

Fernanda Cristina Fraga

**INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO NA CONFORMAÇÃO  
ESTRUTURAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDROLASES**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de  
Oliveira

Coorientadores: Dr.<sup>a</sup> Alexandra  
Valério e Prof. Dr. Marco Di Luccio

Florianópolis  
2018

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

Fraga, Fernanda Cristina

Influência de campo magnético na conformação estrutural e atividade enzimática de hidrolases. / Fernanda Cristina Fraga ; orientadora, Débora de Oliveira, coorientadora, Alexsandra Valério, coorientador, Marco Di Luccio, 2018.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Campo magnético. 3. Enzima. 4. Conformação estrutural. I. Oliveira, Débora de. II. Valério, Alexsandra. III. Di Luccio, Marco. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Fernanda Cristina Fraga

**INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO NA CONFORMAÇÃO  
ESTRUTURAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDROLASES**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química

Florianópolis, 13 de setembro de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Cíntia Soares, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Débora de Oliveira, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Cristiano José de Andrade, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Guilherme Zin, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, irmão e minhas avós.



## AGRADECIMENTOS

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

Meus sinceros agradecimentos aos meus orientadores Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valério, Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira e Dr. Marco Di Luccio, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e pela orientação deste trabalho, sempre me auxiliando com muita paciência e atenção.

Ao Dr. Hernán Terenzi e a Dr.<sup>a</sup> Vanessa Oliveira por todo o apoio, carinho e disponibilidade na realização de análises importantes para o trabalho.

Aos meus pais Gladis e Jorge que mesmo de longe, sempre foram minha base, incentivo e motivação.

Ao meu irmão, Rafael, pelo amor e carinho, e todo o incentivo de vir para esta instituição de ensino.

As minhas avós, Liria e Maria, e toda a família que mesmo abrindo mão do convívio, sempre me apoiaram, incentivaram e oraram por mim.

À minha madrinha Marisa, por todo o apoio inicial, desde hospedagem, guia turística e até caronas para casa. Sem ela, não seria possível a minha vinda para este programa.

A Universidade Federal de Santa Catarina, em especial aos laboratórios LABSin/LABMassa, LABSEM, CEBIME, pela estrutura disponibilizada para a realização dos experimentos e análises.

Aos meus colegas de mestrado, em especial a Mayara, que esteve comigo desde o início, e os demais amigos conquistados ao longo deste período.

Aos colegas e amigos de laboratório, em especial a Talyta, Marina e Janaína, que colocaram a mão na massa comigo. Agradeço pela paciência ao me auxiliarem na realização deste trabalho.

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

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e que contribuíram à minha formação profissional e pessoal, o meu sincero obrigado!



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*Madre Teresa de Calcutá*



## RESUMO

Alternativas para melhorar a estabilidade e atividade enzimática têm importância crescente, visto que a aplicação industrial de enzimas aumentou nos últimos anos. No entanto, as características da enzima em termos de estabilidade e eficiência catalítica podem reduzir, em alguns casos, devido às condições reacionais. Uma vez que há uma falta na literatura relacionada à enzima Eversa® Transform 2.0 (NS-40116), este trabalho avaliou a influência do campo magnético na atividade da protease de *Bacillus* sp. ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e da lipase NS-40116 ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) quando expostas ao campo de 0,7 e 1,34 T de modo estático (2 h) e com recirculação (1, 2 e 4 h) a  $0,06 \text{ L.min}^{-1}$ . O efeito do pH da solução enzimática (pH 5, 7 e 9) associado à exposição ao campo magnético também foi avaliada. Os melhores resultados em termos de atividade enzimática residual foram para a lipase NS-40116 em pH 7,0, 1,34 T no sistema de recirculação por 4 h. A atividade da protease de *Bacillus* sp. não sofreu influência do campo magnético nas condições estudadas. Então, a análise de espectrometria de massa foi realizada para confirmar a estrutura da enzima após diálise e liofilização. Além da atividade enzimática, espectrometria de fluorescência, dicroísmo circular e estabilidade térmica foram realizadas afim de avaliar o efeito do campo magnético na estrutura da NS-40116, e foi observada alterações na estrutura terciária da enzima. Assim, a aplicação de campo magnético como tratamento enzimático é uma técnica promissora e viável para incremento da atividade lipásica, apresenta baixo custo, baixo impacto ambiental e facilidade de operação quando comparado com outras alternativas de ativação enzimática.

**Palavras-chave:** Campo magnético. Lipase NS-40116. Protease de *Bacillus* sp. Conformação estrutural.



## ABSTRACT

Alternatives to improve the enzyme stability and activity have been rising in the last years due to the importance of the industrial application. However, the enzyme characteristics in terms of stability and catalytic efficiency can reduce, in some cases, due to the reaction conditions. Once there is a lack in the literature related to the structural Eversa® Transform 2.0 enzyme (NS-40116), this work evaluated the influence of magnetic density flux on the *Bacillus* sp. (2 g.L<sup>-1</sup>) and lipase NS-40116 (5 g.L<sup>-1</sup>) activity exposed to a magnetic flux (0.7 and 1.34 T) by static (2 h) and recirculation mode (1, 2 and 4 h) at 0.06 L.min<sup>-1</sup>. The effect of pH in the enzymatic solution (pH 5, 7 and 9) associated to the magnetic field was also evaluated. The best results in terms of residual enzymatic activity were for NS-40116 at pH 7.0, 1.34 T after 4 h in a recirculation mode. The enzymatic activity for protease from *Bacillus* sp. was not influenced by conditions studied. Then, mass spectrometry analysis was performed to confirm the enzyme structural after dialysis and lyophilization. In addition to the enzymatic activity, fluorescence spectrometry, circular dichroism and thermal stability analyzes were performed to verify the effect of the magnetic field on the NS-40116 enzyme structure and changes in the tertiary structure of this enzyme was observed. Thus, the application of magnetic fields as enzymatic treatment is a promising and viable technique to increase lipase activity, since it has low cost, low environmental impact and easy operation when compared with other alternatives enzyme activation.

**Keywords:** Magnetic Field. NS-40116 lipase. *Bacillus* sp. protease. Structural conformation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Níveis de estrutura molecular de uma proteína .....	32
Figura 2 - Reações catalisadas por lipases. ....	34
Figura 3 - Interface de atuação das lipases.....	35
Figura 4 - Estrutura da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> . ....	35
Figura 5 - Estrutura cristalina para a protease de <i>Aspergillus oryzae</i> . ....	36
Figura 6 - Cilindro de <i>Halbach</i> (1980) e as alterações na orientação $\alpha$ da magnetização $\mathbf{M}$ com ângulo azimutal $\phi$ .....	39
Figura 7 - Esquema da análise de dicroísmo circular.....	45
Figura 8 - Espectro DC associado com diferentes tipos de estrutura secundária.....	46
Figura 9 - Campo magnético de $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ com densidade de fluxo magnético de (A) 1,34 T (B) 0,7 T.....	50
Figura 10 - Esquema do aparato experimental com recirculação de solução enzimática com densidade de fluxo magnético de (A) 0,7 T, (B) 1,34 T e (C) controle (0 T). ....	51
Figura 11 - Atividade relativa da Protease de <i>Bacillus</i> sp. tratada com campo magnético por 2 h, em modo estático, 25 °C em diferentes valores de pH.....	56
Figura 12 - Atividade relativa da protease de <i>Bacillus</i> sp. em função do tempo e campo magnético, em tampão (A) pH 5,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 9,0.....	57
Figura 13 - Espectro de massa da enzima Eversa® Transform 2.0 (1 g.L <sup>-1</sup> em água ultrapura). ....	60
Figura 14 - Atividade relativa da enzima Eversa® Transform 2.0 tratada com campo magnético por 2 h, em modo estático, 25 °C em diferentes valores de pH.....	61
Figura 15 - Atividade relativa em função do tempo e campo magnético para a lipase NS-40116 em (A) pH 5,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 9,0. ....	63
Figura 16 - Espectros de dicroísmo circular da lipase NS-40116 controle e exposta ao campo magnético de 0,7 e 1,34 T por 4 h com recirculação em pH 7,0 a 25 °C. ....	66
Figura 17 - Efeito do aquecimento sobre a estrutura da NS-40116 controle e exposta ao campo magnético de 0,7 T e 1,3 T por 4 horas com recirculação, pH 7,0 a 25 °C. ....	67
Figura 18 - Espectros de emissão de fluorescência para a lipase Eversa® Transform 2.0 controle (0 T) e com campo magnético de 0,7 T e 1,34T, em pH 7, por (A) 4 horas com recirculação e (B) por 2 h de forma estática.....	69

Figura 19 - Estabilidade da Eversa® Transform 2.0 após exposição ao campo magnético de 1,34 T em pH 7,0 com recirculação a 25 °C. .... 70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos presentes na literatura com foco na aplicação de campos magnéticos em sistemas proteicos.....	40
Tabela 2 - Atividade das amostras controle da Protease de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes valores de pH e tempo de recirculação. ....	58
Tabela 3 - Atividade das amostras controle de lipase, em diferentes valores de pH e tempo de recirculação.....	64
Tabela 4 - Elementos de estrutura secundária e temperatura de desnaturação da NS-40116 controle e após exposição ao campo magnético. ....	66



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Atividade Relativa
CEBIME	Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural
DC	Dicroísmo Circular
EC	<i>Enzyme Commission</i>
HCl	Ácido Clorídrico
LABMASSA	Laboratório de Transferência de Massa
LABSEM	Laboratório de Separação por Membranas
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
PBS	Tampão fosfato salino
$\rho$ -NPP	$\rho$ -nitrofenil palmitato
pH	Potencial Hidrogeniônico ( $-\log[H^+]$ )
Rpm	Rotações por minuto
T	Tesla
TCA	Ácido tricloroacético
<i>TLL</i>	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
$T_m$	<i>Melting Temperature</i>
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Tris	Tris-hidroxi(metilamino)etano
Trp	Triptofanos residuais
Try	Tirosinas residuais
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
m/v	Massa/volume



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Lambda$	Comprimento de onda
$\Theta$	Elipticidade molar



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>31</b>
3.1	ENZIMAS .....	31
<b>3.1.1</b>	<b>Lipases</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Proteases</b> .....	<b>36</b>
3.2	CAMPO MAGNÉTICO .....	37
<b>3.2.1</b>	<b>Campo magnético em sistemas biológicos</b> .....	<b>39</b>
3.3	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS .....	45
<b>3.3.1</b>	<b>Dicroísmo circular e estabilidade térmica</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Espectroscopia de fluorescência</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Espectrometria de massas</b> .....	<b>47</b>
3.4	CONSIDERAÇÕES DO ESTADO DA ARTE .....	48
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.1	MATERIAIS .....	49
4.2	APARATO E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	49
<b>4.2.1</b>	<b>Diálise e liofilização da lipase Eversa® Transform 2.0 (NS- 40116)</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Determinação da atividade enzimática</b> .....	<b>52</b>
4.2.2.1	Lipase Eversa® Transform 2.0 (NS-40116) .....	52
4.2.2.2	Protease de <i>Bacillus</i> sp. ....	52
<b>4.2.3</b>	<b>Avaliação da atividade enzimática com o tempo</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Espectrometria de massas (MALDI-TOF)</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Ensaio de dicroísmo circular (DC) e estabilidade térmica (<math>T_m</math>)</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Espectroscopia de fluorescência</b> .....	<b>54</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
5.1	PROTEASE DE <i>Bacillus</i> sp. ....	55
5.1.1	Influência da exposição estática ao campo magnético na atividade enzimática .....	55
5.1.2	Influência da exposição ao campo magnético com recirculação e do tempo de exposição na atividade enzimática .....	56
5.2	LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0.....	59
5.2.1	Espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS).....	59
5.2.2	Influência da exposição estática ao campo magnético na atividade enzimática .....	60
5.2.3	Influência da exposição ao campo magnético com recirculação e do tempo de exposição na atividade enzimática .....	62
5.2.4	Dicroísmo circular .....	65
5.2.5	Espectroscopia de fluorescência .....	67
5.3	ESTABILIDADE DA ENZIMA COM O TEMPO .....	69
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

### INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO NA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDROLASES

#### Por quê?

- Lipases são enzimas amplamente utilizadas em áreas como alimentícia e farmacêutica;
- Enzimas são utilizadas em processos industriais e todo incremento de atividade de forma econômica é um benefício;
- Campos magnéticos podem afetar a atividade enzimática;
- Existem poucos trabalhos relatando a ação do campo magnético em soluções enzimáticas.

#### Hipóteses?

- O campo magnético afeta a atividade de enzimas (lipase e protease)?
- A ação do campo magnético causa mudança na estrutura terciária ou secundária das proteínas?

#### Como fazer?

- Avaliação das variáveis de processo visando aumentar o efeito do campo magnético;
- Avaliação da forma de exposição ao campo magnético na atividade enzimática;
- Definição das análises para caracterização das estruturas secundárias e terciárias das enzimas, com e sem exposição ao campo magnético, para elucidação do efeito do campo magnético na atividade.

**Resultados:**

- Definição das variáveis de processo ideais para aumento da atividade enzimática (enzima, pH, densidade de fluxo magnético e tempo de exposição);
- Análise da melhor forma de exposição ao campo magnético (estático ou com recirculação);
- Elucidação das alterações causadas pelo tratamento com campo magnético na estrutura terciária e secundária;
- Avaliação da estabilidade após tratamento com campo magnético.

## 1 INTRODUÇÃO

Aplicações que possam reduzir custos nos processos industriais sem perda na qualidade do produto final de forma a diminuir o impacto ambiental, abrem espaço para o uso de enzimas como catalisadores alternativos aos já utilizados em processos convencionais. Além do fator ambiental, a utilização de enzimas como catalisadores apresenta outras vantagens, como condições operacionais mais brandas e elevada seletividade quanto ao tipo de reação que catalisa (MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON; COX, 2013; VOET; VOET, 1995).

As lipases possuem diversos usos em setores industriais como catalisador biológico na indústria alimentícia (óleos e gorduras) e na fabricação de produtos químicos finos de maior valor agregado (RAY, 2012). Mais especificamente, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (*TLL*) possui aplicações em detergentes e em processos biotecnológicos (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). A Eversa® Transform 2.0 (ou NS-40116) é uma enzima modificada de *TLL*, comercializada em formulação líquida.

As proteases possuem um vasto campo de aplicação comercial, desde aditivos em detergentes até uso terapêutico (LI et al., 2013), podendo ser isoladas de animais, plantas, bactérias e fungos. Representam mais de 60% do total de enzimas comercializadas (RAMAKRISHNA; RAJASEKHAR; REDDY, 2010). As produzidas de *Bacillus* sp. constituem um dos mais importantes grupos de enzimas exploradas comercialmente (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). Isso se deve ao fato de sua facilidade de adaptação e crescimento tanto em meios complexos quanto em meios sintéticos (GIONGO, 2006; TAKAMI; AKIBA; HORIKOSHI, 1989).

Pesquisas para aumentar a atividade e estabilidade de enzimas são frequentemente apresentadas na literatura. Entre estas, as quais relacionam métodos químicos (BOUTUREIRA; BERNARDES, 2015; WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005), genéticos (CHEN; TSAO, 2013) e físicos (CHEN et al., 2017; LAGE et al., 2016) de tratamento, o uso de campo magnético permanente (ALBUQUERQUE et al., 2017; PRANDO et al., 2017), fluido pressurizado (DE SOUZA MELCHORS et al., 2017) e ultrassom (YU et al., 2014) apresentam-se como algumas promissoras alternativas. O uso de campo magnético é uma tecnologia promissora por apresentar vantagens, como baixo custo operacional e simplicidade de operação, sem apresentar grande impacto ambiental. Apesar dos relatos na literatura sobre o uso de campo magnético em proteínas, pouco se

esclareceu até o momento em relação às possíveis modificações a nível estrutural enzimático.

Recentemente, Albuquerque et al. (2016) relataram os estudos envolvendo campos magnéticos estáticos na atividade enzimática. Há relatos desde a década de 1960 até os dias atuais, mostrando a variedade de resultados possíveis com diferentes condições experimentais. Entretanto, mesmo com décadas de pesquisa nesse sentido, pouco foi enfatizado e relatado em termos de mudança estrutural.

Diante do exposto, o presente trabalho abrange a avaliação dos efeitos do campo magnético sobre a atividade enzimática, estabilidade e conformação estrutural de forma detalhada. Para isso, foi empregada a espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS), dicroísmo circular (DC) e espectrometria de fluorescência a fim de avaliar as possíveis alterações conformacionais após exposição no campo magnético permanente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do campo magnético permanente na atividade, estabilidade e conformação estrutural de enzimas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar o efeito das variáveis de processo (pH e densidade de fluxo magnético) na atividade residual das enzimas comerciais protease de *Bacillus* sp. e Eversa® Transform 2.0;
- b) Avaliar o efeito do tempo de exposição ao campo magnético na atividade enzimática;
- c) Avaliar diferentes formas de exposição dos campos magnéticos: estático e com recirculação;
- d) Analisar as possíveis modificações estruturais da enzima Eversa® Transform 2.0 quando submetida à diferentes densidades de fluxo magnético;
- e) Determinar as estruturas primária, secundária e terciária da enzima Eversa® Transform 2.0 tratada e não tratada com o campo magnético;
- f) Avaliar a estabilidade enzimática (pós-tratamento com campo magnético) em relação ao tempo de armazenamento.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura que servirá de fundamentação teórica para o desenvolvimento desta dissertação. Inicialmente, será apontada uma breve revisão sobre enzimas, com ênfase nas lipases e proteases utilizadas no trabalho. Serão apresentados conceitos teóricos sobre campo magnético e trabalhos que demonstraram a sua utilização como tratamento de proteínas. Uma breve revisão sobre técnicas de caracterização de enzimas, assim como os principais métodos para avaliação das alterações conformacionais também será reportada.

#### 3.1 ENZIMAS

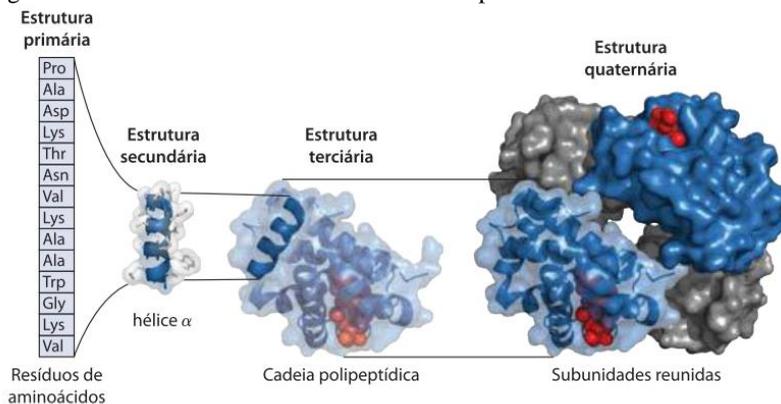
Enzimas são em sua maioria proteínas, com exceção de um grupo de moléculas de RNA. As proteínas são polímeros longos de aminoácidos (macromoléculas) que ocorrem em grande variedade, encontradas em todas as células e formadas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos (MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON; COX, 2013; VOET; VOET, 1995). Atuam principalmente como biocatalisadores em reações específicas, permitindo o aumento da velocidade reacional por meio da diminuição da energia de ativação sem afetar o equilíbrio químico da reação e sem ser consumido no processo (MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON; COX, 2013; VOET; VOET, 1995).

As enzimas são catalisadores altamente específicos, sendo uma das vantagens do uso para esse fim. A estabilidade da estrutura das proteínas e de suas interações se deve a ligações não covalentes entre substrato e enzima. Elas contornam problemas presentes no ambiente reacional, proporcionando um meio ideal para que ocorra a reação de forma acelerada. Essas reações ocorrem no sítio ativo da enzima, através da ligação deste com o substrato (ALBERTS et al., 2011; NELSON; COX, 2013; VOET; VOET, 1995).

Conforme Nelson; Cox (2013), a estrutura das enzimas é definida em quatro níveis: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 1). A estrutura primária é uma descrição de todas as ligações covalentes (ligações peptídicas e dissulfeto), ligando resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica, sendo a sequência de resíduos de aminoácidos o elemento mais importante. O arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos em um segmento polipeptídico é a estrutura secundária. O enovelamento tridimensional do polipeptídeo é

descrito pela estrutura terciária. Quando a proteína contém duas ou mais cadeias polipeptídicas distintas (idênticas ou diferentes), o arranjo destas subunidades em complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária (NELSON; COX, 2013).

Figura 1 - Níveis de estrutura molecular de uma proteína



Fonte: NELSON; COX (2013).

Esses biocatalisadores diferenciam-se dos demais por meio da formação do complexo enzima-substrato, e a energia proveniente dessa interação é a energia de ligação. Sendo esta a principal fonte de energia livre que é utilizada pela enzima para diminuir a energia de ativação. De forma geral, são necessárias múltiplas interações entre enzima e substrato para que a catálise enzimática ocorra, o que justifica o tamanho tão grande das enzimas, pois devem ter grupos funcionais dos mais variados, que sejam capazes de ter interações de modo que maximize, no estado de transição, a energia de ligação (ALBERTS et al., 2011; VOET; VOET, 1995).

A utilização de enzimas como biocatalisadores é observada nas mais variadas áreas, dentre elas na indústria química fina, farmacêutica, de alimentos, cosméticos, têxtil, papel e celulose (CHOI; HAN; KIM, 2015). Com o desenvolvimento de novas tecnologias na área de enzimologia, a biocatálise enzimática vem substituindo os processos químicos tradicionais em diversas áreas, com isso, espera-se que essa substituição aumente nos próximos anos, a partir de estudos que viabilizem suas aplicações em termos de estabilidade, eficiência catalítica e especificidade (CHOI; HAN; KIM, 2015; LITTLECHILD, 2015).

### 3.1.1 Lipases

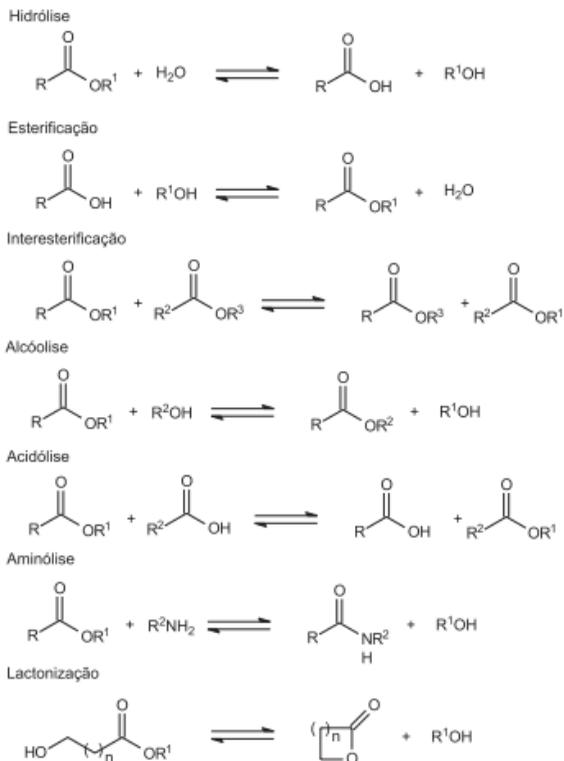
As lipases (triacilglicerol lipase, número EC 3.1.1.3), são enzimas de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e/ou vegetal (PAQUES; MACEDO, 2006) as quais catalisam diferentes reações como a hidrólise de triglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2012), reações de aminólise (MOUAD et al., 2016; PUERTAS et al., 1993; ZENG et al., 2018) e lactonização (ANTCZAK et al., 1991), hidrólise e a transesterificação de ésteres (MORENO-PEREZ et al., 2015). Além disso, possuem propriedades enantiosseletivas e catalisam a reação reversa da síntese com o mesmo poder de reação (GUPTA; SAHAI; GUPTA, 2007).

Na década de 1980, pouco conhecia-se sobre o uso industrial das lipases, porém, o interesse no desenvolvimento de novas aplicações em produtos e processos fez com que aumentasse a variedade de lipases disponíveis comercialmente, com propriedades específicas, alta estabilidade e especificidade, largas faixas de uso de pH e temperatura (MACRAE; HAMMOND, 1985; SHARMA et al., 2001; SINGH; CHANDRAVEER; TRIPATHI, 2017).

Atualmente, as lipases possuem diversos usos em setores industriais como catalisador biológico na indústria alimentícia (FERREIRA-DIAS et al., 2013; SHARMA et al., 2001) e na fabricação de produtos químicos com alto valor agregado (RAY, 2012). Na indústria de laticínios são aplicadas para modificar os comprimentos das cadeias de ácidos graxos, melhorando o sabor de queijos, na hidrólise da gordura do leite e no amadurecimento de queijos (KHEADR; VUILLEMARD; EL-DEEB, 2002). Além disso, são utilizadas na remoção de manchas e gorduras na indústria de detergentes (SHARMA et al., 2001; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Em cosméticos são utilizadas na fabricação de fragrâncias de perfumes por meio da síntese de ésteres (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; RAY, 2012). Mais especificamente, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* possui aplicação na fabricação de detergentes e em processos biotecnológicos como para a produção de biodiesel (PRICE et al., 2016; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Segundo Gandhi (1997), as reações catalisadas por lipases podem ser divididas em duas classes: reações de hidrólise e de reações síntese. Esta última ainda pode ser subdividida em reações de esterificação e de transesterificação (reações de interesterificação, alcoólise e acidólise). Na Figura 2 são apresentadas as reações catalisadas por lipases.

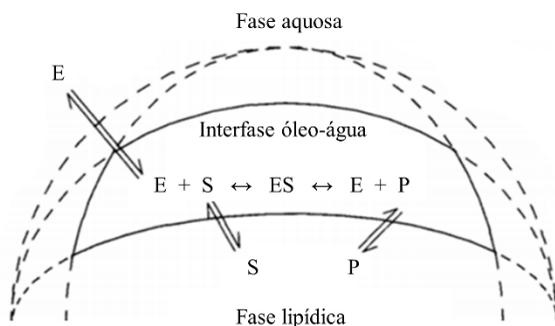
Figura 2 - Reações catalisadas por lipases.



Fonte: PAQUES; MACEDO (2006).

As lipases diferem das esterases devido à interface de ativação (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004). As lipases atuam na interface óleo-água (Figura 3), assim a catálise ocorre na interface entre o substrato insolúvel e a fase aquosa onde a enzima está dispersa (BROCKMAN; MOMSEN; TSUJITA, 1988). Dessa forma, essa enzima possui a capacidade de hidrolisar diferentes ésteres de ácidos graxos sobretudo os insolúveis em água (MACRAE; HAMMOND, 1985).

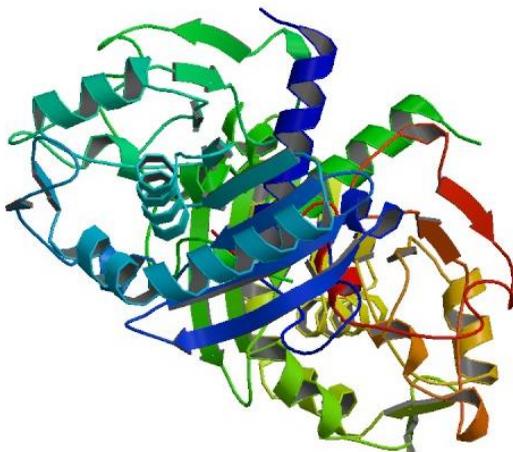
Figura 3 - Interface de atuação das lipases.



Fonte: Adaptado de BROCKMAN; MOMSEN; TSUJITA (1988).

A lipase Eversa® Transform 2.0, também conhecida como NS-40116 ou lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), está entre as lipases mais usadas em biotecnologia (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). É uma hidrolase glicosilada que consiste de 269 resíduos de aminoácidos (Figura 4) (KUMAR et al., 2015) e possui uma glicosilação na posição Asn33 (asparagina) (SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2014).

Figura 4 - Estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus*.



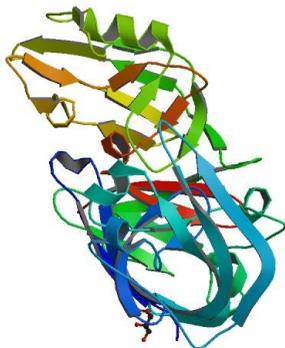
Fonte: KUMAR et al. (2015).

### 3.1.2 Proteases

Proteases são classificadas na classe 3 das enzimas (hidrolases), e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). Formam uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com localização da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (BEUNOM & BOND, 1989 apud FEDATTO, 2004). As endopeptidases são subdivididas conforme o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise: em serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-proteinases ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metaloproteinases ou metaloendopeptidases (EC 3.4.24). A protease de *Bacillus* sp. é uma mistura de proteases, com número EC 3.4.21.62 e 3.4.24.28. As proteinases aspárticas (Figura 5), contém cerca de 330 resíduos de aminoácidos e possuem dois lóbulos, compondo a fenda do centro ativo.

Catalisam a quebra de proteínas pela hidrólise (clivagem) das ligações peptídicas entre os aminoácidos, inicialmente em peptídeos menores e depois em aminoácidos individuais (ALBERTS et al., 2011). Algumas específicas, como a quimotripsina para ligações peptídicas contendo resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas; e a tripsina para ligações peptídicas contendo resíduos com cadeia lateral com carga elétrica positiva, atuam apenas na ligação peptídica adjacente a determinados resíduos de aminoácidos, fragmentando a cadeia polipeptídica de uma maneira reproduzível e previsível (NELSON; COX, 2013). Dessa forma, a especificidade em reações individuais de hidrólise pode ser adaptada para necessidades específicas (LI et al., 2013).

Figura 5 - Estrutura cristalina para a protease de *Aspergillus oryzae*.



Fonte: KAMITORI et al. (2003).

As proteases possuem um vasto campo de aplicação comercial, desde aditivos em detergentes até uso terapêutico (LI et al., 2013). Podem ser isoladas de animais, plantas, bactérias e fungos e representaram mais de 60% do total de enzimas comercializadas (RAMAKRISHNA; RAJASEKHAR; REDDY, 2010). São chamadas de enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases e pertencem ao grupo de hidrolases que possuem envolvimento da água na geração do produto. As produzidas a partir de *Bacillus* sp. formam o mais importante grupo de enzimas exploradas comercialmente (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). Isso se deve ao fato de sua facilidade de adaptação e crescimento tanto em meios complexos, quanto em meios sintéticos (GIONGO, 2006; TAKAMI; AKIBA; HORIKOSHI, 1989). Ainda, seu uso industrial vem crescendo rapidamente nas últimas duas décadas na indústria terapêutica (LI et al., 2013).

### 3.2 CAMPO MAGNÉTICO

Por definição, campo magnético é a região ao redor de um ímã onde se tem uma força magnética de atração/repulsão (SAMBAQUI; MARQUES, 2010), podendo ser produzida por duas formas, com a utilização de partículas eletricamente carregadas em movimento, como uma corrente elétrica em um fio ou utilizando partículas elementares, como os elétrons (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015).

Quando os campos magnéticos de determinados materiais se combinam para produzir um campo magnético nas vizinhanças do material, se tem a formação de um campo magnético permanente (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015). As propriedades magnéticas dos materiais são resultantes de todos os momentos dipolares, e podem ser classificados em diamagnetismo, paramagnetismo e ferromagnetismo (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015; SAMBAQUI; MARQUES, 2010).

O diamagnetismo é uma propriedade de todos os materiais, mas por ser fraco, normalmente não é observado em materiais que possuem uma das outras propriedades. Todo material diamagnético submetido a um campo magnético externo apresenta um momento dipolar magnético orientado no sentido contrário ao do campo magnético externo (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015; SAMBAQUI; MARQUES, 2010; SUN et al., 2013). Esses materiais são aqueles não magnéticos, com permeabilidade magnética inferior a do vácuo (SAMBAQUI; MARQUES, 2010).

O paramagnetismo é observado em materiais com elementos da família dos metais de transição, da família das terras raras ou da família dos actínídeos cujos átomos possuem momentos dipolares magnéticos totais diferentes de zero, com campo magnético resultante zero quando submetido a um campo magnético externo e apresenta momento dipolar magnético orientado no mesmo sentido do campo magnético externo ao qual está exposto (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015; SUN et al., 2013). Os materiais com esta propriedade apresentam permeabilidade maior que a do vácuo (SAMBAQUI; MARQUES, 2010).

Já o ferromagnetismo está presente apenas no ferro, níquel, cobalto, gadolínio e disprósio e em liga desses materiais. Os momentos dipolares magnéticos de átomos vizinhos desses materiais se alinham, produzindo regiões de intensos momentos magnéticos, quando submetido a um campo magnético externo, adquire um grande momento dipolar magnético na mesma direção do campo ao qual está exposto (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015; SAMBAQUI; MARQUES, 2010; SUN et al., 2013). Esses materiais apresentam permeabilidade magnética de centenas e até milhares de vezes maior que a do vácuo (SAMBAQUI; MARQUES, 2010).

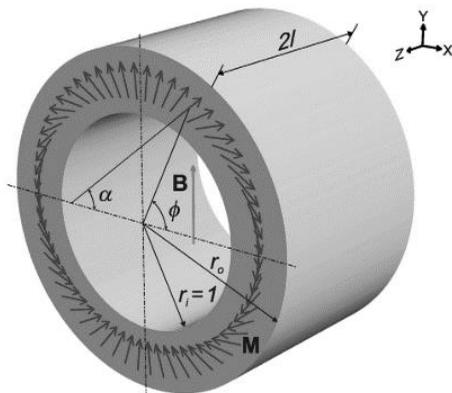
Uma das principais vantagens dos campos magnéticos permanentes é o fato que podem ter tamanho pequeno sem perder ou reduzir a força do campo magnético (HALBACH, 1980; INSINGA et al., 2016). Anteriormente à década de 1960, o campo magnético mais alto obtido por ímãs permanentes era limitado, e a descoberta de elementos de terras raras, de uma nova família de materiais magnéticos permanentes mudou esse cenário (INSINGA et al., 2016). Assim, os mais frequentes ímãs de terras raras encontrados são os de samário-cobalto e neodímio-ferro-boro (NdFeB), podendo alcançar densidades de fluxos tão altas quanto 1,48 T (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015; INSINGA et al., 2016).

Conforme Rosen (2003), os campos magnéticos podem ser classificados de acordo com a sua densidade de fluxo magnético como fracos, sendo aqueles cuja densidade é menor que 1 mT, de intensidade moderada apresentando densidade entre 1 mT e 1 T, forte com densidade entre 1 T e 5 T e os ultra forte com densidade superior a 5 T.

Em 1973, através de um novo arranjo geométrico de blocos de ímãs, o cilindro de *Halbach*, produzindo densidade de fluxo magnético homogêneo, foi reportado (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2015; INSINGA et al., 2016). Dentro do cilindro a densidade de fluxo gerada não apresenta limite teórico, se for utilizado material magnético

suficiente, além disso, o arranjo é perfeitamente auto-isolado, sem que haja o escape de linhas de fluxo magnético da superfície externa do ímã (INSINGA et al., 2016; TUREK; LISZKOWSKI, 2014). Os ímãs cilíndricos de *Halbach* são cilindros ocios magnetizados perpendicularmente ao eixo Z (Figura 6) de tal maneira que a direção de magnetização gira continuamente com sua posição angular (INSINGA et al., 2016; TUREK; LISZKOWSKI, 2014).

Figura 6 - Cilindro de *Halbach* (1980) e as alterações na orientação  $\alpha$  da magnetização  $\mathbf{M}$  com ângulo azimutal  $\phi$ .



Fonte: TUREK; LISZKOWSKI (2014).

### 3.2.1 Campo magnético em sistemas biológicos

Os efeitos do campo magnético em sistemas biológicos são controversos, principalmente em função do tempo de exposição, forma de exposição e intensidade do campo utilizados. A exposição ao campo magnético por organismos biológicos pode ser benéfica, irrelevante ou prejudicial a esses organismos (GRISSOM, 1995).

Existem inúmeros estudos que visam observar os efeitos de campos magnéticos em diversas aplicações. A Tabela 1 apresenta um resumo de alguns trabalhos que estudaram o efeito do campo magnético sobre propriedades físicas e estruturais de diferentes enzimas. Cabe mencionar, que apesar das alterações na atividade catalítica de enzimas submetidas a tratamentos com campo magnético, e dos relatos na literatura, poucos trabalhos apresentam estudo dos efeitos da aplicação do campo magnético à nível enzimático/proteico estrutural.

Tabela 1 - Estudos presentes na literatura com foco na aplicação de campos magnéticos em sistemas proteicos.

<b>Estudo</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Densidade de campo magnético</b>	<b>Tempo</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
Efeito de campo magnético na atividade de lodo ativado no tratamento de água residuais.	Avaliar o efeito da aplicação do campo magnético no crescimento do lodo ativado.	8,9, 17,8, 26,6, 35,5, 46,7 mT	2 s com campo, 2 s sem campo, por 40 h.	44% de incremento na remoção de substrato em 17,8 mT com mesmo tempo de reação. Campo de 8,9 mT não deu diferença. Campo de 46,7 mT deu efeito negativo.	YAVUZ; ÇELEBI (2000).
Efeito de campos eletromagnéticos de extrema baixa frequência em enzimas associadas a membrana.	Avaliar se campo eletromagnético de extrema baixa frequência afetam a atividade de enzimas associadas as membranas: Acetilcolinesterase, fosfoglicerato quinase, ATPase	2,5 mT/75 Hz	0-10 min	Redução da atividade nas três enzimas estudadas, independente do tempo de exposição. A atividade completa é restaurada rapidamente quando a enzima é removida do campo.	MORELLI et al. (2005).

O efeito do campo magnético na atividade de superóxido dismutase (SOD).	Observar a influência dos campos magnéticos na SOD isolada com radicais intermediários.	2,9 – 4,6 mT	0, 2,2, 19,8 e 33 s	Aumento significativo da atividade.	BÜYÜKUSLU; ÇELİK; ATAĞ (2006).
Efeitos de campo magnético na atividade de enzimas antioxidante de células de tabaco cultivadas em suspensão.	Investigar mudanças causadas por campo magnético na atividade das enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).	10 e 30 mT	5 dias	Aumento da atividade da SOD em 10 mT e diminuição da atividade da CAT e APX.	SAHEBJAMEI; BDOLMALEKI; HANATI (2007).
Efeito do campo magnético nas atividades de peroxidase da cultura de tecidos de soja.	Determinar o efeito do campo magnético na atividade da peroxidase e RNA total de brotações regeneradas a partir de culturas de tecidos de soja.	2,9 – 4,6 mT	2,2 e 19,8 s	As características de crescimento dos expostos ao campo magnético no período de 2,2 s foram positivamente afetados e aumentaram em relação ao controle.	ATAĞ et al. (2007).
Influência de campos magnéticos na atividade de enzimas $\alpha$ - e $\beta$ -amilase e glutatona S-transferase (GST) em plantas de trigo.	Estudar o impacto do campo magnético na atividade das enzimas em sementes de trigo.	5 mT/16 Hz	2 h de exposição, medida 13 dias após a exposição	Enzima amilase diminuiu a atividade; GST aumentou em 2 espécies e diminuiu em outra.	ROCHALSKA; GRABOWSKA (2007).

<p>Efeito do campo magnético no sistema de recirculação de defesa antioxidante em cultivares de <i>Chlorella vulgaris</i>.</p>	<p>Avaliar o efeito na atividade de enzimas antioxidantes expostas a campos magnéticos.</p>	<p>5, 10, 15, 25, 35, 45 e 50 mT</p>	<p>12 h</p>	<p>Carotenoides totais não teve diferença. Atividade da SOD com 10-50 mT e atividade da CAT com 50 mT foram superiores ao controle.</p>	<p>WANG et al. (2008).</p>
<p>Caracterização da celulase sobre várias intensidades de campo magnético.</p>	<p>Investigar o efeito do campo magnético estático na caracterização da celulase, em termos de temperatura, pH, mudança na conformação e parâmetros cinéticos.</p>	<p>0,15, 0,30 e 0,45 T</p>	<p>1-12 h</p>	<p>Aumento na atividade com campo de 0,15 T. Km e Vm melhores para 0,3 T. Maior eficiência na catálise e enzima mais estável após exposição ao campo.</p>	<p>RAN et al. (2009).</p>
<p>Efeito do campo magnético estático sobre a atividade da <math>\alpha</math>-amilase e reação enzimática</p>	<p>Investigar o efeito do campo eletromagnético na <math>\alpha</math>-amilase sob três diferentes campos magnéticos</p>	<p>0,15, 0,30 e 0,45 T</p>	<p>1, 2, 3, 4, 5 e 6 h</p>	<p>Aumento da atividade em relação ao controle em todos os tempos testados.</p>	<p>JIA et al. (2009).</p>
<p>Efeitos de campos magnéticos estáticos na atividade e estabilidade da <math>\alpha</math>-amilase immobilizada em esferas de quitosana.</p>	<p>Investigar o efeito do campo magnético na atividade da <math>\alpha</math>-amilase immobilizada em quitosana.</p>	<p>0,15 T</p>	<p>0, 1, 3, 5, 7 e 9 h</p>	<p>Aumento da atividade em 20%. Estabilidade operacional após 10 sucessivas reações manteve 20% a mais que o controle. Na estocagem o controle perdeu 30% a mais de atividade.</p>	<p>LIU et al. (2010).</p>

<p>Efeitos do campo magnético na germinação de sementes e atividades de algumas enzimas em cominho.</p>	<p>Investigar os efeitos da exposição a campos magnéticos estáticos na germinação de sementes e crescimento de plântulas, bem como na atividade enzimática de sementes de cominho.</p>	<p>25, 50 e 75 mT</p> <p>15, 30 e 60 min</p>	<p>Na germinação de sementes, as atividades enzimáticas da <math>\alpha</math>-amilase, desidrogenase e protease foram significativamente maiores nas sementes tratadas em relação aos controles e o valor máximo foi com 50 mT para exposições de 60 min.</p> <p>ASADI SAMANI; POURAKBAR; AZIMI (2013).</p>
<p>Nanopartículas de magnetita revestidas de ouro funcionalizadas por enzimas como novos nanomateriais híbridos: Síntese, purificação e controle da função enzimática por campo magnético de baixa frequência.</p>	<p>Efeito do campo magnético de baixa frequência sobre a atividade catalítica de ChT imobilizado.</p>	<p>250 mT</p> <p>5,5 min: 2x2,5 min e 0,5 min de pausa</p>	<p>Redução da atividade com a exposição do campo magnético.</p> <p>MAJOUGA et al. (2015).</p>
<p>Influência de campo magnético nas lipases <i>Candida Antartica</i> B (CALB) e NS-40116.</p>	<p>Avaliar o efeito da aplicação do campo magnético sobre as lipases.</p>	<p>0,7 e 1,34 T</p> <p>2 h</p>	<p>CalB: aumento 134% na atividade 0,7 T, pH 7 e 65 °C. NS-40116 não apresentou diferença.</p> <p>TORRES (2017).</p>

---

Caracterização do desempenho e atividade catalítica da lisozima de clara de ovo de galinha submetida ao campo magnético permanente.	Avaliar o efeito do campo magnético permanente e as condições operacionais sobre a atividade catalítica, estrutura enzimática e tamanho de partícula.	0, 0,7, e 1,34 T	2 h	Aumento da atividade de 56% para densidade de fluxo magnético de 1,34 T, PRANDO et al. (2017). pH 13 e força iônica de 50 mmol.L <sup>-1</sup> , comparado com o controle.
---	---	------------------	-----	---

---

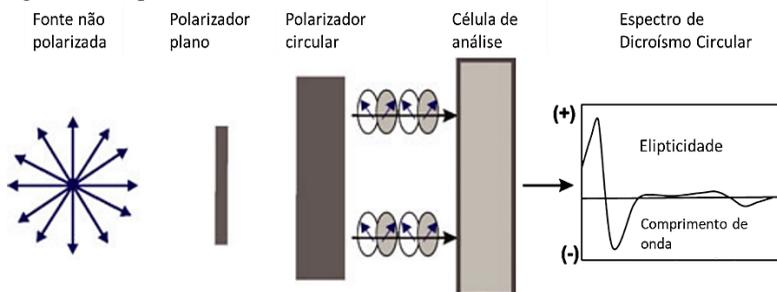
Fonte: Acervo do Autor.

### 3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS

#### 3.3.1 Dicroísmo circular e estabilidade térmica

Espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é uma técnica que permite analisar a estrutura secundária de proteínas em solução através da mudança na polarização da luz UV. Baseia-se no fato de que os grupos cromóforos interagem com a luz polarizada, em um ambiente assimétrico. A forma assimétrica estrutural da enzima, leva a diferenças de absorção da luz circularmente polarizada para a esquerda em relação a direita (Figura 7) (GREENFIELD, 1996; NELSON; COX, 2013; RANJBAR; GILL, 2009).

Figura 7 - Esquema da análise de dicroísmo circular.



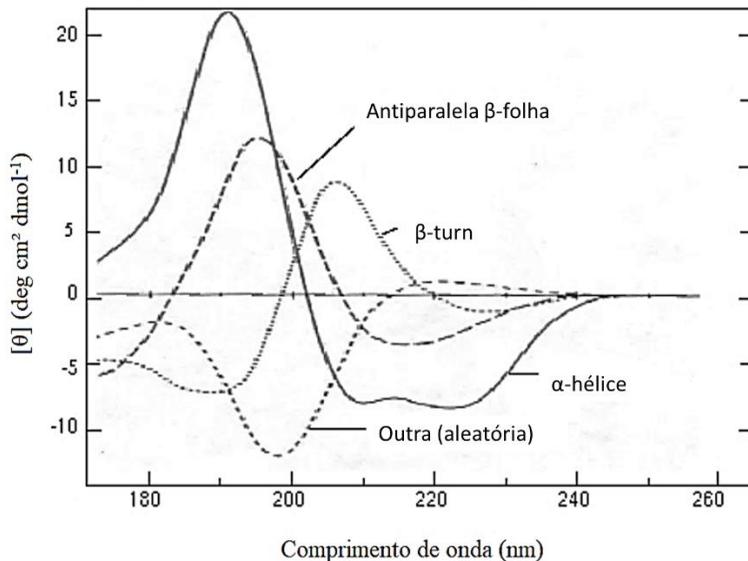
Fonte: Adaptado de RANJBAR; GILL (2009).

Desde a década de 1960, o DC é um método utilizado em biologia estrutural para análise de proteínas, polipeptídeos e estruturas peptídicas (WHITMORE; WALLACE, 2008). Essa técnica espectroscópica não é utilizada apenas para determinar a estrutura secundária das proteínas, mas também para fornecer informações sobre as interações ligante-proteínas e monitorar o dobramento/desdobramento das proteínas (MILES; WALLACE, 2016; WHITMORE; WALLACE, 2008).

Bandas espectrais são atribuídas a características estruturais específica de uma molécula, pois os sinais de DC somente ocorrem em regiões onde há absorção de radiação (KELLY; JESS; PRICE, 2005; MILES; WALLACE, 2016). Ligações peptídicas possuem absorção abaixo de 240 nm, cadeias laterais de aminoácidos aromáticos tem absorção entre 260 e 320 nm e as ligações dissulfureto bandas fracas em aproximadamente 260 nm sendo esses alguns exemplos de cromóforos

de interesse em proteínas. Diferentes tipos de estrutura secundária normalmente encontrados em proteínas geram característicos espectros UV, como os apresentados na Figura 8 (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Figura 8 - Espectro DC associado com diferentes tipos de estrutura secundária.



Fonte: Adaptado de Brahms & Brahms (1980) apud JOHNSON JR (1988).

A desnaturação de proteínas está relacionada com a baixa estabilidade e alterações do equilíbrio das fracas forças que mantêm sua conformação nativa. Suas propriedades sensíveis, como rotação óptica, adsorção UV e viscosidade, mudam drasticamente em uma estreita faixa de temperatura quando a proteína em solução é aquecida. Essa mudança quase descontínua aponta que a estrutura da proteína nativa se desdobra de maneira cooperativa, desdobramentos parciais da estrutura desestabilizam a estrutura remanescente entrando em colapso (MIOTTO et al., 2018; NELSON; COX, 2013; VOET; VOET, 1995). O ponto médio desse processo é equivalente a temperatura de desnaturação (*melting temperature* –  $T_m$ ).

Dessa maneira,  $T_m$  pode ser definida como a temperatura onde a concentração da proteína em seu estado dobrado é igual a concentração em seu estado desdobrado (MIOTTO et al., 2018). Proteínas, em sua maioria, possuem valores de  $T_m$  abaixo de 100 °C, com exceção para as proteínas de bactérias termofílicas com temperaturas próximas a 100 °C (VOET; VOET, 1995).

### 3.3.2 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica rápida, não destrutiva, com alta sensibilidade e especificidade na qual uma molécula eletricamente excitada decai ao seu estado fundamental emitindo um fóton (ENGELEN, 2006; GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; VOET; VOET, 1995). Consequentemente, um próton emitido por fluorescência geralmente tem um comprimento de onda maior que inicialmente absorveu (VOET; VOET, 1995).

É uma técnica utilizada no estudo de peptídeos e proteínas, pois os aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) oferecem fluorescência intrínseca de conformação e interações intermoleculares (CHEN; BARKLEY, 1998). Através dela, é possível obter informações a respeito de macromoléculas como conformação, sítios de ligação, interações com solventes, grau de flexibilidade (PAVONI; SPIROPULOS, 2014). De maneira geral, se a estrutura da enzima é conhecida, se pode interpretar as mudanças na fluorescência de algum grupo cromóforo como alteração em termos estruturais (CHEN; BARKLEY, 1998; GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

### 3.3.3 Espectrometria de massas

Há muito tempo, o espectrômetro de massa tem sido utilizado como ferramenta para análises químicas, e a utilização de técnicas de ionização desenvolvidas mais recentemente permitem analisar moléculas não voláteis e grandes, como é o caso da ionização por dessorção a laser assistido por matriz (MALDI) (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

Nessa técnica, a amostra é dispersa ou dissolvida em uma matriz e colocada no caminho de fótons de alta intensidade; a colisão desses fótons com a amostra ioniza moléculas da amostra e as expelle da superfície; os íons expelidos são acelerados na direção do analisador (ALBERTS et al., 2011; NELSON; COX, 2013; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001). Quando as moléculas carregadas são introduzidas em um campo magnético e/ou elétrico, cujos caminhos percorridos no campo são função da razão entre as massas e suas cargas,  $m/z$ . Mais especificamente, a espectrometria de massas de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-MS), consiste na disposição de proteínas em uma matriz absorvedora de luz; as proteínas são ionizadas com o pulso curto de luz a laser e dessorvidas da matriz no sistema de vácuo (NELSON; COX, 2013). A espectrometria de massa MALDI é

utilizada quando a amostra tem grande faixa de pesos moleculares, e exige pequenas quantidades de amostra (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

### 3.4 CONSIDERAÇÕES DO ESTADO DA ARTE

Na revisão bibliográfica foi apresentado o estado da arte a respeito das aplicações do campo magnético no tratamento de enzimas, e o relato dos principais efeitos que levam às alterações da atividade enzimática. A utilização de campo magnético como tratamento de enzimas é interessante por apresentar como vantagens, baixo custo de funcionamento e a baixa toxicidade e geração de poluentes ou ainda o uso de solventes orgânicos.

No entanto, os resultados quanto da ação de campo magnético em enzimas ainda são controversos. Alguns estudos observaram aumento da atividade enzimática, enquanto outros obtiveram redução dessa atividade em decorrente da exposição a um dado campo magnético, ou nenhum efeito observado. Além disso, é imprecisa a comparação entre os efeitos de campos magnéticos em enzimas, decorrente das variações nas condições experimentais e enzimas utilizadas. De acordo com Albuquerque e colaboradores (2016) as condições experimentais variam muito, desde diferentes tempos de exposição (segundos, minutos, horas e até dias), diversidade de enzimas, forma de exposição (estática ou com recirculação), até a densidade de fluxo magnético ( $10^{-6}$  a 10 T).

Nesse sentido, se evidencia a importância desse estudo na avaliação dos efeitos de campos magnéticos permanentes na atividade das enzimas lipase e protease, a fim de elucidar o efeito do campo magnético na estabilidade e atividade dessas enzimas, assim como nas mudanças conformacionais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados, o aparato experimental empregado e os métodos para a realização deste trabalho, bem como as metodologias de análises de conformação estrutural de enzimas e sua caracterização. O aparato experimental com campo magnético foi disponibilizado pelo Laboratório de Separação por Membranas (LABSEM), as análises de conformação foram realizadas no Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), e as demais análises no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA), todos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 4.1 MATERIAIS

No preparo de todas as soluções utilizou-se água ultrapura Milli-Q® com resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C. Foram utilizadas duas enzimas, Protease de *Bacillus* sp., comercial liofilizada, adquirida da Sigma-Aldrich com pureza  $\leq 100\%$ . A lipase Eversa® Transform 2.0 (NS-40116) em formulação líquida foi cedida pelo fabricante Novozymes®. Para o ajuste do pH das soluções foram utilizados os seguintes reagentes, na concentração de 50 mmol.L<sup>-1</sup>: acetato de sódio anidro (99%, Vetec) e ácido acético glacial (99,5%, Lafan) para pH 5,0, fosfato de potássio monobásico anidro (98%, Vetec) e fosfato de sódio dibásico dihidratado (99% Vetec) para pH 7,0, Tris (hidroximetil) aminometano (99,8%, Vetec) e ácido clorídrico (37%, Química Moderna) para pH 9,0.

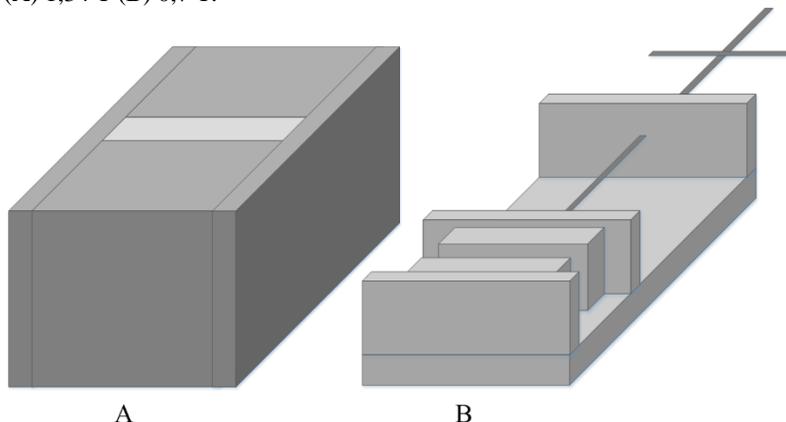
Para determinação da atividade enzimática foram utilizados os reagentes: 4-nitrofenol (99,5%, Sigma-Aldrich), álcool etílico absoluto (Neon), fosfato de sódio dibásico dihidratado (99%, Vetec), fosfato de sódio monobásico anidro (98%, Neon), hidróxido de sódio perolado, (97%, Lafan),  $\rho$ -nitrofenil palmitato ( $\rho$ -NPP, 99%, Sigma-Aldrich), ácido tricloroacético (99%, Vetec), caseína (100%, Vetec) e L-tirosina (99%, Vetec).

### 4.2 APARATO E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para os ensaios com exposição ao campo magnético, dois diferentes aparatos experimentais foram utilizados. O primeiro aparato (Figura 9A) foi formado pela presença de ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro (Nd<sub>2</sub>Fe<sub>14</sub>B) no arranjo de *Halbach* (HALBACH,

1980), com densidade de fluxo magnético de 1,34 T. O segundo aparato experimental (Figura 9B), foi formado por dois ímãs permanentes de  $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$  com dimensões de  $50 \times 50 \times 25$  mm, resultando em uma densidade de fluxo magnético de 0,7 T. A medição da densidade de fluxo magnético foi realizada com um transdutor de campo magnético (modelo TMAG-IT, Globalmag Ltda. Brasil).

Figura 9 - Campo magnético de  $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$  com densidade de fluxo magnético de (A) 1,34 T (B) 0,7 T.

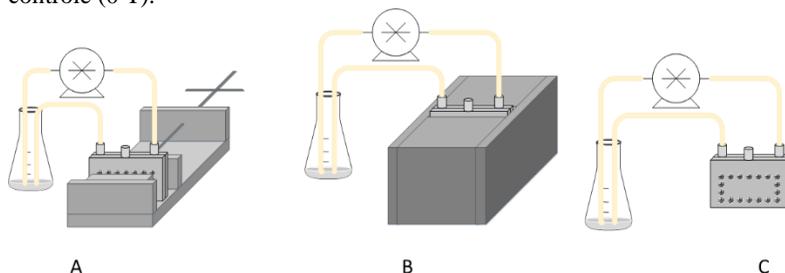


Fonte: Acervo do autor.

Os ensaios em campo magnético foram conduzidos de forma estática e com recirculação da solução enzimática, ambos a temperatura ambiente ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ). Na forma estática, as soluções contendo a enzima foram colocadas em pipetas de *Pasteur*, devidamente posicionadas no centro do campo magnético, com tempo de exposição fixo em 2 h. No sistema com recirculação, soluções enzimáticas foram expostas ao campo magnético com recirculação, onde variou-se o tempo de exposição junto com a intensidade de fluxo magnético. Em ambas as formas de exposição foram conduzidas amostras controle, onde a enzima foi mantida nas mesmas condições operacionais exceto pela ausência do campo magnético.

Para o sistema com recirculação (Figura 10), uma bomba de diafragma (SHURflo, modelo 8090-511-246), com vazão ajustada para  $0,06\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  foi utilizada e uma célula de aço inoxidável com área de  $0,0029\text{ m}^2$ , foi posicionada entre os ímãs permanentes. Para completar o volume morto do sistema, foi utilizado um tanque de alimentação de até 100 mL.

Figura 10 - Esquema do aparato experimental com recirculação de solução enzimática com densidade de fluxo magnético de (A) 0,7 T, (B) 1,34 T e (C) controle (0 T).



Fonte: Acervo do autor.

Foram utilizadas concentrações diferentes de acordo com a enzima utilizada. Essas concentrações foram pré-determinadas de forma a conseguir quantificar a atividade enzimática e as análises de conformação. A concentração da protease de *Bacillus* sp. e lipase NS-40116 foi mantida fixa para todos os ensaios em  $2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente.

Periodicamente, o sistema foi amostrado a fim de avaliar a influência do campo magnético na atividade enzimática. Os resultados referentes à atividade enzimática são expressos em porcentagem de atividade relativa à amostra controle e foram calculados utilizando a Equação (1):

$$\%AR = \frac{\textit{Atividade}_{\textit{amostra avaliada}}}{\textit{Atividade}_{\textit{amostra controle}}} \times 100 \% \quad \text{Equação (1)}$$

#### 4.2.1 Diálise e liofilização da lipase Eversa® Transform 2.0 (NS-40116)

A fim de promover a remoção de impurezas e estabilizantes do caldo enzimático, assim como promover a concentração do caldo enzimático, a enzima Eversa® Transform 2.0 foi dialisada em tampão fosfato de sódio  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 7,0, por 120 horas com trocas periódicas de tampão. Em seguida, a enzima foi congelada em ultra freezer a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , liofilizada por 48 horas (Liofilizador Liotop modelo L101n) e armazenada a temperatura de refrigeração de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4.2.2 Determinação da atividade enzimática

### 4.2.2.1 Lipase Eversa® Transform 2.0 (NS-40116)

A atividade enzimática da lipase NS-40116 foi mensurada pela metodologia descrita por Chiou; Wu (2004), com adaptações. Uma alíquota de 0,1 mL da solução enzimática ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi adicionada em uma mistura contendo 1 mL de  $\rho$ -NPP 0.5% (w/v em etanol) e 1 mL de tampão fosfato de sódio ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0), e incubados por 5 min a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Interrompeu-se a reação com a adição de 2 mL de hidróxido de sódio ( $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). O aumento da absorbância a 400 nm causado pela hidrólise do  $\rho$ -NPP e a formação de  $\rho$ -nitrofenol foi medido em espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240). O branco foi realizado na ausência de enzima, a amostra controle foi realizada na presença de enzima sem exposição ao campo magnético (0 T) e a amostra tratada foi realizada com a enzima que sofreu tratamento prévio com campo magnético. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a produção de  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de  $\rho$ -nitrofenol por minuto, sob condições experimentais.

### 4.2.2.2 Protease de *Bacillus* sp.

A determinação da atividade enzimática da protease de *Bacillus* sp. foi realizada através da adaptação da metodologia descrita por Santhi, (2014), utilizando caseína como substrato.

Para a solução de caseína foi necessário a preparação de uma solução contendo fosfato de sódio dibásico ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e hidróxido de sódio ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), na proporção de 20% e 3%, respectivamente, do volume final da solução de caseína. A quantidade de caseína necessária para a concentração de 1% (m/v, volume final da solução) foi acrescentada sob constante agitação na solução de fosfato e hidróxido de sódio até dissolver completamente. O pH dessa solução foi ajustado para 7,0 com adição de fosfato de potássio ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e o volume final foi ajustado com tampão fosfato ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0).

O meio reacional foi composto de 1 mL de solução enzimática ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) adicionada em 1 mL de caseína 1% (m/v, pH 7,0), mantido por 10 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) e armazenada em temperatura ambiente por 30 min, seguida de centrifugação (10000 rpm por 10 min). O sobrenadante foi examinado por espectrometria (Shimadzu UVmini-1240) em 275 nm comparado com uma curva padrão de tirosina. Uma

unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto, sob condições experimentais.

#### **4.2.3 Avaliação da atividade enzimática com o tempo**

Visando avaliar a capacidade da enzima em manter a alteração da atividade provocada pelo campo magnético, na melhor condição encontrada nos experimentos realizados, as amostras foram mantidas sob temperatura de refrigeração (4 °C) e em intervalos definidos de tempo, alíquotas foram retiradas e quantificadas em relação à atividade de hidrólise de  $p\text{-NPP}$  (conforme item 4.2.2.1).

#### **4.2.4 Espectrometria de massas (MALDI-TOF)**

A massa molar da lipase controle em tampão e água ultrapura foi determinada por MALDI-TOF-MS (espectrometria de massas de tempo de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voe). Cada amostra (1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  em água ou tampão PBS, 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi misturada com uma matriz ionizante composta de ácido sinapínico 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , acetonitrila 70% (v/v), ácido trifluoroacético 0,1% (v/v), na proporção 1:3 (amostra: matriz (v/v)). Em seguida, o volume de 1  $\mu\text{L}$  desta mistura foi aplicado em duplicata sobre a placa alvo de aço polido MALDI. As amostras foram analisadas no equipamento AutoFlex III Smartbeam (Bruker Daltonics GmbH – Bremen) modo de detecção linear positivo com acúmulo de 2500 disparos e intensidade de laser de 30%. Os dados foram processados usando FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonic GmbH – Bremen).

#### **4.2.5 Ensaios de dicroísmo circular (DC) e estabilidade térmica ( $T_m$ )**

Dicroísmo Circular (DC) foi utilizado para determinar a estrutura secundária da enzima. É uma forma de espectroscopia de absorção de luz que mensura a diferença de absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda. Para tanto, a solução de enzima previamente exposta ao campo magnético foi utilizada para analisar a integridade das estruturas secundárias e monitorar as possíveis mudanças conformacionais induzidas devido ao fluxo magnético.

Os espectros de DC foram tomados a 25 °C, utilizando um espectropolarímetro de Dicroísmo Circular (Jasco modelo J-815) com

acessório de Peltier PDF-425S/15. Utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 mm de caminho óptico, os dados foram mensurados na faixa de comprimento de onda UV (250 - 190 nm), com intervalo de comprimento de onda de 1,0 nm, resolução de 0,5 nm, D.I.T de 8 segundos e velocidade de varredura de 50 nm.min<sup>-1</sup>, com o acúmulo de 3 varreduras para cada amostra.

As amostras foram analisadas na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> (tampão PBS 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0), nas condições: controle (sem campo e com recirculação), e recirculação com exposição ao campo magnético (densidade de fluxo magnético de 0,7 e 1,34 T). As contribuições do tampão obtidos sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros foram corrigidos a fim de eliminar qualquer efeito de ruído. A análise dos dados foi realizada usando o programa K2D3 Server, conforme descrito por Louis-Jeune; Andrade-Navarro; Perez-Iratxeta (2012), os resultados foram expressos em termos de conteúdo de  $\alpha$ -hélice (%) e  $\beta$ -folhas (%).

Os dados de estabilidade térmica foram coletados no comprimento de onda de 222 nm com aumento de temperatura de 1 °C.min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de 55 até 100 °C.

#### **4.2.6 Espectroscopia de fluorescência**

Os espectros de fluorescência foram obtidos usando um espectrofluorímetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies) utilizando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm. As amostras controle e tratadas em concentração de 5 g.L<sup>-1</sup> (tampão PBS pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>), foram excitadas no comprimento de onda de 270 nm e a emissão de fluorescência foi acompanhada entre 275 a 450 nm, à temperatura de 25 °C. A abertura da fenda foi de 20 nm, que compreende a quantidade de luz que atingirá a amostra. A velocidade de varredura foi de 600 nm.min<sup>-1</sup> e intervalo de coleta de dados de 1,0 nm.

A intensidade de fluorescência e a emissão máxima foram determinadas de acordo com o pico dos espectros de emissão. Todas as análises foram feitas através de 3 varreduras. As contribuições do tampão obtidas nas mesmas condições foram descontadas de todos os espectros, para corrigir e eliminar qualquer efeito de ruído

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho. Primeiramente, os resultados obtidos para a Protease de *Bacillus* sp., e depois para a lipase Eversa® Transform 2.0 (NS-40116). Resultando na determinação da enzima a ser estudada, tempo, pH e forma de exposição ao campo magnético, bem como a avaliação da atividade e estabilidade da lipase NS-40116 livre antes e após exposição ao campo magnético. Ainda, serão relacionados os resultados sobre as modificações de conformação estrutural da enzima.

### 5.1 PROTEASE DE *Bacillus* sp.

#### 5.1.1 Influência da exposição estática ao campo magnético na atividade enzimática

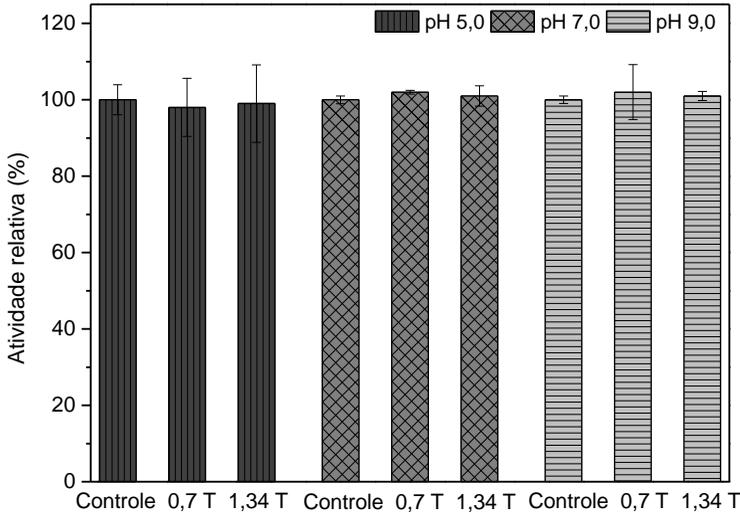
Para avaliar a influência da exposição ao campo magnético de forma estática na atividade enzimática, a protease de *Bacillus* sp. foi diluída ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) em diferentes tampões  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  (acetato pH 5,0, fosfato pH 7,0 e Tris-cloridrato pH 9,0), então 2 mL dessas soluções foram expostas ao campo magnético de 0,7 T e 1,34 T, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por um tempo fixo de 2 horas. Paralelamente, a amostra controle não foi exposta ao campo magnético (densidade de fluxo magnético de 0 T).

Os resultados da exposição de forma estática na atividade da protease são apresentados na Figura 11. É possível perceber que não houve diferença na atividade enzimática em relação ao controle, independente da densidade de fluxo magnético utilizada e o pH da solução enzimática. A atividade enzimática apresentada pelas amostras controle foram de  $0,014 \pm 0,04$ ,  $0,280 \pm 0,01$  e  $0,293 \pm 0,01 \text{ U/mg}$  de enzima, para pH 5,0, 7,0 e 9,0, respectivamente. Em relação a atividade em pH 5, pode-se concluir que este afetou de forma negativa a atividade independente da exposição ou não ao campo magnético, sendo, portanto, a protease de *Bacillus* sp. uma protease alcalina.

Esses resultados são condizentes com o estudo feito por Rabinovitch; Maling; Weissbluth (1967), onde a reatividade da tripsina foi testada em campo magnético de 22 T, por até 20 min e não foi observado diferença quando comparado com a amostra sem tratamento com campo magnético. Ainda, os autores relataram não haver variação na quantidade de produto formada, em comparação com a amostra controle; sugerindo que um gradiente de campo possibilitaria uma

mudança na frequência de colisão entre a enzima e o substrato, se o gradiente afetasse a distribuição normal das energias das moléculas.

Figura 11 - Atividade relativa da Protease de *Bacillus* sp. tratada com campo magnético por 2 h, em modo estático, 25 °C em diferentes valores de pH.



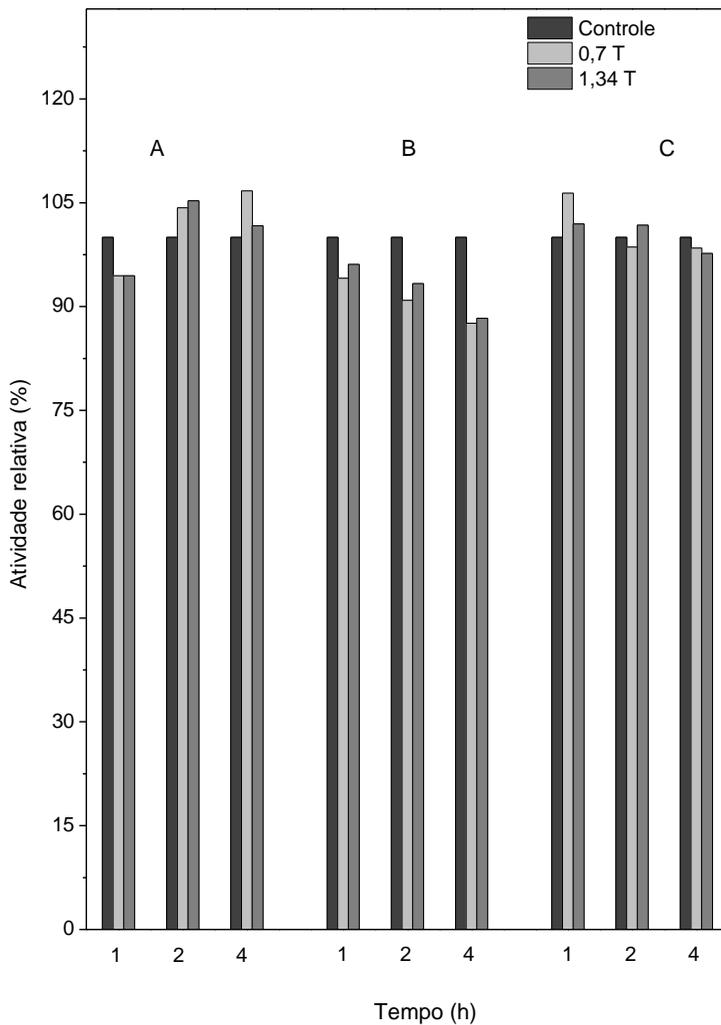
Fonte: Acervo do Autor.

### 5.1.2 Influência da exposição ao campo magnético com recirculação e do tempo de exposição na atividade enzimática

Para avaliação da influência da recirculação e do tempo de exposição, foram utilizados 100 mL da solução enzimática para preencher o volume morto do sistema. O pH das soluções foi avaliado em 5,0, 7,0 e 9,0. Para esse sistema, a influência do tempo de exposição ao campo magnético foi avaliada em 1, 2 e 4 horas de recirculação. Afim de evitar qualquer interferência do sistema utilizado, o controle foi realizado com recirculação de solução enzimática, porém, sem exposição do módulo ao campo magnético (0 T).

Os resultados com recirculação da solução enzimática da protease estão na Figura 12, com os respectivos valores de atividade controle apresentados na Tabela 2.

Figura 12 - Atividade relativa da protease de *Bacillus* sp. em função do tempo e campo magnético, em tampão (A) pH 5,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 9,0.



Fonte: Acervo do Autor.

Tabela 2 - Atividade das amostras controle da Protease de *Bacillus* sp. em diferentes valores de pH e tempo de recirculação.

<b>Tempo de recirculação (h)</b>	<b>Atividade* controle pH 5,0</b>	<b>Atividade* controle pH 7,0</b>	<b>Atividade* controle pH 9,0</b>
1	0,129	0,261	0,275
2	0,106	0,242	0,237
4	0,091	0,237	0,222

\*Atividade expressa em U/mg de enzima.

Fonte: Acervo do Autor.

Para o pH 5 (Figura 12A) não foi observado variação da atividade da protease em função do tempo de recirculação/exposição ao campo magnético. Após 1 h de recirculação, a atividade reduziu em aproximadamente 5% para os campos magnéticos de 0,7 e 1,34 T. Após 2 h de recirculação, a atividade teve um leve incremento de aproximadamente 4 e 5%, com campo magnético de 0,7 e 1,34 T, respectivamente. Em 4 h de recirculação, a atividade enzimática aumentou 6 e 1% em relação ao controle, quando exposta ao campo magnético de 0,7 e 1,34 T, respectivamente.

Em relação à atividade proteolítica antes da exposição utilizando o sistema de recirculação, foi observado uma redução na atividade ao longo do tempo de 80, 66 e 57% para 1, 2 e 4 horas de recirculação, sendo que essa redução também foi observada para a amostra sem recirculação. Assim, foi possível concluir, que o pH afetou de forma negativa a atividade da protease de *Bacillus* sp.

Para o pH de 7,0 (Figura 12B), quando exposto ao campo magnético de média intensidade (0,7 T) houve uma redução de aproximadamente 6, 10 e 13%, respectivamente para 1, 2 e 4 horas de exposição. Para a amostra submetida ao campo de alta intensidade (1,34 T) também foi observada redução da atividade frente ao controle, de aproximadamente 4, 7 e 12%, respectivamente após 1, 2 e 4 horas de recirculação. Por outro lado, a amostra controle, manteve sua atividade por 2 horas, e após 4 horas de recirculação apresentou redução de 22% da atividade inicial.

A enzima diluída em pH 9,0 (Figura 12C) não apresentou influência ao campo magnético de alta intensidade (1,34 T). Após 1 e 2 h de exposição, a atividade foi aproximadamente 2% superior ao controle. Enquanto que após 4 horas, a atividade resultante foi de aproximadamente 2% inferior a amostra controle. Já com exposição ao campo de intensidade moderada (0,7 T), após 1 h de recirculação a atividade foi 6% superior ao controle. Enquanto que após 2 e 4 h a atividade foi 2% inferior ao controle. A atividade da amostra controle

foi constante nas primeiras duas horas de recirculação e após 4 horas, a atividade reduziu aproximadamente 15% em relação a atividade inicial. A redução com 4 horas de recirculação para a amostra controle, pode ser um indicativo que o sistema utilizado pode afetar a atividade proteolítica da enzima a partir de 2 h de recirculação, causando alguma mudança na atividade.

A não influência do campo magnético na atividade proteolítica encontrada nesse estudo, condiz com relatos na literatura. Rabinovitch; Maling; Weissbluth (1967) examinaram o efeito do condicionamento da enzima tripsina em um campo magnético de 22 T, como pré-tratamento enzimático e nenhum efeito na atividade foi observado quando comparadas as soluções pré-tratadas com as amostras controle. Amara et al. (2007) investigaram o efeito da exposição do campo magnético (250 mT) na atividade de enzimas antioxidantes (catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase), e concluíram que a exposição por até 3 horas não causou estresse oxidativos nas enzimas avaliadas.

## 5.2 LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0

### 5.2.1 Espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS)

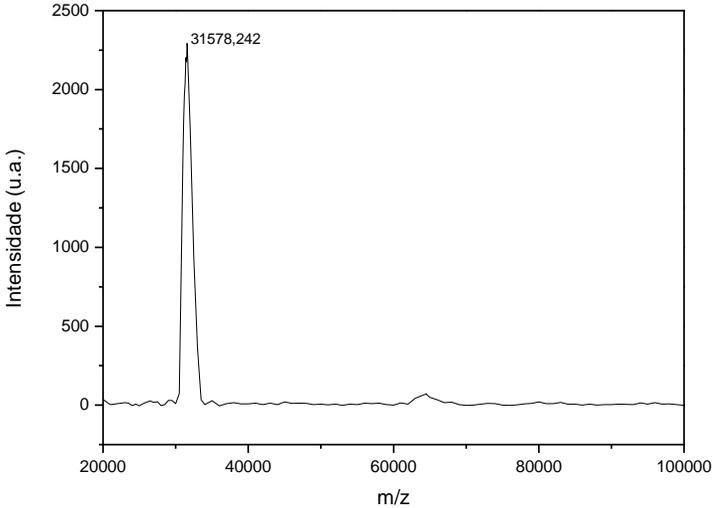
Com o objetivo de determinar a massa molar total da proteína após diálise e liofilização, amostras dessa enzima foram submetidas à análise por espectrometria de massas. Na Figura 13 é apresentado o resultado da análise em MALDI-TOF-MS demonstrando a identificação de um pico em 31,578 m/z correspondente a massa molar da proteína (31,579 kDa).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* possui 269 resíduos de aminoácidos na sua sequência primária, sendo quatro deles triptofano (89, 117, 221 e 260) (Gonçalves et al., 2014). A massa molar dessa lipase é de aproximadamente 30 kDa e é mono-glicosilada em Asn33 (asparagina), adicionando aproximadamente 2 kDa a massa molar final da enzima (Pinholt et al., 2010).

Dessa forma, o resultado da espectrometria de massas sugere que a NS-40116 após diálise e liofilização, é uma TLL monoglicosilada em Asp33, tem uma modificação pós traducional do tipo glicosilação em um resíduo de aminoácido, o que corrobora com estudos anteriores. Gonçalves et al. (2014) observaram um sinal amplo em cerca de 31,5 kDa, para íon monocarregado, compatível com a forma monoglicosilada em Asn33, quando investigaram a conformação da TLL em solução.

Pinholt et al. (2010) determinaram a massa molar da TLL não-glicosilada de 29,343 kDa (teórica), penta-glicosilada de 40,906 kDa e para a monoglicosilada de 31,708 kDa.

Figura 13 - Espectro de massa da enzima Eversa® Transform 2.0 (1 g.L<sup>-1</sup> em água ultrapura).



Fonte: Acervo do Autor.

### 5.2.2 Influência da exposição estática ao campo magnético na atividade enzimática

A fim de avaliar a influência da exposição ao campo magnético de forma estática na atividade enzimática, foram realizados esses ensaios. Para tanto, a lipase Eversa® Transform 2.0 (NS-40116) foi diluída (5 g.L<sup>-1</sup>) em diferentes tampões 50 mmol.L<sup>-1</sup> (acetato pH 5,0, fosfato pH 7,0 e Tris-cloridrato pH 9,0), então 2 mL dessas soluções foram expostas ao campo magnético de 0,7 T e 1,34 T, a 25 °C por um tempo fixo de 2 horas. Paralelamente, a amostra controle não foi exposta ao campo magnético (densidade de fluxo magnético de 0 T).

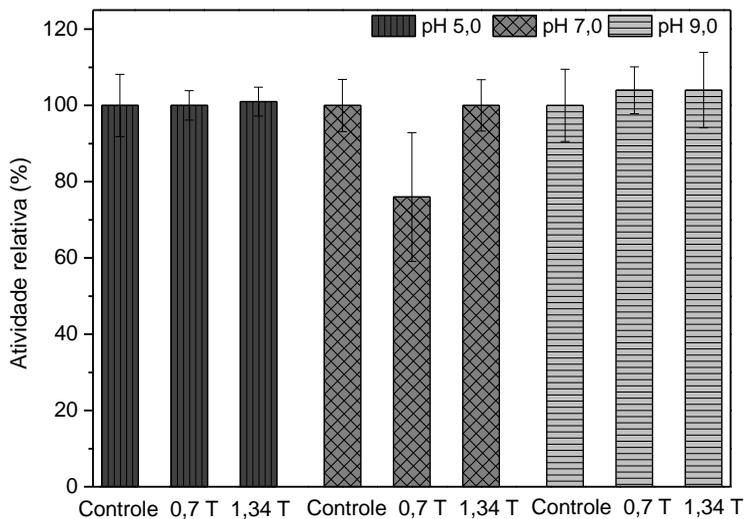
Os resultados da lipase são apresentados na Figura 14, onde é observado que esta enzima não sofreu influência do campo magnético em comparação com a amostra controle (0 T), com exceção de quando exposta ao campo magnético de 0,7 T e pH 7,0, o qual teve um efeito negativo. As amostras controle apresentaram atividades de  $0,746 \pm 0,082$ ,

0,690±0,066 e 0,842±0,024 U/mg de enzima, para pH 5,0, 7,0 e 9,0, respectivamente.

Essa redução na atividade da lipase de 24% corrobora com os estudos realizados por Morelli et al. (2005), onde diferentes enzimas foram expostas a um campo magnético de 2,5 mT. Os autores reportaram a redução na atividade enzimática da fosfatase alcalina (54%), acetilcolinesterase (58%) e da fosfoglicerato-quinase (61%), independentemente do tempo de exposição, sugerindo que a ação do campo pode alterar a enzima para um estado de atividade reduzida, independente da amplitude do campo, pelo menos entre os valores de 240  $\mu$ T a 2,5 mT e a atividade total é restaurada quando a enzima é removida do campo.

Rochalska; Grabowska (2007) trataram sementes de trigo com campo magnético de baixa frequência (16 Hz e 5 mT) por 2 h, após o 13º dia de exposição foram observadas reduções nas atividades das  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilase de 21,7, 40,5% e, 3 e 8,7%, respectivamente. Segundo esses autores, uma explicação para esse resultado seria a influência do campo magnético no metabolismo hormonal de sementes e sementes germinadas, uma vez que a atividade da amilase está relacionada com esse metabolismo.

Figura 14 - Atividade relativa da enzima Eversa® Transform 2.0 tratada com campo magnético por 2 h, em modo estático, 25 °C em diferentes valores de pH.



Fonte: Acervo do Autor.

Ao comparar os resultados, foi possível observar que mesmo com a variação do pH, não houve diferença na atividade enzimática de ambas as enzimas avaliadas, independente da densidade de fluxo magnético utilizada e o pH da solução enzimática. De acordo com Albuquerque et al. (2016), o efeito da exposição ao campo magnético, o tempo e a forma de exposição, bem como densidade de fluxo magnético afetam de forma diferente cada tipo de amostra. Dessa forma, foi utilizado outro sistema de exposição ao campo magnético para avaliar se a forma de exposição concomitante com a densidade de fluxo magnético pode afetar as enzimas estudadas.

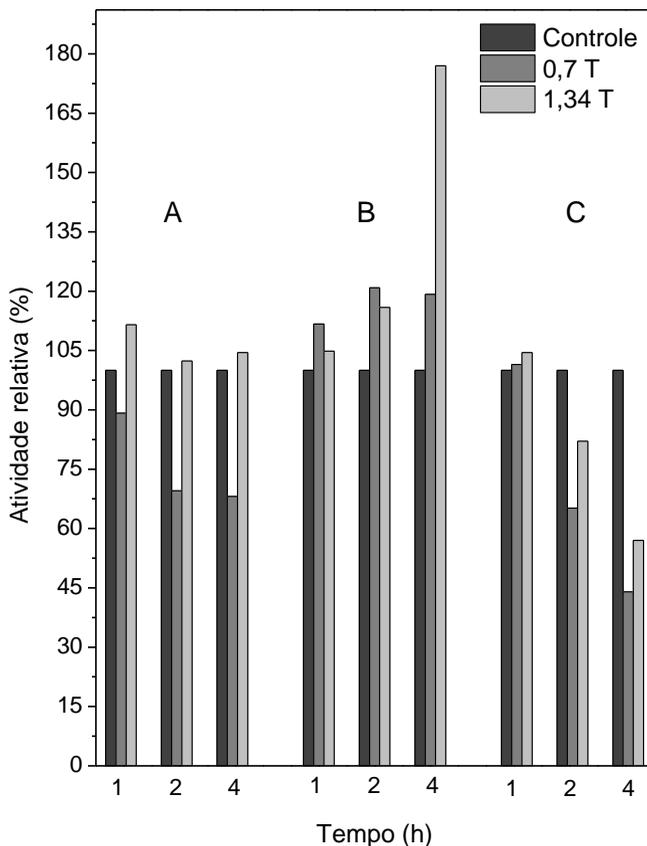
### **5.2.3 Influência da exposição ao campo magnético com recirculação e do tempo de exposição na atividade enzimática**

Para avaliação da influência da recirculação e do tempo de exposição, foram utilizados 100 mL da solução enzimática para preencher o volume morto do sistema. O pH das soluções foi avaliado em 5,0, 7,0 e 9,0. Para esse sistema, a influência do tempo de exposição ao campo magnético foi avaliada em 1, 2 e 4 horas de recirculação. Afim de evitar qualquer interferência do sistema utilizado, o controle foi realizado com recirculação de solução enzimática, porém, sem exposição do módulo ao campo magnético (0 T).

Em relação aos resultados para os experimentos com recirculação da solução enzimática de Eversa® Transform 2.0 (NS-40116) em diferentes valores de pH, a atividade enzimática em pH 5,0 (Figura 15A) exposta ao campo magnético de 0,7 T teve redução de sua atividade em todos os tempos de recirculação de 7, 31 e 32%, após 1, 2 e 4 h, respectivamente. Enquanto que para o campo magnético de 1,34 T a atividade foi superior ao controle em aproximadamente 16, 2 e 4% após 1, 2 e 4 h de exposição, respectivamente.

Da mesma forma, os resultados da atividade da enzima NS-40116 quando em pH 7,0 (Figura 15B), mostram que a enzima sofreu influência do campo magnético de forma positiva. Com a densidade de fluxo magnético de 0,7 T, a atividade foi superior ao controle em aproximadamente 11, 20 e 20% para 1, 2 e 4 h, respectivamente. Quando exposta ao campo de alta densidade (1,34 T), a atividade da enzima foi superior ao controle em cerca de 4, 16 e 77% para os tempos de 1, 2 e 4 h, respectivamente.

Figura 15 - Atividade relativa em função do tempo e campo magnético para a lipase NS-40116 em (A) pH 5,0, (B) pH 7,0 e (C) pH 9,0.



Fonte: Acervo do Autor.

Por outro lado, quando em pH 9,0 (Figura 15C), a influência do campo magnético foi negativa para 2 e 4 h de exposição com redução da atividade em aproximadamente 35 e 56% com o campo de 0,7 T, e de aproximadamente 18 e 43%, respectivamente para cada tempo. Após 1 h de ensaio, a atividade aumentou 1% comparada ao controle com campo magnético de 0,7 T e aumento de 4% quando comparada ao controle 1,34 T. Os respectivos valores de atividade enzimática das amostras controle são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade das amostras controle de lipase, em diferentes valores de pH e tempo de recirculação.

<b>Tempo de recirculação (h)</b>	<b>Atividade* controle pH 5,0</b>	<b>Atividade* controle pH 7,0</b>	<b>Atividade* controle pH 9,0</b>
1	0,577	0,521	0,982
2	0,825	0,581	0,684
4	0,760	0,572	1,068

\*Atividade expressa em U/mg de enzima.

Fonte: Acervo do Autor.

Dessa forma, o maior efeito do campo magnético ocorreu para a lipase NS-40116 em pH 7,0, com recirculação de solução enzimática. Tais resultados podem estar relacionados com a estrutura e estabilidade da enzima quando em solução tampão, bem como a diferença de exposição ao campo magnético, visto que quando exposta de forma estática, não foram obtidos os mesmos resultados. Ou seja, a forma de exposição da solução enzimática ao campo magnético, de fato, interfere no efeito causado por ele. O aumento da atividade enzimática corrobora com estudo reportado por Prando et al. (2017), onde os autores avaliaram os efeitos de campos magnéticos permanentes na atividade enzimática da lisozima da clara de ovo e as condições operacionais resultando em um incremento de 3 vezes na atividade enzimática em comparação com a atividade inicial e 56% em comparação com a amostra controle (sem exposição ao campo magnético), em pH 13, 1,34 T e força iônica de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl.

No estudo realizado por Atak et al. (2007), a atividade da peroxidase aumentou significativamente com o tratamento de campo magnético de 2,9 e 4,5 mT após 2,2 e 19,8 segundos de exposição de brotações regeneradas a partir de culturas de tecido de soja. No estudo de Yavuz; Çelebi (2000), o efeito do campo magnético na atividade do lodo ativado no tratamento de águas residuais sintética foi 44% superior na remoção de glicose quando exposto ao campo magnético de 17,8 mT do que no observado no controle (sem exposição ao campo magnético). Asadi Samani; Pourakbar; Azimi (2013) investigaram o efeito da exposição de sementes de cominho em campos magnéticos de 25, 50 e 75 mT por 15, 30 e 60 minutos, as atividades de  $\alpha$ -amilase, desidrogenase e protease foram significativamente maiores nas sementes tratadas. Com campo magnético de 10 mT em 24 h de exposição, Gemishev et al. (2009) também relataram o aumento de 27% na atividade da endoglucanase.

A partir dos resultados apresentados nesta etapa do trabalho, as caracterizações foram realizadas apenas para a lipase NS-40116 em pH

7,0 com e sem exposição ao campo magnético por 4 h no sistema com recirculação. A análise de fluorescência também foi realizada para a condição de pH 7,0 sem recirculação, a qual apresentou efeito negativo quando submetida ao campo de 0,7 T. Vale a pena ressaltar que os resultados aqui apresentados não avaliaram o pH no qual foi obtido a maior atividade enzimática, mas sim aquele cujo o efeito causado pela exposição ao campo magnético foi maior. Convém ressaltar ainda que, os resultados obtidos são restritos aos sistemas estudados, devendo-se evitar generalizações no que diz respeito às variações experimentais, como pH, densidade de fluxo magnético e tempo de exposição.

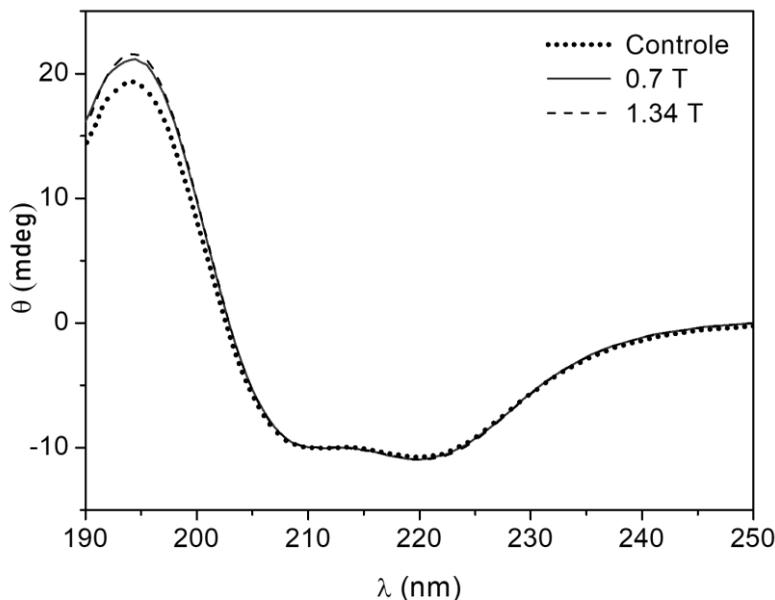
#### **5.2.4 Dicroísmo circular**

O dicroísmo circular (DC) é um método bem estabelecido, amplamente utilizado para estudar as conformações de proteínas em solução e as possíveis mudanças na estrutura secundária dessas proteínas: estruturas  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha, barril- $\beta$ , desordenada e outras (MILES; WALLACE, 2016; WHITMORE; WALLACE, 2008). Assim, com o objetivo de verificar as possíveis alterações na estrutura secundária da NS-40116 causadas pela exposição ao campo magnético, a solução enzimática foi analisada por DC e seus espectros comparados com a amostra controle.

A Figura 16 apresenta os espectros de DC para a lipase NS-40116 controle (sem exposição ao campo magnético) e exposta aos campos magnéticos de 0,7 e 1,34 T após 4 horas de recirculação em tampão pH 7,0. Os espectros de DC para todos os ensaios mostraram duas bandas negativas características da estrutura  $\alpha$ -hélice, em 208 e em 220 nm além da banda positiva em 193 nm (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Os dados de DC das amostras da enzima NS-40116 expostas a campos magnéticos revelaram que a enzima preservou o envelhecimento próximo ao inicial, confirmado pela semelhança entre os espectros obtidos. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinholt et al. (2010), onde os autores analisaram os espectros de DC da enzima *TLL* não-glicosilada, penta-glicosilada e monoglicosilada, resultando em espectros semelhantes aos encontrados para as enzima em condição controle.

Figura 16 - Espectros de dicroísmo circular da lipase NS-40116 controle e exposta ao campo magnético de 0,7 e 1,34 T por 4 h com recirculação em pH 7,0 a 25 °C.



Fonte: Acervo do Autor.

A partir das elipticidades molares, foram calculadas as porcentagens de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha da lipase NS-40116, confirmando o conteúdo de estrutura  $\alpha$ -helicoidal (Tabela 4), o qual apresentou poucas alterações com a exposição ao campo magnético. Esses valores foram obtidos através do programa online K2D3 (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2012).

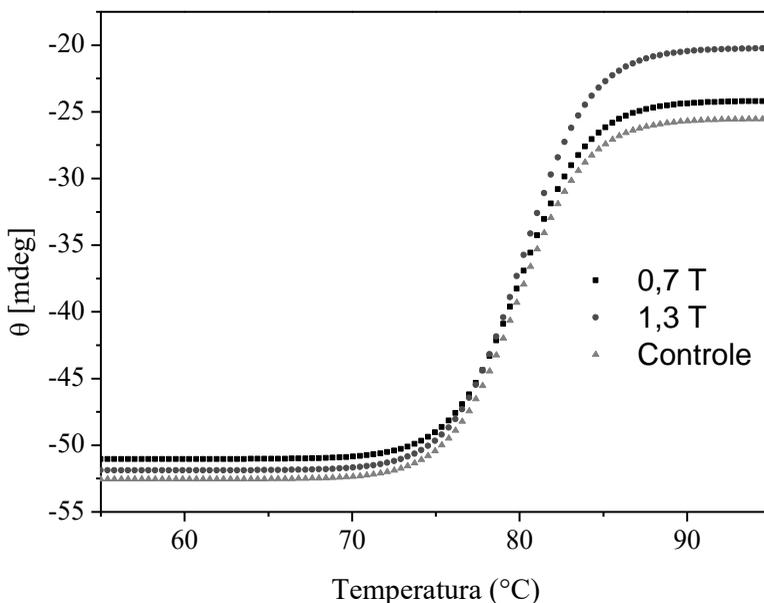
Tabela 4 - Elementos de estrutura secundária e temperatura de desnaturação da NS-40116 controle e após exposição ao campo magnético.

Densidade de fluxo magnético (T)	$\alpha$ -Hélice (%)	$\beta$ -Folha (%)	$T_m$ (°C)
0 (controle)	79,26	2,04	79,91
0,7	81,09	2,11	$80,03 \pm 0,084$
1,34	81,12	2,11	80,15

Fonte: Acervo do Autor.

A análise de estabilidade térmica teve como objetivo determinar a temperatura de desnaturação (*melting temperature* -  $T_m$ ) da lipase NS-40116 e se a mesma apresentou modificações após tratamento com campo magnético, conforme apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Efeito do aquecimento sobre a estrutura da NS-40116 controle e exposta ao campo magnético de 0,7 T e 1,3 T por 4 horas com recirculação, pH 7,0 a 25 °C.



Fonte: Acervo do Autor.

Foi observado que a partir de 75 °C, a enzima NS-40116 iniciou uma perda da sua estrutura natural. Ainda, é possível concluir que a temperatura de desnaturação foi semelhante para todas as condições de tratamento avaliadas nesta etapa. Assim, a exposição ao campo magnético não alterou a  $T_m$  da enzima utilizada neste estudo, conforme mostrado na Tabela 4, através do cálculo de ajuste não linear por *Boltzmann*.

### 5.2.5 Espectroscopia de fluorescência

Os resíduos de triptofano (Trp) presentes na estrutura da lipase NS-40116 foram monitorados pela espectrometria de emissão de

fluorescência com o objetivo de explicar e confirmar as alterações na estrutura terciária da enzima exposta em diferentes intensidades de campo magnético, na região próxima ao sítio ativo em decorrência da presença do Trp89.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* possui quatro triptofanos residuais (Trp89, Trp117, Trp221 e Trp260), sendo que 60% da fluorescência intrínseca dessa lipase é proveniente de um único resíduo de triptofano, o Trp89 (GONÇALVES et al., 2014; JUTILA et al., 2004; SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2017), localizado próximo ao sítio ativo da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A intensidade de emissão está relacionada com a conformação da proteína e de acordo com a intensidade de fluorescência é observado se os resíduos de triptofano internos estão mais expostos ou escondidos (LOPES et al., 2015).

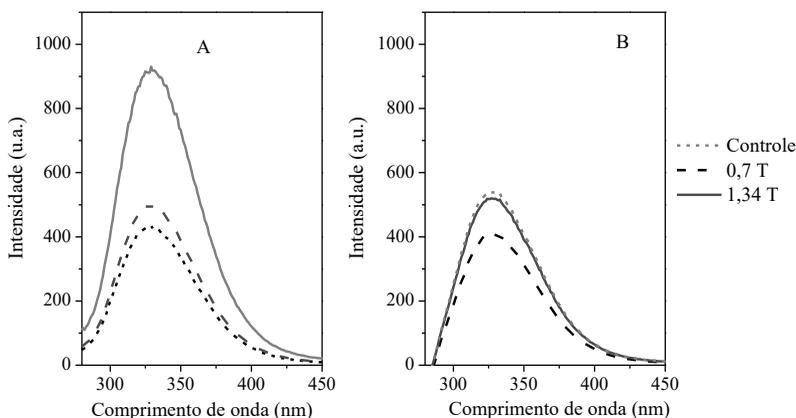
As alterações na estrutura terciária da lipase NS-40116 exposta ao campo magnético podem ser observadas nos espectros da Figura 18. Como observado na Figura 18B, condição de 2 h de exposição de forma estática ao campo em pH 7,0, percebe-se a diminuição da intensidade de fluorescência emitida para o campo de 0,7 T (que apresentou diminuição da atividade enzimática de 24% em relação ao controle). Na Figura 18A, ocorreu um aumento na intensidade de emissão de fluorescência quando a enzima foi exposta ao campo magnético com recirculação de solução enzimática, sendo mais intenso quando em fluxo magnético de 1,34 T. Isso sugere uma maior exposição dos triptofanos, inclusive aqueles mais internalizados, podendo ainda ser um indicativo de incremento da exposição de outros resíduos na solução e conseqüentemente o desnovelamento da proteína. O incremento da emissão de fluorescência também foi observado quando a enzima foi exposta ao campo de média densidade (0,7 T), porém de forma mais moderada.

Lembrando que para essas condições experimentais, a atividade enzimática foi 20 e 77% superior ao controle para os campos de densidade de fluxo magnético de 0,7 e 1,34 T, respectivamente (Figura 15B). Dessa forma, pode-se sugerir que a exposição ao campo magnético pode ter permitido mudança na estrutura terciária da lipase em estudo, permitindo uma configuração mais favorável ao acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, o que resulta em maior atividade enzimática.

Ainda, é possível concluir que não houve alteração no comprimento de onda de emissão máximo em todas as condições experimentais (328 nm). Os estudos de Lopes et al. (2015) corroboram com os resultados aqui encontrados, indicando que não ocorreram

mudanças na polaridade do ambiente ao redor do sítio ativo da enzima. Os autores ainda observaram que os menores valores de intensidade de fluorescência foram encontrados para os menores valores de atividade enzimática. Este resultado também foi observado no presente estudo.

Figura 18 - Espectros de emissão de fluorescência para a lipase Eversa® Transform 2.0 controle (0 T) e com campo magnético de 0,7 T e 1,34T, em pH 7, por (A) 4 horas com recirculação e (B) por 2 h de forma estática.



Fonte: Acervo do Autor.

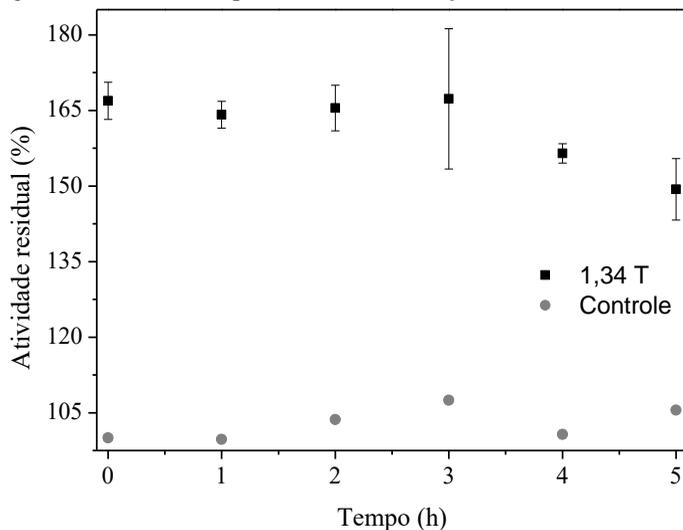
Resultados semelhantes foram relatados por Sackett; Bhattacharyya; Wolff, (1994), onde mudanças na intensidade de emissão de fluorescência sem deslocamentos dos espectros de emissão foram observados, indicando transição de desnovelamento da enzima, afetando predominantemente a intensidade máxima de fluorescência.

### 5.3 ESTABILIDADE DA ENZIMA COM O TEMPO

Com o intuito de verificar a manutenção da atividade enzimática residual com o tempo, as amostras após tratamento obtidas nas melhores condições experimentais foram monitoradas por 5 horas em temperatura de refrigeração (4 °C).

A partir da Figura 19, se observou que a enzima tratada por campo magnético de alta densidade (1,34 T) reduziu a atividade ao passar do tempo de armazenagem, sendo a queda mais perceptível após 3 horas de armazenamento. Tais resultados são de grande relevância, uma vez que foi possível confirmar a memória magnética remanescente sob refrigeração.

Figura 19 - Estabilidade da Eversa® Transform 2.0 após exposição ao campo magnético de 1,34 T em pH 7,0 com recirculação a 25 °C.



Fonte: Acervo do Autor.

Neste contexto, o tratamento da lipase NS-40116 com campo magnético de alta densidade poderia ser empregado como uma etapa de ativação da enzima previamente ao início da reação. Entretanto, a exposição ao campo magnético como tratamento enzimático mostrou ser um processo caracteristicamente reversível, assim, a enzima tende a voltar a sua conformação inicial com o tempo.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizados estudos para avaliar a influência do campo magnético permanente na atividade enzimática da lipase Eversa® Transform 2.0 (NS-40116) e protease de *Bacillus* sp., com o intuito de fornecer informações a respeito das alterações enzimáticas causada pela exposição ao campo.

Tanto a variável pH como a densidade de fluxo magnético mostraram influenciar a atividade residual das enzimas lipase NS-40116 e protease de *Bacillus* sp., sendo o maior incremento da atividade residual para a NS-40116 (77%), com exposição ao campo magnético de 1,34 T, com recirculação da solução enzimática por 4 h em pH 7,0.

A análise de espectrometria de massa revelou que a lipase NS-40116 possui massa molar de aproximadamente 31,578 kDa, sugerindo ser uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* monoglicosilada em Asp33.

As análises conformacionais da enzima tratada mostraram que ocorreram modificações na estrutura terciária quando comparada com a amostra controle, os dados de fluorescência mostraram grande exposição dos resíduos de triptofanos para a melhor condição estudada. Quanto a estrutura secundária, pouca modificação no conteúdo  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha foi observada.

A avaliação da atividade de armazenamento em temperatura de refrigeração (4 °C) da NS-40116 na melhor condição de exposição ao campo magnético (com recirculação, pH 7,0 por 4 h) mostrou que no campo magnético de alta densidade (1,34 T) a enzima possui memória magnética, mantendo a atividade residual acima de 100% após 5 h a 4 °C, quando comparada com a amostra controle (sem tratamento).

O presente trabalho apresentou resultados promissores para o desenvolvimento de novas aplicações e/ou processos de catálise enzimática em reações de interesse, devido à carência de resultados na literatura sobre o comportamento de enzimas expostas a campos magnéticos e, principalmente, a utilização de uma enzima comercial não caracterizada na literatura. Além disso, esta pesquisa revelou que diversos fatores, como pH, a densidade do fluxo magnético, tempo e forma de exposição ao campo magnético, influenciam a atividade da enzima.



## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- ALBUQUERQUE, W. et al. Static magnetic field effects on proteases with fibrinolytic activity produced by *Mucor subtilissimus*. **Bioelectromagnetics**, v. 38, n. 2, p. 109–120, fev. 2017.
- 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, S. et al. Influence of a static magnetic field (250 mT) on the antioxidant response and DNA integrity in THP1 cells. **Physics in Medicine and Biology**, v. 52, n. 4, p. 889–898, 2007.
- ANTCZAK, U. et al. Enzymatic lactonization of 15-hydroxypentadecanoic and 16-hydroxyhexadecanoic acids to macrocyclic lactones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 7, p. 589–593, 1991.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 175–183, 1998.
- ASADI SAMANI, M.; POURAKBAR, L.; AZIMI, N. Magnetic field effects on seed germination and activities of some enzymes in cumin. **Life Science Journal**, v. 10, n. 1, p.323–328, 2013.
- 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.
- BOUTUREIRA, O.; BERNARDES, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 5, p. 2174–2195, 2015.
- BROCKMAN, H. L.; MOMSEN, W. E.; TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes: Properties and effects on lipase binding to surfaces. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 6, p. 891–896, 1988.

BÜYÜKUSLU, N.; ÇELİK, Ö.; ATAK, Ç. The effect of magnetic field on the activity of superoxide dismutase. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 5, n. 1973, p. 57–62, 2006.

CHEN, B. et al. Synthesis of mesoporous silica with different pore sizes for cellulase immobilization: Pure physical adsorption. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 17, p. 9338–9345, 2017.

CHEN, S.; TSAO, M. L. Genetic incorporation of a 2-naphthol group into proteins for site-specific azo coupling. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 1645–1649, 2013.

CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v. 37, n. 28, p. 9976–9982, 1998.

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

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.

DE SOUZA MELCHIORI, M. et al. Effect of compressed fluids on the enzymatic activity and structure of lysozyme. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. July, p. 125–132, 2017.

ENGELEN, S. Section of Statistics Automatically Identifying Scatter in Fluorescence Data Using Robust Techniques. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, n 1, v. 86, p.35-51, 2007.

FEDATTO, L. M. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira. **Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo**, p. 70, 2004.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

FERREIRA-DIAS, S. et al. The potential use of lipases in the

production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 2013.

GEMISHEV, O. et al. Effect of static magnetic field on synthesis of endoglucanase by *Trichoderma reesei*—m7. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 23, p. 848–851, 2009.

GHISAIDOOBE, A.; CHUNG, S. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22518–22538, 2014.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* **Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p. 95, 2006.

GONÇALVES, K. M. et al. Conformational dissection of *Thermomyces lanuginosus* lipase in solution. **Biophysical Chemistry**, v. 185, p. 88–97, 2014.

GREENFIELD, N. J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. **Analytical Biochemistry**, v. 235, n. 1, p. 1–10, 1996.

GRISSOM, C. B. Magnetic Field Effects in Biology: A Survey of Possible Mechanisms with Emphasis on Radical-Pair Recombination. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 1, p. 3–24, 1995.

GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 518–526, 2007.

HALBACH, K. Design of permanent multipole magnets with oriented rare earth cobalt material. **Nuclear Instruments and Methods**, v. 169, n. 1, p. 1–10, 1980.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamental of Physics**. 10. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial

Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1–3, p. 155–170, 2004.

INSINGA, A. R. et al. 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  $\alpha$ -Amylase Activity and Enzymatic Reaction. **Transactions of Tianjin University**, v. 15, n. 1, p. 272–275, 2009.

JOHNSON JR, W. C. Proteins Through Circular Dichroism. **Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.**, v. 17, n. Cd, p. 145–166, 1988.

JUTILA, A. et al. Fluorescence spectroscopic characterization of *Humicola lanuginosa* lipase dissolved in its substrate. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1702, n. 2, p. 181–189, 2004.

KAMITORI, S. et al. Crystal structures of *Aspergillus oryzae* aspartic proteinase and its complex with an inhibitor pepstatin at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, n. 5, p. 1503–1511, 2003.

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

KHEADR, E. E.; VUILLEMARD, J. C.; EL-DEEB, S. A. Acceleration of cheddar cheese lipolysis by using liposome-entrapped lipases. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 485–492, 2002.

KUMAR, M. et al. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Sustainable Chemical Processes**, v. 3, n. 1, p. 14, 2015.

LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–

67, 2016.

LI, Q. et al. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 2013.

LITTLECHILD, J. A. Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. October, p. 1–9, 2015.

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

LOPES, L. C. et al. Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 10–18, 2015.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 2, p. 374–381, 2012.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193–217, 1985.

MAJOUGA, A. 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, jan. 2015.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 18, p. 4859–4872, 2016.

MIOTTO, M. et al. Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecular interactions. **bioRxiv Bioinformatics**, p. 1–14, 2018.

MORELLI, A. et al. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on membrane-associated enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, n. 2, p. 191–198, 2005.

MORENO-PEREZ, S. et al. Enzymatic synthesis of triacylglycerols of docosahexaenoic acid: Transesterification of its ethyl esters with glycerol. **Food Chemistry**, v. 187, p. 225–229, 2015.

MOUAD, A. M. et al. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 64–68, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: H. F. Freeman and Company, 2013.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy third edition Thomson Learning, Inc.**, 2001.

PAVONI, J. F.; SPIROPULOS, M. A. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 36, n. 4, p. 2501, 2014.

PINHOLT, C. et al. Influence of glycosylation on the adsorption of *Thermomyces lanuginosus* lipase to hydrophobic and hydrophilic surfaces. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 273–281, 2010.

PRANDO, L. T. et al. Characterization of the Performance and Catalytic Activity of Lysozyme from Chicken Egg Submitted to Permanent Magnetic Field. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 32, p. 9065–9071, 2017.

PRICE, J. et al. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m<sup>3</sup> using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 8, p. 1719–1728, 2016.

PUERTAS, S. et al. Lipase catalyzed aminolysis of ethyl propiolate and acrylic esters. Synthesis of chiral acrylamides. **Tetrahedron**, v. 49, n. 19, p. 4007–4014, 1993.

RABINOVITCH, B.; MALING, J. E.; WEISSBLUTH, M. Enzyme-Substrate Reactions in Very High Magnetic Fields. I. **Biophysical Journal**, v. 7, n. 2, p. 187–204, 1967.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 207–219, 2009.

RAMAKRISHNA, V.; RAJASEKHAR, S.; REDDY, L. S. Identification and purification of metalloprotease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 63–71, 2010.

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.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses - A review. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101–120, 2009.

RAY, A. Application of Lipase in Industry. **Asian Journal of Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 2, p. 33–37, 2012.

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. **Int. Agrophysics**, v. 21, p. 185–188, 2007.

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

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.

SAMBAQUI, A. B. K.; MARQUES, L. S. B. **Apostila de Eletromagnetismo**. Joinville. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, 2010.

SANTHI, R. Microbial production of protease by *Bacillus cereus* using cassava waste water. **Eur. J. Exp. Biol**, v. 4, n. 2, p. 19–24, 2014.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93–100, 2012.

SHARMA, R. et al. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.

SINGH, M. G.; CHANDRAVEER; TRIPATHI, A. M. Isolation and screening of lipase producing microorganisms from natural sources. **Indian Journal of Ecology**, v. 44, n. 1, p. 19–23, 2017.

SKJOLD-JØRGENSEN, J. et al. Altering the activation mechanism in *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Biochemistry**, v. 53, n. 25, p. 4152–4160, 2014.

SKJOLD-JØRGENSEN, J. et al. Controlled lid-opening in *Thermomyces lanuginosus* lipase – An engineered switch for studying lipase function. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 1, p. 20–27, 2017.

SUN, Z. H. I. et al. Processing of non-ferromagnetic materials in strong static magnetic field. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 17, n. 4, p. 193–201, 2013.

TAKAMI, H.; AKIBA, T.; HORIKOSHI, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 120–124, 1989.

TORRES, T. M. S. Influência de Campo Magnético nas Lipases

*Cândida Antarctica* B (CalB) e NS-40116. **Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 93, 2017.

TUREK, K.; LISZKOWSKI, P. Magnetic field homogeneity perturbations in finite Halbach dipole magnets. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 238, p. 52–62, 2014.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G. J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 45, p. 7342–7372, 2005.

WANG, H.-Y. 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.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, 2008.

YAVUZ, H.; ÇELEBI, S. S. Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 22–27, 2000.

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

ZENG, S. et al. Amide Synthesis via Aminolysis of Ester or Acid with an Intracellular Lipase. **ACS Catalysis**, v. 8, p. 8856–8865, 2018.