da lipase CalB na temperatura ambiente (25 °C) e na temperatura de refrigeração (4 °C) por mais tempo do que foi avaliado no presente estudo.

- ✓ Purificar a enzima para melhor avaliar o efeito do campo por meio de análises de conformação mais elaboradas.

8. REFERÊNCIAS

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

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

AMARA, Salem et al. Effects of static magnetic field exposure on antioxidative enzymes activity and DNA in rat brain. **General physiology and biophysics**, v. 28, n. 3, p. 260-265, 2009.

AMBASHTA, R. D.; SILLANPÄÄ, M. Water purification using magnetic assistance: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 180, n. 1, p. 38-49, 2010.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257-270, 2016.

ARAÚJO, L. M. P. de. **Análise de detecção de fluorescência para aplicação em sistemas de diagnóstico em saúde**. 2010. 93 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

ASTIER, J. P.; VEESLER, S.; BOISTELLE, R. Protein crystals orientation in a magnetic field. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 54, n. 4, p. 703-706, 1998.

ATAK, Ç. et al. Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 21, n. 2, p. 166-171, 2007.

BABICZ, I. et al. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 4-6, 2010.

BARBOSA, O. et al. Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2, 3, 4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine. Advantages of using adsorbed lipases on hydrophobic supports. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 867-876, 2012.

BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

BLANK, K. et al. Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 125, n. 4, p. 474-483, 2006.

BOUZID, H. et al. Impact of zeta potential and size of caseins as precursors of fouling deposit on limiting and critical fluxes in spiral ultrafiltration of modified skim milks. **Journal of Membrane Science**, v. 314, n. 1, p. 67-75, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIGIDA, A. I. S. et al. Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. In: **Proceedings of the European Congress of Chemical Engineering 6, (ECCE'07)**. 2007.

BUYUKUSLU, N.; ÇELİK, O.; ATAK, C. The effect of magnetic field on the activity of superoxide dismutase. **J Cell Mol Biol**, v. 5, p. 57-62, 2006.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. d'A. et al. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme research**, v. 2011, 2010.

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 484-487, 2013.

CESARINI, S. et al. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 29, 2014.

CHEN, L. et al. Zeta potential of limestone in a large range of salinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 450, p. 1-8, 2014.

CHIOU, S.; WU, W. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197-204, 2004.

CHODORGE, M. et al. Rational strategies for directed evolution of biocatalysts—application to *Candida antarctica* lipase B (CALB). **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 347, n. 7-8, p. 1022-1026, 2005.

CUI, C. et al. Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 91, p. 59-66, 2013.

DEWAN, S. S. Cell-based assays: technologies and global markets. **BCC Research**, 2014.

DINI, L.; ABBRO, L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. **Micron**, v. 36, n. 3, p. 195-217, 2005.

DORLING, K. M.; BAKER, M. J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 327, 2013.

DUNSTAN, D. E. Temperature dependence of the electrokinetic properties of two disparate surfaces. **Journal of colloid and interface science**, v. 166, n. 2, p. 472-475, 1994.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High hydrostatic pressure increased stability and activity of immobilized lipase in hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 2, p. 118-125, 2009.

ERGINER, R. et al. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. **Reactive and Functional Polymers**, v. 45, n. 3, p. 227-233, 2000.

FERNANDES, I. A. et al. Nanopartículas de poli-hidroxibutirato-co-valerato como suporte para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* fração B. **Quim. Nova**, v. 37, n. 2, p. 331-336, 2014.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3, p. 197-212, 2010.

FOURAGE, L. et al. How Molecular Evolution Technologies can Provide Bespoke Industrial Enzymes: Application to Biofuels. **Oil & Gas Science and Technology–Revue d'IFP Energies nouvelles**, v. 68, n. 4, p. 681-691, 2013.

GILLENWATER, A.; JACOB, R.; RICHARDS-KORTUM, R. Fluorescence spectroscopy: a technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. **Head & neck**, v. 20, n. 6, p. 556-562, 1998.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 12, p. 2849-2858, 2013.

GOES FILHO, L. da S. **Estudo do efeito de solventes nas propriedades espectroscópicas do antibiótico nonfloxacina: absorção, fluorescência**

estacionária e resolvida no tempo. 2011. 111 p. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Física, Centro Técnico Científico, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

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

GREHL, S. et al. Cellular and molecular changes to cortical neurons following low intensity repetitive magnetic stimulation at different frequencies. **Brain stimulation**, v. 8, n. 1, p. 114-123, 2015.

GÜLSEREN, İ. et al. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 2, p. 173-183, 2007.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GUPTA, Rani et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in lipid research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

HALBACH, K. Design of permanent multipole magnets with oriented rare earth cobalt material. **Nuclear instruments and methods**, p. 1-10, 1980.

HANDS, J. R. et al. Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectral discrimination of brain tumour severity from serum samples. **J. Biophotonics**, v. 7, n. 3-4, p. 189-199, 2014.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 550-563, 2012.

INSINGA, A. R. et al. Journal of Magnetism and Magnetic Materials Performance of Halbach magnet arrays with finite coercivity. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 407, p. 369–376, 2016.

JIA, S. et al. Effect of static magnetic field on α -amylase activity and enzymatic reaction. **Transactions of Tianjin University**, v. 15, p. 272-275, 2009.

JIANG, L. et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. **Food Research International**, v. 62, p. 595-601, 2014.

KHURANA, R.; FINK, A. L. Do parallel β -helix proteins have a unique Fourier transform infrared spectrum?. **Biophysical journal**, v. 78, n. 2, p. 994-1000, 2000.

KIATSIMKUL, P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Selective hydrolysis of epoxidized soybean oil by commercially available lipases: Effects of epoxy group on the enzymatic hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 1, p. 55-60, 2006.

KUMAR, V. et al. Global market scenario of industrial enzymes. BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. **Industrial Enzymes: Trends, Scope and Relevance**. 1. ed., Capítulo: 10: Nova York: Nova Science Publishers, 2014, p. 173-196.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 2, n. 3, p. 1-11, 2012.

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. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 9, p. 1750-1756, 2013.

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

LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 18, p. 2743-2748, 2004.

MAJOUGA, Alexander *et al.* Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: synthesis, purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 104-109, 2015.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; UR REHMAN, Dr I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.

OSÓRIO, N. M. *et al.* Interesterification of fat blends rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids catalysed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase under high pressure. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52, p. 58-66, 2008.

PADILHA, M.E.S. e AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 285-290, 2007.

PEDERSEN, A. T. *et al.* Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89-94, 2014.

PENGR, D. B.; XI LI, S.; WONG, P. Determination of rock properties by low-frequency AC electrokinetics. **Journal of Geophysical Research: Solid Earth**, v. 104, n. B12, p. 29485-29508, 1999.

POLLASTRI, S. *et al.* The zeta potential of mineral fibres. **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 469–479, 2014.

PRICE, J. *et al.* Fed-batch feeding strategies for enzymatic biodiesel production. **IFAC Proceedings Volumes**, v. 47, n. 3, p. 6204-6209, 2014.

PRICE, J. *et al.* Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 113, n. 8, p. 1719-1728, 2016.

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

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

REPPERT, P. M.; MORGAN, Frank Dale. Temperature-dependent streaming potentials: 1. Theory. **Journal of Geophysical Research: Solid Earth**, v. 108, n. B11, 2003.

REVIL, A. *et al.* Streaming potential in porous media: 2. Theory and application to geothermal systems. **Journal of Geophysical Research: Solid Earth**, v. 104, n. B9, p. 20033-20048, 1999.

ROCHALSKA, M.; GRABOWSKA, K. Influence of magnetic fields on the activity of enzymes: alpha-and beta-amylase and glutathione S-transferase (GST) in wheat plants. **International agrophysics**, v. 21, n. 2, p. 185, 2007.

RODRÍGUEZ-CHUECA, J. et al. Disinfection of wastewater effluents with the Fenton-like process induced by electromagnetic fields. **Water research**, v. 60, p. 250-258, 2014.

RODRIGUES, R. C. e AYUB, M.A.Z. **Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil.** *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963-968, 2009.

SAHEBJAMEI, H.; ABDOLMALEKI, P.; GHANATI, F. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured tobacco cells. **Bioelectromagnetics**, v. 28, n. 1, p. 42-47, 2007.

SAZAKI, G. et al. Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals. **Journal of crystal growth**, v. 173, n. 1-2, p. 231-234, 1997.

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

SILVA, F.L. **Efeito de campo magnético sobre as características físico-química de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) e seu desempenho na ultrafiltração.** 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SOARES, M. C. P. **Introdução à magnetoquímica e aos metais de transição.** UNICAMP, 2013. 22p.

SOUZA, M. C. M. de. Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres. 2013. 88 p. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em

Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

SRIVASTAVA, G. et al. Functionalized graphene sheets as immobilization matrix for fenugreek β -Amylase: enzyme kinetics and stability studies. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e113408, 2014.

STAUCH, Benjamin; FISHER, Stuart J.; CIANCI, Michele. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal of lipid research**, v. 56, n. 12, p. 2348-2358, 2015.

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

TAN, T.; NIE, K.; WANG, F. Production of biodiesel by immobilized *Candida sp.* lipase at high water content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, n. 2, p. 109-116, 2006.

TSAI, S. Enantioference of *Candida antarctica* lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 98-116, 2016.

UPPENBERG, J. et al. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16838-16851, 1995.

VARDANEGA, R. et al. Effect of magnetic field on the ultrafiltration of bovine serum albumin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 8, p. 1087–1093, 2013.

VENDITTI, R.; XUAN, X.; LI, D. Experimental characterization of the temperature dependence of zeta potential and its effect on electroosmotic flow velocity in microchannels. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 2, n. 6, p. 493-499, 2006.

WANG, H. et al. Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. *Bioelectromagnetics*, v. 29, n. 1, p. 39-46, 2008.

WANG, J. et al. A novel application of pulsed electric field (PEF) processing for improving glutathione (GSH) antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 161, p. 361-366, 2014.

YAKIR-BLUMKIN, M. Ben et al. Neuroprotective effect of weak static magnetic fields in primary neuronal cultures. **Neuroscience**, v. 278, p. 313-326, 2014.

YOU, Y. et al. Numerical simulation and performance improvement of a multi-polar concentric Halbach cylindrical magnet for magnetic refrigeration. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 405, p. 231-237, 2016.

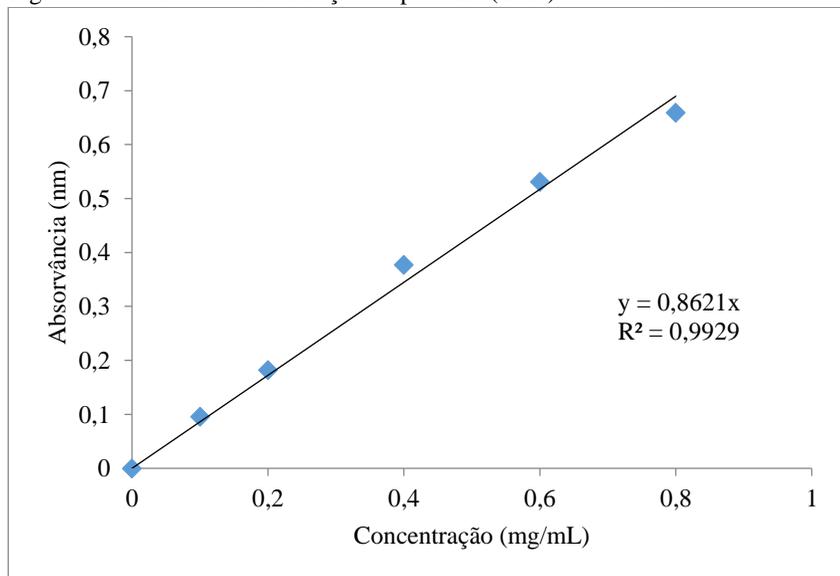
ZAIDI, N. S. et al. Magnetic Field Application and its Potential in Water and Wastewater Treatment Systems. *Separation & Purification Reviews*, v. 43, n. 3, p. 206–240, 14 ago. 2013.

ZIN, G. et al. Fouling control in ultrafiltration of bovine serum albumin and milk by the use of permanent magnetic field. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 154–159, 2016.

9. APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA

A Figura 20 apresenta a curva utilizada na determinação do teor de proteína pela metodologia de Bradford (1976).

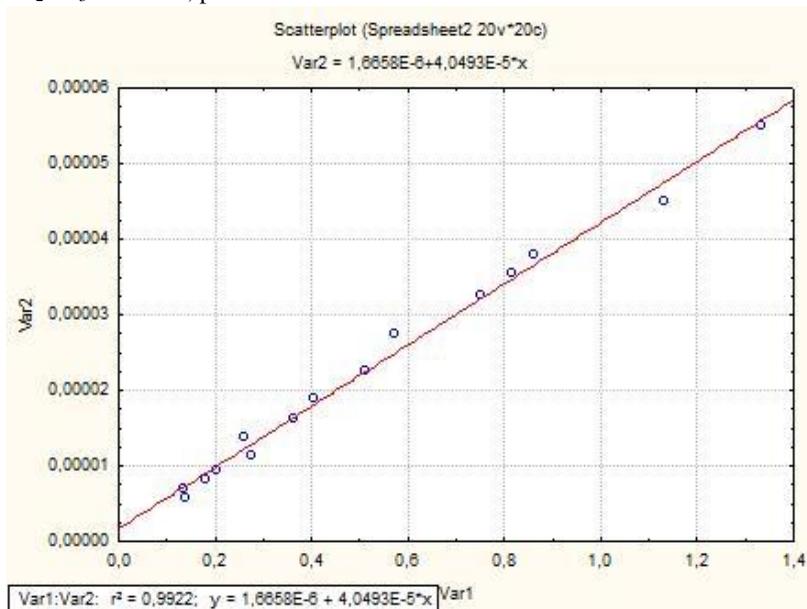
Figura 19 – Curva de concentração de proteína (BSA) vs absorvância.



10. APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA (p-nitrofenol)

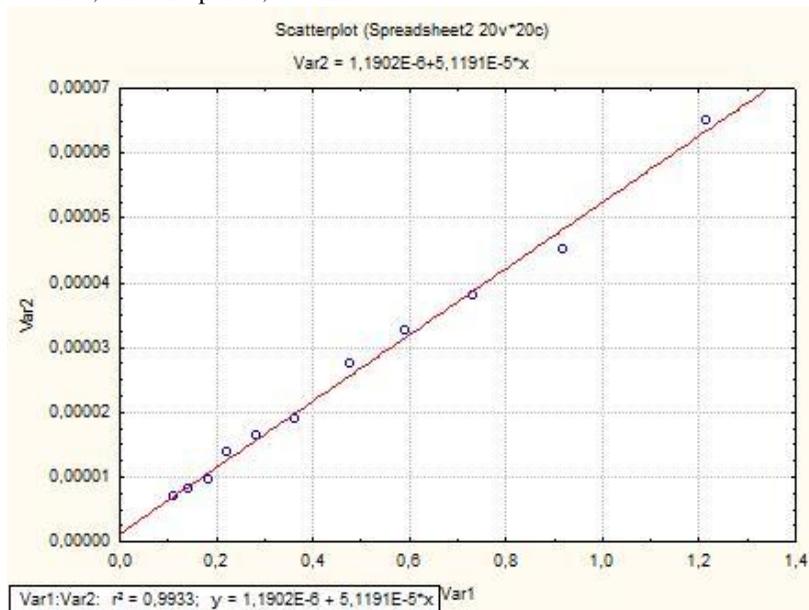
(a) Carbonato de sódio (Na_2CO_3 1 mol.L⁻¹, pH 12), 400 nm

Figura 20 – Curva de calibração p-nitrofenol gerada no *software* Statistica 7, Na_2CO_3 1 mol.L⁻¹, pH 12.



(b) Hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol.L⁻¹ pH 14), 400 nm

Figura 21 – Curva de calibração p-nitrofenol gerada no *software* Statistica 7, NaOH 0,1 mol.L⁻¹ pH 14, 400 nm.



(c) Tampão fosfato pH 7, 410 nm

Figura 22 – Curva de calibração p-nitrofenol gerada no *software* Statistica 7, Tampão fosfato pH 7.

