

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

**LÍDIA TIGGEMANN PRANDO**

**INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE NO  
DESEMPENHO DA ULTRAFILTRAÇÃO DE LISOZIMA E EM  
SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Florianópolis  
2018



**LÍDIA TIGGEMANN PRANDO**

**INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE NO  
DESEMPENHO DA ULTRAFILTRAÇÃO DE LIOSOMA E EM  
SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de doutor (a) em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio.

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira.

Florianópolis  
2018

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

Prando, Lídia Tiggemann

Influência de Campo Magnético Permanente no Desempenho da Ultrafiltração de Lisozima e em suas Propriedades Físico-Químicas / Lídia Tiggemann Prando ; orientador, Marco Di Luccio ; coorientador, José Vladimir de Oliveira. 2018.

119 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

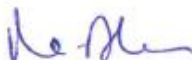
1. Engenharia de Alimentos. 2. Enzima. 3. Atividade. 4. Caracterização. 5. Lisozima. I. Di Luccio, Marco. II. De Oliveira, José Vladimir. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE  
NO DESEMPENHO DA ULTRAFILTRAÇÃO DE  
LISOZIMA E EM SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-  
QUÍMICAS”**

Por

**Lídia Tiggemann Prando**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



Professor Dr. Marco Di Luccio

**Orientador**



Prof. Dr. José Vladimír de Oliveira

**Coorientador**



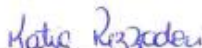
Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carcioli

**Coordenador**

**Banca Examinadora:**



Professor Dr. Marco Di Luccio



Profa. Dra. Kátia Rezzadori



Prof. Dr. Márcio Antônio Mazutti



Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi

Florianópolis, 30 de maio de 2018.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, pelas oportunidades profissionais e por ter sempre guiado o meu caminho, dando força e motivação.

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

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, por todo o conhecimento repassado no decorrer destes 4 anos de Doutorado e a Universidade Federal de Santa Catarina, pela estrutura disponibilizada para a realização dos experimentos.

A Capes pelo financiamento à pesquisa.

Aos meus pais... Agradeço a vocês por tudo!

Ao meu esposo... Pelo carinho, paciência e por me motivar a continuar sempre!

Aos meus colegas de Doutorado e grandes amigos.

Em especial, quero agradecer as colegas Kátia e a Palloma, pela amizade, por sempre me motivarem e pelo grande auxílio na realização desta pesquisa!

A todos os colegas e amigos do Labsem! Aos queridos ICs!

Aos Laboratórios CEBIME, LCME, CERMAT e LCP!

A todos, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço àqueles que nunca me deixaram só!





## RESUMO

A aplicação de campo magnético vem sendo estudada como forma de intensificar processos enzimáticos. Entretanto, sua aplicação ainda é escassa, limitada a poucas enzimas, e focada apenas na avaliação da atividade catalítica destas enzimas sem justificar os mecanismos envolvidos. Além disso, a aplicação de campo magnético, uma tecnologia de simples operação, baixo custo e mínimo impacto ambiental, tem sido utilizada como alternativa para melhorar o desempenho e a recuperação da permeabilidade de membranas após a Ultrafiltração (UF) de proteínas. A lisozima, por ser uma enzima modelo, com ampla disponibilidade e aplicação para a indústria de alimentos, além de apresentar um conhecimento detalhado quanto a sua estrutura nativa, gera a valorização de estudos quanto à elucidação dos mecanismos envolvidos em sua UF e no seu tratamento por campos magnéticos. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de campos magnéticos permanentes e das condições operacionais sobre a atividade catalítica, estrutura secundária, terciária, tamanho de partícula e UF da lisozima extraída da clara de ovo. Como resultados, o tratamento magnético no pH mais alto (13), força iônica de 50 mmol/L e densidade de fluxo magnético de 1,34 T permitiram uma atividade específica residual de 210%, comparada a lisozima nativa sem tratamento magnético. Os resultados sugerem que a ativação da lisozima causada pelo tratamento magnético pode estar relacionada às mudanças no conteúdo de  $\alpha$ -hélice na estrutura secundária e a um aumento no tamanho das partículas da lisozima, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Além disso, a aplicação do campo magnético melhorou o processo de UF da solução de lisozima, resultando em recuperações de permeabilidade de até 90% após a limpeza física. O tratamento magnético das membranas de polietersulfona (PES) resultou em mudanças pronunciadas no potencial zeta e no ponto isoelétrico das membranas. Enquanto que, o campo magnético na solução resultou em um aumento do tamanho das partículas da lisozima. Por fim, o tratamento magnético permitiu a reutilização da membrana de PES por ciclos consecutivos sem a necessidade de limpeza química.

**Palavras-chave:** Enzima. Atividade. Caracterização. Lisozima. Estrutura. Campo Magnético Permanente. Membrana de Polietersulfona. Incrustação. Potencial Zeta. Limpeza Física.



## ABSTRACT

The application of magnetic field is being tested as a way to intensify enzymatic processes. However, regarding magnetic application in enzyme field is still scarce and limited, considering few enzymes, and the majority evaluates only the catalytic activity of the target enzyme. In additionally, ultrafiltration (UF) is a membrane process used in the concentration and fractionation of proteins, which has the disadvantage of the occurrence of permeate flux reduction, due to concentration polarization and fouling, making its industrial application difficult. The application of magnetic field, a technology of simple operation, low cost and minimum environmental impact, has been used as an alternative to improve the performance and the recovery of membrane permeability after the protein UF. In this context, this work aims to evaluate the effects of the magnetic field and the operational conditions on the catalytic activity, secondary and tertiary enzyme structure and particle size of the egg white lysozyme and evaluate the effects of permanent magnetic fields in the UF of lysozyme. As results, the magnetic treatment at the highest pH (13), ionic strength (50 mmol/L) and magnetic flux density (1.34 T) allowed an increased on enzymatic activity of 56%. The results suggest that the activation of lysozyme caused by the magnetic treatment may be related to the changes of the  $\alpha$ -helix content in the secondary structure and the particle size increase, facilitating the substrate access to the enzyme active site. Moreover, the application of the magnetic field improved the UF process of the lysozyme solution, resulting in permeability recoveries of up to 90% after physical cleaning. The magnetic treatment of the Polyethersulfone (PES) membranes resulted in pronounced changes in the zeta potential and the isoelectric point of the membranes. While that, the magnetic field in the lysozyme solution resulted in particle size increased. Finally, the magnetic treatment allowed the re-use of the ultrafiltration membrane by consecutive cycles without the need of chemical cleaning.

**Keywords:** Enzyme. Activity. Characterization. Lysozyme. Structure. Permanent Magnetic Field. Polyethersulfone membrane. Incrustation. Zeta Potential. Physical Cleaning.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura cristalinas de alta resolução para a lisozima extraída da clara de ovo.....	28
Figura 2 -	Cilindro de Halbach (1980) e as alterações na orientação ( $\alpha$ ) da magnetização $\mathbf{M}$ com o ângulo azimutal ( $\phi$ ).....	38
Figura 3 -	Anisotropia diamagnética nas estruturas biológicas.....	40
Figura 4 -	Métodos analíticos para caracterização de proteínas.....	41
Figura 5 -	Esquema de análise de dicroísmo circular.....	42
Figura 6 -	Esquema de determinação de uma estrutura por cristalografia de raios-X.....	43
Figura 7 -	Distribuição de cargas em uma camada interfacial sólido/ líquido na separação de uma solução tampão segundo o modelo de Gouy-Chapman-Stern-Grahame.....	46
Figura 8 -	Amostra controle (a), ensaio utilizando ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro ( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ ) com densidade de fluxo de 0,71 T (b), ensaio utilizando arranjo de Halbach com densidade de fluxo de 1,34 T (c).....	50
Figura 9 -	Imagem da unidade de bancada de UF.....	55
Figura 10 -	Resumo dos ensaios e das condições testadas.	56
Figura 11 -	Representação esquemática da análise de potencial zeta no equipamento SurPass (AntonPaar).....	59
Figura 12 -	Pareto chart with the estimated effects of pH, magnetic flux density and ionic strength on the residual specific activity of lysozyme ( $p < 0.1...$	65
Figura 13 -	Pareto chart with the estimated effects of pH, magnetic flux density and ionic strength on the zeta potential.....	67
Figura 14 -	Particle size distribution as a function of pH, magnetic flux density and ionic strength: (a) 0 mmol/L, (b) 25 mmol/L, and (c) 50 mmol/L.....	70
Figura 15 -	Fluorescence emission spectra (a) and CD analysis (b) for: native pH lysozyme (control run, 0 T), native pH lysozyme exposed to 1.34	

	T field density, lysozyme at pH 13(control run, 0 T) and lysozyme at pH 13exposed to 1.34 T field density.....	72
Figura 16 -	Zeta potential of the lysozyme solutions, with and without addition of NaCl 50 mmol/l (SC-50 and SC-0, respectively), as a function of pH.	76
Figura 17 -	Zeta potential of the PES membranes before and after magnetic induction as a function of solution pH.....	77
Figura 18 -	MALDI-TOF of the lysozyme solutions.....	79
Figura 19 -	Permeate flux of the lysozyme solutions (0 and 50 mmol/l NaCl), in relation to the initial ultrapure water flux ( $J/J_i$ ), in untreated PES membranes and after magnetic induction (1.34 T).Fixed conditions: magnetic induction of the membrane for 12 h, enzyme concentration of 0.5 g/l, pH solution of 9.....	81
Figura 20 -	Lysozyme retention for SC-0, CS-0, SC-50 and CS-50.....	83
Figura 21 -	Average permeability recovery of membranes, with and without magnetic induction, in the UF of lysozyme solutions, after physical and chemical cleaning.....	84
Figura 22 -	Demonstrates the results of optical interferometry after ultrafiltration of lysozyme solutions and after physical cleaning for controls and magnetically treated samples.....	87
Figura 22.3 -	D optical interferometry of PES membranes...	87
Figura 23 -	Recycles of cleaning in the CS-0 (1.34 T) test compared to the SC-0 (0 T) test.....	88

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Cronograma de atividades.....	26
Tabela 1 -	Avaliação do efeito dos diferentes tratamentos nas propriedades físicas e estruturais de proteínas.....	36
Tabela 2 -	Valores utilizados no planejamento fatorial completo $2^3$ (com triplicata no ponto central) para o tratamento magnético.....	51
Tabela 3 -	Full $2^3$ factorial design with residual specific activity as response.....	64
Tabela 4 -	Analysis of variance (ANOVA) to validate the mathematical model describing the specific activity relative (%) of lysozyme.....	66
Tabela 5 -	Summary of codes.....	75
Tabela 6 -	Summary of characterizations.....	78
Tabela 7 -	The increase of final permeate flux of the lysozyme solutions after the different treatments, in relation to the control trials.....	82
Tabela 8 -	Summary of the roughness parameters selected for the optical interferometry analysis.....	85





## SUMÁRIO

	<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO.....</b>	21
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	23
<b>1.1</b>	<b>Objetivos.....</b>	25
1.1.1	Objetivo geral.....	25
1.1.2	Objetivos específicos.....	25
<b>1.2</b>	<b>Proposta de tese e cronograma das atividades realizadas.....</b>	25
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	27
<b>2.1</b>	<b>Enzimas.....</b>	27
2.1.1	Lisozima.....	27
<b>2.2</b>	<b>Tratamento de enzimas.....</b>	29
<b>2.3</b>	<b>Campo magnético.....</b>	37
2.3.1	Efeitos do campo magnético em sistemas biológicos.....	39
<b>2.4</b>	<b>Técnicas de análise de proteínas.....</b>	40
2.4.1	Dicroísmo circular.....	41
2.4.2	Cristalografia.....	42
<b>2.5</b>	<b>Ultrafiltração de proteínas.....</b>	43
2.5.1	Avaliação de potencial zeta.....	45
<b>2.6</b>	<b>Estado da arte.....</b>	46
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	49
<b>3.1</b>	<b>Tratamento magnético da lisozima.....</b>	49
3.1.1	Material.....	49
3.1.1.1	<i>Soluções dos ensaios e reagentes.....</i>	49
3.1.2	Aparato experimental.....	49
3.1.3	Métodos.....	50
3.1.3.1	<i>Delineamento experimental para lisozima.....</i>	50
3.1.3.2	<i>Determinação da atividade enzimática da lisozima.....</i>	51
3.1.4	Determinação analíticas e caracterização da solução protéica.....	52
3.1.4.1	<i>Dicroísmo circular (DC).....</i>	52
3.1.4.2	<i>Espectroscopia de fluorescência.....</i>	52
3.1.4.3	<i>Determinação do potencial zeta.....</i>	53
3.1.4.4	<i>Análise do tamanho de partículas.....</i>	53
3.1.5	Análise estatística.....	53
<b>3.2</b>	<b>Ensaio de ultrafiltração.....</b>	54
3.2.1	Material.....	54
3.2.1.1	<i>Reagentes e soluções.....</i>	54

3.2.1.2	<i>Membranas</i> .....	54
3.2.2	Unidades de ultrafiltração.....	54
3.2.3	Dispositivo magnético.....	55
3.2.4	Procedimento experimental.....	55
3.2.4.1	<i>Indução magnética da membrana</i> .....	56
3.2.4.2	<i>Indução magnética da solução</i> .....	57
3.2.4.3	<i>Compactação da membrana</i> .....	57
3.2.4.4	<i>Ensaio de filtração</i> .....	57
3.2.4.5	<i>Procedimento de limpeza</i> .....	57
3.2.5	Caracterizações da membrana.....	58
3.2.5.1	<i>Recuperação de permeabilidade</i> .....	58
3.2.5.2	<i>Coefficiente de Pretensão</i> .....	58
3.2.5.3	<i>Potencial zeta da membrana</i> .....	58
3.2.5.4	<i>Interferometria Óptica</i> .....	59
3.2.5.5	<i>Ciclos de limpeza</i> .....	60
3.2.6	Caracterizações na solução.....	60
3.2.6.1	<i>Determinação do potencial zeta da solução</i> .....	60
3.2.6.2	<i>Análise do tamanho de partícula</i> .....	60
3.2.6.3	<i>Espectroscopia de massa (MALDI-TOF)</i> .....	60
3.2.7	Análise estatística.....	61
<b>4</b>	<b>MAGNETIC FIELD ON LYSOZYME ACTIVITY.</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Effect of magnetic field on lysozyme activity</b> .....	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>Effect of magnetic field on the zeta potential of lysozyme solution</b> .....	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Effect of magnetic field on the particle size of lysozyme solution</b> .....	<b>68</b>
<b>4.4</b>	<b>Effect of magnetic field in the fluorescence and circular dichroism of lysozyme</b> .....	<b>71</b>
<b>4.5</b>	<b>Conclusions</b> .....	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>MAGNETIC FIELD ON ULTRAFILTRATION</b> ....	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>Summary of assays</b> .....	<b>75</b>
<b>5.2</b>	<b>Zeta potential of solutions</b> .....	<b>75</b>
<b>5.3</b>	<b>Zeta potential of membranes</b> .....	<b>76</b>
<b>5.4</b>	<b>Summary of characterizations</b> .....	<b>78</b>
<b>5.5</b>	<b>Lysozyme activity</b> .....	<b>79</b>
<b>5.6</b>	<b>MALDI-TOF</b> .....	<b>79</b>
<b>5.7</b>	<b>Permeated flux</b> .....	<b>80</b>
<b>5.8</b>	<b>Retention coefficient</b> .....	<b>83</b>
<b>5.9</b>	<b>Recovery of permeate flux</b> .....	<b>83</b>
<b>5.10</b>	<b>Optical interferometry</b> .....	<b>85</b>

<b>5.11</b>	<b>Cleaning recycles.....</b>	<b>88</b>
<b>5.12</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>91</b>
<b>6.1</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>91</b>
<b>6.2</b>	<b>Perspectivas para trabalhos futuros.....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE A – Artigo.....</b>	<b>105</b>



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Influência de Campo Magnético Permanente nas Propriedades Físico-Químicas de Lisozima submetida à ultrafiltração

### Por quê?

- A ultrafiltração (UF) é amplamente utilizada na concentração e fracionamento de proteínas.
- A principal desvantagem da UF é a redução do fluxo de permeado devido à polarização por concentração e incrustação (*fouling*).
- Campos magnéticos (CM) podem melhorar o desempenho de UF de soluções proteicas.
- Há poucos trabalhos sobre a elucidação dos mecanismos de ação de CM em soluções proteicas e em processos com membranas.
- Lisozima extraída da clara de ovo é uma proteína com atividade catalítica, com aplicações como conservante em alimentos e amplamente caracterizada na literatura.
- O uso do CM pode influenciar positivamente a concentração por UF e a atividade catalítica da lisozima.

### Quem já fez?

- Vardanega (2013) deu início aos estudos aplicando campo magnético na permeação de albumina de soro bovino (BSA), Iriberry (2015), Silva (2015) e Zin et al., (2016) melhoraram o processo e avaliaram as características físico-químicas da solução de albumina de soro bovino (BSA) após exposição ao campo magnético, resultando numa redução significativa na incrustação da membrana e alterações pronunciadas no potencial zeta da solução.
- Há poucos estudos que avaliam a aplicação de campo magnético em soluções proteicas, inclusive mostrando alterações na atividade catalítica de certas enzimas, esses trabalhos não aprofundam no estudo do efeito deste tratamento.

**Métodos experimentais:**

- Análise das variáveis de processo necessárias para aumento da atividade catalítica da lisozima submetida a tratamento com campo magnético.
- Testes de estabilidade em diferentes temperaturas das soluções de lisozima submetidas a tratamento com campo magnético.
- Definição dos parâmetros e das análises necessárias para caracterização das estruturas secundária, terciária e quaternária da lisozima, antes e após exposição ao campo magnético.
- Definição dos parâmetros e das caracterizações físico-químicas necessárias para elucidação do efeito do campo magnético em soluções de lisozima.
- Avaliação do efeito da indução magnética das soluções de lisozima no desempenho do processo de ultrafiltração.
- Avaliação do efeito da indução magnética de membranas no desempenho do processo de ultrafiltração da lisozima.

**Resultados:**

- Definição dos parâmetros operacionais ideais para aumento de atividade e melhoria do desempenho da UF (pH, força iônica, temperatura, concentração de enzima, tempo de exposição ao campo magnético e densidade de fluxo magnético).
- Elucidação do mecanismo responsável pela mudança na atividade catalítica da lisozima após o tratamento magnético.
- Verificação das possíveis alterações no tamanho de partícula e no potencial zeta das soluções de lisozima após tratamento magnético.
- Avaliação da estabilidade da lisozima antes e após tratamento com campo magnético.
- Elucidação das possíveis alterações na estrutura terciária, secundária e primária da lisozima exposta ao campo magnético.

## 1 INTRODUÇÃO

A ultrafiltração (UF) é uma das técnicas mais utilizadas industrialmente para fracionamento e purificação de proteínas. Nas indústrias de produtos lácteos, as proteínas são os principais compostos responsáveis pela incrustação de membranas, pois elas podem se depositar sobre a superfície destas, e também serem adsorvidas no interior da estrutura porosa, causando o *fouling* (BÁGUENA et al., 2016). A formação de incrustações na superfície da membrana causa um declínio do fluxo de permeado e diminui a sua vida útil (COHEN, 2005). Neste contexto, pesquisas recentes têm buscado alternativas não intrusivas para a redução de *fouling* aplicando tecnologias como ultrassom (BÁGUENA et al., 2016) e campos magnéticos (ZIN et al., 2016; SCHLÜTER, 2014).

O emprego de campo magnético vem sendo considerado como uma tecnologia promissora por apresentar diversas vantagens, como o baixo custo de operação, a simplicidade do processo, o baixo impacto ambiental, e a ampla gama de aplicações. Além disso, duas descobertas importantes, uma em 1960, de uma nova família de materiais magnéticos, e outra em 1973, de um novo arranjo geométrico de ímãs permanentes, com muitas características desejáveis, facilitaram a produção de ímãs com altas densidades de fluxo magnético.

O grupo do Laboratório de Processos com Membranas da UFSC foi pioneiro na aplicação de campo magnético em soluções protéicas, com o intuito de melhorar o desempenho da ultrafiltração destas soluções. No entanto, apesar dos resultados promissores, esses estudos focaram principalmente na verificação dos efeitos do campo na ultrafiltração de uma proteína modelo (albumina de soro bovino). Contudo, a extrapolação dos efeitos observados para a ultrafiltração de outras proteínas ainda carece de estudos, bem como a elucidação dos efeitos físico-químicos do campo magnético sobre esses sistemas. Um questionamento importante é se ocorrem alterações estruturais nas proteínas envolvidas, ou que tipos de alterações são induzidas na solução e membrana em decorrência da ação do campo magnético.

Visando a elucidação dessas questões, buscou-se avaliar outra proteína modelo, a lisozima de clara de ovo, que é facilmente adquirida com alto grau de pureza, tem massa molecular menor e ponto isoelétrico maior que a albumina, possui alta estabilidade e amplo conhecimento quanto a sua estrutura disponível na literatura.

Por ser a lisozima uma proteína com atividade catalítica, em etapas preliminares, estudou-se a avaliação da sua atividade após

tratamento magnético. Percebeu-se que a esta apresentava um aumento na atividade quando submetida a campo magnético permanente (estático) de alta intensidade (1,34 T), motivando o desenvolvimento deste trabalho.

Na literatura, poucos trabalhos podem ser encontrados no que se refere à avaliação do efeito do campo magnético, seja este aplicado de forma estática ou com recirculação, no tratamento de enzimas. Uma análise geral destes trabalhos mostra que a atividade das enzimas, na grande maioria dos casos, é significativamente alterada, dependendo do tipo da enzima e das condições investigadas. Entretanto, estes estudos focam principalmente no processo, sem justificar o mecanismo de ação do campo magnético na alteração da atividade enzimática.

Existem várias técnicas documentadas na literatura para determinar as estruturas secundárias e terciárias das enzimas, cada uma com as suas peculiaridades. O estudo da estrutura de enzimas pode ser realizado por técnicas como a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular (CD), a eletroforese por SDS- PAGE, a cristalografia de raios-X, o espalhamento de luz dinâmico (DLS - *Dynamic Light Scattering*), entre outras. O dicroísmo circular é empregado para determinar a estrutura secundária de proteínas, por sua vez a espectroscopia de fluorescência pode ser aplicada para avaliar sua estrutura terciária (LEHNINGER et al., 1995; AZEVEDO JR., 2004).

A partir das informações acima citadas, justifica-se o desenvolvimento desta tese, visando avaliar os efeitos do campo magnético que levam a alteração da atividade da lisozima e na redução do *fouling* em processos de UF. Para facilitar a leitura e dar uma sequência lógica aos conteúdos abordados, esta proposta de tese está dividida da seguinte forma:

No Item 1.1 serão apresentados os objetivos do trabalho. Em seguida, no Item 1.2, a proposta desta tese, com o cronograma das atividades executadas. No Capítulo 2 é apresentada uma breve revisão bibliográfica na qual será introduzida uma abordagem geral sobre enzimas mais precisamente lisozima e, serão abordados trabalhos que demonstram a aplicação de campo magnético no tratamento de enzimas, dando ênfase aos efeitos já relatados. Posteriormente, serão discutidas as vantagens e aplicações do campo magnético na concentração de proteínas por UF. No Capítulo 3 serão abordados os materiais, métodos e aparatos experimentais utilizados neste trabalho. Por fim, nos Capítulos 4 e 5, serão apresentados os resultados obtidos neste estudo e no Capítulo 7 as considerações finais e as propostas de trabalhos futuros.



## **1.1 Objetivos**

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliação dos efeitos de campos magnéticos permanentes na atividade e no desempenho da UF da lisozima, elucidando os mecanismos envolvidos.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Estudar as variáveis de processo (densidade de fluxo magnético (média e alta), pH e força iônica) na atividade catalítica da lisozima.
- b) Determinar as estruturas secundária, terciária e quaternária da lisozima antes e após exposição ao campo magnético.
- c) Avaliar os parâmetros potencial zeta e tamanho de partícula da lisozima antes e após exposição ao campo magnético.
- d) Avaliar a estabilidade da lisozima antes e após tratamento por campo magnético.
- e) Avaliar o desempenho de ultrafiltração na concentração de soluções de lisozima antes e após exposição ao campo magnético.
- f) Avaliar o efeito do campo magnético nas membranas de poliétersulfona, empregadas no processo de ultrafiltração, pela análise de potencial zeta e perfilometria óptica.

## **1.2 Proposta de tese e cronograma das atividades realizadas**

As etapas descritas nesta tese foram realizadas conforme o proposto no Quadro.

Atividades	2014		2015		2016		2017		2018	
	Semestre		Semestre		Semestre		Semestre		Semestre	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Disciplinas										
<b>Lisozima</b>										
1. Estudo das variáveis de processo										
2. Análise da estrutura secundária, terciária e quaternária										
3. Avaliação do potencial zeta e tamanho de partícula										
4. Avaliação da estabilidade										
5. Avaliação do desempenho de ultrafiltração										
<b>Membrana</b>										
6. Avaliação do efeito do campo magnético nas membranas de poliétersulfona										
<b>Produção Acadêmica</b>										
7. Qualificação										
8. Artigo I										
9. Artigo II										
10. Artigo III										
11. Defesa da tese										

Quadro 1 – Cronograma de atividades.

Fonte: dados da pesquisa.

## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enzimas

As enzimas são proteínas biologicamente ativas responsáveis pela catálise de diversas reações bioquímicas. Elas podem ser obtidas por extração a partir de plantas ou animais ou por fermentação de micro-organismo e são normalmente adicionadas para desempenhar uma função tecnológica na fabricação, transformação, preparação e tratamento de alimentos. As enzimas são geralmente consideradas e usadas como auxiliares de processamento. Apenas duas enzimas alimentares, a invertase e a lisozima, estão classificadas como aditivos nos termos do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 (DEBEUCKELAERE et al., 2015).

Segundo o último relatório da *Markets and Markets* de 2015, o mercado global de enzimas deve crescer a uma taxa anual média de 7,0%, atingindo USD 6,2 bilhões em 2020. Somente o setor alimentos e bebidas representam cerca de 30% deste mercado.

Os processos por catálise enzimática podem ser realizados sob condições amenas, sem a necessidade de ambientes extremos exigidos por tratamentos químicos (TAVANO et al., 2013). A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima, depende da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura, força iônica do meio, entre outros, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (LIMA et al., 2001).

Segundo Yin (2015), uma vez que a função é determinada pela estrutura, para compreender profundamente as funções das proteínas é muito importante se obter informações estruturais das macromoléculas biológicas, se empregando técnicas adequadas.

#### 2.1.1 Lisozima

A lisozima é uma enzima amplamente disponível na natureza que hidrolisa ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre resíduos do ácido N-acetilmurâmico e N-acetil-D-glicosamina em um peptídeoglicano, o qual é o principal componente de paredes celulares de bactérias gram-positivas (FUENZALIDA et al., 2016). A lisozima é um agente antimicrobiano reconhecido como seguro (GRAS) e adequado para controlar o crescimento de um grande número de agentes patogênicos em

alimentos (BENELHADJ et al., 2016; PRILUSKY et al., 2011; EISENMENGER, REYES-DE-CORCUERA, 2009).

A massa molecular da lisozima é considerada baixa (14,3 kDa), possui um elevado ponto isoelétrico ( $pI = 10,7$ ) e estudos detalhados de suas propriedades moleculares estão disponíveis, incluindo sequência e estrutura (TORREGGIANI et al., 2005). Além da ampla compreensão da sua estrutura é uma enzima estável, tornando-a ideal para elucidação de efeitos após a aplicação de um dado tratamento.

A sequência de aminoácidos completa da lisozima de clara de ovo (CE 3.2.1.17) foi determinada de forma independente por dois grupos, Jolles et al., (1963) e Canfield (1963). A estrutura tridimensional da lisozima está apresentada na Figura 1.

*Protein data bank*

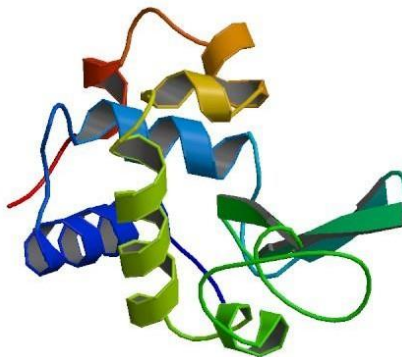


Figura 1 – Estrutura cristalinas de alta resolução para a lisozima extraída da clara de ovo.

Fonte: Weiss, Palm e Hilgenfeld (2000).

A lisozima é uma enzima cuja cadeia polipeptídica é constituída por 129 resíduos aminoácidos dos quais, 21 de ácido aspártico, 5 de ácido glutâmico, 12 alaninas, 11 resíduos de arginina, 8 cistinas, 3 fenilalaninas, 12 glicinas, 6 isoleucinas, 1 histidina, 8 leucinas, 6 lisinas, 2 prolinas, 2 metioninas, 10 serinas, 3 tirosinas, 7 treoninas, 6 de triptofano e 6 valinas (CODEX, COEI-1-LYSOZY: 2007).

Contém cinco regiões helicoidais ( $\alpha$ -hélice) e cinco regiões com estruturas  $\beta$ -sheet ligadas por  $\beta$ -turn and random coils (PRILUSKY et al., 2011), sendo que, da estrutura secundária da lisozima 40% é

composta por  $\alpha$ -hélice e 7% por  $\beta$ -sheet (SETHURAMAN et al., 2004). Se trata de uma enzima ubíqua, ou seja, formada por heterodímeros de diferentes tamanhos com subunidades catalíticas associadas a subunidades reguladoras menores (SAGERMANN; MATTHEWS, 2002).

Nos seres humanos, a lisozima é encontrada em células secretoras e em células da placenta, pulmão, baço e nódulos linfáticos (FUENZALIDA et al., 2016; PRILUSKY et al., 2011; KLOCKARS, REITAMO, 1975). A lisozima está entre uma das principais enzimas incorporadas em embalagens ativas por imobilização em suportes poliméricos, como em bioplásticos de amido (BENELHADJ et al., 2016; SANTOS, 2015). Em processos de vinificação, a lisozima de clara de ovo de galinha (HEWL) é usada para controlar o crescimento de *Oenococcus oeni* (CEJUDO-BASTANTE et al., 2010). A sua utilização em vinificação foi aprovada pela *International Organisation of Vine and Wine* (OIV) em 1997 (resolução OENO 10/97) e deve ser indicada no rótulo do produto de acordo com o regulamento da Comissão Europeia Nº. 1266/2010, de 22 de dezembro de 2010.

Outra aplicação importante desta enzima inclui sua adição em queijos tipo *Grana Padano* e demais queijos duros para evitar o defeito “*late blowing*”, as famosas rachaduras em queijos causadas principalmente pelo microrganismo *Clostridium spp* (JIMENEZ-SAIZ et al., 2013), e em queijos processados (“Polenguinho”, por exemplo) para proteção contra organismos formadores de esporos (DEEGAN et al., 2006).

## 2.2 Tratamento de enzimas

Em vários processos é de interesse o aumento da atividade de enzimas a fim detornar processos de biocatálise economicamente viáveis, gerando assim, interesse por tecnologias emergentes como a alta pressão, a irradiação ultrassônica e o emprego de campos magnéticos (SCRIBAN, 1985; LEHNINGER et al., 1995; LIMA et al., 2001).

A Tabela 1 apresenta uma compilação de alguns trabalhos que estudaram o efeito do ultrassom, da alta pressão e do campo magnético sobre as propriedades físicas e estruturais de diferentes proteínas alimentares e enzimas. Uma análise geral destes trabalhos mostra que a atividade das enzimas, na grande maioria dos casos, é significativamente alterada, dependendo do tipo e da fonte da enzima, do tratamento empregado, e de outras condições de processamento.

As análises frequentemente empregadas para observação de efeitos da aplicação de alta pressão e ultrassom sobre proteínas são: espalhamento de luz dinâmico (DLS), quantidade de grupos sulfidrilo (SH) empregando o reagente de Ellman, calorimetria diferencial exploratória (DSC), técnicas de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-vis), técnicas de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular (CD), eletroforese por SDS- PAGE e análise de polaridade por fluorescência empregando o reagente anilino-naftaleno-sulfonato (ANS).

Objetivo do Estudo	Produto	Parâmetros	Análises	Efeito observado	Ref.
Ultrassom	- caseinato de sódio				
Avaliar o efeito do ultrassom sobre as propriedades físicas e estruturais das proteínas	sódio	34 W cm <sup>-2</sup>	DLS	redução no tamanho e volume hidrodinâmico das proteínas	Sullivan <i>et al.</i> (2014)
	- proteína	20 kHz	SDS-PAGE		
	isolada de soro de leite (WPI)	2 min	Viscosidade intrínseca		
Avaliar o efeito do ultrassom sobre o tamanho e o peso molecular das partículas	WPI concentrado de proteína de soro de leite(WPC)	600 W 20 kHz/15 - 30min 40 kHz/15 - 30min	DLS SDS-PAGE	redução no tamanho das partículas e peso molecular (20 kHz/ 15 - 30 min e 40 kHz/15 min) agregação das proteínas (40 kHz/30 min)	Jambrak <i>et al.</i> (2014)
	- proteína			conteúdo SH ficou inalterado para todas as proteínas	
Avaliar o efeito do ultrassom sobre as funcionalidades das Proteínas	isolada de soja (500 E)	750W 20 kHz		aumento da hidrofobicidade	
	- proteína da clara do ovo	20 min		variação no tamanho das partículas	
			SDS-PAGE	aumento de agregados para a EW	

<b>Objetivo do Estudo</b>	<b>Produto</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Análises</b>	<b>Efeito observado</b>	<b>Ref.</b>
<i>Avaliar o efeito do ultrassom sobre as propriedades funcionais e estruturais da proteína</i>	- isolado proteico de feijão preto (BBPI)	150, 300, ou 450 W 20 kHz 12 e 24 min	CD Espectroscopia de fluorescência SEM Potencial Zeta	modificação na estrutura terciária da proteína diminuição do tamanho da partícula e aumento do potencial zeta (a 300 W) aumento da hidrofobicidade e solubilidade	Jiang <i>et al.</i> (2014)
<i>Avaliar o efeito do ultrassom sobre as propriedades estruturais e térmicas da proteína</i>	WPC	450 W 20 kHz 1, 5, 10, 20, 30 e 60 min	ANS  DSC UV-vis espectroscopia de fluorescência dicróismo circular	diminuição da entalpia de desnaturação - até 5 min aumento da entalpia de desnaturação devido à agregação das proteínas - >5 min pequenas alterações na estrutura secundária e hidrofobicidade da proteína	Chandrapala <i>et al.</i> (2011)
<b>Campo Magnético</b>					
<i>Determinar o efeito do campo magnético sobre a atividade da peroxidase de soja</i>	Peroxidase	- ímã em esteira (2,2 m) com densidade de fluxo magnético de 2,9-4,6 mT  - 2,2 a 19,8 segundos  (1 a 9 passagens pela esteira a 1 m/s)	Atividade enzimática a 470 nm  (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e guaiaacol como substrato)	aumento de 36% na atividade enzimática após o tratamento por 19,8 segundos	Atak <i>et al.</i> (2007)



Objetivo do Estudo	Produto	Parâmetros	Análises	Efeito observado	Ref.
<i>Investigar os efeitos do campo magnético estático sobre a atividade da <math>\alpha</math>-amilase imobilizada</i>	$\alpha$ -amilase imobilizada em quitosana	Campo magnético estático (sem recirculação) de 0,15T 1 a 9horas	Atividade enzimática a 520 nm Estabilidade ao pH (4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0) Estabilidade ao armazenamento (4 °C/30 dias) Parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{max}$ )	aumento de 19,5 % na atividade enzimática aumento da estabilidade ao pH e ao armazenamento diminuição do $K_m$ 11 mg/mL para 9 mg/ mL aumento da $V_{max}$ de 0.02 g/min para 0,05 g/min	Liu <i>et al.</i> (2010)
<i>Avaliar o efeito de um campo magnético sobre a velocidade de reação enzimática</i>	Superóxido dismutase	- ímã em esteira com densidade de fluxo magnético de 2,9 - 4,6 mT - 0; 2,2; 19,8 e 33 segundos (0 a 15 passagens pela esteira a 1 m/s)	Atividade enzimática a 560 nm	aumento da atividade enzimática com o aumento da densidade de fluxo magnético	Büyüksulu e Atak, (2006)
<i>Avaliar o efeito do tempo de exposição e da intensidade de um campo magnético estático sobre a atividade de enzimas digestivas em pepino do mar</i>	Lisozima (LZM) Fosfatase ácida (ACP) Fosfatase alcalina (AKP) Superóxido dismutase (SOD)	- 0,1; 0,3; ou 0,5 T exposição por 0,5ou 1 hora a cada 3dias total de 14 exposições	Atividade enzimática	o efeito biológico do campo magnético foi influenciado pela duração da exposição e pela intensidade de campo para o tratamento a 0,5 T/1 hora ocorreu um aumento da atividade enzimática de todas as enzimas digestivas avaliadas. o maior efeito observado foi para a lisozima com aumento de 2,79 vezes na atividade enzimática.	Tang <i>et al.</i> (2015)

Objetivo do Estudo	Produto	Parâmetros	Análises	Efeito observado	Ref.
<i>Aplicação campo magnético estático sobre a ultrafiltração de soluções de proteína como uma alternativa para melhorar o desempenho de permeação e a recuperação da permeabilidade.</i>	Albumina de soro bovino (BSA)	- 0,7 T - 2 horas	Potencial zeta	a presença do campo magnético e da indução magnética alterou o potencial zeta das soluções de BSA e aumentou o fluxo de permeado e a recuperação da permeabilidade do BSA	Zin <i>et al.</i> (2016)
<b>Alta pressão</b>					
<i>Influências da pressão, tempo de exposição e da taxa de despressurização sobre a atividade da <math>\beta</math>-galactosidase submetida a tratamento com fluidos pressurizados</i>	$\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> liofilizada	CO <sub>2</sub> , propano e n-butano temperatura fixada 37 °C tempo de exposição: 1 a 6h pressão: 10-250 bar	Atividade enzimática Estabilidade	atividade residual máxima de 211% em propano a pressão, taxa de descompressão e o tempo de exposição afeta positivamente a atividade da enzima para todos os solventes testados	Manera <i>et al.</i> (2011)
<i>Investigar a síntese de Fruito oligossacarídeos (FOS) usando inulinase comercial imobilizada pré-tratada em fluidos pressurizados</i>	Inulinase de <i>Aspergillus niger</i>	Atividade enzimática pelo método - 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)		GLP: atividade residual de 145,01%  Propano: atividade residual de 148,50%	Kuhn <i>et al.</i> (2013)

Objetivo do Estudo	Produto	Parâmetros	Análises	Efeito observado	Ref.
<i>Avaliar a influência do tratamento com gás de petróleo liquefeito (GLP) pressurizado sobre a atividade enzimática de inulinases imobilizadas</i>	Inulinases de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Atividade enzimática pelo método - 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) Estabilidade eletrônica de varredura		atividade residual de 163% pequena alteração no suporte da enzima após tratamento com GLP pressurizado que não provocou perdas de atividade enzimática	Silva <i>et al.</i> (2012)
<i>Estudar a fluência da temperatura, pressão, tempo de exposição e a taxa de depressurização sobre a atividade de duas lipases comerciais imobilizadas submetidas a fluidos pressurizados</i>	Lipozyme IM Lipases comerciais imobilizadas e Novozym 435	CO <sub>2</sub> , propano e n-butano temperatura: 35 a 75 °C pressão: 10-280bar tempo de exposição: 1 a 6 h	Atividade enzimática	perdas de atividade para Lipozyme IM em todos os solventes estudados; perdas de atividade com CO <sub>2</sub> e aumento com propano e n-butano para a Novozym 435.	Oliveira <i>et al.</i> (2006)
<i>Avaliaram o efeito do tratamento com CO<sub>2</sub> sub/supercrítico em lipases comerciais</i>	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) e lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	pressões: 60 e 100bar tempo de exposição: 20, 30 e 150 min temperatura: 35 e 40 °C	Análise das estruturas primárias, secundárias e terciárias Atividade enzimática Constantes cinéticas (Km e Vmáx) Energia de ativação (Ea) Estabilidade térmica	atividades relativas foram de 105% e 116% para CALB e lipase PS, respectivamente, para CALB o valor de Vmáx/Km aumentou significativamente, enquanto que para lipase PS, valor Vmáx/Km foi quase constante, ambas as enzimas tratadas mostraram elevada estabilidade térmica.	Liu, Chen e Wang (2013)

Objetivo do Estudo	Produto	Parâmetros	Análises	Efeito observado	Ref.
<i>Análise do efeito da alta pressão na atividade enzimática e estabilidade em uma protease termófila</i>	Protease de <i>Methanococcus jannaschii</i>	Mistura de gás H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> (4:1) pressão: 10, 250 e 500 bar temperatura: 90–130 °C	Atividade enzimática Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica	a atividade enzimática e estabilidade térmica aumentaram com a pressão a taxa de reação aumentou 2 × a 500 bar e 116 °C e 5 × a 130 °C	Michels, Clark (1997)

Legenda: Calorimetria diferencial exploratória (DSC), difratação circular (CD), espalhamento de luz dinâmico (DLS), dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS-PAGE), anilino-naftaleno-sulfonato (ANS) para análise de polaridade, microscopia eletrônica de varredura (SEM).

Tabela 1 – Avaliação do efeito dos diferentes tratamentos nas propriedades físicas e estruturais de proteínas.

Apesar dos estudos relatarem alterações na atividade catalítica de enzimas submetidas a tratamentos com campo magnético, poucos são os trabalhos que aprofundam no estudo dos efeitos deste tratamento sobre a estrutura de proteínas. Os trabalhos que focam na aplicação de ultrassom e alta pressão se mostram mais avançados no que diz respeito ao conhecimento sobre os efeitos na estrutura e nas propriedades físicas de proteínas.

As principais alterações induzidas pela tecnologia de alta pressão e ultrassom na taxa de reações catalisadas por enzimas, relatadas nestes trabalhos, são: (a) a uma modificação direta na estrutura de uma enzima, (b) a alterações nos mecanismos de reação e (c) a alterações no substrato ou nas propriedades físicas do solvente (por exemplo, pH, densidade, viscosidade) que afetam a estrutura da enzima.

O conhecimento das análises comumente empregadas nos trabalhos revisados para alta pressão e ultrassom e dos efeitos relatados por estes autores pode auxiliar na direção de estudos que busquem compreender os efeitos de campos magnéticos sobre enzimas.

### **2.3 Campo magnético**

Campo magnético é a região ao redor de um ímã, na qual ocorre uma força magnética de atração ou de repulsão. O campo magnético pode ser definido pela medida da força que o campo exerce sobre o movimento das partículas de carga, tal como um elétron (SAMBAQUI; MARQUES, 2010). Campos magnéticos estáticos podem ser classificados como fracos ( $<1$  mT), moderados (1 mT – 1 T), fortes (1-5 T) e ultra-forte ( $> 5$  T). Os campos magnéticos estáticos fortes podem ser gerados por ímãs permanentes (ROSEN, 2003).

Até a década de 1960, o mais alto campo magnético obtido a partir de fontes de ímãs permanentes era extremamente limitado. Duas descobertas revolucionárias mudaram este cenário. A primeira foi a descoberta de uma nova família de materiais magnéticos permanentes baseadas em metais de terras raras, sendo que um dos mais empregados é o neodímio, utilizado na fabricação de ímã de neodímio-ferro-boro (NdFeB), que pode atingir densidades de fluxo remanescente próxima a 1,48 T (INSINGA et al., 2016).

A segunda descoberta foi a invenção em 1973 de um novo arranjo geométrico de ímãs permanentes, com muitas características desejáveis, que mais tarde ficou conhecido como o cilindro Halbach (HALBACH, 1980). É um sistema capaz de produzir uma densidade de

fluxo magnético homogêneo ao longo de uma ampla região do entre ferro cilíndrico, em que as linhas de fluxo magnético não escapam para superfície externa do ímã. O maior arranjo de Halbach, de quase 2 toneladas, está na Estação Espacial Internacional como uma parte do espectrômetro magnético alfa que gera um campo magnético de densidade de fluxo de 5 T (TUREK; LISZKOWSKI, 2014).

A Figura 2 apresenta o desenvolvimento proposto por Halbach com estruturas cilíndricas ocas magnetizadas perpendicularmente ao eixo do ímã, de modo a que a orientação da magnetização muda continuamente com o ângulo azimutal ( $\phi$ ). Para fins de cálculo o campo magnético pode ser considerado como bidimensional em que a alteração contínua da orientação da magnetização no cilindro Halbach produz um campo magnético dipolo perfeitamente homogêneo.

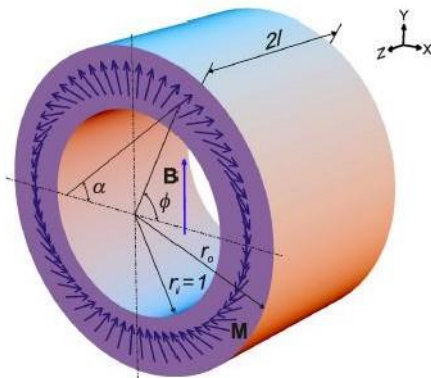


Figura 2 – Cilindro de Halbach (1980) e as alterações na orientação ( $\alpha$ ) da magnetização  $\mathbf{M}$  com o ângulo azimutal ( $\phi$ ).

Fonte: Turek; Liszkowski (2014).

Segundo Sun et al. (2013), as propriedades magnéticas de um dado material possuem correspondência direta com sua estrutura e configuração de elétrons, essas propriedades determinam como o material irá se comportar na presença de um campo magnético externo.

Os materiais podem ser classificados em paramagnéticos, diamagnéticos e ferromagnéticos. As teorias clássicas de diamagnetismo e paramagnetismo surgiram pela primeira vez em 1905 propostas por Paul Langevin. O diamagnetismo é uma propriedade de todos os materiais, que surge a partir da interação de um campo magnético aplicado e o movimento de elétrons que orbitam o núcleo. Os materiais diamagnéticos

possuem uma magnetização negativa contrária ao campo magnético aplicado, o diamagnetismo é uma forma muito fraca do magnetismo, que só é exibido na presença de um campo magnético externo.

Quando colocados entre os pólos de um eletroímã forte, materiais diamagnéticos são atraídos para regiões onde o campo magnético é fraco. Esse comportamento é observado em elementos com elétrons emparelhados e é independente da temperatura, diferentemente do paramagnetismo e ferromagnetismo (SAMBAQUI, MARQUES, 2010; EVANS, HELLER, 2003).

O paramagnetismo surge em virtude do fato de que os elétrons se comportam como se estivessem girando sobre seu próprio eixo, bem como orbitando o núcleo. E, por conseguinte, possuem um momento magnético de rotação para além do seu momento magnético orbital. O momento magnético total de um átomo é dado pela soma vetorial de todos os momentos eletrônicos. Se os momentos magnéticos de rotação e orbitais de um átomo estão orientados em tal forma a compensar-se, o átomo tem momento magnético nulo. Isto leva a comportamento diamagnético. Se, por outro lado, o cancelamento é apenas parcial, o átomo tem um momento magnético permanente. Isto leva ao paramagnetismo (EVANS; HELLER, 2003).

A maioria dos minerais tem comportamento paramagnético como, por exemplo, o sódio que tem um elétron não emparelhado na sua camada 3s que tende a ser alinhado na presença de um campo magnético externo. Já o ferromagnetismo é muito mais forte do que diamagnetismo e paramagnetismo e está particularmente associado com elementos de ferro (daí o nome), níquel e cobalto, mas também ocorre em muitos minerais naturais, tais como certos óxidos de ferro (SUN *et al.*, 2013; SAMBAQUI, MARQUES, 2010; EVANS, HELLER, 2003).

### 2.3.1 Efeitos do campo magnético em sistemas biológicos

Pela falta de estudos quanto aos efeitos do campo magnético em proteínas, buscaram-se também os principais efeitos relatados na literatura para sistemas biológicos. Segundo Teng (2005) os sistemas biológicos podem ser considerados como um sistema complexo, formado por um agrupamento de componentes sensíveis a aplicação de campo magnético externo, como cargas elétricas (íons, elétrons livres) e moléculas com momentos magnéticos.

De acordo com Albuquerque et al. (2016), os principais efeitos relatados na literatura do campo magnético em sistemas biológicos

são principalmente: orientação/alinhamento celular, mobilidade celular, torque e mudanças na trajetória das partículas. Estudos têm indicado que em células microbianas sem propriedades ferromagnéticas ou paramagnéticas aparentes, a anisotropia diamagnética de componentes intracelulares é o fator mais comum para a orientação celular.

Os artigos revisados por Albuquerque et al. (2016) concordam que proteínas (principalmente aquelas com estrutura secundária  $\alpha$ -hélice) expostas a um dado campo magnético recebem torques, resultando em um certo movimento. Sabe-se que a ressonância eletrônica em peptídeos planares (Figura 3) dá propriedades diamagnéticas para as  $\alpha$ -hélices de proteínas, com as ligações planares orientadas paralelamente ao eixo da hélice.

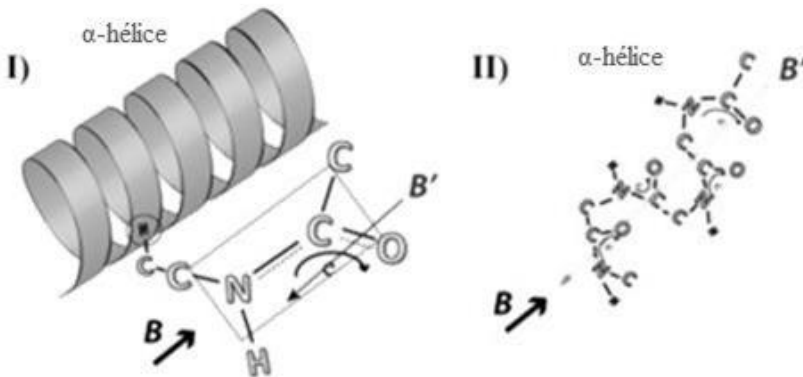


Figura 3 – Anisotropia diamagnética nas estruturas biológicas.

Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2016).

A anisotropia diamagnética pode gerar efeitos subsequentes, como modificações estruturais intracelulares e mudanças nas reações enzimáticas. Porém, estudos que avaliem essas possíveis modificações estruturais são escassos.

## 2.4 Técnicas de análise de proteínas

A descrição das propriedades de superfície de proteínas e da estrutura de enzimas pode ser realizada por meio de diversas técnicas. Bhomia et al. (2016) propõe num esquema (Figura 4) das principais análises empregadas para caracterização de proteínas.





Figura 4 – Métodos analíticos para caracterização de proteínas  
 Fonte: adaptado de Bhomia et al. (2016).

#### 2.4.1 Dicroísmo circular

Dentre as diversas técnicas a Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma técnica rápida, não destrutiva, com um elevado grau de seletividade e que requer uma quantidade mínima de amostra (RAHMAN; KHAN 2016). É uma técnica extensivamente usada na elucidação da estrutura secundária ou conformação de macromoléculas, particularmente proteínas, observando alterações causadas por alterações ambientais (NGAMDEE, 2015).

O fenómeno do dicroísmo circular consiste da absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita (RANJBAR; GILL, 2009). Este efeito irá ocorrer quando um cromóforo é quiral (opticamente ativo) ou (a) intrinsecamente em virtude da sua estrutura, ou (b) por ser covalentemente ligado a um centro quiral, ou (c) por serem colocados num ambiente assimétrico (KELLY; PRICE, 2000).

A Figura 5 apresenta um esquema proposto por Ranjbar e Gill (2009) para análise de dicroísmo circular.

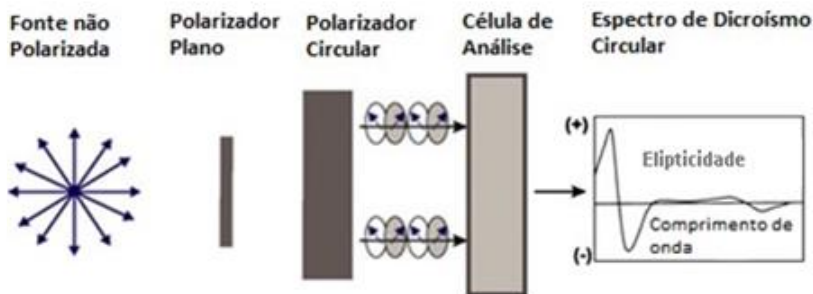


Figura 5 - Esquema de análise de dicroísmo circular.

Fonte: adaptado de Ranjbar e Gill (2009).

Convencionalmente, os resultados de dicroísmo circular são obtidos como uma função da elipticidade molar  $[\theta]$  com o comprimento de onda. Porém, algoritmos existentes proporcionam uma estimativa da composição da estrutura secundária, permitindo calcular o conteúdo global de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha de uma dada proteína (KWAAMBWA; MAIKOKERA, 2008; BHOMIA et al., 2016). Essas previsões podem auxiliar na elucidação de alterações estruturais após um dado tratamento, como no caso da aplicação de campos magnéticos ou de alta pressão.

Os principais softwares comerciais, disponíveis para interpretar os espectros de dicroísmo, incluem o DichroWeb (Londres), CONTIN-CD e K2D (Alemanha), Dicroprot (França) (BHOMIA et al., 2016).

#### 2.4.2 Cristalografia

Elucidar os detalhes estruturais de proteínas é essencial para a definição das funções das enzimas. Na última década ocorreu um rápido desenvolvimento de métodos alternativos para a determinação da estrutura, mas a cristalografia de difração por raios-X e a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permanecem em alta devido a sua versatilidade e dados com alta resolução (GULEREZ; GEHRING, 2014).

Segundo Yin (2015), das estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (dados de 2015), aproximadamente 88,85% foram resolvidas

pela cristalografia de difração por raios-X, 10,23% por RMN, e somente 1% foram resolvidas por todos os outros métodos.

A cristalografia de raios X é uma técnica que consiste em fazer passar um feixe de raios X, uma forma de radiação eletromagnética, através de um cristal da substância sujeita ao estudo. Durante a coleta de dados, o cristal é rotacionado em pequenos incrementos para se obter um conjunto de dados completo de padrões de difração bidimensionais. A transformação de Fourier é aplicada para converter o conjunto de dados a um mapa de densidade de elétrons da proteína. Um modelo da proteína é incorporado ao mapa e refinado para se obter uma estrutura tridimensional final (GULEREZ; GEHRING, 2014). O Esquema de determinação estrutural por cristalografia de raios-X está apresentado na Figura6.

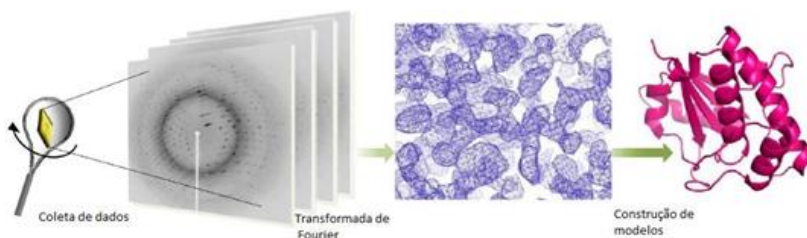


Figura 6 – Esquema de determinação de uma estrutura por cristalografia de raios-X.

Fonte: adaptado de Gulerez; Gehring (2014).

Segundo Yin (2015), lisozima e as proteases são fáceis de serem cristalizadas, enquanto outras enzimas apresentam uma maior dificuldade. Normalmente as dificuldades de cristalização são devido a três problemas principais: (a) como preparar uma solução altamente purificada e monodispersa de macromoléculas, (b) como rastrear as condições de cristalização para se obter os primeiros cristais; e (c) a forma de melhorar a qualidade de cristal, de modo a garantir uma coleta de dados de difração de raios-X bem-sucedida.

## 2.5 Ultrafiltração de proteínas

Ultrafiltração (UF) é uma das técnicas mais utilizadas industrialmente para concentração, e etapa prévia ao fracionamento e purificação de proteínas, sendo que em alguns casos especiais é possível se atingir algum fracionamento da proteína de interesse em relação às

demais presentes no meio, principalmente quando há muita diferença no tamanho das moléculas e na sua carga. Nas indústrias de produtos lácteos, as proteínas são os principais compostos responsáveis pela incrustação de membranas, porque elas podem se depositar sobre a superfície da membrana e também, serem adsorvidas no interior da estrutura porosa da membrana causando incrustação (*fouling*) reversível e/ou irreversível (BÁGUENA *et al.*, 2016).

A formação de incrustações na superfície da membrana causa um declínio do fluxo de permeado e diminui a vida útil da membrana (COHEN, 2005). Neste contexto, pesquisas recentes têm buscado alternativas para a redução de incrustação (*fouling*), aplicando tecnologias como ultrassom (BÁGUENA *et al.*, 2016), campos elétricos (HELGA, 2014) e campos magnéticos (ZIN *et al.*, 2016; HELGA, 2014).

Segundo Vedavyasan (2001), a utilização de um campo magnético é uma tecnologia promissora para o controle de incrustações, de simples operação, baixo custo e consumo de energia e que diminui a utilização de produtos químicos com procedimentos de limpeza química.

Nos últimos anos, o grupo do LABSEM/UFSC vem estudando a aplicação de campos magnéticos em solução de proteínas visando melhorar o desempenho da ultrafiltração destas soluções. Vardanega *et al.*, (2013) estudaram o processo de permeação da albumina de soro bovino (BSA) em membranas (polietersulfona hidrófila) aplicando campo magnético, Silva (2015) e Zin *et al.* (2016) aprimoraram o processo e avaliaram as características físico químicas da solução proteica (BSA) após exposição ao campo magnético, obtendo redução significativa na incrustação em membranas e alterações pronunciadas no potencial zeta das soluções.

No entanto, os estudos disponíveis empregando campo magnético em processos de ultrafiltração focam principalmente na compreensão dos efeitos do campo magnético nas soluções proteicas, e pouca informação foi obtida das mudanças ocorridas nas membranas. Helga (2014) estudou não só o efeito do campo nas soluções salinas no processo de osmose inversa, mas também avaliou o efeito do campo magnético nas membranas de osmose inversa, observando mudanças significativas no potencial zeta e no ponto isoelétrico das membranas após exposição a campo magnético estático.

O transporte de proteínas através de membranas semipermeáveis de ultrafiltração pode ser fortemente afetado por interações eletrostáticas entre a membrana carregada e a proteína carregada. A separação destas substâncias por ultrafiltração é muito difícil

com base apenas na diferença da sua dimensão molecular. Como as cargas das proteínas mudam de acordo com o pH da solução, Nakao et al. (1988) mostraram que o conhecimento da carga das proteínas e da superfície da membrana pode auxiliar na obtenção de uma melhor seletividade, ajustando a magnitude das interações eletrostáticas entre as proteínas e a membrana. Segundo Burns e Zydney (2000) a avaliação do potencial zeta de membranas é essencial para compreender a adsorção de proteínas e incrustações durante a ultrafiltração.

### 2.5.1 Avaliação de potencial Zeta

O potencial zeta (também conhecido como o potencial eletrocinético) denotado como a letra grega ( $\zeta$ ) foi introduzido como um parâmetro que descreve o potencial elétrico na camada interfacial sólido/líquido de um material e uma solução aquosa, sendo um indicador importante e útil de cargas na superfície de materiais (POLLASTRI et al., 2014; DAEHWAN, LEE, FREY, 2012). Em processos de separação a carga superficial de materiais está intimamente relacionada com as interações por afinidade, sendo uma análise fundamental para compreensão do desempenho de membranas de ultrafiltração.

Quando um material é imerso numa solução eletrolítica, os grupos funcionais sobre a superfície do material são protonados ou ionizados e os contra-íons das cargas superficiais se reúnem na superfície. Uma dupla camada elétrica (definida pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern-Grahame) é formada na fronteira interfacial por forças de atração entre uma superfície carregada e contra-íons do material (Figura 7). Os contra-íons fortemente ligados a cargas superficiais dificilmente são separados da superfície por forças externas. Esta camada é chamada de camada de Stern. No exterior da camada de Stern a uma camada difusa em que os contra-íons são de concentração mais baixa e não estão firmemente ligados à superfície do material. O potencial elétrico  $\psi$  a uma distância ( $x$ ) da superfície diminui linearmente com o aumento de  $x$  na camada de Stern e depois decai exponencialmente para zero na camada difusa. O potencial elétrico na dupla camada elétrica é neutralizado através da camada difusa na qual a solução alimentada é encontrada. Como contra-íons estão firmemente ligadas às cargas de superfície numa camada de Stern e com certa mobilidade na camada difusa, uma fronteira (plano de corte) é formada entre as duas camadas. O potencial zeta é definido como o potencial elétrico no local do plano de corte (DAEHWAN; LEE; FREY, 2012).

Diversos fatores afetam o potencial zeta, um deles é a força iônica. O potencial zeta diminui mais rapidamente à medida que a força iônica aumenta, pois, a camada elétrica dupla é comprimida em direção à superfície pela concentração dos íons presentes em solução (VALIÑO et al., 2014).

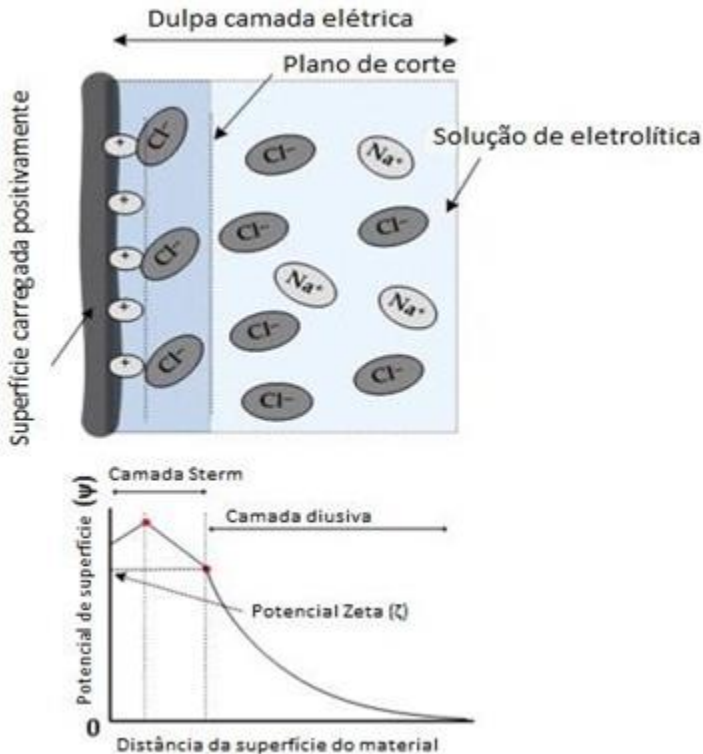


Figura 7 – Distribuição de cargas em uma camada interfacial sólido/líquido na separação de uma solução tampão segundo o modelo de Gouy-Chapman-Stern-Grahame.

Fonte: adaptado de Daehwan; Lee; Frey (2012).

## 2.6 Estado da arte

Na revisão bibliográfica procurou-se apresentar o estado da arte a respeito da aplicação da alta pressão, ultrassom, e em especial

campos magnéticos no tratamento de enzimas, apresentando um relato sobre os principais efeitos que levam a alterações da atividade catalítica de diferentes enzimas.

A valorização do tratamento de proteínas por campo magnético é interessante em vista de suas diversas vantagens, como uso conveniente e de baixo custo de funcionamento, não-tóxico, sem poluição secundária, ampla gama de aplicações. No entanto, o entendimento dos efeitos deste tratamento sobre proteínas ainda se encontra em um estado superficial.

Falta uma visão abrangente em relação aos mecanismos e efeitos dos campos magnéticos sobre a ultrafiltração de proteínas, estrutura e atividade de enzimas. Os trabalhos disponíveis na literatura foram simples descrições fenomenológicas, com pouco controle e sem tentativas de definir um mecanismo de ação (ROSEN, 2003). Além de que, os estudos realizados apresentam grande disparidade, aplicando diferentes tempos de exposição (minutos, horas e até mesmo dias), as mais diversas enzimas, intensidades ( $10^{-6}$  a  $10^1$  T) e formas de exposição ao campo magnético (estática ou em movimento), o que dificulta a construção de uma ideia sobre os efeitos do mesmo (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Frente ao que foi exposto, evidencia-se a importância deste estudo na avaliação dos efeitos de campos magnéticos permanentes na atividade e no desempenho da UF da lisozima elucidando os mecanismos envolvidos.





### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentada uma descrição dos materiais, métodos e aparatos experimentais necessários para a realização deste estudo. As análises foram realizadas no Laboratório de Separação por Membranas (LABSEM), CERMAT, LCME e CEBIME da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 3.1 Tratamento magnético da lisozima

##### 3.1.1 Material

###### 3.1.1.1 Soluções dos ensaios e reagentes

No preparo de todas as soluções utilizou-se água Milli-Q (MilliporeDirect – Q 3 UV) com resistividade de 18,2 M $\Omega$ .cm a 25°C.

A enzima utilizada nos ensaios foi a lisozima da clara de ovo de galinha, adquirida da Sigma-Aldrich, com pureza superior a 99 %, massa molecular média de 14,3 kDa e ponto isoelétrico no pH de 10,7.

Para ajustar o pH das soluções utilizou-se o hidróxido de potássio (KOH) nas concentrações de 0,1, 0,25 e 1 mol.L<sup>-1</sup> e o cloreto de sódio (NaCl) para modificar a força iônica dos experimentos, ambos da Vetec.

Na determinação da atividade da lisozima foi utilizado o microrganismo *Micrococcus lysodeikticus* da Sigma-Aldrich e tampão fosfato de potássio P.A. (Vetec) no pH 6,2.

##### 3.1.2 Aparato experimental

Todos os ensaios em campo magnético foram conduzidos de forma estática, ou seja, sem circulação da solução. O aparato experimental é composto por um campo magnético gerado pela presença de dois ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro (Nd<sub>2</sub>Fe<sub>14</sub>B) com dimensões de 50x50x25mm, permitindo uma densidade moderada de fluxo magnético de 0,71T e também pelo posicionamento de ímãs permanentes de Nd<sub>2</sub>Fe<sub>14</sub>B no formato de arranjo de *Halbach* (HALBACH1980), permitindo uma densidade alta de fluxo magnético de 1,34T. A densidade de fluxo magnético foi medida com um transdutor de campo magnético (modelo TMAG-1T, Globalmag Ltda, Brasil).

Nestes tratamentos, pequenas quantidades de solução de enzima foram submetidas ao campo magnético em diferentes densidades de fluxo magnético (Figura 1b e 1c) e uma amostra na ausência de campo magnético (Figura 1a) foi avaliada simultaneamente.

As soluções enzimáticas, acondicionadas em pipetas de *Pasteur*, foram colocadas no centro do campo magnético a temperatura ambiente. As soluções não submetidas à indução magnética foram denominadas de amostras controle.

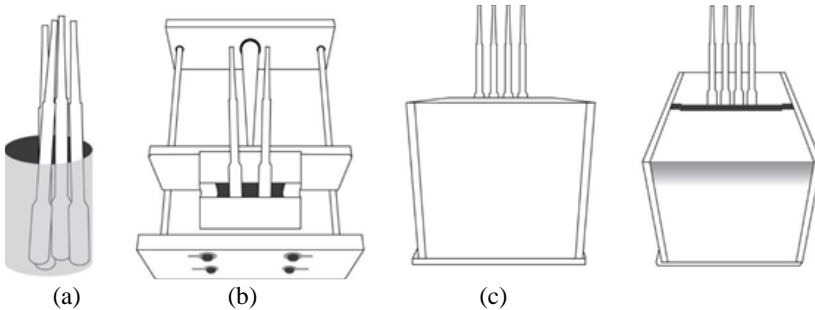


Figura 8 – Amostra controle (a), ensaio utilizando ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro ( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ ) com densidade de fluxo de 0,71 T (b), ensaio utilizando arranjo de Halbach com densidade de fluxo de 1,34 T (c).

### 3.1.3 Métodos

#### 3.1.3.1 Delineamento experimental para alisozima

As condições experimentais tais como pH, força iônica e densidade de fluxo magnético variaram seguindo um planejamento experimental  $2^3$ , conforme os níveis indicados na Tabela 1. A concentração de enzima (0,5 g/L, 34,97  $\mu\text{mol/L}$ ), o tempo de exposição ao campo magnético (2 horas) e o volume de solução submetida ao campo (2 mL) foram fixados.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0*	1
pH	9	11	13
Força iônica (mmol/L)	0	25	50
Densidade de Fluxo magnético (T)	0,7	0	1,34

\*Ponto Central

Tabela 2 – Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> (com triplicata no ponto central) para o tratamento magnético.

### 3.1.3.2 Determinação de atividade enzimática da lisozima

*Micrococcus lysodeikticus* foi empregado como substrato no ensaio de atividade padrão para a lisozima tal como descrito Shugar (1952). Uma suspensão de 0,01 % (w/v) *Micrococcus lysodeikticus* foi preparado em tampão fosfato de potássio (66m M, pH 6,2). Cem microlitros de uma solução de lisozima apropriadamente diluída foram adicionados a 2,5 mL de suspensão bacteriana. Uma vez que a lise da membrana bacteriana provoca uma diminuição na absorbância a 450 nm, esta foi registrada a cada 30 segundos durante um período total de incubação de 5 minutos a 25°C.

Uma unidade de lisozima produz um  $\Delta A$  (alteração de absorbância) a 450 nm de 0,001 por minuto a um pH de 6,2 na temperatura de 25 °C, usando uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* como substrato numa mistura de reação de 2,6mL.

A Equação que define a atividade enzimática da lisozima em U/mL está apresentada na Equação 1, onde df é o fator de diluição.

$$\frac{U}{ml} = \frac{\left( \frac{\Delta A_{450}}{\text{min teste}} - \frac{\Delta A_{450}}{\text{min branco}} \right) x (df)}{(0,001)(0,1)}$$

### 3.1.4 Determinações analíticas e caracterização da solução proteica

#### 3.1.4.1 Dicroísmo circular (DC)

Espectros de DC da enzima foram analisados na faixa de comprimento de onda de 190 a 250 nm, em um espectropolarímetro DC (Jasco J, 715), utilizando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de percurso óptico. Tampão fosfato 33 mmol/L em pH 6,2 (mesmo pH da medida de atividade) foi utilizado para dissolver as amostras. Esse mesmo tampão foi utilizado como controle (branco) para todas as amostras.

Os dados de DC foram expressos em termos de elipticidade molar  $[\theta]$ , em grau  $\text{cm}^2/\text{dmol}$ . Uma redução na intensidade da banda negativa a 208 nm demonstra alterações na estrutura secundária da lisozima e um declínio no conteúdo de  $\alpha$ -hélice (PENG; HIDAJAT; UDDIN, 2004; RAN et al., 2009; ZHONG et al., 2005).

O teor de  $\alpha$ -hélice de lisozima foi calculado a partir do valor  $[\theta]$  a 208 nm, utilizando a Equação 2 (GREENFIELD; FASMAN, 1969):

$$\% \text{hélice} = \frac{-([\theta]_{208} + 4000)}{29,000} \times 100 \quad (2)$$

Para converter  $[\theta]$  em termos de elipticidade molar residual, a Equação 3 foi utilizada:

$$\theta_{\text{mrd}} = \frac{\theta_d M}{10 C L N_r} \quad (3)$$

#### 3.1.4.2 Espectroscopia de fluorescência

O procedimento consiste na passagem de luz de uma fonte de excitação através de um filtro ou monocromador, que é incidente sobre a amostra. Uma parte da luz incidente é absorvida pela amostra, e algumas das moléculas da amostra produzem fluorescência. A luz fluorescente é emitida em todas as direções. Parte desta luz fluorescente passa através de um segundo filtro ou monocromador e atinge um detector (PAVONI et al., 2014).

Para análise de fluorescência, separou-se 1mL das soluções de lisozima tratadas e não tratadas com campo magnético (na concentração de 0,5 g/L, 34,97  $\mu\text{mol/L}$ ). Essas amostras foram mantidas a 4°C durante o curto período entre o transporte até o local da análise, ajuste dos parâmetros e leitura, afim de manter ao máximo o efeito do

campo magnético. Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na faixa de 280 a 500 nm, com excitação em 270 nm (fendas de excitação e emissão de 20 nm e voltagem da foto multiplicadora 800 V), parâmetros definidos com base no trabalho de Chen et al. (2013).

#### 3.1.4.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das amostras dos ensaios controle e após a indução magnética de 2 horas foram determinadas por anemometria laser Doppler utilizando-se o equipamento Zeta Sizer Nano ZS3600 (MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2004).

#### 3.1.4.4 Análise do tamanho de partículas

A análise de estabilidade física das soluções de lisozima e do tamanho de partículas, antes e após a exposição ao campo magnético, foram realizadas no equipamento LUMiSizer (LUM GmbH, Dispersion & Stability Analyses), instrumento que emprega sedimentação por centrifugação para acelerar a ocorrência de fenômenos de instabilidade. As caracterizações foram realizadas simultaneamente em 12 amostras, para favorecer o balanceamento da carga, a 25 °C, 3.000 rpm, utilizando célula retangular sintética de policarbonato.

#### 3.1.5 Análise estatística

Os efeitos das variáveis independentes investigadas (pH, força iônica e densidade de fluxo magnético) sobre a atividade enzimática da lisozima foram avaliados estatisticamente mediante análise do planejamento fatorial  $2^3$ , utilizando *software* STATISTICA versão 7.0, e a ferramenta estatística *Experimental design (DOE)*. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ao nível de 10% de significância.

## 3.2 Ensaio de ultrafiltração

### 3.2.1 Material

#### 3.2.1.1 Reagentes e soluções

A solução de alimentação consistiu em lisozima de clara de ovo (Sigma-Aldrich, massa molar de corte - 14,3 kDa e ponto isoelétrico de 10,7) a uma concentração de 0,5 g/L.

O pH da solução de lisozima foi ajustado a 9 com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 mol/L para obtenção de soluções com potencial zeta positivo ( $12,4 \pm 1,28$ ).

Solução de NaCl 50 mmol/L (Vetec) foi adicionada para conferir potencial zeta negativo às soluções de lisozima ( $-5,63 \pm 0,72$ ) a um pH de 9.

No procedimento de limpeza foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e solução tampão de fosfato monossódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), todos fornecidos pela Vetec.

Água Milli-Q (Millipore Direct – Q 3 UV) com resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C foi usada para o preparo de todas as soluções e reagentes.

#### 3.2.1.2 Membranas

Membranas de polietersulfona (Microdyn-Nadir GmbH, Alemanha) com massa molar de corte (MMC) de 30 kDa foram utilizadas nos experimentos. As membranas foram previamente imersas em água Milli-Q por 48 h para retirada de preservantes e a cada 24 horas foi efetuada a troca desta água. Uma membrana nova foi utilizada para cada experimento.

### 3.2.2 Unidade de ultrafiltração

A unidade de ultrafiltração opera em escoamento tangencial e reciclo total de correntes (retido e permeado), para manter a concentração da alimentação constante. O aparato é composto por um tanque de alimentação com capacidade de 500 mL, uma bomba (SHURflo), e uma célula confeccionada em aço inoxidável com área filtrante de 0,0029 m<sup>2</sup>. Nos ensaios com indução magnética na solução, a célula era posicionada entre dois ímãs (Figura2).

O sistema também é composto por um manômetro (Fiedler) com capacidade de 0 a 4 bar, uma válvula tipo agulha (Swagelok, Nupro Company, SS4BK) e um rotâmetro (Blaster Controles) capaz de medir vazão de alimentação de 0,06 a 0,6L/min.

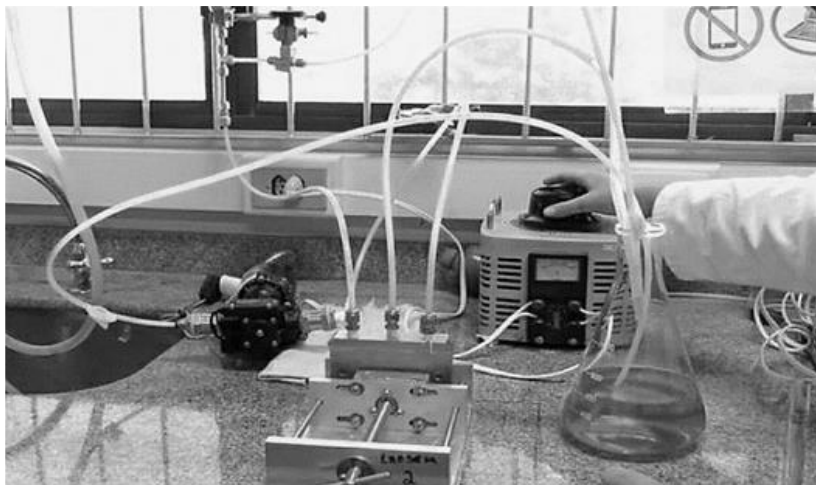


Figura 9 – Imagem da unidade de bancada de UF.  
Fonte: elaborada pela autora.

### 3.2.3 Dispositivo magnético

Utilizou-se ímãs de Nd<sub>2</sub>Fe<sub>14</sub>B no formato de arranjos de *Halbach* (HILTON; McMURRY, 2012), permitindo uma densidade de fluxo magnético de 1,34 T. A densidade de fluxo magnético foi medida com um transdutor de campo magnético (modelo TMAG-1T, Globalmag Ltda, Brasil).

### 3.2.4 Procedimento experimental

Os ensaios de permeação foram realizados em duplicata a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). As variáveis investigadas foram: indução magnética da solução de lisozima (0 e 1,34 T), indução magnética da membrana (0 e 1,34 T) e a força iônica da solução (0 e 50 mmol/L). As condições: tempo de exposição ao campo (2 horas para a solução e 12 horas para a membrana), pH (9) e concentração da solução de lisozima (0,5 g/L) foram fixadas com base em estudos anteriores (SCHLÜTER, 2014; SILVA, 2015).

As permeações utilizando soluções de lisozima e membranas de poliétersulfona que não sofreram indução magnética foram denominadas de ensaios controle. A Figura 3 resume os ensaios realizados.

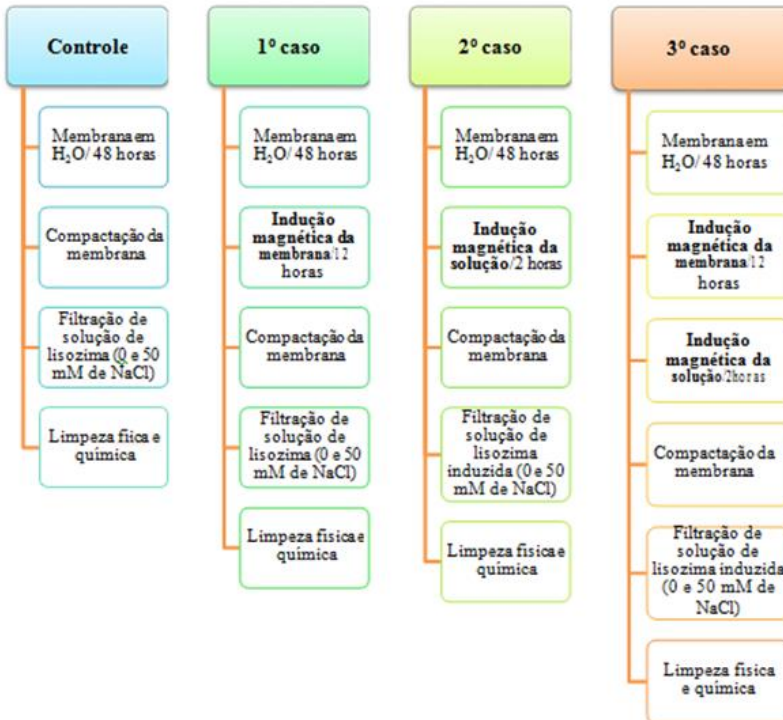


Figura 10 – Resumo dos ensaios e das condições testadas.

Fonte: elaborada pela autora.

### 3.2.4.1 Indução magnética da membrana

As membranas utilizadas nesta avaliação foram colocadas úmidas dentro de um envelope de papel filtro (para proteção da membrana contra danos e sujidades) e submetidas ao campo magnético com densidade de fluxo de 1,34 T durante 12 horas.



### 3.2.4.2 Indução magnética da solução

As soluções de lisozima utilizadas nessa avaliação, com ou sem adição de NaCl e no pH 9, foram circuladas no sistema por 2 horas, sem a presença da membrana e com o ímã de 1,34 T acoplado ao módulo de ultrafiltração.

### 3.2.4.3 Compactação da membrana

A compactação prévia da membrana foi realizada com água Milli-Q a uma pressão de 2 bar e vazão de 0,3 L/min durante 2 horas. A permeabilidade hidráulica das membranas foi determinada após o procedimento de compactação, pelo coeficiente angular obtido no ajuste linear dos valores de fluxo de permeado versus pressão. A permeabilidade serve como parâmetro para quantificar indiretamente a incrustação causada na membrana.

### 3.2.4.4 Ensaios de filtração

Após procedimentos prévios e compactação da membrana, os ensaios de filtração foram conduzidos para todos os casos. As filtrações da solução de lisozima tiveram duração de 2 horas a uma pressão fixa de 2 bar, vazão de alimentação de 0,3L/min e temperatura de 25°C. Os ensaios foram conduzidos em modo batelada, com recirculação total do retido e do permeado, mantendo assim a concentração da alimentação constante.

$$Rec_f(\%) = \frac{Per_f}{Per_i} \quad (4)$$

### 3.2.4.5 Procedimento de limpeza

Para limpeza da membrana uma sequência de etapas foi adotada. A primeira etapa consistiu na limpeza física na qual a membrana foi rinsada com 5 L de água ultrapura e a segunda etapa consistiu na limpeza química pela passagem de soluções de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>pH3,0), hidróxido de sódio (NaOHapH10,0) e tampão fosfato (pH7,0) intercaladas por rinsagens com água destilada e ultrapura.

### 3.2.5 Caracterizações na membrana

#### 3.2.5.1 Recuperação da permeabilidade

O cálculo da recuperação da permeabilidade após a limpeza física (*Rec<sub>f</sub>*) foi feito a partir da Equação 4.

Sendo: *Per<sub>f</sub>* a permeabilidade após o procedimento de limpeza física, dividida pela permeabilidade de água ultrapura da membrana nova *Per<sub>i</sub>*.

O cálculo da recuperação da permeabilidade após a limpeza química (*Rec<sub>q</sub>*) foi feito a partir da Equação 5.

$$Rec_q(\%) = \frac{Per_q}{Per_i} \quad (5)$$

Sendo: *Per<sub>q</sub>* a permeabilidade após o procedimento de limpeza química, dividida pela permeabilidade de água ultrapura da membrana nova *Per<sub>i</sub>*.

#### 3.2.5.2 Coeficiente de Retenção

O coeficiente de retenção (R) representa a capacidade da membrana de reter moléculas, ele é dado em porcentagem. Com relação à proteína e ao coeficiente de retenção, amostras de permeado foram coletadas a cada 15 minutos durante 2 horas, e estas analisadas quanto ao teor de proteína total pelo método de Bradford (1976). Pela concentração de proteína, o coeficiente de retenção (R) foi calculado por

$$R(\%) = \left(1 - \frac{P}{A}\right) \times 100 \quad (6)$$

Onde: P denota a concentração de proteína no permeado e A, a concentração de proteína na alimentação.

#### 3.2.5.3 Potencial zeta da membrana

O potencial zeta da membrana foi analisado nos seguintes casos: membrana nova, após indução magnética de 12 horas, 24 horas após a exposição magnética, após o processo de filtração e após limpeza física e química, afim de determinar a carga superficial em cada etapa.

O potencial zeta da membrana de polietersulfona foi medido com base no fenômeno do potencial de escoamento utilizando o equipamento SurPass da AntonPaar (Figura 4).

O equipamento foi cuidadosamente lavado com a água ultrapura antes de cada análise. A análise foi realizada simultaneamente em dois pequenos pedaços de membrana, para verificar se as duas membranas foram instaladas adequadamente é importante o controle inicial do fluxo *versus* a pressão aplicada.

A análise de potencial zeta foi realizada empregando-se uma solução de KCl 1 mM. Coletou-se diversos pontos na faixa de pH de 2,1 a 10 e em cada pH, o potencial zeta foi medido quatro vezes. Hidróxido de potássio foi utilizado para ajustar o pH da solução por titulação. Todas as medições do potencial de zeta foram realizadas a 400 mbar e à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

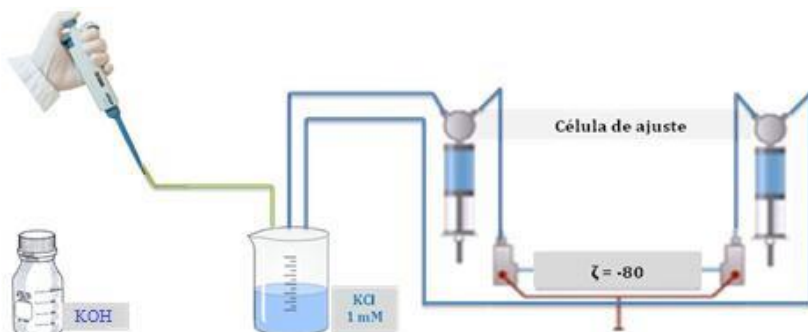


Figura 11 – Representação esquemática da análise de potencial zeta no equipamento SurPass (AntonPaar).

#### 3.2.5.4 Interferometria Óptica

A evolução topográfica da superfície das membranas de PES foi analisada em diferentes estágios do processo de UF, através de um interferômetro ótico de luz branca Zygo Newview 7300. O equipamento obtém mapas 3D da superfície em poucos segundos.

A Interferometria óptica das membranas foi analisada após: (a) ultrafiltração da solução de lisozima e (b) limpeza física, tanto para os ensaios controle quanto para as amostras tratadas magneticamente.

Os dados obtidos no interferômetro foram analisados pelo software Universal Mountains Map 7.4. Da superfície analisada, a forma e a ondulação foram subtraídas.

### 3.2.5.5 Ciclos de Limpeza

Foram realizados diferentes ciclos de UF de solução de lisozima seguidos por limpeza física da membrana com água ultrapura. Tal experimento teve o intuito de avaliar a recuperação do fluxo de permeado após ciclos sucessivos de UF da lisozima. Com base nos bons resultados de fluxo de permeado, foram realizados quatro ciclos de UF da lisozima para a condição CS-0 (solução tratada magneticamente) comparada ao seu respectivo controle SC-0 (solução não tratada magneticamente). Ao final dos 4 ciclos de UF seguidos por limpeza física foi realizada uma limpeza química com o intuito de verificar a recuperação do fluxo de permeado após esse processo.

### 3.2.6 Caracterizações na solução

#### 3.2.6.1 Determinação do potencial zeta da solução

Conforme descrito no item 3.1.4.3

#### 3.2.6.2 Análise do tamanho de partícula

Conforme descrito no item 3.1.4.4

#### 3.2.6.3 Espectroscopia de massa (MALDI-TOF)

Todos os ensaios, tanto os tratados magneticamente a 1,34 T quanto os ensaios controle (não submetidos ao campo magnético) foram analisados usando o espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF modelo AutoFlex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As amostras (1  $\mu\text{L}$ ) foram misturadas manualmente com 3  $\mu\text{L}$  da matriz composta de ácido sinapínico 38  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (SigmaAldrich), 70% (v/v) de acetonitrila LC-MS e ácido trifluoroacético a 0,2% (v/v) em água de grau LC-MS. Após esse processo, as amostras foram depositadas em triplicata sobre a placa de análise e secas à temperatura ambiente. Para aquisição dos dados foi utilizada uma extensão de massas de 5000-30000 m/z e os espectros gerados foram analisados com o software *Flex Analysis 3.3* (Bruker Daltonics).

### 3.2.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ao nível de 5% de significância utilizando o *software* STATISTICA versão 7.0.



Subscriber access provided by UNIVERSITY OF THE SUNSHINE COAST

Article

## Characterization of the Performance and Catalytic Activity of Lysozyme from Chicken Egg Submitted to Permanent Magnetic Field

Lidia Tiggemann Prando, Pallom R de Lima, Katia Rezzadori, J. Vladimir Oliveira, and Marco Di Luccio

*Ind. Eng. Chem. Res.*, **Just Accepted Manuscript** • DOI: 10.1021/acs.iecr.7b01370 • Publication Date (Web): 01 Aug 2017

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on August 1, 2017



## 4 MAGNETIC FIELD ON LYSOZYME ACTIVITY

### 4.1 Effect of magnetic field on lysozyme activity

The effects of treatments were evaluated by quantifying the residual specific activity, which is the ratio between the specific activity of lysozyme after treatment and the specific activity of native lysozyme (untreated), expressed in percentage (%). The average specific activity of the native lysozyme was  $116 \pm 5$  kU/mg, which is similar to the manufacturer's reported value (109 kU/mg).

In this specific study, the effects of the magnetic flux density, pH, and ionic strength on the enzymatic activity were evaluated through a central composite design (CCD)  $2^3$ . Results obtained for the enzymatic activity of lysozyme treated and untreated with magnetic field are presented in Table 3. Assays 12 and 13 were not part of the experimental design, but they were added to check the effect of pH and ionic strength at their intermediate value (11 and 25 mmol/L, respectively) without the influence of the magnetic field.

Significant increases in the residual specific activity of lysozyme (134; 136; 179 and 212 %) were observed for some experiments (2, 4, 6 and 8), even though most experiments remained virtually unchanged or with a slight reduction (tests 3, 12 and 13).

The highest residual specific activity values are reported in assays 6 (179%) and 8 (212 %), which were carried out at higher pH (13.7) and magnetic flux density (1.34 T). The use of all factors set at the higher level (+1) (test 8) resulted in a 56 % increase in the enzymatic activity compared to its counterpart (test 4) without magnetic field.

Similar results to those found in the present study were reported by Ran et al. (2009) that applied permanent magnetic field (0.15, 0.30 and 0.45 T) in a cellulase solution from *Trichoderma virid*. The magnetic flux density showed significant effect on cellulase activity, with an increase of 37 % when compared to the control sample.

Test	pH		Ionic strength (mmol/L)	Magnetic flux density (T)	RSA (%)	Zeta potential
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>			
1	9	0	0	0	92	12.4 ± 0.2
2	13	0	0	0	134	-17.5 ± 0.9
3	9	50	0	0	79	-5.69 ± 0.3
4	13	50	0	0	136	-20.4 ± 1.9
5	9	0	1.34	1.34	98	7.8 ± 0.6
6	13	0	1.34	1.34	179	-17.0 ± 1.3
7	9	50	1.34	1.34	99	-2.1 ± 0.9
8	13	50	1.34	1.34	212	-20.0 ± 1.3
9	11	25	0.7	0.7	94	-11.0 ± 0.4
10	11	25	0.7	0.7	100	-10.5 ± 0.7
11	11	25	0.7	0.7	98	-11.8 ± 0.2
12	11	25	0	0	74	-12.7 ± 1.2
13	11	25	0	0	73	-13.5 ± 0.8

Table 3 – Full 2<sup>3</sup> factorial design with residual specific activity as response.

According to Freitas (2007), lysozyme is a highly stable enzyme that maintains its enzymatic activity above 80 % over a wide pH range (4.0 - 12) at 25 °C (results evaluated in native condition of ionic strength). However, in the results presented in this study, was observed that the magnetic field seems to enhance the stability of lysozyme even further. This behavior can be observed when comparing assays 7, 10, 11 treated with magnetic field and its respective counterpart 3, 12 and 13 (without magnetic field). All samples submitted to magnetic field treatment showed activity residual specific above of 98%, while some samples not magnetically treated presented a decrease in the activity around 27 %.

An increase in enzyme stability after magnetic exposure was also reported by Liu et al. (2010) who submitted  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* to a permanent magnetic field of 0.15 T. The magnetic field conferred to  $\alpha$ -amylase a tolerance to adverse pH, maintaining stable activity over a wide range (pH 4-8).



The results of the full  $2^3$  factorial design, with triplicates at the central point, were statistically treated with 90 % confidence using pure error, which assesses the three central points for the calculation of experimental error. The variables effect on the residual specific activity of lysozyme was presented in the Pareto chart (Figure 12).

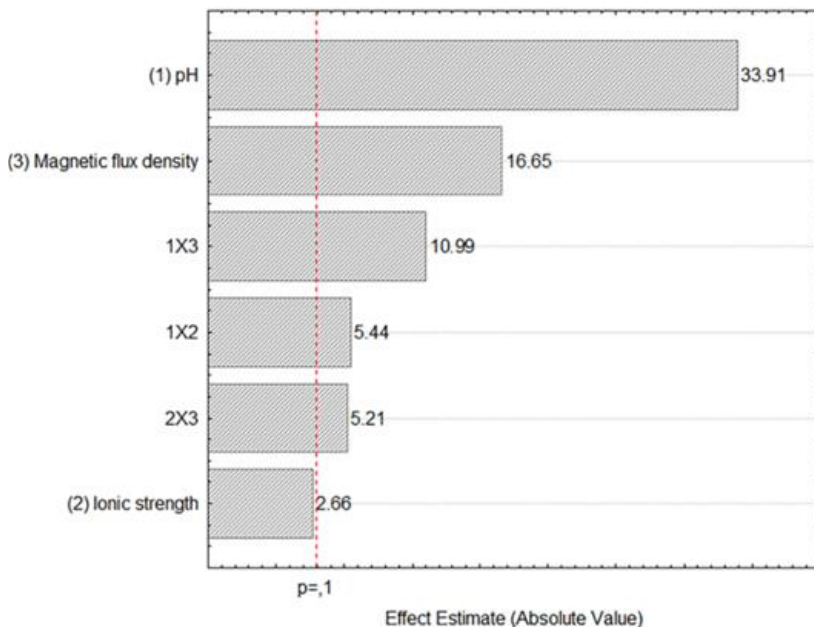


Figure 12 – Pareto chart with the estimated effects of pH, magnetic flux density and ionic strength on the residual specific activity of lysozyme ( $p < 0.1$ ).

Figure 12 shows that the residual specific activity of lysozyme was significantly influenced by the independent factors pH and magnetic flux density, and the interactions ionic strength (NaCl) x magnetic flux density, and pH x magnetic flux density. The pH and density of the magnetic flux presented higher effects and these are significantly positive ( $p < 0.1$ ), i.e., in the range studied, the increase in pH and in the magnetic flux density would result in an increase in the enzymatic activity of lysozyme. The parameters that were not significant at a 90% confidence level were added to the lack of fit in the analysis of variance.

Equation 2 shows the first order decoded empirical model to express the residual specific activity R.S.A (%) in function of the independent factor pH ( $X_1$ ) and the magnetic flux density ( $X_3$ ) and its interactions pH and flux density magnetic ( $X_1.X_3$ ) and ionic strength and magnetic flux density ( $X_2.X_3$ ):

$$\begin{aligned} \text{R. S. A. (\%)} = & 120.8 + 75.8X_1 + 28.6X_3 + 16.2X_1X_3 \\ & + 18.8 X_2X_3 \end{aligned} \quad (2)$$

The analysis of variance (ANOVA) presented in Table 4 was performed to verify the validity of the mathematical model. The F-tabulated (3.18) was obtained from the F-distribution table with a significance level of 90%, degrees of freedom for residue 6 and degrees of freedom for regression 4. The analysis of variance, correlation coefficient (0.9) and F-calculated (1.4 times greater than the F-tabulated) validate the model shown in Equation 2.

Factor	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squared	F calculated
Regression	15043.2	6	2507.2	4.4
Residue	2303.8	4	575.9	
Lack of fit	2285.1	2		
Pure error	18.7	2		
Total	18879.5	10		

Residue = Lack of fit + pure error; Correlation coefficient  $R = 0.9$ ;  $F_{\text{tab}, 90\%} = 3.18$ .

Table 4 – Analysis of variance (ANOVA) to validate the mathematical model describing the specific activity relative (%) of lysozyme.

## 4.2 Effect of magnetic field on the zeta potential of lysozyme solution

Zeta potential was performed to evaluate changes in the magnitude of the repulsion or electrostatic attraction of lysozyme charges in solution, resulted from the application of different treatments (Table 1). Table 1 shows that the magnetic field did not change the zeta potential of the lysozyme solution, while the increase of pH and ionic strength (by the addition of NaCl) made this potential more negative. This behavior can be related to the Pareto chart shown in Figure 13.

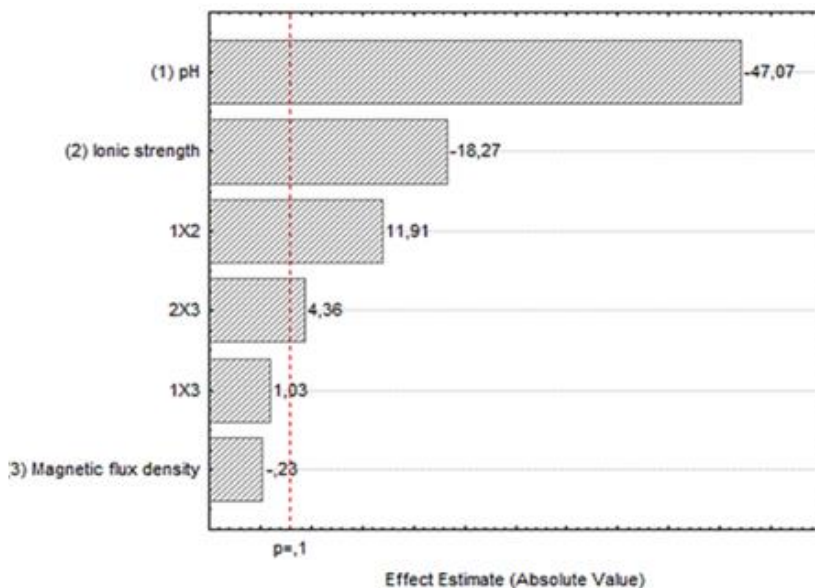


Figure 13 – Pareto chart with the estimated effects of pH, magnetic flux density and ionic strength on the zeta potential.

The negative influence ( $p < 0.1$ ) of pH and ionic strength on the zeta potential of lysozyme is consistent with literature, as according to Valino *et al.* (2014), the zeta potential decreases more rapidly as the ionic strength increases, because the electric double layer is compressed toward the surface by the concentration of ions present in solution. These authors have investigated the influence of ionic strength, by addition of KCl, on the zeta potential of bovine serum albumin and lactoferrin. The effect of KCl concentration on the zeta potential was more significant for lactoferrin and they observed a reduction in the zeta potential with increasing in ionic strength, as occurred in the present work.

The isoelectric point of lysozyme, which is at pH 10.7 in native conditions, was also changed with increasing in ionic strength. This behavior can be seen by comparing the assay 1, where at pH 9 without NaCl addition this potential is positive ( $\zeta = 12.4$ ) and the assay 5, where the addition of 50 mmol/L NaCl resulted in negative zeta potential ( $\zeta = -2.09$ ). The same behavior was reported by Schultz *et al.* (2008), which found significant differences in zeta potential and

isoelectric point of the lipase A from *Candida Antarctica* (CALA) in different environmental conditions.

In addition, pH adjustment of the solution is considered the main factor affecting the zeta potential. If a particle is in suspension with a negative zeta potential and more alkalis added, the particles tend to acquire more negative charges (MALVERN INSTRUMENTS, 2004). Lysozyme contains 14 acid groups and 19 basic groups along its chain of 129 amino acid residues (SHAREGHI et al., 2014). As the solution becomes more basic, the acidic residues tend to deprotonate, resulting in a negative zeta potential of the lysozyme solution.

Although the zeta potential results not changed with the magnetic field application, it seems that the magnetic field action has a greater effect on enzymatic activity in the solutions of lysozyme with more negative zeta potential (assays 2, 4, 6 and 8). At the more negative zeta potential ( $\zeta$  -20.0, assay 8) the largest R.S.A was found.

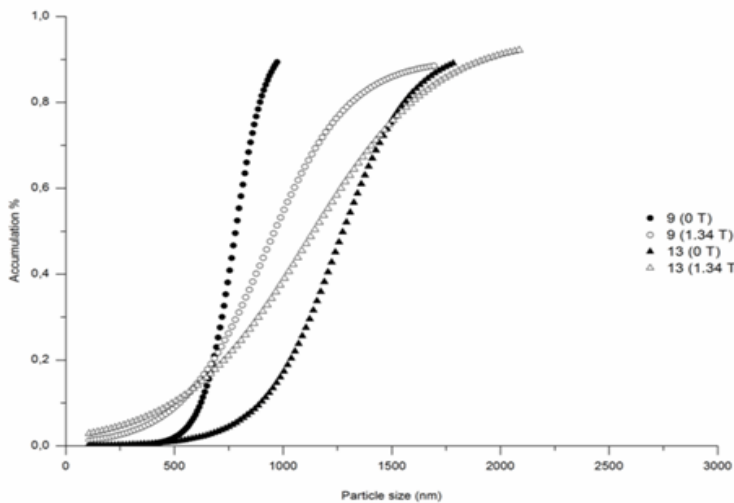
Biological systems are made of groups of components sensitive to application of external magnetic field, such as ions, free electrons and molecules with magnetic moments. Proteins with  $\alpha$ -helical secondary structure, such as lysozyme, when exposed to a magnetic field receive different amounts of torque, resulting in a certain movement (ALBUQUERQUE et al. 2016; TENG, 2005). Probably, the lysozyme solution of test 8, which presents a greater surface charge, suffered higher anisotropy. The diamagnetic anisotropy can produce subsequent effects, such as structural changes and changes in enzyme reactions (ALBUQUERQUE et al., 2016).

However, other assays (2, 4 and 6) also presented zeta potential similar to the test 8 but enzyme activities up to 56% lower. Based on this issue, the effect of the magnetic field for conditions of higher pH and ionic strength may be related to other factors, such as particle size and  $\alpha$ -helix content, that will be discussed below.

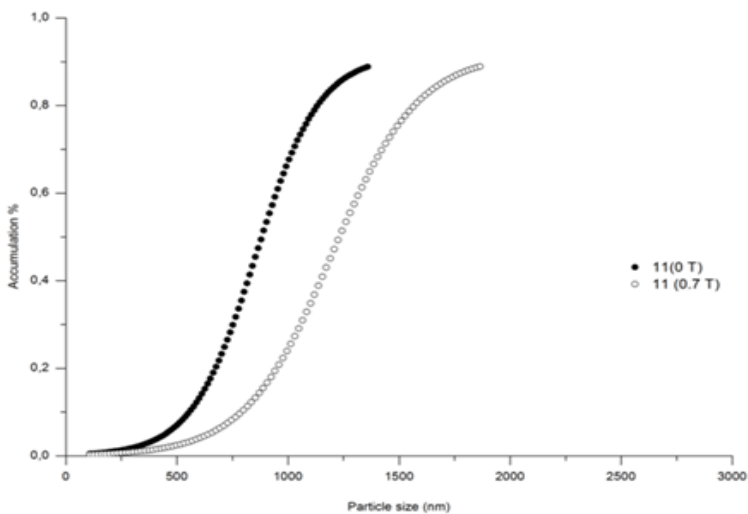
### 4.3 Effect of magnetic field on the particle size of lysozyme solution

Figure 14 shows the particle size distributions obtained for each trial of the experimental design as a function of the independent factors pH, ionic strength and magnetic flux density. It can be observed that the size of the lysozyme in solution increases with increasing pH and the magnetic flux density of 1.34 T (Figure 14a and 14c). However, the combination of the lowest magnetic flux density

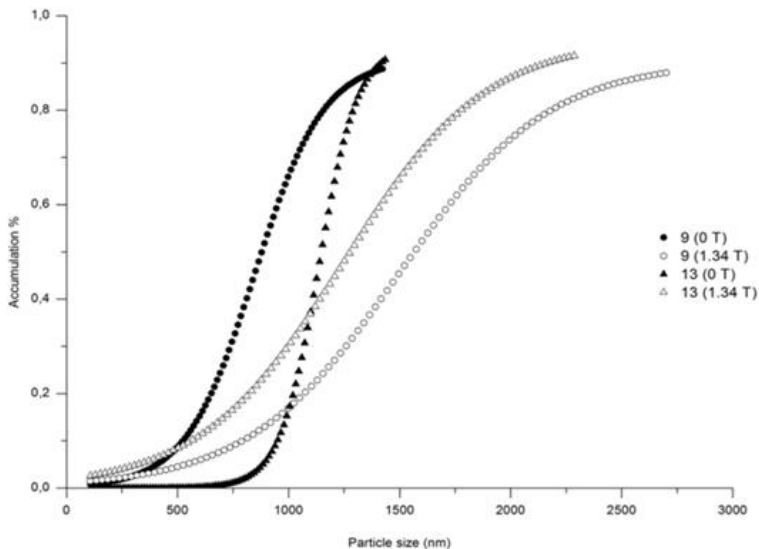
(0.7 T) at intermediate pH values (11) and ionic strength (25 mmol/L) did not cause changes in particle size of lysozyme (Figure 14b).



(a)



(b)



(c)

Figure 14 – Particle size distribution as a function of pH, magnetic flux density and ionic strength: (a) 0 mmol/L, (b) 25 mmol/L, and (c) 50 mmol/L.

The assay that showed the highest average particle size (1574 nm) was the test 7 with ionic strength of 50 mmol/L, magnetic flux density 1.34 T and pH 9 (Figure 14c). The zeta potential values (Table 4) of this lysozyme solution (test 7) was the lowest absolute value of zeta potential ( $\zeta = 2.1$ ), close to the value for its isoelectric point ( $\zeta = 0$ ). According to DLVO (Derjagin, Landau, Verwey and Overbeek) theory, when the protein does not present charge, repulsive forces are minimal and the proteins are not prevented from agglomerating. This observation agrees with Schultz et al. (2008) that investigated the size of CalA enzyme at different pHs. The authors noted that when the pH was close to the isoelectric point of the enzyme, the particle size considerably increased.

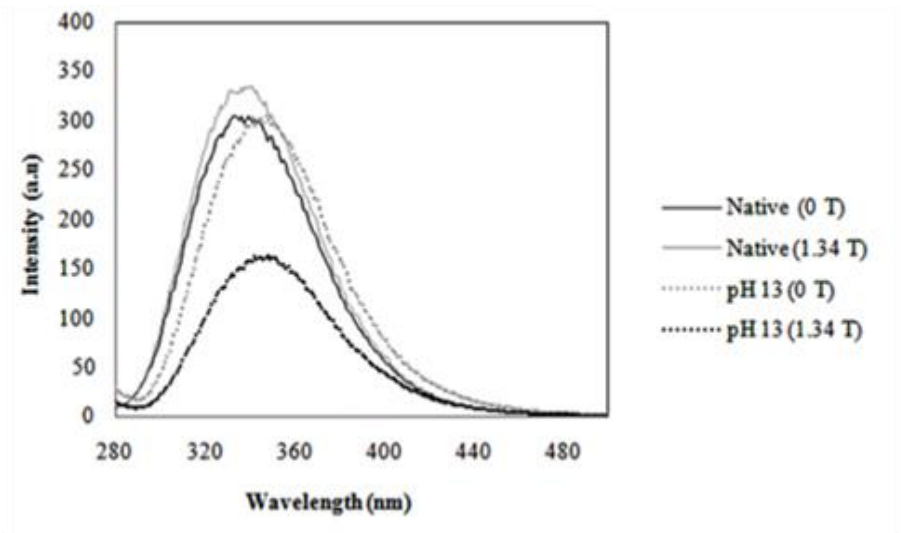
The magnetic field caused an increase in the mean particle size of lysozyme for all assays. While the high magnetic flux density (1.34 T) caused an increase about 50% in average particle size (Figure 14a and 14c), the magnetic field of 0.7 T caused an increase about of 34% (Figure 14b).

In this work, the treatment with magnetic field (1,34 T) at pH 13 and 50 mmol/L de NaCl (the best condition in terms of enzyme activity) promoted an increase in the average particle size of 880 to 1300 nm. The change in particle size is a typical phenomenon in different enzymes treatments. For example, Du et al. (2011) studied the effect of supercritical CO<sub>2</sub> on the production of lysozyme microparticles. When these authors applied pressures (8.5-12 MPa) they observed an increase in the particle size of lysozyme with an average size of 1400 nm, similar result with the present study.

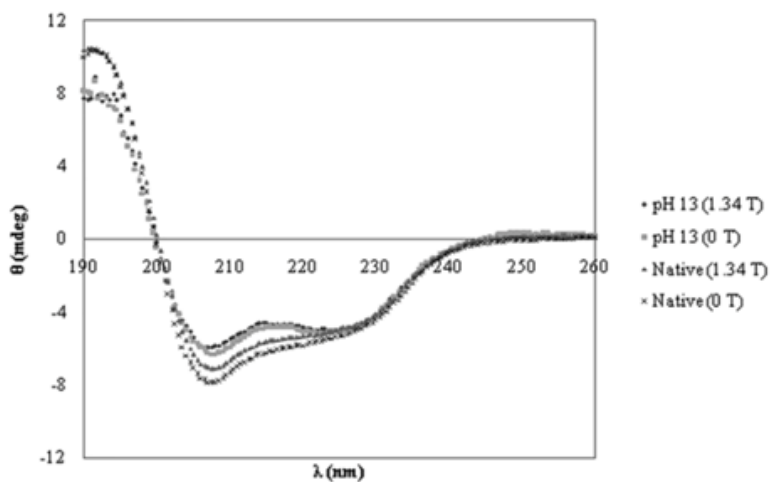
The results of the present study indicate that the combination of factors alkaline pH (13) and higher magnetic flux density (1.34 T) may have caused a partial unfolding of the lysozyme structure, generating a larger average particle size after exposure to the magnetic field. Thus, the amino acid residues that are partly deprotonated at this pH were more exposed and accessible to the action of the magnetic field. To confirm this observation, CD and fluorescence analyzes were performed.

#### **4.4 Effect of magnetic field in the fluorescence and circular dichroism of lysozyme**

Based on the results of the experimental design, experiment 8, which showed the largest increase in the enzymatic activity (1.34 T, pH 13 and 50 mmol/L NaCl), was chosen for fluorescence (Figure 15a) and CD (Figure 15b) measurements, comparing with the control assay (without exposure to the magnetic field) and with the native lysozyme solution (with and without exposure to magnetic field).



(a)



(b)

Figure 15 - Fluorescence emission spectra (a) and CD analysis (b) for: native pH lysozyme (control run, 0 T), native pH lysozyme exposed to 1.34 T field density, lysozyme at pH 13 (control run, 0 T) and lysozyme at pH 13 exposed to 1.34 T field density.



The emission spectrum of the lysozyme solutions (Figure 15a) shows maximum fluorescence intensity at 341 nm for all the experiments, which is similar with reported by Raja and Dasgupta (2012). In addition, was observed that the intrinsic fluorescence intensity of lysozyme in the maximum pH decreased 51% with the application of magnetic field.

In recent study, Shamin et al. (2008) reported that tryptophan (Trp) show memory of permanent magnetic field. The presence of permanent magnetic field cause re-alignment of existing spins altering the spins states. Since 80% of the intrinsic fluorescence of lysozyme is originated from Trp 62 and Trp108 at the active site (RAJA; DASGUPTA, 2012) changes in the fluorescence intensity with the application of magnetic field were expected.

According to Shamim et al. (2008), as the conformational stability of lysozyme molecules is high, large changes in the structure are not probable when there is no apparent change in the peak position of emission curve. However, the reduction in the fluorescence intensity detected in the present study seems to be sufficient for changing the microenvironment of tryptophan, causing an increase in enzymatic activity of lysozyme exposed to magnetic field.

Figure 15b shows that the CD spectra of all lysozyme samples had characteristic bands of  $\alpha$ -helix structure at 208 nm. The  $\alpha$ -helix contents for the native lysozyme without exposure to magnetic field (0 T), native lysozyme submitted to magnetic field (1.34 T), lysozyme in the highest pH (13) and magnetic field (1.34 T) and lysozyme at the highest pH (YU et al., 2014) without magnetic field were 32%, 29%, 26% and 24 %, respectively.

At pH 13 and highest magnetic field (1.34 T), changes in secondary structure were more pronounced, with 25% loss of secondary structure compared to the native lysozyme. The decrease in the  $\alpha$ -helix content was followed by strong activation of the enzyme (R.S.A 212 %). Similar results were found by Lopes et al. (2015), who studied the effects of conventional heating and microwave on the structure and activity of peroxidase. The secondary structure was analyzed by CD and, when the  $\alpha$ -helix content was reduced in 22%, for conventional heating treatment at 40° C for 12 h, the enzyme activity was increased. The authors explained that the increase in the enzymatic activity was a consequence of the lower  $\alpha$ -helix content, since the substrate access to the active site of peroxidase was facilitated.

In the study of Ran et al. (2009) CD was investigated for cellulase after exposure to magnetic field. The magnetic fields effect on cellulase activity was evident, with increased by 37.01% compared with the control experiments, in addition, these best results were followed by changes in the CD spectra. The peak position and peak height changed according to the magnetic flux density applied.

#### **4.5 Conclusions**

Results showed that application of the magnetic field at high magnetic flux density (1.34 T), pH (13) and ionic strength (50 mmol/L) resulted in an increase of 56% in the enzymatic activity when compared with the control sample, which was not exposed to the field. Also, the results suggest that the activation of lysozyme caused by treatment under magnetic field may be related to the reduction of  $\alpha$ -helix in secondary structure and with increasing in particle size, facilitating the access of substrate to the enzyme active site. Hence, the application of a static magnetic field in industrial processes can be an attractive alternative to the increase of enzyme activity.

## 5 MAGNETIC FIELD ON ULTRAFILTRATION

### 5.1 Summary of assays

To facilitate the understanding of the different UF assays, according to application or not of the magnetic field and the presence or not of NaCl, specific codes were created. Table 5 shows the respective codes.

Code	NaCl (mM)	Membrane induction	Solution induction
SC-0	0	No	No
SC-50	50	No	No
CM-0	0	Yes	No
CM-50	50	Yes	No
CS-0	0	No	Yes
CS-50	50	No	Yes
CMES-0	0	Yes	Yes
CMES-50	50	Yes	Yes

Table 5 – Summary of codes.

### 5.2 Zeta potential of solutions

The zeta potential is an indicator of the particles charges. This potential decreases more rapidly as the ionic strength increases, because the double electric layer near the surface is compressed towards the surface by the concentration of ions present in solution (VALINO et al. (2014) and SCHLÜTER (2014)). The zeta potential responses of lysozyme solutions, with and without addition of NaCl (50 mmol/l), as a function of pH is shown in Figure 16. Based on the results of Prado et al. (2017) who showed that static magnetic field has no significant effect on

the lysozyme solutions zeta potential, the zeta potential curve for the solutions magnetically treated was not evaluated.

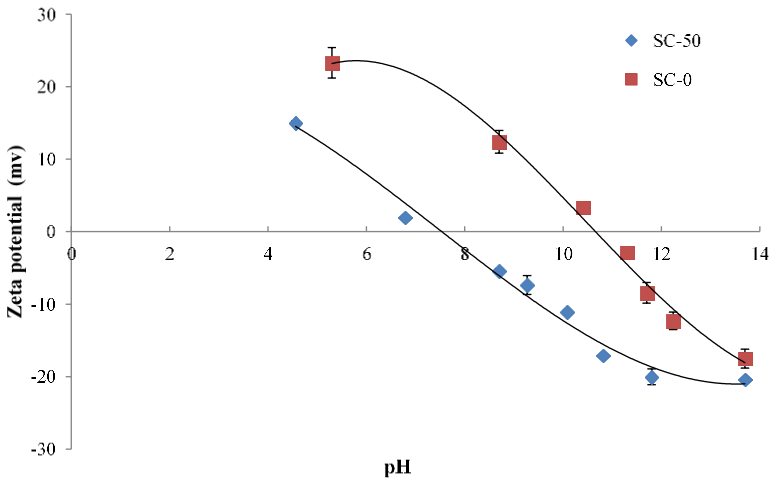


Figure 16 – Zeta potential of the lysozyme solutions, with and without addition of NaCl 50 mmol/l (SC-50 and SC-0, respectively), as a function of pH.

From this figure it can be seen that the addition of the NaCl electrolyte (50 mmol/l) not only reduced the zeta potential of the lysozyme solution but also its isoelectric point. According to Torreggiani et al. (2005) native lysozyme presents pI at pH 10.7 and a very similar value was obtained in this study (pH 10.8) for the enzyme solution without addition of electrolyte. On the other hand, in the solution with NaCl addition the isoelectric point displaced to pH 8.3.

Valino et al. (2014) studied the operational conditions that would lead to maximum separation of bovine serum albumin and lactoferrin proteins by ultrafiltration. The reduction in the isoelectric point of proteins after addition of different electrolytes (NaCl, HCl and CaCl<sub>2</sub>) was also observed. For the 0.1 mol/l of HCL addition, for example, the lactoferrin pI was altered from pH 9.3 to pH 5.7.

### 5.3 Zeta potential of membranes

The presence of surface charges on the PES membranes (UH030) and the effect of the magnetic field on these charges were

investigated by the determination of membrane zeta potential x pH (Figure 17).

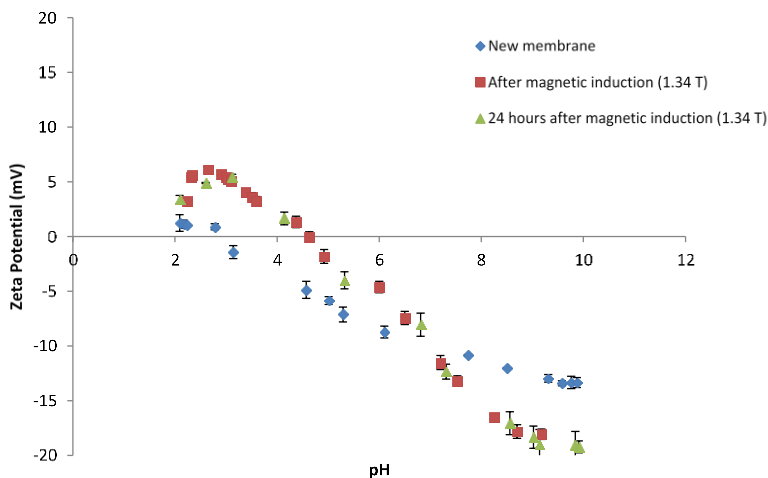


Figure 17 – Zeta potential of the PES membranes before and after magnetic induction as a function of solution pH.

The PES membranes without magnetic induction presents isoelectric point approximately at pH 3. After the exposure of membranes to 1.34 T magnetic field for 12 hours, it was observed that the isoelectric point displaced ( $\zeta$  -17.8 at pH 9) when compared to the membranes without magnetic induction ( $\zeta$  -12 at pH 9). Results of membrane zeta potential, after 24 hours of exposure to the magnetic field, similar to those found immediately after magnetic induction, suggest that the field effect for the membrane studied was durable.

Similar results from those of the present study were observed by Schlüter (2014), which subjected reverse osmosis membranes to a static magnetic field of 480 Gauss (0.048 T) for 40 minutes, after about 100 hours of exposure, a reduction of only 1% of the effect of magnetic field was obtained. The effect perceived by Schlüter (2014) was the tendency of the isoelectric point of the magnetically induced membranes to shift to different pH values from those of the new membrane.

#### 5.4 Summary of characterizations

In order to facilitate the next discussions the results of membranes zeta potential, zeta potential and particle of lysozyme solutions are shown in Table 6.

Code	Particle size ( $\mu\text{m} \pm \text{nm}$ )	Solution zeta potential (mV)	Membrane zeta potential (mV)*
SC-0	$0.73 \pm 0.7$	$12.4 \pm 0.2$	$-11.2 \pm 2.4$
SC-50	$0.89 \pm 1.4$	$-5.8 \pm 0.9$	$-11.2 \pm 2.4$
CM-0	$0.73 \pm 0.7$	$12.4 \pm 0.2$	$-18.3 \pm 3.7$
CM-50	$0.89 \pm 1.4$	$-5.8 \pm 0.9$	$-18.3 \pm 3.7$
CS-0	$0.86 \pm 0.3$	$5.6 \pm 1.2$	
CS-50	$1.23 \pm 0.5$	$-2.7 \pm 0.5$	$-11.2 \pm 2.4$
CMES-0	$0.86 \pm 0.3$	$5.6 \pm 1.2$	
CMES-50	$1.23 \pm 0.5$	$-2.7 \pm 0.5$	$-18.3 \pm 3.7$

\*membrane zeta potential values at pH 9

Table 6 – Summary of characterizations.

Results shown in Table 6 demonstrate that the magnetic treatment increases the particle size of lysozyme solutions (0.73 to 0.86  $\mu\text{m}$  for assays without NaCl and 0.89 to 1.23  $\mu\text{m}$  for assays with NaCl). This increase can be justified by partially unfolding or aggregation of lysozyme. As lysozyme solutions present a zeta potential very close to pI (pI = 0), in which lysozyme is not prevented from aggregating (VARMA et al., 2017; WAN; LU; CUI, 2006). Based on these observations, and knowing that the molecular mass of the solution influences significantly on the permeate flux and in occurrence of incrustations, it is extremely important to investigate this hypothesis.

## 5.5 Lysozyme activity

The lysozyme activity stayed above 80% of the native enzyme activity ( $114 \pm 5$  kU/mg) for every assay. The enzyme activity was of 107, 113, 99 and 104 kU/mg for the assays SC-0, CS-0, SC-50, CS-50, respectively.

## 5.6 MALDI-TOF

Studies by native electrophoresis require the presence of charges in solutions. As the lysozyme solutions present zeta potential very close to zero, the molecular mass of lysozyme was studied by the MALDI-TOF technique. This technique is qualitative, sensitive to small changes in the molecular mass of proteins and allows a reliable and rapid analysis. As shown in Figure 18, in the mass spectroscopy results for lysozyme, it is possible to observe the presence of lysozyme dimers both in the control assay (SC-0) and in the magnetic treated assay (CS-0). The SC-50 and CS-50 assays, despite not shown in figure 18, have presented similar behavior.

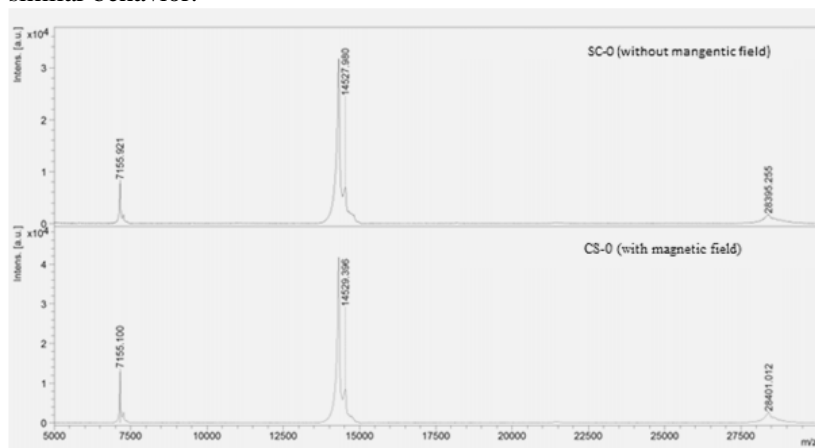


Figure 18 - MALDI-TOF of the lysozyme solutions.

Self-assembling of polypeptide chains to form ordered structures is a general property of protein systems. The protein-protein interactions that lead to the partial formation of dimers are a function of temperature (MINE; NOUTOMI; HAGA, 1990), pH, type and quantity of salt, ionic strength, protein concentration (GHARBI; LABBAFI, 2018;

PLACKEN; LOEY; HENDRICKX, 2006), and electric fields (PEREZ; PILOSOFF 2004). Matsuda et al. (1981) observed the fractional and step-wise aggregation of egg white proteins caused by heating at pH 9.

Perez and Pilosof (2004) analyzed egg white proteins treated with electric field strength of 25 kV/cm for 800  $\mu$ s by electrophoresis and found that aggregates were formed by covalent bonds. Wu et al. (1999) studied the circular dichroism spectrums and aggregation for lysozyme from egg white in the presence of 150  $\mu$ m of arsenic trioxide, pH 7,4 and 35 °C. The circular dichroism spectrums suggested that the changes in the lysozyme secondary structure, with significant reduction in  $\alpha$ -helix content and promotion of the  $\beta$ -sheet structure (partially untwisted conformation), triggered the aggregation processes.

The lysozyme aggregation observed in this study may have been triggered by the 2 hours recirculation of the solution in pH 9 (close to the pI), both in presence and absence of magnetic field before the ultrafiltration process. Despite the dimerization not having triggered significant losses in enzyme activity (enzyme activity superior to 99 kU/mg), it may have contributed to the retention of lysozyme on PES membrane surface.

## 5.7 Permeated flux

Normalized flux ( $J/J_i$ ) obtained by the ratio of lysozyme solutions flux and the initial ultrapure water permeate flux was used to reduce the usual variation among membrane samples from the same lot. Figure 19 shows the normalized permeate flux responses versus time for the different assays. In the figure, it is possible to observe a common behavior in UF processes, in which at the initial instants the lysozyme flux is larger, decreases with time, and stabilizes at the end of filtration.



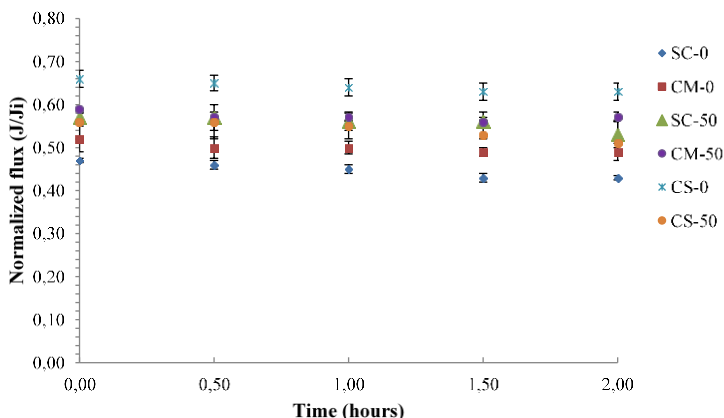


Figure 19 – Permeate flux of the lysozyme solutions (0 and 50 mmol/l NaCl), in relation to the initial ultrapure water flux ( $J/J_i$ ), in untreated PES membranes and after magnetic induction (1.34 T). Fixed conditions: magnetic induction of the membrane for 12 h, enzyme concentration of 0.5 g/l, pH solution of 9.

Similar behavior was reported by Zin et al. (2016), who studied ultrafiltration of bovine serum albumin (BSA) solutions in PES (50 kDa) membranes. For these authors, the permeate flux decreased rapidly at the beginning of the process because of concentration of polarization, whereas after 30 minutes of the process, the flux drop was less pronounced and can be justified by the occurrence of incrustation.

Table 7 shows the increase of the final permeate flux of the lysozyme solutions for the different UF assays. In this table, it is possible to observe that the application of magnetic field in the solution of lysozyme without addition of NaCl significantly influenced the permeate flux, resulting in an increase of 46.5% in this parameter. A similar result was found by Iriberry (2014), who evaluated the UF in PES membrane of BSA solution (2.5 g/l) using magnetic fields at different intensities, 0.7 T and 1.34 T. For the magnetic induction of 2 hours and 1.34 T, it was obtained a 42% increase in permeate flux in relation to the control test.

Assay	Normalized Flux (J/Ji)	Increase of Normalized Flux (%)
SC-0 <b>(control 1)</b>	0.43 <sup>a</sup>	-
CM-0	0.49 <sup>b</sup>	13.9
<b>CS-0</b>	0.63 <sup>c</sup>	46.5
CMES-0	0.55 <sup>b</sup>	27.9
<b>SC-50</b> <b>(control 2)</b>	0.53 <sup>A</sup>	-
CM-50	0.57 <sup>A</sup>	7.5
<b>CS-50</b>	0.51 <sup>A</sup>	-3.8
CMES-50	0.53 <sup>A</sup>	0

\*averages followed by the same letter do not differ by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

Table 7 – The increase of final permeate flux of the lysozyme solutions after the different treatments, in relation to the control trials.

From the results of Table 3 it is observed that in the UF tests of lysozyme solution with addition of NaCl (SC-50 and CS-50), there was no significant difference in permeate flux after magnetic treatment. It is also observed that the magnetic treatment of the membrane (CM-0 and CM-50) did not show a great influence on the normalized permeate flux responses, resulting in an increase of only 13.9% in the UF of lysozyme solutions without NaCl (CM-0). According to Wan, Lu and Cui (2006), the separation of proteins using UF is strongly affected by the operating conditions and the physical-chemical properties of the solutions filtered. The pH, ionic strength, zeta potential and particle size have a strong impact on the mass transfer of biomolecules within the porous membranes. When salt to solution was added, a significant reduction in the zeta potential of the solution occurred, which led to a lower electrostatic repulsion, not preventing lysozyme from aggregation. Zin et al. (2016) observed a lower permeate flux in UF of magnetically treated (0.7 T) BSA solutions when 0.5 M of NaCl was added. The presence of NaCl in the magnetically induced solution significantly increased the occurrence of fouling.

## 5.8 Retention coefficient

The retention coefficient (R), which corresponds to the membrane's capacity to retain molecules, was assessed for lysozyme solutions (molar mass cut-off 30 kDa) on UF membrane, and is shown in Figure 20. It is observable in Figure 20 that the values obtained for protein retention percentage after 2 hours of permeation were similar for all assays, peaking at 84% for CS-50. These results suggest that the magnetic treatment did not influence the protein retention by the membrane.

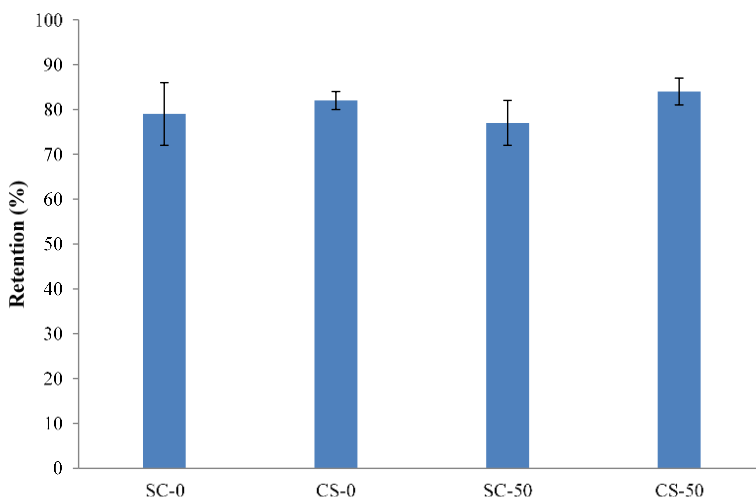


Figure 20 – Lysozyme retention for SC-0, CS-0, SC-50 and CS-50.

## 5.9 Recovery of permeate flux

Figure 21 shows the mean permeation recovery percentages for the different tests, with and without magnetic induction of the membrane and with and without magnetic induction of the lysozyme solution, after physical and chemical cleaning.

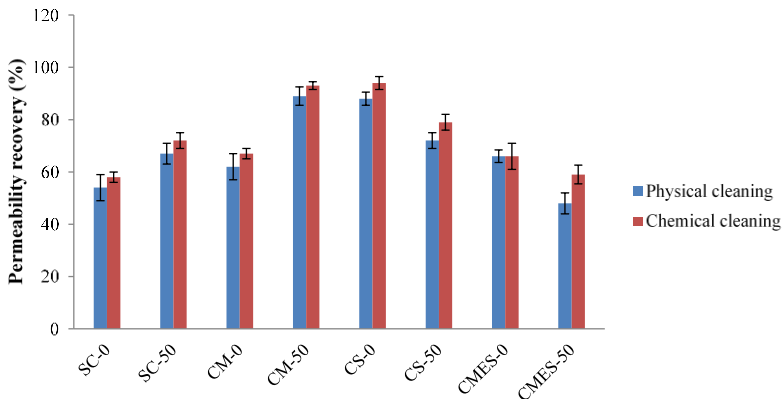


Figure 21 – Average permeability recovery of membranes, with and without magnetic induction, in the UF of lysozyme solutions, after physical and chemical cleaning.

After the cleaning procedures, one of the best permeability recovery occurred in the test CM-50 (membrane subjected to magnetic induction/12 hours), for the filtration of lysozyme with 50 mmol/l of NaCl, was obtained permeability recovery of 89%. It is known that the charges on the surface of the membrane are important for the control of incrustations (BAKER, 2004). The higher recovery of hydraulic permeability at CM-50 can be attributed to a higher electrostatic repulsion, between negatively charged lysozyme ( $\zeta = -5.63$ ) with more negative charges in the surface of the membrane ( $\zeta = -18.8$ ), reducing the adsorption in membrane surface.

Another test that showed excellent performance in permeability recovery was the CS-0. In this experiment, a permeability recovery of 88% after physical cleaning was obtained, 63% higher than the control sample without magnetic treatment. As the membrane is negatively charged ( $\zeta = -11.2$ ), less attraction occurs between the membrane and the magnetically treated protein solution (with lower zeta potential  $\zeta = 5.6$ ). Like the present study, Zin (2014), Irriberi (2015), and Silva (2015) observed in their UF studies that the application of the magnetic field on BSA solutions favored the increase of the permeability recovery after the physical and chemical cleaning procedures and that the magnetic field caused alteration on the zeta potential of BSA.

Different from the work of Prando et al., (2017), the magnetic treatment had a significant effect on the zeta potential of

lysozyme solution. The magnetic treatment (CS-0) caused a reduction in the zeta potential of the solution (from 12.4 to 5.6). These divergent results may be related to the different forms of solution exposure to the magnetic field, recirculating the solution and not by static exposure.

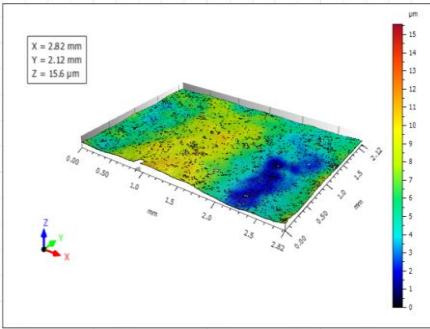
### 5.10 Optical interferometry

The numerical characterization of the surface by optical interferometry depends on the selection of roughness parameters, though  $S_a$  and  $S_q$  are the commonly used (STOUT; BLUNT, 2000). The Table 8 summarizes the responses to the selection of roughness parameters for the optical interferometry analysis. The roughness parameters selected in this paper were: (a)  $S_q$  which represents the quadratic mean of the distance from the points to a midline; (b)  $S_a$  which represents the mean absolute value of the height of the roughness in relation to a midline; (c)  $S_t$  which represents the difference between the highest peak and the deepest valley and (d)  $S_p$  which represents maximum peak height.

Test	$S_a(\mu\text{m})$	$S_q(\mu\text{m})$	$S_t(\mu\text{m})$	$S_p(\mu\text{m})$
SC new membrane	1.72	2.10	15.6	9.48
SC-0 – after filtration	2.27	2.70	18.4	6.54
SC-0 – after physical cleaning	2.36	2.93	17.3	7.32
CS-0 – after filtration	2.62	3.57	23.9	11.1
CS-0 – after physical cleaning	1.29	1.70	16.8	7.64
CM-50 – after filtration	4.20	5.40	28.7	11.2
CM-50 – after physical cleaning	2.31	3.22	25.1	16.6

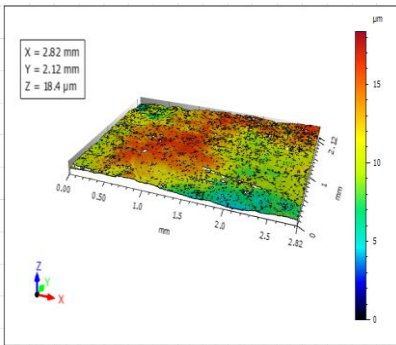
Table 8 – Summary of the roughness parameters selected for the optical interferometry analysis.

The Figure 22 demonstrates the results of optical interferometry after ultrafiltration of lysozyme solutions and after physical cleaning for controls and magnetically treated samples.

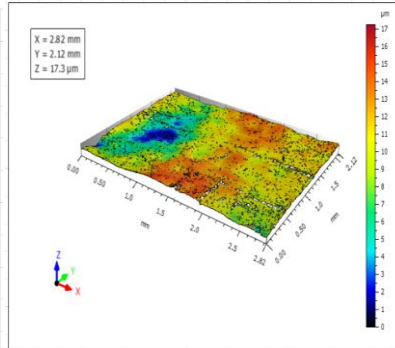


- (a) SC-0 – new membrane
- (b) SC-0 –after filtration
- (c) SC-0 –after physical cleaning
- (d) CS-0 –after filtration
- (e) CS-0 –after physical cleaning
- (f) CM-50 –after filtration
- (g) CM-50 – after physical cleaning

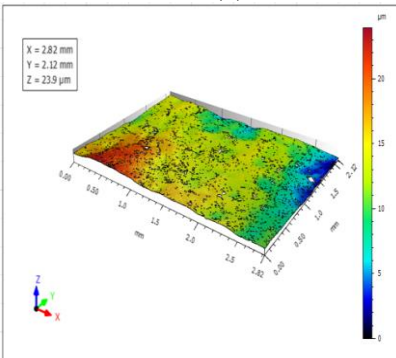
(a)



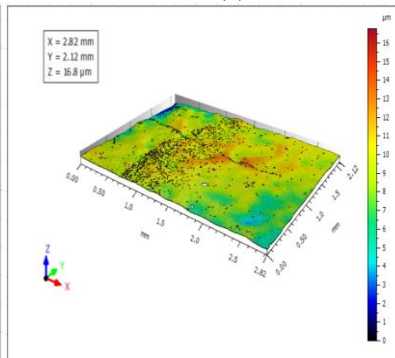
(b)



(c)



(d)



(e)

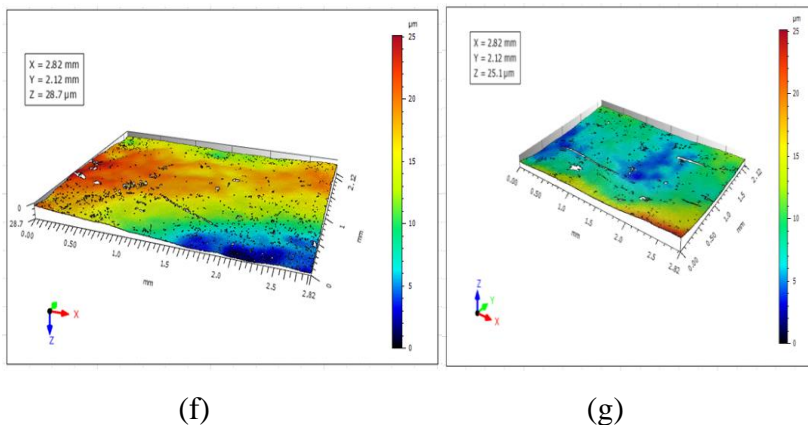


Figure 22 – 3 D optical interferometry of PES membranes.

By the surface profile of the PES membranes shown in Figure 22 it is possible to observe that the samples after ultrafiltration show predominance of peaks in relation to valleys. The predominance of peaks after ultrafiltration may be related to the occurrence of deposition of lysozyme on the surface of the membranes. In the CS-0 and CM-50 tests, with magnetic treatment in the solution and in the membrane respectively, the topographic profiles seem to confirm the physical cleaning efficiency in these tests, observed by the lower predominance of deposition peaks.

In Table 8 it is possible to reinforce the physical cleaning efficiency in the CM-50 and CS-0 magnetic treatments, due to the lower roughness values ( $Sa$ ,  $Sq$ ,  $St$ ) after cleaning procedures, while for the magnetically untreated test (SC-0) the roughness values ( $Sa$ ,  $Sq$ ,  $St$ ,  $Sp$ ) did not change significantly after physical cleaning. Both the topographic profiles and the roughness values corroborate with the permeate recovery responses presented in the previous session (Figure 22), wherein the magnetically treated (CM-50 and CS-0) trials presented high recoveries of permeate flux (close to 90%) after physical cleaning.

Since physical cleaning consists only of passing water through the membrane, an increase in permeability recovery at this stage leads to reduced time and usage of cleaning agents. Consequently, the use of the field can increase the life span of the membrane.

### 5.11 Cleaning recycles

Sequential steps, including fouling by lysozyme and physical cleaning with ultrapure water, are presented in Figure 23. These assays were made to evaluate the effects of the magnetic field on the cleaning recycles in the CS-0 test compared to the SC-0 test. Four cycles of ultrafiltration operation and physical cleaning were conducted. The permeability flux recovery for the assay CS-0 (submitted to the magnetic field), after four runs of lysozyme ultrafiltration, was almost 80%, while that of SC-0 (without magnetic treatment) was low in all the cycles. The physical cleaning efficiency of four cycles of ultrafiltration operation was only 43%. In comparison, the assay not submitted to magnetic field displayed much lower cleaning efficiency.

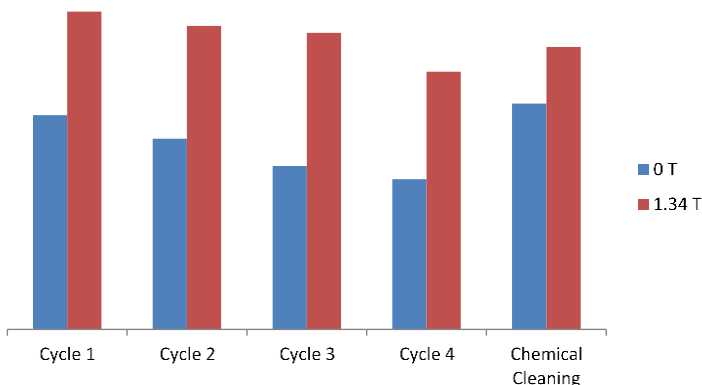


Figure 23 – Recycles of cleaning in the CS-0 (1.34 T) test compared to the SC-0 (0 T) test.

Mu et al. (2017) investigated the effect of L-Dopa functionalized halloysite nanotubes (LPDHNTs) on the structure and properties of cellulose acetate ultrafiltration. The ultrafiltered model solution was Egg albumin (EA). According to the authors, the surface of HNTs in neutral pH value and the membranes had strong negative charges, which effectively inhibit more negative EA adsorption, leading to higher antifouling performance and resulting in easy washing of the membrane surface and imparting high recyclability to the membranes.

It is important to remember that magnetic field treatment reduced the zeta potential of the lysozyme solution and that PES



membrane has negative pI (-11.2). In this way, the magnetic treatment of solution (CS-0) may have reduced the lysozyme adsorption on the PES membrane, which consequently made physical cleaning easier.

## **5.12 Conclusions**

The application of the magnetic field on the PES ultrafiltration membrane changed the isoelectric point of the membrane from 3.0 to 4.5, and at higher pHs the membrane surface acquired more negative charges. The membrane presents "magnetic memory", which can be observed by its maintaining of the zeta potential responses even after 24 hours of the magnetic treatment. Magnetic treatment of the solution resulted in a significant increase in the mean particle size of the lysozyme with addition of NaCl (0.89 to 1.23  $\mu\text{m}$ ). High permeability recoveries, up to 90% after physical cleaning, for CM-50 and CS-0 assays were obtained. In addition, the magnetic treatment allowed the re-use of the ultrafiltration membrane by successive cycles without the need of chemical cleaning, reducing time and process costs.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 Conclusões

Os resultados mostraram que a aplicação do campo magnético em alta densidade de fluxo magnético (1,34 T), pH (13) e a força iônica (50 mM) resultou em um aumento de 56% na atividade enzimática quando comparado a amostra controle, nas mesmas condições de pH e força iônica, mas que não foi exposta ao campo magnético. Os resultados sugerem que a ativação causada pelo tratamento com campo magnético pode estar relacionada com a redução do conteúdo de  $\alpha$ -hélice na estrutura secundária e com o aumento da dimensão das partículas de lisozima, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

A aplicação do campo magnético em membrana de ultrafiltração de PES alterou o ponto isoelétrico da membrana de 3,0, para 4,5, e em pHs mais altos a superfície da membrana adquiriu cargas mais negativas.

A membrana apresenta “memória magnética”, o que pode ser observado pela manutenção das respostas de potencial zeta mesmo depois de transcorridas 24 horas do tratamento magnético.

O tratamento magnético da solução resultou num aumento significativo do tamanho de partícula médio da lisozima com adição de NaCl (de 0,89 para 1,23  $\mu\text{m}$ ).

Altas recuperações de permeabilidade, de até 90% após a limpeza física, foram obtidas para os ensaios CM-50 e CS-0. Além disso, o tratamento magnético permitiu a reutilização da membrana de PES por ciclos consecutivos sem a necessidade de limpeza química. Como a limpeza física consiste somente na passagem de água pela membrana, a aplicação de campo magnético no processo de UF leva a uma redução do tempo de processo e a um menor uso de agentes químicos para limpeza, consequentemente, aumentando o tempo de vida útil da membrana.

### 6.2 Perspectivas para trabalhos futuros

- I. Estudar a modificação do pH da solução de lisozima pela adição de diferentes soluções tampão em pH alcalino;
- II. Investigar de forma aprofundada a formação de dímeros de lisozima no ponto isoelétrico;
- III. Estudar a influência de campos magnéticos nos parâmetros cinéticos da lisozima;

- IV. Estudar a inativação de bactérias gram-positivas (halo de inibição) da lisozima tratada magneticamente em comparação a lisozima nativa;
- V. Avaliar o efeito do tratamento magnético na atividade catalítica e no desempenho de UF de proteases comerciais e de outras enzimas com apelo para indústria de alimentos;
- VI. Estudar métodos para a ampliação da duração dos efeitos magnéticos nas soluções enzimáticas (por exemplo: imobilização das enzimas tratadas magneticamente).

## REFERÊNCIAS

- AGUILÓ-AGUAYO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effects of high-intensity pulsed electric fields on lipoxygenase and hydroperoxidelyase activities in tomato juice. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 8, p. 595–601, 2009.
- AGUILÓ-AGUAYO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoxidase inactivation. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 641–646, 2010.
- 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.
- ANDREOU, Varvara. et al. Comparison of the application of high pressure and pulsed electric fields technologies on the selective inactivation of endogenous enzymes in tomato products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 349–355, 2016.
- ARZENI, C. et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 463–472, 2012.
- AZEVEDO JR., W. F. **Crystallization of biological macromolecules**. São José do Rio Preto/SP: Department of Physics - University of São Paulo, 2004.
- BÁGUENA, M. J C. et al. Application of electric fields to clean ultrafiltration membranes fouled with whey model solutions. **Separation and Purification Technology**, v. 159, p. 92– 99, 2016.
- BAKER, Richard W. **Membrane technology**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- BATISTELLA, L. et al. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic

solvent system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 452–458, 2012.

BENELHADJ, S. et al. Properties of lysozyme/*Arthrospira platensis* (Spirulina) protein complexes for antimicrobial edible food packaging. **Algal Research**, v. 15, p. 43–49, 2016.

BHOMIA, R. et al. Investigation of the thermal and storage stability of bovine haemoglobin by ultra violet-visible and circular dichroism spectroscopies. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 242–248, 2016.

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

BURNS, Douglas B.; ZYDNEY, Andrew L. Buffer effects on the zeta potential of ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 172, n. 1-2, p. 39–48, 2000.

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, p. 57–62, 2006.

CANFIELD, R. E. The amino acid sequence of egg white lysozyme. **J. Biol. Chem.**, v. 238, p. 2698-2707, 1963.

CHANDRAPALA, J. et al. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 975–983, 2011.

CHEN, Dawei. et al. Enzyme and Microbial Technology Effect of sub- and supercritical CO<sub>2</sub> treatment on the properties of *Pseudomonas cepacia* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 2, p. 110–117, 2013.

COHEN, Y. Morphometric characterization of calcium sulfate dihydrate (gypsum) scale on reverse osmosis membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 252, p. 253-263, 2005.

DAEHWAN, C.; LEE, S.; FREY, M. W. Characterizing zeta potential of functional nanofibers in a microfluidic device. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 372, n. 1, p. 252–260, abr. 2012.

DEBEUCKELAERE, Wim. Legislation on food additives, food enzymes and flavourings in the European Union. **Current Opinion in Food Science**, n. 6, p. 49–52, 2015.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1058-1071, 2006.

DU, Z et. al. Supercritical fluid assisted atomization introduced by an enhanced mixer for micronization of lysozyme: particle morphology, size and protein stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 2, p. 258–268, 2011.

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

FREITAS, D. da. S. Extração, Purificação e Peglação de Lisozima. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo 2007.

FUENZALIDA, J. P. et al. On the role of alginate structure in complexing with lysozyme and application for enzyme delivery. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 239–248, 2016.

GHARBI, N.; LABBAFI, M. Effect of processing on aggregation mechanism of egg White proteins. **Food Chem.**, 2018.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108–4116, 1969.

GULEREZ, I. E.; GEHRING, K. X-ray crystallography and NMR as tools for the study of protein tyrosine phosphatases. **Methods**, v. 65, n. 2, p. 175–183, 2014.

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.

HILTON, J. E.; MCMURRY, S. M. An adjustable linear Halbach array. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 13, p. 2051-2056, 2012.

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.

IRIBERRI, O. N. Effect of magnetic induction on polymeric membrane ultra filtration performance. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

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

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

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current protein and peptide science**, v. 1, n. 4, p. 349–384, 2000.

KLOCKARS, M.; REITAMO, S. Tissue distribution of lysozyme in man. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 23, n. 932, 1975.

KUHN, G. D. O. et al. Synthesis of fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* commercial inulinase immobilized in montmorillonite pretreated in pressurized propane and LPG. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 3, p. 750–760, 2013.



KWAAMBWA, H. M.; MAIKOKERA, R. Infrared and circular dichroism spectroscopic characterisation of secondary structure components of a water treatment coagulant protein extracted from *Moringaoleifera* seeds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 64, n. 1, p. 118–125, 2008.

LEHNINGER, A. L. et al. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blüncher Ltda., 2001.

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, 2010.

LIU, Y.; CHEN, D.; YAN, Y. Effect of ionic liquids, organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment on the conformation and catalytic properties of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 123–127, 2013.

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.

LULLIEN-PELLERIN, V.; BALNY, C. High-Pressure as a tool to study some proteins properties: conformational modifications, activity and oligomeric dissociation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 3, p. 209–221, 2002.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nano Series User Manual**. Cambridge: Department of Biochemistry Biophysics Facility; University of Chambridge, 2004.

MANERA, A. P. et al. Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of [beta]-galactosidase. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1235–1240, 2011.

MATSUDA, T.; WATANABE, K.; SATO, Y. Heat-induced aggregation of egg white proteins as studied by vertical flatsheet polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 1829-1834.

MELGOSA, R. et al. Enzymatic activity and conformational and morphological studies of four commercial lipases treated with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 51–62, 2015.

MICHELS, P. C.; CLARK, D. S. Pressure effects on enzyme activity and stability at high temperatures. **Adv. Protein Chem.**, v. 48, p. 341-376, 1997.

MINE, Yoshinori; NOUTOMI, Tatsushi; HAGA, Noriyuki. Thermally induced changes in egg white proteins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, n. 12, p. 2122-2125, 1990.

MU, Keguang et al. Enhanced permeability and antifouling performance of cellulose acetate ultrafiltration membrane assisted by l-DOPA functionalized halloysite nanotubes. **Carbohydrate polymers**, v. 174, p. 688-696, 2017.

NAKAO, S. et al. Separation of proteins by charged ultrafiltration membranes. **Desalination**, v. 70, n. 1-3, p. 191-205, 1988.

NGAMDEE, K. et al. Circular dichroism sensor based on cadmium sulfide quantum dots for chiral identification and detection of penicillamine. **Analytica Chimica Acta**, v. 898, p. 93– 100, 2015.

OLIVEIRA, D. et al. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 3, p. 373–382, 2006.

PAVONI, J. F. et al. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 36, n. 4, p. 1-9, 2014.

PENG, Z. G.; HIDAJAT, K.; UDDIN, M. S. Adsorption and desorption of lysozyme on nano-sized magnetic particles and its conformational

changes. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 35, n. 3–4, p. 169–74, jun. 2004.

PEREZ, O. E.; PILOSOF, A. M. R. Pulsed electric fields effects on the molecular structure and gelation of b-lactoglobulin concentrate and egg white. **Food Res. Int.**, v. 37, p. 102-110, 2004.

PLANCKEN, I. V.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. E. Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: a kinetic study. **J. Food Eng.**, v. 75, p. 316-326, 2006.

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

PRANDO, L. T. et al. Characterization of the performance and catalytic activity of lysozyme from chicken egg submitted to permanent magnetic field. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 56, p. 9065-9071.

PRILUSKY, J. et al. Proteopedia: a status report on the collaborative, 3D web-encyclopedia of proteins and other biomolecules. **Journal of Structural Biology**, v. 175, n. 2, p. 244-252, 2011.

RAHMAN, N.; KHAN, S. Circular dichroism spectroscopy: an efficient approach for the quantitation of ampicillin in presence of cloxacillin. **Spectrochimica Acta-Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 160, p. 26–33, 2016.

RAJA, S. O.; DASGUPTA, A. K. Magnetic field induced self assembly and optical memory of pi-ring containing fluorophores. **Chemical Physics Letters**, v. 554, p. 163–167, 2012.

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, Bijan; GILL, Pooria. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses - a review. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101– 120, 2009.

RIENER, Joerg. et al. Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 402-407, 2008.

ROSEN, Arthur D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 39, n. 2, p. 163-173, 2003.

SAGERMANN, M.; MATTHEWS, B. W. Crystal structures of a T4-lysozyme duplication- extension mutant demonstrate that the highly conserved beta-sheet region has low intrinsic folding propensity. **Journal of molecular biology**, v. 316, n. 4, p. 931-940, 2002.

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

SANTOS, T. A. **Desenvolvimento e caracterização de bioplásticos a base de amido de jaca com incorporação de lisozima**. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2015.

SCHLÜTER, H. E. P. **Utilização do campo magnético no controle de formação de incrustações inorgânicas em membranas de osmose inversa no tratamento de águas com altas concentrações de sais**. 2014. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

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

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

SHAMIM, N et al. Adsorption, desorption, and conformational changes of lysozyme from thermosensitive nanomagnetic particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 320, p. 15-21, 2008.

SHAREGHI, B. Investigation the activity and stability of lysozyme on presence of magnetic nanoparticles. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 4–9, 2014.

SETHURAMAN, A. et al. Protein unfolding at interfaces: slow dynamics of alpha-helix to sheet transition. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 56, n. 4, p. 669-678, 2004.

SHUGAR, D. The measurement of lysozyme activity and ultraviolet inactivation of lysozyme Biochem. **Biophys. Acta**, v. 8, p. 302-309, 1952.

SILVA, F. L. **Efeito de campo magnetico sobre as características fisico-químicas de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) e seu desempenho na ultrafiltração**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

STOUT, K. J.; BLUNT, L. **Three dimensional surface topography**. London: Butterworth-Heinemann , 2000.

SULLIVAN, J. et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. **Food hydrocolloids**, v. 53, p. 386–396, 2014.

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.

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

TAVANO, O. L et al. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

TENG, H. C. A Puzzle of the Effect of Magnetic Field on Biological Cells. **Life Science Journal**, v. 2, n. 1, p. 16-21, 2005.

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

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

VALIÑO, V. et al. Accurate determination of key surface properties that determine the efficient separation of bovine milk BSA and LF proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 135, p. 145–157, 2014.

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

VARMA, N. et al. Structural perturbation by arsenic triggers the aggregation of hen egg white lysozyme by promoting oligomers formation. **Int J Biol Macromol.**, 2017.

VEDAVYASAN, C.V. Potential use of magnetic field a perspective. **Desalination**, v. 134, n. 1-3, p. 105-108, 2011.

VERCET, A. et al. Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 2, n. 2, p. 139-150, 2001.

YIN, D. C. Protein crystallization in a magnetic field. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 61, n. 1, p. 1–26, 2015.

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.

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

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

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

WAN, Yinhua; LU, Junren; CUI, Zhanfeng. Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 48, n. 2, p. 133-142, 2006.

WU, Jeffrey Chi-Sheng; LEE, En-hsien. Ultrafiltration of soybean oil/hexane extract by porous ceramic membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 154, n. 2, p. 251-259, 1999.





## APÊNDICE A – Artigo



Catalysis Communications  
Volume 116, November 2018, Pages 43-47



Short communication

## Effect of high pressure and magnetic field treatments on stability of *Candida antarctica* lipase B (CALB) and lysozyme from chicken egg

Lídia Tiggemann Prando <sup>a</sup>, Marina de Souza Melchiors <sup>a</sup>, Talyta Mayara Silva Torres <sup>a</sup>, Vanessa Almeida de Oliveira <sup>b</sup>, Josamaique Gilson Venerai <sup>a</sup>, Marcos Antonio Castiani <sup>a</sup>, Débora de Oliveira <sup>a</sup>, J. Vladimir de Oliveira <sup>a</sup>, Marco Di Luccio <sup>a</sup>  

 Show more

<https://doi.org/10.1016/j.catcom.2018.08.006>

[Get rights and content](#)

Stability of Lysozyme and Lipase submitted to high pressure and magnetic field treatment

*Lídia Tiggemann Prando<sup>a</sup>, Marina de Souza Melchiors<sup>a</sup>, Talyta Mayara Silva Torres<sup>a</sup>, Marcos Antonio Castiani<sup>a</sup>, Débora de Oliveira<sup>a</sup>, Marco Di Luccio<sup>a</sup>, J. Vladimir de Oliveira<sup>a\*</sup>*

<sup>a</sup>Chemical and Food Engineering Department – Federal University of Santa Catarina – EQA/UFSC – C.P. 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

\*Corresponding author: [jvladimiroliveira@gmail.com](mailto:jvladimiroliveira@gmail.com) (José Vladimir de Oliveira)

## 1 INTRODUCTION

Enzyme activity and stability depend on several factors, such as enzyme species, enzyme purity and the variables manipulated in the process (MANERA et al., 2011). The changes on the activity and the improvement of enzyme stability are important factors for the implementation of bioprocesses catalyzed by enzymes (MELGOSA, et al., 2015).

Researchers have focused their efforts on the emerging technologies, such as magnetic and electric field and high pressure treatments, because they are environmentally friendly techniques that can be applied to modulate the activity, stability and structural conformation of enzymes (REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007; YU et al., 2007; ATAK et al., 2007; LIU et al., 2010; MANERA et al., 2011; LIU et al., 2012; LIU; CHEN; TANG et al., 2015; MELGOSA, et al., 2015).

The use of high-pressure and magnetic field technologies are commonly known to cause protein denaturation (HEREMANS, 1982; MOZHAEV et al., 1996, RAN et al., 2009). However, some enzymes have been reported to perform better after these treatments (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009; MATSUDA, 2013).

Despite the changes in activity, conformation and enzymatic stability being important factors for the implementation of enzyme-catalyzed bioprocesses, there has been little investigation on how they are affected by the pressurized medium and the magnetic field.

Lysozymes are enzymes widely available in nature, with numerous industrial applications for their catalytic action on  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds between residues of N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine in a peptide glycan (FUENZALIDA et al., 2016). In the other hand, lipase from *Candida Antarctica B* (CaLB) is one of the enzymes most used in biocatalysis for the stereo selective conversion of secondary alcohols. It is very efficient for aqueous hydrolysis and esterification reactions in organic solvents (LUTZ, 2004; RABBANI et al., 2015). Making these enzymes (TORREGGIANI et al., 2005) ideal for the elucidation of effects after different treatments.

This study aimed to investigate the effect of the high pressure, magnetic field and operational variables on the stability of lysozyme extracted from chicken egg and *Candida antarctic* lipase B stored at 4 °C followed by the analysis of their tertiary structure by fluorescence spectroscopy.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials and Reagents

Hen egg-white lysozyme EC 3.2.1.17 and lyophilized cells of *Micrococcus lysodeikticus* were obtained from Sigma Chemical Co.

(St. Louis, USA). A liquid formulation of Lipozyme® CALB was supplied by Novozymes.

Sodium hydroxide (NaOH, purity ~98%), sodium phosphate monobasic anhydrous P.A. ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 98%), sodium chloride (NaCl, 99.5%) were from Vetec. 4-Nitrophenyl palmitate, 4-Nitrophenol and Sodium carbonate were purchased from Sigma-Aldrich. Ethanol P.A. was from Synth and sodium phosphate dibasic anhydrous P.A. ( $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$ , 98%) was obtained from NEON.

Water used in all experiments was ultrapure from Milli-Q Element system (Millipore Direct - Q 3 UV).

Carbon dioxide (99.9%) was purchased from White Martins S.A; LPG – propane (50.3 wt%), n-butane (28.4 wt%), isobutane (13.7 wt%), ethane (4.8 wt%), and other minor constituents (methane, pentane, isopentane, etc.) - was obtained from Petrobras; and R134a (1,1,1,2-tetrafluoroethane) with a purity of 100% was purchased from DuPont - Brazil.

All other chemicals used were of analytical grade.

## 2.2 Apparatus and experimental procedure

### 2.2.1 High Pressure Apparatus

The experimental apparatus employed to conduct the experiments is based on the static method (batches) in a high-pressure, variable volume cell (movable piston). In each experiment 6 mL of enzyme solution ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was loaded into the cell and the system was submitted to pressurization of 150 bar for 2 hours. The ionic strength of lysozyme was  $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  and depressurization rate was  $30 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 2.2.2 Magnetic Field Apparatus

Magnetic field tests were performed using permanent magnets of neodymium-iron-boron ( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ ).

The treatment of lysozyme solutions was conducted under two different conditions at room temperature ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). The first used two magnets of dimensions of 50 x 50 x 25 mm that generated a magnetic field of 0.7 T intensity and the second used magnets in Halbach's arrangement (HALBACH, 1980) generating a magnetic flux density of 1.34 T. To measure the magnetic flux intensity, a magnetic field transducer (model TMAG-1T, GlobalmagLtda, Brazil) was used.

For the lipase solutions, the magnetic treatments were conducted at  $65 \pm 2$  °C, with thermostatic bath, and 0.7 T magnets.

In each experiment 1.5 mL of liquid lipase or lysozyme solutions were treated for 2 hours in magnetic field. Immediately after treatment, enzyme stability studies were started.

### 2.3 Measurement of the lysozyme and lipase stability

The treated enzymes (lipase or lysozyme) were either stored at 4 °C (refrigerator) or frozen instantaneously in liquid nitrogen (-196 °C) and then storage at -10 °C. Analysis of enzymatic activity were performed in the first 0.5 h and then after every 1 hour, observing the behavior of the activity as a function of time. A control sample, that is, that was not submitted to treatment (high pressure or magnetic field) was analysed simultaneously under these same conditions.

All experiments were performed in duplicate, and the results expressed in terms of residual activity  $\pm$  standard deviation.

### 2.4 Lipase Activity

Lipase activity was determined taking into account absorbance alteration through time ( $\Delta A/t$ ). The reaction started after addition of 200  $\mu$ L of p-npp 0.5 % (w/v) in 20  $\mu$ L of enzymatic solution diluted in 20 mL of PBS 0.05 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7.0). The concentration of p-nitrophenol, after lipase hidrolisis, was determined by the UV-vis spectrophotometer (QUIMIS) set at 410 nm. The enzyme activity was defined in terms of residual activity (%) as described in equation (1). Considering  $U_0$  as the activity of the liquid lipase at native pH and room temperature and  $U$  as the activity of the lipase treated in the magnetic field or the control sample after 2 hours.

Residual Activity (%) =

$$\left(\frac{U}{U_0}\right) \times 100 \quad \% \quad (1)$$

### 2.5 Lysozyme Activity

The activity of lysozyme was measured according to Shugar (1952), using lyophilized cells of *Micrococcus lysodeikticus* as substrate. The residual activity (%) was defined as the ratio between the

activity of the untreated enzyme ( $U_0$ ) and that of the lysozyme treated with magnetic field or high pressure, such as in Equation 2:

Residual Activity (%) =

$$\left(\frac{U}{U_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

## 2.6 Spectroscopy Fluorescence

The samples were stored at 4 ° C until the moment of the analysis in order to maintain to the maximum the effect of the treatment in magnetic field or high pressure.

The fluorescence spectroscopy for lysozyme and lipase solutions, were measured every each 30 minutes during six hours using a fluorescence spectrometer (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer - Agilent Technologies).

For lysozyme the excitation wavelength was 270 nm and the emission wavelength was read at 280–500 nm. For lipase, different excitations and emission wavelengths were tested.

For both enzymes, the bandwidth of excitation and emission slits was set as 20 nm.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Stability of the lysozyme treated in high pressure

The study of storage stability becomes very important when evaluating the effects of modification on the enzymatic activity. It is interesting to evaluate the duration of effects, whether reversible or not, and the applicability of these effects in real situations of production and storage of products and inputs. For the industry, the applicability of any enzyme is judged by the knowledge of its stability (SRIVASTAVA et al., 2014).

In order to define the maintenance of the residual enzymatic activity after the high pressure treatment, under different storage conditions, samples were monitored for up to 6 hours for the following storage conditions: a) in a refrigerator at 4 °C, and b) frozen instantaneously in liquid nitrogen (-196 °C) followed by freezer storage at -10 °C. The results of the lysozyme stability before and after high pressure treatment, in residual specific activity (%), are shown in Figure 1.

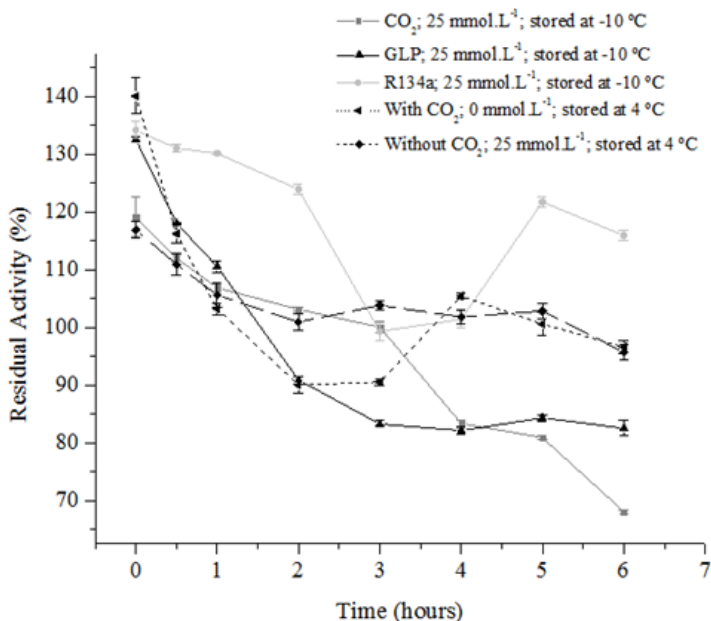


Figure 1 – Stability of the lysozyme treated with CO<sub>2</sub>/GLP/R134a without solvent in the samples stored for 6 hours at 4 °C and freezing in liquid N<sub>2</sub> (-196 °C) followed by storage at -10 °C.

It can be observed in Figure 1 that the enzyme treated with the different pressurized fluids lost activity gradually with the passage of storage time at low temperatures in all systems studied. The enzyme treated without the use of solvent in contact with the sample lost activity in the first hours of storage, but it maintained for 5 hours the residual activity above 100%. In the case of enzymes treated with scCO<sub>2</sub> as the solvent, the decrease of residual activity is slower over time, indicating that the interaction of CO<sub>2</sub> with the enzyme may have favored the stability of the stored enzyme.

The enzyme treated with R134a and then frozen in liquid nitrogen followed by storage in a freezer, had residual specific activity unchanged during the first hours of storage undergoing a sudden drop in 3 h and 4 h but reestablishing residual activity in the following hours.

Comparing the different storage methods at low temperature, there is generally a lower loss of residual activity when the enzyme underwent rapid freezing in liquid nitrogen. However, the

greatest lost of residual specific activity was observed in the enzyme treated with scCO<sub>2</sub> and frozen in liquid nitrogen, demonstrating that the behavior investigated for each system varies depending on the solvent and the manipulated variables in each experiment.

All the enzymatic treatments studied were reversible processes, that is, the enzyme returns to its initial conformation after a certain time. According to Anfinsen, 1973, non-covalent forces such as hydrophobic interactions, hydrogen bonding, ion pairing and Van der Waals forces maintain the native enzyme. When there is a change in temperature during the storage or process, some interactions can be disrupted and the protein may acquire another conformation or restructure to its native conformation, reflecting on the enzyme activity.

As seen, the fluorescence spectra for high pressure treated lysozyme (Figure 2) is characterized by a single peak at  $\sim 332$  nm  $\lambda_{max}$ , similar results were reported by Shamim et al., (2008) and Mandal and Ghosh (2016), which obtained maximum intensity at 339 and 338 nm, respectively, for lysozyme solutions extracted from egg white. In addition, it can be seen from Figure 2 that the intrinsic fluorescence intensity increased with storage time.

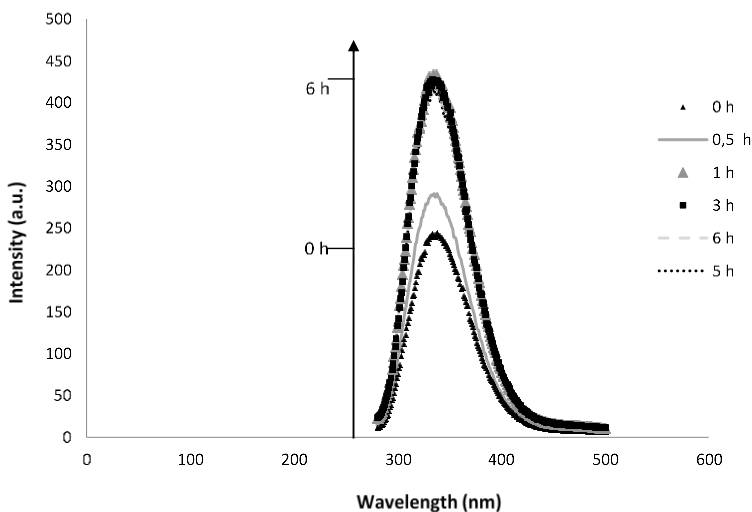


Figure 2 – Fluorescence emission spectra of lysozyme treated with CO<sub>2</sub>/GLP/R134a without solvent in the samples stored for 6 hours at 4 °C.

The behavior of alteration in the intrinsic fluorescence intensity presented in Figure 2 may be characterized by a transient structural modification of the enzyme treated by high pressure during the period of return and restructuring to its native state.

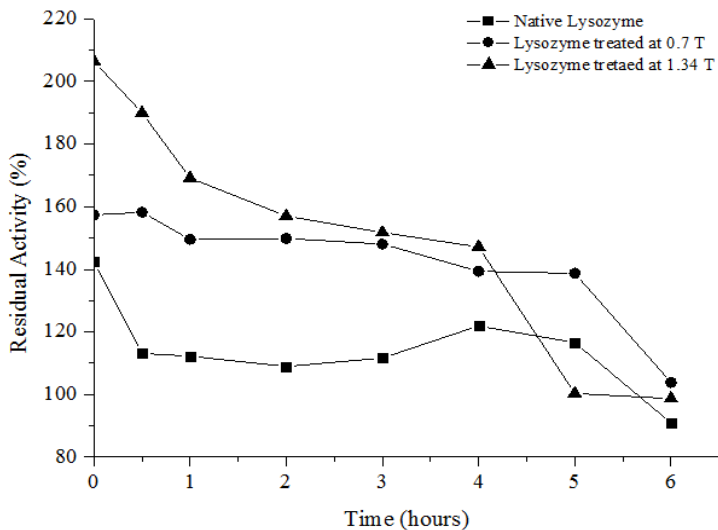
Zhang et al., (2012) and Liu et al., (2012) reported that the tertiary structure change, observed by spectroscopy fluorescence, was reversible on *Candida rugosa* Lip7 (CRL7) and phytoferritin, by supercritical CO<sub>2</sub> and hydrostatic pressure, respectively.

According Zhang et al., (2012) it is likely that, the effects of pressure depend on the experimental conditions and that supercritical CO<sub>2</sub> can interact with tryptophan and tyrosine of the protein by means of weak interactions.

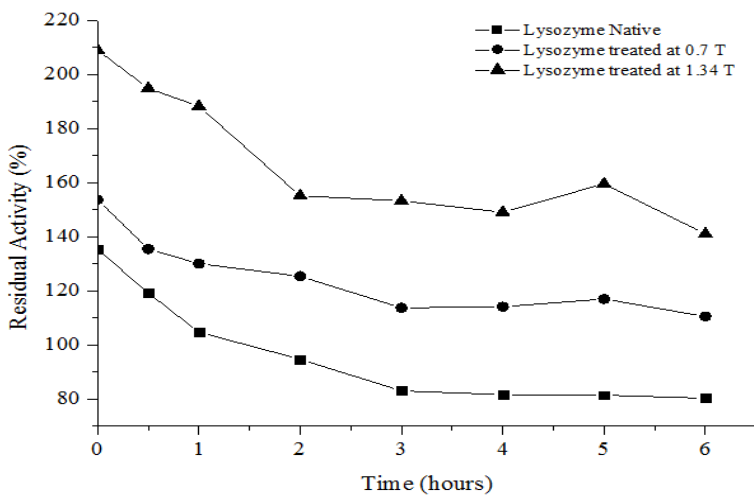
### 3.2 Stability of the lysozyme after magnetic field

Figures 3a and 3b present the stability studies of lysozyme at pH 13, before and after magnetic treatment (0.7 and 1.34 T), during storage at room temperature ( $25 \pm 2$  ° C) and refrigeration ( $4 \pm 2$ °C), respectively. It can be seen in Figure 3 that the magnetic field-treated lysozyme gradually loses activity over the storage time at room temperature (25 ° C), while the lysozyme stored at 4°C (Figure 4) loses activity more pronouncedly in the first 2 hours, but remains higher than 140% in the following hours (at pH 13 and 1.34 T). Such results are of great relevance since it is shown that the "magnetic memory" remains for a short time at room temperature and is prolonged at low temperature (4 °C). In the case of reactions at room temperature, the treatment of lysozyme with magnetic field would have to be used as a step of enzymatic activation, very close to the beginning of the reaction that it catalyzes.





(a)



(b)

Figure 3 - (a) Stability of the lysozyme native and treated with magnetic field stored for 6 hours at 25 °C and (b) stability of the lysozyme native and treated with magnetic field stored for 6 hours at 4 °C.

Liu et al. (2010) also performed a stability study to evaluate the action of the magnetic field on the activity of the  $\alpha$ -amylase enzyme immobilized on chitosan over time. The enzyme, diluted to  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  in phosphate buffer pH 7, was stored at  $4^\circ \text{C}$  and its activity evaluated every 5 days for 30 days. In this study it was observed that the non-exposed sample lost 50% of the initial activity, while the sample submitted to the  $10^4 \text{ T}$  intensity field only lost 19.4% of the activity.

The Figure 4 presented the fluorescence spectra for lysozyme solutions treated by magnetic field (1.34 T), stored at  $4^\circ \text{C}$ . The spectra's are characterized by a single peak at  $\sim 347 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}$ .

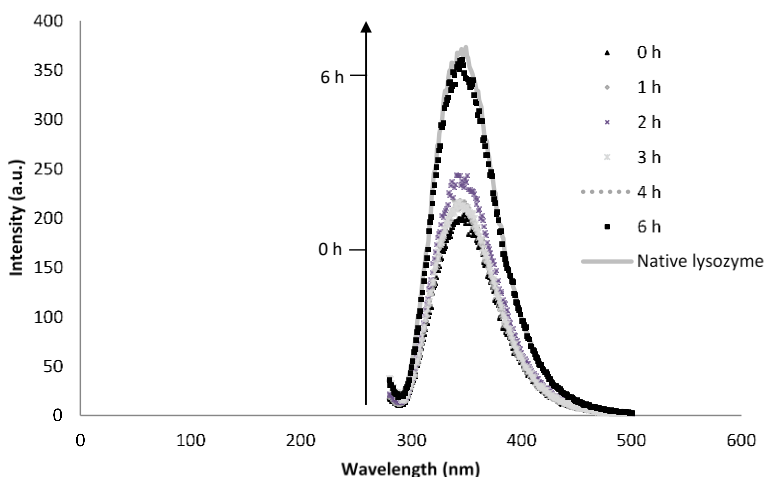


Figure 4 – Fluorescence emission spectra of lysozyme (pH 13) treated with magnetic field (1.34 T) stored for 6 hours at  $4^\circ \text{C}$ .

The fluorescence spectra of the magnetically treated lysozyme (Figure 4) exhibited a behavior similar to that of lysozyme treated at high pressure (Figure 2), with a typical behavior of a reversible effect. The intrinsic fluorescence of lysozyme treated at 1.34 T after 2 hours ( $4^\circ \text{C}$ ) of stored is very similar to untreated lysozyme (native state).

### 3.3. Stability of the lipase after magnetically field

A study of the lipase stability of *Candida antarctic* B diluted in phosphate buffer pH 7 (1:5) before and after static magnetic treatment

(0.7 T) at 65 °C, during storage at the cooling temperature ( $4 \pm 2$  °C), is presented in Figure 1. From the data in Figure 5, it can be seen that enzyme activity remained relatively stable over a period of 5 hours of storage in both the treated and control samples. The field activity increment was maintained (95%), showing the "magnetic memory" of the molecule, for the cooling temperature for a period of 5 hours of observation.

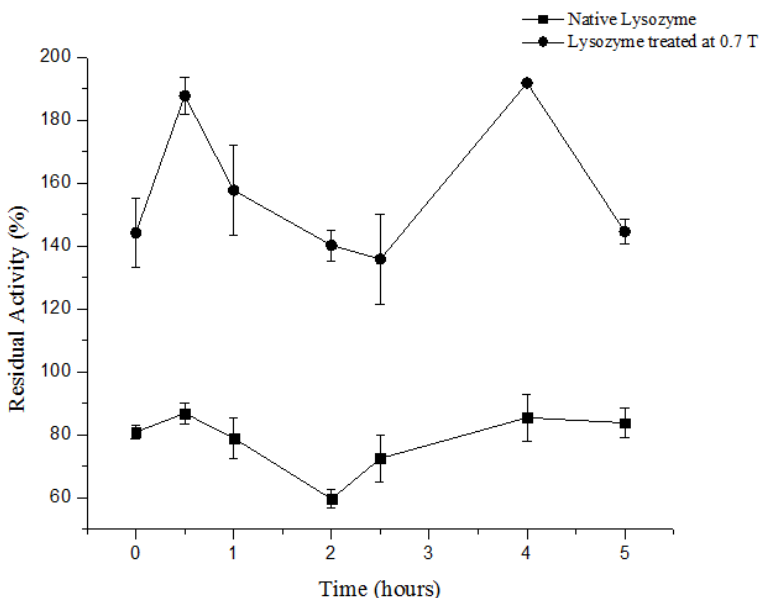


Figure 5 – Stability of CalB treated with magnetic field in the samples stored for 5 hours at 4 °C.

Similar stability results of the samples subjected to the magnetic field were described in the literature. Ran et al. (2009) evaluated the stability of cellulase for 10 days at 4 °C after magnetic treatment in fields of intensity of 0.15, 0.30 and 0.45 T with exposure time of 1-12 hours. The control sample lost about 35% of the initial activity, while the treated sample had no significant loss.

The liquid lipase used in this study is an enzyme protein solution in water with various additives, including salts and stabilizers. Because it is not a pure solution, the additives present in the liquid formulation may be interfering in reading the fluorescence spectrum of the desired fluorophore component (tryptophan), which may provide

information on the tertiary structure of the enzyme. As it stands, it would be interesting to carry out this analysis with the purified enzyme.

#### 4 CONCLUSIONS

The results presented in this article contributed significantly to the understanding of changes in the activity, stability and structural conformation of lysozyme and/or lipase after treatment by high pressure and magnetic fields.

This study shows that both the high pressure technology and the application of static magnetic fields, in the studied conditions, increased the activity of the investigated enzymes and that these increases are related to reversible changes in the level of tertiary structure. Because the effects are reversible, these technologies can be attractive as simultaneous pretreatment to the biocatalysis processes.

#### 5 REFERENCES

- [1] A. P. Manera, G. Kuhn, APolloni, M.Marangoni, G.Zabot,S. J. Kalil, D. de Oliveira, H.Treichel; J. V. Oliveira; M.A.Mazutti, F.Maugeri, Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of  $\beta$ -galactosidase, Food chemistry 125.4 (2011) 1235-1240.
- [2] R. Melgosa, M. T. Sanz, Á. G. Solaesa, S. L. Bucio, S. Beltrán, Enzymatic activity and conformational and morphological studies of four commercial lipases treated with supercritical carbon dioxide, The Journal of Supercritical Fluids 97 (2015) 51-62.
- [3] REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007.
- [4] Ç. Atak, Ö. Çelik, A. Olgun, S. Alikamanoğlu, A. Rzakoulieva,Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture, Biotechnology & Biotechnological Equipment 21.2 (2007) 166-171.
- [5] Y. Liu, S.Jia, J. Ran, S. Wu, Effects of static magnetic field on activity and stability of immobilized  $\alpha$ -amylase in chitosan bead, Catalysis Communications 11.5 (2010) 364-367.

[6] LIU, Y. et al. Enzyme and Microbial Technology Evaluation of structure and hydrolysis activity of *Candida rugosa* Lip7 in presence of sub- / super-critical CO<sub>2</sub>. v. 51, p. 354–358, 2012.

[7] Y. Liu, D. Chen, S. Wang, Effect of sub-and super-critical CO<sub>2</sub> pretreatment on conformation and catalytic properties evaluation of two commercial enzymes of CALB and Lipase PS, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 88.9 (2013) 1750-1756.

[8] J. Tang, W. Zhao, J. Chi, G.Liu, X. Yu, L.Bian, Effects of magnetic treatment on growth and immune and digestive enzyme activity in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), Aquaculture 435 (2015) 437-441.

[9] K. Heremans, High Pressure Effects on Proteins and other Biomolecules. Annual Review of Biophysics and Bioengineering 11.1 (1982) 1-21.

[10] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, C. Balny, High pressure effects on protein structure and function. Proteins: Structure, Function, and Genetics 24.1 (1996) 81-91.

[11] J. Ran, S. Jia, Y. Liu, S. Wu, Characterization of cellulase under various intensities of static magnetic fields, Catalysis Communications 11.2 (2009) 91-95.

[12] M. J. Eisenmenger, J. I. Reyes-De-Corcuera, High hydrostatic pressure increased stability and activity of immobilized lipase in hexane, Enzyme and Microbial Technology 45.2 (2009) 118-125.

[13] T. Matsuda, K. Watanabe, Y. Sato, Heat-induced aggregation of egg white proteins as studied by vertical flatsheet polyacrylamide gel electrophoresis, J. Food Sci., 46 (1981) 1829-1834.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04498.x>

[14] J. P.Fuenzalida, P. K.Nareddy, I. Moreno-Villoslada, B. M.Moerschbacher, M. J.Swamy, S. Pan, M. Ostermeier, F. M.Goycoolea, On the role of alginate structure in complexing with lysozyme and application for enzyme delivery, Food Hydrocolloids 53 (2016) 239-248.

[15] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, São Paulo: IMESP 4 (2004) 25-26.

[16] G. Rabbani, E. Ahmad, M. V. Khan, M. T. Ashraf, R. Bhatc, R. H. Khan, ImpactofstructuralstabilityofcoldadaptedCandidaantarctica lipase B (CaLB): in relationto pH, chemical and thermal denaturation, RSC Advances 5.26 (2015) 20115-20131.

[17] A. Torreggiani, M. Tamba, I. Manco, M. R. Faraone-Mennella, C. Ferreri, C. Chatgialiloglu, Radiation damage of lysozyme in a biomimetic model: some insights by Raman spectroscopy, Journal of molecular structure 744 (2005) 767-773. [19] A. Torreggiani, M. Tamba, I. Manco, M. R. Faraone-Mennella, C.Ferreri, C. Chatgialiloglu, Radiation damage of lysozyme in a biomimetic model: some insights by Raman spectroscopy, Journal of molecular structure 744 (2005) 767-773.

[18] K. Halbach, Design of permanent multipole magnets with oriented rare earth cobalt material, Nuclear instruments and methods 169.1 (1980) 1-10.

[19] SHUGAR, D. The measurement of lysozyme activity and ultraviolet inactivation of lysozyme Biochem.Biophys.Acta, v. 8, p. 302-309, 1952.

[20] G. Srivastava, K. Singh, M. Talat, O. N. Srivastava, A. M. Kayastha, Functionalized Graphene Sheets As Immobilization Matrix for Fenugreek  $\beta$ -Amylase: Enzyme Kinetics and Stability Studies, Plos One 9.11 (2014) 1-9.

[21] C. B. Anfinsen, Principles that govern the folding of protein chains, Science (Nobel Lecture) 181 (1973) 223-230.

[22] N. Shamim, H.Liang, K.Hidajat, M. S. Uddin, Adsorption, desorption, and conformational changes of lysozyme from thermo sensitive nanomagnetic particles, Journal of colloid and interface science 320.1 (2008) 15-21.

[23] B. Mandal, S. Ghosh, S. P. Moulik, Detailed characterization of lysozyme (Lyz)–surfactant (SDDS) interaction and the structural transitions, *New J. Chem.* 40.5 (2016) 4617-4624.

[24] T. Zhang, C. Lv, S. Yun, X. Liao, G. Zhao, X. Leng, Effect of high hydrostatic pressure (HHP) on structure and activity of phytoferritin. *Food Chemistry* 130.2 (2012) 273-278.