

#### UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Campus Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociências 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

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

Magri, Agnes. M212e Extração e purificaç

Extração e purificação do biofármaco antileucêmico Lasparaginase (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.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6

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 Rodriguéz (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 pósgraduação, 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 Lasparaginase (ASNase) utilizando-se SABs com polímeros e sais ou líguidos 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 guantificação adeguado 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, Lls 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 alguílica 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<sup>-1</sup> (PEG 600) e polipropilenoglicol de massa molecular média 400 g.mol<sup>-1</sup> (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 particão 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<sup>-1</sup> (PEG 600) and polypropylene glycol of average molecular weight 400 g.mol<sup>-1</sup> (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 upstreamdownstream 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 ABREVIAÇÕES

<sup>13</sup> C RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono				
<sup>1</sup> H RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton				
ADT	Auto Dock Tools software				
AE	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )				
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				
∟-GIn	L-glutamina				
L-Glu	Ácido L-glutâmico				
LI	Líquido Iônico				
NADH	Nicotinamida Adenina Nucleotídeo reduzido				
nm	Nanômetros				
ΟΡΑ	o-Ftaldeído				
PDB	Protein Data Bank: 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	AGE Eletroforese de Gel de Poliacrilamida com Dodeci					Sulfato de		
	Sódio	(do	inglês	"sodium	dodecyl	sulfate		
	acrylamide	ide gel electrophoresis")						
ТСА	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 <sup>-10</sup> m)
g	Força centrífuga
К	Coeficiente de Partição
kDa	Quilodaltons
Tf	Temperatura de fusão ("melting point")
U	Unidade Enzimática (µmolsubstrato min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )
∆Ср	Variação do calor específico a pressão constante
θ	Elipticidade (miligraus)
μL	Microlitros (10 <sup>-3</sup> mL)

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Composição dos sistemas ternários utilizados para partição daASNase.62

Tabela 4. Variação das unidades de absorbância da amônia em função dotempo de reação de coloração com reagente de Nessler (em min) paradiferentes comprimentos de onda.82

**Tabela 5.** Energias de afinidade de ancoragem e átomos interagentes previstospelo programa AutoDock para a ASNase e os cátions dos sais.106

 Tabela 6. Propriedades físico-químicas e parâmetros de extração (K e EE (%))

 dos sistemas polímero/sal ou LI utilizados na extração da ASNase comercial.

**Tabela 9.** Composição dos SABs compostos por PPG 400/[Ch]X e atividaderelativa (%) 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	AS	Nase							25

Figura 3. Fluxograma representando os objetivos específicos agrupados porfases 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 8.** Relação de atividade da ASNase (U.mL<sup>-1</sup>) 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

**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 µmol.mL<sup>-1</sup>. **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.

**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 mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total<sup>-1</sup></sub>, e tampão - linha preta) sob a fluorescência da

**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.

**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.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES	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 etabilidade 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 (SD	S-
PAGE)	68
~	
4. RESULTADOS E DISCUSSAO	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 7	71
4.1.2 Método de Nessler adaptado	80
4.2 Efeito de Diferentes Compostos na Estabilidade Catalítica da ASNase 8	85
4.2.1 Efeito do [Ch]Cl sob a estabilidade catalítica e estrutural da ASNase 8	86
4.2.1.1 Efeito do [Ch]Cl sob estabilidade e atividade catalítica da ASNase 8	86
4.2.1.2 Efeito do [Ch]Cl sob a estrutura proteica da ASNase	90
4.2.2 Efeito do aumento da cadeia alquilíca dos ânions de LIs baseados e	m
[Ch] <sup>+</sup> sob a estabilidade da ASNase10	00
4.2.2.1 Efeito do aumento da cadeia do ânion de compostos baseados em	
[Ch] <sup>+</sup> na estabilidade e atividade catalítica da ASNase	00
4.2.2.2 Efeito do aumento da cadeia do ânion de compostos baseados em	
[Ch] <sup>+</sup> sob a estrutura tridimensional da ASNase10	04
4.2.3 Influência do pH na atividade da ASNase	07
4.2.4 Influência de polímeros na estrutura proteica da ASNase	09
4.3 Controle da partição da ASNase pela seleção da natureza dos SABs à bas	se
de polímero/sal ou LI	12
4.4 Recuperação de ASNase recombinante a partir de lisado celular de E. c	oli
	25
~	
5. CONCLUSÕES	37
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	30
	00
7. REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2	52
LISTA DE PUBLICAÇÕES1	53
<b>APENDICES</b>	55

APÊNDICE 1	156
APÊNDICE 2	156
APÊNDICE 3	157
APÊNDICE 4	
APÊNDICE 5	159
APÊNDICE 6	

# **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<sup>®</sup>) 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<sup>®</sup>, 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).

#### 1.1 L-asparaginase

A ASNase (E.C.3.5.1.1) é a enzima que catalisa a reação de hidrólise do grupo amino da cadeia lateral do aminoácido L-asparagina (Figura 1), liberando ácido L-aspártico e amônia [4], sendo amplamente utilizada como agente antineoplásico [5] e também na indústria alimentícia, para depleção de acrilamida em alimentos processados [6].



L-asparagina

Ácido L-aspártico Amônia

Figura 1. Reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina catalisada pela enzima ASNase. Fonte: a própria autora.

Inicialmente, estudos correlacionaram a atividade antitumoral de soro de cobaias sob linfomas à presença de ASNase [7]. No entanto, a baixa quantidade desta enzima obtida a partir do soro de cobaias limitava a realização de testes clínicos, e assim, outras fontes foram então estudadas, principalmente as de origem microbiana, devido à sua viabilidade de produção em larga escala [8]. A enzima produzida por processos microbianos demonstrou um efeito terapêutico similar à de soro de cobaias [9] e uma eficácia terapêutica comprovada em humanos [10]. Desde essa constatação, a ASNase vem sendo amplamente utilizada para o tratamento da Leucemia Linfóide/Linfoblástica Aguda (LLA) infanto-juvenil [2].

Nos indivíduos acometidos pela LLA, a medula óssea produz excessivamente blastos leucêmicos (linfoblastos), ou seja, um número excessivo de células brancas (leucócitos) imaturas. Os blastos leucêmicos se acumulam na medula óssea e interferem na produção de células sanguíneas. Além disso, podem ainda se espalharem pelo sangue e invadir outras partes do corpo, como gânglios linfáticos, baço, fígado, sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro), entre outros [11].

A LLA é reconhecida como o câncer mais comum em crianças, representando até 80% de todos os cânceres que acometem crianças e 20% de todos os cânceres que acometem adultos [12]. No Brasil, a LLA representa a causa mais frequente de morte por câncer antes dos 20 anos de idade [13].

Algumas das causas conhecidas da LLA incluem a presença de síndromes genéticas congênitas no feto, como a síndrome de Down, neurofibromatose, anemia de Fanconi e a síndrome de Bloom, e também a exposição parental à radiação ionizante. No entanto, todas essas causas juntas explicam somente 10% dos casos [14]. Recentemente, a LLA infantil foi associada a causas ambientais, como o baixo estímulo do sistema imune nos primeiros anos de vida. Assim, o aumento da incidência da LLA pode ser vista como consequência do progresso nas sociedades modernas, onde as mudanças comportamentais restringiram a exposição microbiana precoce, o que gerou um descompasso evolutivo entre as adaptações históricas do sistema imunológico e os estilos de vida [15].

Genericamente, a aplicação de qualquer tipo de ASNase visa esgotar a asparagina do sangue, reduzindo consequentemente a incidência de várias doenças hematológicas que dependem de asparagina extracelular para o crescimento [16], como é o caso da Leucemia Linfóide/Linfoblástica Aguda (LLA) infanto-juvenil [2]. No caso da leucemia, os blastos leucêmicos e as células da medula necessitam da asparagina extracelular para seu desenvolvimento, já que não expressam, ou expressam em níveis muito baixos, a enzima asparagina-sintetase, que é normalmente expressa em células saudáveis [17]. Portanto, a progressão das células malígnas de LLA depende quase que exclusivamente de fontes exógenas de L-asparagina. Assim, a aplicação da ASNase na corrente sanguínea depleta os níveis de L-asparagina circulante, e consequentemente, destrói seletivamente as células tumorais que dependem de fontes exógenas desse aminoácido [16].

A utilização da ASNase aumentou as chances de cura em até 90 %, sendo portanto parte da terapia de primeira linha [11]. O tratamento da LLA utilizando a ASNase consiste em quatro fases de tratamento: indução da remissão; consolidação/terapia dirigida pelo sistema nervoso central; reindução (intensificação tardia) e manutenção/continuação. A duração total do

tratamento, em geral, é de 2 a 3,5 anos, com a terapia intensiva ocorrendo nos primeiros 6 a 9 meses [11].

Como atrás enunciado, apesar da ASNase poder ser produzida por diversas fontes, quando produzida por via microbiana, esta é geralmente produzida por microrganismos, tais como bactérias: *Escherichia coli* [9]; *Bacillus subtilis* [18]; *Bacillus licheniformis* [19]; *Streptobacillus* sp. [20]; e fungos: *Aspergillus terreus* [21]; *Aspergillus oryzae* [22]; *Cladosporium* sp. [23]; *Flammulina velutipes* [24]; *Pichia pastoris* [25].

No entanto, hoje existem no mercado 4 formas terapeuticamente aceitas, duas formas de ASNase nativa obtidas de *E. coli* e *Dickeya dadantii* (anteriormente conhecida como *Erwinia chrysanthemi*), uma forma modificada por peguilação obtida de *E. coli* e uma forma recombinante expressa em *E. coli* (Spectrila<sup>®</sup>). Atualmente, no ano de 2019, somente a Spectrila possui registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Registro ANVISA nº 1562600310016 – Spectrila). Em geral, a ASNase de *D. dadantii* é utilizada em casos de pacientes com hipersensibilidade às outras formas [4].

A ASNase nativa obtida de *E. coli* é a mais comum, sendo conhecida como ASNase tipo II (PDB: 3ECA). Esta forma é caracterizada por um homotetrâmero composto de subunidades idênticas denominadas A, B, C e D, de 34 kDa cada. As subunidades da ASNase são constituídas por dois domínios  $\alpha/\beta$  conectados pelos aminoácidos 191-212 da sequência. O tetrâmero interage entre si formando 2 pares de subunidades, sendo constituído de 2 dímeros com 2 dímeros idênticos em cada, chamados de AB e CD, como apresentado na Figura 2.

Cada dímero possui dois sítios ativos, que estão localizados entre as subunidades dos dímeros. Cada sítio ativo é composto pelos resíduos do domínio N-terminal em contato com o domínio C-terminal da subunidade intimamente ligada. Devido à isso, somente o tetrâmero possui atividade catalítica [26]. Além disso, estruturalmente, a ASNase é uma enzima que se mostra estável em ampla faixa de pH (4,5-11,5), e apresenta um leve aumento na atividade e estabilidade em valores de pH alcalinos, o que indica uma conformação mais estável da molécula nessas condições [27].



Figura 2. Representação do cristal de L-asparaginase de *E. coli* mostrando a simetria da enzima e suas subunidades.

Fonte: Protein Data Bank, referência 3ECA.

Devido à baixa concentração de ASNase encontrada no meio fermentado em sistemas de expressão microbiana, as etapas de concentração, extração e purificação têm se tornando extremamente importantes e índices fundamentais para alcançar de produção satisfatórios [25]. Adicionalmente, as exigências por alto grau de pureza para a comercialização dos biofármacos reforça a importância das etapas de purificação. Desse modo, essas necessidades conduziram ao desenvolvimento e aprofundamento de técnicas alternativas de extração/purificação, que oferecessem um processo de baixo custo, com alta biocompatibilidade, as quais permitam não somente a separação, mas também sua concentração e purificação.

#### 1.2 Métodos de quantificação da atividade enzimática da ASNase

A ASNase catalisa a desaminação da asparagina (L-Asn) e glutamina (L-Gln), e como citado acima, tem sido muito utilizada como agente antitumoral bem estabelecido para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (ALL) [10], outros tipos de câncer relacionados [28, 29] e, recentemente, e contra infecções de bactérias patogênicas [30]. Por outro lado, a ASNase tem sido também aplicada com sucesso na indústria alimentícia para prevenir a formação de acrilamida em alimentos processados com alto teor de amido [31– 33]. Considerando sua grande importância e vasta aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia [34], a demanda por métodos adequados, sensíveis e confiáveis para determinação da atividade da ASNase tem aumentado.

O uso da ASNase em diversos segmentos industriais se baseia na capacidade dessa enzima em hidrolisar tanto a L-Asn quanto a L-Gln, e consequentemente, formar ácido L-aspártico (L-Asp) e glutamato (L-Glu), respectivamente, e a amônia como subproduto (NH<sub>3</sub>). Desse forma, sua atividade enzimática é quantificada pela medida da conversão do substrato à taxa máxima, onde uma unidade de ASNase (U) corresponde à quantidade de enzima necessária para converter 1 µmol de L-Asn, em 1 µmol de L-Asp e NH<sub>3</sub> por minuto, sob as condições de temperatura e pH abordadas [35]. Em geral, estudos voltados à aplicação como biofármaco costumam utilizar a quantificação em pH aproximado ao do plasma sanguíneo (7,4) e temperatura de 37°C.

Assim, para medir a conversão de substrato, foram desenvolvidos vários métodos de quantificação baseados na determinação L-Asp ou NH<sub>3</sub>. Os métodos que determinam o L-Asp incluem o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), [36–38] quantificação direta de aminoácidos por dicroísmo circular (CD) [39], eletroforese [40] e determinação de L-Asp por complexação com hidroxilamina [41, 42]. Por outro lado, os métodos que medem a quantidade de NH<sub>3</sub> liberada envolvem, em geral, o uso de reagentes colorimétricos, como Nessler [43, 44] ou indofenol [45], que consistem na reação da NH<sub>3</sub> com um reagente de cor seguido pela determinação espectrofotométrica.

Em alternativa aos métodos colorimétricos, o NH<sub>3</sub> liberado também pode ser medido por elétrodo de íon seletivo [46], ou com o método acoplado a enzima glutamato desidrogenase o qual mede a oxidação de NADH para síntese de glutamato a partir da NH<sub>3</sub> liberada pela hidrólise da L-Asn pela ASNase [47]. Além desses, outros ensaios aplicados na determinação da atividade da ASNase baseiam-se na medição da degradação de substratos alternativos, como indoxina [35, 48] e o ácido L-aspártico  $\beta$ -(7-amido-4metilcumarina) [49]. Por fim, a condutimetria também pode ser utilizada como ferramenta para medir a atividade enzimática da ASNase, onde o aumento de condutividade corresponde à produção simultânea de L-Asp e NH<sub>3</sub> [50]. Apesar de vários métodos de quantificação da atividade da ASNase serem bem estabelecidos, não há uma padronização atual e nenhuma diretriz oficial de controle de qualidade a ser seguida [51]. Devido à inexistência de padronização, a atividade ASNase relatada na literatura é bastante diferente e dispersa, tornando complexo comparar efetivamente a atividade enzimática "real" considerando a ampla variedade de aplicações da enzima. Como por exemplo, não podemos garantir que uma nova cepa produz mais ASNase do que microrganismos anteriores, caso diferentes métodos sejam aplicados em diferentes condições de reação.

O método mais comum, e amplamente utilizado, para quantificação de ASNase é o método colorimétrico de Nessler. Este consiste na reação entre o reagente de Nessler (tetraiodomercurato(II) de potássio) e a NH<sub>3</sub>, liberada durante a conversão de L-Asn em L-Asp, fornecendo uma coloração amarela característica, que pode ser quantificada por espectrofotometria [43]. O método de Nessler possui uma boa reprodutibilidade, no entanto, requer um cuidado meticuloso para evitar interferência nos resultados [52], apresenta baixa sensibilidade (não é preciso para atividades inferiores a 20 U.L<sup>-1</sup>) [43] e envolve o uso de reagentes altamente tóxicos [36, 49]. Além disso, o reagente de Nessler não é seletivo para o íon de amônio, e dessa forma, muitas substâncias podem interferir com a reação colorimétrica, como polímeros, ésteres, sais [53, 54], surfactantes, álcoois, aminas e aldeídos, ou ainda, temperatura de reação, tempo de coloração e taxa de agitação, os quais podem afetar no desenvolvimento da cor deste reagente [55, 56].

Para superar algumas das limitações do método de Nessler, particularmente em amostras de meio fermentado, um cenário bem mais complexo, uma vez que vários microrganismos podem produzir bioprodutos à base de amônia, ou em meios com alto teor de NH<sub>3</sub> que também afetam a cor do reagente de Nessler [55], foram propostos alguns métodos alternativos para a determinação da atividade da ASNase. Uma das abordagens clássicas consiste na determinação de ácidos hidroxâmicos sintetizados pela reação enzimática da ASNase com os aminoácidos L-Glu ou L-Asn e hidroxilamina [41]. Em mais detalhes, em geral a ASNase converte L-Asn em ácido β-hidroxamato L-aspártico (AHA) na presença de hidroxilamina, tipicamente conhecido como método AHA. Em seguida, o AHA é complexado com íons

férricos (Fe<sup>3+</sup>), desenvolvendo uma cor característica vermelha mensurável por espectrofotometria de luz visível [41]. A reação reversa também pode ser usada para determinação da atividade da ASNase, e consiste na hidrólise do AHA, também conhecido como método de indooxina [35]. Este ensaio é baseado na reação da hidroxilamina, produto da hidrólise do AHA pela ASNase, com a 8-hidroxiquinolina em pH alcalino, resultando na formação de indooxina, um corante de verde oxindol intenso detectável em comprimentos de onda de 705 a710 nm [35, 48]. Embora, o método da indooxina seja bastante sensível (limite de detecção até 2.10<sup>-5</sup> U.L<sup>-1</sup>), este possui uma faixa de trabalho limitada devido à instabilidade da hidroxilamina acima da neutralidade [48]. Outro método alternativo é o método fluorimétrico, que quantifica a 7-amino-4-metilcoumarina, produto da degradação do ácido  $\beta$ -(7-amido-4-metilcumarina) L-Asp pela ASNase, utilizando o espectrofluorímetro [49]; no entanto, este ainda é pouco utilizado.

Nos últimos anos, vem sendo realizados alguns estudos para melhorar a sensibilidade, precisão, reprodutibilidade e a confiabilidade dos protocolos existentes para a maioria dos métodos colorimétricos, nos quais foram propostas adaptações e melhorias, como, por exemplo, alteração do tempo de reação enzimática, composição dos reagentes, pH e molaridade dos tampões [35, 51]. Visando superar as desvantagens dos métodos colorimétricos, alguns métodos utilizando CLAE foram desenvolvidos para determinar a atividade ASNase, por meio da quantificação de L-Asp ou L-Asn (depleção) [36–38]. Os métodos para a determinação de aminoácidos por CLAE são interessantes, uma vez que podem quantificar não só o L-Asp produzido, mas também o L-Asn consumido durante a reação enzimática.

Recentemente, Nath et al. [36] determinaram a atividade de ASNase pela quantificação de L-Asp produzida após incubação de amostras de plasma com L-Asn, utilizando CLAE com detector de fluorescência. O ensaio consistiu na derivatização dos produtos enzimáticos com *o*-ftaldeído seguido da separação em cromatografia em fase reversa e detecção por fluorescência a 357 nm (excitação) / 455 nm (emissão) [36]. Este método mostrou excelente reprodutibilidade, sensibilidade e linearidade, uma vez que avalia não só a produção de L-Asp ou L-Glu, mas também o consumo dos substratos, L-Asn e

L-Gln [36]. No entanto, trata-se de um método com longo tempo de execução e de complexidade relativamente maior que os demais métodos colorimétricos.

Apesar da grande quantidade de métodos de quantificação da atividade ASNase, somente a Farmacopéia Chinesa possui monografias a respeito da quantificação da ASNase para fins farmacêuticos [57]; e para aplicações alimentares, a *Food and Drug Administration* (FDA) indica o método Nessler para ser utilizado em amostras que contenham ASNase pura [58]. Assim, considerando a escassez de protocolos padronizados e diretrizes de controle de qualidade farmacêutica, protocolos padrões para medir o atividade de preparações de ASNase são dificilmente relatados [51].

Neste contexto, considerando a variedade de métodos e a ausência de padronização "oficial" pelas agências reguladoras, existe a necessidade de encontrar o método mais adequado através de uma comparação crítica entre os métodos estabelecidos na literatura.

#### 1.3 Estabilidade proteica na presença de LIs

Dentre os produtos biotecnológicos, os biofármacos representam uma das classes mais importantes, uma vez que trazem grandes avanços para a área farmacêutica, em especial, no que diz respeito à produção de biomoléculas complexas [59]. Adicionalmente, a atual possibilidade de tratamento específico e personalizado está também amplamente associada ao avanço da indústria de biofármacos [60].

Os biofármacos, ou fármacos biológicos, são fármacos de origem proteica ou derivada de ácidos nucléicos produzidos por fontes biológicas modificadas ou processos biotecnológicos, os quais podem oferecer vantagens adicionais aos fármacos convencionais (pequenas moléculas de menor complexidade), como por exemplo, maior potência e maior especificidade proporcionada por sua estrutura complexa [61]. Devido à alta complexidade estrutural e maior tamanho, o grande desafio na utilização dos biofármacos é manter a sua estabilidade estrutural durante o processo de produção, isolamento, armazenamento e administração [62]. Isso ocorre particularmente devido à presença de osmólitos, íons, enzimas ou anticorpos presentes nas vias de administração, além da presença de diferentes solventes ao longo dos processos de produção e estocagem, os quais podem agir sobre a estrutura

proteica, tornando os biofármacos muito mais suscetíveis a alterações [61, 63, 64]. De forma simplificada, e como exemplificado na Tabela 1, os biofármacos apresentam maior suscetibilidade a modificações comparativamente ao fármacos sintéticos, devido à baixa estabilidade estrutural, complexidade de processos de manufatura e *de downstream*, entre outros.

	Fármacos Sintéticos		Biofármacos
Moléculas	Pequenas (ex.	ácido	Grandes (de 2 mil a 25 mil átomos)
	acetilsalicílico: 21 átomos)	)[65]	[65]
Estrutura	Simples		Complexas
Estabilidade	Estáveis		Instáveis
Caracterização	Simples e completa		Difícil e incompleta
Manufatura	Previsível pelo proc	cesso	Variável, produzido por sistemas
	químico		vivos
	Possibilidade de obtençã	o de	Impossível de realizar cópias
	cópias idênticas		idênticas
	Genéricos e similares		Biossimilares
Downstream	Menos etapas		Muitas etapas (como por exemplo,
			etapa extra para remoção de debris
			celulares)
Patentes	Geralmente única		Múltiplas
Imunogenicidade	Ocasional		Frequente
Custos de	US\$ 30 milhões a US\$	100	US\$ 200 milhões a US\$ 500
produção – larga	milhões[65]		milhões[65]
escala			

**Tabela 1.** Principais diferenças entre os fármacos sintéticos e os biofármacos.

Fonte: a própria autora, adaptado de Pinto, 2016 [66].

Em geral, os medicamentos biológicos são conhecidos pela expressão "o processo é o produto", o que demonstra a grande importância dos detalhes do processo de manufatura que podem alterar a qualidade final do produto. Qualquer variação de processo resulta em um produto distinto, e por se tratar de produção biológica, está susceptível a pequenas modificações que ocorrem naturalmente [67], e portanto, cópias exatamente idênticas de medicamentos biológicos não podem ser produzidas [66]. Adicionalmente, por se tratarem de macromoléculas, os biofármacos são passíveis de desencadear diferentes respostas imunes. Pequenas alterações que podem ocorrer naturalmente nas moléculas no ambiente celular ou perda de estrutura ao longo das etapas produtivas, podem aumentar a imunogenicidade desses fármacos. Outro ponto é que por serem recuperados de meios biológicos, podem apresentar diferentes impurezas, quando comparadas aos sintéticos, que contribuem para a imunogenicidade final do produto. Assim, esta é uma importante diferença entre os fármacos sintéticos e os biológicos [66].

Dessa maneira, a indústria de biofármacos apresenta ainda muitas dificuldades tecnológicas quando comparada à indústria farmacêutica tradicional baseada em síntese química. A base científica inerente à produção de biofármacos é muito mais recente que à de síntese química, que por sua vez possui mais de um século de desenvolvimento. Assim, os processos de biotecnologia moderna utilizados na produção biofarmacêutica são extremamente novos, sem acúmulo suficiente de conhecimento [60].

Segundo a *Emerging Therapeutic Company Investiment and Deal Trends*, o setor que os capitais de risco mais investem é a oncologia, devido ao maior retorno financeiro, quando comparada às demais frentes biotecnológicas [60]. Logo, um dos desafios da indústria é atender a este mercado crescente, aumentando sua escala de produção e mantendo a qualidade do produto. Avanços nessa área se direcionam às melhorias de processos como: sistemas de expressão celular; eficiência de purificação; estabilização; entre outros que impactam diretamente sobre o custo e a qualidade dos bioprodutos [65].

Assim, para obter produtos de alta qualidade e tratamento efetivo é necessário que o biofármaco na sua forma final, se apresente na sua forma mais estável, com a manutenção de sua atividade biológica e com alto índice de pureza [68]. De fato, uma das principais barreiras à larga produção de biofármacos pela indústria farmacêutica se relaciona com as modificações estruturais que podem ocorrer nas proteínas utilizadas como agentes terapêuticos [64]. Neste caso, além da viabilidade e qualidade do produto, deve-se levar em conta os solventes utilizados durante o processamento do biofármaco, uma vez que exibem alta influência na estabilização do produto ao longo do processo produtivo, uma vez que exibem alta influência o razões toxicológicas e ambientais, a indústria farmacêutica busca minimizar o número e a quantidade de solventes utilizados na produção de fármacos. Adicionalmente, por serem tóxicos podem acelerar a degradação estrutural do produto [70].
A conformação nativa de proteínas é resultado de interações complexas como interações hidrofóbicas, iônicas e ligações de hidrogênio. A estrutura de proteínas e consequentemente suas funções, são moduladas por alterações das interações intra e intermoleculares da cadeia polipeptídica, como por exemplo, resultado da presença de diferentes solventes [71]. A perda da estabilidade pode levar à desnaturação proteica, processo onde a proteína perde a sua estrutura terciária e secundária e/ou sua atividade biológica na presença de, por exemplo, ácidos ou base fortes, altos níveis de sais e altas temperaturas. Assim, a utilização de Líquidos lônicos (LIs) como agentes efetivos na manutenção da estabilidade nativa de proteínas, principalmente no que diz respeito às suas funções biocatalíticas, têm sido bastante estudadas. Diversos trabalhos têm avaliado as interações entre proteínas e co-solventes, trazendo novas perspectivas sobre o comportamento e propriedades das proteínas, suas interações com os solventes e alterações conformacionais [72].

As modificações estruturais de proteínas levam a alterações em sua função biológica, as quais podem promover sua estabilização ou desnaturação. Em geral, qualquer estresse no ambiente ao redor da proteína, como a simples mudança de temperatura, pressão ou adição de eletrólitos, podem levar a modificações estruturais cruciais para a perda ou manutenção da sua função biológica [73]. Assim, as proteínas são consideradas extremamente sensíveis às características do meio em que se encontram. Um exemplo, é a energia livre de Gibbs descrita para desestabilizar a estrutura proteica até o estado de desenovelamento que é muito baixa, o que corresponde a 60 kJ por mol de proteína, aproximadamente, a energia equivalente a quebra de apenas 3 ligações por ponte de hidrogênio (H) [73, 74].

Sendo assim, a baixa estabilidade de proteínas resulta do tênue equilíbrio de forças moleculares nomeadamente, interações hidrofóbicas, de van der Waals, eletrostáticas, ligações por pontes de hidrogênio, tendência intrínseca (entropia conformacional, interações locais) e também resulta de fatores físicos (temperatura, agitação, pressão) [64, 75]. Enquanto a estabilização da estrutura tridimensional das proteínas é resultado dessas interações, a desestabilização é principalmente associada à componente entrópica devido à perda da configuração da cadeia enovelada (*"folded"*) [75]. O desenovelamento de proteínas pode ser reversível ou irreversível. Assim, em

35

muitos casos, durante o processo de desenovelamento, pode ocorrer também a agregação de proteínas, o que limita ainda mais a estabilidade proteica [73]. A agregação proteica in vivo é responsável por doenças como a doença de Alzheimer e a doença de Huntington [76] e ainda representa um significante fator imunogênico [77]. In vitro, a possibilidade de agregação deve ser considerada em várias etapas de diferentes processos industriais. Por exemplo, no campo farmacêutico, a agregação in vitro limita o tempo de prateleira de fármacos baseados em proteínas, além de dificultar formulações biocatalíticas em laboratórios e processos em larga escala [64], já que agregada, a enzima pode apresentar sua função biológica reduzida ou inativada. Além desses, os processos de produção de proteínas recombinantes em sistemas de expressão bacterianas também são afetados pela agregação, uma vez que as proteínas quando expressas em corpos de inclusão, apenas após a ruptura da célula essas proteínas serão solubilizadas e então enoveladas para sua estrutura nativa ativa de acordo com as condições do meio onde serão liberadas [78].

Portanto, para tornar as proteínas mais tolerantes às condições processuais na indústria, existem algumas possibilidades como mutação sítiodirigida da proteína, modificações estruturais por adesão a suportes sólidos, encapsulações, ou alternativamente, e de uma forma bem mais simples, a estabilidade enzimática pode ser alcançada pela escolha apropriada do solvente no qual a proteína é solubilizada [79, 80]. No entanto essas estratégias não garantem a estabilidade térmica das mesmas [81]. Assim, devido à instabilidade da manipulação *in vitro* de várias proteínas, a utilização de agentes estabilizadores é fundamental para assegurar a estabilidade biológica durante todo o processo de produção (etapas de *upstream* e *downstream*), bem como na formulação a longo prazo do produto terapêutico proteico [82].

Como o solvente tem forte influência na estabilização da estrutura proteica, a busca de processos mais ambientalmente sustentáveis está levando à substituição de solventes orgânicos por solventes alternativos, o que também além de estabilizar melhor a molécula proteica, reduz a exposição dos biofármacos a solventes tóxicos, e também traz melhorias ao processo de produção de biofármacos devido à redução dos resíduos tóxicos gerados [70].

36

Neste contexto, os LIs são compostos iônicos que apresentam uma grande deslocalização de carga, e foram previamente definidos como sais de baixo ponto de fusão e designados por LIs, comumente devido aos pontos de fusão menores que 100°C [83]. Os LIs são, de uma forma geral, constituídos por um cátion orgânico e um ânion inorgânico (ou orgânico) e apresentam uma série de propriedades físico-químicas interessantes como: baixa pressão de vapor; baixos pontos de fusão; alta estabilidade térmica, química e eletroquímica [84], grande capacidade de solvatação [85], alto grau de ajustamento das suas propriedades físico e/ou químicas através de uma escolha apropriada do ânion e/ou cátion [86, 87] podendo assim promover alta seletividade à diferentes compostos, grande capacidade de interações intermoleculares [88, 89], e/ou capacidade de superativar enzimas [90]. Assim, os Lls assumem um grande potencial como meio solvente para diversos processos de biocatálise [91][88, 91], extração [92] e estabilização [62, 88]. Em especial, devido à grande especificidade das interações intermoleculares entre os Lls e as proteínas, é fundamental a escolha adequada do Ll, visto que uma escolha inapropriada do LI pode levar a redução da estabilidade estrutural de proteínas, ou ainda, contribuir para redução de sua estabilidade térmica, resultando na diminuição ou perda de sua atividade biológica [93, 94].

Assim, considerando que em processos biológicos envolvendo proteínas, a manutenção da estrutura nativa e enovelamento são essenciais para a sua função enzimática, o uso de LIs tem se mostrado particularmente interessante em processos de extração e purificação, também conhecidos como processos *downstream*. No final das etapas de *downstream*, a proteína deve manter sua estrutura nativa intacta e sua função biológica. No entanto, realçando novamente que os LIs podem afetar a estabilidade estrutural das proteínas, uma vez que a estabilidade e funções catalíticas destas resultam de um equilíbrio tênue das forças moleculares que afetam a estrutura proteica quando em solução [73].

É amplamente conhecido que a hidratação dos íons perturba a estrutura da água e, consequentemente, influencia a atividade biológica e o comportamento catalítico de várias enzimas [88]. Em baixas concentrações de sais inorgânicos, o efeito observado sobre as proteínas é dominado pelas forças eletrostáticas entre os íons e a proteína carregada. Acima de determinadas concentrações de sais inorgânicos, o efeito específico de íons se sobrepõe aos demais efeitos, crescendo quando a concentração de sal é aumentada [95]. Dessa forma, em baixas concentrações, as forças eletrostáticas não específicas levam ao aumento da solubilidade das proteínas (efeito *salting in*), e em altas concentrações, a adição de sal pode precipitar a proteína (efeito *salting out*) de modo íon-específico [95].

Em geral, os efeitos de hidratação de proteínas por diferentes sais seguem a tendência da capacidade de salting in/salting out. Anteriormente, foi avaliado o poder estabilizador de vários sais sobre a estrutura proteica, os quais foram organizados em uma série, conhecida como série de Hofmeister, onde para os sais estudados, a variação do ânion se mostrou mais eficiente para estabilização, do que a variação do cátion, portanto os efeitos da série Hofmeister são em geral associados ao ânion dos sais inorgânicos. No entanto, algumas modificações a esta série vêm sendo observadas quando são utilizadas soluções aquosas de LIs, devido principalmente aos efeitos específicos dos íons (orgânicos e inorgânicos) sobre as propriedades da água, o que leva a modificações nas interações proteína-água e estes íons acabam interagindo diretamente com a proteína [88, 96, 97]. Desse modo, é evidente que uma escolha adequada do cátion ou ânion do LI e o fino ajuste de suas propriedades físico-químicas podem assim afetar positivamente a estrutura, atividade e estabilidade de várias enzimas [71]. LIs hidrofílicos, quando dissolvidos em solução aquosa, se dissociam em cátions e ânions individuais [71], e assim podem estabilizar proteínas através de algumas mudanças específicas na estrutura que podem levar a exposição do sítio ativo. Nesse caso, as mudanças no comportamento enzimático resultam não apenas dos efeitos salting-in/salting-out e das propriedades dos solventes, mas também resultam da contribuição dos efeitos de cada íon individualmente [97].

Dentre as diversas classes de LIs estudados, os LIs derivados de colina têm recebido grande atenção, particularmente, por serem capazes de estabilizar a estrutura de biofármacos, como anticorpos monoclonais [98], de aumentar a estabilidade e a atividade de moléculas bioativas, como o citocromo c [99], rubisco [100], BSA [101] e quimotripsina [102]. É importante ressaltar, embora tenha já sido reportado um número crescente de estudos que mostrem a estabilização de proteínas com LIs, que a estabilidade resulta de uma série de efeitos cumulativos de interações muito específicas entre os LIs e cada proteína, não tendo sido descrito até o presente momento, nenhuma série de cátions ou ânions de LIs que sejam estabilizadores, e particularmente, não existe qualquer estudo a respeito da interação dos LIs diretamente com a ASNase.

#### 1.4 Extração e Purificação de biofármacos utilizando SABs

A alta complexidade estrutural dos biofármacos complica também o conjunto das operações de extração, purificação e aplicação, devido ao grande tamanho e à susceptibilidade a degradação [61]. Por este motivo, é necessária uma busca por processos de *downstream* mais biocompatíveis (*i.e.* mais compatíveis com a biomolécula de interesse) e estabilizadores para esses tipos de produtos terapêuticos.

Dentre as técnicas atualmente mais utilizadas para a extração e purificação de biofármacos a partir de meios fermentados, destacam-se a precipitação com sulfato de amônio, seguido por cromatografia de troca iônica e/ou filtração em gel [103-106], entre outras técnicas cromatográficas, e os processos de extração sólido-líquido e líquido-líquido [107, 108]. Esta última técnica é uma das mais utilizadas industrialmente para concentração de uma grande variedade de biomoléculas de pequena massa molecular, e consiste na simples extração do soluto de interesse com uso de uma fase extratante com solventes orgânicos voláteis (por ex. acetato de etila, acetonitrila, ácido tricloroacético, entre outros). A ampla utilização da extração líquido-líquido é resultado do seu baixo custo e dos altos rendimentos processuais [109]. Apesar da sua larga aplicabilidade, a utilização de solventes orgânicos voláteis em processos de extração apresenta vários riscos para a saúde humana e ao meio ambiente, principalmente à atmosfera, o que acabou por levar a uma recente contestação por várias organizações ambientais e de saúde pública [110]. Adicionalmente, os processos de extração líquido-líquido baseados em solventes orgânicos não proporcionam um ambiente de extração estável e biocompatível para a recuperação de diversos tipos de bioprodutos complexos, particularmente, os fármacos proteicos.

Todos os fatores negativos da utilização de solventes orgânicos voláteis levaram ao ressurgimento do interesse pelos processos de extração líquidolíquido utilizando sistemas aquosos bifásicos (SABs) como alternativa promissora para a extração de vários bioprodutos, uma vez que, por serem compostos majoritariamente por água, apresentam-se como técnicas mais biocompatíveis para diferentes tipos de biomoléculas (células e organelas) e substâncias com atividade biológica (proteínas, enzimas, antibióticos, etc.) [111].

Os primeiros SABs foram obtidos pela combinação de diferentes componentes como polímero-polímero ou polímero-sal [112], os quais permitiam a formação de duas fases imiscíveis guando combinados com água acima de uma determinada concentração. Este tipo de sistemas apresentam uma série de características e propriedades físico-químicas, ajustáveis sob diferentes concentrações de agentes formadores е temperaturas, indispensáveis na formação e dimensionamento dos processos de separação em uma escala industrial. Os SABs já foram satisfatoriamente testados na separação de diversos compostos biológicos, como ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas, enzimas, alcaloides, antibióticos, dentre outros [111].

Apesar de terem sido descobertos em meados de 1950, no final do século passado, a baixa polaridade das fases coexistentes em equilíbrio dos SABs de base polimérica conduziu ao desinteresse coletivo de seu estudo e aplicação. No entanto, em 2003, Gutowski *et al.* [113] deram um novo impulso a esse tipo de sistemas, quando promoveram a sua formação com a simples dissolução de dois LIs em água. Esses SABs induziam a formação de uma região de imiscibilidade como resultado da dissolução de um sal com alta densidade de carga, e um outro de baixa densidade de carga, permitindo a hidratação preferencial de uma das fases em equilíbrio.

Desde o surgimento dos primeiros SABs utilizando LIs, vários SABs com LIs e sais orgânicos e inorgânicos foram, entretanto, caracterizados. Adicionalmente, foi também avaliada capacidade desses sistemas na extração e separação de um grande número de biomoléculas [114–117]. Em geral, foi verificado que pela combinação adequada cátion/ânion os rendimentos de extração, purificação e recuperação, e muitas vezes até mesmo a seletividade, podem ser aumentados consideravelmente [118]. Posteriormente, foi também demonstrado que é possível utilizar os LIs como coadjuvantes (quando adicionados em pequena quantidade para alterar a polaridade das fases) em SABs convencionais polímero/sal inorgânico [85], bem como substituto desses mesmos sais [107, 118] levando a obtenção de maiores coeficiente de partição. Estes SABs compostos por polímeros/LIs proporcionaram melhor ajustamento da polaridade das duas fases aquosas. A biocompatibilidade e capacidade extrativa destes sistemas foi já demonstrada para uma série de produtos com interesse biotecnológico, como por exemplo, na partição de anticorpos [98], enzimas [90], antibióticos [114], pigmentos [119].

Apesar da efetividade de vários SABs com LIs na extração seletiva de antibióticos e outras biomoléculas, a obtenção de um alto rendimento e índice de pureza nos processos de extração e recuperação de proteínas, este ainda constitui um grande desafio para a indústria biotecnológica, uma vez que estes processos expõem a molécula-alvo (intracelular ou periplasmática) a um meio físico-químico capaz de alterar a configuração da proteína nativa, principalmente quando se objetiva a recuperação e purificação de enzimas [25]. Desse modo, é evidente que uma escolha apropriada do tipo de SABs e parâmetros processuais que se aproximem mais das condições fisiológicas, pode evitar alterações estruturais significativas e constituírem-se assim alternativas efetivamente válidas aos processos tradicionais de extração líquido-líquido.

Nesse contexto, considerando o alto teor em água e a possibilidade de desenhar adequadamente as características do processos de extração líquidolíquido, os SABs se apresentam como a alternativa biocompatível e ambientalmente favorável para a recuperação e purificação de diferentes bioprodutos [92], particularmente, se na formulação dos SABs, se considerar: o uso de polímeros inertes, biocompatíveis e biodegradáveis, tais como polietileno glicol (PEG) [120] e polipropileno glicol (PPG) [121]; o uso de soluções tampões que simulam o ambiente celular; o uso de sais derivados de fontes renováveis com toxicidade e custos reduzidos, como os sais à base de colina [122]. A formulação desse novo tipo de SABs faz com que este tipo de plataforma de extração se adeque cada vez mais aos principais princípios da Química Verde [123]. Além disso, estas classes de SABs foram já descritas como plataformas com uma grande capacidade para a partição seletiva de biomoléculas e biofármacos similares [111, 124, 125]. Em geral, nestes sistemas, as proteínas nativas são muito hidrofílicas para serem solubilizadas na fase relativamente mais hidrofóbica (fase rica em polímero) e, portanto, as proteínas são excluídas da fase rica em polímero devido a interações de hidrofobicidade/hidrofilicidade [126]. Os sistemas polímeros/sais (por exemplo PEG-fosfato) exibem diferenças relativamente grandes em relação a hidrofobicidades de fase, de modo que a concentração de solvente e a hidrofilicidade da fase rica em sal são significativamente maiores do que na fase superior rica em PEG, favorecendo a separação de fases e particionamento seletivo [127].

As características dos sistemas de polímero/sal ou (LIs) permitem controlar a partição das moléculas pelo simples ajuste da composição do sistema. Assim, determinados sais podem ser utilizados para manipular tanto as propriedades das fases quanto as propriedades das proteínas, a fim de obter diferentes partições. Fatores como o tipo, a massa molecular e a concentração do polímero utilizado, assim como o tipo e a concentração do sal empregado nos SABs controlam a partição de proteínas nos sistemas polímero/sal ou LIs [128, 129]. No entanto, os efeitos desses fatores sobre a partição ainda não podem ser preditos, visto que os mecanismos de partição são muito dependentes do tipo de biofármaco-alvo, e devido à alta complexidade destes solutos, ainda existe uma falta de entendimento dos mecanismos que controlam o particionamento de macromoléculas nesses sistemas.

Em geral, busca-se compreender melhor os mecanismos através do estudo da partição de uma molécula-alvo, onde as diferenças da hidrofobicidade relativa das fases e das propriedades eletrostáticas de cada fase coexistente nesses SABs atuam como fatores predominantes no controle dos mecanismos de partição. Observa-se que para proteínas a partição é proteína-específica, e independe da massa molecular ou tamanho, quando polímeros de baixa massa molar são utilizados. Apenas a natureza e o arranjo químico das partes proteicas expostas ao solvente afeta o comportamento de partição das mesmas [128].

Dessa forma, combinar a diferença de hidrofobicidade das fases e diferentes efeitos eletrostáticos pela adição de diferentes sais é uma plataforma

42

eficiente para o controle da partição de proteínas. Considerando que as proteínas possuem cargas em determinados valores de pH, a melhor estratégia para controlar a partição destas é por meio da manipulação na composição iônica. A composição iônica de SABs afeta as propriedades dos solventes de cada fase e ainda, afeta as interações proteína-solvente devido a alteração dos grupos carregados das proteínas, mudando a interação dos sais ou a habilidade dos grupos polares em participar de ligações por ponte de hidrogênio [130].

Assim, a escolha de diferentes sais ou LIs para compor os SABs é uma ferramenta muito útil para criar determinadas condições nos sistemas que levem à partição seletiva mesmo para moléculas com estrutura muito próximas da proteína alvo que se pretende particionar. A natureza do sal ou LI em SABs polímero/sal ou polímero/LI pode afetar a formação de fases tanto quanto a natureza dos polímeros. Observa-se que a utilização de polímeros de baixa massa molecular e também de diferentes LIs alargaram o número de possibilidade de ajuste dos mecanismos de partição de solutos em sistemas polímero/sal [129, 131]. No entanto, essas modificações devem ser levadas em conta quando o pH afeta a partição da biomolécula. Nesses casos, o sistema deve ser tamponado no pH ideal.

Considerando as grandes vantagens dos Lls como agentes estabilizadores de proteínas, em particular enzimas, e na sua capacidade de partição seletiva de proteínas, estes surgem como alternativa ideal para recuperar a proteína de interesse deste trabalho, a ASNase. Inclusive, a eficiência dos Lls como solventes alternativos para biocatálise e/ou extrações da própria ASNase já foi relatada [107]. Santos et al. [107] demonstraram a capacidade de SABs compostos por polímeros/LIs como plataformas eficientes para a extração in situ de ASNase produzida por E. coli usando SABs, e foi capaz de concentrar a enzima na fase rica em polímero, enquanto as proteínas contaminantes foram particionadas preferencialmente para outra fase, chegando a um fator de purificação de 173.8 quando combinado a técnicas de precipitação. Qin et al. [132] relataram a extração in situ da ASNase, em sistemas micelares à base de Triton-X100, no entanto a ASNase de E. coli foi particionada principalmente para fase rica em fosfato, alcançando um coeficiente de partição de apenas 0,6. Ainda utilizando SABs micelares, foi

43

relatado o uso de um sistema termossensível para extração da ASNase, e o rendimento do processo atingiu 73,3%, sendo a ASNase concentrada para a fase rica em micelas (57). Os diferentes comportamentos de partição, nos diferentes SABs, pode estar ligado à capacidade das regiões hidrofóbicas da superfície da enzima serem mais ou menos expostas, dependendo da fonte a partir da qual foram obtidas e, principalmente, do meio ambiente em torno da proteína, que o solvente forneceu, neste caso as fases coexistentes em equilíbrio.

Os estudos anteriores mostraram que os SABs utilizando LIs e polímeros são muito promissores para a recuperação da ASNase a partir de meios fermentados, ou lisados celulares, complexos. Desse modo, nesta tese foi avaliada a capacidade da extração líquido-líquido, através da utilização de SABs com LIs (SAB-LIs), como uma ferramenta útil para a recuperação e purificação de ASNase recombinante produzida por microrganismos, como uma metodologia alternativa não apenas mais econômica, mas também mais sustentável, biocompatível e inerte.

### 2. Objetivos

#### 2. OBJETIVOS

Com este trabalho buscou-se obter e caracterizar SABs-LIs que possibilitem aumentar a eficiência de extração da ASNase produzida por *E. coli*, visando aumentar a biocompatibilidade e sustentabilidade dos processos de extração líquido-líquido.

Para isto, o trabalho foi dividido em quatro desafios, os quais estão diretamente relacionados a cada uma das fases do mesmo:

- Análise dos métodos de quantificação da atividade da ASNase, e validação de uma metodologia adaptada para este estudo;
- 2- Estudos de estabilidade da ASNase na presença dos possíveis componentes dos SABs, tais como LIs, sais e polímeros, sob diferentes condições experimentais como tempo, temperatura, concentração e pH,
- Seleção das melhores condições de partição com ASNase comercial nos sistemas que proporcionam maior estabilidade ao biofármaco;
- 4- Avaliação da performance extrativa da ASNase a partir de lisado celular de *E. coli* recombinante.

#### 2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer uma correlação da medida de atividade da ASNase por diferentes métodos colorimétricos (Nessler, AHA e indoxina) e um método direto (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CLAE);
- Propor e validar um método adaptado para a determinação da atividade enzimática para uso nas posteriores etapas;
- Avaliar a estabilidade e determinar a atividade da ASNase ao longo do tempo em diferentes concentrações de: *i*) sais derivados de colina cloreto de colina ([Ch]Cl), acetato de colina ([Ch][Ac]), propanoato de colina([Ch][Pro]), butanoato de colina ([Ch][But]) e hexanoato de colina ([Ch][Hex]); *ii*) polímeros polietilenoglicol de massa média 600 g.mol<sup>-1</sup> (PEG 600) e polipropilenoglicol de massa média 400 g.mol<sup>-1</sup> (PPG 400); bem como avaliar a estabilidade e atividade da ASNase em diferentes

condições experimentais de temperatura (25, 37 e 50°) e pH (5 a 11) ao longo do tempo;

- Selecionar o composto que melhor estabiliza a enzima ao longo do tempo, e avaliar a manutenção da estrutura nativa da ASNase utilizando análises de fluorescência, dicroísmo circular e calorimetria de varredura diferencial buscando compreender o mecanismo de interação entre os agentes estabilizadores e a estrutura da ASNase;
- Criar uma plataforma capaz de controlar a partição da enzima ASNase comercial utilizando SABs compostos por polímeros e sais/LIs, com base nos compostos anteriormente estudados que promoveram maior estabilidade ao longo do tempo para a ASNase e sejam capazes de manter a atividade da mesma ao fim do processo;
- Validar a plataforma de extração e purificação da ASNase por meio da avaliação da performance extrativa dos SABs selecionados utilizando a ASNase recombinante a partir de lisado celular obtido de *E. coli*.

Para facilitar a compreensão das atividades realizadas neste projeto de doutorado, na Figura 3 é apresentado um fluxograma relacionando cada objetivo específico e as respectivas fases do trabalho.



Figura 3. Fluxograma representando os objetivos específicos agrupados por fases do trabalho desenvolvido.

Fonte: a própria autora.

3. Materiais e Métodos

#### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Materiais

A L-asparaginase comercial (PDB: 1K2X) utilizada neste estudo foi adquirida da ProsPec-Tany (Código: ENZ-287, Rehovot, Israel) com atividade específica de 225 U.mg<sup>-1</sup>. Acetato de colina ([Ch][Ac]) foi obtido da empresa Iolitec® (Alemanha). Cloreto de colina ([Ch]Cl), dihidrogenofosfato de colina ([Ch][DHP]), ácido propanoico, ácido butanoico, ácido hexanoico, hidróxido de colina (46% m/v), polipropilenoglicol de massa molecular média 400 g.mol<sup>-1</sup> (PPG 400), polietilenoglicol de massa molecular média 600 g.mol<sup>-1</sup> (PEG 600), padrão de asparagina (L-Asn, ≥99%), padrão de ácido aspártico (L-Asp, ≥99%), mercaptoetanol, o-ftaldeído (OPA), acetonitrila (≥90%), metanol (≥90%), ácido  $\beta$ -hydroxamato L-aspártico (AHA) ( $\geq$ 90%), hidroxilamina (>99%), propionato de hidrogeno-ortofosfato de di-potássio, tetraborato de sódio, ácido propiônico (≥90%), acrilamida, triptona, extrato de levedura, carbenicilina, IPTG, azul de bromofenol, acrilamida/bis-acrilamida (29:1) 30% v/v, dodecil sulfato de sódio (do inglês "sodium dodecyl sulfate – SDS"),  $\beta$ -mercaptoetanol e persufato de amônio foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED) foi adquirido da ThermoFischer. HYDRANAL ®-Methanol Rapid e HYDRANAL®-Composite 5 utilizados para o titulador automático Karl Fischer (Metrohm) foram obtidos da Honeywell Research Chemicals (Fluka). O reagente de Nessler foi adquirido da Merck<sup>®</sup> (Brasil). Para determinação de proteínas totais pelo método de Bradford foi utilizado o reagente concentrado "Protein Assay Dye" obtido da Bio-Rad.

Os demais reagentes utilizados: cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>), ácido tricloroacético (TCA), ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de potássio mono e dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), TRIS (hidroximetil) aminometano e glicerol foram todos de grau analítico. A água ultrapura utilizada para os ensaios foi duplamente destilada, passou pelo sistema de reserva-osmose, e posteriormente foi filtrada e passou pelo sistema de troca iónica Millipore Milli-Q.

As estruturas químicas dos LIs e polímeros utilizados para os estudos de estabilidade proteica estão expostas na Figura 4.



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.

Fonte: a própria autora.

#### 3.1.1 Preparo dos Líquidos Iônicos (LIs)

Os seguintes LIs derivados de colinas, propanoato de colina [Ch][Pro], butanoato de colina [Ch][But] e hexanoato de colina [Ch][Hex], foram sintetizados pelo nosso grupo BioPPul (Bioproducts Production and Purification Lab), de acordo com o protocolo padrão previamente estabelecido [134]. O preparo de cada LI consistiu na neutralização de uma solução de hidróxido de colina (46 % m/v) com o ácido apropriado. Para isso, 0,1 mol da solução de cada ácido foi gotejada na solução aguosa de hidróxido de colina (0,1 mol). A mistura foi mantida sob agitação contínua por 12 h a temperatura ambiente. Após a síntese, todos os LIs foram secos sob agitação constante e vácuo, a temperatura moderada de 50°C, durante 48 h, a fim de reduzir os compostos voláteis e o teor de água a valores mínimos. O conteúdo de água residual nos Lls foi medido a 25°C utilizando o titulador volumétrico Karl-Fischer 852 Titrando (Metrohm), utilizando os solventes HYDRANAL ®-Methanol Rapid e HYDRANAL®-Composite 5. Para avaliar a pureza e a eficiência da síntese de cada amostra, foram realizados ensaios de ressonância magnética nuclear de próton (<sup>1</sup>H RMN). Todos os Lls apresentaram um nível de pureza superior a 98% em massa.

### 3.2 Avaliação de metodologias de quantificação da ASNase comercial

Foram avaliadas diferentes metodologias de quantificação de ASNase a fim de padronizar o método mais preciso para quantificação da atividade e estabelecer uma relação e um fator de conversão entre eles. Para isso, inicialmente, diferentes soluções de ASNase comercial (com concentrações da enzima entre 0,01 e 0,04 mg.mL<sup>-1</sup>) foram preparadas em solução de tampão fosfato (20 mM) pH 7,4. A atividade enzimática da ASNase de cada solução foi determinada por 4 métodos diferentes: três métodos colorimétricos, Nessler, AHA e Indooxina; um por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), como detalhado nos itens de *2.2.1* a *2.2.4*. A Figura 5 traz um resumo das reações estudadas para quantificação da atividade da ASNase comercial. É importante ressaltar que apesar da principal atividade da ASNase ser a hidrólise da asparagina, descrita no quadro a) da Figura 5, a enzima também possui outras atividades sobre substratos alternativos, como a síntese e hidrólise de AHA (quadros c) e d) da Figura 5).



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.

Fonte: a própria autora.

#### 3.2.1 Método de Nessler

O método de quantificação de Nessler baseou-se no protocolo Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, que foi estabelecido por Shifrin et al. [44]. A reação de Nessler determina a concentração de amônia (NH3) liberada após a conversão de L-Asn em L-Asp. A reação é constituída de duas etapas: a primeira, de hidrólise da L-Asn e a segunda etapa, a de coloração por Nessler. Na primeira etapa, 50 μL de cada solução de ASNase diluída foram adicionados à 500 μL de tampão TRIS-HCl pH 8,6 (50 mM), 50 µL da solução de 189 mM de L-Asn e 450 µL de água deionizada. Assim, após a hidrólise da L-Asn, na etapa de coloração foram adicionados 100 µL de cada amostra em 2,15 mL de água deionizada e, em seguida, foram adicionados 250 µL de reagente Nessler a solução diluída. A concentração de NH<sub>3</sub> de cada solução foi então determinada por espectrofotometria a 436 nm em Leitor de Placas (EnSpire Multimode Plate Reader, PerkinElmer<sup>®</sup>). A curva de calibração foi preparada através da reação do reagente de Nessler com múltiplas diluições de uma solução estoque de 6 mM de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), correspondendo à faixa de concentração de 0,05 a 0,87 µmol de NH<sub>3</sub>.mL<sup>-1</sup>. Uma unidade de atividade da ASNase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária à liberação de 1 µmol de NH<sub>3</sub> por min da reação em pH 8,6 e 37°C.

#### 3.2.1.1 Método de Nessler adaptado

A medida da atividade da ASNase pelo método de Nessler adaptado foi baseado no protocolo de Yao et al. [51] com adaptações [135]. Para isso, a reação consistiu em duas etapas:

<u>Etapa de reação</u>: Adição de 50 µL de solução contendo ASNase (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>) em tampão fosfato (20 Mm, pH 7,4), em 950 µL de solução de asparagina 23 mM em tampão fosfato (20 Mm, pH 7,4) previamente aquecida a 37°C. Após 15 min a 37°C, a reação foi interrompida com a adição de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 25%. Foram feitos dois brancos: o branco da reação que não contém a enzima, apenas o substrato, asparagina, e o tampão; e o branco da enzima que contém a enzima desnaturada, pela adição do TCA 25% durante a primeira etapa.

2. <u>Etapa de coloração</u>: Diluição da amostra da primeira etapa em água ultrapura. Então, 250 µL da primeira etapa foram transferidas para outro tubo contendo 3750 µL de água ultrapura e após a homogeneização, 250 µL de Nessler foi adicionado e imediatamente agitado. Após 10 min, as amostras foram lidas em Leitor de Placas a 420 nm e os valores obtidos foram correlacionados à curva de calibração previamente estabelecida com cloreto de amônio. Uma Unidade Internacional (U) foi considerada como a quantidade de ASNase necessária para produzir 1 µmol de amônia por minuto de reação por mL. A atividade enzimática relativa (%) foi calculada pela normalização dos dados considerando a atividade inicial da enzima nas condições estudadas (tempo 0 h, solução tampão fosfato 20 mM pH 7,4) como 100%.

A escolha do pH 7,4 partiu de estudos acerca do pH ótimo da enzima (item 3.5), nos quais foi demonstrado uma baixa variação de atividade entre pH de 6 e 9 durante o tempo reacional de 15 min. Desse modo, optou-se por utilizar no método o pH fisiológico 7,4, por se tratar de um biofármaco de administração intravenosa. Portanto, torna-se importante compreender os mecanismos de atividade enzimática no pH em que o biofármaco irá agir.

#### 3.2.2 Método do ácido β-hydroxamato L-aspártico (AHA)

O método do ácido  $\beta$ -hydroxamato L-aspártico (AHA) utilizado para a determinação da atividade da ASNase foi adaptado do protocolo desenvolvido por Drainas et al. [42]. Para este método foram adicionados 50 µL de enzima diluída a 500 µL de tampão Tris-HCI (50 mM) pH 8,6, 50 µL de solução de L-Asn (189 mM), 100 µL de hidroxilamina (1 M) e 300 µL de água deionizada. Os tubos de reação foram mantidos a 37° C em banho termostático (Ethik technology, SP, Brasil) e, após 10 min, a reação foi interrompida por adição de uma solução contendo 5,0% (m/v) de FeCl<sub>3</sub>, 2,5% (m/v) de TCA e HCI (0,33 M).

A reação entre a AHA e o FeCl<sub>3</sub> produz uma coloração marrom, que foi quantificada por absorvância a 500 nm em espectrofotômetro UV-VIS com sistema de detecção por arranjo de diodos, modelo PDA S-3100 (©SCINCO Co. Ltd., Seul, Coréia).

A curva de calibração foi realizada através de múltiplas diluições do padrão de AHA 5 mM e a adição de FeCl<sub>3</sub>/TCA/HCl, variando de 0,01 a 3 µmol de AHA.mL<sup>-1</sup> férrico. Uma unidade da atividade de ASNase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de AHA férrico produzido por min da reação em pH 8,6 e 37°C.

#### 3.2.3 Método da Indooxina

A quantificação da atividade de ASNase por indooxina foi mensurada de acordo com o protocolo de Lanvers et al. [35], no qual 20  $\mu$ L de cada solução de ASNase foram adicionados a 180  $\mu$ L de AHA (10 mM) em tampão Tris (pH 7,3, 15 mM) e suplementado com 0,015% (m/v) de albumina de soro bovino (BSA). A reação foi incubada a 37° C durante 10 min e, em seguida, foi interrompida adicionando 250  $\mu$ L de TCA 24,5% (m/v). A solução final da reação foi centrifugada durante 5 min a 3.050 x*g*, para remover possíveis precipitados da reação.

Na etapa seguinte, 10 µL do sobrenadante foram adicionados a 40 µL de água deionizada e 200 µL de solução de 8-hidroxiquinolina (1 volume de 2% (m/v) de 8-hidroxiquinolina em etanol (98%), diluído em 3 volumes de carbonato de sódio (1 M)). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 95°C durante 1 min e então resfriadas até à temperatura ambiente. Devido a formação de indoxina ao final da reação, composto de cor verde, a absorvância das amostras foi lida a 710 nm em Leitor de Placas (EnSpire Multimode Plate Reader, PerkinElmer<sup>®</sup>). A curva de calibração foi realizada utilizando uma solução estoque de indoxina medida a 710 nm. Uma unidade de atividade de ASNase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de indoxina produzida por min da reação em pH 7,3 a 37°C.

#### 3.2.4 Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação da atividade de ASNase por CLAE foi baseada na reação de hidrólise de L-Asn (189 mM) em L-Asp a 37°C por 10 min. Dessa forma, a concentração de ácido L-aspártico final de todas as amostras hidrolisadas foram obtidas de acordo com o protocolo anterior estabelecido por Nath et al. [36]. Para isso, uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi derivatizada com 100 µL de solução de o-ftaldeído (OPA) preparada, e então 5 µL da amostra derivatizada foi imediatamente injetada no sistema de CLAE. A

solução de OPA foi obtida pela adição de 54 mg de reagente OPA (>99%) a 10 mL de tetraborato de sódio 0,1 M e 40 μL de mercaptoetanol (>99,0%). As curvas de calibração dos aminoácidos foram estabelecidas pelos padrões de L-Asn e L-Asp, com concentração variando de 5 a 65 μg.mL<sup>-1</sup>, com os tempos de retenção correspondentes a 2,7 e 4,4 min para os padrões de L-Asp e L-Asn, respectivamente. Os padrões também foram derivatizados e injetados no sistema CLAE, como mencionado acima para as amostras hidrolisadas. Uma unidade de atividade de L-asparaginase (U) foi definida como a quandidade de enzima necessária à liberação de 1 μmol de L-Asp por min de reação a 37°C, pH 7,4. Para maior controle, foram realizadas as curvas de calibração para o substrato, L-asparagina (APÊNDICE 4 a), e para o produto, L-Asp (APÊNDICE 4 b).

O sistema de CLAE consistiu em um controlador de sistema Shimadzu SCL-10AVP, bomba Shimadzu LC-10ATVP, injetor automático Shimadzu SIL-10AF e detector de fluorescência Shimazu RF-10AXL. A fase móvel foi preparada por adição de 50 mL de tampão de propionato de hidrogenoortofosfato de di-potássio em estoque (pH 6,0, 196 mM, 1,75% de ácido propiônico), em 750 mL de água deionizada, 100 mL de metanol (>98%) e 100 mL de acetonitrila (>98%). A fase móvel foi injetada a taxa de fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup> numa coluna Shim-pack ISC-07/S1504, mantida a 35°C. O detector de fluorescência foi ajustado a 350 nm (excitação) e 450 nm (emissão). O tempo de corrida para cada amostra foi de 12 min.

## 3.3 Efeito de diferentes compostos na Estabilidade Catalítica da ASNase

Para identificar quais os possíveis compostos estabilizadores da atividade da ASNase, foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de sais, compostos iônicos (LIs e sais) derivados de colina e polímeros sobre a estabilidade catalítica da ASNase. Também foi avaliada a estabilidade em diferentes temperaturas: 25, 37 e 50°C. Essas temperaturas foram escolhidas por ser a temperatura ambiente (25°C), corpórea (37°C) e uma temperatura elevada (50°C) onde ainda fosse possível identificar os efeitos do aumento da temperatura sob a atividade enzimática, sem que ocorresse a desnaturação completa da ASNase.

57

Os sais, LIs e polímeros avaliados nesta etapa foram: cloreto de sódio (NaCI); cloreto de colina ([Ch]CI); acetato de colina ([Ch][Ac]); propanoato de colina ([Ch][Pro]); butanoato de colina ([Ch][But]); hexanoato de colina ([Ch][Hex]); PPG 400 e PEG 600. Estes dois polímeros foram escolhidos por serem capazes de formar SABs na presença dos compostos derivados de colinas aqui estudados.

Para os estudos de estabilidade, 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> da ASNase comercial foi exposta a diferentes soluções aquosas dos compostos estudados em fração molar de 0 a 0,05 mol<sub>composto</sub>.mol<sub>total</sub><sup>-1</sup>, onde mol<sub>total</sub> representa a soma dos moles do composto + moles de água. As amostras foram avaliadas em diferentes temperaturas (de 25, 37 e 50°C) durante 22 h. Nos tempos 0, 1, 3, 6 e 22 h, foram retiradas amostras para quantificação da atividade da ASNase. A atividade da ASNase nas amostras contendo sais e LIs derivados de colina foram quantificadas pelo método de Nessler definido anteriormente (Nessler adaptado, *item 2.3.1*), já nas amostras contendo os polímeros a atividade foi apresentada como Atividade Relativa (%) em cada ponto, após a normalização segundo a Equação (1):

Atividade Relativa (%) = 
$$\frac{A_p}{A_i} \times 100$$
 (1)

Onde,  $A_p$  corresponde a atividade enzimática no ponto amostral, e  $A_i$  corresponde a atividade enzimática inicial da amostra (tempo zero).

Ao final dessa etapa, o composto que manteve a maior estabilidade catalítica da ASNase ao longo do tempo foi selecionado para uma investigação mais detalhada. Para isso, após a determinação do tempo necessário à estabilização da atividade enzimática, o estudo das mudanças conformacionais e termodinâmicas produzidas pelo composto estabilizador sob a estrutura nativa da ASNase foi examinada.

#### 3.4 Influência do [Ch]Cl na etabilidade estrutural da ASNase

Após determinado o tempo de estabilização das alterações na atividade enzimática, a associação das mudanças termodinâmicas e conformacionais produzidas pelo [Ch]Cl na estrutura nativa da ASNase foi examinada usando análises de dicroísmo circular (DC), fluorescência e calorimetria diferencial de varredura (CDV) para identificar e compreender possíveis alterações que levaram a modificação na atividade catalítica da ASNase.

#### 3.4.1 Dicroísmo Circular (DC)

Para identificar as alterações na estrutura secundária, que levaram ao aumento da atividade enzimática da ASNase, espectroscopia de DC foi realizada após o tempo de estabilização pré-determinado. Para isso, foram utilizadas 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> de ASNase exposta durante 6 h às diferentes soluções aquosas de [Ch]Cl, tamponadas em pH 7,4 com tampão fosfato (20 mM). Os espectros foram adquiridos na região de UV próximo (190 a 260 nm) em espectropolarímetro de dicroísmo circular JASCO J-815 (Jasco Corporation, Japão), equipado com controlador de temperatura do tipo *Peltier*. Os experimentos de estabilidade ao longo do tempo foram avaliados durante o período de 6 h, para as temperaturas de 25, 37 e 50°C, com 3 varreduras por espectro, e tempo de integração de 3 s por ponto, com aquisição de dados a cada 0,5 nm. Os espectros foram adquiridos em cubetas de 1,0 mm de caminho óptico.

Para avaliação da temperatura de fusão,  $T_{fusão}$ , da ASNase foi realizada a curva de transição do processo de desnaturação térmica da estrutura enzimática em solução aquosa de [Ch]Cl (0,00 e 0,05 mol<sub>Ll</sub>.mol<sub>total</sub>-1). Os perfis de fusão foram determinados por aumento da temperatura à taxa de aquecimento de 1°C.min<sup>-1</sup> a um comprimento de onda constante de 222 nm ( $\theta_{222}$ ). Os espectros da curva foram adquiridos em intervalos de 5°C.min<sup>-1</sup>, com tempo de estabilização de 5 min, na faixa de temperatura de 25 a 95°C. Para este experimento, os espectros foram adquiridos em cubetas de 10,0 mm de caminho óptico e foram realizadas 3 varreduras em casa ponto.

Todos os resultados apresentam o espectro da média das 3 varreduras obtidas, e posterior alisamento do espectro final utilizando o programa Origin 7, a partir do filtro Savitzky-Golay, considerando 100 pontos para o cálculo. Todos os estudos de DC foram realizados no Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista - UNESP, no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas.

#### 3.4.2 Fluorescência Intrínseca

Para compreender melhor a interação da proteína com o [Ch]Cl foi empregada a técnica de fluorescência para identificar mudanças na

fluorescência intrínseca da ASNase conferida pelos aminoácidos aromáticos triptofano (Trp) e tirosina (Tir) presentes na estrutura proteica. Nos ensaios de fluorescência, 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> de ASNase foram expostas às diferentes concentrações de [Ch]Cl Cl (de 0 a 0,05 mol<sub>[Ch]Cl.moltotal<sup>-1</sup></sub>) tamponada em pH 7,4 com tampão fosfato (20 mM). As medições dos espectros de emissão de fluorescência intrínseca foram realizadas em um leitor de Placas (EnSpire Multimode Plate Reader, PerkinElmer<sup>®</sup>). O comprimento de onda de excitação foi fixado a 280 nm para obter a emissão de aminoácidos aromáticos de 300 a 500 nm.

Para melhor entender a interação do [Ch]Cl e a ASNase, os estudos de fluorescência foram complementados com a supressão de fluorescência (*"quenching"*) por titulação de acrilamida hidrossolúvel, que age como supressor de fluorescência [136]. Estes dados possibilitam localizar a região que possivelmente interage com o [Ch]Cl, e foram obtidos através da análise da variação na intensidade de fluorescência. Os dados foram obtidos nas mesmas condições anteriores do estudo de fluorescência, no entanto, com a adição de acrilamida nas concentrações de 10 a 50 mM.

#### 3.4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (CDV)

A estabilidade térmica da ASNase em solução aquosa de [Ch]Cl foi avaliada por CDV (NanoDSC, TA Inc.). As transposições de dobragem/desdobramento (*folding/unfolding*) da ASNase e as transições de fase foram monitoradas de 25°C a 95°C com uma taxa de aquecimento de 1°C.min<sup>-1</sup>. Para os ensaios, 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> de ASNase foram expostas à solução de [Ch]Cl tamponada com tampão fosfato 20 Mm, pH 7,4.

A célula de referência foi preenchida com a mesma solução sem a presença da ASNase. As varreduras foram analisadas usando um modelo de variação de capacidade térmica ( $\Delta$ Cp) de dois estados (nativo e desnaturado) do *software* NanoAnalyzer (NanoDSC, TA Inc.), e os espectros em branco foram removidos do espectro de contendo as transições de cada amostra.

#### 3.5 Influência do pH na estabilidade e atividade da ASNase

A influência do pH sob a atividade da ASNase ao longo do tempo foi avaliada variando a faixa de pH de 4 a 11. Para isso, no primeiro ensaio avaliou-se a atividade da ASNase mantida em diferentes valores de pH, a fim de compreender o efeito do mesmo sobre a atividade enzimática. Neste experimento, a enzima foi exposta a tampões que apresentavam diferentes valores de pH durante um período de 24 h, e em cada ponto, uma alíquota da amostra foi retirada e a atividade quantificada. Para a faixa de tamponamento de pH de 4 a 7, as soluções tampão utilizadas foram preparadas com o tampão McIlvaine; e para os valores de pH de 7,5 a 11 foi utilizado o tampão fosfato.

Posteriormente, foi avaliado o efeito do pH reacional na quantificação da atividade catalítica da ASNase. Para isso, foi avaliado o efeito de diferentes valores de pH no meio reacional (de 5 a 9) durante o tempo de 15 min da reação de Nessler. Assim, foi possível avaliar se a alteração do pH reacional teve influencia sob valores de quantificação da atividade da ASNase.

#### 3.6 Simulação de Ancoragem Molecular

Esta fase do trabalho foi desenvolvida durante o período de estágio no exterior na Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal), e todos os experimentos de simulação foram realizados em parceria com o Dr. Matheus Pereira. Estes experimentos foram aqui adicionados para ajudar a explicar e compreender melhor os possíveis mecanismos que levaram a ativação ou desativação da ASNase frente a diferentes compostos. A análise e discussão dos resultados de simulação foram realizados conjuntamente, e, portanto incorporados neste documento.

Dessa forma, a interação dos compostos derivados de colinas com a ASNase foi realizada *in silico* pela técnica de ancoragem molecular, também conhecida como "*molecular docking*". Os sites de interação da ASNase com os íons dos LIs foram identificados usando o programa Auto-dock vina 1.1.2 [137]. Foi utilizada a estrutura cristalina de ASNase apresentada na Figura 2.

Auto Dock Tools (ADT) [138] foi usado para preparar os arquivos de entrada da proteína por fusão de átomos de hidrogênio não-polar, adicionando taxas parciais e tipos de átomos. As coordenadas dos átomos ligantes 3D (cátion e ânion de cada um dos LIs) foram computadas por *Gaussian 03w* e a raiz rígida do ligando foi gerada usando *AutoDockTools* (ADT), definindo todas as possíveis ligações rotativas definidas como ativas por torções. O centro de grade localizado no centro de massa (eixos x, y e z, respectivamente) para

cobrir toda a superfície de interação de ASNase foi de 76  $\hat{A} \times 88 \hat{A} \times 126 \hat{A}$ . O modelo de ligação que possui a menor energia livre de ligação foi pesquisado em 10 diferentes conformêros para cada ligante (cátions e ânions dos LIs).

#### 3.7 Estudos da partição da ASNase utilizando SABs

Esta fase do trabalho também foi desenvolvida durante o período de estágio no exterior realizado na Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal). Os compostos derivados de colinas e os polímeros selecionados na fase anterior foram utilizados para compor os SABs. Além dos dois polímeros avaliados quanto a estabilização da ASNase, outros sais e polímeros foram selecionados com base na literatura [107]. Para o estudo da partição da ASNase comercial, foram preparadas diferentes SABs polímero/sal(LI) de acordo com as composições mássicas descritas na Tabela 2.

Sistema Ternário	Concentração mássica (%)			
	Polímero	Sal ou LI	Água	
PEG + tampão citrato[139,				
140]				
PEG 600	15	20	65	
PEG 1000	15	20	65	
PEG 1500	15	20	65	
PEG 2000	15	20	65	
PEG + tampão fosfato[139]				
PEG 300	15	20	65	
PEG 600	15	20	65	
PEG 1000	15	20	65	
PEG 1500	15	20	65	
PEG 2000	15	20	65	
PEG + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [141]				
PEG 300	15	10	75	
PEG 600	15	10	75	
PEG 1000	15	10	75	
PEG 1500	15	10	75	
PEG 2000	15	10	75	
PEG 600 + [Ch] [125]				
[Ch]Cl	50	30	20	
[Ch][Ac]	50	30	20	
PPG 400 + [Ch][129, 142]				
[Ch]Cl	30	16	54	
[Ch][Ac]	30	16	54	

Tabela 2. Composição dos sistemas ternários utilizados para partição da ASNase.

Fonte: a própria autora.

A concentração final de ASNase em cada sistema foi fixada em 0,20 mg.mL<sup>-1</sup> de forma a garantir que a concentração de ASNase estivesse em condições próximas à diluição infinita, visando evitar interações proteína-proteína, e consequente influência nos coeficientes de partição. Assim, o

aumento da concentração proteica pode levar a agregação o que pode influenciar na partição da biomolécula e também levar a perda de atividade biológica ao fim do processo extrativo, além das limitações metodológicas.

Dessa forma, todos os componentes foram homogeneizados em agitador orbital por 2 min, resultando em sistema de 1,0 g final. Para acelerar o processo de separação de fases, os sistemas foram centrifugados por 15 min, 25 °C, 5000 x *g*. Após a centrifugação, as fases de topo e fundo foram cuidadosamente separadas e armazenadas separadamente para as demais determinações.

Para avaliar a capacidade de particionamento de cada SAB, foram determinados para cada sistema, o coeficiente de partição (K) e a eficiência de extração (EE (%)) da ASNase, de acordo com as Equações (2) e (3), respectivamente:

$$K = \frac{[ASNase]_{topo}}{[ASNase]_{fundo}}$$
(2)

$$EE (\%) = \frac{[ASNase]_{fase \ rica \ ASNase} \times V_{fase \ rica \ ASNase}}{([ASNase]_{fase \ rica \ ASNase}) + [ASNase]_{fase \ rica \ ASNase} \times V_{fase \ rica \ ASNase}} x \ 100$$
(3)

onde [*ASNase*]<sub>topo</sub> and [*ASNase*]<sub>fundo</sub> representa a concentração de ASNase nas fases superior e inferior, respectivamente. *V* e [*ASNase*] representam o volume da fase e da concentração de ASNase, enquanto os índices "fase rica ASNase" e "fase pobre ASNase" correspondem às fases (topo ou fundo) que possuem alta ou baixa concentração de ASNase, respectivamente.

Para facilitar a identificação da partição da ASNase entre as fases superior e inferior, o *K* foi representado como a função logarítmica da escala decimal (log10), uma vez que o log K > 0 corresponde a uma partição preferencial para a fase de topo e log K < 0 corresponde à partição preferencial para a fase de fundo. É importante notar que, que a *EE* (%) foi determinado apenas para a fase em que a ASNase estava mais concentrada.

#### 3.8 Quantificação da concentração de ASNase nos SABs

A concentração (mg.mL<sup>-1</sup>) de ASNase foi medida em cada fase dos SABs por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de exclusão por tamanho (SEC-CLAE), após a separação das fases superior e inferior, utilizando um sistema de CLAE Chromaster (VWR Hitachi) equipado com uma bomba binária, forno de coluna, auto-amostrador controlado por temperatura, detector de "arranjo diodo" (DAD) e coluna analítica Shodex Protein KW -802,5 (8 mm x 300 mm). Cada fase foi diluída 1: 6 (v/v) em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) e foram injetados 25 µL no sistema CLAE. A fase móvel foi composta por tampão fosfato 100 mM pH 7,0 com NaCl 0,3 M de forma isocrática com fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. O comprimento de onda para a leitura foi ajustado em 280 nm e a curva padrão foi realizada utilizando a ASNase comercial (APÊNDICES 1 e 2).

Para as amostras obtidas a partir do lisado celular, as proteínas totais foram quantificadas por Bradford utilizando o reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye* para o protocolo utilizando microplacas de 96 poços. Resumidamente, o reagente foi diluído 1:4 em água ultrapura e então filtrado. Em cada poço foram adicionados 10 µL da amostra correspondente e 200 µL do reagente filtrado, imediatamente homogeneizado e mantido a temperatura ambiente por 5 min. A absorvância foi avaliada em leitor de placas PerkinElmer<sup>®</sup> a 595 nm. A curva de calibração foi realizada variando a concentração do padrão de ASNase comercial (ProSpec) de 0,05 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (APÊNDICE 3).

#### 3.9 Manutenção do Microrganismo, meios e condições de cultivo

*Escherichia coli* BL21+ASNaseII foi gentilmente cedida pela professora Dr<sup>a</sup> Gisele Monteiro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP, e esta etapa foi desenvolvida em parceria com sua aluna de doutorado Marcela Valente Pimenta da Fonte. O microrganismo foi mantido em placas de Petri por no máximo 15 dias. Para reativação, uma colônia contida na placa foi incubada em 5 mL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de NaCl e 5 g de extrato de levedura por litro) adicionado de 50 µg.mL<sup>-1</sup> de carbenicilina em frascos de 15 mL e mantidos em agitador orbital por 12 h a 37°C, 200 rpm. Após esse período o cultivo foi interrompido e 10 % (m/v) de glicerol estéril foi adicionado para crioproteção, e então, o meio fermentado foi aliquotado em amostras de 50µL cada e preservados a -80°C.

Para o pré-cultivo, a *E. coli* BL21+ASNaseII transformada foi cultivada por 12 h a 37°C em 100 mL de meio LB fresco estéril contendo carbenicilina, nas mesmas concentrações utilizadas para manutenção do microrganismo, até a  $DO_{600nm}=0,7 \pm 0,1$ . A expressão de ASNase (PDB: 3ECA) foi induzida pela adição de 1mM de IPTG após 3 h de crescimento a 37 °C. Após o tempo de cultivo de 24 h, as células foram separadas por centrifugação a 4000 x *g*, a 4°C por 20 min, e o *pellet* celular obtido foi utilizado para os ensaios posteriores de rompimento celular.

#### 3.10 Rompimento celular e estocagem da ASNase

Para o rompimento celular, para cada 50 mL de cultura, o pellet celular resultante (2 g) foi inicialmente tratado com 160 mL de tampão hiperosmótico (Tris-HCI 100 mM, pH 8,0, sacarose 500 mM, EDTA 0,5 mM), incubado em gelo por 5 min e depois centrifugado durante 20 min, 4500 x g a 4°C. Ao pellet formado foi adicionado 120 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, seguido de incubação em gelo por 5 min para romper a membrana externa do microrganismo utilizado, E. coli. Após centrifugação (40 min, 18000 x g e 4°C), o sobrenadante resultante é a fração periplasmática. A esta fração adicionou-se 6 mL de Tris-HCI (1 M), resultando na concentração final de Tris-HCI 50 mM pH 8,8, e foi mantida congelada a -20° C. Antes do uso da fração periplasmática nos sistemas, foi realizada a troca do tampão. Assim, as amostras foram ultrafiltradas (8000 x g, 30 min, 25° C) usando o concentrador de ultrafiltração Vivaspin 20 (Sartorius) com membrana de corte de peso molecular de 10 kDa, e posteriormente, o tampão foi trocado por tampão fosfato 20 mM a pH 7,4. A Figura 6 traz o esquema ilustrado da obtenção da ASNase a partir de lisado celular. As amostras concentradas foram então utilizadas nos ensaios posteriores de extração da ASNase utilizando SABs.



Figura 6. Esquema para obtenção da ASNase a partir de lisado celular de *E. coli* BL21+ASNaseII. Fonte: a própria autora.

#### 3.11 Recuperação da ASNase a partir de lisado celular

Para os sistemas de partição da ASNase obtida a partir do lisado celular de *E. coli*, as condições e composições das misturas ternárias foram as mesmas utilizadas para os sistemas de partição da ASNase comercial (Tabela 2). Após a partição completa, as amostras foram pré-filtradas para a remoção de todos os componentes formadores do sistema, como polímeros e sais, para evitar interferências nos métodos quantitativos de proteína e atividade. A análise das amostras obtidas a partir do lisado celular não foram realizadas em CLAE devido à alta carga proteica e possíveis resíduos dos componentes dos sistemas presente nas amostras, visto que poderiam danificar a coluna cromatográfica. Além disso, a presença dos componentes de fases pode interferir nos métodos de quantificação, e também superativar ou reduzir a atividade da ASNase; portanto, optou-se por fazer a retirada dos componentes formadores de fases de cada amostra e carrega-las com tampão fosfato.

Dessa forma, as fases de cada sistema foram ultrafiltradas utilizando o concentrador de ultrafiltração Vivaspin 6 (Sartorius) com membrana de corte de peso molecular de 10 kDa, para remoção dos componentes formadores de fase (Figura 6). A seguir, amostras foram lavadas e carregadas com tampão fosfato 20 mM pH 7,4 como segue: 150 µL das fases de cada sistema foram diluídos em 5 mL de tampão fosfato 20 mM pH 7,4 e centrifugados a 25°C, por 20 min a 7000 x *g*. O volume recuperado foi lavado com as mesmas condições prévias (5 mL de tampão fosfato 20 mM pH 7,4) e o volume final foi medido e considerado para os cálculos de concentração/diluição. Para garantir que a ultrafiltração não ocasionou perda de proteínas nos sistemas, após a ultrafiltração foram quantificadas as proteínas totais presentes no permeado, não tendo sido observado nenhum traço proteico.

#### 3.12 Propriedades intrínsecas das fases dos SABs

Para obter uma caracterização das fases em equilíbrio, para cada SAB foram determinadas as seguintes propriedades: pH; condutividade; viscosidade; densidade; teor de água. A condutividade específica e o pH de cada fase foram medidas a 25°C utilizando um medidor de pH portátil e o condutivímetro Metrohm (Modelo 914). O condutivímetro foi calibrado com uma

solução padrão com 1408  $\mu$ S.cm<sup>-1</sup> de 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCI a 25°C. O pHmetro foi calibrado usando dois tampões padrão (valores de pH de 7,00 e 4,00 ± 0,02). A viscosidade e a densidade foram determinadas experimentalmente a 25°C utilizando um viscosímetro-densímetro automatizado (SVM 3000 Rotational Stabinger Anton Paar). O teor de água de cada amostra foi medido por titulação utilizando o titulador automático Karl Fischer (Metrohm). As medições de cada propriedade foram feitas em triplicata para reduzir a incerteza associada.

# 3.13 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Para verificar a presença de contaminantes nas amostras após o processo de extração foi preparado o gel de SDS-PAGE de acordo com o protocolo pré-estabelecido [143]. Resumidamente, o extrato bruto inicial utilizado para as extrações e cada uma das duas fases de cada sistema foram avaliados por esta técnica. Em sistemas onde o precipitado foi observado na interface, o material suspenso interface também foi analisado. Para a preparação das amostras foram adicionados 30 µL de cada uma das amostras a 60 µL do tampão de dissociação (tampão TRIS-HCI a 62,5 mM, pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v), 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol e 0,05% (v/v) de azul de bromofenol). A mistura foi aquecida a 100°C em banho termostatizado durante 10 min para completar a desnaturação das proteínas. Depois de resfriado à temperatura ambiente, 20 µL das amostras foram aplicadas ao gel e corrida foi fixada em 20 A. O gel possuía duas composições diferentes, a fase superior (também conhecida como "gel de empacotamento") com 3,7% (v/v) de solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), TRIS 123 mM, 1,08% (v/v) de SDS, 0,23% (v/v) de TEMED e 0,1% (p/v) de persulfato de amônio em solução aquosa ultrapura; e a fase inferior (também conhecida como "gel de separação"), também em solução aquosa ultrapura com 12,5% (v/v) de solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), TRIS 0,37 mM, 1% (v/v) de SDS, 0,01% (v/v) de TEMED e 0,05% (m/v) de persulfato de amônio.

### 4. Resultados e Discussão

## 4.1 Análise crítica sobre a metodologia de quantificação da ASNase

Artigo publicado no periódico "Analytical and Bioanalytical Chemistry"
### 4.1.1 Comparação dos métodos de quantificação da atividade da ASNase

A atividade da ASNase obtida a partir dos três métodos colorimétricos indiretos em estudo (Nessler, AHA e Indooxina) foi comparada com a atividade enzimática determinada pelo método de CLAE, o qual quantifica a atividade enzimática por determinação direta do produto L-Asp. Dessa forma, a comparação entre todos os métodos foi realizada utilizando soluções aquosas de ASNase em diferentes concentrações (de 0 a 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>). Na Figura 7, as atividades de ASNase correspondentes (U.mL<sup>-1</sup>) quantificadas através dos métodos CLAE, Nessler, Indooxina e AHA foram correlacionadas com as diferentes concentrações (de ASNase (mg.mL<sup>-1</sup>).



**Figura 7. a)** Atividade da ASNase (U.mL<sup>-1</sup>) a 37°C das diferentes concentrações da enzima (mg.mL<sup>-1</sup>) e b) Regressão linear ajustada e respectivos coeficientes ( $R^2$ ) dentro do intervalo de 0 a 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, 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.

Fonte: a própria autora.

A partir da Figura 7 a), observou-se uma tendência linear entre a atividade da ASNase e a concentração da enzima. Essa correlação linear foi observada até a concentração de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> de ASNase, depois da qual observou-se um perfil de esgotamento do substrato L-Asn. Em altas concentrações de ASNase (> 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>), provavelmente ocorre a conversão completa do substrato (189 mM de L-Asn para métodos de CLAE, Nessler e

AHA e 10 mM de AHA para o método da Indooxina). Esta hipótese foi confirmada através da análise CLAE, onde L-Asn não foi detectada nas amostras hidrolisadas quando concentrações mais elevadas de ASNase foram empregadas (> 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>). Levando em consideração esse fato, na Figura 7 b) é apresentada a análise comparativa dos métodos, no entanto, apenas até a concentração de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> de ASNase. A análise linear de regressão mostrou uma boa correlação para todos os métodos, no qual a linearidade de cada método foi mantida com  $R^2$  superior a 0,99.

Apesar da correlação entre os perfis da atividade versus concentração da ASNase, e a boa linearidade de cada método, os métodos em estudo não forneceram valores estatisticamente equivalentes de atividade enzimática para a mesma concentração de ASNase. Pode-se observar que o método de Nessler superestima a atividade de ASNase, enquanto os métodos de Indooxina e AHA subestimam a atividade enzimática em comparação com a quantificação direta de L-Asp por CLAE. Desse forma, em baixas concentrações de ASNase (<0,1 mg.mL<sup>-1</sup>), os métodos de CLAE e Nessler têm aproximadamente a mesma resolução para determinar a atividade de ASNase, mas acima desta concentração, o método de Nessler começa a superestimar a atividade de ASNase quando comparado ao L-Asp produzido (atividade "real", método por CLAE). Por outro lado, tanto os métodos de Indooxina, como AHA, "real" da ASNase, independentemente da subestimarm a atividade concentração de ASNase estudada. Particularmente, uma solução tampão contendo 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> de ASNase proporcionou atividades de  $16,2\pm0,5$ ; 13,8±0,7; 9,1±0,3 e 4,5±0,2 U.mL<sup>-1</sup>, quando quantificadas através dos métodos Nessler, CLAE, Indooxina e AHA, respectivamente.

Considerando as diferenças dos valores absolutos das atividades de ASNase entre os quatro métodos, a relação entre os valores de atividade de ASNase obtidos pelos três métodos colorimétricos foram calculados em função da atividade enzimática direta medida por CLAE, e estão retratadas na Figura 8. Foram apenas considerados os valores experimentais na gama de concentrações de ASNase que apresentaram linearidade em relação a atividade da enzima (até 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>).



**Figura 8.** Relação de atividade da ASNase (U.mL<sup>-1</sup>) 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.

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados de cada método indica a seguinte tendência para quantificar a atividade de ASNase (coeficiente angular/ $R^2$ ): AHA (0,3352/0,9932) < Indooxina (0,6663/0,9975) < CLAE (1/1) < Nessler (1,1682/0.9965). Todos os métodos utilizados apresentaram altos coeficientes de correlação ( $R^2$ > 0,95) entre si. Os declives (coeficientes angulares) das regressões lineares confirmam que o método de Nessler superestimou a atividade de ASNase em aproximadamente 17% a mais que o método de CLAE, enquanto que, quando a atividade da ASNase é determinada através dos protocolos da Indooxine ou AHA, os valores de atividade enzimática são, aproximadamente, 33 e 67% inferiores aos valores obtidos através da determinação de L-Asp por CLAE, respectivamente. Considerando que a quantificação direta de L-Asp por CLAE fornece o valor mais preciso de atividade da ASNase, pois quantifica exatamente o produto resultante da hidrólise do substrato (validando também o consumo de substrato através da medida da concentração de L-Asn), fica evidente que o método colorimétrico que mais se aproxima deste valor é o método de Nessler seguido pelo método da Indooxina.

Por outro lado, o AHA é método colorimétrico que exibe a menor precisão, pois quantifica aproximadamente 3 vezes menos atividade enzimática do que o método direto (CLAE). Para entender as diferenças entre os métodos colorimétricos, é importante considerar que a atividade da ASNase é baseada na conversão de substrato à taxa máxima [35]. Assim, o método de Nessler e AHA podem ser comparados diretamente com o método de CLAE, uma vez que a mesma quantidade de substrato, 189 mM de L-Asn, foi hidrolisada pela ASNase seguindo o mesmo protocolo de reação; no entanto, uma comparação mais cuidadosa deve ser realizada com o método da Indooxina, já que este método utiliza um tipo diferente de substrato em outra concentração (10 mM de AHA).

O método de Nessler apresentou o menor desvio quando comparado ao método de CLAE, no entanto, em altas concentrações de ASNase, o método de Nessler superestima os valores da atividade enzimática. Lanvers et al. [35] compararam a reação de Nesslerização com o método da Indooxina e encontraram um perfil de superestimação similar para o método de Nessler, corroborando com os resultados obtidos anteriormente. O método de Nessler quantifica indiretamente a atividade enzimática pela determinação de NH3 produzida e compara a geração desse produto com uma solução padrão diferente (no caso (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Em geral, é um método considerado aceitável, preciso e barato, no entanto, exibe várias desvantagens e exige o extremo controle de algumas variáveis [144]. Algumas destas variáveis podem afetar diretamente as medidas, levando a superestimação dos valores "reais". Por exemplo, o cromogênio que resulta do processo de Nesslerização é relativamente instável, dessa forma sua absorvância pode ser afetada pelo tempo até que a medição seja realizada, após a adição do reagente de cor [144]. Além disso, quando altas quantidades de proteína estão presentes, em particularmente alto quantidade de ASNase, o reagente de Nessler pode produzir precipitados floculantes que interferem com a absorção da solução e, portanto, se faz necessário nesses casos, um passo de centrifugação para removê-los a fim de evitar interferências na absorvância da solução final [144].

É importante destacar que se o foco da pesquisa é a determinação da atividade da ASNase em misturas complexas, como caldos fermentados, os íons amônio residuais serão quantificados, reduzindo sua precisão e exatidão.

Por outro lado, os métodos AHA e Indooxina acabam por subestimar a atividade da ASNase quando comparados aos valores obtidos com o método de Nessler e CLAE. Do ponto de vista prático, ambas metodologias são bastante interessantes para a determinação da atividade enzimática em meios complexos, como por exemplo caldos fermentados contendo íons amônio residuais, uma vez que apresentam baixa interferência com íons desse tipo e, portanto, podem medir efetivamente a atividade da ASNase. Conforme destacado, os protocolos de AHA e Indooxina baseiam-se na conversão de diferentes substratos e, portanto, a subestimação é específica do método. No método AHA, provavelmente o desvio resulte diretamente da reação de hidroxilaminólise, que por sua vez não ocorre na mesma taxa de conversão que a reação asparaginolítica.

Assim, o L-Asp só é quantificado após a reação com hidroxilamina por uma segunda reação da enzima ASNase, produzindo AHA, que então é complexado com FeCl<sub>3</sub> em meio ácido, sendo o complexo formado mensurável por espectroscopia na região visível (Figura 5 c). Dessa forma, durante o tempo de reação, a enzima fica ocupada em duas reação diferentes, e que por sua vez, possuem diferenças em sua velocidade que está diretamente ligada à afinidade da ASNase pelos substratos. Ao contrário, o método de CLAE mede diretamente o L-Asp produzido após apenas uma reação da enzima ASNase (hidrólise de L-Asn) e o método de Nessler determina diretamente a quantidade de NH<sub>3</sub> produzido também após um único passo de reação enzimática. Portanto, através do protocolo AHA, a enzima permanece ocupada com duas reações diferentes e, uma vez que a atividade ASNase é calculada pela taxa de conversão pelo tempo de reação, os valores de conversão deste método são muito inferiores aos outros métodos (incluindo o método da Indooxina). Além disso, considerando que a ASNase pode usar AHA como substrato, pode ainda ocorrer uma reação catalítica reversível, em que o produto AHA é convertido em L-Asp e hidroxilamina. Dessa forma, a concentração de AHA e a complexação com íons férricos são reduzidas, o que gera valores baixos de atividade enzimática quando utiliza-se esse método. Embora o método de AHA

subestime a atividade catalítica, este ainda é um método bastante fácil e simples [144], além de ser útil em ocasiões em que a ASNase encontra-se em um meio complexo, vantagens estas que ainda sustentam sua utilização em alguns casos.

O outro método colorimétrico estudado foi o da Indooxina, que se baseia na conversão do substrato alternativo AHA pela ASNase, resultando em hidoxilamina que então durante a segunda fase do método, etapa de coloração, reage com a 8-hidroxiquinolina resultando na indooxina [35]. Conforme destacado acima, este método fornece valores enzimáticos inferiores aos métodos de CLAE e Nessler, e valores superiores ao método AHA. Em primeiro lugar, é importante notar que, de forma semelhante ao método AHA, a conversão de AHA em L-Asp e hidroxilamina é uma reação catalítica reversível, na qual o L-Asp pode ser o produto ou o substrato para produzir AHA. Considerando que pode ocorrer a reversão de produto em substrato, contrariamente à reação em um único passo que ocorre nos métodos de CLAE e Nessler, os valores inferiores obtidos com os protocolos AHA e Indooxina já eram esperados.

Lanvers et al. [35] estimaram a concentração da ASNase em várias amostras de soro e observaram que o método de Indooxina mede menos atividade catalítica do que o método de Nessler (eles consideraram que este método superestimava as concentrações séricas, da ASNase em estudo, particularmente para ASNase peguilada). Conforme destacado por Lanvers et al. [9], além da diferença nos procedimentos experimentais (tampão, pH e tipo e concentração de substrato), a calibração dos métodos também pode induzir diferenças nas respostas catalíticas. Paralelamente, Yao et al. [51] também compararam as características teóricas e operacionais dos métodos de Indooxina e Nessler, e os valores da atividade enzimática fornecida por Nessler foram maiores do que o método de Indooxina. Dessa forma, demonstraram que o método de Nessler era mais sensível, simples e menos laborioso no que diz respeito ao tempo total de execução e quantidade de soluções reagentes, do que o método da Indooxina [51].

Em resumo, todos os métodos apresentaram uma boa linearidade e precisão, o que os torna úteis para determinar o comportamento catalítico da ASNase. No entanto, cada método possui suas próprias vantagens e

desvantagens (apesar de alguns serem mais sensíveis, outros são mais simples e econômicos) e, portanto, dependendo da fonte de ASNase (soro, caldo fermentado, lisado celular, solução tampão, comercial, etc.), é evidente que uma escolha adequada do método mais adequado é essencial para obter a resposta catalítica mais precisa. Este trabalho objetiva fornecer uma escala de desvio entre Nessler, AHA e Indooxina, permitindo uma correlação fácil e rápida com a atividade ASNase mais precisa obtida por CLAE. Devido ao elevado número de protocolos enzimáticos da ASNase, torna-se difícil obter uma comparação boa e confiável da grande quantidade de dados publicados na literatura. Assim, com a correlação fornecida na Figura 8, valores de atividade enzimática da ASNase já publicados, foram comparados utilizando essa correlação, com ênfase para ASNase obtida através de fontes microbianas. Dessa forma, a Tabela 3 resume uma série de valores de atividade de ASNase relatados anteriormente, e os valores estimados de atividade por CLAE correspondentes, obtidos de acordo com a correlação fornecida com a regressão linear de mínimos guadrados. Para fornecer uma comparação mais confiável, os dados selecionados levam em consideração apenas protocolos semelhantes aos acima avaliados.

Métodos de	Fonte da Enzima	Atividade da	Atividade da ASNase	Referências	
Quantificação		ASNase reportada	(U.mL <sup>-1</sup> ) estimada*		
		(U.mL⁻¹)			
Nessler	Aspergillus sp.	35,3	30,2	[105]	
	E. coli	2,0	1,73	[145]	
	E. coli	306,3	262,2	[133]	
	E. coli	20,9	17,9	[146]	
	Streptobacillus sp. KK2S4	2,8 - 7,3	2,4 - 6,2	[20]	
	Actinomycetes marinho	24,6 - 49,2	21,0 - 42,1	[147]	
	Bacillus sp. GH5	57,1	48,9	[148]	
	A. oryzae CCT 3940	67,5	57,8	[22]	
Ácido β-hidroxamato ∟- aspártico (AHA)	Cladosporium sp.	7,1	21,2	[149]	
	Zymomonas mobilis	0,3	1,0	[150]	
Ácido β-hidroxamato ∟- aspártico (AHA) adaptado	Candida utilis	0,8	2,4	[151]	
Indooxina	Determinação no plasma/E. Col	i 100 - 500	150,8 - 754,1	[152]	
	Determinação no plasma/E. Col	2,5 – 3.000	3,77 – 4,52	[153]	

**Tabela 3.** Comparação da atividade da ASNase (U.mL<sup>-1</sup>) obtida de diferentes fontes e relatadas na literatura versus valores estimados da atividade da ASNase (U.mL<sup>-1</sup>) com base nas correlações lineares da Figura 8.

\*Valores estimados correspondentes ao cálculo do valor real obtido por CLAE.

Fonte: a própria autora.

A partir da Tabela 3, é possível observar que os métodos Nessler e AHA são em geral usados para quantificar a ASNase de meio fermentado por microorganismos ou lisado celular, enquanto o método da Indooxina é usado exclusivamente para determinação da atividade de ASNase a partir do plasma. Métodos que utilizam substratos alternativos para a quantificação de ASNase, como AHA e Indooxina, sofrem menor interferência da NH<sub>3</sub> presente no meio fermentado, uma vez que essa molécula não faz parte da reação que o método utiliza para quantificação. No entanto, o método de Nessler é altamente influenciado pelo meio fermentado, uma vez que após o crescimento do microorganismo, a liberação de amônia ocorre como um subproduto do metabolismo das fontes de nitrogênio. Grandes quantidades de NH<sub>3</sub> afetam o desenvolvimento de cor do reagente Nessler, levando à turbidez da solução [55]. Após a normalização, pela equação anterior apresentada (Figura 8), alguns valores discrepantes tornaram-se mais próximos, mas esta condição não se aplica a todos os valores relatados (Tabela 3). Como exemplo, o valor

obtido pelo método AHA [149] tornou-se maior do que o obtido pelo método Nessler [146], no caso, os valores reportados foram 7,1 U.mL<sup>-1</sup> por AHA e 20,9 U.mL<sup>-1</sup> por Nessler, e após suas atividades serem estimadas esses valores se tornaram 21,2 U.mL<sup>-1</sup> e 17,9 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, no caso do método da Indooxina, o comportamento é semelhante ao método AHA, ou seja, o valor estimado (150,8 - 754,1 U.mL<sup>-1</sup>) é maior do que o valor relatado (100 -500 U.mL<sup>-1</sup>) [152].

Considerando a discrepância observada nos valores calculados para Nessler e os outros métodos, além das inferências de cada método, em alguns estudos [23, 149, 154] foram utilizados dois métodos para determinar a atividade da ASNase, nomeadamente, Nessler e AHA. Em dois deles [23, 149], o AHA é empregado para quantificação de ASNase a partir de meio fermentado, e o Nessler utilizado em etapas onde a enzima encontra-se mais purificada, como ensaios de aplicações e/ou estabilidade. Além disso, em todos os estudos avaliados, não foi considerado nenhum fator de conversão para avaliação dos valores de atividade do meio fermentado (obtido por AHA) e de aplicação (obtido por Nessler), ou para obter uma comparação confiável das atividades enzimáticas com outros estudos que utilizaram métodos diferentes. Os ensaios enzimáticos convencionais são realizados em condições definidas usando temperaturas, valores de pH, substratos em excesso e outras condições de reação que permitem chegar a uma taxa bem próxima à máxima de catálise de substrato. Esta abordagem proposta (Figura 8) fornece uma medida confiável e reprodutível de atividade potencial; no entanto, comparar valores de atividade enzimática para enzimas de diferentes fontes que tenham afinidades diferentes por cada um dos substratos utilizados em cada método, podem ainda causar uma certa disparidade entre os valores obtidos. Assim, como foi destacado acima, para obter uma comparação precisa dos valores obtidos devem ser consideradas a subestimação de 33,5% do método AHA e a superestimação de 16,8% dos métodos Nessler, e a comparação do valor "real" deve ser cuidadosamente analisada.

As atividades *in vitro* na maioria das vezes não representam condições *in vivo*, exibindo valores de atividade muito discrepantes [155, 156]. Apesar disso, os resultados *in vitro* obtidos pelos métodos AHA e Nessler podem ser usados como uma estimativa aproximada para saber se a enzima produzida

por microrganismos a partir de meio fermentado terá atividade suficiente para ser utilizada em tratamentos *in vitro*. Deve-se levar em consideração que após a injeção na corrente sanguínea, a ASNase pode sofrer interferência de outras enzimas e moléculas presentes no sangue, alterando sua atividade catalítica. No entanto, mesmo para comparar exclusivamente as atividades da ASNase *in vitro*, não existe um método universal e padrão para a determinação da atividade enzimática [157–159]. Consequentemente, a falta de padronização leva a dados enzimáticos incomparáveis [158] e, apesar do desenvolvimento de algumas plataformas de padronização e unificação de dados enzimáticos, ainda não foram aplicados a todos os trabalhos [159, 160].

Assim, buscou-se reforçar a importância da padronização de metodologias enzimáticas, propondo uma correlação que, pelo menos, possibilite uma comparação aproximada entre os valores obtidos de 3 métodos diferentes (Nessler, AHA e Indooxine), em comparação com o método de CLAE, que foi considerada a medida mais viável e próxima do valor real. É evidente que a compreensão completa das diferenças entre os métodos enzimáticos e suas limitações torna-se extremamente importante neste contexto. Mas, considerando que o método Nessler tem o tempo de execução mais curto, mais barato e operacionalmente mais fácil, acredita-se que ele continuará sendo o mais aplicado, mas em todos os casos, uma comparação adequada com os dados já publicados deve ser sempre realizada, particularmente, considerando os desvios de precisão de cada um.

Comparando todas as metodologias avaliadas, o método Nessler é a metodologia mais simples, com reagentes relativamente baratos e menor tempo para análise dos resultados, quando comparados aos métodos da indooxina e de CLAE. Tendo em conta todas essas vantagens, foi proposta uma adaptação do método Nessler para melhorar a quantificação da ASNase.

### 4.1.2 Método de Nessler adaptado

Atualmente, apesar de existirem diversas técnicas adotadas para a quantificação da ASNase, o método padrão mais utilizado baseia-se na quantificação da amônia liberada durante a hidrólise da L-Asn, empregando o método com reagente de Nessler. Por outro lado, embora apresente algumas interferências (presença de íons amônio no meio reacional, interferências de

compostos extra reação), o método de Nessler possui vantagens na determinação da ASNase, como elevados limites de detecção e sensibilidade, facilidade operacional e custos processuais menores quando comparadas a outras técnicas comuns.

Considerando a facilidade de execução e baixo custo do método de Nessler em comparação à outros métodos de quantificação, foi proposta e validada uma adaptação do método de Nessler. As modificações no método tiveram como base o recente trabalho de Yao et al. [51], o qual propõe um ajuste da composição do reagente e na diluição do mesmo para coloração da amônia, de forma a melhorar a exatidão desta técnica. O reagente de Nessler utilizado no presente estudo foi obtido da Merck<sup>®</sup>, e a composição, apesar de conter os mesmos componentes do utilizado no artigo, não se apresentam nas mesmas concentrações. Dessa forma, foram realizados testes monitorando a curva de calibração para validar o método, tendo sido reduzida a quantidade de reagente para metade com objetivo de se reduzir os custos. Para tal foi efetuada a varredura do espectro de absorção visível de soluções com diferentes concentrações de cloreto de amônia nos comprimentos de onda de 350 a 600 nm (0 a 1,15 µmol.mL<sup>-1</sup>), Figura 9 a).

Neste caso em particular, o perfil de absorbância de amônia obtida por coloração com reagente de Nessler se apresenta de forma diferente dos espectros de absorção comuns, onde existe uma região de absorção máxima. Desse modo, para reduzir a inferência do branco nas amostras, foi considerado o ponto de inflexão das curvas no comprimento de onda no qual os pontos da curva demonstrem maior variação na absorbância relativamente ao aumento da concentração de amônia. Portanto, para escolha do comprimento de onda ideal para determinar a atividade da ASNase, na Figura 9 b) é apresentada a correlação entre as curvas de calibração para quantificação da amônia por método de Nessler em diversos comprimentos de onda (de 420 a 455 nm).



**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 µmol.mL<sup>-1</sup>. **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.

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que quanto maior o comprimento de onda, menor será a quantidade de amônia quantificada pelo método de Nessler. Nesse sentido, é evidente que uma escolha apropriada do comprimento de onda para quantificar a amônia produzida pela ASNase permite obter uma maior acurácia do método de Nessler e consequente maior resolução do mesmo. Posteriormente, foi avaliada a influência de diferentes tempos de reação de coloração com reagente de Nessler (em termos unidades de absorbância) para tempos de 2, 7, 10 e 15 min nos respetivos espectros de absorção em quatro diferentes comprimentos de onda (420, 430, 440 e 450 nm), conforme Tabela 4.

Tabela 4.	Variação das	unidades de	e absorbância	da amônia	em função do	tempo de	reação de
coloração	com reagente	e de Nessler	(em min) para	a diferentes	comprimentos	s de onda.	

Comprimento de onda	Unidade de Absorbância por tempo de coloração com Nessler				
(nm)	2 min	7 min	10 min	15 min	
420	1,110	1,115	1,116	1,117	
430	0,971	0,977	0,977	0,978	
440	0,857	0,864	0,864	0,865	
450	0,745	0,751	0,751	0,752	

Fonte: a própria autora.

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que após 7 min de coloração as unidades de absorbância de amônia para cada amostra são aproximadamente as mesmas, independentemente do comprimento de onda a que foi obtido o espectro de absorção. No entanto, e conforme apresentado na Figura 9, menores comprimentos de onda permitem obter uma maior quantidade de unidades de absorbância por concentração de amônia reagida. Nesse sentido, e de forma a padronizar a metodologia para todos os ensaios posteriores de atividade da ASNase utilizando o método de Nessler, foi definido um tempo 10 min para a coloração das amostras com reagentes de Nessler, de forma a garantir a coloração de toda amônia livre presente na amostra e diminuir o desvio entre as amostras.

Ademais, considerando que o comprimento de onda que permite uma maior resolução (maiores valores de absorbância e menor interferência do branco) é de 420 nm, o qual garante também a linearidade com a concentração de amônia presente solução, todos os ensaios das próximas subseções foram quantificados a 420 nm segundo a seguinte metodologia descrita no item *4.1.2*.

Além disso, a atividade obtida com o método adaptado apresenta alta correlação com a atividade pelo método CLAE além de possibilitar o uso da metade da quantidade de Nessler utilizada no método tradicional [44]. Testes adicionais de varredura do espectro completo a partir de amostras obtidas pelo método tradicional de Nessler e pelo método modificado, mostra que o método modificado apresentou maior absorvância à 420 nm, e, portanto, maior resolução nessas condições (APÊNDICE 5).

A padronização das metodologias de quantificação de ASNase por um método simples, confiável, rápido e robusto pode ser uma ferramenta útil para superar as desvantagens em relação à grande disparidade de métodos que existem em sua atividade enzimática relatada na literatura. Além disso, a escolha de um método que permita interpretar ou converter os resultados obtidos de outros métodos também é uma grande vantagem. Comparando todas as metodologias avaliadas, o método Nessler apresenta-se como a metodologia mais simples, com reagentes relativamente baratos e menor tempo para análise dos resultados. A adaptação do método Nessler proposta foi eficiente para reduzir a quantidade de reagente utilizado e melhorar a quantificação da ASNase.

4.2 Efeito de Diferentes Compostos na Estabilidade Catalítica da ASNase

# 4.2.1 Efeito do [Ch]Cl sob a estabilidade catalítica e estrutural da ASNase

## 4.2.1.1 Efeito do [Ch]Cl sob estabilidade e atividade catalítica da ASNase

Embora na literatura, existam alguns estudos que demonstrem que as enzimas são estáveis em certas gamas de concentrações de diferentes polímeros e sais, o número de estudos avaliando a estabilidade de proteínas em presença de LIs é ainda residual [72, 161]. Particularmente, para a enzimaalvo deste trabalho, a ASNase, não existe qualquer estudo que avalie qual o efeito de diferentes concentrações de LIs na estabilidade, atividade e estrutura da enzima.

Nesse sentido, foram então realizados uma série de ensaios que avaliaram a estabilidade da ASNase comercial na presença de compostos (sais ou LIs) baseados em colina ([Ch]<sup>+</sup>). A escolha destes LIs teve como base a capacidade de estabilização proteica recentemente relatada para compostos baseados em colinas [98–101], além da sua capacidade em promover a formação de sistemas de extração líquido-líquido quando acima de determinadas concentrações em meio aquoso em misturas com diferentes polímeros (PEG, PPG, PEG-OMe, etc.) [125]. Dessa forma, inicialmente foi avaliado o efeito de diferentes concentrações molares de [Ch]Cl na atividade enzimática da ASNase a 25, 37 e 50°C, conforme apresentado na Figura 10.



**Figura 10.** Efeito da concentração (mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total<sup>-1</sup></sub>) 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 U.mL<sup>-1</sup>.

Fonte: a própria autora.

Os resultados de atividade ao longo do tempo apresentados na Figura 10 a) mostram que a 25°C o sal é capaz de manter a enzima estável e o aumento da atividade da ASNase é proporcional ao aumento da concentração de [Ch]Cl, devido possivelmente à diminuição da energia de ativação para a enzima ASNase. Após uma hora de contato da ASNase com uma solução aquosa com 0,050 mol<sub>[Ch]Cl.</sub>mol<sub>total</sub>-1, o aumento da atividade de ASNase chegou a 2,5 vezes quando comparado a atividade inicial da enzima em tampão. Embora tenha sido observado um aumento da atividade enzimática a 25°C quando em presença de sal, a maior atividade da ASNase foi obtida após 1 h em contato com [Ch]Cl. Após este período de exposição, ocorre uma diminuição da atividade enzimática, indiferentemente da concentração de [Ch]Cl. A redução da atividade enzimática em cada solução aquosa de [Ch]Cl foi atingida após 6 h de exposição. Independentemente do tempo de contato da ASNase ao sal, os valores das atividades da ASNase neste sal foram sempre superiores à atividade da ASNase em presença apenas de tampão fosfato.

A estabilidade térmica da ASNase foi avaliada, nesse caso, pelo aumento da temperatura da solução de [Ch]Cl para 37 e 50°C, como mostrado na Figura 10 b) e c), respectivamente. Os resultados obtidos a 37°C mostram que a temperatura apresenta um efeito significante na estabilidade da ASNase em diferentes concentrações de [Ch]Cl. Pelos dados da Figura 10 b), é possível verificar a manutenção da estabilidade enzimática a 37°C semelhante ao verificado a 25°C, no qual se verifica uma tendência de aumento da atividade catalítica nas primeiras horas de exposição e estabilização após 6 h de contanto com a solução iônica. Este perfil foi idêntico para baixas concentrações de [Ch]Cl, no qual a atividade enzimática máxima foi atingida 1 h após a incubação da enzima na solução iônica. Após esse tempo, ocorre uma pequena diminuição da atividade até a sua estabilização, a partir das 6 h.

No entanto, para as maiores concentrações de [Ch]Cl, 0,025 e 0,050 mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total</sub>-1, o máximo de atividade enzimática apenas foi obtido no final de 3 h de exposição da ASNase, e a perda de atividade se deu a partir de 3 h de exposição, período o qual é seguido da diminuição de atividade enzimática absoluta. Os resultados mostram que maiores concentrações de [Ch]Cl induzem um mecanismo diferente para a estabilização da proteína, permitindo não só atingir maiores atividades catalíticas absolutas, mas também a energia

necessária para que essa estabilização seja atingida. Neste caso em específico, o atraso na estabilização é resultado direto do aumento da entropia do sistema causado pelo aumento da temperatura, o qual é intensificado sob concentrações iônicas superiores.

Por outro lado, quando se analisam os dados apresentados na Figura 10 c), correspondente às atividades da ASNase em soluções aquosas incubadas a 50°C, é observado um perfil totalmente diferente dos anteriores, no qual a adição de [Ch]Cl causa a diminuição da atividade absoluta da ASNase relativamente à ASNase presente em tampão fosfato. O perfil mostra uma perda gradual de atividade com o aumento da concentração de [Ch]Cl até 0,025 mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total</sub>-1, no qual é atingida uma perda de mais de 90% da atividade inicial da ASNase. Contudo, na concentração de 0,050 mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total<sup>-1</sup></sub> a diminuição da atividade catalítica absoluta foi menor do que as observadas com as concentrações 0,010 e 0,025 molichici.molitotal-1, *i.e.* diminuição de aprox. 70% da atividade inicial. Esta inversão de comportamento catalítico da enzima mostra que para concentrações superiores de [Ch]Cl o mecanismo de estabilização da enzima pode ser diferente, podendo não ser resultado apenas de efeitos de interações fracas (componente entálpica), mas também pela indução de mudanças conformacionais na proteína resultantes do aumento da temperatura do sistema (entropia) [162]. Contudo, mais estudos são necessários para compreender totalmente o que ocorre a nível molecular.

Em resumo, os resultados apresentados na Figura 10 demonstram que o aumento da temperatura do sistema, afeta a estabilidade da ASNase, sendo os resultados mais proeminentes a 50°C. O aumento de temperatura, gera um aumento da entropia do sistema, a qual acaba por intensificar as interações proteína-íons e consequentemente uma inversão de aumento para diminuição da atividade asparaginolítica quando em altas concentrações de [Ch]Cl. O conjunto de resultados de atividade enzimática da ASNase em diferentes concentrações, temperaturas e tempos de exposição, demonstraram que é possível manter a estabilidade enzimática em soluções contendo [Ch]Cl sem perda da atividade catalítica.

Estudos anteriores mostraram que os sais baseados em [Ch]<sup>+</sup> podem funcionar como agentes estabilizadores de proteínas, como citocromo c e anticorpos [98, 99]. No entanto, o aumento da atividade enzimática na

presença de [Ch]<sup>+</sup> ainda não foi relatado, e pode ter sido ocasionada por diferentes condições, como por exemplo o efeito do pH ou ainda, pelo efeito específico dos íons constituintes desses compostos. Inicialmente, para eliminar qualquer hipótese de aumento de atividade enzimática devido ao efeito do pH, todas as amostras testadas foram tamponadas com tampão fosfato 20 mM pH 7,4. Assim, o efeito do pH foi descartado como responsável pela superativação enzimática. Portanto, para dar prosseguimento ao estudo dos mecanismos que levaram à superativação enzimática, foi avaliado se o aumento da atividade enzimática poderia ter sido ocasionado por um efeito específico dos íons presentes no composto derivado de [Ch]<sup>+</sup>.

Para isso, foi inicialmente avaliado a influência do ânion do [Ch]Cl. Este composto derivado de [Ch]<sup>+</sup> possui comportamento mais próximo a um sal comum, e contém um ânion inorgânico em sua composição. Considerando que de acordo com a série de *Hofmeister*, o efeito estabilizador da estrutura proteica é dado pelo ânion presente no sal, neste caso o responsável pela estabilização seria o íon Cl<sup>-</sup>. Assim, para avaliar se a estabilização e posterior o aumento da atividade da ASNase poderia ser devido à presença do ânion Cl<sup>-</sup>, foi realizado um estudo de estabilidade da ASNase na presença de um sal contendo o mesmo ânion que o [Ch]Cl. Para isso, duas concentrações de NaCl foram avaliadas: uma intermediária (0,005 mol<sub>NaCl</sub>.mol<sub>total</sub><sup>-1</sup>) e a máxima (0,050 mol<sub>NaCl</sub>.mol<sub>total</sub><sup>-1</sup>) utilizada anteriormente para os estudos com o [Ch]Cl. Os resultados são apresentados na Figura 11.



**Figura 11.** Efeito da concentração (mol<sub>sal</sub>.mol<sub>total</sub><sup>-1</sup>) 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 U.mL<sup>-1</sup>.

Como observado na Figura 11, o íon Cl<sup>-</sup> na forma de NaCl não causou a superativação da enzima, contrariamente ao observado com o [Ch]Cl, tendo inclusive sido observada uma redução da atividade da enzimática da ASNase na maior concentração de NaCl. Com isso, pode-se inferir que o efeito de manutenção da estabilidade e aumento da atividade na presença do [Ch]Cl não é resultante do efeito estabilizador do ânion Cl<sup>-</sup>, podendo esse resultar de interações específicas cátion-[Ch]<sup>+</sup> ou de interações combinadas do cátion e o ânion em solução contendo a enzima.

Portanto, a fim de melhor compreender as possíveis interações de cada um dos íons com a estrutura da ASNase que pudessem justificar o aumento da atividade catalítica com o [Ch]Cl e a manutenção da mesma com o NaCl, foram realizados ensaios de ancoragem molecular para tentar simular a disposição dos íons em solução contendo a enzima.

# 4.2.1.2 Efeito do [Ch]Cl sob a estrutura proteica da ASNase

Apesar da estrutura ASNase já ter sida elucidada, o mecanismo enzimático ainda não foi bem esclarecido. De acordo com os trabalhos anteriores, o sítio ativo e catalítico da ASNase muda de acordo com o microrganismo que a produz [169]. No entanto, os resíduos de treonina são os principais candidatos a ser um centro nucleófilo responsável pela atividade da mesma [169]. De fato, de acordo com o modelo utilizado neste estudo (PDB: 1K2X), o substrato asparagina mostrou alta afinidade pelos resíduos de treonina (THR179 e THR230).

Inicialmente avaliou-se se o efeito obtido com o [Ch]Cl seria resultante da interação do cátion [Ch]<sup>+</sup> com algum sítio específico da ASNase. Para isso, comparou-se as energias de ligação (afinidade) para os cátions [Ch]<sup>+</sup> e [Na]<sup>+</sup>, com o mesmo ânion em comum, o cloreto. A posição de ligação com menor valor absoluto de afinidade (kcal.mol<sup>-1</sup>) para ASNase, [Ch]<sup>+</sup> e [Na]<sup>+</sup> é mostrada na Figura 12 para evidenciar a interação dos cátions na estabilidade da proteína.



**Figura 12.** Simulação de ancoragem molecular dos cátions dos sais [Ch]Cl e NaCl: **a)** Na<sup>+</sup> e **b)** [Ch]<sup>+</sup>, sob a estrutura da 3D da ASNase. (Estrutura ASNase: *Protein Data Bank*, referência1K2X).

Fonte: a própria autora.

As afinidades de encaixe desses cátions para ASNase seguem o ranking: [Ch]<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Cl<sup>-</sup>. A força de ligação do íon Cl<sup>-</sup> não foi suficiente para exibir interações específicas com resíduos presentes na ASNase, conforme mostra a Figura 13 (as interações são representadas como linhas tracejadas

quando presentes). Como o ânion Cl<sup>-</sup> é comum para ambos os cátions, é evidente que o efeito é predominantemente promovido pelo cátion.



Figura 13. Posição de menor valor absoluto de afinidade (kcal.mol<sup>-1</sup>) para o ensaio de ancoragem molecular para ASNase e o ânion Cl<sup>-</sup>.

Fonte: a própria autora.

De acordo com os resultados obtidos, a [Ch]<sup>+</sup> interage preferencialmente com os resíduos de glicina na estrutura ASNase (GLY10). Por outro lado, apesar da baixa força de ligação do Na+, estes íons exibiram interações metalreceptor com ASP83, SER196 e THR197. Mesmo assim, ambos os cátions interagem com resíduos que não envolvem o centro nucleofílico da ASNase (resíduos de treonina). Tanto o Na<sup>+</sup> como Cl<sup>-</sup> apresentam baixa afinidade com a estrutura ASNase, o que significa que, como bem estabelecido, os íons de menor tamanho molecular perturbam essencialmente a camada de hidratação da ASNase. Desse modo, a interação entre as moléculas de água e a proteína é interrompida, levando à desestabilização da estrutura quaternária proteica, e consequentemente, à redução de sua atividade catalítica. Estes resultados, combinados aos resultados observados com a pequena diminuição da atividade enzimática e aumento da concentração de NaCl, sugerem que os íons pequenos estudados (Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup>) têm um efeito não significante na estabilidade da ASNase. Por outro lado, o efeito para íons maiores, como [Ch]+, parece estar relacionado com interações específicas cátion-proteína, neste caso, interagindo com resíduos de aminoácidos (GLY10) da ASNase. Esses resultados parecem indicar que o cátion [Ch]+ tem um papel ativo na estabilização e superativação da ASNase, possivelmente, resultante das interações específicas entre o cátion e a estrutura proteica.

Em seguida, para obter uma maior compreensão dos mecanismos de interação do [Ch]Cl e a estabilização da ASNase, bem como do aumento da atividade catalítica, foram realizadas análises estruturais da ASNase utilizando técnicas de dicroísmo circular (DC), fluorescência e calorimetria diferencial de varredura (CDV). Particularmente, os ensaios foram realizados para compreender os mecanismos que controlam as alterações de atividade enzimática na presença de diferentes concentrações de [Ch]Cl e verificar possíveis alterações conformacionais na proteína em estudo. Inicialmente foi empregada a técnica de DC, para verificar possíveis alterações na estrutura secundária da ASNase que pudessem estar relacionadas ao aumento da atividade enzimática correspondente. O espectro de DC para cada solução de ASNase em tampão e solução de [Ch]Cl foi obtida a 25°C, conforme apresentado na Figura 14.



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 mol<sub>[Ch]Cl.moltotal<sup>-1</sup>) e tampão (linha preta).</sub>

Fonte: a própria autora.

O espectro da ASNase nativa (linha preta) apresentado na Figura 14 mostra as bandas características da estrutura secundária em α-hélice,

representado pelas bandas negativas a 208 e 222 nm. A banda em 208 nm corresponde à transição  $\pi$  para  $\pi^*$  da  $\alpha$ -hélice, enquanto a banda em 222 nm corresponde a transição  $\pi$  para  $\pi^*$  da  $\alpha$ -hélice ou enovelamento aleatório (*"random coil"*). Para todas as concentrações de [Ch]Cl testadas verificou-se um aumento da elipticidade negativa características das bandas da estrutura secundária da ASNase, demonstrando a estabilização da estrutura e consequente reestruturação com a adição do sal.

No entanto, nas maiores concentrações do sal, 0,025 e 0,050 mol<sub>[Ch]Cl.moltotal</sub><sup>-1</sup>, observa-se o aumento da razão  $\theta_{208}$ . $\theta_{222}$ <sup>-1</sup>, possivelmente devido a modificações da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice e/ou transição para outra conformação ocasionadas por efeito da adição do composto iônico. O deslocamento das bandas 208 e 222 nm no ponto de 0,025 mol<sub>[Ch]Cl.moltotal</sub><sup>-1</sup> e posterior retorno em 0,050 mol<sub>[Ch]Cl.moltotal</sub><sup>-1</sup> evidenciam que a partir desse ponto a estrutura da proteína provavelmente já se encontra saturada pelo [Ch]Cl, não apresentando mais alterações conformacionais que favoreçam ou estejam relacionadas ao aumento de atividade enzimática.

Ensaios adicionais de fluorescência foram então realizados para avaliar com maior detalhe a alteração da estrutura da proteína. Estes ensaios analisam os aminoácidos estruturais que possuam fluorescência quando excitados a um determinado comprimento de onda, como o triptofano, tirosina e fenilalanina. O triptofano (Trp) e a tirosina (Tir) são fluoróforos muito utilizados em caracterização estrutural de proteínas uma vez que são extremamente sensíveis ao microambiente em que se encontra inserido na proteína [163]. A variação do comprimento máximo de emissão (Amáx) dos espectros de proteínas indica modificações neste microambiente devido à ação dos solventes utilizados [163]. A escolha de um solvente que mantenha a estabilidade da proteína está intimamente ligada à manutenção de sua estrutura, na qual o aumento da intensidade de fluorescência emitida no  $\lambda_{máx}$ mostra a diminuição da polaridade do microambiente no qual está inserido o fluoróforo [136, 163]. O aminoácido mais utilizado em análises de fluorescência é o Trp, devido a sua maior sensibilidade ao ambiente ao redor e maior emissão de fluorescência, tornando-se de fácil identificação [164]. Os dados obtidos a partir do monitoramento do Trp, com excitação a 280 nm e emissão

no λ<sub>máx</sub> (330 nm) para as soluções aquosas de ASNase em diferentes concentrações de [Ch]Cl a 25ºC estão apresentados na Figura 15.



**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 mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total</sub>-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.

Fonte: a própria autora.

A Figura 15 mostra que o aumento da concentração até 0,025 mol<sub>[Ch]Cl.moltotal</sub><sup>-1</sup> promove uma maior intensidade de fluorescência da estrutura ASNase, indicando que a polaridade do solvente foi diminuída com a adição do [Ch]Cl, e logo os aminoácidos aromáticos foram mais internalizados [136]. Como a proteína se encontra em um meio aquoso, portanto polar, os aminoácidos aromáticos encontram-se no interior da estrutura proteica, logo, quanto mais internalizados, mais expostos a um ambiente mais hidrofóbico, e o aumento da hidrofobicidade ao redor do fluoróforo leva ao aumento da fluorescência do mesmo [72]. A partir dessa concentração de sal não ocorre mais aumento na fluorescência dos aminoácidos aromáticos aromáticos, portanto para a concentração superior de sal não foi observada alteração significativa no microambiente aos quais os fluoróforos estão expostos. Esse comportamento em função da concentração de [Ch]Cl foi semelhante ao observado com a espectroscopia de DC.

Em geral, em proteínas no estado nativo, Tir e Trp estão localizados no interior (*core,* centro) da proteína, enquanto que no estado desenovelado (do inglês "*unfolded*") ou parcialmente enovelada (do inglês "*folded*"), esses aminoácidos começam a ser expostos ao solvente em que estão imersos. Se o

solvente tiver natureza polar, a fluorescência será perdida; e caso o solvente tenha características apolares, quando esses resíduos forem expostos, a fluorescência será aumentada[136]. Portanto, os resultados obtidos mostram que a adição do [Ch]Cl tem uma influência no enovelamento (*"folding"*) da ASNase, e acima de 0,025 mol<sub>[Ch]Cl.moltotal</sub><sup>-1</sup> ocorre a estabilização dessa condição, a partir da qual a fluorescência para de aumentar, provavelmente devido à saturação da estrutura da ASNase pelo [Ch]Cl, ou a polaridade do solvente chegou a um limite máximo, a partir do qual não age mais diretamente sobre o microambiente ao redor do fluoróforo. Outra evidência é o  $\lambda_{máx}$  que permaneceu fixo em 330 nm, indicando que a proteína apresenta uma conformação estável em todas as concentrações de [Ch]Cl estudadas [165].

Para confirmar os efeitos do [Ch]Cl sobre a estrutura da ASNase, foram realizados ensaios de titulação por acrilamida (um supressor/inibidor hidrossolúvel que se liga a regiões polares da proteína), na ausência e na presença de [Ch]Cl. Este ensaio permitiu obter mais informações sobre alterações estruturais das proteínas pelo monitoramento da localização do fluoróforo, uma vez que o aumento da hidrofobicidade do ambiente ao redor do fluoróforo devido à exposição a regiões polares, levam a trocas de carga e energia que irão reduzir a fluorescência. A acrilamida suprime a fluorescência do triptofano via contato físico com o anel indol excitado, onde a maior supressão da fluorescência indica maior exposição do triptofano ao meio polar [136]. Os resultados da supressão de fluorescência com adição da acrilamida estão apresentados na Figura 16.



**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).

Embora o aumento da concentração de acrilamida tenha suprimido a fluorescência em todas as concentrações de [Ch]Cl, observou-se um efeito diferente na concentração de 0,050 mol[ch]cl.moltotal<sup>-1</sup>, a qual não seguiu a tendência de supressão gradual observada nas demais concentrações. Esse fato confirma que o ambiente ao redor do fluoróforo é estabilizado a partir dessa concentração, e, portanto, sugerindo a existência de outro mecanismo de interação proteína-[Ch]Cl. Logo, o aumento da atividade enzimática pode ser resultado de outro tipo de interações específicas sobre a estrutura proteica, que sobreponham aos efeitos de exposição a ambientes mais polares observados pela análise de fluorescência [88]. Importa destacar que a supressão de fluorescência observada foi do tipo dinâmica, uma vez que o comprimento de onda de emissão máximo praticamente não foi alterado. Portanto, para altas concentrações de [Ch]Cl observou-se apenas pequenas modificações no microambiente em que o fluoróforo está exposto, conforme verificado no DC, onde pequenas alterações na intensidade do sinal foram observadas, sem nenhuma alteração conformacional significativa na estrutura da proteína.

A fim de associar as alterações estruturais observadas aos efeitos termodinâmicos, a estabilidade térmica da ASNase frente ao [Ch]Cl foi avaliada posteriormente por ensaios de CVD e comparada com novos ensaios de DC. Em geral, experimentos que avaliam o enovelamento ou a perda da estrutura proteica ("folding/unfolding") consideram que as alterações na intensidade de fluorescência e/ou na elipticidade estão fortemente correlacionadas à termodinâmica dessas reações. Portanto, para caracterizar a resistência estrutural da ASNase frente a diferentes concentrações de [Ch]Cl em solução aquosa, a perda da estrutura nativa foi monitorada por dois métodos físicoquímicos diferentes. As transições observadas por esses métodos representam a perda da estrutura nativa da proteína devido ao aumento da temperatura, que leva à reorganização da estrutura proteica. A CVD avalia o calor consumido para o processo de "unfolding", constituindo o método de referência para as análises termodinâmicas. Os métodos espectroscópicos, em particular o DC, são empregados para monitorar as alterações da estrutura secundária durante este processo de "unfolding" térmico. Dessa forma, a estabilidade térmica foi avaliada por CVD de 25°C a 95°C, a uma taxa de aquecimento de 1°C.min<sup>-1</sup>, sendo comparada com os dados obtidos por DC, conforme apresentado na Figura 17.



**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 mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total</sub><sup>-1</sup> (linha azul). mdeg: eliptiticidade em miligraus ("*milidegrees*", do inglês).

Fonte: a própria autora.

A Figura 17 a) apresenta o efeito do [Ch]Cl sob a temperatura média de transição ( $T_f$ ) da ASNase. O aumento da concentração de [Ch]Cl diminui a  $T_f$ , como por exemplo, em condições fisiológicas, a ASNase funde ("*melts*") a uma temperatura de 61,64°C, e o aumento da concentração de [Ch]Cl leva à redução da  $T_f$  para 55,94°C. A capacidade térmica, em pressão constante, apresentou a mesma tendência até a concentração de 0,025 mol<sub>[Ch]Cl.</sub>mol<sub>total</sub>-1. Após essa concentração, o aumento da concentração de sal não continuou a influenciar o processo de "*unfolding*", podendo ser observada a estabilização da temperatura de fusão nessa concentração, conforme a Figura 17 a).

O desenovelamento progressivo da estrutura secundária da ASNase foi também monitorado por DC, a uma taxa de aquecimento de 1°C.min<sup>-1</sup>, de 25 a 95°C, conforme apresentado na Figura 17 b). A proporção  $\theta_{208}$ . $\theta_{222}$ <sup>-1</sup> aumenta de acordo com o aumento da temperatura, indicando o desenovelamento da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice. A  $T_f$  da ASNase por este método foi de 57°C para a estrutura nativa e caiu para 51°C com a adição de [Ch]Cl na concentração de 0,025 mol<sub>[Ch]Cl</sub> mol<sub>total</sub><sup>-1</sup>.

Ambos os métodos avaliam a estabilidade térmica da ASNase, no entanto, utilizam diferentes modelos para aferir a  $T_{f}$ . O CVD comumente analisa o desenovelamento partindo do modelo "dois estados" e o DC considera o modelo de desenovelamento sequencial, onde são assumidos mais de dois estados (nativo e desenovelado) durante o processo de desenovelamento. Considerando a base dos dois processos, embora a diferença dos valores absolutos de T<sub>f</sub> obtida por ambos os métodos, foi observada a mesma tendência de desestabilização térmica, na qual o aumento da concentração de [Ch]Cl leva à diminuição da  $T_{f}$ . Apesar da presença do [Ch]Cl atuar como estabilizador da ASNase em condições próximas à temperatura ambiente (25°C), o mesmo agiu como agente desnaturante em temperaturas superiores. O desdobramento proteico se dá pela competição entre a entalpia da ligação de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e a hidratação dos resíduos de aminoácidos. Dessa forma, um agente desnaturante exposto a proteína, podendo ser de natureza iônica ou não, leva a diminuição da T<sub>f</sub> de acordo com o aumento de sua concentração, como já demonstrado para outras proteínas globulares [80].

O conjunto de resultados de atividade enzimática e estabilidade da ASNase em diferentes concentrações de [Ch]Cl e tempos de exposição demonstraram que este composto iônico manteve a estabilidade e promoveu o aumento da atividade enzimática da ASNase em comparação com solução de tampão. Os ensaios estruturais da ASNase em presença de [Ch]Cl, em particular, DC e fluorescência, evidenciaram diferentes mecanismos de estabilização/interação da ASNase a partir de 0,025 mol<sub>[Ch]Cl</sub>.mol<sub>total</sub>-1.

# 4.2.2 Efeito do aumento da cadeia alquilíca dos ânions de LIs baseados em [Ch]<sup>+</sup> sob a estabilidade da ASNase

4.2.2.1 Efeito do aumento da cadeia do ânion de compostos baseados em [Ch]<sup>+</sup> na estabilidade e atividade catalítica da ASNase

Os resultados anteriores indicaram que o o cátion [Ch]<sup>+</sup> apresentou maior afinidade de ligação pela proteína. Considerando que o efeito estabilizador parece ser resultado da presença da [Ch]<sup>+</sup>, em seguida, foram testados uma série de ânions com objetivo de verificar se o aumento da afinidade do ânion pela estrutura proteica podia potencializar o efeito de superativação enzimática e estabilização da ASNase. Para isso, foi avaliado o efeito do aumento da cadeia alquílica do ânion dos LIs derivados [Ch]<sup>+</sup> na estabilidade e atividade da ASNase a diferentes temperaturas (25, 37 e 50°C), tendo sido preparadas diferentes concentrações de acetato de colina ([Ch][Ac]), propanoato de colina ([Ch][Pro]), butanoato de colina ([Ch][But]), variando a fração molar de 0,001 a 0,050 molLi.moltotal<sup>-1</sup>, conforme apresentado na Figura 18. De acordo com os resultados obtidos para o [Ch]Cl, observou-se que os efeitos dos sais na atividade enzimática estabilizam após 6 h de contato. Assim, nesta série de ensaios com [Ch]<sup>+</sup>-LIs, a cinética da atividade enzimática da ASNase foi avaliada somente nas primeiras 6 h de exposição.



**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 mol<sub>L1</sub>.mol<sub>total</sub><sup>-1</sup> (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 ± 0,03 U.mL<sup>-1</sup> para [Ch][Ac]; 5,98 ± 0,25 U.mL<sup>-1</sup> para [Ch][Pro] e 5,37 ± 0,36 U.mL<sup>-1</sup> para [Ch][But].

Na Figura 18 a) é apresentada a atividade da ASNase na presença de diferentes concentrações de [Ch][Ac] em 3 temperaturas diferentes. Este LI também se mostrou eficiente em estabilizar a proteína a 25°C durante o período total de 6 h. Tal como o [Ch]Cl, foi observado um aumento da atividade proporcional ao aumento da concentração do [Ch][Ac], tendo sido atingido o máximo de atividade da ASNase após 1 h de exposição. Todavia, quando a ASNase está numa solução aquosa de [Ch][Ac], o aumento da atividade enzimática relativamente ao tampão fosfato foi menor do que o observado para o [Ch]Cl, com uma atividade enzimática 1,6 vezes superior à atividade da

enzima nativa em tampão fosfato. A ASNase apresenta um perfil de estabilização idêntico em ambos LIs, no qual a estabilidade é atingida após 6 h de contato. Contudo, a atividade absoluta da ASNase para uma mesma concentração de LI é sempre superior em soluções aquosas contendo [Ch]Cl.

Quanto ao efeito da temperatura na atividade enzimática para soluções com [Ch][Ac] (Figura 18 a), observa-se a redução da atividade enzimática a 50°C. Analogamente ao que aconteceu com o [Ch]Cl, não é possível observar a manutenção da atividade da enzima, e esta perde quase toda a atividade quando exposta a pequenas quantidades de [Ch][Ac]. Em todos os ensaios a 50°C ocorre uma redução muito grande da atividade da ASNase nas primeiras horas de exposição, tendo esses valores estabilizados próximo de 6 h de incubação. Em 1 h de contato da enzima com o Ll, é possível perceber que ocorre a maior queda de atividade em todas as concentrações de [Ch][Ac]. De acordo os dados a 50°C, percebe-se também que, independentemente do tempo de exposição da enzima ao Ll, os valores obtidos de atividade da enzima foram sempre inferiores aos valores de atividade da ASNase em presença apenas de tampão fosfato.

Assim, considerando que a estrutura do ânion influencia a atividade da ASNase, em seguida foi estudado o efeito de diferentes concentrações molares de [Ch][Prop] e [Ch][But] na estabilidade e atividade enzimática da ASNase. Os resultados apresentados na Figura 18 b) e c), respectivamente, mostram que a 25°C, a adição de [Ch][Pro] e [Ch][But], respectivamente, induzem uma tendência similar ao observado anteriormente para o [Ch]Cl e [Ch][Ac], no qual o aumento da concentração do LI promove um aumento da atividade enzimática. O aumento da atividade catalítica foi observado até 0,025 mol<sub>[Ch][Pro]</sub>.mol<sub>total</sub>-1, a partir do qual diminuiu em comparação com a atividade da ASNase na presença apenas de tampão. O mesmo ocorre com o [Ch][But] até a concentração de 0,010 mol<sub>[Ch][But]</sub>.mol<sub>total</sub>-1, a partir da qual o aumento da concentração não promove nenhuma alteração na atividade enzimática da ASNase. Por outro lado, para ambos os LIs, o aumento da temperatura teve efeito negativo sobre a estabilidade, tanto a 37°C quanto a 50°C. A 50°C, independente do LI utilizado, após 1 h, a ASNase perde completamente sua atividade enzimática quando comparada à mesma concentração de ASNase em solução tampão fosfato pH 7,4 (50 mM).

Por fim, para confirmar se realmente o carácter mais hidrofóbico do ânion influencia negativamente a atividade da ASNase, foi realizado um ensaio a 25°C, para determinar o efeito de diferentes concentrações de [Ch][Hex] na atividade enzimática da ASNase, conforme está apresentado na Figura 19.



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

Fonte: a própria autora.

Os resultados da Figura 19 mostram que quando a enzima é exposta a diferentes concentrações do [Ch][Hex], a 25°C, as atividades relativas são próximas às observadas anteriormente com os LIs [Ch][Pro] e [Ch][But]. Particularmente, nas duas maiores concentrações, 0,025 e 0,05 (mol<sub>LI.</sub>mol<sub>total</sub>-1), foram observadas diminuições das atividades catalíticas da ASNase, as quais apresentaram atividades inferiores às atividades iniciais e da amostra controle na presença do tampão. Considerando que o comportamento negativo do [Ch][Hex] sobre a estabilidade da ASNase já foi observado a 25°C, não foram realizados os ensaios a 37 e 50°C. Os resultados aqui demonstrados permitiram inferir que o aumento do caráter hidrofóbico dos ânions de cada LI testado diminuiu a capacidade de estabilizar e superativar a ASNase.

Conforme reportado anteriormente, na presença de LIs as enzimas apresentam atividade, estabilidade e seletividade aprimoradas [166]. No entanto, existem algumas evidências de que os LIs podem alterar a estrutura nativa de uma proteína e consequentemente afetar negativamente sua função [166]. É importante ressaltar que, embora tenha sido reportado um número crescente de estudos que mostrem a estabilização de proteínas com LIs [71, 93], estes ainda permanecem escassos, em particular, para a estabilização de enzimas terapêuticas.

4.2.2.2 Efeito do aumento da cadeia do ânion de compostos baseados em [Ch]<sup>+</sup> sob a estrutura tridimensional da ASNase

Considerando que o aumento da cadeia alquílica dos LIs derivados de [Ch]<sup>+</sup> induzem um efeito negativo na atividade e estabilidade da ASNase, o estudo de ancoragem molecular foi conduzido para verificar a afinidade de ligação dos ânions à ASNase. Na Figura 20 são representadas as posições de ancoragem dos ânions: [Ac]<sup>-</sup>, [Prop]<sup>-</sup>, [But]<sup>-</sup> e [Hex]<sup>-</sup>.

As energias de ligação dos ânions estudados com a estrutura da ASNase estão descritas na Tabela 5 e seguem a série: Cl<sup>-</sup> < [Ac]<sup>-</sup> < [Prop]<sup>-</sup> < [But]<sup>-</sup> = [Hex]<sup>-</sup>. De acordo com os resultados, os ânions dos derivados de [Ch]<sup>+</sup> mostraram interações preferencialmente por ligações de hidrogênio com a ASNase. No entanto, importa realçar que o ânion Cl<sup>-</sup> não apresentou nenhuma interação, conforme discutido na seção anterior. Além da ligação de hidrogênio, os ânions [Prop]<sup>-</sup> e [But]<sup>-</sup> apresentaram também interações eletrostáticas. E por último, o [Hex]<sup>-</sup>, ânion mais hidrofóbico, mostrou apenas interações do tipo hidrofóbicas.



**Figura 20.** Simulação de ancoragem molecular de cátions dos LIs baseados em [Ch]<sup>+</sup>, **a)** [Ac]<sup>-</sup>, **b)** [Prop]<sup>-</sup>, **c)** [But]<sup>-</sup> e **d)** [Hex]<sup>-</sup> sob a estrutura da 3D da ASNase. (Estrutura ASNase: *Protein Data Bank*, referência1K2X).

Os resultados de ancoragem molecular mostraram que [Prop]<sup>-</sup> e [But]<sup>-</sup> interagem com THR179 (aminoácido no centro nucleofílico da ASNase), o que pode levar à perda de comportamento catalítico enzimático. As interações hidrofóbicas promovidas pelo ânion [Hex]<sup>-</sup> ocorrem devido à interação da cadeia alquílica à superfície de ASNase.

Cátion	Afinidade (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Tipo de interação	De:	Para:	Distância (Å)
[Ch]⁺	-2.5	Ligação de hidrogênio	[Ch]+- C	Glicina - O	3.46
Na+		Ligação metálica _	[Na]+	Ácido Aspártico - O	2.44
	-1.2		[Na]+	Serina- O	2.60
			[Na]+	Treonina - O	2.58
[Ac] <sup>-</sup>	-2.7	Ligação de hidrogênio –	Ácido glutâmico - N	[Ac] <sup>-</sup> - O	3.13
			Glicina - N	[Ac] <sup>-</sup> - O	2.97
[Pro] <sup>.</sup>		Ligação de hidrogênio/ Interação eletrostática	Treonina - N	[Pro] <sup>-</sup> - O	3.07
		Ligação de hidrogênio -	Asparagina - N	[Pro] <sup>-</sup> - O	3.19
	-2.9		Treonina - O	[Pro] <sup>-</sup> - O	3.04
			Treonina - O	[Pro] <sup>-</sup> - O	3.10
			Treonina - O	[Pro] <sup>-</sup> - O	3.13
[But] <sup>.</sup>	-3.0	Ligação de hidrogênio/ Interação eletrostática	Arginina - NH	[But] <sup>-</sup> - O	3.24
		Interação eletrostática	Treonina - N	[But] <sup>-</sup> - O	5.34
		 Ligação de hidrogênio 	Asparagina - N	[But] <sup>-</sup> - O	3.26
			Arginina - NH	[But] <sup>-</sup> - O	3.11
			Arginina - NH	[But] <sup>-</sup> - O	3.13
[Hex] <sup>-</sup>	-3.0	Interação hidrofóbica	Tirosina	[Hex] <sup>-</sup> - C	3.92

 Tabela 5.
 Energias de afinidade de ancoragem e átomos interagentes previstos pelo programa AutoDock para a ASNase e os cátions dos sais.
Em resumo, os resultados de ancoragem molecular permitem concluir que as interações específicas LI-ASNase são responsáveis pela mudança na atividade catalítica da enzima. O equilíbrio de assimetria entre os íons dos LIs em solução aquosa pode interromper ou aumentar a atividade de ASNase. Os ânions mais hidrofóbicos interagem em regiões próximas ao sítio ativo, dificultando seu acesso. Embora as interações proteínas sal/LI ainda não sejam totalmente conhecidas, os promissores resultados de atividade e estabilidade catalítica da ASNase em presença de LIs derivados de colinas, demonstram a efetividade destes compostos para serem utilizados como agentes extrativos para os SABs.

Desse modo, até essa etapa do trabalho foi possível constatar que quanto maior a hidrofobicidade do composto, menor será a estabilização e atividade da ASNase. Adicionalmente, foi também observado que o aumento da temperatura em todos os compostos avaliados, foi desfavorável à manutenção da estabilidade catalítica da ASNase. O conjunto de resultados apresentados mostram que a ASNase apresenta um perfil de estabilização idêntico em todos os LIs, no qual a estabilidade é atingida após 6 h de contato. Contudo, a atividade absoluta da ASNase para a mesma concentração de LI é sempre superior em soluções aquosas contendo [Ch]Cl. Estes dados indicam que principalmente o tipo de ânion do LI influencia a estabilidade de enzimas, o que está de acordo com estudos anteriores para outras proteínas [166]. Além disso, o aumento da cadeia alquílica do ânion dos compostos derivados de colina, bem como o aumento de temperatura não se mostraram favoráveis a atividade da ASNase.

#### 4.2.3 Influência do pH na atividade da ASNase

Para confirmar se a diferença de atividade observada entre as soluções de diferentes concentrações de sais derivados de [Ch]<sup>+</sup> poderia ser resultado das alterações no pH da solução causados pela adição dos sais/LIs, a estabilidade da ASNase foi monitorada frente a diferentes valores de pH em soluções tamponadas, nas mesmas condições anteriores, e por último, a quantificação da atividade catalítica da ASNase variando o pH da reação.

Os valores de pH variaram de 4 a 11, sendo cada condição representada por uma curva diferente no gráfico abaixo (Figura 21).



**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 ± 0,02 U.mL<sup>-1</sup>.

Fonte: a própria autora.

A Figura 21 a) mostra que o pH tem efeito significativo na atividade da ASNase. Quando a enzima foi exposta a pH 11, maior valor de pH testado, foram atingidos os menores valores de atividade, seguido dos valores de atividade enzimática quando a enzima foi submetida ao pH mais ácido, *i.e.* pH 4. Estes resultados mostram, que condições extremas de pH, muito ácidas ou básicas, não são favoráveis para a manutenção da atividade enzimática da ASNase. No geral, os valores de pH de 5 a 7 foram os que apresentaram as maiores capacidades para manter a atividade enzimática e estabilizar a estrutura da ASNase.

Estudos a respeito das interações eletrostáticas de proteínas, relacionado a diferenças de pH, evidenciam a importância de resíduos carregados para o enovelamento, função e estabilidade das proteínas, especialmente quando tais resíduos são encontrados no sítio ativo da biomolécula [167]. É devido a esses resíduos ionizáveis que o pH possui tanta influência na atividade e estabilidade das proteínas, já que estes resíduos ionizáveis podem sofrer alterações em seu estado de protonação, e alterar a atividade catalítica ou estrutural [167].

Em seguida, foi avaliada a variação de atividade frente aos diferentes valores de pH durante o tempo de reação. Os resultados desse experimento mostraram que em toda a faixa de pH estudada, de 4,0 a 9,0, durante o tempo de reação de quantificação da atividade da ASNase, as atividades da ASNase se mantêm idênticas à solução em tampão fosfato pH 7,4 (20 mM).

Por fim, fica evidente que a superativação da ASNase na presença do [Ch]Cl, não se dá pelas alterações do pH, mas sim por interações específicas entre os íons do sal e a ASNase, alterações que permitem o aumento da atividade catalítica.

#### 4.2.4 Influência de polímeros na estrutura proteica da ASNase

Após avaliar o efeito de LIs na estabilidade e atividade da ASNase, foi posteriormente avaliada a influência de dois polímeros, compostos formadores de fases que serão utilizados nas etapas de extração da enzima, na manutenção da atividade catalítica da ASNase. Os resultados da atividade relativa da ASNase na presença de diferentes concentrações dos polímeros PEG 600 e PPG 400, em função do tempo, estão apresentados na Figura 22.

Os resultados apresentados na Figura 22 a) mostram que o PEG 600 não é um bom estabilizador da ASNase. Após 1 h de exposição da enzima à solução aquosa deste polímero a atividade diminuiu, independente das concentrações do PEG 600. Apenas a menor concentração, de 0,001 mol<sub>polímero</sub>.mol<sub>total</sub><sup>-1</sup> de PEG 600, permitiu obter valores de atividade maiores que a solução padrão com tampão fosfato. Para as restantes concentrações de PEG, os valores de atividade enzimática foram todos inferiores, independentemente do tempo de exposição.



**Figura 22.** Efeito da concentração (mol<sub>polímero</sub>.mol<sub>total<sup>-1</sup></sub>) 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 %:  $1,25 \pm 0,06 \text{ U.mL}^{-1}$ .

Fonte: a própria autora.

Por outro lado, a adição de PPG 400, Figura 22 b), permitiu uma maior manutenção da atividade da ASNase, comparativamente ao observado com o PEG 600. A concentração de PPG 400 que se mostrou mais eficiente para o aumento da atividade enzimática foi a de 0,025 mol<sub>polímero</sub>.mol<sub>total</sub>-1. Com exceção da maior concentração, de 0,050 mol<sub>polímero</sub>.mol<sub>total</sub>-1, todas as outras soluções aquosas de PPG 400 apresentaram valores de atividade maiores que os da solução enzimática com tampão fosfato, independentemente do tempo de exposição.

Vários polímeros têm sido usados para estabilização de proteínas, a fim de melhorar atividade catalítica, até mesmo sua ou modular а biodisponibilidade de fármacos. Já foi demonstrado que a presença do PEG pode diminuir a estabilidade térmica da lisozima devido às propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas tanto do polímero quanto da enzima [168]. Isto pode ser explicado pelo fato do PEG ser de natureza hidrofóbica, e dessa forma interagir favoravelmente com as cadeias laterais hidrofóbicas expostas após o desdobramento da proteína; e então, levar a uma redução da temperatura de transição térmica [168]. No entanto, há casos onde o PEG teve efeitos levemente estabilizadores, como por exemplo da lipase, enzimas que hidrolisam compostos apolares, onde PEG de alta massa molecular interagem muito com os sítios hidrofóbicos da proteína o que leva a estabilização do

estado desnaturado da enzima, e também casos onde o PEG de baixa massa molecular foram capazes de estabilizar a conformação nativa das proteínas por fenômenos de hidratação [169]. Assim fica claro que um fator crucial para estabilização são as características de cada proteína, sendo observados diferentes mecanismos de estabilização, de acordo com a natureza da mesma.

Portanto, devido a esses polímeros possuírem natureza mais hidrofóbica que os sais e Lls estudados anteriormente, observou-se a mesma tendência anterior, onde o aumento da hidrofobicidade leva à desestabilização da ASNase. No entanto, o PPG 400, apesar de mais hidrofóbico que o PEG 600, conferiu maior estabilidade a ASNase, e se mostrou eficiente como estabilizador até 0,01 mol<sub>polímero</sub>.mol<sub>total</sub>-1, e o PEG 600 apenas em 0,001 mol<sub>polímero</sub>.mol<sub>total</sub>-1. Fatores como a viscosidade e a estruturação do polímero em água também contribuem com a capacidade estabilizadora dos mesmos frente as proteínas [170]. Dessa forma, o mecanismo de estabilização do PPG 400 provavelmente se sobrepõe ao efeito de hidrofobicidade observado anteriormente para o PEG 600, portanto, no PPG 400 a estabilização não se deu pelo caráter de hidrofobicidade.

Assim, os dois polímeros foram utilizados para compor os SABs contendo os compostos derivados de colina na próxima fase do trabalho, no entanto devido à redução da atividade da ASNase em presença desses polímeros, optou-se por retirar os polímeros de cada uma das fasee após a extração, para que a ASNase não perdesse a atividade.

### 4.3 Controle da partição da ASNase pela seleção da natureza dos SABs à base de polímero/sal ou LI

Artigo submetido ao periódico "Separation and Purification Technology"

## 4.3 Controle da partição da ASNase pela seleção da natureza dos SABs à base de polímero/sal ou LI

A migração de uma proteína alvo em um sistema polímero/sal depende das propriedades físico-químicas das fases coexistentes em equilíbrio, para que a sua extração possa ser adequadamente manipulada. Assim, esta fase do trabalho foi divida em duas etapas: a partição com uma molécula modelo, a ASNase comercial; e a partição com a ASNase "real", obtida a partir do lisado celular.

Para entender como ocorre a migração da ASNase neste tipo de sistemas, e para obter mais informações sobre os mecanismos de partição, inicialmente determinou-se a eficiência de extração da ASNase comercial (*EE*%) usando a série de sistemas descritos na Tabela 2. Após a compreensão dos mecanismos de controle da partição e a triagem dos melhores sistemas com a molécula modelo, foi realizada então a extração da ASNase "real" obtida a partir de lisado celular de *E. coli* utilizando os sistemas que obtiveram melhores resultados.

Para obter mais informações sobre os fenômenos por trás do particionamento ASNase, foi realizada a caracterização físico-química das fases dos sistemas a 25°C, sendo determinado seu pH, condutividade (mS.cm<sup>-1</sup>), viscosidade (mPa.s), densidade (g.cm<sup>-3</sup>) e teor de água (% em massa), conforme detalhado na Tabela 6. Primeiramente, foram preparados SABs compostos por seis diferentes polímeros de PEG (300, 600, 1000, 1500 e 2000 g.mol<sup>-1</sup>) e PPG (400), e sais (sal e tampões, inorgânicos e orgânicos) ou LI ([Ch][Ac]), e utilizados para inferir como o aumento da massa molecular do PEG afeta o particionamento de ASNase a 25°C. Os parâmetros de partição (*EE* (%) e log *K*) para cada sistema foram determinados, como mostrado na Figura 23. As composições mássicas e os valores dos parâmetros de partição são apresentados na Tabela 6. É importante notar que com exceção dos SABs baseados em tampão citrato, todos os outros sistemas permitiram a manutenção da atividade enzimática (> 97%) ao final do processo de partição (como mostrado pelos valores relativos de atividade da Tabela 6).

Sistema Ternário	рН		Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )		Viscosidade (mPa.s)		Densidade (g/cm <sup>3</sup> )		Teor de água (%)		Parâmetro de Partição	Atividade Relativa (%)	
	Торо	Fundo	Торо	Fundo	Торо	Fundo	Торо	Fundo	Торо	Fundo	log ( <i>K</i> )	Торо	Fundo
PEG+tampão citrato[139, 140]													
PEG 600 PEG 1000 PEG 1500	7.04 6.96 7.02	6.91 6.82 6.79	2.36 1.818 1.116	19.1 28.9 24.5	26.75 23.71 41.97	* 3.6605 3.5807	1.13 1.12 1 12	* 1.27 1.27	40.00 47.52	60.58 62.48 62.66	** 0.51 ± 0.05* 0.42 ± 0.09*	$101.16 \pm 2.42$ $70.25 \pm 3.24$ $70.82 \pm 2.01$	0
PEG 2000	7.02	6.82	0.918	20.9	60.81	5.2866	1.12	1.34	44.73	54.32	$-0.42 \pm 0.03$	$30.52 \pm 1.75$	0
PEG+tampão fosfato[139]													
PEG 300 PEG 600	6.92 7.05	6.97 6.75	17.63 8.57	117.8 134.9	4.86 6.85	2.9056 2.5140	1.11 1.10	1.24 1.25	63.41 55.71	71.26 69.69	**	102.56 ± 2.01 105.01 ± 1.78	0 0
PEG 1000 PEG 1500 PEG 2000	7 6.98 7.01	6.71 6.69	5.02 3.595 2.026	140.1 142.7	10.49 15.68 22.41	2.3581 2.3078	1.09 1.09	1.24 1.24 1.24	57.57 57.98	71.91 72.58 72.03	$-0.47 \pm 0.09$ $-0.73 \pm 0.06$ $1.37 \pm 0.06$	2.35 ± 1.25 0	$97.28 \pm 1.87$ $97.56 \pm 2.89$ $08.51 \pm 2.11$
PEG+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [141]	7.01	0.7	2.920	142.0	22.41	2.2102	1.09	1.24	56.97	72.03	-1.37 ± 0.00	0	90.01 ± 0.11
PEG 300 PEG 600	6.69 7.02	7.11 7.18	12.02 3.43	23.5 29.4	5.82 6.62	3.1480 2.6028	1.10 1.08	1.20 1.19	65.17 63.98	72.46 77.07	0.59 ± 0.03 0.37 ± 0.01	105.54 ± 0.98 100.87 ± 0.14	0 0.45 ± 0.12
PEG 1000	4.29	4.68	14.3	98.51	5.99	2.0817	1.08	1.15	70.49	81.06	-1.96 ± 0.04	0	0.45
PEG 1500 PEG 2000	6.64 6.4	6.65 6.21	8.168 6.294	106.3 111.8	9.47 13.14	1.8587 1.8185	1.08 1.07	1.15 1.15	66.61 63.89	79.75 82.97	-1.97 ± 0.03 -1.98 ± 0.02	0 0	97.54 ± 0.64 99.65 ± 0.85
PEG 600+[Ch][125]													
[Ch]Cl	7.75	7.21	29.36	0.603	18.98	123.125	1.10	1.13	31.19	13.28	$-0.12 \pm 0.06$	0	$88.01 \pm 0.29$ 73.00 ± 0.29
PPG 400+[Ch][129. 142]	9.01	3.12	14.71	0.014	13.13	101.175	1.10	1.12	50.57	10.70	$-0.57 \pm 0.10$	0	13.00 ± 0.29
[Ch]Cl	5.64	6.39	0.023	60.63	58.71	2.8056	1.02	1.05	15.91	64.70	**	0	109.21 ± 2.22
[Ch][Ac]	7.5	8.04	0.019	36.06	65.73	3.0675	1.03	1.05	16.59	69.69	**	0	116.90 ± 0.15

Tabela 6. Propriedades físico-químicas e parâmetros de extração (K e EE (%)) dos sistemas polímero/sal ou LI utilizados na extração da ASNase comercial.

\*Nos SABs à base de citrato ocorreu precipitação da ASNase na interface (formação de uma partição trifásica). Assim, a determinação dos valores de log (K) considerou a precipitação, onde representa a quantidade de proteína no precipitado ou na fase rica em polímero.

\*\* Extração completa, portanto, não foi possível calcular o log (K) devido à uma das fases apresentar concentração de ASNase igual a zero.

Fonte: a própria autora.

Os resultados obtidos com os SABs baseados em tampão fosfato/PEG mostram que ocorreu uma inversão na partição da ASNase com o aumento da massa molecular (MM) do PEG, onde utilizando PEG 300 e PEG 600 a ASNase foi preferencialmente particionada para fase superior (fase rica em PEG) (Figura 23 a), enquanto que com PEG 1000, PEG 1500 e PEG 2000, a proteína migrou preferencialmente para a fase inferior (fase rica em sal) (Figura 23 b). Curiosamente, enquanto ambos os PEGs de baixa MM extraem aproximadamente 100% da ASNase em uma única etapa de extração, a *EE* (%) para a fase rica em sal aumentou com o aumento da MM do PEG, ou seja, PEG 1000 (84,45  $\pm$  2,24 %) < PEG 1500 (92,51  $\pm$  0,71%) < PEG 2000 (98,81  $\pm$  0,20%).

A inversão da partição da ASNase em SABs PEG/tampão fosfato pode ser muito útil no delineamento de sistemas de extração da molécula "real", uma vez que através de uma seleção adequada da MM do PEG pode ser alcançado um controle total da migração da ASNase, mantendo sempre elevadas eficiências de extração (> 84%) independentemente da sua extração para a fase rica em polímero ou sal.

Para confirmar se a tendência de inversão ocorre em outro tipo de SAB polímero/tampão, a partição da ASNase em quatro sistemas baseados em tampão citrato usando PEG 600, PEG 1000, PEG 1500 e PEG 2000 como agentes formadores de fase foi também avaliado (resultados apresentados na Figura 23 e na Tabela 6). A extração da ASNase no sistema composto por PEG 300 e tampão citrato não foi determinada, uma vez que este sistema não promoveu a formação de um regime bifásico após a adição da ASNase em solução tamponada. Neste tipo particular de SAB, como resultado da alta energia livre de Gibbs de hidratação do ânion citrato (forte aptidão para "salting-out"), observou-se a formação de equilíbrios do tipo trifásicos para os sistemas compostos com PEGs de alta MM (PEG 1000, PEG 1500 e PEG líquido-sólido(precipitado)-líquido. Os valores correspondentes à 2000), ASNase extraída no precipitado (EEprecipitado (%)) são apresentados na Figura 24. O sistema PEG 2000/tampão citrato não foi considerado para comparação nos resultados de eficiência de extração por conter mais de 77% da ASNase precipitada no sistema.



**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.

Fonte: a própria autora.



**Figura 24.** Porcentagem de ASNase extraída no precipitado (interface), nomeada como eficiência de extração na precipitação (% *EE*<sub>precipitado</sub>) 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.

Fonte: a própria autora.

Analisando os resultados da Figura 23, observa-se que, com exceção do PEG 2000/tampão citrato, a ASNase foi particionada preferencialmente para fase rica em PEG (> 61%). A extração completa foi obtida com o SAB composto por PEG 600 e com o aumento da MM do PEG, ou seja, PEG 1000 e PEG 1500, as eficiências de extração foram diminuídas. Os resultados obtidos com sistemas PEG/tampão citrato revelaram o mesmo comportamento de partição ASNase do que os sistemas PEG/tampão fosfato. No entanto, como destacado acima, nos sistemas baseados em citrato, a ASNase que não foi recuperada na fase rica em polímero não foi transferida para a fase rica em sal. Nesse caso, a ASNase começou a precipitar na interface e, como mostrado na Figura 24, com um aumento da precipitação associada ao aumento da MM do PEG, com aproximadamente 77% da ASNase precipitada no sistema constítuido por PEG 2000/tampão citrato.

Deve-se observar que em todos os SABs tamponados (citrato e fosfato), o pH das fases coexistentes permaneceu entre 6,69 a 7,05 (como mostra a Tabela 6). Assim, é evidente que a precipitação da ASNase foi um resultado das características dos íons citrato e não de qualquer alteração do pH. A alta basicidade dos íons citrato quando comparados ao fosfato, de acordo com a série Hofmeister [171, 172], leva à sua forte solvatação, desidratando mais a fase rica em PEG (onde a ASNase foi preferencialmente concentrada). A maior desidratação da fase rica em PEG (fase superior) é demonstrada pelos menores valores de teor de água (%) (Tabela 6) dessa fase nos SABs à base de citrato (de 40 a 48% de água) quando comparada à fase nos SABs à base de fosfato (de 55 a 63% de água). Portanto, nos sistemas com PEGs de alta MM (PEG 1500 e PEG 2000), e contrariamente aos SABs à base de tampão fosfato, quando o tampão citrato foi usado como agente formador de fase, a partição da ASNase para a fase rica em sal foi limitada pelos efeitos de salting out dos ânions citrato, os quais causaram a precipitação da ASNase na interface. A precipitação resultante dos mecanismos de salting out está em concordância estreita com os resultados anteriormente relatados. nomeadamente, para a partição de lisozima e de BSA usando sistemas PEG 8000/fosfato de potássio [173].

Embora seja claro que os mecanismos de "salting out" limitem a partição de ASNase na fase rica em sal, a inversão da migração e as altas eficiências de extração para a fase rica em sal obtidas com os SABs compostos por citrato e PEG 1000, PEG 1500 ou PEG 2000, ainda não estão completamente compreendidos. Portanto, para avaliar se a inversão do padrão de migração da ASNase pode ocorrer com outro SAB polímero/sal, foi avaliado a partição da enzima em sistemas compostos por diferentes PEGs (PEG 300, PEG 600, PEG 1000, PEG 1500 e PEG 2000) e sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Como apresentado na Figura 23, nos sistemas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e os polímeros PEG 300 e PEG 600, a ASNase foi extraída preferencialmente para fase rica em polímero (valores de *EE* (%) de 93,77  $\pm$  0,23 e 72,83  $\pm$  0,83, respectivamente), enquanto que utilizando PEG com MM superior a 1000 g.mol<sup>-1</sup>, quase toda a proteína foi particionada para fase rica em sal (*EE* (%) > 97,5).

Os resultados indicam que quando PEGs de baixa MM (PEG 300 e PEG 600) são usados na formação dos SABs, a proteína tende a ser particionada preferencialmente para a fase rica em PEG, como resultado da predominância dos efeitos *salting out* dos íons dos sais sobre a ASNase. A ASNase teve uma maior afinidade para as fases de baixa força iônica (rica em PEG), que, como mostrado na Tabela 6, exibem condutividades em pelo menos uma ordem de magnitude mais baixa que as fases coexistentes ricas em sal. Estes resultados

estão de acordo com o reportado anteriormente [174, 175], os quais demonstraram que o efeito *salting-out* é o mecanismo predominante que governa a migração de biomoléculas da fase rica em sal para a fase rica em polímero. No entanto, aumentando a MM do PEG (PEG 1000, PEG 1500 e PEG 2000) o comportamento de partição é o oposto, sendo a ASNase concentrada preferencialmente na fase rica em sal. As diferentes MM da fase de polímero afetam diretamente a partição dos solutos devido à mudança nas interações polímero-proteína e indiretamente na composição das fases coexistentes (mudanças nas curvas binodais) [176]. Em geral, num SAB polimero/sal, o efeito da MM do polímero na partição de proteína é associado a pelo menos um dos dois fenômenos seguintes: *i*) exclusão estereoquímica da proteína [177, 178]; *ii*) aumento da hidrofobicidade relativa da fase rica em polímero (redução da relação de grupos hidrofílicos/hidrofóbica) [100, 128, 179, 180].

Os efeitos de volume de exclusão implicam que as interações entre polímero e proteína são limitadas à ausência de sobreposição estérica, onde pequenas moléculas de polímero podem ocupar toda a fração volumétrica não preenchida com proteína [181], mas PEGs maiores são fortemente excluídos das proteínas globulares nativas [182]. Por outro lado, embora o aumento da hidrofobicidade relativa da fase rica em polímero favoreça a partição de proteínas hidrofóbicas (devido à interação hidrofóbica entre os resíduos de aminoácidos não polares das proteínas e os grupos etileno do PEG), é importante notar que os polímeros de PEG mais hidrofóbicos podem ser excluídos dos domínios hidrofílicos das proteínas hidrofílicas, diminuindo a solubilidade da proteína na fase rica em PEG [174, 176]. Anteriormente, Farruggia et al. [178] estudaram a interação proteína-PEG-água para explicar a partição da albumina sérica bovina (BSA) em SABs composto de PEG/fosfato de potássio, avaliando a separação de fases por meio do efeito do polímero na estruturação da água. Curiosamente, os autores observaram que a interação PEG 600-BSA é conduzida pelas forças de van der Waals entre as superfícies hidrofóbicas do PEG e moléculas de proteína, o que leva a ruptura das ligações de hidrogênio da água estruturada ao redor dos mesmos. Assim, para alcançar a condição de energia livre mínima a proteína é particionada preferencialmente na fase com água mais estruturada (fase rica em PEG). No entanto, eles notaram que, aumentando a MM do PEG, a exclusão do polímero da superfície da proteína é predominante, induzindo consequentemente a inversão da partição da proteína para a fase rica em sal.

Portanto, devido ao caráter hidrofílico da ASNase [183], mais do que os efeitos entrópicos e estéricos, acima mencionados, a extração completa para a fase rica em sal do SAB parece ser principalmente um resultado do balanço de hidrofobicidade/hidrofilicidade entre as fases [184], onde a ASNase foi preferencialmente particionada para as fases com maior teor de água, ou seja, mais hidrofílico (de acordo com os dados da Tabela 6), como mostrado anteriormente para outras enzimas hidrofílicas nativas [126]. De qualquer forma, é importante notar que a partição de proteínas é uma função complexa fatores. que podem contribuir cumulativamente de vários para o particionamento de proteínas. Um exemplo deste equilíbrio complexo entre os mecanismos de partição é observado no SAB composto por PEG 2000 e tampão citrato, onde quase toda a ASNase foi precipitada na interface porque a proteína não estava termodinamicamente estável em nenhuma das duas fases em equilíbrio, isto é, uma combinação de interações desfavoráveis.

Finalmente, para avaliar melhor a importância das interações hidrofóbicas/hidrofílicas no ajuste da extração de ASNase, dois conjuntos de experimentos foram realizados, utilizando o SAB composto de sais à base de colinas ([Ch]<sup>+</sup>), ou seja, [Ch]Cl e [Ch][Ac]. Os sais de [Ch]<sup>+</sup> foram escolhidos para manter a estabilidade da ASNase (seção anteior desta tese), os quais já foram relatados como sais estabilizantes para proteínas [101].

Para ajustar o balanço hidrofóbico/hidrofílico dos SABs, soluções aquosas de ambos os sais de [Ch]<sup>+</sup> foram misturadas com dois polímeros de baixa MM com diferentes polaridades, PEG 600 (mais hidrofílico) e PPG 400 (mais hidrofóbico), conforme detalhado na Tabela 6. Similarmente, aos sistemas PEG/tampão ou PEG/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, todos os SABs compostos de sais de [Ch]<sup>+</sup> apresentaram valores de pH superiores ao pI 4,9 da ASNase [185], onde a ASNase apresentou carga superficial global negativa. As grandes diferenças nas propriedades físico-químicas desses sistemas estão particularmente relacionadas ao teor de água e condutividade das fases em equilíbrio. Ao contrário dos SABs comuns de polímero/sal (em que ambas as fases são ricas em água), o teor de água dos sistemas PEG 600/[Ch]<sup>+</sup> e PPG 400/[Ch]<sup>+</sup> foi

significativamente menor. Embora o teor de água de ambas as fases seja reduzido, os valores mais baixos foram obtidos para as fases ricas em polímero (variando de 13 a 17% de água, aproximadamente), conferindo-lhes um caráter bastante hidrofóbico. Quanto à condutividade, as fases destes dois tipos de SABs, devido às baixas energias de hidratação dos sais [Ch]<sup>+</sup>, exibiram valores mais baixos de condutividade ( $\leq 60,63$  mS.cm<sup>-1</sup>).

Como mostrado na Figura 23, embora os quatro sistemas baseados em sais de [Ch]<sup>+</sup> exibam características físico-químicas diferentes, eles ainda são eficazes para a extração de ASNase (EE (%) > 65%, aproximadamente). Curiosamente, a mudança da hidrofobicidade relativa dos polímeros também induziu a inversão do particionamento do ASNase. A extração de ASNase usando SABs compostos por PEG 600 levou a uma partição preferencial na fase rica em PEG, enquanto o uso de sistemas baseados em PPG 400 induziu uma migração completa de ASNase para as fases compostas principalmente de [Ch]Cl ou [Ch][Ac] (ambos os sistemas com EE de 100%). Este mesmo comportamento de extração total para fase salina guando utilizado o PPG foi observado para diferentes colinas testadas, demonstrando que a natureza dos compostos derivados de [Ch] utilizados não alteraram a partição da ASNase (APÊNDICE 6) mostrando que o balanço hidrofóbico/hidrofílico do SABs é prepoderante nesse tipo de sistema. Portanto, devido ao leve caráter hidrofílico do ASNase, é muito fácil entender a sua extração completa para as fases mais hidrofílicas (fase rica em sal), quando o polímero PPG 400, mais hidrofóbico, foi usado como agente formador de fases.

Ao final do processo de extração, a atividade final da enzima foi avaliada em relação à atividade inicial e notou-se que houve um aumento da atividade enzimática (APÊNDICE 6), como já demonstrado anteriormente na sessão sobre a estabilidade da ASNase frente aos compostos derivados de colina.

No entanto, o mecanismo de extração do SAB em PEG 600 parece ser bem mais complexo. Nestes sistemas, apesar da hidrofilicidade da ASNase, a proteína foi preferencialmente concentrada para a fase com menor teor de água (fase rica em polímero), sugerindo que uma combinação de efeitos está governando a partição. Outras evidências podem ser obtidas comparando o efeito aniônico dos SABs à base de PEG 600/sais de [Ch]<sup>+</sup>, correspondendo aos seguintes valores de *EE* (%): [Ch][Ac] 89,14  $\pm$  2,58 > [Ch]Cl 64,78  $\pm$  3,11. Aqui, o maior *EE* (%) foi obtido com o SAB composto do ânion mais hidrofílico (alta energia de hidratação de Gibbs), ou seja, o ânion [Ac]<sup>-</sup>. Assim, mais do que as interações hidrofóbicas / hidrofílicas, o efeito *salting-out* de ambos os sais [Ch]<sup>+</sup> assumiram o papel predominante na partição ASNase, similarmente aos sistemas PEG 600/tampão e PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ao final, para comprovar que o ASNase permaneceu em estado ativo, a atividade enzimática de cada fase após a extração com todos os SABs foi determinada através do método do AHA. Como mostrado na Tabela 6, em geral, todos os sistemas apresentam uma atividade relativa em torno de 100%, demostrando que essas plataformas extrativas são biocompatíveis, mantendo a ASNase ativa ao final do processo. As exceções foram os sistemas compostos de tampão citrato que induziram a precipitação de ASNase e PEG 600/[Ch]<sup>+</sup>, os quais causaram uma diminuição nas atividades biocatálticas da ASNase (perdas relativas variando de 12 a 70%).

Os resultados obtidos nesta fase são bastante promissores, uma vez que foram alcançadas altas eficiências de extração, controle completo da partição e manutenção da atividade biocatalítica da ASNase. Poucos trabalhos têm avaliado a capacidade de SABs para recuperar ASNase [107, 133, 186]. Uma das exceções é o estudo no qual uma ASNase recombinante produzida por E. coli foi extraída e purificada usando SABs micelares [186]. Nesse trabalho, a enzima foi preferencialmente concentrada na fase rica em sal (fase pobre em micelas), enquanto as proteínas contaminantes foram removidas na fase rica em surfactante (fase rica em micelas). Em outro trabalho, foi realizado um processo de termosseparação in situ utilizando SABs micelares, e obtiveram rendimentos de até 73,3 % para a recuperação da ASNase na fase rica em micelas (fase concentrada) [133]. Mais recentemente, usando SABs baseados em PEG, uma ASNase recombinante de E. coli foi recuperada na fase rica em PEG (fase relativamente mais hidrofóbica) [107]. As descobertas anteriores e os resultados promissores obtidos suportam a efetividade dos SABs polímero/sal como alternativas viáveis para a recuperação e purificação da ASNase a partir de matrizes complexas.

Os SABs são amplamente estudados para isolar e purificar uma ampla gama de proteínas, mas os mecanismos de partição ainda não são totalmente

compreendidos. De qualquer forma, é bem aceito que os coeficientes de partição das proteínas serão uma combinação de vários fatores, alguns relacionados com a proteína, tais como, sua MM, carga e hidrofobicidade relativa [174, 187], ou dependentes das características dos agentes formadores de fase dos SABs, como por exemplo, propriedades de solvatação, força iônica, energias de hidratação ou polaridades relativas das fases em equilíbrio [100, 178, 188]. Devido à complexidade dos fatores, a proteína pode ser particionada ou excluída em uma das fases em equilíbrio, devido às interações do tipo hidrofóbicas, efeitos eletrostáticos atrativos ou repulsivos e interações fracas como interações de van der Waals ou de ligações de hidrogênio [127]. Em cada sistema específico, uma combinação desses fatores controla a partição de proteínas, em que pelo menos um desses fatores será mais acentuado do que os outros.

Portanto, essa etapa do trabalho forneceu uma imagem simples dos principais mecanismos que governam o particionamento da ASNase em SABs à base de polímero/sal, passo fundamental para projetar a melhor plataforma de extração para a recuperação da ASNase a partir de um meio complexo, neste caso, o lisado celular de *E. coli.* Particularmente, avaliou-se a força de dois efeitos distintos, o balanço hidrofóbico/hidrofílico e os efeitos *salting-out* sobre o particionamento da ASNase. A partir dos resultados obtidos, identificou-se que a alta hidrofobicidade do polímero favoreceu a partição para a fase rica em sal, enquanto as altas energias livres de hidratação dos íons contribuíram para a concentração da ASNase para uma fase desejada pode ser facilmente controlada ajustando-se as polaridades das fases, isto é, alterando o PM do polímero ou a capacidade de *salting-out* dos íons dos sais. Um esquema simplificado destacando os mecanismos predominantes e os tipos de SABs, encontra-se descrito na Figura 25.



**Figura 25.** Forças motrizes que controlam o particionamento da ASNase nos diferentes SABs baseados em polímero/sal.

Fonte: a própria autora.

4.4 Recuperação de ASNase recombinante a partir de lisado celular de *E. coli* 

# 4.4 Recuperação de ASNase recombinante a partir de lisado celular de *E.* coli

A partir dos resultados obtidos anteriormente com a ASNase comercial, foram selecionados sistemas que promoveram a partição preferencial da enzima para a fase rica em polímero e outros para fase rica em sal, a fim de avaliar se o controle da partição em cada um desses casos favoreceria o aumento da seletividade na recuperação e purificação da ASNase recombinante (PDB: 3ECA) a partir de lisado celular de E. coli. Como a partição foi alterada pelo aumento do comprimento da cadeia polimérica foram escolhidos sistemas constituídos por PEG de MM mais baixa (PEG 600) e o de maior MM (PEG 2000), nomeadamente, os SABs compostos por PEG 600 ou PEG 2000 e: tampão fosfato; tampão citrato; sulfato de sódio. Adicionalmente, considerando a capacidade de inversão de partição foram também estudados os SABs compostos por PEG 600/[Ch]Cl, PEG/[Ch][Ac], PPG 400/[Ch]Cl e PPG 400/[Ch][Ac]. Os resultados correspondentes à EE% das proteínas totais são comparados na Figura 26. Destaca-se que todos os sistemas selecionados foram preparados nas mesmas concentrações e condições que os sistemas modelo, exceto o sistema composto de PEG 2000/tampão citrato que exigiu alguns ajustes para formar a região bifásica após a adição do lisado celular, como apresentado na Tabela 7.

Para evitar que o pH do lisado celular pudesse alterar o equilíbrio de fases dos sistemas e consequentemente a partição da ASNase, foi realizada a troca de tampão para todas as amostras, utilizando o mesmo tampão usado para diluir a ASNase comercial nos ensaios anteriores (tampão fosfato 20 mM pH 7,0).

#### a) FASE RICA EM POLÍMERO







**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.

Fonte: a própria autora.

Sistemas Ternários	Proteínas	(mg.mL <sup>-1</sup> )	Balanço de massa %	Atividade	e (U.mL <sup>-1</sup> )	Fator de Purificação (FP) (AE <sub>final</sub> /AE <sub>inicial</sub> )	
	Торо	Fundo		Торо	Fundo	Торо	Fundo
PEG+tampão fosfato							
PEG 600	$2,84 \pm 0,27$	0,17 ± 0,00	110,52 ± 5,24	49,16 ± 5,26	$0,14 \pm 0,05$	2,11 ± 0,09	0,10 ± 0,12
PEG 2000	1,46 ± 0,21	0,55 ± 0,11	71,03 ± 11,89	10,83 ± 3,73	10,62 ± 0,42	0,91 ± 0,26	2,39 ± 0,21
PEG+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>							
PEG 600	1,70 ± 0,18	0,56 ± 0,08	106,19 ± 9,46	6,44 ± 0,21	$2,36 \pm 0,20$	$0,47 \pm 0,07$	1,75 ± 0,13
PEG 2000	$0,53 \pm 0,09$	1,54 ± 0,27	94,81 ± 15,00	1,10 ± 0,22	$3,99 \pm 0,34$	0,26 ± 0,10	1,07 ± 0,14
PEG 600+[Ch]X							
[Ch]Cl	2,15 ± 0,29	0,13 ± 0,03	112,57 ± 13,97	1,37 ± 0,17	0,00	$0,08 \pm 0,00$	0,00
PPG 400+[Ch]X							
[Ch]Cl	$0.14 \pm 0.08$	1,40 ± 0,29	121,87 ± 2,39	0,27 ± 0,31	$2,82 \pm 0.07$	0.00	0.86 ± 0.20
[Ch][Ac]	0,09 ± 0,01	$1,04 \pm 0,02$	80,96 ± 1,33	$0,16 \pm 0,03$	$11,45 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,02$
PEG+tampão citrato							
PEG 600 PEG 2000	0,98 ± 0,17 1,65 ± 0,14	0,13 ± 0,03 0,81 ± 0,16	88,15 ± 13,70 89,10 ± 9,21	5,77 ± 0,76 14,77 ± 7,07	0,02 ± 0,02 4,22 ± 0,18	0,84 ± 0,12 1,11 ± 0,53	0,15 ± 0,21 2,19 ± 0,39

Tabela 7. Resultados da extração de ASNase a partir de lisado celular utilizando SABs compostos por polímeros/sal ou LI.

\*A concentração inicial de proteínas no lisado celular foi padronizada em 1,07 ± 0,15 mg de proteínas totais e atividade específica de 5,69 ± 2,10 U.mg<sup>-1</sup>.

Fonte: a própria autora.

Os resultados apresentados na Figura 26 mostram que todos os sistemas com EE % > 50% podem ser utilizados como plataformas de extração da ASNase "real". No entanto, como esperado, foram observadas algumas diferenças na extração da ASNase a partir do lisado celular, em comparação com os resultados da extração da ASNase comercial. Nos sistemas PEG 2000/tampão (fosfato e citrato) ocorreu uma diminuição dos valores de EE % obtidos para a partição da ASNase do lisado celular, em comparação com os dados da partição da ASNase comercial. Nesses sistemas, utilizando a amostra comercial as EE % foram superiores a 80%, enquanto que com o lisado celular os valores obtidos foram próximos a 60%. No entanto, destaca-se que para os demais, a partição permaneceu próxima do valor obtido para molécula modelo (de 80 a 99%). Para os sistemas PEG 2000/tampão fosfato e PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> os valores de EE % foram, respectivamente, 55% e 80%. Destaca-se, entretanto, que houve partição seletiva da ASNase do lisado celular para a fase rica em sal (fase de fundo), uma vez a maioria das proteínas contaminantes migraram para a fase oposta (fase rica em polímero), como pode ser verificado a partir do fator de purificação apresentado na Tabela 7. Observa-se também que para o sistema com PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a ASNase dividiu-se entre as duas fases, predominantemente para a fase de fundo (rica em polímero), o que levou a diminuição da EE % deste sistema quando comparado anteriormente ao mesmo sistema utilizando a enzima comercial.

As diferenças observadas são de certo modo esperadas visto que no lisado celular ocorre a presença de outras biomoléculas, em particular outras proteínas contaminantes, as quais podem alterar as tendências de partição da ASNase [124, 129], e até mesmo dos equilíbrios termodinâmicos dos sistemas líquido-líquido. Além disso, a molécula modelo, a ASNase comercial, utilizada nos ensaios anteriores possui algumas diferenças da ASNase obtida a partir do lisado celular de *E. coli*, como, massa molecular, volume e balanço de regiões polares e não polares na superfície da proteína. Estas diferenças conferem diferentes acessibilidades do solvente à superfície da proteína, conhecida como superfície ativa (Tabela 8).

Tabela 8.	Proprieda	ides obtidas	a partir	da an	álise	de S	Superfície	Ativa	Acessível	ao	Solvente
(do inglês	"Solvent	Accessible	Surface	Active	- S	ASA	)" obtidas	pela	resolução	da	equação
Poisson-E	Boltzmann.								-		

70	Surpernice
9,27 84009,8	20461,1
7,67 168544	35045,6
	9,27 84009,8 7,67 168544

\*Código de identificação da proteína no banco de dados de proteínas "*Protein Data Bank*". Fonte: a própria autora.

Um resultado interessante foi obtido com sistemas compostos por PEG 600/[Ch]Cl o qual ocorreu a inversão da partição da ASNase relativamente ao sistema modelo, onde a ASNase havia sido particionada para a fase rica em polímero. Apesar da inversão da partição, o fator de purificação obtido nesse sistema não foi promissor, e além disso, a atividade específica da ASNase diminuiu após a partição. Para os sistemas compostos por PPG 400/[Ch]X, os fatores de purificação obtidos com [Ch][Ac] foram superiores aos do [Ch]Cl. No entanto, anteriormente utilizando a ASNase comercial, não foi observada nenhuma diferença na capacidade de partição da mesma com a variação dos ânions de cada composto derivado de colina. Assim, um aumento do fator de purificação foi observado para os SABs compostos por polímeros/[Ch]<sup>+</sup> quando comparados aos polímeros/tampão, usando ASNase a partir de meio complexo.

Vale ressaltar que a combinação de diferentes sistemas aqui estudados utilizando polímeros, sais, LI ou tampões (fosfato e citrato) podem ser combinados para obtenção de sistemas de extração reversa, indo além de uma simples plataforma de purificação de baixa resolução. Sistemas em que ASNase migra seletivamente para a fase polimérica podem ser utilizados subsequentemente para constituir um sistema contendo um tampão, e assim recuperar a amostra da fase polimérica de uma maneira simplificada.

Após a extração e remoção dos polímeros e sais de cada fase, e também após a troca do tampão (tampão fosfato pH 7,4 20mM), as amostras foram monitoradas quanto à presença de proteínas contaminantes e manutenção da estrutura secundária da enzima.

A fim de confirmar a presença de proteínas contaminantes e avaliar a capacidade dos sistemas em extrair seletivamente a ASNase presente no lisado celular de *E. coli*, amostras de cada fase foram avaliadas por SDS-

PAGE. Os dados de SDS-PAGE, apresentados na Figura 27 possibilitaram detectar qualitativamente quais sistemas foram mais seletivos para recuperar a ASNase, relativamente às proteínas contaminantes presentes no lisado celular.

Os resultados qualitativos obtidos com SDS-PAGE estão de acordo com os FP obtido para cada sistema, apresentados na Tabela 7, os quais confirmam não só a migração preferencial da ASNase para cada uma das fases, mas também a remoção de proteínas contaminantes nos SABs: PEG 2000/fosfato de 2,39  $\pm$  0,21 > PEG 2000/citrato de 2,19  $\pm$  0,39 > PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 1,75  $\pm$  0,13 > PPG 400/[Ch][Ac] de 1,24  $\pm$  0,02. Para o sistema PEG 600/fosfato, apesar de um FP de 2,11  $\pm$  0,09, foi observada a presença de contaminantes pelo gel de SDS-PAGE, o que mostra que o sistema foi capaz apenas de concentrar as proteínas totais, e não em separar seletivamente os contaminantes.

No sistema PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a ASNase obtida a partir do lisado celular particionou entre as duas fases, no entanto, foi seletivamente concentrada na fase de fundo, como mostrado na Tabela 7. Assim, observa-se nesse sistema que a *EE* % das proteínas totais para fase de topo (82,29  $\pm$  2,71 %) é maior que para a fase de fundo (17,71  $\pm$  2,71 %), no entanto, o FP é maior para a fase de fundo (1,75  $\pm$  0,13), demonstrando partição seletiva dos contaminantes para fase de topo.

Para os sistemas PEG 2000/citrato foi observado formação de precipitado na interface, como relatado anteriormente para a ASNase comercial. Como mostrado na Figura 27, o precipitado não corresponde a precipitação da ASNase, sendo esta concentrada na fase de fundo (rica em sal). No entanto, com a adição da ASNase a partir de lisado celular, ocorreu precipitação nos sistemas PEG 2000/fosfato e PPG 400/[Ch][Ac], o que não foi anteriormente observado com a ASNase comercial. No sistema PEG 2000/fosfato, a ASNase foi encontrada no precipitado, apesar da maior concentração proteica se encontrar na fase de fundo (rica em sal). O mesmo não foi observado para o sistema PPG 400/[Ch][Ac], o qual não apresentou traço proteico no material precipitado. A precipitação pode ter ocorrido devido à presença dos contaminantes presentes no lisado celular, o que pode ter contribuído para a desestabilização da ASNase presente no meio complexo.



**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.

Como esperado para os sistemas PEG 2000/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PEG 600/fosfato, PEG 600/[Ch]Cl, PEG 600/citrato e PPG 400/[Ch]Cl os quais apresentaram FP ≤ 1, não foi observado aumento na purificação da ASNase, podendo ser observado bandas de contaminantes nessas condições, conforme a Figura 27.

A seguir, a estrutura secundária da carga proteica presente nas fases foi monitorada por DC. A presença da estrutura em alfa hélice foi observada nas fases que continham a maior quantidade de ASNase (Figura 28). No entanto, quando comparamos os espectros de DC do extrato inicial com cada fase após a extração, foi detectado um deslocamento no comprimento de onda (de 220 a 210  $\pm$  2 nm) em muitos dos sistemas testados, com exceção do PEG 2000/citrato e PPG 400/[Ch][Ac] onde não são observadas alterações no comprimento de onda (Figura 28).

A Figura 28 traz o espectro de DC de cada um dos sistemas testados (de **a** a **j**) nas concentrações reais utilizadas nos sistemas. Para os sistemas em que a ASNase apresentou qualitativamente menor número de contaminantes, conforme observado na Figura 28, as amostras foram concentradas (2 vezes) para melhorar o sinal do espectro adiquirido (**I**, **m** e **n**).

Os deslocamentos observados para as duas bandas características de estrutura secundária em alpha-hélice (208 e 222 nm) podem ter se deslocado devido à alta carga de contaminantes na amostra, o que pode levar ao desvio da luz circularmente polarizada. Assim, a identificação das bandas que caracterizam a estrutura secundária proteica se torna muito difícil. Dessa forma, a partir dos dados obtidos com os expectros de DC em cada uma das fases não foi suficiente para inferir se houveram ou não alterações estruturais significativas.



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.

Mudanças espectrais induzidas por alteração de temperatura, pH, ligantes, desnaturantes ou alterações de solvente podem ser monitoradas por DC. Embora esta seja usada para detectar mudanças estruturais secundárias e ser uma ferramenta poderosa para acompanhar mudanças dinâmicas na estrutura da proteína, os desvios obtidos podem ser relacionados com a presença de uma mistura de proteínas, e confirmar após o processo de extração a predominância de ASNase ou outras proteínas contaminantes através da mudança no espectro de DC. Partindo desses dados, não é possível afirmar que a ASNase permaneceu ou não estruturalmente estável após a extração nos sistemas que apresentaram bandas contaminantes a partir do SDS-PAGE. Já para os sistemas PEG 2000/fosfato e PEG 2000/citrato (Figura 28, I e m, respectivamente) é possível inferir que a ASNase presente nas fases manteve a estrutura secundária estável.

No entanto, as atividades medidas ao fim do processo evidenciam que a atividade foi mantida, e o aumento da atividade específica pode indicar uma maior pureza da ASNase após a extração, como podemos ver a partir do FP e SDS-PAGE obtidos para os melhores sistemas: PEG 2000/fosfato de 2,39  $\pm$  0,21 > PEG 2000/citrato de 2,19  $\pm$  0,39 > PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 1,75  $\pm$  0,13 > PPG 400/[Ch][Ac] de 1,24  $\pm$  0,02. Os resultados promissores de extração da ASNase a partir de lisado celular de *E. coli* validam a capacidade dos SABs serem utilizados como plataforma de purificação de baixa resolução, em particular, utilizando os seguintes sistemas compostos por polímeros/sal ou LI: PEG 2000/fosfato > PEG 2000/citrato > PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > PPG 400/[Ch][Ac]; confirmando inclusive os resultados observados com enzima comercial na ausência de contaminantes.

### 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

137

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. Disponíel em: http://www.inca.gov.br. Acesso em: 18 Jan 2015.
- 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.
- 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. Lasparaginase 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.
- 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/wpconteudo/uploads/2018/02/estimativa-câncer-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 andd 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.
- 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 Lasparaginase 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, Nimtz 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Lasparaginases 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  $\alpha$ -keto acid- $\omega$ -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 gassensing 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 Lasparagine 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. 2<sup>nd.</sup> 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=articl e&id=33814:td-2398-biofarmacos-no-brasil-caracteristicas-importancia-edelineamento-de-politicas-publicas-para-seudesenvolvimento&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.

- 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/pharmaceuticalsand-medical-products/our-insights/rapid-growth-in-biopharma
- 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/34biologicos-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 freeenergy 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 *Actinomycetales 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.
- 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, mebranes 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, Swatloski 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, Kozlowski A, Harris JM, Tjerneld F. Application of temperatureinduced 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 Lasparaginase using thermoseparating aqueous two-phase systems. J Chromatogr A. 2007;1147(1):127–34.
- 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 Lasparaginase 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 antileukaemic enzyme L-asparaginase from marine *Actinomycetes* by solidstate 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 requeriments and the estabilishment 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/m<sup>2</sup> 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 *Rhodosporidium 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.

- 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, Penhasilva 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 Chern. 1991;20:447–90.
- 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 twophase 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 polyethyleneglycolphosphate. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2002;780(2):389–96.
- 178. Farruggia B, Nerli B, Picó G. Study of the serum albuminpolyethyleneglycol 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.
- Oelmeier SA, Dismer F, Hubbuch J. Molecular dynamics simulations on aqueous two-phase systems - single PEG-molecules in solution. BMC Biophys. 2012;5(1):14.
- 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 Lasparaginase from *E. coli* by specific adsorption and desorption. FEBS. 1987;7(3):294–6.
- 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.

## **CAPÍTULO 2**

## LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. **Magri A**, Santos J H P M, Coutinho J A P, Ventura S P M, Pereira J F B (2019) Improving the L-asparaginase partitioning and extraction through the proper selection of polymer/salt-based aqueous biphasic systems nature. Separation and Purification Technology (*submetido*).

2. **Magri A**, Pecorari T, Pereira M M, Cilli E M, Greaves T L, Pereira J F B (2019) Enhancing the biocatalytic activity of L-Asparaginase using aqueous solutions of cholinium-based compounds. ACS Sustain Chem Eng (*em preparação*).

3. **Magri A**, Soler MF, Lopes AM, Cilli EM, Barber PS, Jr AP, Pereira JFB (2018) A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods — colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. Anal Bioanal Chem 410:6985–6990 . doi: 10.1007/s00216-018-1326-x.

4. Pereira JFB, **Magri A**, Quental M V, Gonzalez-miquel M, Freire MG, Coutinho JAP (2016) Alkaloids as alternative probes to characterize the relative hydrophobicity of aqueous biphasic systems. ACS Sustain Chem Eng 4:1512– 1520. doi: 10.1021/acssuschemeng.5b01466

## APÊNDICES





Fonte: a própria autora.

**APÊNDICE 2.** Cromatograma obtido a partir da solução de ASNase (0.07 mg.mL<sup>-1</sup>) comercial em tampão fosfato (100mM, pH 7,0) por SEC-CLAE.



Fonte: a própria autora.

**APÊNDICE 3.** Curva de calibração ASNase comercial pelo método de Bradford (BioRad) em tampão fosfato 20 mM pH 7.4. As barras de erros representam o desvio padrão para cada ponto.



Fonte: a própria autora.

**APÊNDICE 4.** Curva de calibração para determinação da atividade da ASNase por CLAE.



a) L-asparagina - tempo de retenção de 4,5 min. Fonte: a própria autora.

Fonte: a própria autora.



Fonte: a própria autora.

**APÊNDICE 5.** Espectro total de duas amostras com 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> de ASNase após a reação enzimática, corada com as diferentes técnicas. O método modificado apresentou maior sensibilidade, maior sinal para o mesmo comprimento de onda.



Fonte: a própria autora.

**APÊNDICE 6.** SABs compostos por PPG 400/colinas.

Além dos SABs compostos por PPG 400/[Ch]Cl e [Ch][Ac], foram também avaliadas as colinas: [Ch][Pro]; [Ch][But]; [Ch][DHP], conforme a composição dos sistemas mostrada na Tabela 9. Assim, os Lls baseados em [Ch]<sup>+</sup> foram testados como componentes de fases, e todos mostraram *EE* % = 100% para ASNase comercial, como visto na Figura 29.



**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<sup>-</sup>, [Ac]<sup>-</sup>, [Pro]<sup>-</sup>, [But]<sup>-</sup>, [DHP]<sup>-</sup>.

Fonte: a própria autora.

Com estes dados, conclui-se que a natureza dos compostos derivados de colina testados não possui efeito sobre a partição da ASNase nos sistemas compostos por PPG 400. Ao final do processo de extração, a ASNase foi capaz de se manter ativa na fase rica em colina, como mostrado na Tabela 9.

**Tabela 9.** Composição dos SABs compostos por PPG 400/[Ch]X e atividade relativa (%) da ASNase comercial no final do processo de partição.

	Composição (massa %)			Atividade Relativa (%)	
	PPG 400	[Ch]X	Água	Fase rica em PPG	Fase rica em [Ch] <sup>+</sup>
[Ch]Cl	30	16	54	0	109.22
[Ch][Ac]	30	16	54	0	116.9
[Ch][Pro]	30	16	54	0	76.64
[Ch][But]	30	16	54	0	91.70
[Ch][DHP]	30	16	54	0	146.71

Fonte: a própria autora.