

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 22/03/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus Araraquara

Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

AGNES MAGRI

Extração e Purificação do Biofármaco Antileucêmico L-
Asparaginase (ASNase) utilizando Sistemas Aquosos
Bifásicos com Polímeros e Líquidos Iônicos

Araraquara – São Paulo

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS ARARAQUARA

Agnes Magri

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BIOFÁRMACO ANTILEUCÊMICO L-
ASPARAGINASE (ASNASE) UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS COM POLÍMEROS E LÍQUIDOS IÔNICOS**

**Araraquara
2019**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS ARARAQUARA

Agnes Magri

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BIOFÁRMACO ANTILEUCÊMICO L-
ASPARAGINASE (ASNASE) UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS COM POLÍMEROS E LÍQUIDOS IÔNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Biotecnologia Diagnóstica, Bioprodutos e Biofármacos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge F. B. Pereira

Araraquara

2019

M212e Magri, Agnes.
Extração e purificação do biofármaco antileucêmico L-asparaginase (ASNASE) utilizando sistemas aquosos bifásicos com polímeros e líquidos iônicos / Agnes Magri. – Araraquara, 2019.
162 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação Em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.
Área de concentração em Biotecnologia Diagnóstica, Bioprodutos e Biofármacos.

Orientador: Jorge Fernando B. Pereira.

1. L-asparaginase. 2. Líquidos iônicos. 3. Estabilidade. 4. Extração. 5. Purificação. 6. Sistemas aquosos bifásicos. I. Pereira, Jorge Fernando B., orient. II. Título.

*Dedico este trabalho à minha família e amigos que foram meu suporte para
todas as horas e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos,
E à memória do meu avô, Aparecido Magri, que passou por esta triste doença.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Clóvis e Lígia, e também meus irmãos, Renan e Victória, por cada palavra de incentivo e amparo durante toda esta caminhada. Sem vocês eu não teria conseguido.

A todos os amigos e familiares que me apoiaram. Especialmente à Camila Lopes, amiga dentro e fora do laboratório, que dividiu a família dela comigo para que eu não me sentisse tão distante de casa. E a sua vó, Thereza, que virou minha vó também e uma grande amiga. À Franciele G. Baveloni, que foi um grande alicerce nesta reta final, além de uma grande amiga para todas horas.

Ao professor Jorge F.B. Pereira, pela orientação e aprendizados durante todos esses anos.

Ao grupo BioPPul: à professora Valéria C. Santos-Ebinuma por sempre se fazer presente, e aos colegas de laboratório, Cassamo, Joyce, Nathália S., Nathália V., e em especial à Thainá, estudante de iniciação, pela ajuda no laboratório durante este período.

Ao professor João A. Coutinho e à investigadora Sônia, por me orientarem durante o período de intercâmbio na Universidade de Aveiro (UA), Portugal.

Aos professores Eduardo M. Cilli (Instituto de Química – UNESP/Araraquara), Gisele Monteiro e Carlota O. R. Yagui (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP/São Paulo) pela colaboração e por disponibilizarem o laboratório para a execução do projeto. À Marcela V. P. da Fonte pelo auxílio nas etapas de produção do biofármaco.

Ao grupo Path que me acolheu em Aveiro, em especial dois grandes amigos e colaboradores portugueses, Ana Maria Ferreira e João H.P.M. Santos, sempre levo vocês comigo nas memórias.

Às brasileiras, Fabiane, Melina, Alexys, Carol, Fernanda, Michele, minha família no exterior, não teríamos nos conhecido se não fosse essa oportunidade. Da UA para vida. Em especial, à Regina, uma grande amiga que ganhei para compartilhar viagens e experiências e que dedicou seu tempo a amparar todas nós no exterior.

Ao grupo que conheci durante os cursos do Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB), que apareceram no momento que mais precisava e me abriram novos horizontes e viraram grandes amigos. Em especial às professoras Larissa Goia, Pilar Rodríguez (UDELAR, Uruguai), Alejandro Orden (UNSL, Argentina), e aos amigos: Juan, Gonçalo, Anderson, Giulian, Breno, Leonardo, Fabiana, Carla, Antonela, Ariana, Julieta, Xiomara e Karyme, guardo todos em meu coração. Em especial, Katiany e Pâmela, duas grandes amigas e colaboradoras na área científica, que tive o prazer de conhecer.

A todos os funcionários da FCFar que diariamente tornam nosso trabalho mais fácil: o pessoal da limpeza, da portaria, da administração, da seção de pós-graduação, do apoio técnico. Especialmente aos técnicos, Ana Lúcia, Adriana,

Flávio, Matheus e Caio, e aos funcionários da FCFar: Percival, Dani, Cláudia, Vitor, Henrique, Adriano, por toda atenção e dedicação ao trabalho e a nós.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: processos nº 2014/16424-7, 2013/08617-7, 163292/2015-9 e 001.

A Deus por ter me cercado de pessoas tão maravilhosas.

"If you want to go fast, go alone. If you want to go far, go together."

Provérbio Africano

RESUMO

A L-asparaginase destaca-se como um importante biofármaco utilizado no tratamento de leucemia, além da sua utilização na indústria alimentícia. Seu alto custo de produção se deve principalmente às etapas de purificação, que correspondem em geral a mais de 70% do valor do produto final. Assim, novos processos de extração líquido-líquido, como a aplicação de Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs), surgem como técnicas alternativas de extração/purificação mais econômica e biocompatível. Nesse sentido, este trabalho avaliou um processo alternativo para a purificação de baixa resolução da enzima L-asparaginase (ASNase) utilizando-se SABs com polímeros e sais ou líquidos iônicos (LIs). Inicialmente, foi realizado um estudo comparativo de diferentes metodologias de quantificação da atividade da ASNase comercial, a fim de compreender as interferências dos métodos em diferentes condições, e assim estabelecer um método de quantificação adequado para determinação da atividade de ASNase nos SABs. A seguir, a estabilidade da ASNase foi avaliada frente aos diferentes componentes de fases dos SABs. Dessa forma, LIs derivados de colinas e polímeros foram testados como solventes alternativos na biocatálise, e a fim de compreender o efeito do tamanho da cadeia do ânion dos LIs sob a estabilidade da enzima, foram testadas soluções aquosas contendo as colinas com os seguintes ânions: cloreto ([Ch]Cl); acetato ([Ch][Ac]); propanoato ([Ch][Pro]); butanoato ([Ch][But]) e hexanoato ([Ch][Hex]). O aumento da cadeia alquílica do ânion teve um efeito negativo na atividade enzimática devido à maior afinidade desses compostos pela proteína, portanto, [Ch]Cl e [Ch][Ac] foram selecionados como os melhores solventes alternativos, mantendo a estabilidade e aumentando a atividade enzimática da ASNase. Estes LIs foram então avaliados como agentes formadores de fase em diferentes SABs. Quanto aos polímeros, avaliou-se a estabilidade e atividade da ASNase em soluções aquosas de polietilenoglicol de massa molecular média 600 g.mol^{-1} (PEG 600) e polipropilenoglicol de massa molecular média 400 g.mol^{-1} (PPG 400), e constatou-se que a ASNase se manteve estável e ativa, podendo esses polímeros serem também utilizados como agentes formadores de fase em diferentes SABs. Dessa forma, foram avaliadas inicialmente as capacidades extrativas de sistemas polímeros-sal/LIs usando como modelo a ASNase comercial. Os SABs testados foram capazes de concentrar a ASNase comercial, com eficiências de extrações $> 95\%$, podendo a partição da mesma ser totalmente controlada pela escolha apropriada da natureza do polímero ou sais/LIs utilizados. Por fim, os melhores SABs se mostraram plataformas promissoras para extração da ASNase a partir de lisado celular de *E. coli*. O conjunto de resultados mostraram que os SABs podem ser eficientemente aplicados na extração e purificação de biomoléculas complexas de interesse farmacêutico, com capacidade para serem utilizados como plataformas de integração dos processos *upstream* e *downstream* em modo contínuo e/ou semi-contínuo. Além disso, foi demonstrado que os LIs derivados de colinas podem ser utilizados como solventes alternativos na estabilização/ativação da ASNase, com grande potencial para serem utilizados em meios reacionais catalíticos ou sintéticos, para outras enzimas e moléculas, em processos industriais.

Palavras-chaves: L-asparaginase; líquidos iônicos; estabilidade; extração; purificação; sistemas aquosos bifásicos.

ABSTRACT

L-asparaginase (ASNase) is an important biopharmaceutical used in the treatment of leukemia, as well in industrial food processes. Its high production costs are mainly due to purification steps, in general, up to 70% of the final product value. Therefore, new liquid-liquid extraction processes, such as Aqueous Biphasic Systems (ABS), have appeared as more economical and biocompatible extraction/purification alternatives. In this work an alternative process for the purification of the enzyme L-asparaginase (ASNase) using ABS composed of polymers and salts or ionic liquids (ILs) was evaluated. In the first stage, a comparative study of different activity quantification methods of the commercial ASNase was carried out. This study intended to determine the interferences of the quantification methods and to establish the most adequate method for the quantification of ASNase activity after the extraction with different ABS. Further, the stability of the ASNase in the presence of different type and concentration of phase-forming agents, namely cholinium based-ILs ([Ch]⁺-ILs) and polymers, was evaluated. Thus, in order to understand the effect of the increase of anion alkyl chain length of the ILs in the enzyme stability, aqueous solutions of [Ch]⁺-ILs, with the following anions, were tested: chloride ([Ch][Cl]), acetate ([Ch][Ac]), propanoate ([Ch][Pro]), butanoate ([Ch][But]) and hexanoate ([Ch][Hex]). The increase of the anion alkyl chain length had a negative effect on the enzymatic activity due to the affinity of these compounds to the protein structure. [Ch][Cl] and [Ch][Ac] were selected as the best alternative solvents, because of their ASNase stability aptitude, as well enzymatic activity enhancing effect. The stability and activity of ASNase in aqueous solutions of polyethylene glycol of average molecular weight 600 g.mol⁻¹ (PEG 600) and polypropylene glycol of average molecular weight 400 g.mol⁻¹ (PPG 400) was also evaluated, in which ASNase remained stable and active, being these polymers selected as ABS phase forming agents. Therefore, the partition and extraction of commercial ASNase (used as model) using different ABS composed of polymer/salts or polymer/[Ch]⁺-ILs was evaluated. All ABS were able to concentrate the commercial ASNase, exhibiting extraction efficiencies > 95%. Furthermore, it was obtained a full control of the ASNase partition by the appropriate choice of the polymer nature or salts/ILs used as phase forming agents. To end, it was demonstrated the excellent aptitude of the best ABS to act as promising platforms for the extraction of ASNase from *E. coli* cell lysate. The set of results shown that the ABS can be efficiently applied in the extraction and purification of complex pharmaceutical biomolecules, with high capability to be used as continuous and/or semi-continuous upstream-downstream integrative platforms. Moreover, it was demonstrated that [Ch]⁺-ILs can be used as alternative ASNase stabilizing/activating solvents, which may be promising candidates for composing catalytic or synthetic reactive media used in industrial processes, not only for ASNase but also for other enzymes and biomolecules.

Keywords: L-asparaginase; ionic liquids; stability; extraction; purification; aqueous biphasic systems.

LISTA DE ABREVIÇÕES

¹³C RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
¹H RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton
ADT	<i>Auto Dock Tools software</i>
AE	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
AHA	Ácido β-hidroxamato L-aspártico
ASNase	L-asparaginase
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês “ <i>bovine serum albumin</i> ”
CDV	Calorimetria Diferencial por Varredura
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DC	Dicroísmo circular
DO₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EE	Eficiência de extração
IPTG	Do inglês “ <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> ”
L-Asn	L-asparagina
L-Asp	Ácido L-aspártico
LB	Meio de cultivo Luria-Bertani
L-Gln	L-glutamina
L-Glu	Ácido L-glutâmico
LI	Líquido Iônico
NADH	Nicotinamida Adenina Nucleotídeo reduzido
nm	Nanômetros
OPA	o-Ftaldeído
PDB	<i>Protein Data Bank</i> : https://www.rcsb.org/
PEG	Polietilenoglicol
MM	Massa Molecular
PPG	Polipropilenoglicol
RMN	Ressonância magnética nuclear
SABs	Sistemas Aquosos Bifásicos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE	Eletoforese de Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês " <i>sodium dodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis</i> ")
TCA	Ácido tricloro acético
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina
THR	Treonina
Tir	Tirosina
Trp	Triptofano

LISTA DE SÍMBOLOS

[Ch][Ac]	Acetato de colina
[Ch][But]	Butanoato de colina
[Ch][DHP]	Dihidrogenofosfato de colina
[Ch][Hex]	Hexanoato de colina
[Ch][Pro]	Propanoato de colina
[Ch]Cl	Cloreto de colina
Å	Ångström (10^{-10} m)
<i>g</i>	Força centrífuga
K	Coefficiente de Partição
kDa	Quilodaltons
<i>T_f</i>	Temperatura de fusão (“melting point”)
U	Unidade Enzimática ($\mu\text{mol}_{\text{substrato}} \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$)
ΔC_p	Variação do calor específico a pressão constante
θ	Elipticidade (miligraus)
μL	Microlitros (10^{-3} mL)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais diferenças entre os fármacos sintéticos e os biofármacos.	33
Tabela 2. Composição dos sistemas ternários utilizados para partição da ASNase.	62
Tabela 3. Comparação da atividade da ASNase (U.mL ⁻¹) obtida de diferentes fontes e relatadas na literatura versus valores estimados da atividade da ASNase (U.mL ⁻¹) com base nas correlações lineares da Figura 8.	78
Tabela 4. Variação das unidades de absorvância da amônia em função do tempo de reação de coloração com reagente de Nessler (em min) para diferentes comprimentos de onda.	82
Tabela 5. Energias de afinidade de ancoragem e átomos interagentes previstos pelo programa AutoDock para a ASNase e os cátions dos sais.	106
Tabela 6. Propriedades físico-químicas e parâmetros de extração (<i>K</i> e <i>EE</i> (%)) dos sistemas polímero/sal ou LI utilizados na extração da ASNase comercial.	114
Tabela 7. Resultados da extração de ASNase a partir de lisado celular utilizando SABs compostos por polímeros/sal ou LI.	128
Tabela 8. Propriedades obtidas a partir da análise de Superfície Ativa Acessível ao Solvente (do inglês “ <i>Solvent Accessible Surface Active - SASA</i> ”) obtidas pela resolução da equação Poisson–Boltzmann.	130
Tabela 9. Composição dos SABs compostos por PPG 400/[Ch]X e atividade relativa (%) da ASNase comercial no final do processo de partição.	160

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina catalisada pela enzima ASNase..... 25
- Figura 2.** Representação do cristal de L-asparaginase de *E. coli* mostrando a simetria da enzima e suas subunidades. 28
- Figura 3.** Fluxograma representando os objetivos específicos agrupados por fases do trabalho desenvolvido. 48
- Figura 4.** Estrutura química dos compostos estudados como estabilizadores da estrutura proteica da ASNase: **a)** Cloreto de colina; **b)** Colina dihidrogenofosfato; **c)** Acetato de colina; **d)** Propanoato de colina; **e)** Butanoato de colina; **f)** Hexanoato de colina; **g)** Polietilenoglicol e **h)** Polipropilenoglicol. 51
- Figura 5. a)** Reação principal da enzima ASNase; e diferenças entre as reações químicas dos métodos de quantificação colorimétricos para a atividade da ASNase: **b)** Nessler; **c)** AHA; **d)** Indooxina. 53
- Figura 6.** Esquema para obtenção da ASNase a partir de lisado celular de *E. coli* BL21+ASNasell. Fonte: a própria autora. 66
- Figura 7. a)** Atividade da ASNase (U.mL^{-1}) a 37°C das diferentes concentrações da enzima (mg.mL^{-1}) e **b)** Regressão linear ajustada e respectivos coeficientes (R^2) dentro do intervalo de 0 a $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$, determinado utilizando os seguintes métodos: CLAE (●); Nessler (■); Indooxina (◆); e AHA (●). Os valores correspondentes à média de três ensaios independentes e desvio padrão correspondente. As barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada ponto. 71
- Figura 8.** Relação de atividade da ASNase (U.mL^{-1}) pelos métodos colorimétricos, AHA (●), Nessler (■) e Indooxina (◆) com base na quantificação por CLAE (●). As linhas correspondem a análise de regressão linear com base no método de mínimos quadrados de cada método de quantificação, de acordo com as equações correspondentes e os valores de R^2 . Os valores

correspondem à média de três ensaios independentes e desvio padrão correspondente. 73

Figura 9. a) Espectro de absorção entre 350 e 600 nm da curva de calibração de amônia pelo método de Nessler modificado para diferentes soluções: Água (cinza); Branco sem amônia (preto); espectros de absorção gradiente crescente da concentração de amônia na reação de Nessler (azul claro para escuro), até uma concentração de amônia de $1,15 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. **b)** Curvas de calibração de amônia por reagente de Nessler em diferentes comprimentos de onda, respetivos coeficientes angulares e índice de correlação dos coeficientes angulares das curvas. 82

Figura 10. Efeito da concentração ($\text{mol}_{[\text{Ch}]\text{Cl}}.\text{mol}_{\text{total}}^{-1}$) de [Ch]Cl a a) 25°C , b) 37°C e c) 50°C na atividade enzimática da ASNase comercial. *Valor absoluto considerado 100 % = $3,94 \pm 0,16 \text{ U.mL}^{-1}$ 86

Figura 11. Efeito da concentração ($\text{mol}_{\text{sal}}.\text{mol}_{\text{total}}^{-1}$) de NaCl a 25°C na atividade enzimática da ASNase comercial em função do tempo (h). As barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada ponto. *Valor absoluto considerado 100 %: $4,01 \pm 0,17 \text{ U.mL}^{-1}$ 90

Figura 12. Simulação de ancoragem molecular dos cátions dos sais [Ch]Cl e NaCl: **a)** Na^{+} e **b)** $[\text{Ch}]^{+}$, sob a estrutura da 3D da ASNase. (Estrutura ASNase: *Protein Data Bank*, referência 1K2X). 91

Figura 13. Posição de menor valor absoluto de afinidade (kcal.mol^{-1}) para o ensaio de ancoragem molecular para ASNase e o ânion Cl^{-} 92

Figura 14. Espectro de Dicroísmo Circular a 25°C de ASNase após 6 h de exposição a diferentes concentrações de [Ch]Cl (do azul claro a azul escuro de menor para maior concentração de [Ch]Cl, respectivamente de 0,001 a 0,050 $\text{mol}_{[\text{Ch}]\text{Cl}}.\text{mol}_{\text{total}}^{-1}$) e tampão (linha preta). 93

Figura 15. Efeito de diferentes concentrações de [Ch]Cl (do azul claro a azul escuro de menor para maior concentração de [Ch]Cl, respectivamente de 0,001 a 0,050 $\text{mol}_{[\text{Ch}]\text{Cl}}.\text{mol}_{\text{total}}^{-1}$, e tampão - linha preta) sob a fluorescência da

ASNase para uma excitação a 280 nm e emissão em: **a)** de 300 a 500 nm; e **b)** a 330 nm; a temperatura de 25°C. 95

Figura 16. Supressão da fluorescência de ASNase na presença de diferentes concentrações de [Ch]Cl por acrilamida (Pontos pretos: estrutura nativa ASNase em tampão fosfato, e azul claro a escuro aumento da concentração de acrilamida: 10, 20, 30, 40 e 50 mM). 97

Figura 17. Estabilidade térmica da ASNase por dois métodos diferentes: a) Temperatura de fusão, T_f , (°C) por CVD na presença de diferentes concentrações de [Ch]Cl; b) Monitoramento da estrutura secundária da ASNase (222 nm) por DC em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 (linha preta) e exposta a $0,025 \text{ mol}_{[\text{Ch}]\text{Cl}} \cdot \text{mol}_{\text{total}}^{-1}$ (linha azul). mdeg: elipticidade em miligraus (“*milidegrees*”, do inglês). 98

Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de LIs derivados de colina sob a atividade enzimática da ASNase em diferentes temperaturas: **a)** [Ch][Ac], **b)** [Ch][Pro] e **c)** [Ch][But]. Foram testadas diferentes concentrações variando de $0,001$ a $0,050 \text{ mol}_{\text{LI}} \cdot \text{mol}_{\text{total}}^{-1}$ (azul claro a azul escuro, da menor para a maior concentração de [Ch]Cl e tampão fosfato 50 mM pH 7,4 (linha preta). As barras de erros correspondem ao desvio padrão. *Valor absoluto considerado 100 %: $5,29 \pm 0,03 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para [Ch][Ac]; $5,98 \pm 0,25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para [Ch][Pro] e $5,37 \pm 0,36 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para [Ch][But]..... 101

Figura 19. Efeito da concentração ($\text{mol}_{[\text{Ch}][\text{Hex}]} \cdot \text{mol}_{\text{total}}^{-1}$) de [Ch][Hex] a 25°C na atividade enzimática da ASNase comercial em função do tempo (h). *Valor absoluto considerado 100 %: $3,73 \pm 0,13 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 103

Figura 20. Simulação de ancoragem molecular de cátions dos LIs baseados em $[\text{Ch}]^+$, **a)** $[\text{Ac}]^-$, **b)** $[\text{Prop}]^-$, **c)** $[\text{But}]^-$ e **d)** $[\text{Hex}]^-$ sob a estrutura da 3D da ASNase. (Estrutura ASNase: *Protein Data Bank*, referência 1K2X)..... 105

Figura 21. Efeito de diferentes valores de pH na atividade enzimática relativa da ASNase comercial. **a)** Efeito do pH na estabilidade ao longo do tempo. **b)** Efeito do pH da reação enzimática.*Valor absoluto considerado 100 %: $3,19 \pm 0,02 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 108

- Figura 22.** Efeito da concentração ($\text{mol}_{\text{polímero}} \cdot \text{mol}_{\text{total}}^{-1}$) de a) PEG 600 e b) PPG 400 na atividade enzimática da ASNase comercial a 25°C em função do tempo. *Valor absoluto considerado 100 %: $1,25 \pm 0,06 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 110
- Figura 23.** Eficiências de extração da ASNase (EE (%)) nas fases: a) rica em polímeros e b) salina a 25°C utilizando os seguintes SABs: PEG/tampão fosfato; PEG/tampão citrato; PEG/sulfato de sódio; PEG/colinas; e PPG/colinas. As barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada ponto. 116
- Figura 24.** Porcentagem de ASNase extraída no precipitado (interface), nomeada como eficiência de extração na precipitação ($\% EE_{\text{precipitado}}$) nos SABs à base de tampão citrato com PEG 1000, PEG 1500 ou PEG 2000 a 25°C. As barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada ponto. 117
- Figura 25.** Forças motrizes que controlam o particionamento da ASNase nos diferentes SABs baseados em polímero/sal. 124
- Figura 26.** Eficiência de extração (EE (%)) das proteínas totais obtidas com cada SAB usado para extrair a ASNase a partir do lisado celular nas fases: a) rica em polímeros e b) salina a 25°C utilizando os seguintes SABs: PEG/tampão fosfato; PEG/tampão citrato; PEG/sulfato de sódio; PEG/colinas; e PPG/colinas. As barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada ponto. 127
- Figura 27.** SDS-PAGE de cada uma das fases dos SABs testados para a recuperação da ASNase a partir do lisado celular de *E. coli*. *Todas amostras tiveram a mesma diluição, sendo diluídas 3 vezes em tampão de dissociação. Fonte: a própria autora. 132
- Figura 28.** Monitoramento da estrutura secundária da ASNase em cada uma das fases dos SABs polímeros/sal ou LI testados para recuperação a partir de lisado celular. De **a)** a **j)** estão apresentados o espectro de DC para todos os SABs testados na concentração real do sistema. De **l)** a **n)** estão apresentados os sistemas que tiveram maior desempenho, concentrados 2 vezes. Fonte: a própria autora. 134

Figura 29. Log do coeficiente de partição ($\log K$) e eficiência de extração (EE (%)) da ASNase nos SABs compostos por PPG 400/[Ch]X, onde X corresponde aos seguintes ânions: Cl⁻, [Ac]⁻, [Pro]⁻, [But]⁻, [DHP]⁻..... 160

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	13
LISTA DE SÍMBOLOS.....	15
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE FIGURAS	17
CAPÍTULO 1	26
1. INTRODUÇÃO	24
1.1 L-asparaginase.....	25
1.2 Métodos de quantificação da atividade enzimática da ASNase	28
1.3 Estabilidade proteica na presença de LIs.....	32
1.4 Extração e Purificação de biofármacos utilizando SABs	39
2. OBJETIVOS	46
2.1 Objetivos específicos	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 Materiais.....	50
3.1.1 Preparo dos Líquidos Iônicos (LIs).....	51
3.2 Avaliação de metodologias de quantificação da ASNase comercial	52
3.2.1 Método de Nessler	54
3.2.1.1 Método de Nessler adaptado	54
3.2.2 Método do ácido β -hydroxamato L-aspártico (AHA).....	55
3.2.3 Método da Indooxina	56
3.2.4 Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	56
3.3 Efeito de diferentes compostos na Estabilidade Catalítica da ASNase	57
3.4 Influência do [Ch]Cl na estabilidade estrutural da ASNase	58
3.4.1 Dicroísmo Circular (DC)	59
3.4.2 Fluorescência Intrínseca	59
3.4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (CDV)	60
3.5 Influência do pH na estabilidade e atividade da ASNase	60
3.7 Estudos da partição da ASNase utilizando SABs.....	62
3.8 Quantificação da concentração de ASNase nos SABs	63
3.9 Manutenção do Microrganismo, meios e condições de cultivo.....	64
3.10 Rompimento celular e estocagem da ASNase	65

3.11 Recuperação da ASNase a partir de lisado celular	67
3.12 Propriedades intrínsecas das fases dos SABs.....	67
3.13 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Análise crítica sobre a metodologia de quantificação da ASNase.....	70
4.1.1 Comparação dos métodos de quantificação da atividade da ASNase	71
4.1.2 Método de Nessler adaptado	80
4.2 Efeito de Diferentes Compostos na Estabilidade Catalítica da ASNase	85
4.2.1 Efeito do [Ch]Cl sob a estabilidade catalítica e estrutural da ASNase	86
4.2.1.1 Efeito do [Ch]Cl sob estabilidade e atividade catalítica da ASNase	86
4.2.1.2 Efeito do [Ch]Cl sob a estrutura proteica da ASNase.....	90
4.2.2 Efeito do aumento da cadeia alquílica dos ânions de LIs baseados em [Ch] ⁺ sob a estabilidade da ASNase	100
4.2.2.1 Efeito do aumento da cadeia do ânion de compostos baseados em [Ch] ⁺ na estabilidade e atividade catalítica da ASNase.....	100
4.2.2.2 Efeito do aumento da cadeia do ânion de compostos baseados em [Ch] ⁺ sob a estrutura tridimensional da ASNase	104
4.2.3 Influência do pH na atividade da ASNase	107
4.2.4 Influência de polímeros na estrutura proteica da ASNase.....	109
4.3 Controle da partição da ASNase pela seleção da natureza dos SABs à base de polímero/sal ou LI.....	112
4.4 Recuperação de ASNase recombinante a partir de lisado celular de <i>E. coli</i>	125
5. CONCLUSÕES	137
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139
7. REFERÊNCIAS.....	140
CAPÍTULO 2	152
LISTA DE PUBLICAÇÕES	153
APÊNDICES	155

APÊNDICE 1.....	156
APÊNDICE 2.....	156
APÊNDICE 3.....	157
APÊNDICE 4.....	158
APÊNDICE 5.....	159
APÊNDICE 6.....	160

CAPÍTULO 1

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o acentuado crescimento da biotecnologia tem impulsionado a indústria farmacêutica na busca de processos de produção e purificação mais eficientes, em particular, na melhoria da sustentabilidade e biocompatibilidade dos processos químicos convencionais utilizados na separação/purificação dos produtos farmacêuticos. Nesse sentido, o desenvolvimento de novos processos de biosseparação para a purificação de biofármacos utilizados no tratamento onco-hematológico se apresenta como um grande e atual desafio na indústria farmacêutica e biotecnológica.

No Brasil, o atual foco tem sido os medicamentos oncológicos, uma vez que o fornecimento de alguns dos biofármacos mais antigos foi (ou tem vindo a ser) interrompido [1], por despertarem baixo interesse comercial à indústria farmacêutica estrangeira, como é o caso da L-asparaginase (ASNase), um importante biofármaco anti-neoplásico [2]. Além disso, recentemente a aquisição emergencial, pelo governo brasileiro, de uma ASNase nativa produzida pela empresa chinesa Beijing SL Pharmaceutical com menor valor de mercado, levantou uma grande polêmica no país a respeito da procedência e qualidade do biofármaco [3]. Este medicamento (Leuginase[®]) apresentou diversos contaminantes, menor atividade em plasma de camundongos e maior formação de anticorpos anti-ASNase quando comparado ao medicamento que era obtido anteriormente (Aginasa[®], Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd.) [3], apesar de clinicamente não ter sido encontrado relato de danos ou efeitos colaterais nos pacientes que receberam o tratamento.

O alto custo de produção associado aos medicamentos em geral resulta, em grande parte, dos processos de *downstream*, isto é, das etapas de extração e purificação. Neste contexto, é importante encontrar e avaliar novas técnicas de extração/purificação que possam ser mais rentáveis, biocompatíveis e facilmente escalonáveis pelas empresas biofarmacêuticas, como por exemplo os sistemas aquosos bifásicos (SABs). Assim, visando reduzir o custo final de produtos biofarmacêuticos, sistemas *downstream* integrados e/ou complementares aos convencionais, que possibilitem simultaneamente maior rendimento e menor perda de estabilidade, têm sido alvo da indústria biotecnológica emergente. De acordo com esses pressupostos, este trabalho

visou estudar métodos alternativos para extração/purificação da enzima L-Asparaginase (ASNase).

5. Conclusões

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estabelecido uma correlação para conversão dos resultados obtidos por diferentes métodos de quantificação da ASNase e proposto uma adaptação do método de Nessler para as condições deste trabalho. Os estudos de estabilidade demonstraram que os compostos derivados de colinas apresentam capacidade para manter a estabilidade e atividade enzimática da ASNase. O [Ch]Cl destacou-se dos demais compostos, como o maior ativador enzimático sem modificar a estrutura secundária da enzima. Os resultados sugeriram que a superativação foi resultado de interações específicas ponto a ponto dos íons dos compostos derivados de colina e a estrutura proteica da ASNase. Os estudos de estabilidade permitiram concluir que o aumento da cadeia alquílica do ânion, tal como o aumento de temperatura, não favorecem a manutenção da atividade da ASNase.

A utilização dos LIs como solventes alternativos estabilizantes foi demonstrada para a ASNase, mostrando que estes podem ser candidatos a compor meios reacionais catalíticos ou sintéticos utilizados em processos industriais, não só para a ASNase mas para outras enzimas e biomoléculas. Dessa forma, a utilização dos compostos derivados de colinas (sal e LIs) pode viabilizar a construção de biossensores ou até mesmo serem utilizados como estabilizantes para armazenamento de diferentes composições farmacêuticas/biológicas.

Embora as interações proteínas-sal/LI ainda não sejam totalmente conhecidas, os promissores resultados foram úteis para identificar os compostos mais apropriados para compor os SABs. A compreensão dos mecanismos de estabilização e separação da ASNase é essencial para projetar plataformas de SABs efetivos para recuperar enzimas diretamente de matrizes complexas (como extratos vegetais, meios fermentados ou lisados celulares). Por fim, e como objetivo principal deste projeto, demonstrou-se que é possível controlar a extração/partição da ASNase, comercial e a partir de meios complexos, através da escolha apropriada dos polímeros sal/LI utilizados na formação dos SABs. Desse modo, concluímos que a utilização dos SABs

representa uma ferramenta de grande utilidade na área de extração e purificação da ASNase, podendo reduzir o número de etapas de cromatografia utilizadas atualmente na sua purificação, além de concentrar a enzima em uma solução biocompatível e possibilitar a sua recuperação em menores volume de trabalho. A plataforma de extração aqui estudada poderá ainda ser utilizada na integração dos processos *upstream* e *downstream*, a qual pode se utilizar dos sistemas líquido-líquido como etapas intermédias de processos contínuos ou semi-contínuos.

No entanto, devido aos processos cromatográficos estarem bem estabelecidos na indústria farmacêutica, torna-se difícil a adição de mais uma etapa no processo produtivo de obtenção da ASNase para fins farmacêuticos. Assim, acredita-se que a plataforma de extração/purificação aqui estudada seja mais aceita e útil em outras áreas, como por exemplo a área alimentícia, onde é extensamente utilizada para a redução dos teores de acrilamida, ou ainda na indústria de insumos, como é o caso da produção de glutamato, que pode fazer o uso da ASNase para sua produção. Nestes casos, como a exigência de pureza do produto final é menos rigorosa, em comparação com as da indústria farmacêutica, os SABs terão mais margem para expansão e possíveis aplicações, do que dentro da área destinada à saúde humana.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuramente, espera-se adaptar os SABs que tiveram maior desempenho na recuperação da ASNase a partir de lisado celular, em sistemas de extração/purificação utilizando cromatografia contracorrente (ou cromatografia de partição centrífuga), o que poderá permitir a realização do processo em modo contínuo ou semi-contínuo. Assim, esta plataforma poderá ser aplicada na integração de processos na indústria farmacêutica ou ainda como processo de extração/purificação na indústria de alimentos, onde as exigências de pureza são menores que as da área farmacêutica.

Considerando ainda o potencial de utilização dos sais/LIs derivados de colinas como solventes alternativos na área alimentícia, poderão ser desenvolvidos ensaios futuros em alimentos, como por exemplo a depleção de acrilamida em alimentos processados, atentando-se em garantir a qualidade final do produto.

Por fim, para permitir sua larga aplicabilidade serão necessários estudos de reciclagem dos componentes formadores de fase, o que permitirá cumprir os requisitos de sustentabilidade dos processos de *downstream*, além de reduzir os custos da utilização destes sistemas, viabilizando sua aplicação.

7. REFERÊNCIAS

1. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Câncer. 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 18 Jan 2015.
2. Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH. L-Asparaginase and PEG asparaginase - Past, present, future. *Leuk Lymphoma*. 1993;10(Suppl):153–7.
3. Zenatti PP, Migita NA, Cury NM, Mendes-Silva RA, Gozzo FC, de Campos-Lima PO, et al. Low bioavailability and high immunogenicity of a new brand of *E. coli* L-asparaginase with active host contaminating proteins. *EBioMedicine*. 2018;30:158–66.
4. Narta UK, Kanwar SS, Azmi W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;61(3):208–21.
5. Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;100:1–10.
6. Xu F, Oruna-Concha MJ, Elmore JS. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chem*. 2016;210:163–71.
7. Broome JD. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*. 1961;191(4793):1114–5.
8. Loureiro CB. Purificação, conjugação e avaliação “*in vitro*” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 2010. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-01122010-193435/pt-br.php>
9. Mashburn T, Wriston JC. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1963;12(1):50–6.
10. Hill JM, Roberts J, Loeb E, Khan A, MacLellan A, Hill RW. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remission in human leukemia. *JAMA*. 1967;202(9):882–8.
11. Egler RA, Ahuja SP, Matloub Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pharmacol Pharmacother*. 2016;7(2):62–71.
12. Fullmer A, Brien SO, Kantarjian H, Jabbour E. Emerging therapy for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2010;15(1):1–11.
13. INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2017. [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 23]. Available from: <https://www.agenciabrasilia.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/02/estimativa-cancer-2018.pdf>
14. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*. 2012;196(3):59–67.
15. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:471–484.

16. Nomme J, Su Y, Konrad M, Lavie A. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. *Biochemistry*. 2012;51(34):6816–26.
17. Graham ML. Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(10):1293–302.
18. Feng Y, Liu S, Jiao Y, Gao H, Wang M, Du G, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(4):1509–20.
19. Mahajan R V, Kumar V, Rajendran V, Saran S, Ghosh PC, Saxena RK. Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. *PLoS One*. 2014;9(6):1–8.
20. Makky E A., Chun Loh Y, Karim MR. Purification and partial characterization of a low molecular weight L-asparaginase produced from corn cob waste. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2014;3(4):265–70.
21. Loureiro CB, Borges KS, Andrade AF, Tone LG, Said S. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. *Adv Microbiol*. 2012;2(2):138–45.
22. Dias FFG, Sato HH. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2016;6:33–9.
23. Kumar N, Manonmani H. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp . *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29(4):577–87.
24. Eisele N, Linke D, Bitzer K, Na’amnieh S, Nimitz M, Berger RG. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresour Technol*. 2011;102(3):3316–21.
25. Ferrara MA, Severino NMB, Valente RH, Perales J, Bon EPS. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme Microb Technol*. 2010;47(3):71–6.
26. Swain AL, Jaskólski M, Housset D, Rao JKM, Wlodawer A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(4):1474–8.
27. Stecher AL, Deus PM De, Polikarpov I. Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. *Pharm Acta Helv*. 1999;74(1):1–9.
28. Beard MEJ, Crowther D, Galton DAG, Guyer RJ, Hamilton Fairley G, Kay HEM, et al. L-asparaginase in treatment of acute leukaemia and lymphosarcoma is known that the enzyme is virtually confined to the plasma. *Br Med J*. 1970;1(5690):191–5.
29. Kobrinsky NL, Sposto R, Shah NR, Anderson JR, Delaat C, Morse M, et al. Outcomes of treatment of children and adolescents with recurrent non-Hodgkin’s lymphoma and Hodgkin’s chemotherapy, and transplantation: children’s cancer group study CCG-5912. *J Clin Oncol*. 2001;19(9):2390–6.
30. Baruch M, Belotserkovsky I, Hertzog BB, Ravins M, Dov E, Mciver KS, et al. An extracellular bacterial pathogen modulates host metabolism to regulate its own sensing and proliferation. *Cell*. 2014;156(1-2):97–108.

31. Zyzak D V., Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem.* 2003;51(16):4782–7.
32. Aiswarya R, Baskar G. Enzymatic mitigation of acrylamide in fried potato chips using asparaginase from *Aspergillus terreus*. *Int J Food Sci Technol.* 2017;53(2):1–8.
33. Meghavarnam AK, Janakiraman S. Evaluation of acrylamide reduction potential of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* (ASP-87) in starchy products. *LWT - Food Sci Technol.* 2017;89:32-37.
34. Vimal A, Kumar A. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. *Biotechnol Genet Eng Ver.* 2017;33(1):40-61.
35. Lanvers C, Paulo J, Pinheiro V, Hempel G, Wuerthwein G, Boos J. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Anal Biochem.* 2002;309(1):117–26.
36. Nath CE, Dallapozza L, Eslick AE, Misra A, Carr D, Earl JW. An isocratic fluorescence HPLC assay for the monitoring of L-asparaginase activity and L-asparagine depletion in children receiving *E. coli* L-asparaginase for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Biomed Chromatogr.* 2009;23(2):152–9.
37. Gentili D, Zucchetti M, Conter V, Masera G, D’Incalci M. Determination of L-asparagine in biological samples in the presence of L-asparaginase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1994;657(1):47–52.
38. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer.* 2011;117(2):238–49.
39. Kudryashova E V, Sukhoverkov K V. “Reagent-free” L-asparaginase activity assay based on CD spectroscopy and conductometry. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(4):1183–9.
40. Broome JD. Factors which may influence the effectiveness of L-asparaginases as tumor inhibitors. *Br J Cancer.* 1968;22(3):595–602.
41. Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, Waelsch H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *J Biol Chem.* 1950;187(1):111–25.
42. Drainas C, Kinghorn JR, Pateman JA. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 1977;98(2):493–501.
43. Meister A. Glutaminase, asparaginase, and α -keto acid- ω -amidase. *Methods Enzymol.* 1955;2(C):380–5.
44. Shifrin S, Parrott CL, Luborsky SW. Substrate binding and intersubunit interactions in L-asparaginase. *J Biol Chem.* 1974;249(5):1335–40.
45. Scheiner D. Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water Res.* 1976;10(1):31–6.
46. Tagami S, Matsuda K. An enzymatic method for the kinetic measurement of L-asparaginase activity and L-asparagine with an ammonia gas-sensing electrode. *Chem Pharm Bull.* 1990;38(1):153–5.
47. Balcão VM, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Xavier Malcata F, Guisán JM. Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnol Prog.* 2001;17(3):537–42.

48. Wehner A, Harms E, Jennings Mp, Beacham Ir, Derst C, Bast P, et al. Site-specific mutagenesis of *Escherichia coli* asparaginase II: none of the three histidine residues is required for catalysis. *Eur J Biochem.* 1992;208(2):475–80.
49. Ylikangas P, Mononen I. A fluorometric assay for L-asparaginase activity and monitoring of L-asparaginase therapy. *Anal Biochem.* 2000;280(1):42–5.
50. Drainas D, Drainas C. A conductimetric method for assaying asparaginase activity in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem.* 1985;151(3):591–3.
51. Yao H, Vancoillie J, D'Hondt M, Wynendaele E, Bracke N, Spiegeleer B De. An analytical quality by design (aQbD) approach for a L-asparaginase activity method. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;117:232–9.
52. Cooney DA, Capizzi RL, Handschumacher RE. Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man. *Cancer Res.* 1970;30(4):929–35.
53. Harris JM, Struck EC, Case MG, Paley MS, Alstine JM V, Brooks DE. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. *J Polym Sci Polym Chem Ed.* 1984;22(2):341–52.
54. Miller GL, Miller EE. Determination of nitrogen in biological materials. *Anal Chem.* 1948;20(5):481–8.
55. Morrison GR. Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler reagent. *Anal Biochem.* 1971;43 (2):527–32.
56. Thompson JF, Morrison GR. Determination of organic nitrogen control of variables in the use of Nessler's reagent. *Anal Chem.* 1951;23(8):1153–7.
57. Chinese Pharmacopoeia Commission. General monographs part 1. In: *Pharmacopoeia of the People's Republic of China.* 2010. p. 35–8.
58. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Acrylamide in Foods. FDA Food Guidances. Disponível em: <http://www.fda.gov/FoodGuidances>.
59. Walsh G. *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology.* 2nd. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2003, 551 p. ISBN 0-470-84326-8
60. Salerno MS, Matsumoto C, Ferraz I. *Biofármacos no Brasil: Características, importância e delineamento de políticas públicas para o seu desenvolvimento.* 2018. 86 p. Disponível em: http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=33814:td-2398-biofarmacos-no-brasil-caracteristicas-importancia-e-delineamento-de-politicas-publicas-para-seu-desenvolvimento&catid=411:2018&directory=1.
61. Mitragotri S, Burke PA, Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(9):655–72.
62. Fujita K, Forsyth M, MacFarlane DR, Reid RW, Elliott GD. Unexpected improvement in stability and utility of cytochrome C by solution in biocompatible ionic liquids. *Biotechnol Bioeng.* 2006;94(6):1209–13.
63. Bye JW, Platts L, Falconer RJ. Biopharmaceutical liquid formulation: a review of the science of protein stability and solubility in aqueous environments. *Biotechnol Lett.* 2014;36(5):869–75.
64. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative

- protein aggregation. *Pharm Res.* 2003;20(9):1325–6.
65. Otto R, Santagostino A, Schrader U. Rapid growth in biopharma: challenges and opportunities. McKinsey & Company, dez. 2014. 2014. p. 8. Disponível em: <https://www.mckinsey.com/industries/pharmaceuticals-and-medical-products/our-insights/rapid-growth-in-biopharma>
 66. Pinto V. Entendendo os Medicamentos Biológicos. Interfarma: Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. 2012. 28 p. 2016. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/34-biologicos-site.pdf>. Acesso em: dez/2018.
 67. Vulto AG, Jaquez OA. The process defines the product: what really matters in biosimilar design and production? *Rheumatology.* 2017;56(suppl_4):iv14–iv29.
 68. Berthold W, Walter J. Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products. *Biologicals.* 1994;22(2):135–50.
 69. Dunn PJ. The importance of green chemistry in process research and development. *Chem Soc Rev.* 2012;41(4):1452–61.
 70. Grodowska K, Parczewski A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(1):3–12.
 71. Naushad M, ALOthman ZA, Khan AB, Ali M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: a review. *Int J Biol Macromol.* 2012;51(4):555–60.
 72. Jha I, Venkatesu P. Unprecedented improvement in the stability of hemoglobin in the presence of promising green solvent 1-allyl-3-methylimidazolium chloride. *ACS Sustain Chem Eng.* 2016;4(2):413–421.
 73. Weingärtner H, Cabrele C, Herrmann C. How ionic liquids can help to stabilize native proteins. *Phys Chem Chem Phys.* 2012;14(2):415–26.
 74. Robertson a D, Murphy KP. Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem Rev.* 1997;97(5):1251–67.
 75. Dill KA. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry.* 1990;29(31):7133–55.
 76. Vendruscolo M, Dobson CM. Towards complete descriptions of the free-energy landscapes of proteins. *Philos Trans R Soc A.* 2005;363(1827):433–52.
 77. Roberts CJ. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol.* 2014;32(7):372–80.
 78. Lange C, Rudolph R. Production of recombinant proteins for therapy, diagnostics, and industrial research by in Vitro Folding. In: Kiefhaber T, Buchner J. *Protein Folding Handbook.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005. p 1245–1280. ISBN: 3-527-30784-2.
 79. Timasheff SN. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(15):9721–6.
 80. von Hippel PH, Wong K-Y. On the conformational stability of globular proteins: the effects of various electrolytes and nonelectrolytes on the thermal ribonuclease transition. *J Biol Chem.* 1965;240(10):3909–23.
 81. Patel R, Islamia JM, Kumari M, Islamia JM, Islamia JM. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;172(8):3701-20.
 82. Fujita K, Macfarlane R, Forsyth M. Protein solubilising and stabilising ionic liquids. *Chem Commun (Camb).* 2005;(38):4804–6.

83. Wilkes JS. A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem.* 2002;4(2):73–80.
84. Domańska U. Thermophysical properties and thermodynamic phase behavior of ionic liquids. *Thermochim Acta.* 2006;448(1):19–30.
85. Pereira JFB, Lima AS, Freire MG, Coutinho JAP. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. *Green Chem.* 2010;12(9):1661–9.
86. Ventura SPM, Neves CMSS, Freire MG, Marrucho IM, Oliveira J, Coutinho JAP. Evaluation of anion influence on the formation and extraction capacity of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *J Phys Chem B.* 2009;113(27):9304–10.
87. Neves CMSS, Ventura SPM, Freire MG, Marrucho IM, Coutinho JAP. Evaluation of cation influence on the formation and extraction capacity of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *J Phys Chem B.* 2009;113(27):9304–10.
88. Zhao H. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. *J Chem Technol Biotechnol.* 2016;91(1):25–50.
89. Sowmiah S, Srinivasadesikan V, Tseng M, Chu Y. On the chemical stabilities of ionic liquids. 2009;14(9):3780-813.
90. Ventura SPM, Santos LDF, Saraiva JA, Coutinho JAP. Ionic liquids microemulsions: the key to *Candida antarctica* lipase B superactivity. *Green Chem.* 2012;14(6):1547–806.
91. Welton T. Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. *Chem Rev.* 1999;99(8):2071–84.
92. Ferreira AM, Faustino VFM, Mondal D, Coutinho JAP, Freire MG. Improving the extraction and purification of immunoglobulin G by the use of ionic liquids as adjuvants in aqueous biphasic systems. *J Biotechnol.* 2016;236:166–75.
93. Schröder C. Proteins in ionic liquids: current status of experiments and simulations. *Top Curr Chem (Cham).* 2017;375(2):25.
94. Uralcan B, Kim SB, Markwalter CE, Prud'homme RK, Debenedetti PG. A computational study of the ionic liquid-induced destabilization of the miniprotein Trp-Cage. *J Phys Chem B.* 2018;122(21):32.
95. Collins KD, Washabaugh MW. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q Rev Biophys.* 1985;18(4):323–422.
96. Constantinescu D, Weingärtner H, Herrmann C. Protein denaturation by ionic liquids and the Hofmeister series: a case study of aqueous solutions of ribonuclease A. *Angew Chemie Int Ed.* 2007;46(46):8887–9.
97. Zhao H, Campbell SM, Jackson L, Song Z, Olubajo O. Hofmeister series of ionic liquids: kosmotropic effect of ionic liquids on the enzymatic hydrolysis of enantiomeric phenylalanine methyl ester. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2006;17(3):377–83.
98. Mondal D, Sharma M, Quental M V., Tavares APM, Prasad K, Freire MG. Suitability of bio-based ionic liquids for the extraction and purification of IgG antibodies. *Green Chem.* 2016;18(22):6071–81.
99. Bisht M, Mondal D, Pereira MM, Freire MG, Venkatesu P, Coutinho JAP. Long-term protein packaging in cholinium-based ionic liquids: improved catalytic activity and enhanced stability of cytochrome C against multiple stresses. *Green Chem.* 2017;19(20):4900–11.
100. Ruiz CAS, Berg C Van Den, Wijffels RH, Eppink MHM. Rubisco

- separation using biocompatible aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol.* 2017;196:254–61.
101. Taha M, Quental MV, Correia I, Freire MG, Coutinho JAP. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. *Process Biochem.* 2015;50(7):1158-66.
 102. Bisht M, Venkatesu P. Influence of cholinium-based ionic liquids on the structural stability and activity of α -chymotrypsin. *New J Chem.* 2017;41(22):13902–11.
 103. Toma RJ, Suo AM, Hassan SA, Aon MAA, Salman SK, L- LA. Extraction and purification of L-Asparaginase II from local isolate of *Proteus vulgaris*. *Baghdad Sci J.* 2011;8(1):509–18.
 104. Sinha RK, Singh HRAM, Jha SK. Production, purification and kinetic characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015;7(1):3–6.
 105. Kalyanasundaram I, Nagamuthu J, Srinivasan B. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes. *World J Pharm Pharm Sci.* 2015;4(03):663–77.
 106. Dash C, Mohapatra SB, Maiti PK. Optimization, purification and characterization of L-asparaginase from *Actinomyces bacterium* BkSoiiA. *Prep Biochem Biotechnol* 2014;46(1):1-7.
 107. Santos JHP., Santos JCF, Meneguetti GP, Rangel-Yagui CO, Coutinho JAP, Vitolo M, et al. In situ purification of periplasmatic L-asparaginase by aqueous two phase systems with ionic liquids (ILs) as adjuvants. *J Chem Technol Biotechnol.* 2017;93(7):181-80.
 108. Domínguez-Pérez M, Tomé LIN, Freire MG, Marrucho IM, Cabeza O, Coutinho JAP. (Extraction of biomolecules using) aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids. *Sep Purif Technol.* 2010;72(1):85–91.
 109. Anderson CR, Rupp HS, Wu WH. Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2005;1075(1–2):23–32.
 110. Welton T. Solvents and sustainable chemistry. *Proc R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2015;471(2183):20150502.
 111. Santos NV dos, Santos-Ebinuma VC, Pessoa-Junior A, Pereira JFB. Liquid-liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects. *J Chem Technol Biotechnol.* 2017;93(7):1845-63.
 112. Albertsson PA. Partition of cell particles and macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3rd. ed. Chichester: John Wiley and Sons, 1986. 346 p. ISBN: 978-0471828204.
 113. Gutowski K E, Broker GA, Willauer HD, Huddleston JG, Swatoski RP, Holbrey JD, Rogers RD. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle,metathesis,and separations. *J Am Chem Soc.* 2003;125(22):6632–3.
 114. Panas P, Lopes C, Cerri MO, Ventura SPM, Santos- VC, Pereira JFB. Purification of clavulanic acid produced by *Streptomyces clavuligerus* via submerged fermentation using polyethylene glycol/cholinium chloride

- aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilib.* 2017;450:42–50.
115. Lee SY, Khoiroh I, Ooi CW, Ling TC, Show PL. Recent advances in protein extraction using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Sep Purif Ver.* 2017;46(4):291-304.
 116. Dimitrijević A, Ignjatović L, Tot A, Vraneš M, Zec N, Gadžurić S, et al. Simultaneous extraction of pesticides of different polarity applying aqueous biphasic systems based on ionic liquids. *J Mol Liq.* 2017;243:646–53.
 117. Freire MG, Cláudio AFM, Araújo JMM, Coutinho J a P, Marrucho IM, Canongia Lopes JN, et al. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chem Soc Rev.* 2012;41(14):4966–95.
 118. Ramalho CC, Neves CMSS, Quental M V, Coutinho JAP, Freire MG. Separation of immunoglobulin G using aqueous biphasic systems composed of cholinium-based ionic liquids and poly(propylene glycol). *J Chem Technol Biotechnol.* 2018;93(7):1931-39.
 119. Abreu MH, Coutinho JAP, Ventura SPM. Recovery of carotenoids from brown seaweeds using aqueous solutions of surface-active ionic liquids and anionic surfactants. *Sep Purif Technol.* 2017;196:300–8.
 120. Ulbricht J, Jordan R, Luxenhofer R. On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s. *Biomaterials.* 2014;35(17):4848–61.
 121. West RJ, Davis JW, Pottenger LH, Banton MI, Graham C. Biodegradability relationships among propylene glycol substances in the organization for economic cooperation and development ready- and seawater biodegradability tests. *Environ Toxicol Chem.* 2007;26(5):862–71.
 122. Petkovic M, Ferguson JL, Gunaratne HQN, Ferreira R, Leitão MC, Seddon KR, et al. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids— toxicity and biodegradability. *Green Chem.* 2010;12(4):643.
 123. Anastas P, Eghbali N. Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev.* 2009;39(1):301–12.
 124. Pereira JFB, Vicente F, Santos-Ebinuma VC, Araújo JM, Pessoa A, Freire MG, et al. Extraction of tetracycline from fermentation broth using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and cholinium-based salts. *Process Biochem.* 2013;48(4):716–22.
 125. Pereira JFB, Magri A, Quental M V, Gonzalez-miquel M, Freire MG, Coutinho JAP. Alkaloids as alternative probes to characterize the relative hydrophobicity of aqueous biphasic systems. *ACS Sustain Chem Eng.* 2016;4(3):1512–20.
 126. Alred PA, Kozłowski A, Harris JM, Tjerneld F. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. *J Chromatogr A.* 1994;659(2):289–98.
 127. Johansson HO, Karlström G, Tjerneld F, Haynes CA. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998;711(1–2):3–17.
 128. Zaslavsky BY, Uversky VN, Chait A. Analytical applications of partitioning in aqueous two-phase systems: exploring protein structural changes and protein – partner interactions in vitro and in vivo by solvent interaction analysis method. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1864(5):622–44.
 129. Quental MV, Caban M, Pereira MM, Stepnowski P, Coutinho JAP, Freire

- MG. Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems. *Biotechnol J*. 2015;10(9):1457–66.
130. Wu Z, Hu G, Wang K, Yu B, Kurgan L, Uversky VN. What are the structural features that drive partitioning of proteins in aqueous two-phase systems? *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2017;1865(1):113–20.
 131. Pereira JFB, Kurnia KA, Freire MG, Coutinho AP, Rogers RD. Controlling the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems by changing the hydrogen-bonding ability of polyethylene glycol end groups. *Chemphyschem*. 2015;16(10):2219-25.
 132. Qin M, Zhao F. L-Asparaginase release from *Escherichia coli* cells with aqueous two-phase micellar systems. *Appl Biochem Biotechnol*. 2003;110(1):11–21.
 133. Zhu J, Yan X, Chen H, Wang Z. In situ extraction of intracellular L-asparaginase using thermoseparating aqueous two-phase systems. *J Chromatogr A*. 2007;1147(1):127–34.
 134. Muhammad N, Hossain MI, Man Z, El-Harbawi M, Bustam MA, Noaman YA, et al. Synthesis and physical properties of choline carboxylate ionic liquids. *J Chem Eng Data*. 2012;57(8):2191–6.
 135. Magri A, Soler MF, Lopes AM, Cilli EM, Barber PS, Jr AP, et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods — colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(27):6985–90.
 136. Eftink M, Ghiron C. Exposure of tryptophanyl residues in proteins: quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*. 1976;15(3):672–80.
 137. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455–61.
 138. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4 : Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785–91.
 139. Glyk A, Scheper T, Beutel S. Influence of different phase-forming parameters on the phase diagram of several PEG-salt aqueous two-phase systems. *J Chem Eng Data*. 2014;59(3):850–9.
 140. Abbasiliasi S, Tan JS, Ibrahim TAT, Kadkhodaei S, Ng HS, Vakhshiteh F, et al. Primary recovery of a bacteriocin-like inhibitory substance derived from *Pediococcus acidilactici* Kp10 by an aqueous two-phase system. *Food Chem*. 2014;151:93–100.
 141. Nagaraja VH, Iyyaswami R. Aqueous two phase partitioning of fish proteins: partitioning studies and ATPS evaluation. *J Food Sci Technol*. 2015;52(6):3539–48.
 142. Neves CMSS, Shahriari S, Lemus J, Pereira JFB, Freire MG, Coutinho JAP. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and polypropylene glycol: Insights into their liquid-liquid demixing mechanisms. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(30):20571–82.
 143. Silva Jr JG. Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2001. 126 p.
 144. Jayaram HN, Cooney DA, Jayaram S, Rosenblum L. A simple and rapid method for the estimation of L-asparaginase in chromatographic and

- electrophoretic effluents: comparison with other methods. *Anal Biochem.* 1974;59(2):327–46.
145. Santos JHPM, Costa IM, Molino JVD, Leite MSM, Pimenta M V., Coutinho JAP, et al. Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host. *Biotechnol Prog.* 2016;33(2):416–24.
 146. Khushoo A, Pal Y, Singh BN, Mukherjee KJ. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. *Protein Expr Purif.* 2004;38(1):29–36.
 147. Basha NS, Rekha R, Komala M, Ruby S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine *Actinomycetes* by solid-state and submerged fermentation: purification and characterisation. *Trop J Pharm Res.* 2009;8(4):353–60.
 148. Gholamian S, Gholamian S, Nazemi A, Nargesi MM. Optimization of culture media for L-asparaginase production by newly isolated bacteria, *Bacillus* sp. GH51. *Microbiology.* 2013;82(6):856–63.
 149. Kumar NSM, Ramasamy R, Manonmani HK. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Ind Crop Prod.* 2013;43:150–8.
 150. Galani I, Drainas C, Typas MA. Growth requirements and the establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett.* 1985;7(9):673–8.
 151. Kil J, Kim G, Park I. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995;59(4):749–50.
 152. Tong WH, Pieters R, Hop WCJ, Lanvers-kaminsky C, Boos J, Sluis IM Van Der. No evidence of increased asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(2):258–61.
 153. Pinheiro JPV, Wenner K, Escherich G, Wu G, Boos J. Serum asparaginase activities and asparagine concentrations in the cerebrospinal fluid after a single infusion of 2,500IU/m² PEG asparaginase in children with all treated according to protocol COALL-06-97. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46(1):18–25.
 154. Ramakrishnan MS, Joseph R. Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospiridium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. *Can J Microbiol.* 1996;42(4):316–25.
 155. Scopes RK. Enzyme activity and assays. *Encycl Life Sci.* 2002;1–6.
 156. Burns B, Mendz G, Hazell S. Methods for the measurement of a bacterial enzyme activity in cell lysates and extracts. *Biol Proced Online.* 1998;1(1):17–26.
 157. Sabatier AM, Fish NM. Method of analysis for feed enzymes: methodological problems? *Is an Enzyme.* 1996;5(4):408–13.
 158. Kettner C, Cornish-Bowden A. Quo Vadis, enzymology data? Introductory remarks. *Perspect Sci.* 2014;1(1–6):1–6.
 159. Schomburg I, Chang A, Schomburg D. Standardization in enzymology—data integration in the world's enzyme information system BRENDA. *Perspect Sci.* 2014;1(1–6):15–23.
 160. Tipton KF, Armstrong RN, Bakker BM, Bairoch A, Cornish-Bowden A, Halling PJ, et al. Standards for reporting enzyme data: the STRENDA consortium: what it aims to do and why it should be helpful. *Perspect Sci.*

- 2014;1(1–6):131–7.
161. Xanthakis E, Zarevúcka M, Saman D, Wimmerová M, Kolisis FN, Wimmer Z. Application of ionic liquids in enzymic resolution by hydrolysis of cycloalkyl acetates. *Tetrahedron Asymmetry*. 2006;17(21):2987–92.
 162. Fonseca LC, Caroline N, Corrêa R, Garrote-filho MS, Chagas C, Penha-silva N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. *Quim Nov*. 2006;29(3):543–8.
 163. Chen Y, Barkley MD. Toward understanding tryptophan fluorescence. *Biochemistry*. 1998;37(28):9976–82.
 164. Swaminathan R, Krishnamoorthy G, Periasamy N. Similarity of fluorescence lifetime distributions for single tryptophan proteins in the random coil state. *Biophys J*. 1994;67(5):2013–23.
 165. Vivian JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J*. 2001;80(5):2093–109.
 166. Jha I, Attri P, Venkatesu P. Unexpected effects of the alteration of structure and stability of myoglobin and hemoglobin in ammonium-based ionic liquids. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16(12):5514.
 167. Givaty O, Levy Y. Protein sliding along DNA: dynamics and structural characterization. *J Mol Biol*. 2009;385(4):1087–97.
 168. Lee LL, Lee JC. Thermal stability of proteins in the presence of poly (ethylene glycols). *Biochemistry*. 1987;26(1981):7813–9.
 169. Noel M, Combes D. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. 2003;33(2-3):299–308.
 170. Chan HS, Dill KA. Polymer principles in protein structure and stability. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1991;20:447–90.
 171. Ries-Kautt MM, Ducruix AF. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *J Biol Chem*. 1989;264(2):745–8.
 172. Carbonnaux C, Ries-kautt M, Ducruix A. Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic *Hypoderma lineatum* collagenase at pH 7.2. *Protein Sci*. 1995;4(10):2123–8.
 173. Kim CW, Rha CK. Salting-out effects on the partition of proteins in aqueous two-phase systems. *J Microbiol Biotechnol*. 1996;6(5):352–7.
 174. Schmidt AS, Andrews BA, Asenjo JA. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. *Biotechnol Bioeng*. 1996;50(6):617–26.
 175. Huddleston J, Abelaira JC, Wang R, Lyddiatt A. Protein partition between the different phases comprising poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems, hydrophobic interaction chromatography and precipitation: A generic description in terms of salting-out effects. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;680(1–2):31–41.
 176. Baskir JN, Hatton TA, Suter UW. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. *Biotechnol Bioeng*. 1989;34(4):541–58.
 177. Reh G, Nerli B, Picó G. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human plasma by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2002;780(2):389–96.
 178. Farruggia B, Nerli B, Picó G. Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in

- aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B*. 2003;798(1):25–33.
179. Ferreira LA, Uversky VN, Zaslavsky BY. Phase equilibria, solvent properties, and protein partitioning in aqueous polyethylene glycol-600-trimethylamine N-oxide and polyethylene glycol-600-choline chloride two-phase systems. *J Chromatogr A*. 2018;1535:154-161.
 180. Oelmeier SA, Dimer F, Hubbuch J. Molecular dynamics simulations on aqueous two-phase systems - single PEG-molecules in solution. *BMC Biophys*. 2012;5(1):14.
 181. Knolls D, Hermans J. Polymer-protein Interactions: comparison of experiment and excluded volume theory. *J Biol Chem*. 1983;258(9):5710–5.
 182. Bhat R, Timasheff SN. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Protein Sci*. 1992;1(9):1133–43.
 183. Warangkar SC, Khobragade CN, Dawane BS, Bhosale RB. Effect of dihydropyrimidine derivatives on kinetic parameters of *E. carotovora* L-asparaginase. *Int J Biotechnol Appl*. 2009;1(1):05-13.
 184. Kavakcioğlu B, Tongul B, Tarhan L. Aqueous two-phase system purification for superoxide dismutase induced by menadione from *Phanerochaete chrysosporium*. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2017;45(2):380-388.
 185. Kristiansen T, Einarsson M, Sundberg L, Porath J. Purification of L-asparaginase from *E. coli* by specific adsorption and desorption. *FEBS*. 1987;7(3):294–6.
 186. Qin M, Zhao F. L-Asparaginase from *Escherichia coli* cells with aqueous two-phase micellar systems. *Appl Biochem Biotechnol*. 2003;110(1):11–21.
 187. Andrews BA, Schmidt AS, Asenjo JA. Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity and charge. *Biotechnol Bioeng*. 2005;90(3):380–90.
 188. Johansson G. Effects of salts on the partition of proteins in aqueous polymeric biphasic systems. *Acta Chem Scand B*. 1974;28(8):873–82.