



OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE DE ZYMOMONAS MOBILIS  
PRODUZIDA POR ESCHERICHIA COLI RECOMBINANTE

Vinícius de Lima Gonçalves

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Angel Ramón Hernández

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2019

OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE DE ZYMOMONAS  
MOBILIS PRODUZIDA POR ESCHERICHIA COLI RECOMBINANTE

Vinícius de Lima Gonçalves

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO  
ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE  
ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA  
QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

---

Dr. José Angel Ramón Hernández, D.Sc.

---

Prof. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

Gonçalves, Vinícius de Lima

Obtenção e Purificação de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* produzida por *Escherichia coli* recombinante/Vinícius de Lima Gonçalves – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XIX, 102 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Angél Ramón Hernández

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 87 – 95.

1. Purificação. 2. Cromatografia. 3. Leucemia Linfoblástica Aguda. I. Alves, Tito Lívio Moitinho, *et al.*  
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*“Being smart will count for nothing if you don’t make the world better. You have to use your smart to count for something...”*

*(Horizon Zero Dawn)*

# Agradecimentos

A Deus.

A minha mãe que me apoiou com todo o carinho e amor possível durante essa jornada.

Ao pessoal do Laboratório de Bioprocessos: Mônica, Lidiana, Aline e Isis pela incrível ajuda durante toda a fase de experimentos. Aprendi demais com todas elas e sempre vou ser grato por toda a atenção.

Ao Ricardo Aderne do laboratório LMSCP pela ajuda e atenção.

Aos orientadores Pepe e Tito por toda paciência, atenção, dedicação e conselho. Principalmente ao Pepe que esteve ao meu lado no dia a dia do laboratório me apoiando e ensinando tudo que eu precisava para seguir em frente, ao ponto que de orientador virou um amigo pessoal.

Á capes pelo apoio financeiro no desenvolvimento da dissertação.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE DE ZYMOMONAS  
MOBILIS PRODUZIDA POR ESCHERICHIA COLI RECOMBINANTE

Vinícius de Lima Gonçalves

Fevereiro/2019

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Angel Ramon Hernandez

Programa: Engenharia Química

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um câncer do sistema linfático com uma incidência importante, sobretudo, na população infantil. A enzima L-asparaginase tem uma reconhecida efetividade na terapia deste câncer. O Brasil não possui uma forma de produção desta enzima para uso clínico. Atualmente, pacientes com a doença dependem da importação do medicamento para prosseguir com o tratamento. Encontrar uma forma de produção nacional da L-asparaginase é de vital importância para melhorar a viabilidade e eficiência do tratamento da LLA. Nesse cenário, o presente trabalho estuda as condições de extração e purificação da enzima codificada pelo gene da bactéria *Zymomonas mobilis* expressado por via recombinante em *Escherichia coli*. Os processos de ruptura celular por homogeneizador a alta pressão e purificação cromatográfica em duas etapas foram estudados. Determinou-se que as melhores condições de rompimento são 300 bar e 4 passes. O primeiro passo cromatográfico foi pela cromatografia de afinidade por íons imobilizados e apresentou-se um fator de purificação de 12,1 com recuperação de 88%. O segundo passo foi pela cromatografia de troca iônica, a qual obteve um fator de purificação de 3,5 e recuperação de 69,5%. O grau de pureza obtido faz possível os estudos em animais desta enzima nacional e iniciar os trabalhos para um escalonamento do processo.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master on Science (M.Sc.)

OBTAINMENT AND PURIFICATION OF L-ASPARAGINASE FROM  
ZYMOMONAS MOBILIS PRODUCED FROM RECOMBINANT ESCHERICHIA  
COLI

Vinícius de Lima Gonçalves

February/2019

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

José Angel Ramon Hernandez

Department: Engenharia Química

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a cancer of the lymphatic system with an important incidence, especially, in child population. The enzyme L-asparaginase has a recognized effectiveness in the therapy of this cancer. The Brazil does not have a way to produce the enzyme to clinical use. Currently, patients with the disease depend on the importation of the medicine to continue the treatment. Finding a national way of producing L-asparaginase is of vital importance in improving the viability and efficiency of ALL treatment. In this scenario, the present work studies the extraction and purification conditions of the enzyme encoded by the recombinantly expressed *Zymomonas mobilis* bacterial gene in *Escherichia coli*. The cell rupture by high-pressure homogenization and two steps chromatography purification were studied. It was determined that the best cell rupture conditions are 300 bar and 4 passages. The first chromatography step was by immobilized ion affinity chromatography and presented a 12,1 purification factor with 88% recovery. The second step was by ion exchange chromatography, which obtained 3,5 recuperation factor and 69,5% recovery. The purity degree obtained makes possible the animal studies of this national enzyme and start the studies for a process escalation.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1	Leucemia Linfoblástica aguda (LLA).....	4
2.2	L-asparaginase.....	5
2.2.1	Descoberta da enzima.....	5
2.2.2	Atuação nos tumores .....	6
2.2.3	Produção nacional e mundial.....	8
2.3	Técnicas de rompimento celular.....	11
2.3.1	Homogeneização a alta pressão .....	12
2.3.2	Ultrassom.....	13
2.4	Técnicas de análise da enzima.....	14
2.4.1	Análise de concentração proteínas (método de Bradford).....	14
2.4.2	Ensaio de atividade enzimática de L-asparaginase .....	15
2.4.3	Eletroforese.....	15
2.4.3.1	Géis bidimensionais.....	16
2.4.3.2	Immunoblotting .....	17
2.5	Cromatografia.....	18
2.5.1	Cromatografia por exclusão de tamanho .....	19
2.5.2	Cromatografia por troca iônica .....	19
2.5.3	Cromatografia por afinidade.....	20
2.5.3.1	Histidina.....	22
2.5.3.2	Ligações quelantes.....	24
2.6	Análise estatística .....	28
2.6.1	ANOVA.....	30
2.6.2	Teste de Duncan.....	33
2.6.3	Homogeneidade de inclinações.....	35



3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Solução tampão.....	39
3.2	Meio de cultura.....	39
3.3	Centrifugação .....	40
3.3.1	Tratamento do sobrenadante.....	40
3.4	Teste de atividade .....	41
3.5	Eletroforese .....	42
3.6	Ensaio de Bradford .....	44
3.7	Análise estatística .....	44
3.8	Rompimento celular.....	45
3.9	Cromatografia.....	47
3.9.1	Cromatografia por afinidade.....	47
3.9.2	Cromatografia por troca iônica .....	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	Análise estatística das curvas padrões .....	51
4.2	Melhores condições de rompimento .....	58
4.3	Purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica.....	66
4.3.1	Cromatografia de afinidade .....	66
4.3.2	Efeito da concentração de imidazol .....	69
4.3.3	Cromatografia de troca iônica.....	77
5.	CONCLUSÕES .....	85
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
	APÊNDICE A .....	96

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura da enzima L-asparaginase.....	5
Figura 2.2 – Atuação da L-asparaginase nas células cancerosas.....	7
Figura 2.3 - Mecanismo de ação da L-asparaginase .....	7
Figura 2.4 - Homogeneizador a alta pressão .....	12
Figura 2.5 - Primeira etapa da purificação por géis bidimensionais.....	17
Figura 2.6 - Exemplos de cromatografia na separação de proteínas.....	22
Figura 2.7 - Molécula de histidina .....	22
Figura 2.8 - Interação entre o níquel e a histidina .....	25
Figura 3.1 - Mini-PROTEAN® Tetra Cell .....	43
Figura 3.2 - Coluna HisTrap HP, 1 mL.....	47
Figura 3.3 - Coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL .....	49
Figura 3.4 - Esquema dos processos abordados na metodologia da dissertação em ordem de operação. ....	50
Figura 4.1 – Gel de poliacrilamida para a cromatografia da amostra obtida após rompimento celular a 100 bar 1 passe. 1- Amostra inicial; 2 até 9- Eluição. ....	59
Figura 4.2 - Gel de poliacrilamida para a cromatografia da amostra obtida após rompimento celular a 100 bar 4 passes. 1- Amostra inicial; 2 até 9- Eluição .....	59
Figura 4.3 – Gráfico das concentrações de proteína para 200, 300 e 400 bar em função do número de passes. ....	64
Figura 4.4 – Gel de poliacrilamida para a cromatografia de afinidade de 5 mL da amostra 2. A- Amostra inicial; P- Passagem da amostra (passe); 1- Lavagem I (10 mM imidazol); 2- Início da lavagem II (70 mM imidazol); 3- Final da lavagem II (70 mM imidazol); 4 até 8- Frações de 0,5, 1, 2, 3 mL de eluição; Padrão- padrão de peso molecular .....	68
Figura 4.5 – Gel de poliacrilamida para o reprocessamento da amostra 2. 1- Amostra inicial; 2- Passe de toda a amostra inicial; 3- Lavagem I; 4- Lavagem II; 5 até 8- Frações de eluição .....	69
Figura 4.6 – Géis de poliacrilamida para a cromatografia de afinidade de 10 mL da amostra 2. 1- Amostra Inicial; 2 até 4- Amostras de passe (quando	

	passaram 1, 10 e 18 mL da amostra inicial, respectivamente); 5- Início da lavagem I (10 mM de imidazol); 6- Final da lavagem 1; 7- Início da lavagem II (70 mM de imidazol); 8- Final da Lavagem II; 9- Início da Lavagem III (100 mM de imidazol); 10 até 17- Frações de eluição	70
Figura 4.7 - Gel de comparação entre as bandas da enzima obtida no laboratório (direita) e da enzima comercial Elspar (esquerda)	.....	71
Figura 4.8 – Gel de poliacrilamida com as frações de eluição da cromatografia de afinidade dos pellets da amostra 2 rompidos com ultrassom	.....	72
Figura 4.9 – Gel de poliacrilamida para a cromatografia de afinidade das amostras 1 e 3. 1- Amostra Inicial; 2 até 5- Amostras de passe (quando passaram 5 ml, 20 ml e 50 ml e 103 ml respectivamente); 6- Início da Lavagem I (60 mM de imidazol); 7- Final da Lavagem I; 8- Início da Lavagem III (100 mM de imidazol); 9- Final da Lavagem III; 10 até 17- Frações da eluição	.....	73
Figura 4.10 - Gel de poliacrilamida com as frações de eluição da cromatografia de afinidade dos pellets das amostras 1 e 3 rompidos com ultrassom	.....	74
Figura 4.11 – Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 10 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 7- Lavagens; 8 até 14- Eluições	.....	75
Figura 4.12 - Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 50 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 8- Lavagens; 9 até 18- Eluições	.....	75
Figura 4.13 - Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 100 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 7- Lavagens; 8 até 9- Eluições	.....	76
Figura 4.14 - Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 150 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 7- Lavagens; 8 até 9- Eluições	.....	76
Figura 4.15 – Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 500 µL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A etapa de eluição e realizada com um gradiente de 0 até 100 % de solução tampão fosfato 66 mM pH 8 com 1 M de NaCl. Curva azul escuro representa a absorvância a 280 nm. A curva azul claro representa a variação da condutividade em porcentagem. A curva verde representa a concentração em porcentagem de solução de eluição.	.....	78

- Figura 4.16 – Fotografia do meio reacional da atividade enzimática para as amostras provenientes da separação por troca iônica. T- Solução tampão utilizada no ensaio de atividade; A- amostra de L-asparagina usada para a reação enzimática no ensaio; 1 e 2- primeiro ombro; 3 e 4- pico principal; 5 e 6- segundo ombro; 7- cauda final. A intensidade da coloração esverdeada indica a presença de L-asparaginase na amostra..... 79
- Figura 4.17 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 1 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em mili unidades de absorção e eixo horizontal em minutos. .... 80
- Figura 4.18 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 1 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de condutividade e eixo horizontal em minutos..... 80
- Figura 4.19 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 1 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de solução de eluição e eixo horizontal em minutos..... 81
- Figura 4.20 - Fotografia do meio reacional da atividade enzimática para as amostras provenientes da separação por troca iônica. T- Solução tampão utilizada no ensaio de atividade; A- amostra de L-asparagina usada para a reação enzimática no ensaio; 1 e 2- pico de passe da amostra; 3 até 5- primeiro pico da eluição; 6 e 7- Dois últimos picos da eluição ..... 81
- Figura 4.21 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 4 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em mili unidade de absorção e eixo horizontal em minutos. .... 82
- Figura 4.22 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 4 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um

gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de condutividade e eixo horizontal em minutos.....	82
Figura 4.23 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 4 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de solução de eluição e eixo horizontal em minutos.....	83
Figura A.0.1 - Curva padrão para o ensaio de Bradford. Solução de BSA (Albumina de soro bovino).....	96
Figura A.0.2 - Curva padrão para o ensaio de Bradford. Solução de BSA (Albumina de soro bovino).....	96
Figura A.0.3 - Curva padrão para o ensaio de Bradford. Solução de BSA (Albumina de soro bovino).....	97
Figura A.0.4 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Solução de sulfato de amônio. ....	97
Figura A.0.5 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Solução de sulfato de amônio. ....	98
Figura A.0.6 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Solução de sulfato de amônio	98
Figura A.0.7 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Mistura de solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.....	99
Figura A.0.8 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Mistura de solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.....	99
Figura A.0.9 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Mistura de solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.....	100
Figura A.0.10 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 20 µL para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.....	100
Figura A.0.11 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 14 µL para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.....	101
Figura A.0.12 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 20 µL para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.....	101

Figura A.0.13 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 14  $\mu$ L para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L ..... 102

## Lista de Tabelas

Tabela 4.1 – Curvas padrões para o ensaio de Bradford com BSA.....	51
Tabela 4.2 – Análise das inclinações e interseções das curvas de Bradford.....	51
Tabela 4.3 - Curvas padrões para o ensaio de atividade com soluções de sulfato de amônio .....	52
Tabela 4.4 – Análise das inclinações das curvas padrões com de sulfato de amônio ....	52
Tabela 4.5 – Curvas padrões para o ensaio de atividade com sulfato de amônio e L- asparagina .....	53
Tabela 4.6 - Análise das inclinações e interseções das curvas com sulfato de amônio e L- asparagina .....	53
Tabela 4.7 – Comparação entre as atividades enzimáticas obtidas por curvas padrões com L-asparagina e sem L-asparagina na aferição.....	54
Tabela 4.8 - Curvas padrões com L-asparagina para 20 e 14 $\mu$ L de amostra .....	55
Tabela 4.9 - Análise estatística das inclinações para as curvas padrões com L-asparagina com 20 e 14 $\mu$ L de amostra .....	55
Tabela 4.10 - Curvas padrões com L-asparagina para 20 e 14 $\mu$ L de amostra .....	55
Tabela 4.11 - Análise estatística das inclinações para as curvas padrões com L-asparagina com 20 e 14 $\mu$ L de amostra .....	56
Tabela 4.12 – Comparação estatística entre as inclinações das curvas padrões com 20 e 14 $\mu$ L de amostra.....	56
Tabela 4.13 – Análise estatística da atividade enzimática em relação ao tempo .....	57
Tabela 4.14 – Análise estatística de atividade enzimática em relação às diluições.....	57
Tabela 4.15 – Concentração de proteína obtida após a cromatografia da amostra obtida com rompimento para 100, 200 e 400 bar com 1,2,3 e 4 passes. Médias e desvio padrão para triplicata.....	60
Tabela 4.16 - Comparação pelo teste ANOVA entre as concentrações de proteína em cada grupo de pressão.....	61
Tabela 4.17 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 100 bar de rompimento.....	62
Tabela 4.18 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 200 bar de rompimento.....	62

Tabela 4.19 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 400 bar de rompimento.....	62
Tabela 4.20 - Concentração de proteína obtida após a cromatografia da amostra obtida com rompimento para 200, 300 e 400 bar com 4, 7 e 10 passes. ....	63
Tabela 4.21 - Análise ANOVA para rompimento a 200, 300 e 400 bar com 4, 7 e 10 passes.....	63
Tabela 4.22 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 200 bar de rompimento.....	64
Tabela 4.23 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 300 bar de rompimento.....	64
Tabela 4.24 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 400 bar de rompimento.....	65
Tabela 4.25 - Atividade enzimática e concentração de proteína para as amostras obtidas pelo rompimento com a prensa de French.....	67
Tabela 4.26 - Comparação ente a atividades enzimáticas para as amostras obtidas após o rompimento celular pela prensa de French e ultrassom .....	72
Tabela 4.27 - Dados de recuperação, fator de purificação e atividade enzimática pela cromatografia de afinidade. Coluna HisTrap HP, 1 mL.....	77
Tabela 4.28 - Dados de recuperação, fator de purificação e atividade enzimática pela cromatografia de troca iônica. Coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL.....	83
Tabela 4.29 – Resumo dos dados de recuperação de enzima e fator de purificação das cromatografias de afinidade e troca iônica. Colunas Histrap HP, 1mL e HiScreen Q HP, 4,7 mL, a 25°C .....	84



## Lista de símbolos

I	número de populações estudadas ou número de médias
MQE	valor médio quadrado do erro
MQF	valor médio quadrado devido aos níveis do fator
N	número total de medidas efetuadas
$N_i$	o número de medidas do grupo I
P	pressão de operação
R	concentração de proteínas totais (g/L).
$R_m$	concentração de proteínas intracelulares totais (g/L).
SQE	soma dos quadrados devido ao erro
SQF	soma dos quadrados devido ao fator
$S_r^2$	quadrado médio dos erros, ao considerar o grau de liberdade do erro
$Y_i$	valor de Y experimental
$\hat{Y}_i$	valor de Y calculado pelo modelo ajustado
a	constante que é função do tipo de célula do meio e das condições de crescimento celular

$e_i$	resíduos
$k$	constante de velocidade que depende da temperatura da suspensão, da concentração celular e do tipo de célula (L/min).
$n$	número de passes
$r$	número de repetições para cada média.
$s^2_I$	variância do grupo I
$s_x^2$	variância amostral da variável x
$s_y^2$	variância amostral da variável y
$\bar{x}$	média global dos grupos
$\bar{x}_I$	média do grupo I
$\beta_0$	coeficiente linear
$\beta_1$	coeficiente angular
$\beta_{i0}$	coeficiente linear
$\beta_{i1}$	coeficiente angular
$\varepsilon$	erro associado ao modelo. É o erro de Y calculado pelo modelo em relação ao Y experimental.
$\sigma_x^2$	variância da variável x

$\sigma_y^2$       variância da variável  $y$

$\nu_i$       grau de liberdade do numerador (1) e denominador (2).

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer não é considerado apenas uma doença isolada e sim um conjunto de doenças que apresentam um perfil semelhante de atuação. Dentre todos os tipos de câncer existentes, todos compartilham a mesma característica básica: o crescimento desordenado das células (MUKHERJEE, 2011). Em 1950, a Organização Mundial da Saúde começou a investigar as possíveis causas dos males de câncer que apareciam em diferentes partes do mundo. Aprenderam que determinados tipos de câncer eram mais comuns em regiões específicas do planeta do que outros, associando a ocorrência dos mesmos a fatores ambientais. Porém, com a criação da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), os estudos conduziram a outros agentes causadores, como o genético e os produtos com os quais as pessoas interagem (BLACKADAR, 2016). Porém, ao contrário do que muitos pensam, não existe apenas um fator genético o responsável pelo aparecimento de um câncer. O desencadeamento da doença ocorre através da interação entre a predisposição genética e 3 tipos diferentes de fatores carcinogênicos externos, como: físicos, raios UV e outros tipos de radiações; químicos, como componentes do cigarro, asbestos, poluentes, agrotóxicos e alguns outros produtos químicos; biológicos, como vírus, bactérias e parasitas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A leucemia linfóide (ou linfoblástica) aguda (LLA) é uma forma de câncer que afeta o sistema linfático. Ela se caracteriza pelo crescimento desordenado das células linfoblastos durante o processo de hematopoese do sangue. Ainda são desconhecidos os fatores responsáveis por desencadear essa má formação. É uma doença mais comum em crianças do que em adultos. Cerca de 90% das crianças em tratamento conseguem ser curadas dependendo do tipo de L-asparaginase utilizada. Já nos adultos, em torno de 50% dos pacientes que começam o tratamento entram em remissão completa da doença (INCA, 2006; ABRILE, 2016). O seu tratamento envolve a enzima L-asparaginase como o principal agente antineoplástico a qual vem sendo estudado desde 1953 (NARTA et al., 2007; KIDD, 1953; VERMA et al., 2007).

As principais formas de produção da enzima para fins terapêuticos são através de microrganismos recombinantes, mais especificamente as bactérias *Escherichia coli* e

*Erwinia chrysanthemi*. No Brasil, não há nenhuma produção da L-asparaginase para uso terapêutico em humanos, necessitando importar todo produto demandado para tratamento. Caso algum paciente apresente alguma sensibilidade quanto ao medicamento, necessita passar por todo um processo de importação de uma enzima produzida por outro microrganismo (no caso a *Erwinia chrysanthemi*), tempo esse que nenhum paciente com câncer dispõe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; KOZAK et al., 2002; BATISTA, 2013).

Assim, uma das soluções para melhorar o tratamento dos pacientes leucêmicos no Brasil é a produção de um medicamento à base de uma L-asparaginase nacional. Nesse contexto, o Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ vem desenvolvendo uma nova forma de produção da L-asparaginase através da bactéria *Zymomonas mobilis*. A produção da L-asparaginase foi bem caracterizada até o estágio da sua fermentação pelos trabalhos de Abud (2005) e Einsfeldt (2014), por meio de um microrganismo recombinante (*Escherichia coli*) para expressar o gene da enzima procedente da *Zymomonas mobilis* e obter, assim, um novo tipo dessa enzima, uma vez que não existe a sua produção de forma recombinante. Porém, em todo processo produtivo de uma proteína terapêutica, é necessária uma etapa de purificação bem definida e caracterizada.

Nesse ponto é que foi baseado o presente trabalho, determinar um processo de purificação eficiente e escalonável de forma a permitir obter uma enzima purificada o suficiente para ser utilizada como matéria prima para produção de fármacos. O processo proposto pretende utilizar a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, uma vez que a produção da enzima nos estudos de Einsfeldt (2014) já incluiu, na enzima, uma sequência proteica chamada cauda de histidina visando uma purificação desse gênero. É um tipo de purificação de proteínas muito conhecido pela sua especificidade e eficácia de separação, visto que apenas moléculas com determinadas características específicas conseguem ser separadas através de interações com a matriz cromatográfica.

Assim, o objetivo geral se resume ao estudo das melhores condições de purificação para enzima L-asparaginase utilizando matrizes cromatográficas comerciais. Para tal, os objetivos específicos são: produzir a enzima expressada de forma recombinante através do cultivo de *Escherichia coli*; estabelecer as condições para a

quantificação da concentração de proteína e determinação da atividade enzimática da L-asparaginase deste trabalho; obter um método eficiente para a ruptura celular e extração da L-asparaginase intracelular; obter as condições de purificação da enzima L-asparaginase, por cromatografia de afinidade por íons de níquel imobilizados; purificar a L-asparaginase por cromatografia de troca iônica.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Leucemia Linfoblástica aguda (LLA)**

A medula consiste na estrutura presente nas cavidades dos ossos e é responsável pela produção de células sanguíneas como os glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas, e é comumente conhecida como tutano. A leucemia linfóide (ou linfoblástica) aguda (LLA) ocorre precisamente nessa região. Ela se caracteriza pela reprodução das células ainda imaturas, denominadas de linfoblastos, que normalmente originariam células sanguíneas linfóides, mas acabam por se multiplicar desordenadamente. A propagação e acúmulo dos blastos, prejudica a produção das células sanguíneas normais causando anemia (pela falta de glóbulos vermelhos), infecções (pela ausência de glóbulos brancos) e hemorragias (pela privação de plaquetas). O tratamento consiste na receita de medicamentos (agentes quimioterápicos) em conjunto, também, com a prevenção das infecções e hemorragias, porém, em alguns casos, é preciso realizar o transplante da medula óssea. Além disso, nas etapas iniciais do tratamento, o paciente recebe transfusões regulares de hemácias e plaquetas enquanto a medula não recupera sua capacidade de produção normal de células sanguíneas (hematopoese) (INCA, 2006; EINSFELDT, 2014)

O agente mais empregado no tratamento da LLA é a enzima L-asparaginase podendo ainda ser ministrado em conjunto com outros agentes quimioterápicos em paralelo. Ela já vem sendo utilizada para o tratamento da leucemia por mais de 30 anos. Porém, apesar da aparente eficácia no controle do câncer, a principal desvantagem reside nos efeitos colaterais causados ao ministrar a forma nativa, tais como: pancreatite, alergias, diabetes, problemas de coagulação, entre outros. Com isso, foram desenvolvidas enzimas conjugadas por esterificação ao polietilenoglicol (PEG) de forma a diminuir os efeitos colaterais causados através da redução de sua resposta imunogênica, possibilitando aumentar a frequência de aplicações do agente quimioterápico (ABUD, 2005; NARTA et al., 2007; DUVAL et al., 2002, VAN DEN BERG, 2011; PIETERS et al., 2011).

## 2.2 L-asparaginase

A enzima L-asparaginase possui a identificação EC 3.5.1.1. Isso significa ser uma enzima que atua por hidrólise nas ligações carbono-nitrogênio de amidas lineares, que não sejam peptídicas. Possui a constituição de um homotetrâmero, que é uma enzima formada pela junção de quatro aglomerados proteicos como exemplificado na Figura 2.1. Essas estruturas são constituídas por aproximadamente 331 tipos de resíduos de aminoácidos, que ao se combinarem formam o aglomerado molecular referente a uma unidade métrica que constitui o tetrâmero da L-asparaginase, sendo essa formação muito semelhante em todos os tipos de L-asparaginases produzidas. Cada unidade apresenta uma massa molar de aproximadamente 37 kDa (SWAIN et al., 1993; YUN et al., 2007; VERMA et al., 2007, NARTA et al., 2007; LUBKOWSKI et al., 1996; MILLER et al., 1993; EINSFELDT, 2014).

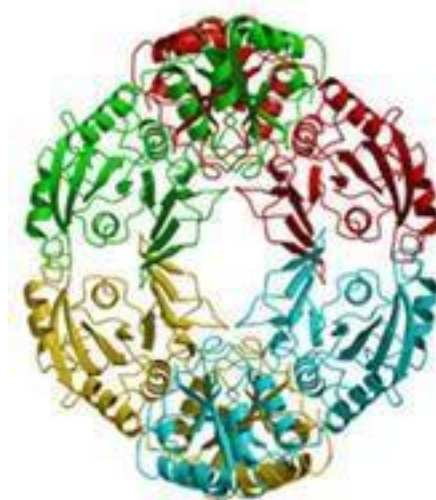


Figura 2.1 – Estrutura da enzima L-asparaginase

Fonte: Yun et al., 2007

### 2.2.1 Descoberta da enzima

A descoberta da L-asparaginase como potencial agente anti-leucêmico começou quando Clementi, por volta de 1922, constatou a alta atividade dessa enzima em soro sanguíneo de porquinhos da Índia devido a desaminação do aminoácido L-asparagina, ao



passo que o soro de outros mamíferos não apresentava o mesmo efeito (NARTA et al.,2007; TOWER et al., 1963; CLEMENTI, 1922). Esse soro encontrado foi ministrado em linfomas de ratos por Kidd por volta de 1953, observando a regressão da doença após aplicada a substancia, o que pôde comprovar a eficácia do uso da L-asparaginase no tratamento do linfoma. Ou seja, ela era eficiente em tratar células linfáticas cancerosas, que é o mesmo caso da LLA. Porém, essa conclusão só foi afirmada em 1961 pelo trabalho de Broome dando continuidade ao trabalho de Kidd, no qual a influência específica da L-asparaginase contida no soro pode ser comprovada, uma vez que a aplicação do soro de outros mamíferos, que não continham L-asparaginase, não surtiu o mesmo efeito antineoplástico nos linfomas que o soro obtido do porquinho-da-índia (MÜLLER E BOSS, 1998; KIDD, 1953; BROOME, 1961). Porém, a extração da enzima em quantidades relevantes de um animal para um tratamento terapêutico é inviável (NARTA et al.,2007). Assim, através do trabalho de alguns autores como Mashburn e Wriston (1964), além de Campbell e Mashburn (1969), foi possível identificar a produção de L-asparaginase por *Escherichia coli* como uma alternativa para a produção mais expressiva da enzima, permitindo estudos clínicos mais aprofundados sobre o assunto (CAMPBELL E MASHBURN, 1969; CAMPBELL et al., 1967; HO et al., 1969; ROBERT et al., 1966).

### **2.2.2 Atuação nos tumores**

A L-asparagina é uma proteína essencial para a manutenção de uma célula e sua síntese proteica. Sua falta causa a inibição da síntese de RNA e das proteínas levando a apoptose celular (morte das células). Em células saudáveis, a L-asparagina é suprida pela enzima L-asparagina sintetase que permite a inclusão de um grupo amina originado da glutamina ao ácido aspártico gerando a molécula de L-asparagina, que é necessária ao metabolismo. Essa enzima é a única forma de síntese de L-asparagina por uma célula. Porém, em células leucêmicas, a ação da L-asparagina sintetase é menor, uma vez que elas não conseguem expressar essa enzima corretamente como fazem as células saudáveis. As células cancerosas acabam por depender da L-asparagina do meio extracelular (disponível às células através da dieta alimentar) para conseguir sobreviver, como observado experimentalmente por Haley et al em 1961. Assim, a teoria por trás do

tratamento da leucemia com L-asparaginase consiste em ministrar essa enzima de forma a extinguir o suprimento de L-asparagina extracelular, matando as células cancerosas pelo desfavorecimento de sua síntese proteica (Figura 2.2). (KUMAR et al., 2013, VERMA et al., 2007, NARTA et al., 2007; MÜLLER E BOSS, 1998)

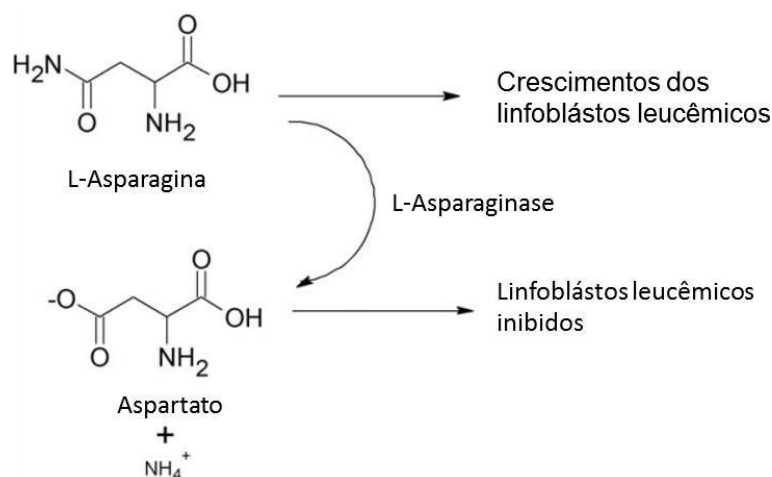


Figura 2.2 – Atuação da L-asparaginase nas células cancerosas

Fonte: Narta et al., 2007

A reação que L-asparaginase catalisa consiste na hidrólise do aminoácido L-asparagina em amônia e aspartato. A Figura 2.3 ilustra o mecanismo de hidrólise através de um ataque nucleofílico (VERMA et al., 2007, NARTA et al., 2007).

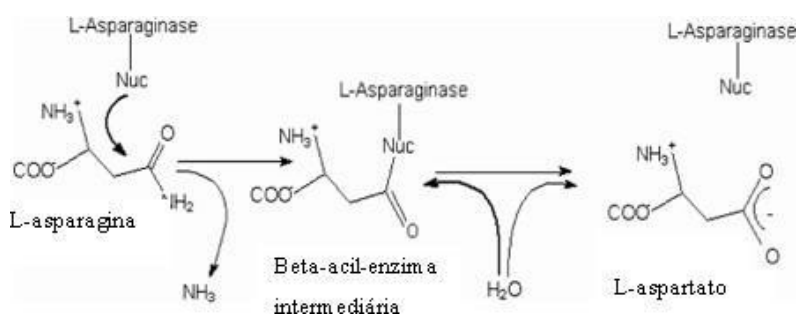


Figura 2.3 - Mecanismo de ação da L-asparaginase

Fonte: Verma et al., 2007

O aspartato pode ser utilizado como fonte para produção de oxalacetato, que é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, ou transformado em arginino-succinato pelo ciclo da uréia, que também acaba por influenciar no ciclo do ácido cítrico, sendo essa relação denominada de lançadeira aspartato-arginino-succinato. O primeiro consiste não só numa das principais etapas do processo oxidativo da matéria orgânica, mas também na produção

de precursores para muitas vias biossintéticas, como a de aminoácidos. Já o segundo, consiste na transformação da amônia produzida pelo metabolismo em ureia, substância menos tóxica para o meio celular. Assim, o aspartato acaba sendo uma das principais fontes para manter não só o balanço do nitrogênio no âmbito celular, como também a formação de aminoácidos para a célula (YUN,2007; NELSON, 2014).

### 2.2.3 Produção nacional e mundial

A L-asparaginase utilizada no Brasil é importada. A empresa que fornecia o medicamento para o Brasil comunicou em 2013 que não atenderia mais o abastecimento vigente. A sua compra era efetuada por serviços do SUS (Sistema Único de Saúde) habilitados em oncologia. Com a declaração do fim do abastecimento, o Ministério da Saúde interveio na compra do medicamento, em parceria com a Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE) por um novo fornecedor, adquirindo estoque suficiente para um ano de uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2013). No mesmo ano, foi cogitado começar a produção da L-asparaginase nacional a partir de 2015 com uma parceria entre a Fiocruz e os laboratórios NT Pharma e Unitec Biotec, porém, em nota divulgada esse ano à imprensa, o Ministério da Saúde afirma não possuir nenhum registro no Brasil da produção de L-asparaginase (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013 e 2017).

A enzima pode ser obtida de fonte bacteriana, de leveduras, fungos, plantas, algas, etc, porém não é toda forma de L-asparaginase que possui atividade anti-leucêmica, como comprovado por Broome (1961). A fonte mais utilizada para a produção da enzima destinada à tratamentos é a bacteriana na qual, alguns tipos que proporcionam atividade antineoplástica são: *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*, *Zymomonas mobilis*, entre outras. (EINSFELDT, 2014; VERMA, 2007; VAN DEN BERG, 2011). Porém, as fontes mais usadas para produção em larga escala para tratamentos de LLA e linfossarcomas são *Erwinia chrysanthemi* e *Escherichia coli*. (KOZAK et al., 2002; KOTZIA e LABROU, 2005)

Apenas a L-asparaginase produzida por *Escherichia coli* é autorizada pela ANVISA para ser utilizada em tratamentos de leucemia no Brasil. Porém, é possível que pacientes desenvolvam quadros de sensibilidade, ao produto derivado desse microorganismo. Um processo judicial deve ser conduzido a fim de aprovar a importação de uma L-asparaginase adquirida de outra fonte, *Erwinia chrysanthemi* por exemplo, caso o paciente apresente algum desses quadros de rejeição (EINSFELDT, 2014).

Os produtos comerciais que contêm a enzima L-asparaginases de *Escherichia coli* que vêm sendo comercializadas normalmente são: Kidrolase® da EUSA Pharma, Elspas® da Ovation Pharmaceuticals, Crasnitin™ da Bayer, Leunase® da Sanofi-aventis, L-asparaginase medac™ da Kyowa Hakko e Elspar® da Merck & Co. A forma peguilada da L-asparaginase produzida pela *E. coli* é comercializada como: Oncaspar™ da Enzon Pharmaceuticals Inc. Já as enzimas geradas pela *Erwinia chrysanthemi* são comercializadas como Erwinase® da EUSA Pharma (PIETERS et al., 2011).

Entre as duas principais formas citadas de obtenção da enzima, a primeira é a recomendada de início por apresentar maior eficiência antineoplástica do que a segunda. Apesar de ambos os tipos apresentarem efeitos colaterais, as enzimas providas por essas duas bactérias possuem efeitos imunogênicos distintos. Portanto, pacientes que desenvolvem sensibilidade a um dos dois possui a alternativa de utilizar o medicamento do outro tipo bacteriano. Caso o paciente desenvolva um quadro de alergia à droga produzida pela *Escherichia coli*, é recomendado o uso do segundo tipo, pois indivíduos que apresentam resposta imunogênica ao primeiro tipo não necessariamente apresentam ao segundo também, além do fato dela possuir efeitos tóxicos mais brandos (DUVAL et al., 2002; KOTZIA e LABROU, 2005).

A produzida por *E. coli* é um homotetrâmero com massa molar de sua subunidade em torno de 32 kDa com ponto isoelétrico na faixa de 4,6 até 5,5, enquanto que a preparada pela *Erwinia* possui massa molar de sua subunidade por volta de 40 kDa com ponto isoelétrico por volta de 8,7 (SANCHES, 2003; NARTA, 2007). Dois tipos de L-asparaginase (I e II) podem ser produzidos pela *E. coli*. O tipo I é expresso no citoplasma e é a mais requerida para o crescimento da bactéria. O tipo II é a reportada como produzida no periplasma da bactéria, espaço entre a membrana da célula e a parede bacteriana, na qual pode ser expressa até, em alguns casos, sob condições anaeróbias e de falta de

nutrientes. O tipo II é provido de alta atividade antineoplástica. Possui alta afinidade pela L-asparagina, com uma constante Michaelis<sup>1</sup> na ordem de grandeza de  $\mu\text{M}$  e maior tempo de permanência no sangue do que a tipo I. O tipo I, aparentemente, não apresenta ação contra as células cancerosas e possui menor afinidade que o outro tipo, apresentando uma constante de Michaelis em torno de 3,5 mM. Por isso, a tipo II é a indicada e utilizada nos tratamentos da leucemia (SANCHES, 2003; YUN, 2007; KUMAR et al., 2013).

Uma estratégia para reduzir os efeitos imunogênicos de um medicamento é a realização do processo de conjugação ao PEG (comumente chamado de peguilação). O PEG é produzido pela polimerização do óxido de etileno usando água ou metanol como agente iniciador. Utilizando o metanol produz-se o metóxi-PEG, caso use a água produzirá o diol PEG. A peguilação corresponde à ligação covalente de uma ou mais moléculas de PEG à substâncias tais como: proteínas, enzimas, fosfolipídeos e fármacos de diversos tipos (MENEGUETTI, 2017). Como dito anteriormente, a principal vantagem da peguilação é diminuir a imunogenicidade da substância que está sendo ministrada. As moléculas de PEG ao serem ligadas às moléculas da substância de interesse, criam uma camada hidrofílica capaz de blindar os sítios imunogênicos da proteína. Além disso, essa camada promove maior solubilidade devido aos grupamentos hidróxi, diminui a agregação por proteases e diminui a perda do composto pela filtração glomerular, resultando, de tudo isso, no aumento do tempo de meia vida da substância peguilada *in vivo* em comparação ao mesmo composto não peguilado (PASUT E VERONETE, 2007; LOUREIRO, 2010; MENEGUETTI, 2017; BARAN et al., 2003).

Com base no que foi dito, percebe-se a importância da produção nacional de L-asparaginase que possua atividade antineoplástica para o tratamento da LLA, não só para eliminar a complicação dos pacientes que desenvolvem sensibilidade a droga já utilizada, mas para eliminar os custos de importação e tornar o tratamento mais acessível.

Uma fonte de produção que está em estudo é o microrganismo *Zymomonas mobilis*. Uma bactéria Gram negativa, anaeróbia e muito estudada com a finalidade de produzir etanol (CAZETTA, 2007). Essa bactéria é objeto de análise no Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE, onde estudos conduzidos

---

<sup>1</sup> Parâmetro obtido da equação de Michaelis-Menten que tem por interpretação o nível de afinidade entre uma enzima e seu substrato. Quanto menor o valor, maior a afinidade (NELSON, 2014)

por Abud (2005), Pinheiro (2001), Einsfeldt (2014) e Mayara (2016) já trataram dos casos relacionados a: fermentação dessa bactéria para a produção da L-asparaginase, modelagem do comportamento cinético de produção da enzima, protocolo de processo e influência das condições de operação na produção da L-asparaginase, além da expressão de clones dessa proteína obtidas de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli* e a modelagem da rede metabólica para esse caso. Uma vez que a *Zymomonas* apresenta baixa produtividade da L-asparaginase, sua produção em *E. coli* foi estudada a fim de melhorar a expressão da enzima, além de permitir expressar também de forma extracelular, o que facilitaria o processo de separação e purificação da L-asparaginase obtida. Além disso, pode ser comprovado que a enzima produzida pela *Zymomonas* possui boa correspondência com a L-asparaginase tipo II da *E. coli* a qual possui comprovada atividade antileucêmica. (EINSFELDT, 2014; WASHINGTON, 2016).

### **2.3 Técnicas de rompimento celular**

A enzima utilizada para purificação pode ser obtida de forma extracelular segundo o trabalho Einsfeldt (2014). Porém, como a L-asparaginase é uma enzima naturalmente sintetizada de forma intracelular pela *Escherichia coli*, é relevante analisar o quanto de material enzimático permanece no meio endógeno ainda para ser purificado. Mesmo o meio intracelular possuindo uma maior quantidade de contaminantes que o extracelular, a possibilidade de obter uma maior concentração de material para ser purificado o tornaria uma alternativa mais viável ao estudo da purificação (CHISTI e YOUNG, 1986; MIDDLEBERG, 1995).

Os métodos de rompimento celular podem ser divididos em: mecânicos (homogeneização a alta pressão/prensa de French, ultrassonificação e moinho de bolas), não mecânicos (choque osmótico, secagem, congelamento e descongelamento), enzimáticos (inibição da produção da parede celular ou lise enzimática) e químicos (ácidos, álcalis, detergentes e solventes) (SCHIMIDELL, 2002; SCHIITTE e KULA, 1993).

Como apenas a homogeneização a alta pressão, a Prensa de French e o ultrassom são utilizadas na presente dissertação, o foco desse capítulo será voltado para essas técnicas.

### 2.3.1 Homogeneização a alta pressão

Geralmente os equipamentos de homogeneização a alta pressão, como a prensa French, são câmaras de determinada geometria conectadas por um canal com espessura muito pequena. A ideia por trás do processo é a passagem da solução por esse orifício a uma determinada pressão. Isso ocasiona tensões de cisalhamento entre as partículas do fluido quando o mesmo passa para uma câmara de baixa pressão e colide com a parede da válvula de operação (Figura 2.4). No caso das suspensões celulares, as células são rompidas pelas forças cisalhantes sem danificar as proteínas em seu interior. É uma técnica escalonável e muito utilizada pela indústria para produzir emulsões. Por não utilizar solventes ou qualquer outro composto químico e nem produzir emissões, é ambientalmente favorável na ruptura celular. A diferença entre a prensa de French e um homogeneizador a alta pressão consiste apenas no funcionamento do equipamento. Mas a ideia central de passar a amostra sob pressão por um orifício se mantém (LEE et al., 2009; LI et al., 2012; MARESCA et al., 2011; SCHULTZ et al., 2004; SCHIITTE e KULA, 1993).

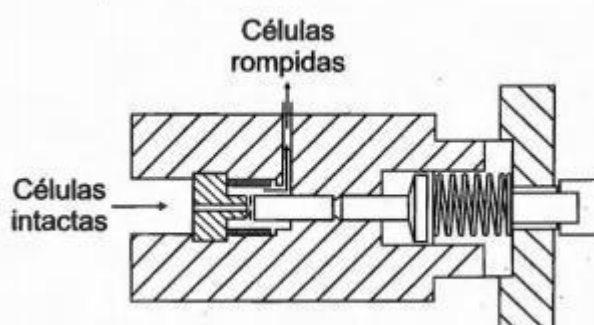


Figura 2.4 - Homogeneizador a alta pressão

Fonte: Schmidell et al., 2001

Alguns fatores que afetam a operação de uma suspensão celular no homogeneizador são: a concentração celular, o tipo de célula, a temperatura de operação,

a pressão de operação e o número de passes pelo equipamento (SCHMIDELL et al., 2001). A liberação de proteínas pode ser equacionada da forma:

$$\log\left(\frac{R_m}{R - R_m}\right) = k(P)^a n \quad (1)$$

Em que:

$R_m$  – concentração de proteínas intracelulares totais (g/L).

$R$  – concentração de proteínas totais (g/L).

$k$  – constante de velocidade que depende da temperatura da suspensão, da concentração celular e do tipo de célula (1/min).

$a$  – constante que é função do tipo de célula do meio e das condições de crescimento celular

$n$  – número de passes

$P$  – pressão de operação

### 2.3.2 Ultrassom

A ultrassonificação consiste na propagação de uma onda sonora de alta frequência (geralmente entre 16 kHz – 100 MHz) por um meio líquido, ocasionando variações na agitação molecular, criando zonas de compressão (maior quantidade de moléculas) e expansão (maior deficiência molecular). A dinâmica entre essas zonas de expansão e compressão, gera o efeito de cavitação (LORIMER E MANSON, 1987; PATRIL E PANDIT, 1987).

O processo de cavitação consiste na repentina queda de pressão em alguns pontos no interior do fluido. Pressão essa, abaixo da pressão de vaporização do fluido para aquela temperatura, formando bolhas que logo são colapsadas sob a pressão da solução circundante. Esse colapso, promove a propagação de uma grande onda de choque na ordem de 10.000 atm através do meio (PAITL e PANDIT, 2007; SILVA, 2002).

Apesar da sua fácil operação em escala laboratorial, essa técnica não é possível de ser escalonável. O que faria o estudo a respeito das condições de rompimento celular de



um material não aproveitáveis para uma futura pesquisa de escalonamento do processo. Além disso, é relatado que a ultrassonificação tem a possibilidade de causar inativação da proteína obtida pela lise celular. Tal fato ocorreria através das forças cisalhantes originados pelas ondas de choque (SINGH, 2013; CHISTI e YOUNG, 1986).

## **2.4 Técnicas de análise da enzima**

### **2.4.1 Análise de concentração proteínas (método de Bradford)**

O ensaio de Bradford é um dos mais utilizados para determinação da quantidade de proteínas uma vez que possui fácil performance, rapidez de análise, alta sensibilidade e especificidade pelas proteínas (ZOR, 1996).

A técnica baseia-se na complexação do reagente Comassie azul G-250 com a proteína alvo de análise. O resultado do procedimento consiste na observação de duas cores diferentes, o vermelho e o azul. O vermelho é característico do reagente puro e o azul aparece após a complexação com a proteína. As interações predominantes entre o reagente e as proteínas são por interações de Van der Waals (dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e forças de dispersão) e interações hidrofóbicas. Os resíduos de arginina são os que apresentam a melhor interação com o reagente, seguido pelos resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina. O processo de coloração é bem rápido (cerca de 2 min) com a durabilidade da cor do complexo em torno de 1 hora. A leitura a uma absorvância de 595 nm em espectrofotômetro contra uma curva de calibração, geralmente obtida com BSA (albumina de soro bovino), no mesmo comprimento de onda, permite a avaliação da quantidade de proteína no meio (ZOR, 1996; BRADFORD, 1976; AZEREDO et al., 2003; BARBARINO e LOURENÇO, 2005; COMPTON e JONES, 1985).

## **2.4.2 Ensaio de atividade enzimática de L-asparaginase**

Como descrito no capítulo 2.2, a L-asparaginase é capaz de liberar amônia como subproduto a partir da sua reação. Portanto, o ensaio para a determinação da atividade dessa enzima se baseia na quantificação de amônio produzida no meio. A atividade é calculada como a unidade internacional de L-asparaginase (UI) dada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de amônia por minuto a 37 °C (GUO et al., 2002; EINSFELDT, 2014). O método de análise utilizado nessa dissertação é baseado no procedimento de Berthelot para quantificação de uréia, com alterações propostas pelo estudo de Tabacco et al. (1979). Tal procedimento se baseia na mistura da solução que contém amônio a ser quantificado com duas soluções, uma contendo hipoclorito e outra contendo nitroprussiato e salicilato. O nitroprussiato tem por função catalisar a formação do complexo indofenol pela reação entre o hipoclorito, salicilato e os íons amônio. O indofenol possui absorvidade a 600 nm, permitindo sua quantificação e, por conseguinte, a quantificação de amônio por espectrofotômetro, uma vez que a relação entre o indofenol e amônio é de um para um. A solução de indofenol possui coloração esverdeada, o que permite observar qualitativamente a presença de amônio em uma amostra (ROCHA, 1989; TABACCO et al., 1979; BOWER & HOLM-HANSEN, 1980).

## **2.4.3 Eletroforese**

A eletroforese é fundamentada na aplicação de um campo elétrico na amostra, na qual a presença de grupos iônicos na molécula de interesse, considerando estar na forma de uma espécie carregada, permitirá que o composto sofra atração na direção positiva ou negativa do campo, ocasionando o deslocamento do mesmo através da solução em direção ao polo atrator. A sua forma mais conhecida é a feita em gel com SDS (dodecilsulfato de sódio), na qual o meio geralmente utilizado é um gel de poliacrilamida, agarose ou amido, que funciona como uma matriz inerte por onde as moléculas irão migrar. O gel pode ser preparado de modo a dificultar a migração das moléculas proteicas de interesse devido a uma malha de cadeias de espaçamento suficientemente pequeno. Já o SDS, por ser um surfactante aniônico, se liga às proteínas ocasionando o

desdobrando de sua estrutura molecular (desnaturação), em que a carga negativa cedida pelo detergente supera a carga intrínseca da proteína a qual está ligada. Cada proteína se liga a mesma quantidade de SDS e as estruturas dos complexos proteína-SDS são os mesmos, já que as proteínas estão desnaturadas e suas estruturas tridimensionais não são mais relevantes. Assim, a migração do complexo carregado pela rede molecular do gel ocorrerá apenas em função do tamanho molecular da proteína. Proteínas maiores percorrerão distâncias menores num mesmo intervalo de tempo comparado a moléculas menores, permitindo identificar as massas molares dos compostos presentes pela distância percorrida. Corantes como azul de Coomassie são usados no gel para revelar a banda de proteínas formadas pela eletroforese (ALBERT et al., 2010; JANSON, 2011; COELHO et al., 2008).

#### **2.4.3.1 Géis bidimensionais**

Consiste, assim como na eletroforese, na aplicação de um campo elétrico que causa a migração molecular pela carga das moléculas. Porém, uma etapa preliminar denominada de enfoque isoeletrico é efetuada, em que o meio possui um determinado gradiente de pH formado por uma mistura especial de tampões. Com isso, essa primeira etapa se baseia na separação dos componentes da amostra pela diferença de pontos isoeletricos. Uma vez que uma molécula carregada negativamente, por exemplo, migra para o catodo, ela cessará seu movimento no instante em que passar pela região que possua o pH correspondente ao seu ponto isoeletrico. Isso ocorre devido a proteína não apresentar carga líquida no seu ponto isoeletrico, encerrando a força motriz eletrostática sobre ela. Geralmente o meio utilizado consiste num surfactante não iônico, como o  $\beta$ -mercaptoetanol, ureia como agente desnaturante e um gel como matriz. Após a separação preliminar, é efetuada a eletroforese convencional com o mesmo gel, mas agora com SDS como surfactante. Nessa segunda etapa, a eletroforese é realizada numa direção perpendicular à primeira etapa, em que a separação será baseada na massa molar dos componentes (COELHO et al., 2008; ALBERT et al., 2010)

Figura 2.5 exemplifica a primeira etapa da separação por géis bidimensionais.

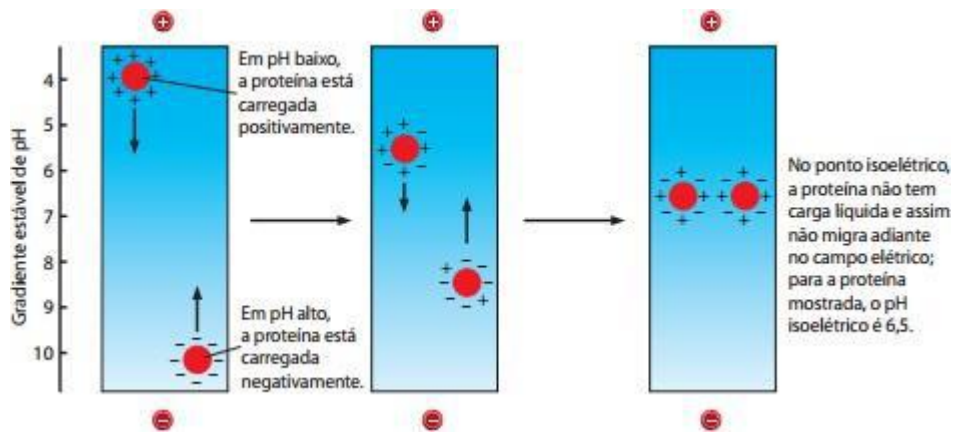


Figura 2.5 - Primeira etapa da purificação por géis bidimensionais

Fonte: ALBERT et al., 2010.

### 2.4.3.2 Immunoblotting

Após o processo de eletroforese, é possível a caracterização das bandas geradas no decorrer da operação. Isso pode ser feito através da eluição de uma determinada banda proteica diretamente em uma solução ou a transferência da mesma para uma membrana. O segundo caso é chamado de *blotting*. Ele consiste na transferência das frações proteicas para uma membrana imobilizada de forma que elas fiquem disponíveis para interações com espécies macromoleculares, como antígenos e anticorpos, que serão responsáveis por selecionar apenas as proteínas de interesse (JANSON, 2011). O método começou com os estudos de Southern (1975), no qual foi realizada a transferência de fragmentos de DNA de um gel de poliacrilamida de uma eletroforese para uma membrana de nitrato de celulose, onde os fragmentos de interesse eram reconhecidos por um processo de hibridização. O processo foi batizado de *Southern blotting*. O mesmo método aplicado agora para fragmentos de RNA ficou conhecido como *Nothern blotting*. Ambos processos se basearam na transferência de moléculas do gel para a membrana através de forças capilares ou vácuo. Em seguida, o trabalho de Towbin et al. (1979), foi capaz de realizar o mesmo procedimento utilizando uma forma de detecção imunológica aliado a forma de transferência eletroforética das moléculas entre o gel e a membrana. Tal procedimento foi batizado de *Western blotting* (SOUHTERN, 1975; ALWINE et al., 1977; TOWBIN et al., 1979; KURIEN e SCOFIELD, 2005; JANSON, 2011).

O procedimento ocorre primeiramente pela transferência das proteínas do gel para a membrana que comumente é executado de forma eletroforética, como exemplificado na Figura 2.5. O complexo proteína-SDS de carga negativa são conduzidas na direção do anodo. Nesse caminho ele encontrará e ficara aderido a membrana utilizada. Em seguida é utilizada uma solução de bloqueio para justamente bloquear os sítios não específicos que não foram ligados a proteínas e não comprometer a análise do processo. A aplicação do anticorpo para a proteína desejada se ligará apenas a ela. Um segundo anticorpo é utilizado de modo a detectar o primeiro anticorpo, o que será responsável pela detecção da proteína. (BEISIEGE et al., 1986; TOWBIN E GORDON, 1984; JANSON, 2011).

## **2.5 Cromatografia**

A cromatografia realiza a separação de componentes de uma mistura com base na diferença de velocidade de percolação dos mesmos por uma matriz cromatográfica. Tal diferença é função das interações dessas espécies com essa matriz. Ela pode ser planar ou em coluna. A planar apresenta a fase estacionária suportada em uma placa plana e a fase móvel desloca-se pela força da gravidade ou pela ação de capilaridade. Já a em coluna, a fase estacionária é confinada sob pressão em um tubo com a fase móvel percolando pela mesma sob a aplicação de pressão ou pela força da gravidade apenas (SKOOG, 2009).

Os dois principais tipos de cromatografia em coluna é a gasosa e a líquida, na qual a líquida pode ser subdividida em troca iônica, exclusão por tamanho, por partição, por adsorção e por afinidade. Porém as mais utilizadas para purificação de proteínas são as por exclusão de tamanho, iônica e por afinidade (SKOOG, 2009; JANSON, 2011).

### **2.5.1 Cromatografia por exclusão de tamanho**

A cromatografia por exclusão de tamanho é caracterizada pela utilização de um gel como leito de matriz porosa de forma a selecionar as moléculas que o permeiam através de seus tamanhos já em uma solução. O gel é composto por partículas esféricas porosas. Poros esses, onde moléculas suficientemente pequenas podem adentrar, passando a se mover mais lentamente, enquanto que moléculas maiores, que não entraram nesses poros, movem-se mais rápido acompanhando a velocidade da solução, passando entre as esferas e saindo primeiro do que as menores da coluna cromatográfica. O tempo de residência do analito retido na rede de poros dependerá do seu tamanho. Portanto, acaba sendo, também, um método de determinação do tamanho de moléculas. Por isso, um dos nomes pela qual é conhecida é justamente cromatografia por exclusão de tamanho. Possíveis interações do soluto com a matriz podem prejudicar o processo de separação uma vez que ele se baseia apenas na diferenciação de tamanhos dos componentes. Caso o recheio seja constituído de um componente hidrofílico o processo pode ser denominado como filtração em gel e a fase móvel normalmente utilizada é de espécies polares, se for hidrofóbico pode ser chamado de permeação em gel e a fase móvel é predominantemente não-polar (COELHO et al., 2008; ALBERT et al., 2010; JANSON, 2011, SKOOG, 2009)

### **2.5.2 Cromatografia por troca iônica**

Se baseia na interação eletrostática entre a molécula alvo da separação e um grupamento carregado que foi adicionado a um determinado suporte na coluna cromatográfica, na qual a interação entre ambos é dependente de propriedades como pH, temperatura, tipo de tampão e da força iônica do meio, em que os principais tipos de resinas utilizadas são argilas e zeólitas. Essa dependência ocorre devido ao fato dessas propriedades poderem afetar não só o ponto isoelétrico e o potencial zeta da molécula desejada, mas também de influenciar na ativação do grupo iônico no suporte, definindo,

assim, a carga elétrica do mesmo, podendo facilitar ou prejudicar o processo de separação (COELHO et al., 2008; ALBERT et al., 2010; JANSON, 2011, SKOOG, 2009).

As resinas podem ser trocadoras de cátions, que contem grupos ácidos ou de ânions que contém grupos básicos, em que ambos os tipos podem ser fortes ou fracos. Grupos ácidos fortes são constituídos por grupamentos sulfônicos (-SO<sub>3</sub>H) e os fracos geralmente por grupos carboxílicos (-COOH). Já os básicos fortes são normalmente constituídos de grupos amínicos quaternários (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OH) enquanto os fracos são formados por grupamentos amínicos secundários e terciários.(SKOOG, 2009)

Porém, para uma mistura complexa de proteínas, os métodos cromatográficos citados não apresentam alta capacidade de purificação, sendo necessário utilizar, normalmente, mais de uma coluna em série, do mesmo tipo ou de tipos diferentes, para alcançar a pureza desejada (ALBERT et al., 2010). Nesse ponto, recorre-se a cromatografia por afinidade como um dos melhores métodos para purificação de proteínas (UEDA et al., 2003).

### **2.5.3 Cromatografia por afinidade**

Cromatografia por afinidade se baseia na teoria de que cada molécula possui um determinado sítio de reconhecimento que pode se ligar a outros sítios ou moléculas artificiais ou naturais. Ou seja, se resume ao processo de reconhecimento molecular entre duas substâncias, permitindo a adesão e eventual separação, do composto ligado, da sua mistura original (MAGDELDIN e MOSER, 2012). Do ponto de vista biológico, está relacionado a ligações e interações moleculares muito específicas tais como: enzima e substrato, ligante e receptor, ou anticorpo e antígeno. Assim, é necessário um conhecimento da natureza dos tipos de ligação e interação que a molécula alvo (que se deseja separar) permite realizar, de modo a selecionar o ligante com maior afinidade. É justamente essa alta seletividade entre ambos que permite um processo de separação rápido e com capacidade de purificação de 100 a 1000 vezes maior que processos convencionais. O nível de especificidade é tal, que é possível separar tipos de proteínas com atividades biológicas distintas, como, por exemplo, a forma nativa de uma proteína da sua forma inativa. (URTH et al., 2009; SCHMITT et al., 1993).

Segundo Magdeldin e Moser (2012), o processo ocorre pelas seguintes etapas:

- 1- Incubação da amostra com a moléculas que se deseja separa com o suporte estacionário contendo o ligante a fim de que possa haver a união de ambos.
- 2- Lavagem do resto da amostra onde se encontram os componentes não ligantes.
- 3- Eluição da molécula ligada pela alteração das condições em que o sistema se encontra de modo a desfavorecer a ligação para com o suporte ligante.

A cromatografia por afinidade começou por volta de 1951 com a publicação de Emil Starkenstein que analisou a interação de macromoléculas com uma fase imobilizada de um substrato. As macromoléculas eram enzimas do tipo amilase e o substrato, uma fase insolúvel de amido. Porém, o desenvolvimento do processo começou quando alguns autores como: Campbell et al. (1951), Lerman (1953), Arsenis & McCormick (1966), Bautz & Hall (1962), Cuatrecasas et al. (1968) desenvolveram tipos de suportes para a fase estacionária além de estudar a química por trás das interações com a mesma, tudo a fim de melhorar as condições de separação do processo, sendo o último deles o que introduziu o termo cromatografia por afinidade (MAGDELDIN e MOSER, 2012; URTH et al., 2009; CUATRECASAS, 1970).

Por volta de 1970 Porath et al., introduziram um novo tipo de cromatografia chamada de cromatografia por metal quelante, que algum tempo depois foi rebatizada como cromatografia por afinidade por metal imobilizado. Atualmente, o conjunto de ligantes mais utilizados para realizar o processo é a interação entre um metal de transição e uma sequência de aminoácidos de histidina acoplado a proteína alvo da purificação chamado de cauda de histidina (UEDA et al., 2003; PORATH et al., 1975).

A Figura 2.6 exemplifica os três tipos de cromatografia mais utilizados que foram citados: troca iônica, gel-filtração e por afinidade.



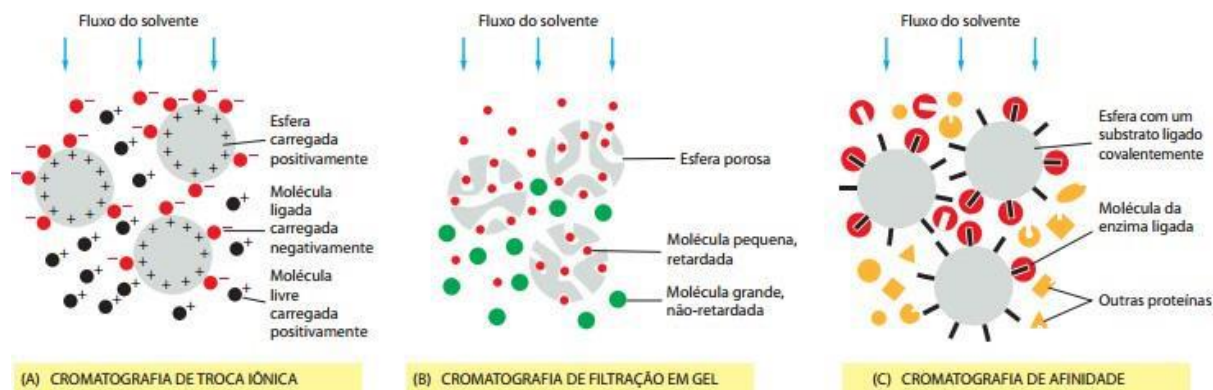


Figura 2.6 - Exemplos de cromatografia na separação de proteínas

Fonte: ALBERT et al., 2010.

### 2.5.3.1 Histidina

A histidina representa um dos 20 aminoácidos essenciais para a constituição de qualquer proteína (Figura 2.7). Possui três valores de  $pK_a$  diferentes correspondentes a três grupamentos característicos da sua molécula nos quais,  $pK_a = 1,8$  para o grupamento (-COOH),  $pK_a = 6,0$  para o anel de imidazol e  $pK_a = 9,2$  para o grupamento (-NH<sub>2</sub>). É caracterizada como grupo R carregado positivamente, uma vez que o grupo R considerado (o grupo imidazol) possui carga negativa para pH acima de 7. Além disso, proteínas com resíduos de histidina constituem em tampão eficientes próximo ao pH neutro (NELSON, 2014).

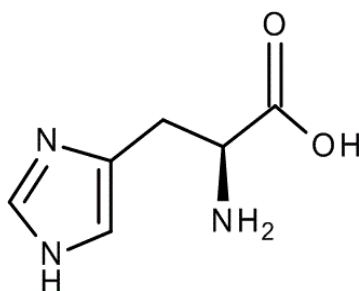


Figura 2.7 - Molécula de histidina

Fonte: Merkmilipore, 2017.

A histidina é o aminoácido que possui a capacidade de realizar as ligações mais fortes com metais em colunas de afinidade, em relação a qualquer outro aminoácido

hidrolisado que possa estar presente no meio. A interação ocorre através da doação de elétrons do nitrogênio presente no anel de imidazol, efetuando a coordenação com o metal de transição (PORATH, 1992; BORNHORST E FALKE, 2000).

É comum utilizar uma cadeia de 6 resíduos de histidina como primeira tentativa para a purificação. Cadeias mais longas podem prejudicar a funcionalidade da proteína, apesar de serem capazes de melhorar a purificação. Porém, devido ao relativo pequeno tamanho e carga da cauda de histidina, é considerado que a atividade da proteína alvo da purificação raramente é afetada (BORNHORST E FALKE, 2000; CROWE et al., 1994).

É possível utilizar engenharia genética de modo a implementar a sequência de histidinas. O aparecimento dela na molécula se deve a modificação do gene responsável por produzir a proteína alvo, de modo a produzir também a cauda de histidina acoplada a essa molécula, como um marcador especial, que servirá para separá-la do resto da mistura complexa formada pela célula produtora. Por exemplo, para o caso das proteínas da *Escherichia coli*, por não possuírem afinidade natural com espécies metálicas, é possível ligar caudas de histidina às proteínas de interesse, de modo que seja possível efetuar a separação pela cromatografia de afinidade por metal. E ainda, para refinar o processo de purificação, ainda é possível inserir uma sequência de aminoácidos, que possui um sítio de clivagem específico para enzimas proteolíticas, entre a estrutura molecular da proteína de interesse e a cauda de histidina. Com isso, seria possível, após a purificação, remover a molécula do marcador pela clivagem dessa proteína adicionada, sem danificar a molécula alvo (ALBERT et al., 2010; UEDA et al., 2003; KEELE et al., 1970).

Geralmente a cauda de histidina é acoplada ao nitrogênio ou carbono terminal da proteína alvo. Porém, devido a configuração entrelaçada das proteínas, é possível que toda a cadeia de histidina fique impedida de realizar sua interação com o metal da coluna. Isso pode ser solucionado realizando a purificação sob condições de desnaturação da proteína para que a cauda de histidina fique acessível a coordenação com o metal (BORNHORST E FALKE, 2000; CROWE et al., 1994).

Como regra geral, recomenda-se sempre realizar o processo de purificação por afinidade com cauda de histidina num pH acima do pKa da histidina. Assim, a desprotonação dos grupamentos de imidazol aumentará a força de interação com o íon

metálico e evitará o aparecimento de forças repulsivas entre ambos, o que prejudicaria o processo (SUEN et al., 2004).

### **2.5.3.2 Ligações quelantes**

A ligação dos metais a estrutura da torre cromatográfica se dá através de ligações quelantes. As ligações quelantes constituem de ligações coordenadas em que grupamentos doadores de elétrons se ligam à um mesmo cátion metálico formando um composto de coordenação, gerando, muitas vezes, anéis heterocíclicos. Os ligantes quelatos influenciam na retenção das proteínas nas colunas. Por isso, a escolha do agente quelante deve ser realizada de modo a combinação entre o mesmo e os íons possam favorecer a seletividade e eficiência da coluna de separação. O uso mais comum consiste na coordenação de compostos tridentados como o ácido imunodiacético (IDA) e o ácido aminohidroxâmico, porém é possível utilizar grupos quelantes: tridentados, como o dipicolilamina; tetradentados, como o ácido aspártico carboximetilado e o ácido nitrotriacético (INA); e pentadentados, como o N,N,N-tris(carboximetil) etilenodiamina. Os compostos quelantes dos metais utilizados nas colunas por afinidade são estáveis em uma grande variedade de solventes e grande faixa de temperatura, tornando-os possíveis de serem reutilizados por um bom tempo sem a perda da sua performance (SUN et al., 2005; BLOCK et al., 2009; PORATH et al., 1975; CHEUNG et al., 2012; ARNOLD, 1991; SKOOG, 2009).

Para exemplificar a influência do tipo de composto quelante, comparando o composto tris(carboximetil) etilenodiamina (TED) e o IDA. A interação da proteína alvo de separação com o complexo de TED-Ni é mais fraca do que com a IDA-Ni já que o TED faz coordenação com 5 sítios do níquel, deixando só 1 para interação com a proteína, enquanto que com IDA, ela faz só com 3 sítios, deixando os outros 3 para interação com a proteína (JANSON, 2011).

A Figura 2.8 representa a interação do metal níquel com as valências livres dos nitrogênios dos anéis de imidazol disponíveis na cauda de histidina, em que o suporte apresenta a ligação quelante tridentada do níquel com o ácido imunodiacético em dois

oxigênios carboxilados e um nitrogênio. Como o níquel é capaz de realizar até seis ligações, duas são para os nitrogênios aromáticos da histidina e o sítio de coordenação restante pode ser ocupado por uma molécula de água do meio (BLOCK et al., 2009; ARNOLD,1991).

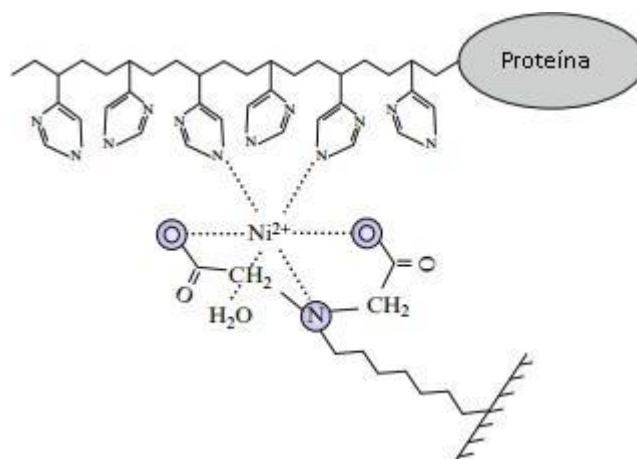


Figura 2.8 - Interação entre o níquel e a histidina

Fonte: Modificado de BLOCK et al., 2009

A prioridade para a ligação dos metais segue a preferência de acordo com a classificação determinada por Pearson (1968) a qual se baseia na teoria de Lewis sobre ácidos e bases, porém agora aplicada a estabilidade de complexos, denominada de Princípio dos Ácidos e Bases Duros e Macios. Ele dividiu as espécies em compostos ácidos ou básicos duros, intermediários ou macios. Essa separação é de acordo com sua reatividade preferencial por nucleófilos e pela capacidade de polarização da nuvem eletrônica das espécies, na qual ácidos duros têm preferência por bases duras e ácidos macios têm preferência por bases macias. Preferência essa relativa a estabilidade do complexo formado, ácidos duros formam complexos mais estáveis com bases duras, ácidos macios com bases macias. Ácidos duros como os metais  $K^{+1}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Yb^{+3}$  e  $Al^{+3}$  apresentam melhor coordenação com bases do tipo  $OH^{-}$  e  $CH_3CO_2^{-}$ . Ácidos macios como os metais  $Cu^{+}$ ,  $Hg^{+2}$  e  $Ag^{+1}$  preferem coordenar-se com bases do tipo  $R_2S$ ,  $RSH$  e  $RS^{-}$ . Já os compostos considerados intermediários como os metais  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  e  $Co^{+2}$  preferem ligar-se a moléculas do tipo N, O e S (SUN et al., 2005; UEDA et al., 2003; PEARSON, 1968).

O mais usado desses metais para coluna de afinidade é o  $\text{Ni}^{+2}$  por apresentar estabilidade eletroquímica e redox nas condições do processo cromatográfico além de possuir polarizabilidade referente a um metal intermediário da classificação Pearson, o que faz ser ideal para interações com bases intermediárias como átomos de nitrogênio aromático, que é o caso da histidina. Além disso, a histidina é o amino ácido que possui maior afinidade com íons metálicos, tornando a dupla histidina- $\text{Ni}^{+2}$ , como dito anteriormente, uma das mais usada para purificação por cromatografia por afinidade (UEDA et al., 2003; SUN et al., 2005).

A seletividade da interação níquel e histidina é de tal modo que permite que proteínas que possuam purificação menor que 1% consigam alcançar uma purificação maior que 95% em apenas uma etapa (CROWE et al., 1994).

Apesar da ordem de força de retenção de proteínas para os metais intermediário ser  $\text{Cu}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Zn}^{+2} \sim \text{Co}^{+2}$ , o que faria do  $\text{Cu}^{+2}$  a melhor opção, o maior poder de retenção também significa maior possibilidade de capturar impurezas. Portanto, costuma-se utilizar mais os íons  $\text{Ni}^{+2}$  pela alta capacidade de interação e menor captura de impurezas (UEDA et al., 2003; SUN et al., 2005; ARNOLD, 1991; KAGEDAL, 2011).

As colunas de cromatografia por afinidade podem ser regeneradas uma centena de vezes sem que haja a perda de suas propriedades cromatográficas. Porém, também é possível retirar os metais da coluna na maioria dos casos. Basta realizar uma eluição com uma solução de EDTA 0,05-1 M em pH 7-8, a qual também pode resgatar alguma proteína que ainda possa ter ficado adsorvida após a etapa de recuperação. Além disso, a cromatografia por afinidade é facilmente escalonada e reproduzível, caso haja interesse em aplicações industriais (PORATH, 1992; UEDA et al., 2003).

Apesar de todas as vantagens apresentadas para esse tipo de cromatografia, um problema importante relacionado a ela é a transferência do íon metálico para fora da matriz fixa. Isso, obviamente, acarreta a perda de proteínas na separação e ao baixo rendimento da mesma. Porém, a maior preocupação desse caso reside no fato dele ocorrer pela proteína alvo de separação possuir maior afinidade com o metal do que a estrutura fixa que o retém, ocasionando, a transferência do íon metálico para a estrutura proteica. Esse incidente pode levar não só a perda de atividade da proteína como a contaminação

da mesma por um metal pesado. Visto que muitas proteínas possuem finalidade terapêutica, o que seria o caso da L-asparaginase, e os metais mais utilizados são  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Co}^{+2}$ , haveria a contaminação do medicamento com componentes conhecidamente carcinogênicos (UEDA et al., 2003; PORATH, 1992; SULKOWSKI, 1989).

Um das causas do processo de transferência do íon metálico é a presença de grupos tiol, encontrados na cisteína, que favorecem a captura dos íons metálicos. Além disso, o pH do meio, por influenciar no potencial das proteínas, acaba também por influenciar na possibilidade de captura de íons. Para o caso da histidina, por exemplo, é relatado que um valor de pH acima do pKa da proteína, por volta de 6,5, pode influenciar na captura de íons. Uma das formas de evitar esse efeito indesejado seria utilizar compostos quelantes com ligações mais fortes do que os normalmente utilizados, IDA e INA, como por exemplo o tris(carboximetil) etilenodiamina (TED) (UEDA et al., 2003; SULKOWSKI, 1989; WU et al., 1995).

Um tipo especial de cromatografia por afinidade é a cromatografia por imonosorção que se baseia na interação entre um antígeno e um anticorpo para realizar a separação. A maior vantagem desse tipo de cromatografia é a alta especificidade dos ligantes, uma vez um determinado anticorpo realizará interação apenas com a proteína correspondente, a qual pode não possuir mais nenhuma interação complementar com outra substância além desse anticorpo. O tipo de anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal, sendo o monoclonal o mais utilizado (JANSON, 2011)

Anticorpos monoclonais são aqueles que reconhecem apenas um tipo específico de sítio no antígeno. Eles são produzidos em grande quantidade por linhagens de linfócitos B híbridos chamados hibridomas (ALBERT et al., 2010)

A capacidade de interação do tipo monoclonal é pelo menos 10 vezes maior do que o policlonal. Porém esse tipo de cromatografia tem um alto custo, sendo normalmente utilizado com colunas pequenas onde são feitos muitos ciclos, além da possibilidade de desnaturação, degradação proteolítica e de entupimentos (por biopolímeros e lipídeos). Problemas esses, que podem ser prevenidos utilizando uma etapa de purificação preliminar dos extratos a serem utilizados (JANSON, 2011).

Apesar da forma mais comum de utilizar a purificação por afinidade com metais seja pela cromatografia, também é possível utilizar o metal em sua estrutura fixa diretamente na solução que contém a proteína alvo. Um exemplo, é o trabalho de Yao (2015) o qual utilizou a hidroxiapatita como fase fixa para inserir os sítios metálicos de Ni (II). A estrutura foi preparada na forma de nanopartículas, as quais eram adicionadas na solução que continha a proteína a ser removida e, sob agitação do sistema, realizavam a sua adsorção.

A eluição de proteína vinculadas aos metais na coluna, a fim de recuperá-las após a separação, é realizada por ácidos de Lewis, como  $Zn^{+2}$  ou  $H^+$ , que irão competir para se ligar a proteína no lugar do metal, ou por bases de Lewis, como moléculas de imidazol, que irão competir para se ligar aos metais ao invés das proteínas. Na maioria das cromatografias de afinidade, a concentração de imidazol é o fator que permite determinar a interação dos compostos no meio com a matriz da coluna, já que o par de elétrons do nitrogênio do imidazol possuem forte interação com os orbitais de níquel. Quanto maior a concentração de imidazol menor será a interação com qualquer outro componente do meio. Como a cauda de histidina apresenta uma cadeia de radicais imidazol na composição, ela possui uma interação muito forte com os sítios de níquel na matriz, a ponto de, em determinadas concentrações, poder ser mais favorável do que o imidazol puro. Assim, é comum testar concentrações de imidazol na etapa de ligação de forma a verificar em que concentração a enzima conseguiria se ligar a coluna. (ARNOLD,1991).

## 2.6 Análise estatística

Muitas vezes é necessária a comparação de um valor obtido, com um outro valor de referência, que pode vir a ser um dado obtido de forma teórica, um valor de referência para se tomar uma decisão ou até um valor obtido por experiência. Nesse caso é necessário usar um teste de hipótese para observar a semelhança dos dados a serem comparados. Para tal, duas hipóteses são sempre adotadas, a hipótese nula ( $H_0$ ) e a hipótese alternativa ( $H_a$ ). Ao considerar, por exemplo, que se deseja comparar a média de uma população ( $\mu$ ) com um valor de referência ( $\mu_0$ ), a hipótese nula  $H_0$  afirma sempre que  $\mu = \mu_0$ . Já a hipótese alternativa  $H_a$  pode assumir diferentes formas, tais como:  $\mu > \mu_0$ ;

$\mu < \mu_0$ ;  $\mu > \mu_0$  ou  $\mu \neq \mu_0$ . Tudo depende do tipo de análise que se deseja fazer (SOOKG, 2009; SCHWAAB & PINTO, 2007).

Para determinar qual hipótese deve ser aceita precisa-se estipular um teste estatístico adequado para a comparação e uma margem de rejeição. A região de rejeição é dada pelos valores obtidos pelo teste estatístico que fariam a hipótese nula  $H_0$  ser considerada errada. Tal região é determinada pelo nível de confiança que se deseja adotar para o teste estatístico. O mais utilizado é o nível de confiança de 95%. Quanto maior o nível de confiança, mais difícil de o teste estatístico gerar valores que rejeitam a hipótese nula. Porém, caso isso aconteça, o fato da hipótese nula ser rejeitada é mais confiável do que em níveis de confiança menores. Mas, como a rejeição, ou não, é uma probabilidade, poderia ocorrer de estar errada. Tal fato pode acontecer por algum dado incomum que faça o teste estatístico entrar na região de rejeição indevidamente. Caso a hipótese nula seja considerada falsa quando deveria ser verdadeira é chamado de erro tipo I. Para o caso de aceitar a hipótese nula como verdadeira quando ela é falsa é chamado de erro tipo II. O nível de confiança é geralmente caracterizado pelo p-valor. (SOOKG, 2009; SCHWAAB & PINTO, 2007).

O p-valor é considerado como a probabilidade de acontecer erro tipo I num conjunto de dados. Ou seja, é a chance de duas amostras retiradas da mesma população serem consideradas de diferentes populações quando na verdade são da mesma população. Assim, para um  $p=0,05$ , por exemplo, há 5% de chance de duas amostras serem consideradas diferentes mesmo que tenham saído da mesma população (FILHO, 2003). O p-valor é calculado em função do grau de liberdade e da distribuição da função estatística que estiver sendo usada. Está intimamente conectado ao intervalo de confiança escolhido para ser adotado pelo experimentador. Para o caso de  $p=0,05$ , significa escolher um nível de confiança de 95%, o mais usual. Escolher um intervalo de confiança, por exemplo 95%, significa dizer que a curva de distribuição de probabilidade do teste estatístico utilizado apresenta 95% dos seus resultados considerados aceitáveis e, portanto, 5% são considerados descartáveis e menos prováveis de ocorrer. Pela curva de distribuição de probabilidade, 2,5% dos resultados descartáveis estão presentes na região superior e 2,5% na região inferior da curva (SCHWAAB & PINTO, 2007).



## 2.6.1 ANOVA

Para a comparação entre médias de grupos de dados é geralmente efetuada uma análise de variância (ANOVA). A ANOVA é um método empregado para determinar se há diferença entre as médias de populações. A hipótese nula para esse método é adotada como a médias dos grupos observados serem iguais:  $H_0: \mu = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_N$  para um conjunto de N grupos. Já a hipótese alternativa normalmente considerada é o exato oposto da hipótese nula, em que todos as médias das populações são consideradas diferentes:  $H_a: \mu \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \dots \neq \mu_N$  (ANDERSON, 2001; SKOOG, 2009).

O teste estatístico adotado pela análise ANOVA é o teste F que consiste em comparar a variância de um conjunto de dados com a variância de outro conjunto de dados. De forma geral, ao considerar um conjunto de dados para as variáveis x e y, o teste F é calculado pela razão das variâncias dos conjuntos comparados (1) (ANDERSON, 2001; SILVA 2010, FARIAS, 2017; SKOOG, 2009).

$$F = \frac{\left(\frac{s_x^2}{\sigma_x^2}\right)}{\left(\frac{s_y^2}{\sigma_y^2}\right)} \quad (1)$$

Em que:

$\sigma_x^2$ : variância da variável x

$\sigma_y^2$ : variância da variável y

$s_x^2$ : variância amostral da variável x

$s_y^2$ : variância amostral da variável y

O teste F considera a hipótese nula como a igualdade entre as variâncias das populações comparadas e a hipótese alternativa como a desigualdade:  $H_0: \sigma = \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \dots = \sigma_N$ ;  $H_a: \sigma \neq \sigma_1 \neq \sigma_2 \neq \sigma_3 \neq \dots \neq \sigma_N$ . Porém, para ser usado na ANOVA o teste F é calculado por (2) (FARIAS, 2017).

$$F = \frac{MQA}{MQE} \quad (2)$$

Em que:

-MQF: valor médio quadrado devido aos níveis do fator (variável de entrada)

- MQE: valor médio quadrado do erro

Os valores médios quadrados são dados pelas expressões:

$$MQF = \frac{SQF}{I - 1} \quad (3)$$

$$MQE = \frac{SQE}{N - I} \quad (4)$$

Em que:

-SQF: soma dos quadrados devido ao fator

-SQE: soma dos quadrados devido ao erro

-N: número total de medidas efetuadas

-I: número de populações estudadas ou número de médias

Por sua vez, a soma dos quadrados é representada pelas equações:

$$SQF = N_1 (\bar{x}_1 - \bar{x})^2 + N_2 (\bar{x}_2 - \bar{x})^2 + N_3 (\bar{x}_3 - \bar{x})^2 + \dots + N_I (\bar{x}_I - \bar{x})^2 \quad (5)$$

$$SQE = (N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2 + (N_3 - 1)s_3^2 + \dots + (N_I - 1)s_I^2 \quad (6)$$

Em que:

-  $N_I$ : o número de medidas do grupo I

-  $\bar{x}_I$ : a média do grupo I

-  $\bar{x}$ : a média global dos grupos

-  $s_I^2$ : variância do grupo I

A confirmação, ou não, da hipótese nula da ANOVA é realizada através da comparação do valor de F obtido pelas fórmulas acima com o valor crítico de F. O valor

crítico é tabelado em função do nível de significância adotado, geralmente 95%, e os graus de liberdade I-1 e N-I. Caso o valor calculado seja maior que o valor crítico a hipótese nula é rejeitada. Caso o valor calculado seja menor, a hipótese nula é aceita (SKOOG, 2009).

Ainda é possível fazer a mesma interpretação anterior calculando o p-valor usando a função de distribuição de probabilidade de F. Tal valor é tabelado em função do nível de confiança e grau de liberdade. Todo teste estatístico pode ter o p-valor tabelado se é determinada a função de distribuição de probabilidade. Assim, caso o valor calculado para p-valor for maior do que o considerado para o nível de significância determinado, por exemplo p=0,05 para 95%, a hipótese nula é rejeitada. Para o caso do teste F, por exemplo, a função de distribuição é dada pela equação (7) em que  $v_1$  e  $v_2$  são os graus de liberdade do numerador e denominador, respectivamente (DEMSAR, 2006; SCHWAAB & PINTO, 2007).

$$p(F) = F(F; v_1, v_2) = \frac{\Gamma\left(\frac{v_1 + v_2}{2}\right)}{\Gamma\left(\frac{v_1}{2}\right)\Gamma\left(\frac{v_2}{2}\right)} \frac{v_1^{v_1/2} v_2^{v_2/2}}{(v_1 F + v_2)^{\frac{v_1 + v_2}{2}}} \frac{F^{(v_1/2 - 1)}}{v_2^{v_2/2}} \quad (7)$$

Em que:

- $v_i$ : grau de liberdade do numerador (1) e denominador (2).

A análise ANOVA permite dizer se as médias em um grupo de análise são iguais ou não. Porém, não informa quais valores são considerados diferentes de quais. Com apenas um valor de média diferente dos outros a ANOVA já acusaria a diferença entre as médias no grupo. Para saber quais valores diferem de quais é necessário realizar um teste de paridade. Um dos testes mais utilizados é o de Duncan em que a hipótese nula é  $H_0: \mu = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_N$  para um grupo de N médias (DUNCAN, 1955; HARTER, 1960; SILVA, 2010).

## 2.6.2 Teste de Duncan

O teste de Duncan é procedido pela comparação par em par entre as médias do grupo analisado. O valor crítico usado para determinar se a diferença entre as médias é considerada significativa não é constante para todas as comparações. Ele varia com o número de médias contidas entre as médias que se deseja comparar, considerando que todas as médias do grupo foram, primeiramente, ordenadas de forma crescente (HARTER, 1960).

O valor crítico de comparação ( $R_p$ ) entre as médias é dado pela fórmula (8) abaixo, sendo ela considerada, então, a estatística do teste (SILVA, 2010).

$$R_p = q \sqrt{\frac{S^2}{r}} \quad (8)$$

Na qual:

$r$  – número de repetições para cada média.

$Sr^2$  – quadrado médio dos erros, considerando o grau de liberdade do erro (todos os valores coletados e aferidos menos o número de médias).

$q$  – valor tabela por Duncan, 1955 . É função do número de médias entre as médias que se deseja comparar, do nível de significância considerado e do grau de liberdade do erro.

Portanto, o valor de  $q$  será diferente para cada média que se deseja comprar, uma vez que depende da quantidade de outras médias entre essas duas.

A metodologia de análise será descrita pelo seguinte exemplo. Considera-se quatro médias que é desejado comprar: A, B, C e D. Primeiramente, os valores são ordenados em ordem crescente, a qual, nesse caso, considera-se a mesma ordem anterior: A, B, C e D. A comparação será feita primeiramente fazendo a diferença D-A, a maior menos a menor. Caso seja obtido um valor inferior ao obtido pela fórmula (8) para essas médias ( $R_1$ ), o processo termina e todas as médias são consideradas iguais, já que todos

os valores compreendidos em um intervalo em que os extremos já foram considerados iguais, são considerados iguais também. Caso seja maior, as médias são consideradas diferentes e o processo continua. É feito em seguida a diferença D-B calculando novamente a fórmula (8) em função das condições para essa comparação ( $R_2$ ). Se todos as medias forem diferentes a ordem de diferenças a ser efetuada é como segue: D-A; D-B; D-C; C-A; C-B; B-A. Sempre comparando primeiro os dados mais afastados e diminuindo progressivamente essa diferença até comprar os dados mais próximos. Apesar dos valores de  $r$  e  $Sr^2$  serem iguais para todos os casos, o valor tabelado de  $q$  depende do número de valores compreendidos entre as médias que estão sendo comparadas. Como para D-A temos um número total de 4 médias entre esses valores, A, B, C e D (considerando eles próprios também) o valor final de  $R_1$  será diferente do obtido por  $R_2$  pois, para D-B há apenas três médias entre eles, B, C e D. Assim, o valor crítico de comparação muda a cada nova comparação (DUNCAN, 1955; ANDERSON, 2001; SILVA, 2010).

Ainda há outras formas de comparação entre médias como teste da diferença menos significativa, e  $t$  de *student*, mas ambos são mais indicados quando se deseja comparar apenas até três médias em um determinado grupo. Para grupos maiores é mais indicado testes como: Tukey, Scheffé, Newman-Keuls e Duncan, sendo esses os mais conhecidos e utilizados. Porém, para os testes do tipo Duncan e Newman-Keuls, a diferença entre as médias pode ser considerada relevante dependendo da disposição das outras médias no grupo. As médias mais próximas não terão o mesmo valor crítico de avaliação que as mais afastadas. Já para os tipos Tukey e Scheffé, o valor crítico para avaliar a diferença entre duas médias é fixado, ou seja, para qualquer diferença entre quaisquer médias ser considerada significativa ela deve exceder esse determinado valor de comparação. Para esses dois conjuntos, a diferença é que o primeiro tem maior probabilidade de ocorrer erro tipo I do que erro tipo II, são chamados de testes mais poderosos, e para o segundo a maior chance é de ocorrer erro tipo II do que erro tipo I, testes menos poderosos. Agora, comparando ente Newman-Keuls e Duncan, eles são testes bem parecidos entre si, porém, a probabilidade de ocorrer erro tipo I é maior no segundo do que no primeiro, analogamente, erro tipo II é mais provável no primeiro do que no segundo. Cabe ao usuário do teste discernir qual probabilidade de erro mais se adequa ao tipo de comparação que se quer fazer (DUNCAN, 1955; SILVA, 2010).

### 2.6.3 Homogeneidade de inclinações

A comparação entre regressões lineares é muito usada para avaliar a similaridade de comportamento ou de características entre grupos em uma pesquisa. Por exemplo, a influência do tamanho corporal de homens e mulheres em uma dada característica humana ou a comparação entre determinados tratamentos e sua eficácia. Esse tipo de estudo geralmente é conduzido através da análise de covariância (ANCOVA). A ANCOVA é uma extensão da análise ANOVA, porém, é realizado um teste estatístico sobre a covariância entre os grupos. É avaliado como a covariância entre grupos afeta o desempenho da variável dependente do estudo (MILLER & CHAPMAN, 2001; RAWLINGS et al., 1998; ARANEDA et al., 2008).

Para realizar a ANCOVA é necessário comprovar que as regressões lineares dos grupos envolvidos possuem coeficientes angulares iguais. Ou seja, as curvas têm que ser consideradas paralelas. Para comparar a inclinações de duas curvas é possível aplicar um teste t de *student*. Porém, para mais de duas inclinações é necessário fazer a análise da homogeneidade das inclinações. Esse caso é análogo ao uso do teste t apenas para a comparação de duas médias e o teste ANOVA quando é desejado comprar mais de duas médias entre elas (ANDRADE & ESTÉVEZ-PÉREZ, 2014).

A expressão geral para uma regressão linear com uma variável de independente (x) e a variável de dependente (y) é dada por (9) (RAWLINGS et al., 1998).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon \quad (9)$$

Na qual:

- $\beta_0$ : coeficiente linear

-  $\beta_1$ : coeficiente angular

- $\varepsilon$ : erro associado ao modelo. É a diferença entre Y calculado pelo modelo em relação ao Y experimental.

Através de um conjunto de pontos (Y, X) é possível encontrar a os coeficientes que minimizam os erros do modelo (resíduos) pela soma dos mínimos quadrados (10) (RAWLINGS et al., 1998).

$$SS(Res) = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2 \quad (10)$$

Em que:

- $Y_i$ : valor de Y experimental
- $\hat{Y}_i$ : valor de Y calculado pelo modelo ajustado
- $e_i$ : resíduos

De modo a considerar mais de uma regressão linear para grupos de valores de X e Y, a equação (9) anterior pode ser escrita na forma de (11) (RAWLINGS et al., 1998; MILLER & CHAPMAN, 2001; DESHON & ALEXANDER, 1996).

$$Y_{ij} = \beta_{i0} + \beta_{i1} X_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (11)$$

Em que:

- $\beta_{i0}$ : coeficiente linear
- $\beta_{i1}$ : coeficiente angular
- $\varepsilon$ : erro do modelo

Onde,  $i=1, \dots, t$  e  $j=1, \dots, n_i$ , na qual t é o número de grupos que está sendo analisado com  $n_i$  dados coletados em cada um deles. Ou seja,  $n_1$  são os pontos  $X_{1j}$  e  $Y_{1j}$  coletados para a regressão da primeira curva,  $n_2$  são os pontos  $X_{2j}$  e  $Y_{2j}$  para a segunda regressão e assim por diante.

Para unir todas as t regressões em um único modelo (12), é introduzido uma variável modelo W para considerar o efeito de cada grupo t de dados. Na qual:  $W_{tj} = 1$  para a observação do grupo t e  $W_{tj} = 0$  para observação de qualquer outro grupo. Logo, para observação dos dados do grupo 1, por exemplo, é considerado  $W_{1j} = 1$  e  $W_{tj} = 0$

para  $t \neq 1$  (RAWLINGS et al., 1998; DESHON & ALEXANDER, 1996; MILLER & CHAPMAN, 2001).

$$Y_{ij} = W_{1ij}(\beta_{10} + \beta_{11}X_{1j}) + W_{2ij}(\beta_{20} + \beta_{21}X_{2j}) + \dots + W_{tij}(\beta_{t0} + \beta_{t1}X_{tj}) + \varepsilon_{ij} \quad (12)$$

A hipótese nula adotada para a avaliação da homogeneidade dos coeficientes angulares é dada por:  $H_0: \beta_{11} = \beta_{21} = \dots = \beta_{t1}$ . A estatística aplicada é o teste F. Para a comparação entre apenas duas curvas, o teste F e de *student* iram obter o mesmo resultado, sendo que qualquer um dos dois pode ser usado nesse caso. Para fazer o teste F é necessário considerar os erros ( $\varepsilon$ ) constantes e independentes entre cada modelo e a variável dependente (Y) é distribuída de forma normal com variação constante. O cálculo é feito primeiro ao realizar a soma dos mínimos quadrados dos resíduos tanto para o modelo completo (12) e para o modelo reduzido (13), no qual  $\beta_1$  reúne todos os coeficientes angulares dos grupos que estão sendo utilizados. O numerador do teste F é a diferença entre as somas dos resíduos para as equações 11 e 12 dividida pela diferença entre os graus de liberdade ( $\nu$ ) de cada um, resultando no valor  $Q_1$  (14). O denominador é dado pela soma dos mínimos quadrados para o modelo completo dividido pelo seu grau de liberdade, resultando  $Q_2$  (15). O valor de F, então, é dado pela razão de  $Q_1$  por  $Q_2$  (15). O resultado do teste é comparado com o F crítico tabelado em função de três valores: a diferença dos graus de liberdade dos dois modelos ( $\nu_{reduzido} - \nu_{completo}$ ), o grau de liberdade do modelo completo ( $\nu_{completo}$ ) e o p-valor, geralmente 0,05 para 95% de significância (RAWLINGS et al., 1998; ANKARALI et al., 2018).

$$Y_{ij} = \beta_{10}W_{1ij} + \beta_{20}W_{2ij} + \dots + \beta_{t0}W_{tij} + \beta_1X_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (13)$$

$$Q_1 = \frac{SS(Res_{reduzido}) - SS(Res_{completo})}{\nu_{reduzido} - \nu_{completo}} \quad (14)$$

$$Q_2 = \frac{SS(Res_{completo})}{n_2} \quad (15)$$



$$F = \frac{Q_1}{Q_2} \quad (16)$$

$$v_{reduzido} = \sum n_i - t - 1 \quad (17)$$

$$v_{completo} = \sum n_i - 2t \quad (18)$$

Após realizar a prova da homogeneidade de inclinações, também é possível testar a homogeneidade de coeficientes lineares. Essa prova só é realizada apenas se os coeficientes lineares foram comprovados como iguais, caso contrário os coeficientes lineares são automaticamente considerados como diferentes, a não ser que haja alguma razão específica para os mesmos convergirem em um mesmo ponto  $X=0$ . Para esse teste, o procedimento é análogo ao usado para as inclinações, porém a hipótese nula é da forma:  $H_0: \beta_{10}=\beta_{20}=\dots=\beta_{i0}$ , como o modelo completo considerado como (13), uma vez que as inclinações já foram provadas iguais, e o reduzido como (19) (RAWLINGS et al., 1998).

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (19)$$

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Solução tampão**

A solução tampão de fosfato pH 8 foi utilizada como meio e diluente em todas as amostras que contem a enzima uma vez que ela apresenta maior estabilidade por volta desse pH. Ela possui concentração de 66 mM de fosfato e é preparada com 0,336 g de fosfato de potássio monobásico (anidro) e 9,119 g fosfato de sódio dibásico (anidro) em 1 litro de água destilada (ZHANG et al., 2017; EINSFELDT, 2014).

#### **3.2 Meio de cultura**

O meio de cultura utilizado nesse trabalho para o cultivo da *Eschericia coli* e produção da L-asparaginase foi baseado no meio LB (Luria-Bertani) como descrito no trabalho de Einsfeldt (2014). Ele é composto por 6 gramas de fosfato dibásico de sódio anidro, 3 gramas de fosfato de potássio dibásico anidro, 20 gramas de triptona, 5 gramas de extrato de levedura e 5 gramas de cloreto de sódio. As quantidades mencionadas são para a produção de 1 litro de meio. O mesmo foi dividido em dois erlenmeyer de 1L, e ambos são autoclavados por 20 min sob 1 atm de pressão e 120 °C.

Em seguida foram adicionados, em capela de fluxo laminar, os volumes: 0,5 mL de glicerol (60% p/v), 0,25 mL de glicose (10% p/v), 1,25 mL de lactose (8% p/v) e 100 µL de canamicina 50 mg/mL em cada erlenmeyer. A aplicação dessas soluções é realizada por uma seringa acoplada a um filtro de 0,2 µm para as soluções de glicose e glicerol, e um filtro de 0,33 µm para solução de lactose, de modo a evitar a contaminação do meio de cultura.

O tempo de cultivo é de 18h em agitador a 37 °C.

Os itens 3.3 e 3.4 a seguir se baseiam na metodologia adotada em Einsfeldt (2014).

### **3.3 Centrifugação**

O meio de cultivo, após o tempo de crescimento, foi centrifugado a 5000 rpm por 1 hora a 4 °C (Sorvall Legend XTR, Thermo Fisher Scientific, *Massachusetts, United States*). O sobrenadante foi recolhido em frascos de vidro (Schott, *Mainz, Germany*) e os pellets foram congelados para posterior lise celular. A enzima obtida através do rompimento desses pellets congelados foi utilizada para os estudos de rompimento celular e cromatografia.

#### **3.3.1 Tratamento do sobrenadante**

O sobrenadante da última centrifugação foi centrifugado novamente a 5000 rpm por 30 min a 4°C de forma a retirar possíveis células que ainda estejam em solução. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0.22 µm.

Do filtrado obtido anteriormente, foram aplicados 15 mL em concentrador com membrana de 10 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore, *Massachusetts, United States*) de modo a realizar a ultra filtração da solução através da centrifugação a 3000 rpm durante 7 min, obtendo-se 7,5 mL de concentrado final. O filtrado dessa etapa foi descartado e o concentrado foi preenchido com mais solução filtrada da etapa anterior (após a passagem em filtro 0.22 µm). Como um volume total de 22,5 mL foi utilizado nessa etapa e o concentrado final foi 7,5 mL, a solução foi concentrada 3 vezes.

A solução gerada na etapa anterior foi concentrada novamente, agora com solução tampão de equilíbrio para a cromatografia de afinidade seguindo o mesmo procedimento anterior. O objetivo é realizar a troca de tampão para o tampão de equilíbrio utilizado na

cromatografia de afinidade. O concentrado final é recolhido para posterior teste de atividade e cromatografia.

Após uso da membrana, o concentrador é lavado com água destilada em abundância. Em seguida, é deixado em solução de SDS 0,5 % por 1 hora. Após esse tempo, é lavado novamente com água destilada abundante e mantido em solução de etanol 20% na geladeira.

### **3.4 Teste de atividade**

Os reagentes responsáveis pela formação de complexo com absorvidade em 600 nm são chamados de reagentes 1 e 2. O reagente 1 é composto por 10 g/L de salicilato de sódio, 1 g/L nitroprussiato de sódio e 0,5 g/L de EDTA. O reagente 2 é composto por 6 g/L de hidróxido de sódio e 6,2 mL/L de hipoclorito de sódio.

Foram realizadas diferentes diluições com a amostra para garantir que o cálculo da atividade fosse feito por interpolação na curva padrão. Das diluições, são retirados 50  $\mu$ L e misturados com 50  $\mu$ L de L-asparagina, 5 g/L, para efetuar a reação entre a enzima e seu substrato, a L-asparagina. A solução utilizada como branco são 100  $\mu$ L de tampão de fosfato. Duas soluções foram utilizadas para contabilizar a absorbância gerada pela amostra a ser analisada e pela solução de L-asparagina. A primeira foi preparada com 50  $\mu$ L de amostra e 50  $\mu$ L de tampão e a segunda com 50  $\mu$ L de L-asparagina com 50  $\mu$ L de tampão. No caso da amostra analisada, é possível que ela contenha alguma absorbância própria a 600 nm que possa interferir na análise, por isso a leitura de sua absorbância é realizada e descontada. Como a L-asparagina apresenta a formação de absorbância a 600 nm com os reagentes 1 e 2, o valor de sua absorbância também deve ser observado.

A reação foi procedida em 30 min a 37 °C. Ao final, foi adicionado 25  $\mu$ L de TCA (ácido tricloroacético) para interromper a reação. Foram retirados 20  $\mu$ L das soluções de reação, tampão e branco e cada alíquota foi misturada separadamente com 1 mL de reagente 1. Após agitação das misturas, foi adicionado 1 mL de reagente 2 a cada mistura. Após nova agitação de cada solução, elas foram colocadas em banho a 37 °C por 5 min.

Após esse período, foram colocadas para esfriar durante 10 min. Em seguida foi realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro (modelo 8453, Agilent Technologies, *California, United States*) no comprimento de onda 600 nm.

A curva foi preparada utilizando soluções de sulfato de amônio em diferentes concentrações. Foi realizado o procedimento do teste de atividade normalmente como se cada solução de sulfato de amônio fosse uma amostra a ser analisada. Com o valor da absorção de cada solução a 600 nm, foi possível fazer uma curva que relaciona a concentração de amônia com a absorção nesse comprimento de onda.

Quatro diferentes formas de realizar a curva padrão foram observadas. A primeira seguindo o procedimento idêntico ao do teste de atividade, como se cada solução de sulfato de amônio fosse uma amostra a ser analisada pela atividade, porém não foi realizado a etapa de reação, uma vez que a solução já possui o amônio necessário para a reação com os reagentes 1 e 2. Portanto, a solução de amônio foi misturada diretamente com os reagentes 1 e 2 seguindo o procedimento necessário descrito anteriormente para essa etapa. A segunda forma segue o mesmo procedimento da primeira, porém a solução de amônio foi misturada com solução de L-asparagina como no procedimento de teste de atividade. Ou seja, 50  $\mu\text{L}$  de solução de sulfato de amônio com 50  $\mu\text{L}$  de solução de L-asparagina. Assim, a curva padrão foi produzida com a solução de L-asparagina também. A terceira e quarta forma seguem a segunda forma, porém são utilizados volumes de 0,7 mL para os reagentes 1 e 2, além de variar o volume da alíquota da mistura de amônio com L-asparagina entre 20 e 14  $\mu\text{L}$ .

### **3.5 Eletroforese**

A eletroforese foi efetuada no equipamento Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell (Figura 3.1) seguindo a metodologia em Westermeier (2016). Para efetuar o processo foi primeiramente realizado a produção dos géis, separador e concentrador, no qual o concentrador é posto acima do separador.

O gel concentrador é responsável por colocar as proteínas em posição igualitária de forma que, ao penetrar no gel separador, elas estejam no mesmo ponto de partida. Uma vez que a corrida no gel separador consiste na separação das proteínas pelo tamanho molecular em um mesmo sentido longitudinal, é fundamental que o simples posicionamento de uma proteína sobre outra na aplicação das amostras não interfira na análise.



Figura 3.1 - Mini-PROTEAN® Tetra Cell

Fonte: Biorad, 2018

O gel separador (10 mL) é composto por 4,3 mL de água Mili-Q, 2,5 mL Tris pH 8,8, 3 mL de Acrilamida (30%), 100  $\mu$ L de SDS (10%), 100  $\mu$ L de PSA (10%) e 10  $\mu$ L de TEMED. Já o gel concentrador (4mL) é composto por 1,7 mL de água Mili-Q; 1 mL de Tris 6,8; 0,67 mL de Acrilamida (30%); 40  $\mu$ L de SDS (10%); 40  $\mu$ L de PSA (10%) e 4  $\mu$ L de TEMED.

Antes da aplicação das amostras no gel foi realizada a diluição da mesma em um tampão de amostra composto de tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% de SDS e 0,5% de azul de bromofenol. Foi retirado 15  $\mu$ L da amostra a ser analisada e misturado com 15  $\mu$ L da solução de tampão de amostra. A mistura resultante é aplicada no gel para efetuar a corrida a 128 V e 34 mA. Após a corrida, a coloração do gel foi feita em Coomassie Brilliant Blue R-250. A descoloração foi feita com solução composta com 10% de metanol e 10% ácido acético (WESTERMEIER, 2005).

### **3.6 Ensaio de Bradford**

O ensaio de Bradford foi realizado aplicando-se 20  $\mu\text{L}$  de amostra a ser analisada com 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford em microplacas de 96 poços Bio tek EPOCH<sup>®</sup> 2 incubada a temperatura ambiente por 5 minutos com leitura, em seguida, a 595 nm. A curva padrão para o ensaio é obtida com solução mãe de BSA 1 g/L (albumina de soro bovino) em diferentes concentrações seguindo a mesma metodologia efetuada para as amostras (BRADFORD, 1976; EINSFELDT, 2014).

### **3.7 Análise estatística**

A análise estatística dos ensaios de atividade e Bradford foram realizadas pela repetição das curvas padrão. Tal análise foi necessária para observar se a curva padrão para um determinado método poderia ser continuamente utilizada ou se era necessário a aferição de uma curva diferente para cada análise. Para o ensaio de Bradford foram feitas 3 curvas padrão como descrito no item 3.6. Para o ensaio de atividade a análise observou 3 pontos principais: o uso e o não uso da L-asparagina na produção da curva padrão, uma vez que se observou a influência da L-asparagina na produção das curvas; a proporção dos reagentes usados no ensaio e o tempo da reação na determinação de atividade enzimática. No primeiro caso, foi realizado a curva padrão como descrito no item 3.6 sem a L-asparagina nas soluções de sulfato de amônio, e também foi realizada a curva usando como amostra para cada ponto uma mistura de 50  $\mu\text{L}$  da solução de sulfato de amônio com 50  $\mu\text{L}$  da solução de L-asparagina 5 g/L de forma a avaliar a influência da L-asparagina na determinação da curva. No segundo caso, observou-se a produção das curvas com 0.7 mL de reagente 1, 0.7 mL de reagente 2 e como amostra para absorvância 20  $\mu\text{L}$  ou 14  $\mu\text{L}$  usando a mistura com L-asparagina como descrita anteriormente. No

terceiro caso, tempos de 10, 15, 20 e 30 min foram avaliados para a determinação da atividade enzimática de uma mesma amostra.

Os cálculos foram feitos com o software GraphPad Prism (Graphpad, *San Diego, United States*), o qual permite efetuar o teste F e p-valor entre as inclinações e interseções das retas. A hipótese nula utilizada para o teste F consiste dos valores da inclinação ou da interseção como iguais.

### **3.8 Rompimento celular**

A ruptura celular foi efetuada em prensa de French (Thermo FA-032, Thermo Electron Corporation, *Massachusetts, United States*), por ultrassom (Sonic Dismembrator Model 100, Fisher Scientific, *New Hampshire, United States*) com frequência de operação de 23 kHz) e por homogeneizador a alta pressão (APLAB-10, Arte Peças, São Paulo, Brasil). Esses equipamentos são frequentemente utilizados para realizar processos de rompimento celular (SINGH, 2013; BENOVA e AL-IBRAHEEM, 2002; GANNER et al., 2013; SHRESDA et al., 2012; CHISTI e YOUNG, 1986; MIDDLEBERG, 1995), mas devido aos estudos de Singh (2013), são observados melhores resultados quanto a liberação de material intracelular utilizando a prensa French ou o homogeneizador do que o ultrassom. A prensa e o ultrassom foram utilizados em experimentos preliminares, nos quais o ultrassom serviu para processar a massa celular que sobra após o rompimento pela prensa de French a fim de observar se ainda havia células a serem lisadas e, portanto, enzima intracelular a ser extraída. Além disso, foi possível observar qual dos dois tipos de rompimento era mais efetivo do ponto de vista das condições finais que a enzima era obtida, ou seja, se ela ainda apresentava sua atividade enzimática conservada. Após observar que o rompimento das células com a prensa de French proporcionava melhores resultados, o homogeneizador foi usado para determinar as melhores condições para o rompimento celular de forma a obter a maior quantidade de enzima ativa possível, uma vez que é um equipamento muito utilizado industrialmente e de fácil escalonamento.

A prensa French empregada nesta pesquisa possui um volume máximo de 30 mL. Para um experimento preliminar de rompimento, pellets armazenados do cultivo celular



foram ressuspensos em 100 mL de solução tampão fosfato 66 mM pH 8 com manitol 0.15 g/L. Duas frações de 40 mL foram separadas (amostras 1 e 2) e a última fração de 20 mL foi diluída a 30 mL com a mesma solução tampão (amostra 3). As amostras 1 e 3 foram lisadas a 800 psi e a amostra 2 foi lisada a 1200 psi. Após o rompimento, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm e 4°C por 30 minutos de forma a tirar todas as frações celulares presentes. Os sobrenadantes e pellets são separados. O sobrenadante é filtrado a 0.22 µm antes de ser utilizado na cromatografia e análises posteriores.

O rompimento celular com ultrassom foi conduzido em 10 ciclos de 10 segundos com 1 minuto de intervalo entre cada ciclo. Como o ultrassom aquece a solução, o processo foi conduzido em banho de gelo. A solução resultante é então centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante é filtrado a 0,22 µm.

O homogeneizador efetua o rompimento com determinada pressão e números de passes pelo aparelho. Ele possui um volume mínimo de 400 mL. Portanto, os pellets resultantes do cultivo a serem utilizados foram ressuspensos em 400 mL de solução tampão fosfato 66 mM pH 8 com manitol 0.15 g/L. Ao colocar o equipamento na pressão desejada para o rompimento, alíquotas de 10 mL foram recolhidas após determinada quantidade de passes. Após o processo, essas alíquotas foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 min e filtradas a 0.22 µm. Em seguida foi realizada a cromatografia pela coluna His Trap HP de 1 mL. As amostras de eluição foram analisadas pelos ensaios de Bradford e atividade a fim de determinar a melhor condição de rompimento celular para a enzima.

O estudo das condições de rompimento começou com a investigação de uma margem para a pressão de rompimento e para o número de passes. Primeiro foram testadas as pressões de 100, 200 e 400 bar de 1 até 4 passes para cada pressão. Após a análise das amostras para cada um desses casos, as condições de 7 e 10 passes foram analisadas para 200 e 400 bar, além de 4, 7 e 10 passes para 300 bar. A fim de verificar se a intensificação das condições de rompimento acarretaria em um patamar de liberação constante de produto intracelular, pois todas as células já estariam rompidas, foi realizada a comparação estatística pelos métodos ANOVA e de Duncan das médias de cada passe para cada grupo de pressão de rompimento. Assim, seria possível avaliar se esses valores seriam diferentes ou iguais, indicando ter atingido o patamar de rompimento.

## 3.9 Cromatografia

### 3.9.1 Cromatografia por afinidade

A cromatografia da enzima foi baseada nos estudos de Zhang et al. (2017) utilizando uma coluna His Trap HP de 1 mL (Figura 3.2). A operação da mesma seguiu a vazão recomendada pelo manual da GE Healthcare específico da coluna que determina ser 1 mL/min. A vazão foi controlada por uma bomba peristáltica Watson Marlow 101U/R



Figura 3.2 - Coluna HisTrap HP, 1 mL

Fonte: GE Health care, 2017

São preparadas três soluções principais: solução de ligação, lavagem e eluição. Todas essas soluções foram preparadas com solução de tampão de fosfato pH 8 a 66 mM, pois são as condições de estabilidade da enzima (ZHANG et al., 2017; EINSFELDT, 2014). O que muda de uma solução para outra é a concentração de imidazol. Essa variável foi analisada durante os trabalhos da dissertação para chegar numa condição de menor perda da enzima durante o processo.

Antes da realização da cromatografia é efetuada a passagem de água para retirar a solução de álcool 20% em que a coluna é armazenada. Após a passagem de pelo menos 10 volumes de água para limpeza, é iniciada a cromatografia.

O processo começa com a passagem de 10 volumes da solução de ligação para equilibrar a coluna cromatográfica. A concentração de imidazol que essa solução contém previne a realização de interações não específicas entre outras proteínas que o meio possui

e o níquel imobilizado na coluna. Em seguida foi realizada a passagem da amostra a ser purificada a qual é recolhida após sua passagem (amostra de passe) para ser analisada em conjunto com outras amostras do processo. Logo após foi realizada a etapa de lavagem da coluna. A lavagem consiste na retirada de material que não interage de forma específica com os átomos de níquel complexados e, portanto, não são o material alvo do processo de purificação. Ela consiste na passagem de 10 volumes da solução de ligação. Após a etapa de lavagem, o processo termina com a passagem da solução de eluição de forma a retirar toda a enzima que ficou retida ao níquel. Foi passada a quantidade de volume suficiente de forma e recolher as alíquotas necessárias para a análise da etapa de eluição.

O tratamento pós-uso da coluna consiste na passagem de água em abundância, seguido de solução de NaOH 1 M, acompanhado da passagem de pelo menos mais 10 volumes de água para retirar o excesso de base presente, sendo procedido da passagem de 2 volumes de solução de NiSO<sub>4</sub> 0,1 M para recarregar o metal que é perdido durante o processo.

Toda a operação da coluna foi efetuada de modo a evitar a secura da mesma, nunca deixando de passar líquido em seu interior e nunca permitindo a passagem de ar.

Os primeiros experimentos em relação a cromatografia de afinidade utilizaram 10 e 60 mM de imidazol para a etapa de ligação e 10, 60, 70 e 100 mM de imidazol na etapa de lavagem. A etapa de eluição foi sempre realizada a 300 mM de imidazol em todas as cromatografias de afinidade.

De forma a testar o equilíbrio de ligação entre a enzima e a coluna, foram utilizadas soluções com a concentração de imidazol de 10, 50, 100 e 150 mM para as etapas ligação e lavagem, em que a amostra inicial correspondia a enzima já purificada por cromatografias de afinidade anteriores. Assim, é possível observar se tal concentração de imidazol favorece a interação da enzima com a coluna e desfavorece a interação com qualquer outra substância do meio.

### 3.9.2 Cromatografia por troca iônica

A cromatografia por troca iônica foi realizada utilizando a coluna HiScreen Q HP de 4,7mL da GE Healthcare (Figura 3.3). Como a enzima produzida possui pI por volta de 5,94, a coluna selecionada foi aniônica e operada com meio a pH 8 (EINSFELDT, 2014). O processo seguiu a vazão recomendada de 1,2 mL/min segundo o manual para a coluna.



Figura 3.3 - Coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL

O cromatógrafo utilizado é o Äkta Micro (GE Healthcare, *Pittsburg, United States*) o qual possui sistema de bombeamento por pistão, coletador de amostras e detector de comprimento de onda UV.

Assim como a cromatografia por afinidade, duas soluções principais são preparadas: uma solução de equilíbrio e uma solução de eluição. Ambas foram preparadas com solução tampão fosfato 66 mM pH 8. A primeira constituiu apenas da solução tampão e a segunda possui 1 M de NaCl a mais na sua constituição.

O primeiro procedimento adotado foi a passagem de água pela coluna como forma de limpeza inicial e retirada de qualquer contaminante que está no meio em que a matriz está armazenada. Em seguida, a etapa de equilíbrio consiste na passagem de 5 volumes de coluna com a solução de equilíbrio. Finalizada a etapa de equilíbrio, efetuou-se a aplicação da amostra. Em seguida foram passados 5 volumes de coluna da solução de equilíbrio como lavagem da coluna. Após essa etapa, começa a fase de eluição. Para a investigação das condições cromatográficas de um composto, foi primeiro procedida a

passagem de um gradiente de eluição (de 0 até 100% de eluente) de modo a verificar em que porcentagem de eluente o produto de interesse sai da coluna. Após essa verificação, a separação do composto de interesse foi efetuada aplicando-se a porcentagem de eluente observada para a saída do mesmo.

Um ensaio de atividade qualitativo das amostras correspondentes aos picos de saída foi efetuado de forma a verificar a fração que possui atividade enzimática e, portanto, que continha a enzima. Tal ensaio seguiu a mesma metodologia do capítulo 3.4. Porém, não foi aferida a absorvância da amostra. A determinação da presença da enzima na solução analisada foi caracterizada pela observação da coloração esverdeada típica do método.

A Figura 3.4 representa um esquema dos processos que foram adotados no desenvolvimento da dissertação na ordem de operação.

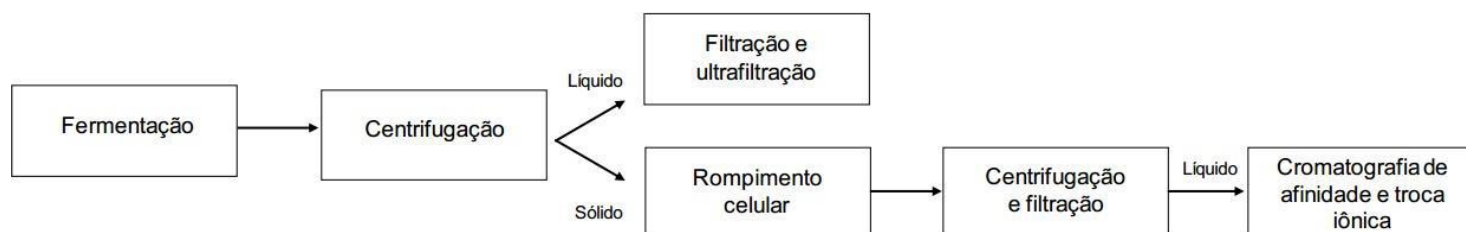


Figura 3.4 - Esquema dos processos abordados na metodologia da dissertação em ordem de operação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise estatística das curvas padrões

As curvas padrão para o ensaio de Bradford, como definidas no capítulo da metodologia, produzidas nas condições ambientes e com um dia de diferença resultaram, nas equações da Tabela 4.1 e podem ser observadas nas Figuras A.1 – A.3.

Tabela 4.1 – Curvas padrões para o ensaio de Bradford com BSA

	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Inclinação	$2,13 \pm 0,06$	$2,03 \pm 0,07$	$2,05 \pm 0,06$
Interseção	$0,180 \pm 0,002$	$0,182 \pm 0,002$	$0,182 \pm 0,002$
Equação	$Y = 2,13 * X + 0,180$	$Y = 2,03 * X + 0,182$	$Y = 2,05 * X + 0,182$
R <sup>2</sup>	0,9852	0,9796	0,9841

A semelhança entre as inclinações das curvas e entre as interseções foi comparada pela análise estatística das curvas pelo do *software* GraphPad Prism. Os principais parâmetros de comparação foram o teste F (estatística do método) e o valor do p-level. Para valores  $p > 0,05$  pode-se dizer que as inclinações e interseções não possuem diferenças significativas e podem ser consideradas retas equivalentes, pois falha-se ao rejeitar a hipótese nula de igualdade entre inclinações ou interseções. Caso contrário, elas possuem diferenças significativas a ponto de poderem ser consideradas diferentes.

Nesse caso, os valores para F e p-level entre as interseções e inclinações das 3 curvas é como listado na Tabela 4.2 abaixo.

Tabela 4.2 – Análise das inclinações e interseções das curvas de Bradford

	Inclinação	Interseção
F	0,670	0,084
P-valor	0,5156	0,9199
Equação	$Y = 2,06984 * X + 0,181127$	

Portanto, como os valores de p-level são maiores que 0,05, as três curvas podem ser consideradas semelhantes em um nível de confiança de 95%. Logo, é possível calcular valores gerais para interseção e inclinação como a média aritmética das inclinações e interseções das curvas como mostrado na tabela acima.

Assim, é possível admitir que dentro do tempo de análise, nas mesmas condições e com os mesmos reagentes, não é necessário fazer mais de uma curva padrão para as amostras do ensaio de Bradford. Apenas uma curva padrão é o suficiente para analisar as amostras aferidas no intervalo de tempo.

Quando se realizou o mesmo tipo de estudo para a curva padrões do ensaio de atividade, foi primeiro seguido o procedimento descrito no item 3.2 da metodologia. Nesse primeiro caso não foi utilizado L-asparagina no ensaio para essas curvas (Figuras A.4 – A.6). As equações estão na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Curvas padrões para o ensaio de atividade com soluções de sulfato de amônio

	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Inclinação	0,1101 ± 0,0008	0,1124 ± 0,0003	0,1107 ± 0,0007
Interseção	-0,006 ± 0,001	-0,0073 ± 0,0004	-0,006 ± 0,001
Equação	Y = 0,1101*X - 0,006	Y = 0,1124*X - 0,0073	Y = 0,1107*X - 0,006
R <sup>2</sup>	0,9988	0,9999	0,9992

Ao fazer a análise estatística para essas curvas foram obtidos os valores de F e p-level para as inclinações obtidas (Tabela 4.4). Como os coeficientes angulares já são calculados como diferentes, as curvas relacionadas podem ser consideradas como diferentes também, não precisando mais de nenhuma análise adicional.

Tabela 4.4 – Análise das inclinações das curvas padrões com de sulfato de amônio

	Inclinação
F	3,443
P-valor	0,037

Como a realização dessas curvas foram aferidas no mesmo dia, sobre as mesmas condições e com os mesmos reagentes, a diferenciação das curvas significa que para cada ensaio de atividade necessita de sua própria curva padrão.

Agora, ao fazer o mesmo experimento, porém usando a L-asparagina na amostra de coloração como citado na metodologia, as curvas adquiridas são mostradas na Tabela 4.5 e Figuras A.7 – A.9.

Tabela 4.5 – Curvas padrões para o ensaio de atividade com sulfato de amônio e L-asparagina

	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Inclinação	0,099 ± 0,002	0,096 ± 0,002	0,096 ± 0,002
Interseção	0,169 ± 0,002	0,170 ± 0,001	0,171 ± 0,001
Equação	$Y = 0,099 \cdot X + 0,169$	$Y = 0,0961 \cdot X + 0,170$	$Y = 0,096 \cdot X + 0,171$
R <sup>2</sup>	0,9928	0,9962	0,9952

Ao fazer a mesma análise estatística entre os coeficientes angulares e interseções, os valores para F e p-level entres as curvas é demonstrado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Análise das inclinações e interseções das curvas com sulfato de amônio e L-asparagina

	Inclinação	Interseção
F	0,643	0,086
P-valor	0,530	0,918
Equação	$Y = 0,0969 \cdot X + 0,1702$	

Pela análise estatística, essas curvas são consideradas iguais. Por isso é possível determinar uma curva geral que representa o experimento realizado e pode ser considerada válida para qualquer ensaio realizado nas mesmas condições. A inclinação é a média das inclinações das 3 curvas e a interseção é a média entre as 3 interseções das curvas. Como foram curvas determinadas no mesmo dia, é possível concluir que para análises feitas no mesmo dia e com os mesmos reagentes, apenas uma curva padrão é o suficiente para as análises de atividade naquele dia, não sendo necessário realiza-las a cada experimento. É possível que a adição da L-asparagina ao método tenha trazido mais



robustez ao mesmo, não influenciando tanto a variabilidade da absorvidade em cada ensaio.

Uma das formas de calcular a atividade enzimática é utilizar a curva padrão sem L-asparagina, apenas com soluções de sulfato de amônio. Então, ao realizar o ensaio de atividade para uma amostra, é necessário descontar primeiro a absorção da L-asparagina pura e usar a diferença obtida na curva padrão aferida. Porém, nesse caso está considerando um efeito aditivo da absorção da solução de L-asparagina no meio, efeito esse que não pode ser confirmado. Portanto, foram feitas curvas padrões com a L-asparagina como elemento integrante de forma a avaliar o efeito da sua absorção na aferição do ensaio. Ao considerar que no ensaio de atividade para uma enzima a quantidade de L-asparagina está em excesso no meio e o seu consumo é considerado irrelevante para provocar qualquer alteração significativa na absorvância final, a absorvância gerada pela L-asparagina na determinação da curva padrão pode ser considerada a mesma para quando realizado um teste de atividade enzimática.

Em um ensaio de atividade enzimática, subtrair o valor da absorvância da L-asparagina pura para depois realizar a estimativa de atividade pela curva padrão resulta num valor de atividade menor do que simplesmente utilizar uma curva padrão com o efeito da L-asparagina já embutido. De fato, ao olhar para uma curva feita com L-asparagina e retirar a absorvância da L-asparagina pura das absorvâncias de cada ponto, é possível notar um valor de absorvância total menor do que seria na curva sem L-asparagina, mostrando que o efeito de absorvância da mesma no meio não é aditivo. Ao observar os dados da tabela 4.7, é possível notar como usar a curva sem a L-asparagina subestima o valor da atividade enzimática de uma amostra, o que mostra a necessidade de uma curva que contabilize o efeito do reagente.

Tabela 4.7 – Comparação entre as atividades enzimáticas obtidas por curvas padrões com L-asparagina e sem L-asparagina na aferição

	Atividade enzimática (UI/mL)	Desvio padrão (%)
Curva sem L-asparagina	13,45	0,09
Curva com L-asparagina	14,46	0,10

Porém, no caso da curva com L-asparagina, foi possível observar que apenas concentrações de amônio acima de 37,5 ppm puderam ser detectadas com uma absorvância maior do que a L-asparagina pura. Qualquer amostra com concentração inferior apresentou um absorvância igual à da L-asparagina pura. Assim, a presença da L-asparagina aumentou o limite de detecção do método.

Analisando agora a influência da proporção de reagentes no ensaio, foram realizadas duas curvas padrões utilizando 0,7 mL de reagente 1, 0,7 mL de reagente 2, porém variando o volume de amostra com amônio de 20 µL para 14 µL (Figuras A.10 e A.11). A Tabela 4.8 mostra os dados de regressão para cada caso.

Tabela 4.8 - Curvas padrões com L-asparagina para 20 e 14 µL de amostra

	Curva 20 µL	Curva 14 µL
Inclinação	0,0598 ± 0,0006	0,0522 ± 0,0009
Interseção	0,0879 ± 0,0005	0,0635 ± 0,0007
Equação	Y = 0,0598*X + 0,0879	Y = 0,0522*X + 0,0635
R <sup>2</sup>	0,9981	0,9943

A análise estatística da comparação das curvas (Tabela 4.9) mostra que ambas não podem ser consideradas iguais, uma vez que p<0,05.

Tabela 4.9 - Análise estatística das inclinações para as curvas padrões com L-asparagina com 20 e 14 µL de amostra

	Inclinação
F	49
P-valor	Menor que 0,0001

O mesmo experimento foi repetido no mesmo dia. As regressões dos dados obtidos são mostradas na Tabela 4.10 (Figuras A.12 e A.13).

Tabela 4.10 - Curvas padrões com L-asparagina para 20 e 14 µL de amostra

	Curva 20 µL	Curva 14 µL
Inclinação	0,0757 ± 0,001	0,0565 ± 0,0006
Interseção	0,1258 ± 0,0012	0,0758 ± 0,0005
Equação	Y = 0,0757*X + 0,1258	Y = 0,0565*X + 0,0758
R <sup>2</sup>	0,9930	0,9978

A análise estatística mostrou novamente que as curvas não podem ser consideradas semelhantes (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 - Análise estatística das inclinações para as curvas padrões com L-asparagina com 20 e 14  $\mu\text{L}$  de amostra

Inclinação	
F	148
P-valor	Menor que 0,0001

Portanto, uma adição de 6  $\mu\text{L}$  a mais de amostra, já é suficiente para alterar completamente a curva padrão. Isso expõe mais um exemplo de como o ensaio pode ser sensível a perturbações nas suas condições. Além disso, realizando a análise estatística entre as curvas com 20  $\mu\text{L}$  e com 14  $\mu\text{L}$ , os dados da tabela 4.12 mostram que os pares de curvas também não podem ser considerados iguais. Ou seja, a aferição das curvas produzidas nas mesmas condições, com volumes iguais de amostra e no mesmo dia, foi capaz de provocar alterações significativas nos resultados da análise.

Tabela 4.12 – Comparação estatística entre as inclinações das curvas padrões com 20 e 14  $\mu\text{L}$  de amostra

	Inclinação para 20 $\mu\text{L}$	Inclinação para 14 $\mu\text{L}$
F	102	15
P-valor	Menor que 0,0001	0,0003

Ao observar as equações obtidas para o experimento anterior, para 20 e 14  $\mu\text{L}$ , a regressão das curvas é diferente das curvas que utilizam os volumes de originais de reagentes, como 1 mL para o reagente 1 e 2. Mesmo usando uma proporção equivalente para os reagentes, como é o caso para 0,7 mL de reagente 1 e 2 com 14  $\mu\text{L}$  de amostra, as regressões obtidas são claramente discrepantes, mostrando que o ensaio é suscetível a alterações quando efetuado com volumes diferentes, mesmo seguindo a mesma proporção. Porém, um ponto interessante a se notar foi a concentração mínima em que a absorção das amostras se tornou distinguível da absorção da L-asparagina. Tal diferenciação começou a ser observada a partir de 25 ppm de sulfato de amônio, bem menor que o anterior 37,5 ppm. Assim, utilizando os reagentes 1 e 2 com os volumes de 0,7 mL, é possível identificar um limite menor de detecção da atividade enzimática. Como a comparação entre as curvas com 14  $\mu\text{L}$  apresentou um valor de F menor do que para as curvas com 20  $\mu\text{L}$ , o primeiro caso apresenta uma variabilidade menor que o segundo.

Logo, curvas utilizando a proporção de 0,7 mL:0,7 mL:14 µL foram utilizadas como padrão para a determinação de atividade enzimática. Porém, como observados pelas análises estatísticas para esse tipo de curva, para cada ensaio de atividade é necessário realizar sua própria curva padrão.

Observou-se a influência do tempo de reação e das diluições para as amostras do ensaio de atividade. A atividade enzimática para os tempos de 10, 15, 20 e 30 min e diluições de 1:100, 1:70, 1:40, 1:20, 1:10 são listados nas tabelas 4.13 e 4.14, respectivamente. Dessa forma foi possível determinar o coeficiente de variação para a influência do tempo e das diluições de amostra. Os casos estudados apresentam dispersão em torno da média, uma vez que os coeficientes de variação são de 16,2% e 13,3%.

Tabela 4.13 – Análise estatística da atividade enzimática em relação ao tempo

Tempo (min)	Atividade (UI/mL)
30	2.19
20	1.49
15	1.73
10	1.92
<hr/>	
Média	1.83
Desv.	0.296
Cv	16.2%

Tabela 4.14 – Análise estatística de atividade enzimática em relação às diluições

Diluição (1:X)	Atividade (UI/mL)
100	2.23
70	2.07
40	1.67
20	1.73
10	2.19
<hr/>	
Média	1.98
Desv.	0.263
Cv	13.3%

Portanto, a curva padrão para o ensaio de Bradford se mostrou robusta no intervalo de tempo aferido no trabalho, um total de três dias. Porém, as curvas para o ensaio de

atividade enzimática apresentaram grande variabilidade nos resultados de suas repetições, ao ponto das curvas produzidas no mesmo dia e nas mesmas condições apresentarem comportamentos distintos. O que torna necessário realizar uma curva padrão para cada novo ensaio que se deseja fazer.

## **4.2 Melhores condições de rompimento**

Para começar a investigar as melhores condições de rompimento celular, as pressões de 100, 200 e 400 bar foram testadas para 1, 2, 3 e 4 passes no homogeneizador a alta pressão.

Através de experimentos preliminares, já havia sido comprovado que a cromatografia de afinidade era capaz de purificar um meio obtido pela lise celular. Por isso, amostras de 10 mL foram recolhidas para cada condição de rompimento e foi realizada a cromatografia de afinidade de forma a recolher majoritariamente a enzima L-asparaginase e observar se a alteração nas condições de rompimento afetava a quantidade de enzima liberada no meio.

Após a cromatografia para os rompimentos a 100 bar 1 passe e 4 passes foram observadas as alíquotas de eluição pela eletroforese para determinar se a enzima de fato estava sendo purificada. A Figura 4.1 e Figura 4.2 abaixo representam a cromatografia para 1 e 4 passes a 100 bar.

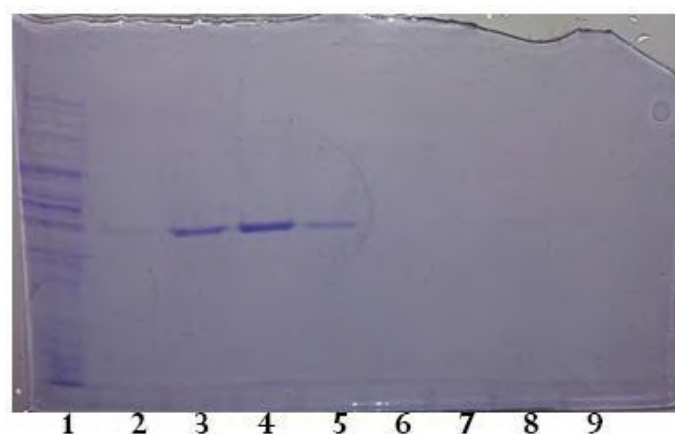


Figura 4.1 – Gel de poliacrilamida para a cromatografia da amostra obtida após rompimento celular a 100 bar 1 passe. 1- Amostra inicial; 2 até 9- Eluição.

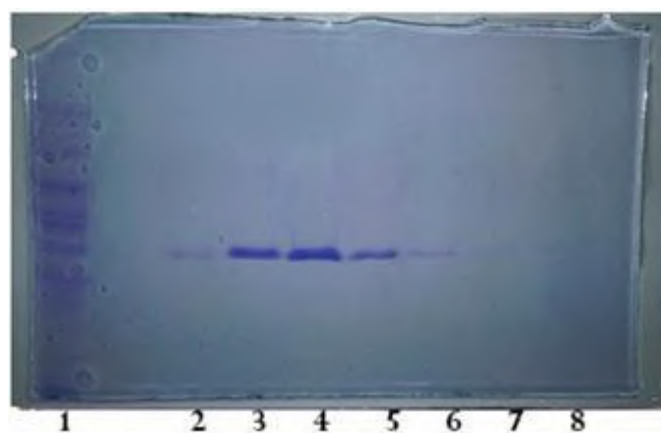


Figura 4.2 - Gel de poliacrilamida para a cromatografia da amostra obtida após rompimento celular a 100 bar 4 passes. 1- Amostra inicial; 2 até 9- Eluição

Como é possível observar, apenas uma banda aparece nas alíquotas de eluição, as quais consistem em grande parte da enzima L-asparaginase. Nota-se que apenas as alíquotas 3, 4 e 5 apresentam quantidades relevantes de enzima. Portanto essas foram recolhidas para análise. Como cada alíquota corresponde a 0,5 mL, 1,5 mL totais foram recolhidos para análise da concentração proteica após a passagem dos primeiros 0,5 mL de eluição. Essa mesma metodologia foi seguida para todas as cromatografias desse estudo de rompimento. Uma cromatografia de afinidade foi efetuada para a amostra resultante de cada condição de rompimento testada.

Os valores para a concentração das proteínas liberadas após a cromatografia das amostras de cada caso estão resumidos na Tabela 4.15, na qual é possível observar que as maiores concentrações obtidas são para as condições de 200 bar 4 passes e 400 bar 4 passes.

Tabela 4.15 – Concentração de proteína obtida após a cromatografia da amostra obtida com rompimento para 100, 200 e 400 bar com 1,2,3 e 4 passes. Médias e desvio padrão para triplicata.

Pressão (bar)	Passes	Concentração de proteína (mg/mL)	Desvio padrão (%)
100	1	0,02345	5,08
100	2	0,02723	4,73
100	3	0,02672	0,60
100	4	0,03121	0,93
200	1	0,03540	1,61
200	2	0,03611	0,72
200	3	0,05818	0,71
200	4	0,06671	2,20
400	1	0,02283	0,00
400	2	0,04347	0,98
400	3	0,05818	0,70
400	4	0,06604	3,00

Nos estudos de rompimento celular, é comum chegar a uma determinada condição em que todo o material celular é lisado e a quantidade de produto intracelular quantificado chega a um patamar constante, não importando o quanto aumente a força do rompimento. Para determinar se as concentrações obtidas são consideradas iguais entre os passes para cada pressão, foi realizado o teste ANOVA entre essas médias.

Foram comparadas as médias das concentrações de enzima entre 1 passe até 4 passes para as pressões 100, 200 e 400 bar. É possível observar pela Tabela 4.16 que os valores p seguem a desigualdade  $p < 0,05$  para todas as condições aferidas. Isso indicou que as médias obtidas são consideradas diferentes para o nível de confiança de 95%. Assim, observa-se que nenhum patamar de liberação de enzima é atingido durante o intervalo de considerações estudado.

Tabela 4.16 - Comparação pelo teste ANOVA entre as concentrações de proteína em cada grupo de pressão

Pressão (bar)	F	p
100	4,123	0,0484
200	176,241	0,0000
400	310,13	0,0000

Porém, para o caso de 100 bar é possível observar que o valor de p-valor está bem próximo de 0,05. De fato, pela Tabela 4.15, o desvio padrão para esse grupo é maior do que para qualquer outra pressão de rompimento e que para 2 passes há maior concentração de enzima do que para 3 passes. Os desvios padrão apresentados para esses dois casos permitiriam dizer que são os mesmos valores.

A análise pela ANOVA permite dizer se as médias em um grupo de análise são iguais ou não. Porém, não informa quais valores são considerados diferentes de quais. Com apenas um valor de média diferentes dos outros a ANOVA já acusaria a diferença entre as médias. Para saber quais valores diferem de quais é necessário realizar um teste de paridade. Um dos testes mais simples e usados é o de Duncan.

O teste de Duncan realizado pelo *software* STATISTICA para as médias dos grupos a 100, 200 e 400 bar são mostrados, respectivamente, nas Tabelas 4.17, 4.18 e 4.19. Os valores exibidos são os p-valor para a comparação entre cada uma das médias de concentração de proteína. Para um nível de significância de 95%, a comparação que possuir um p-level acima de 0,05 revela que as duas médias comparadas são consideradas iguais. Para cada grupo de pressão de rompimento, foram comparadas as médias obtidas pela variação de passes. É possível notar que para 100 bar a maior parte das concentrações são consideradas iguais uma vez que valores de p-level são maiores que 0,05 (em preto), a não ser para 1 e 4 passes já que os valores de p-level são menores que 0,05 (em vermelho) e justamente essa diferença entre as médias mais afastadas que a análise ANOVA considera para dizer que os valores são diferentes. Para 200 bar, apenas a relação entre os dois primeiros pontos é considerada igual, todos os outros pontos são considerados diferentes. Para 400 bar todas as médias são consideradas diferentes.



Tabela 4.17 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 100 bar de rompimento

Passes	1	2	3	4
1	-	0,140669	0,178754	0,011122
2	0,140669	-	0,823714	0,110203
3	0,178754	0,823714	-	0,087730
4	0,011122	0,110203	0,087730	-

Tabela 4.18 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 200 bar de rompimento

Passes	1	2	3	4
1	-	0,682320	0,000100	0,000077
2	0,682320	-	0,000223	0,000100
3	0,000100	0,000223	-	0,001129
4	0,000077	0,000100	0,001129	-

Tabela 4.19 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 400 bar de rompimento

Passes	1	2	3	4
1	-	0,000223	0,000100	0,000077
2	0,000223	-	0,000223	0,000100
3	0,000100	0,000227	-	0,001034
4	0,000077	0,000100	0,001034	-

Pela observação dos resultados na Tabela 4.15 é possível observar o aumento da concentração de proteína no meio pelo aumento da pressão e número de passes. Já o teste de Duncan nas Tabelas 4.17 até 4.19 comprovaram a diferença entre as médias em cada grupo de pressão, a exceção do grupo a 100 bar. Porém, as médias dos extremos desse grupo foram consideradas diferentes, o que pode indicar um comportamento de aumento de liberação de proteína. Assim, observou-se uma tendência geral de maior liberação da enzima com o aumento da pressão e do número de passes pelo homogeneizador, na extensão dos valores usados para essas variáveis.

Como é possível notar, há maior concentração de proteínas para os rompimentos a 200 bar 4 passes e 400 bar 4 passes. Para dar continuidade ao estudo, realizou-se o

rompimento com 7 e 10 passes para 200 e 400 bar além de 3, 4, 7 e 10 passes para 300 bar. As concentrações obtidas estão listadas na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 - Concentração de proteína obtida após a cromatografia da amostra obtida com rompimento para 200, 300 e 400 bar com 4, 7 e 10 passes.

Pressão (bar)	Passes	Concentração de proteína (mg/mL)
200	4	0,06671
200	7	0,08367
200	10	0,07687
300	3	0,09845
300	4	0,11700
300	7	0,07512
300	10	0,02896
400	4	0,06604
400	7	0,06451
400	10	0,05041

A análise ANOVA foi realizada para o rompimento a 200, 300 e 400 bar em 4, 7 e 10 passes. Foi constatado que existe uma diferença significativa entre as médias das concentrações de proteínas liberadas entre os passes para cada uma das pressões, uma vez que  $p\text{-valor} < 0,05$  em um nível de confiança de 95% (Tabela 4.21).

Tabela 4.21 - Análise ANOVA para rompimento a 200, 300 e 400 bar com 4, 7 e 10 passes

Pressão (bar)	F	p
200	29,37	0,0008
300	67,91	0,0000
400	44,74	0,0002

No intervalo de passes estudado para o rompimento, não se chega há um patamar em que o aumento de passes mantem a liberação de enzima constante, ao contrário, chega a diminuir, como pode ser observado na Figura 4.3.

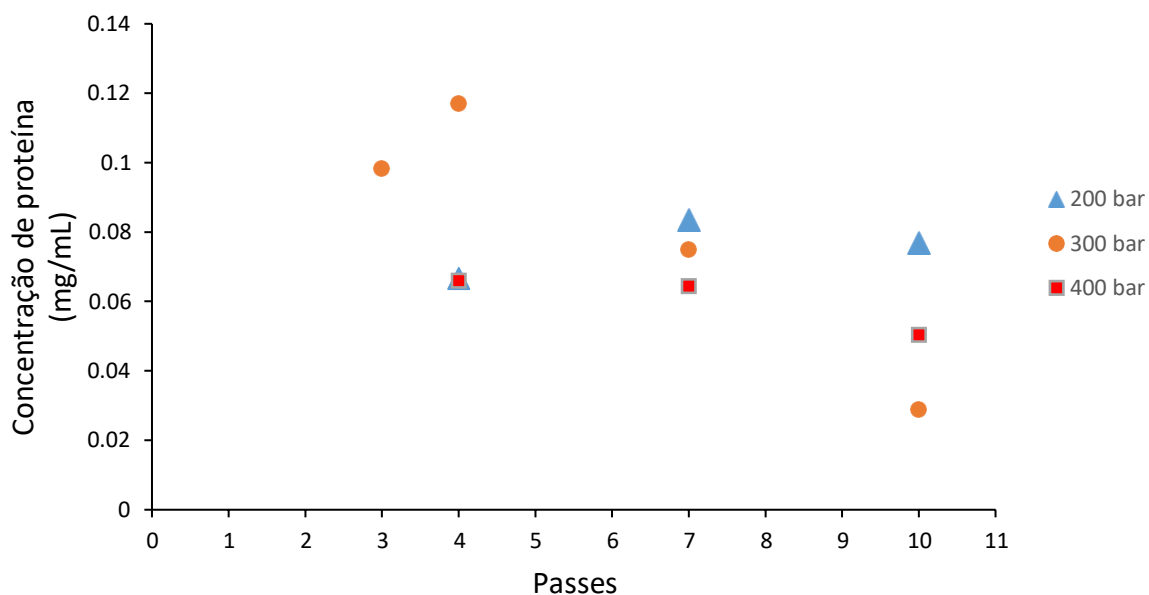


Figura 4.3 – Gráfico das concentrações de proteína para 200, 300 e 400 bar em função do número de passes.

Com a análise das diferenças menos significativas pelo método de Duncan, percebe-se que para cada grupo de pressão de rompimento não existe igualdade nas concentrações de enzima liberadas (Tabelas 4.22, 4.23 e 4.24).

Tabela 4.22 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 200 bar de rompimento

Passes	4	7	10
4	-	0,000414	0,004042
7	0,000414	-	0,022653
10	0,004042	0,022653	-

Tabela 4.23 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 300 bar de rompimento

Passes	3	4	7	10
3	-	0,021925	0,007402	0,000103
4	0,021925	-	0,000351	0,000077
7	0,007402	0,000351	-	0,000299
10	0,000103	0,000077	0,000299	-

Tabela 4.24 – Análise Duncan entre as concentrações de proteína no grupo de 400 bar de rompimento

Passes	4	7	10
4	-	0,432712	0,000262
7	0,432712	-	0,000470
10	0,000262	0,000470	-

Uma das causas para a diminuição de quantidade de enzima observada seria o fenômeno de agregação proteica. Uma vez que nas condições de maior quantidade de passes foi observado o aquecimento da solução, esse aumento da temperatura favorece a formação de agregados proteicos das estruturas que sofreram desnaturação no meio. O aumento da temperatura provoca o desnovelamento das proteínas, o que facilita a interação das regiões hidrofóbicas entre elas e provoca a formação de agregados (FINK, 1998; MALAU, 2016; BORZOVA et al., 2016). Tais agregados são passivos de serem separados durante as etapas de centrifugação, filtração ou até mesmo na etapa de ligação durante a cromatografia, uma vez que uma determinada concentração de imidazol permite o desfavorecimento de interações não específicas com a coluna. Além disso, o efeito da concentração de proteínas no meio também é relevante para a formação de agregados. Segundo Wolz et al. (2016), o aumento da concentração proteica numa condição de temperatura desnaturante pode provocar o aumento na agregação proteínas. Assim, nas condições de maior pressão e maior passe, em que se supõem liberar maior quantidade de material intracelular no meio, acaba sendo, na verdade, as piores condições para a enzima, pois a alta concentração proteica liberada, em conjunto com o calor gerado no processo, permitirá a formação de agregados, o que inviabiliza o processo nessas condições devido à perda de enzima.

A pressão de 400 bar foi a maior utilizada no estudo de rompimento. É intuitivo pensar que proporcionaria a maior liberação de enzima. Porém, nessa condição foi que aconteceu o maior aquecimento da amostra em comparação com as outras pressões. Com o maior aquecimento e a maior disponibilidade proteica no meio, o processo de formação de agregados se torna mais provável de acontecer do que nas pressões inferiores. Assim, o efeito de permitir a liberação de mais proteína pela maior pressão compete com a maior chance de formar agregados no meio. Essa competição pode explicar os dados contraditórios obtidos nesse experimento. Por exemplo, no caso de 300 bar, imagina-se

liberar mais enzima do que 200 bar devido a maior pressão exercida sobre as células, porém no decorrer do aumento de passes o efeito da temperatura acaba se sobrepondo, o que aumenta o número de agregados e causa a perda de enzima viável. A mesma explicação pode ser usada para comparar os dados para 400 bar e 300 bar. Em 4 e 7 passes a temperatura gerada em 300 bar é menor do que para 4 e 7 passes em 400 bar. Então, a quantidade de agregados formada seria menor para 300 bar do que para 400 bar, compensando a maior pressão de liberação para o segundo caso. Porém, em 10 passes, com o aumento da temperatura, o efeito da formação de agregados em 300 bar se sobrepõe a liberação de enzima pelo maior número de passes de uma forma superior ao que acontece em 400 bar, já que no segundo caso supõe-se maior liberação de enzima pela maior pressão.

Atividade específica para 400 bar e 10 passes foi de 114,67 UI/mg. Ou seja, para a maior pressão e quantidade de passes usada, a atividade específica ainda é maior do que a aferida no rompimento com o ultrassom, mesmo com o possível problema de agregação proteica causado pelo aquecimento e alta concentração do meio. Isso justifica o uso do homogeneizador ao invés do ultrassom como estratégia para o rompimento celular.

### **4.3 Purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica**

#### **4.3.1 Cromatografia de afinidade**

Após o tratamento de filtração e concentração do sobrenadante do cultivo, foi realizado o teste de atividade do mesmo, resultando num valor de 0,227 UI/mL. Isso mostra um baixo valor de atividade para essa amostra concentrada. O trabalho com amostra de baixa atividade em um meio que contém naturalmente muita proteína não apresenta nenhum atrativo devido à baixa quantidade de proteína que poderia ser purificada. Além disso, o processo de concentração do sobrenadante do cultivo, de modo a gerar amostras de atividade mais confortável para o estudo, levaria maior tempo se comparado ao extrato obtido pelo processo de lise celular, se o mesmo apresentar uma

solução com atividade relevante. Por isso, o procedimento de rompimento celular foi efetuado com pellets do cultivo buscando-se observar uma atividade maior.

Após o rompimento celular, separação dos pellets pela centrifugação, e ressuspensão dos mesmos em solução tampão, as frações de 40 mL (amostras 1 e 2) e a de 30 mL (amostra 3) foram avaliadas quanto a atividade e a quantidade de proteínas de forma a evidenciar o rompimento celular. As amostras 1 e 3 foram rompidas a 800 psi e a amostra 2 a 1200 psi pela prensa de French. Os ensaios de atividade obtiveram valores de 8,67; 14,9 e 5,58 UI/mL para as amostras 1, 2 e 3 respectivamente. Com esse resultado já é possível afirmar que o aumento da pressão na lise celular foi capaz de liberar maior quantidade de material intracelular, abrindo espaço para descobrir uma condição ótima de rompimento. Os valores das concentrações de proteína para as amostras na mesma ordem são: 4,55; 7,16 e 3,19 mg/mL, respectivamente, comprovando a maior liberação de proteína pela maior pressão aplicada. Os dados de atividade e concentração de proteína para o rompimento com a prensa de French estão resumidos na Tabela 4.25.

Tabela 4.25 - Atividade enzimática e concentração de proteína para as amostras obtidas pelo rompimento com a prensa de French.

Amostra	Atividade (UI/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)
1	8,67	4,55
2	14,90	7,16
3	5,58	3,19

A cromatografia de afinidade da amostra 2 foi realizada utilizando 5 mL diluídos em 5 mL de solução de diluição. A etapa de ligação utilizou 10 mM de imidazol e a eluição a 300 mM de imidazol. As alíquotas coletadas da cromatografia são observadas no gel de eletroforese na Figura 4.4.

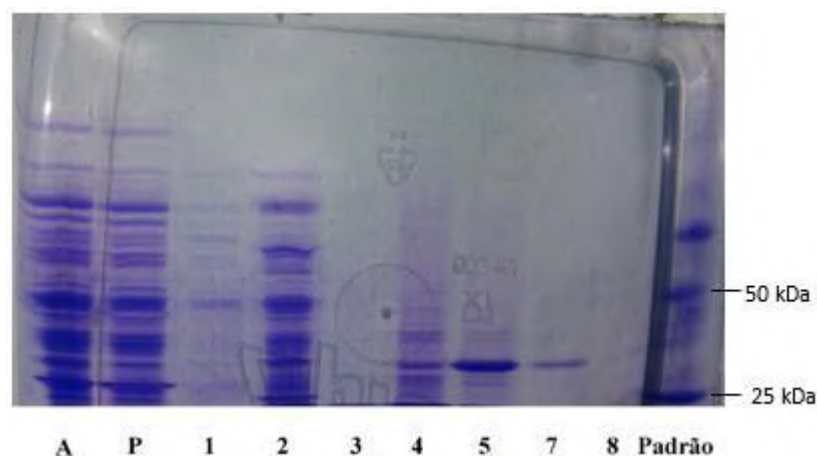


Figura 4.4 – Gel de poliacrilamida para a cromatografia de afinidade de 5 mL da amostra 2. A- Amostra inicial; P- Passagem da amostra (passe); 1- Lavagem I (10 mM imidazol); 2- Início da lavagem II (70 mM imidazol); 3- Final da lavagem II (70 mM imidazol); 4 até 8- Frações de 0,5, 1, 2, 3 mL de eluição<sup>2</sup>; Padrão- padrão de peso molecular

É possível observar que a alíquota 5 possui uma banda de proteína bem visível além de não apresentar outras bandas com a mesma intensidade. Como a massa molecular está no intervalo de 25 até 50 kDa e ensaios de atividade constataram atividade enzimática, é possível que essa banda se trate da enzima L-asparaginase uma vez que a mesma possui 37,8 kDa de massa molar em suas unidades tetraméricas (EINSFELDT, 2014). Além disso, na alíquota 7 aparece o mesmo padrão que em 5, porém muito mais fraco que o anterior, de forma que a enzima já deve possuir uma concentração mais baixa nessa alíquota. Da mesma forma, a alíquota 8 não apresenta praticamente nenhuma banda visível, o que demonstra que a proteína de interesse saiu em maior concentração nas alíquotas anteriores. A coluna correspondente ao padrão de peso molecular não apresenta boa visibilidade das suas bandas já que a solução padrão encontrava-se desnaturada. Como em apenas 4,5 mL de eluente não há mais evidencia da saída de enzima, é possível que a concentração de 300 mM de imidazol apresente uma rápida eluição da enzima purificada.

Para avaliar se toda enzima foi purificada, foi efetuado o reprocessamento do passe dessa última cromatografia. Assim é possível verificar se ocorre perda relevante da

<sup>2</sup> A alíquota 6 que consiste na passagem de 1,5 mL de eluição não foi utilizada na eletroforese

enzima no processo por eventual saturação da coluna ou insuficiente tempo de contato da amostra com a matriz (Figura 4.5).

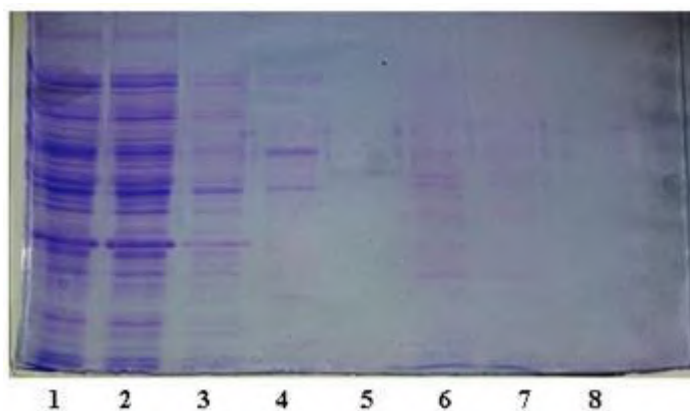


Figura 4.5 – Gel de poliacrilamida para o reprocessamento da amostra 2. 1- Amostra inicial; 2- Passe de toda a amostra inicial; 3- Lavagem I; 4- Lavagem II; 5 até 8- Frações de eluição

Como é possível observar, nenhuma banda significativa foi encontrada nas alíquotas de eluição, de maneira que é possível concluir que a maior parte da enzima conseguiu ser purificada com apenas uma passagem pela coluna. Isso mostrou que não é necessária uma etapa de reprocessamento da amostra, pois uma passagem pela coluna na vazão utilizada foi o suficiente para separar a maior parte da enzima contida.

#### **4.3.2 Efeito da concentração de imidazol**

Ao realizar a cromatografia com 10 mL da amostra 2 diluída em 10 mL de solução de diluição foi feita também uma terceira e quarta etapa de lavagem de forma a observar o efeito da concentração de imidazol na lavagem. Essas etapas extras utilizaram solução com 70 e 100 mM de imidazol e foram passados 3 volumes de coluna em cada lavagem. Além disso, a eluição foi recolhida em frações menores de forma a observar a concentração da enzima que é eluída no decorrer do processo (Figura 4.6).



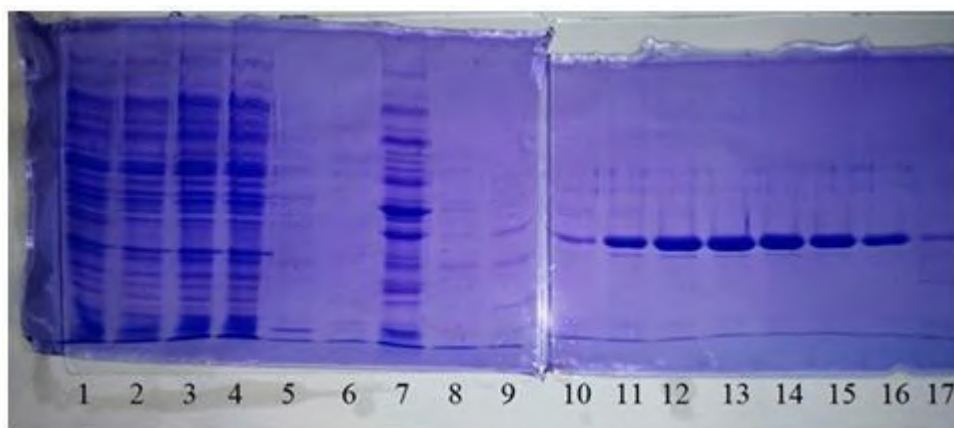


Figura 4.6 – Géis de poliacrilamida para a cromatografia de afinidade de 10 mL da amostra 2. 1- Amostra Inicial; 2 até 4- Amostras de passe (quando passaram 1, 10 e 18 mL da amostra inicial, respectivamente); 5- Início da lavagem I (10 mM de imidazol); 6- Final da lavagem 1; 7- Início da lavagem II (70 mM de imidazol); 8- Final da Lavagem II; 9- Início da Lavagem III (100 mM de imidazol); 10 até 17- Frações de eluição

As amostras de passe e inicial apresentam grande equivalência nas aparências das bandas, como deveria ser por se tratarem da mesma solução, porém essas alíquotas foram observadas de modo a notar se alguma banda presente em alguma alíquota não estava presente na seguinte, indicando a ligação da substância referente a essa banda na coluna. O gel resultante evidencia tal comportamento com uma banda na alíquota da amostra inicial. Tal banda está na mesma altura das bandas mais fortes das alíquotas de eluição e não é observada nas amostras de passe, ou seja, a proteína correspondente conseguiu ligar na matriz da coluna.

As alíquotas de lavagem 1 não apresentaram grande quantidade de proteínas, podendo deduzir que ela não foi eficiente em remover as proteínas adsorvidas de forma não específica. Já a alíquota referente a lavagem 2 (70 mM de imidazol) apresenta um padrão de distribuição mais forte, o que significa ter sido eficiente na remoção dessas proteínas, uma vez que a alíquota referente ao final dessa lavagem não apresenta mais quantidades relevantes de proteína. É possível que a essa concentração sejam desfavorecidas as ligações não específicas das proteínas do meio, porém, ao mesmo tempo, é uma concentração forte o suficiente para provocar a eluição da enzima, uma vez que se observa a saída de bandas com mesma altura das que aparecem na eluição

A lavagem 3 também não parece ter sido efetiva na retirada de nenhuma proteína apesar da maior concentração de imidazol. Uma vez que a lavagem 2 foi bem-sucedida uma grande variedade de bandas, é natural que a lavagem 3 não apresente nenhuma quantidade relevante de contaminantes. Porém, já é observada a saída de uma banda na mesma altura das bandas de eluição. Isso mostra que a 100 mM de imidazol seria forte demais para a lavagem, uma vez que há perda de enzima junto com os contaminantes.

As alíquotas 11 até 16 foram misturadas e avaliadas com os testes de atividade e Bradford de modo a determinar a atividade específica da enzima após a cromatografia. O resultado obtido para a atividade foi de 13,5 UI/mL e 148,35 UI/mg de atividade específica.

A amostra anterior foi comparada por eletroforese (Figura 4.7) a banda da enzima obtida pela purificação (banda da direita) com a L-asparaginase comercial da Elspar (banda da esquerda). É possível observar que a banda correspondente a enzima comercial fica ligeiramente abaixo da enzima purificada. Esse resultado era o esperado porque a proteína comercial possui massa molar por volta de 31,7 kDa, enquanto a obtida no laboratório possui 37,8 kDa. O que mostra que a enzima purificada pela cromatografia de afinidade teve uma massa molecular semelhante à esperada.

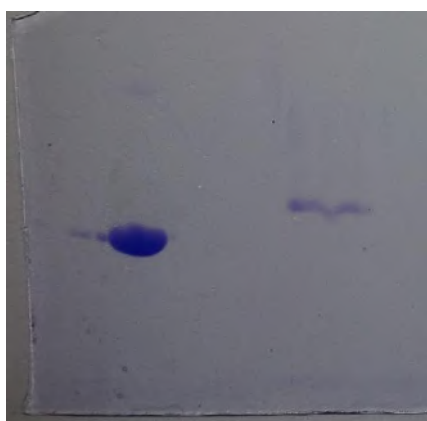


Figura 4.7 - Gel de comparação entre as bandas da enzima obtida no laboratório (direita) e da enzima comercial Elspar (esquerda)

Todo o pellet que sobrou da amostra 2 após o processamento pela prensa de French foi ressuspendido em solução tampão fosfato 66mM pH 8 e processado no ultrassom em banho com gelo. Ao realizar a cromatografia com a mesma metodologia

anterior, o resultado pelo gel de eletroforese das etapas de passe, lavagem e eluição apresentaram distribuições de bandas semelhantes ao caso anterior, porém com bandas bem mais fortes na etapa de eluição (Figura 4.8).

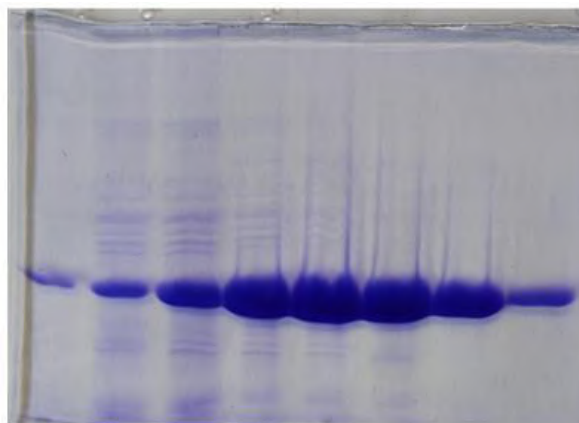


Figura 4.8 – Gel de poliacrilamida com as frações de eluição da cromatografia de afinidade dos pellets da amostra 2 rompidos com ultrassom.

A atividade e quantidade de proteína aferidas são 18 UI/mL e 0,39 mg/mL, respectivamente. Isso resulta em uma atividade específica de 46,15 UI/mg. Tal valor sugere perda de atividade específica pelo tratamento com o ultrassom ao comparar com a atividade obtida quando o processo de rompimento foi a prensa de French (Tabela 4.26), o que pode ser ocasionado pela desnaturação da enzima devido ao aumento de temperatura e das forças cisalhantes no meio.

Tabela 4.26 - Comparação entre as atividades enzimáticas para as amostras obtidas após o rompimento celular pela prensa de French e ultrassom

Amostra	Atividade (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)
Rompido pela prensa de French	13,5	148,35
Rompido pelo ultrassom	18	46,15

Esse fenômeno de desnaturação é muito comum no rompimento de células por ultrassom (HUANG & CHENG, 2015). Porém, é possível notar pela espessura das bandas

que ainda há uma grande quantidade de enzima no interior das células. Isso leva a necessidade de um estudo das melhores condições de rompimento.

Para testar a passagem de uma quantidade maior de enzima pela coluna, foi realizada a cromatografia dos sobrenadantes das amostras 1 e 3 obtidas pelo rompimento da prensa de French de uma única vez (Figura 4.9). A concentração de proteína após a cromatografia foi determinada como 0,62 mg/mL. Como observado pelas eletroforeses anteriores, grande parte dessa concentração se deve a enzima. Tal procedimento foi realizado para observar se a coluna iria saturar com toda a quantidade de proteína disponível. Isso seria visto através de bandas que não aparecem nos primeiros passes mas começam a surgir nas alíquotas de passes seguintes. Esse comportamento não foi observado, levando a crer que a coluna não foi capaz ser saturada pelas enzimas do meio. De fato, segundo o manual da GE Healthcare, esse modelo de coluna tem uma capacidade de até 40 mg de proteína com cauda de histidina por mL de meio, o que é muito superior a quantidade de enzima que se utiliza normalmente como amostra.

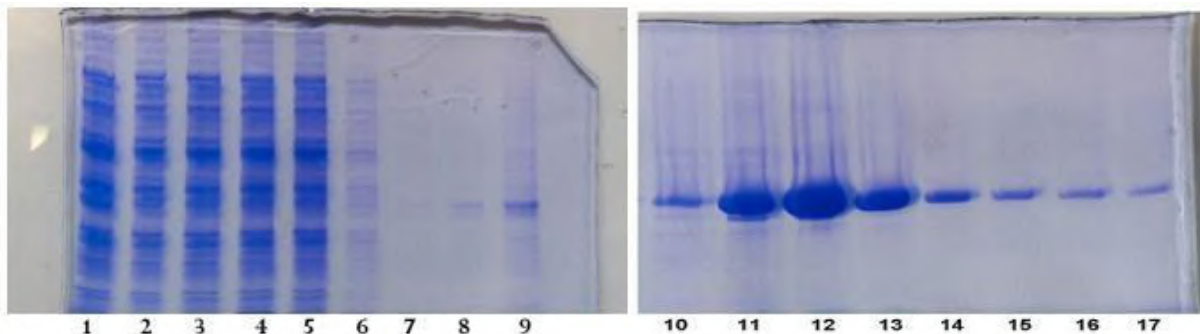


Figura 4.9 – Gel de poliacrilamida para a cromatografia de afinidade das amostras 1 e 3. 1- Amostra Inicial; 2 até 5- Amostras de passe (quando passaram 5 ml, 20 ml e 50 ml e 103 ml respectivamente); 6- Início da Lavagem I (60 mM de imidazol); 7- Final da Lavagem I; 8- Início da Lavagem III (100 mM de imidazol); 9- Final da Lavagem III; 10 até 17- Frações da eluição

Para observar novamente se haveria enzima intracelular a ser liberada, os pellets que sobraram das amostras 1 e 3 foram rompidos com ultrassom e reunidos em uma única amostra para cromatografia. O gel com as alíquotas de eluição mostra que há ainda muita enzima intracelular a ser retirada (Figura 4.10).

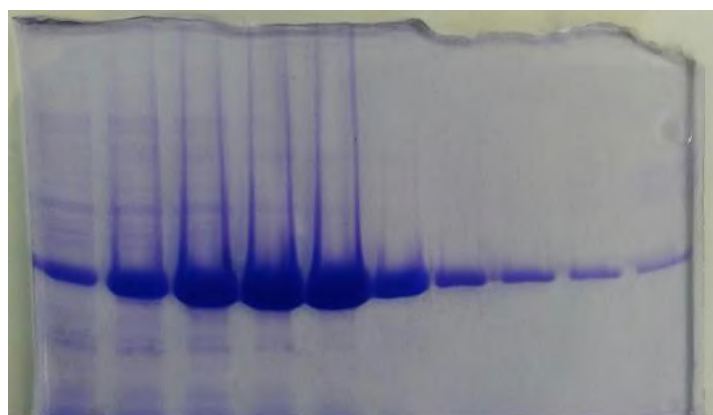


Figura 4.10 - Gel de poliacrilamida com as frações de eluição da cromatografia de afinidade dos pellets das amostras 1 e 3 rompidos com ultrassom.

A cromatografia para o gel da Figura 4.9 foi realizada com uma concentração de 60 mM imidazol na solução de ligação e lavagem. Além disso, foi realizada uma etapa de lavagem a mais a 100 mM de imidazol para testar o seu efeito. Os resultados da eletroforese mostraram a lavagem com 60 mM como a que obtém grande variedade de bandas em sua alíquota, o que prova ser uma lavagem eficiente. Diferentemente do caso da Figura 4.6, em que a lavagem com a mesma solução de ligação não obteve a saída de contaminantes. Isso ocorre porque a 60 mM na etapa de ligação as interações de contaminantes com a coluna é diminuída de forma que ao passar a solução de lavagem grande parte dos contaminantes saem nas alíquotas de lavagem. Porém, ainda aparecem bandas nas alturas das bandas de eluição, mostrando que ainda há perda de enzima no processo. Já para 100 mM é possível observar a presença de uma banda bem aparente na altura da banda de eluição, o que também aponta para a saída de enzima nessa concentração de lavagem.

Para descobrir a concentração de imidazol necessária para minimizar as perdas, a etapa de ligação foi realizada com soluções tampão fosfato 66mM pH 8 nas concentrações de 10 mM, 50 mM, 100 mM e 150 mM de imidazol. As amostras utilizadas são de enzimas já purificadas pelas cromatografias anteriores, das quais as alíquotas de eluição obtidas foram reunidas em uma única solução, a qual foi empregada nesse estudo.

As cromatografias resultaram em alíquotas de passe, lavagem e eluição de 0,5 mL. Em seguida a cromatografia, foram feitas eletroforeses para determinar a saída ou não da

enzima nessas alíquotas. As eletroforeses resultantes para cada caso são mostradas nas Figura 4.11 até Figura 4.14.



Figura 4.11 – Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 10 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 7- Lavagens; 8 até 14- Eluições



Figura 4.12 - Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 50 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 8- Lavagens; 9 até 18- Eluições

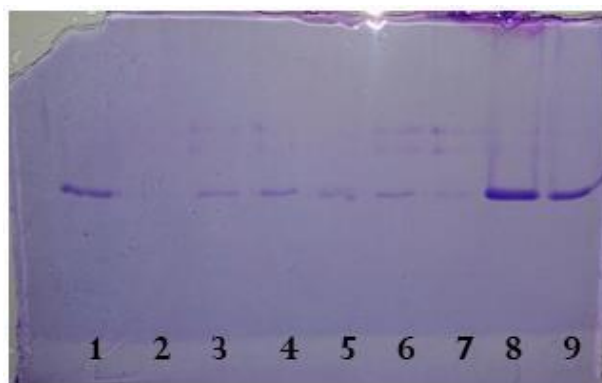


Figura 4.13 - Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 100 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 7- Lavagens; 8 até 9- Eluições



Figura 4.14 - Gel de poliacrilamida para cromatografia de afinidade com solução de ligação 150 mM de imidazol. 1- Passe; 2 até 7- Lavagens; 8 até 9- Eluições

Nos casos a 10 e 50 mM de imidazol é possível observar que não há saída de enzima nas alíquotas de lavagem. Isso demonstra que a enzima, nessas concentrações, efetua uma ligação forte o suficiente com a matriz da coluna a ponto de não sair durante o processo de lavagem. O equilíbrio de interação da enzima com a matriz está deslocado para a formação da interação entre ambos. Já para as concentrações de 100 e 150 mM é possível observar a saída de enzima nas frações de lavagem. Isso aponta que o equilíbrio de interação entre a enzima e a coluna está desfavorecendo a ligação entre eles. Em tais concentrações o imidazol foi forte o suficiente para priorizar a sua ligação com os orbitais de níquel na matriz ao invés da enzima.

A cromatografia de amostras com 14,83 UI/mg de atividade específica após o rompimento celular, obteve 178 UI/mg de atividade específica no purificado ao realizar o procedimento na condição determinada acima, com 50 mM de imidazol na ligação e lavagem. A recuperação do processo obtido pela razão das atividades enzimáticas antes e depois da cromatografia multiplicadas pelos respectivos volumes de amostra é de 88%. Ou seja, 18% da atividade da enzima aplicada na cromatografia é perdida durante a operação (Tabela 4.27).

Tabela 4.27 - Dados de recuperação, fator de purificação e atividade enzimática pela cromatografia de afinidade. Coluna HisTrap HP, 1 mL

Amostra	Atividade (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)	Recuperação da enzima	Recuperação de proteína	Fator de purificação
Extrato	5,63	14,83	88%	18,4%	12
Purificado	12,46	178,48			

O valor de atividade específica é próxima da atividade específica da L-asparaginase purificada em trabalhos na literatura (DIASTASIO et al., 1976; CHAN et al., 2014; ELSPAR, 2000). Além disso, possui um valor próximo da enzima comercial Elspar<sup>®</sup> que possui atividade específica em torno de 200 UI/mg (ELSPAR, 2000).

### 4.3.3 Cromatografia de troca iônica

Para a separação cromatográfica por troca iônica de um composto é necessário primeiramente saber em quais concentrações de eluente ele sairá, além outros possíveis compostos contaminantes no meio. Para isso é realizado um gradiente de concentração do eluente e observa-se quais picos são formados no processo e quais as concentrações de eluente correspondentes aos mesmos. Em seguida, para separar cada pico é realizado



uma eluição na concentração determinada onde o pico da substância de interesse foi observado.

A troca iônica foi realizada para uma amostra resultante da etapa de purificação de cromatografia de afinidade. Tal amostra possuía concentração de proteína de 0,54 mg/mL e atividade de 14,46 UI/mL (Tabela 4.28). O baixo valor para a atividade, a despeito dos valores anteriores apresentados após a cromatografia de afinidade, se deve ao tempo em que a amostra ficou armazenada até poder ser realizada a troca iônica. Uma mostra de 500  $\mu$ L foi diluída com 500  $\mu$ L de solução tampão fosfato 66 mM pH 8 de forma a compor um volume mais confortável de se aplicar no cromatógrafo. A Figura 4.15 é o cromatograma obtido para o processo. É possível observar um pico principal com dois ombros adjacentes a partir de 55 minutos do início do processo.

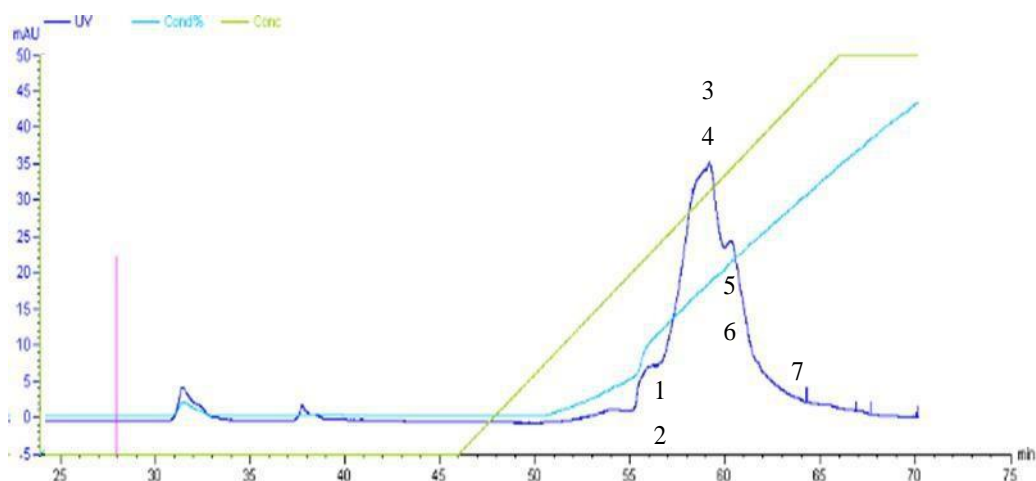


Figura 4.15 – Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 500  $\mu$ L em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A etapa de eluição e realizada com um gradiente de 0 até 100 % de solução tampão fosfato 66 mM pH 8 com 1 M de NaCl. Curva azul escuro representa a absorvância a 280 nm. A curva azul claro representa a variação da condutividade em porcentagem. A curva verde representa a concentração em porcentagem de solução de eluição.

Amostras correspondentes ao pico principal e os ombros adjacentes foram recolhidas para análise qualitativa da atividade enzimática. As amostras foram utilizadas para o ensaio sem nenhuma diluição. Foi observado que apenas o primeiro ombro gerava um composto com atividade enzimática relevante como demonstrado na Figura 4.16.

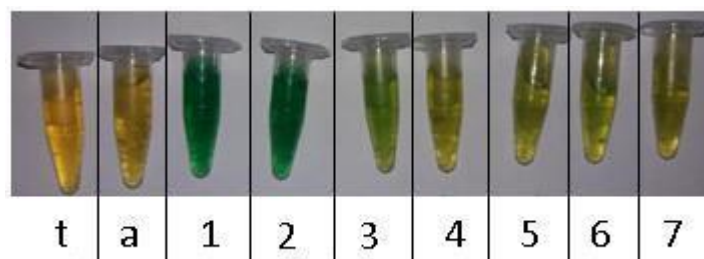


Figura 4.16 – Fotografia do meio reacional da atividade enzimática para as amostras provenientes da separação por troca iônica. T- Solução tampão utilizada no ensaio de atividade; A- amostra de L-asparagina usada para a reação enzimática no ensaio; 1 e 2- primeiro ombro; 3 e 4- pico principal; 5 e 6- segundo ombro; 7- cauda final. A intensidade da coloração esverdeada indica a presença de L-asparaginase na amostra

Na Figura 4.16, a amostra rotulada como “t” corresponde ao tampão eluente, mostrando que a solução não reage ao ensaio, podendo considerá-lo como não interferente; a amostra “a” corresponde a solução de L-asparagina usada no ensaio; amostras 1 e 2 correspondem ao primeiro ombro; amostras 3 e 4 correspondem ao pico principal; amostras 5 e 6 correspondem ao segundo ombro; e 7 ao final do segundo ombro. A amostra 3 apresenta uma coloração um pouco mais esverdeada do que as outras amostras além de 1 e 2. É possível que essa presença da enzima seja apenas o resto do que saiu para as amostras 1 e 2. Como o ensaio de atividade foi realizado sem nenhuma diluição das amostras, a coloração para amostra 3 representa uma quantidade de enzima ativa muito pequena para ser considerada.

A condição de saída para o primeiro ombro foi correspondente a 20 % de eluente (solução tampão de fosfato 66 mM, pH 8, NaCl 1M). Portanto, essa concentração foi usada como para uma nova cromatografia de forma a observar o comportamento de saída da enzima.

Uma nova cromatografia foi realizada com mesma amostra inicial da cromatografia anterior. Um volume de 1 mL foi utilizado, sendo diluído com 1 mL de solução tampão da mesma forma que a amostra da cromatografia anterior. Foi configurado a passagem de um degrau de concentração de 20% de eluente após a etapa de lavagem. É possível observar pela Figura 4.17 até Figura 4.19 a saída de apenas um

pico na concentração de 20%, enquanto outros dois picos são obtidos de forma conjunta ao longo do gradiente de 20% até 100%. Esse último gradiente foi implementado para observar a possível saída do pico principal e segundo ombro constatados na última cromatografia.

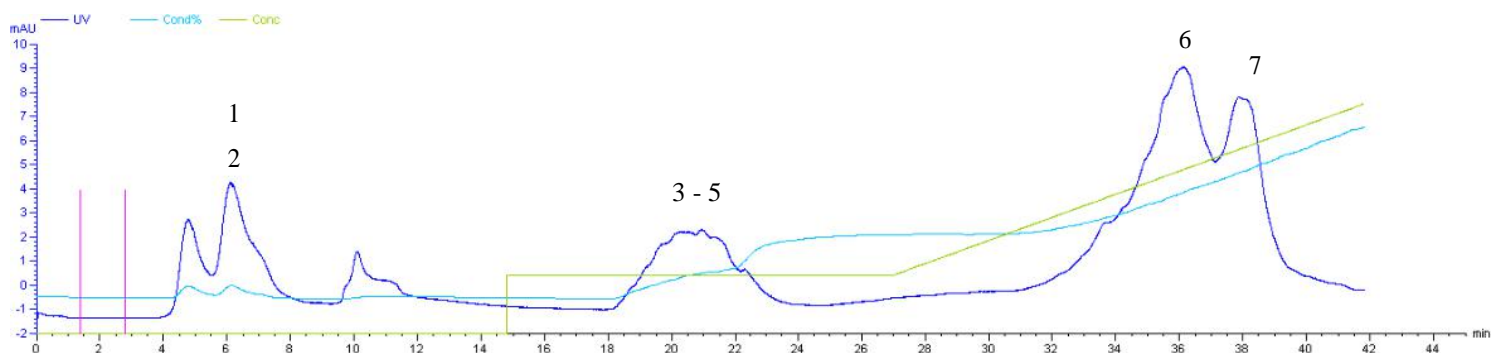


Figura 4.17 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 1 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em mili unidades de absorção e eixo horizontal em minutos.

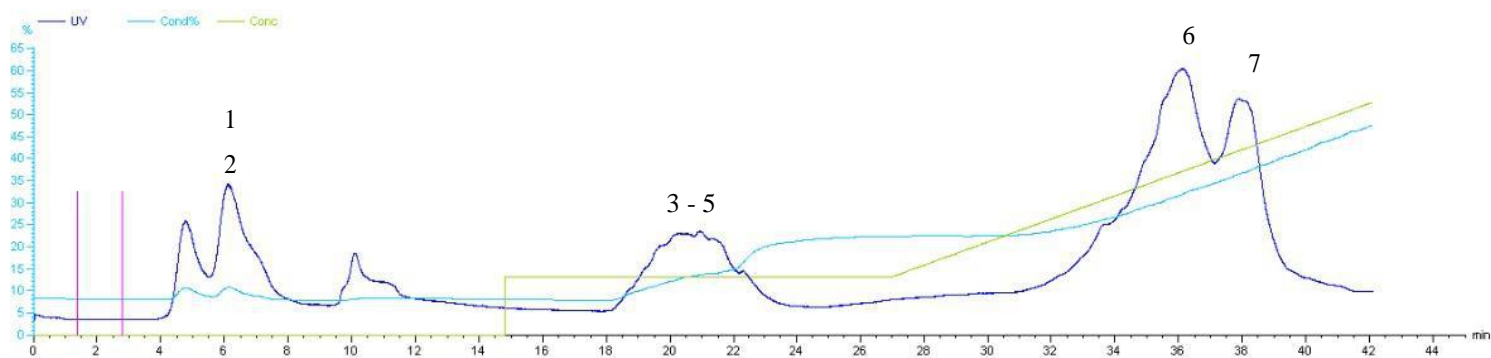


Figura 4.18 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 1 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de condutividade e eixo horizontal em minutos.

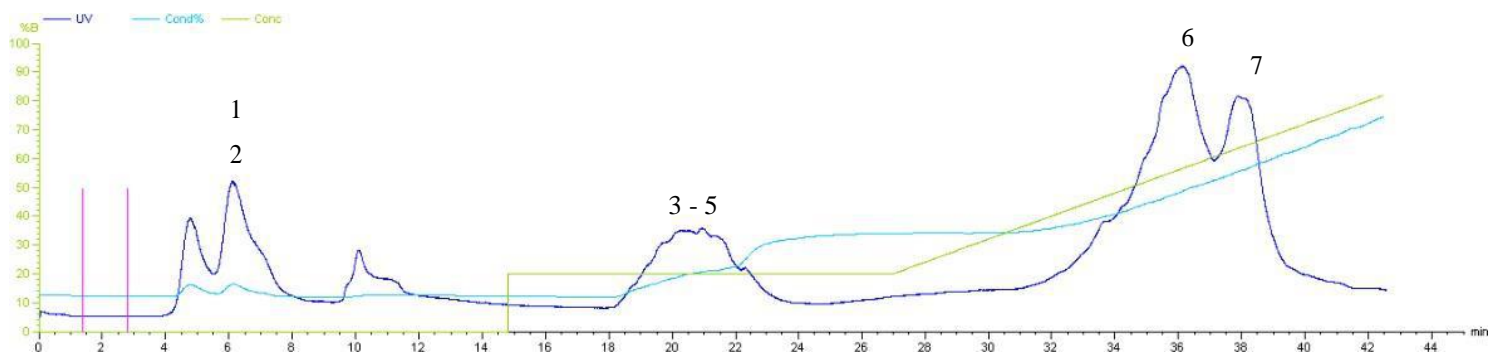


Figura 4.19 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 1 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de solução de eluição e eixo horizontal em minutos.

A análise qualitativa das atividades obtidas nesses picos (Figura 4.17 – Figura 4.19), efetuada da mesma forma que a anterior, propõe que o primeiro pico é o único que apresenta atividade enzimática relevante.

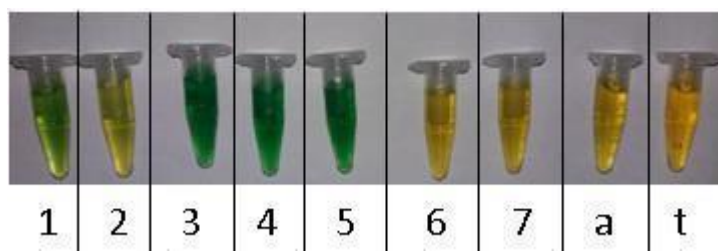


Figura 4.20 - Fotografia do meio reacional da atividade enzimática para as amostras provenientes da separação por troca iônica. T- Solução tampão utilizada no ensaio de atividade; A- amostra de L-asparagina usada para a reação enzimática no ensaio; 1 e 2- pico de passe da amostra; 3 até 5- primeiro pico da eluição; 6 e 7- Dois últimos picos da eluição

As amostras rotuladas como “t” e “a” na Figura 4.20 representam as soluções tampão e L-asparagina usada no ensaio, que são as mesmas do ensaio anterior; amostras 1 e 2 correspondem a amostra de passagem pela coluna no minuto 6; a amostra 3, 4 e 5 correspondem ao primeiro pico de eluição; e as amostras 6 e 7 correspondem aos últimos picos de eluição. As amostras de passe constataam que a maior parte das enzimas ficaram retidas na matriz, saindo na etapa de eluição.

Tal comportamento pode ser observado novamente até mesmo com maior quantidade de enzima. Foi aplicado 4 mL de amostra adotando a mesma metodologia da cromatografia anterior. O cromatograma gerado (Figura 4.21 – Figura 4.23) mostra que a metodologia adotada para a purificação através da troca iônica funciona da mesma forma mesmo com uma quantidade superior de enzima a ser separada.

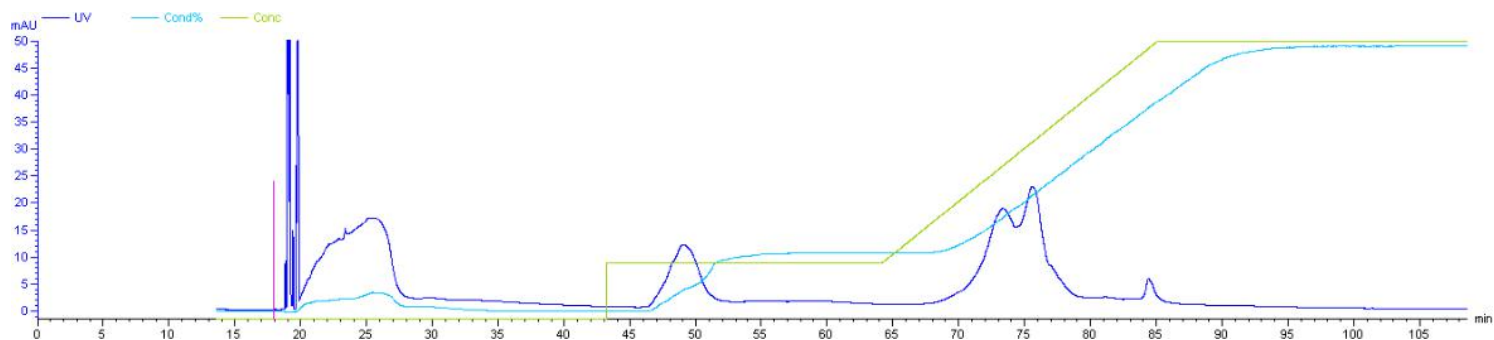


Figura 4.21 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 4 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em mili unidade de absorção e eixo horizontal em minutos.

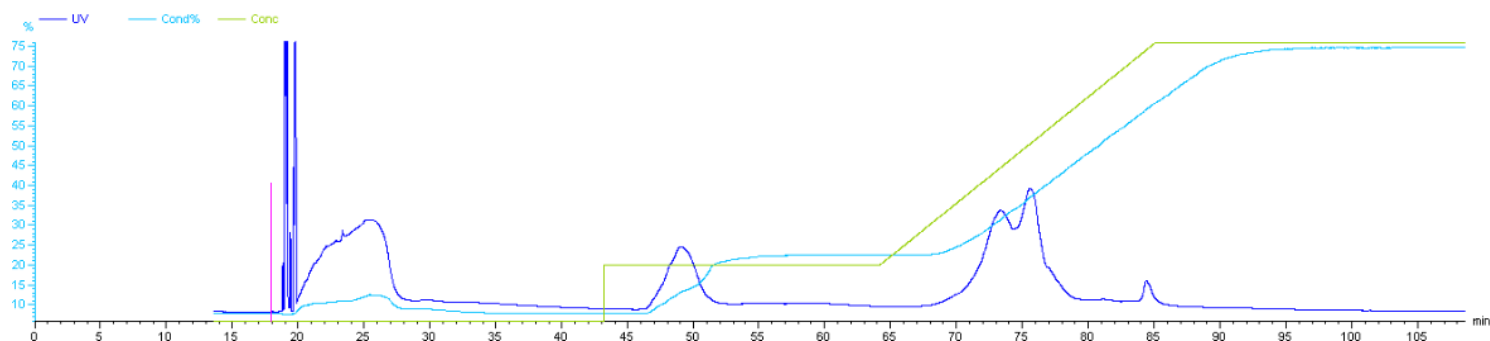


Figura 4.22 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 4 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de condutividade e eixo horizontal em minutos.

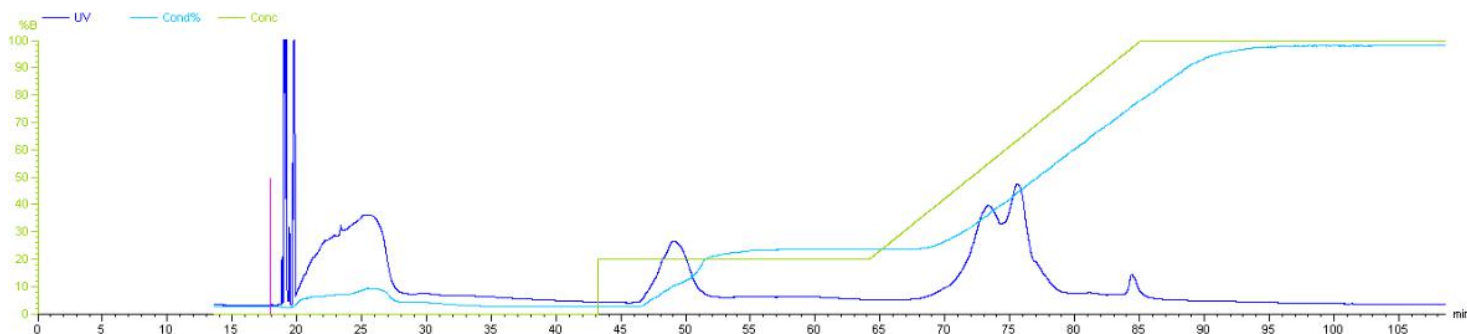


Figura 4.23 - Cromatograma para a cromatografia de troca iônica da amostra 4 mL em solução tampão fosfato 66 mM pH 8, 25°C, coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL. A eluição é efetuada primeiro com um degrau a 20% e depois um gradiente de 20% a 100%. Eixo vertical em porcentagem de solução de eluição e eixo horizontal em minutos.

A atividade específica para amostra antes da troca iônica e depois da troca iônica foram determinadas para a cromatografia da amostra de 4 mL, obtendo-se 3,55 como fator de purificação e um fator de recuperação de 69,5% (Tabela 4.28). Ao aliar a troca iônica com a cromatografia de afinidade, será possível obter uma atividade específica bem próxima à da enzima comercial Elspar (200 UI/mg) uma vez que apenas com a cromatografia de afinidade já foi possível obter em torno de 178 UI/mg. Porém, tal fato não pode ser comprovado devido à perda de atividade pelo armazenamento, como já mencionado.

Tabela 4.28 - Dados de recuperação, fator de purificação e atividade enzimática pela cromatografia de troca iônica. Coluna HiScreen Q HP, 4,7 mL.

Amostra	Atividade específica (UI/mg)	Recuperação de enzima	Fator de purificação
Extrato	26,77	69,5%	3,55
Purificado	95,06		

A Tabela 4.29 resume os dados de recuperação e fator de purificação para as cromatografias de afinidade e troca iônica.

Tabela 4.29 – Resumo dos dados de recuperação de enzima e fator de purificação das cromatografias de afinidade e troca iônica. Colunas Histrap HP, 1mL e HiScreen Q HP, 4,7 mL, a 25°C

Tipo de cromatografia	Recuperação de enzima	Fator de purificação
Afinidade	88,0%	12,10
Troca iônica	69,5%	3,55

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram determinadas condições para a extração e purificação da enzima L-asparaginase produzida através do gene modificado de *Zymomonas mobilis* e expressada pela bactéria *Escherichia coli*.

Um das primeiras medidas foi realizar um estudo das curvas padrões para os principais testes analíticos realizados nesse trabalho, a quantificação de proteína por Bradford e o teste de atividade enzimática. A concentração de proteína das amostras deste trabalho pode ser aferida de modo a não ser necessário realizar uma curva padrão para cada análise num intervalo de 3 dias. O que mostra certa robustez quanto a repetição do procedimento no intervalo de tempo observado. Já a curva padrão de atividade enzimática necessita ser aferida a cada novo ensaio de atividade devido ao método não conseguir replicar a curva padrão nas mesmas condições. Além disso, é necessária a presença da L-asparagina na solução de sulfato de amônio para a determinação mais acurada da atividade. Os volumes a serem utilizados no ensaio pelo reagente 1, 2 e amostra de análise são 0,7 mL, 0,7 mL e 14  $\mu$ L, respectivamente.

Ao testar as condições de ruptura celular, a enzima apresenta melhor atividade enzimática com o uso do homogeneizador a alta pressão em relação ao ultrassom, ao qual se determina nesse trabalho 300 bar e 4 passes como a condição que resulta na maior liberação de enzima. Como o homogeneizador é um equipamento geralmente utilizado na indústria, os parâmetros encontrados podem servir para um eventual escalonamento visando a produção em larga escala da enzima.

A L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* obtida por via recombinante em *Escherichia coli* pode ser isolada por cromatografia de afinidade por íons de níquel imobilizados em solução tampão fosfato 66 mM pH 8 em que as soluções de ligação e lavagem possuem 50 mM de imidazol e a de eluição possui 300 mM de imidazol. A solução de ligação citada apresenta um eficiente favorecimento das interações da enzima com a coluna e o desfavorecimento das interações não específicas no meio. O processo cromatográfico utilizando a coluna comercial para cromatografia de afinidade por íons de



níquel imobilizados necessita de apenas uma passagem de amostra para reter a maior parte da L-asparaginase, não precisando de uma etapa de reprocessamento. Amostras obtidas pelo processo padronizado de cultivo, expressão e rompimento apresentam uma atividade de 5,63 UI/mL e podem ser aplicadas em um volume de amostra de 10 mL por mL de coluna. A purificação nessa etapa apresenta um fator de purificação de 12,1 e recuperação de 88% da enzima, o que mostra ser um procedimento eficaz e de baixa perda. Já para a cromatografia de troca iônica, o processo apresenta capacidade de purificar ainda mais a amostra já purificada pela cromatografia de afinidade ao ser utilizado solução tampão fosfato 66 mM pH 8 para a etapa de ligação e de lavagem e 20% da mesma solução tampão com 1M de NaCl para a etapa de eluição. Foi obtido um fator de purificação de 3,55 e uma recuperação de 69,5%.

Assim, pelos dados obtidos no trabalho foi possível encontrar um processo eficaz não só para a obtenção da enzima do meio intracelular das células produtoras, mas também para a sua purificação. Desse modo será possível dar continuidade para aos estudos para obter a L-asparaginase comercial brasileira, no qual o próximo passo seria a peguilação do composto purificado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, A. K. D. S., ALVES, T. L. M., PINTO, J. C. C. D. S. Processo de produção de L-asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis* e uso do caldo fermentativo e/ou da enzima purificada no tratamento de doenças. Patente, Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE/UFRJ (Rio de Janeiro,RJ), BR n. PI0404952-7, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*, 5<sup>a</sup> Edição, Artmed, Porto Alegre, 2010.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**. v. 26, pp. 32-46, 2001.

ANDRADE, J. M.; ESTÉVEZ-PÉREZ, M. G. Statistical comparison of the slopes of two regression lines: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**. v. 838, pp. 1-12, 2014.

ANKARALI, H.; CANGUR, S.; ANKARALI, S. A new SEYHAN's approach in case of heterogeneity of regression slopes in ANCOVA. **Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci**. v. 10, pp. 282-290, 2018.

ANVISA, Nota Técnica nº 128 de 24 de janeiro de 2017. Importação em carácter excepcional do medicamento L-asparaginase.

ARANEDA, M.; PÉREZ, E. P.; GASCA-LEYVA, E. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight. **Aquaculture**. v. 283, pp. 13-18, 2008.

ARNOLD, F. H. Metal-Affinity Separations: A New Dimension in Protein Processing. **Nature**, v.9, p. 151-156, 1991.

- BAPTISTA, I. C. Avaliação da atividade antileucêmica de L-Asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- BATTERHAM, A. M.; GEORGE, K. P. Modeling the influence of body size and composition on M-mode echocardiographic dimensions. **The American Physiological Society**, 2018.
- BENOV, L; AL-IBRAHEEM, J. Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of Methods. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. vol. 35. nº 4. pp. 428-431, 2002.
- BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of cancer, **World J Clin Oncol**. v. 7, pp. 54-58, 2016.
- BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods in Enzymology**. v 326, p. 245-254, 2000.
- BOWER, C. E.; HOLM-HANSEN, T. A salicylate-hypoclorite method for determining ammonia in seawater. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 37, pp. 794-798, 1980.
- BROOME J.D. Evidence that the l-asparaginase activity in guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**. v.191 pp.1114–1115, 1961.
- CAMPBELL, H.; MASHBURN L.; BOYSE, E.; OLD, J.L. Two l-asparaginases from *E. coli* B, their separation, purification and antitumor activity. **Biochem. Genet**. v. 6, pp.721–730,1967.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SACARMINO, I. S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**. v. 98, n. 15, pp. 2824-2828, 2007.

- CHAN, W. K.; LORENZI, P. L.; ANISHKIN, A.; PURWAHA, P.; ROGERS, D. M.; SURHAREV, S. REMPE, S. B.; WEINSTEIN, J. N. The glutaminase activity of l-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, v. 123, n. 23, pp. 3596-3606, 2014.
- CHEN, X.; WRIGHT, J. V.; CONCA, J. L.; PERRUNG, L. M. Effects of pH on Heavy Metal Sorption on Mineral Apatite. **Environmental science & technology**, v. 31, pp. 624-631, 1997.
- CHISTI, Y; YOUNG, M. M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 8, pp. 194-204, 1986.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia Enzimática. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, 2008.
- CROWE, J.; DOBELI, H.; GENTZ, R.; HOCHULI, E.; STUBER, D.; HENCO, K. 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. **Methods Mol. Bio.**, v. 31, pp. 371-387, 1994.
- CUATRECASAS, P. Protein Purification by Affinity Chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, pp. 3059-3065, 1970.
- DEMSAR, J. Statistical comparisons of classifiers over multiple data sets. **Journal of Machine Learning Research**, v. 7, pp. 1-30, 2006.
- DESHON, R. P.; ALEXANDER, R. A. Alternative procedures for testing regression slope homogeneity when group error variances are unequal. **Psychological Methods**, v. 1, n° 3, pp. 261-277, 1996.
- DISTASIO, J. A.; NIEDERMAN, R. A.; KAFKEWITZ, D.; GOODMAN, D. Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from vibrio succinogenes. **The journal of biological chemistry**, v. 251, n 22, pp.6929-6933, 1976.

- DUCAN, D. B. Multiple range and multiple F test. **Biometrics**, v. 11 n° 1, p. 1-42, 1995.
- DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RAILLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A. M.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. Comparison of Escherichia coli–asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children’s Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n.8, pp. 2734-2739, 2002.
- EINSFELDT, K. Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de Zymomonas mobilis para aplicação como biofármaco. Tese de doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2014.
- ELSPAR (Asparaginase). West point: Merck &Co, 2000. Bula de remédio.
- FARIAS, A. M. L; DEMARQUI, F. N. Análise de variância. Instituto de Matemática e Estatística. Universidade Federal Fluminense, 2017.
- FILHO, U. D. Introdução à bioestatística para simples mortais. Editora Negócio. 1 ed. Rio de Janeiro, 2003.
- GANNER, A; STOIBER, C.; UHLIK, J. T.; DOHNAL, I; SCHATZMAYR, G. Quantitative evaluation of E. coli F4 and Salmonella Typhimurium binding capacity of yeast derivatives. **AMB Express**. 3:62, 2013.
- GUO, Q.L., WU, M.S., CHEN, Z. Comparison of antitumor effect of recombinant L-asparaginase with wild type one in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.23, n.10, pp.946-951, 2002.
- HALEY E.E., FISCHER G.A., WELCH A.C. The requirement for lasparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture. **Cancer Res**, v. 21 pp. 532–541, 1961.
- HARTER, H. L. Critical values for Duncan’s new multiple range test. **Biometrics**, v. 16. n° 4. pp. 671-685, 1960.

- HO, D.; THETFORD, B.; CARTER, C.; FREI E. Clinical pharmacologic studies of l-asparaginase. **Clin Pharmacol Ther**, v. 11 p. 408–17, 1968.
- HUNAG, N.; CHENG, X.; HU, W.; PAN, S. Inactivation, aggregation, secondary and tertiary structural changes of germin-like protein in Satsuma mandarine with high polyphenol oxidase activity induced by ultrasonic processing. **Biophysical chemistry**, v. 197. p. 18-24, 2015.
- INCA,2009. Leucemia aguda. Disponível em: < [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=344](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344)>. Acessado em: novembro, 2017.
- JANSON, J. C. **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Application**. John Wiley & Sons. 3ª edição, New Jersey, 2011.
- KOTZIA, G.A. E LABROU, N.E. “Cloning, expression and characterisation of Erwinia carotovora l-asparaginase. **Journal of Biotechnology**, v.119, pp.309–323, 2005.
- KOZAK, M., BOREK, D., JANOWSKI, R., JASKOLSKI, M. Crystallization and preliminary crystallographic studies of five crystal forms of Escherichia coli l-asparaginase II (Asp90Glu mutant). **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr**, v. 58 (1), pp. 130–132, 2002.
- KUMAR, K.; KAUR, J.; WALIA, S.; PATHAK, T.; AGGARWAL, D. L-asparaginase: an effective agent in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), **Leukemia & lymphoma**, 2013.
- LEE S. Y.; CHUN, S. J.; KANG, I. A.; PARK, J. Y. Preparation of cellulose nanofibrils by high-pressure homogenizer and cellulose-based composite films. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 50-55, 2009.
- LI, J.; WEI, X; WANG, Q; CHEN, J.; CHANG, G.; KONG, L.; SU, J.; LIU, Y. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugar cane bagasse by high pressure homogenization. **Carbohydrate Polymers**, pp. 1609-1613, 2012.

- LIN, S. H.; JUANG, R. S. Heavy metal removal from water by sorption using surfactant-modified montmorillonite. **Journal of Hazardous Materials**, pp. 315-326, 2002.
- MA, Q. Y. Effects of Aqueous Al, Cd, Cu, Fe (II), Ni, and Zn on Pb Immobilization by Hydroxyapatite. **Environ. Sci. Technol.**, v. 28, pp. 1219-1228, 1994.
- MARESCA, P.; DONSI, F.; FERRARI, G. Application of a multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 364-372, 2011.
- MERCKMILLIPORE. Tabela com principais características L-Histidine. Disponível em: <[http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/L-histidine,MDA\\_CHEM-104351](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/L-histidine,MDA_CHEM-104351)>. Acessado em: outubro, 2017.
- MILLER, G. A.; CHAPMAN, J. P. Misunderstanding Analysis of Covariance. **Journal Abnormal Psychology**. v. 110. n° 1, p. 40-48, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde garante medicamento contra a leucemia infantil. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/servicos/32547-saude-garante-medicamento-contraleucemia-infantil.html>>. Acessado em: outubro, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Seis laboratórios atestam L-asparaginase adquirida pelo Ministério da Saúde <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/29718-seis-laboratorios-atestam-l-asparaginas-e-adquirida-pelo-ministerio-da-saude>>. Acessado em: outubro, 2017.
- MUKHERJEE, S. **O imperado de todos os males**. Schwarcz, São Paulo, 2011.
- NARTA, U. K., KANWAR, S. S., AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia, **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 3, pp. 208-221, 2007.

- NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- PINHEIRO, I. O. Fermentações de *Zymomonas mobilis* em Meio Mínimo Usando L-asparagina como Fonte de Nitrogênio. Tese de Doutorado, COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2001.
- PORATH, J. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 3, pp. 263-281, 1992.
- RAWLINGS, J. O.; PANTULA, S. G.; DICKEY, D. A. **Applied regression analysis: A research tool**. Springer, 2ª edição, New York, 1998.
- ROBERTS, J., PRAGER, M., BACHYNSKY, N. The antitumor activity of *Escherichia coli* l-asparaginase. **Cancer Res.** v. 26, pp. 2213–2217, 1966.
- ROCHA, J. C.; GRANER, C. A. F.; MAGNANI, R. Determinação espectrofotométrica de amônio em extratos de carne, com salicilato e hipoclorito, sem prévia neutralização dos digeridos sulfúricos. **Química Nova**. v. 12, n. 4, p. 309-312, 1989.
- ROTHSTEIN, F. Differential Precipitation of Proteins in Protein Purification Process Engineering, R. G. Harrison, ed., Marcel Dekker, New York, p. 115, 1994.
- SCHIITTE, H.; KULA, M. R. Cell disruption and isolation of non-secreted products, in: *Biotechnology Vol. 3, Bioprocessing*, Rehm HJ & Read HJ, 1993.
- SCHULTZ, S.; WAGNER, G.; URBAN, K.; ULRICH, J. High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation. **Chem. Eng. Technol**, v. 27, p. 361-368, 2004.
- SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. Análise de dados experimentais fundamentos de estatística e estimação de parâmetros. *E-papers*. 1 ed. Rio de Janeiro, 2007.



- SHRESDA, P.; HOLLAND, T. M; BUNDY, B. C. Streamlined extract preparation for Escherichia coli-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. **BioTechniques**, Vol. 53, No. 3, pp. 163–174, 2012.
- SILVA, R. C. *Testes de comparações de Médias*. Trabalho de conclusão de curso-Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, 2010.
- SINGH, R.S. A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from E. coli K-12. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 51. pp. 997-1003, 2013.
- TABACCO, A.; MEIATTINI, F.; MODA, E.; TARLI, P. Simplified enzymic/colorimetric sérum urea nitrogen determination. **Clinical Chemistry**. v. 25, n. 2, pp. 336-337, 1979.
- UEDA, E.K M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **Journal of Chromatography A**, v. 988, pp.1-23, 2003.
- URH, M.; SIMPSON, D.; ZHAO, K. Affinity Chromatography: General Methods. **Methods in Enzymology**, v. 463, pp. 418-438, 2009.
- VAN DEN BERG, Asparaginase revisited, **Leukemia & Lymphoma**, v.52, n.2, pp.168–178, 2011.
- WASHINGTON, M. P. L. **Modelagem do processo de produção da l-asparaginase recombinante utilizando a abordagem dinâmica da análise do balanço de fluxos metabólicos**. Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2016.
- WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. 4 ed. Friburgo, 2005.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice**: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. *John Wiley & Sons*, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acessado em: Dezembro, 2018.

## APÊNDICE A

### Curvas padrões para os ensaios de Bradford e atividade

Figuras A.1, A.2 e A.3 são curvas padrões para o ensaio de Bradford produzidas nas mesmas condições, reagentes e em dias consecutivos.

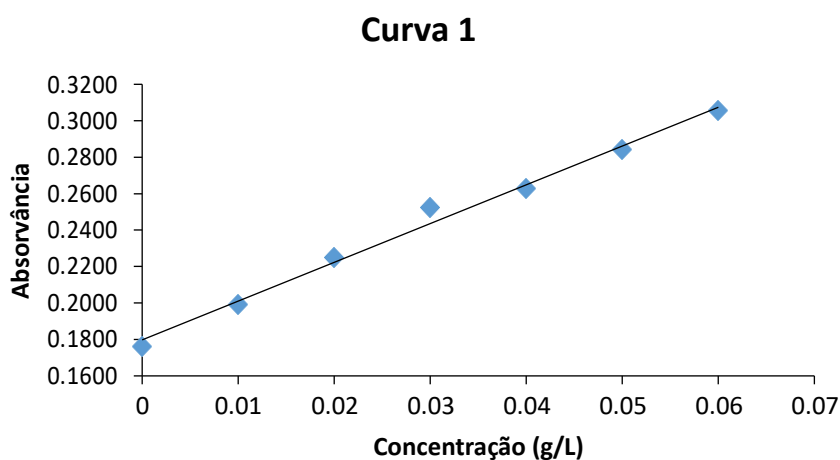


Figura A.0.1 - Curva padrão para o ensaio de Bradford. Solução de BSA (Albumina de soro bovino).

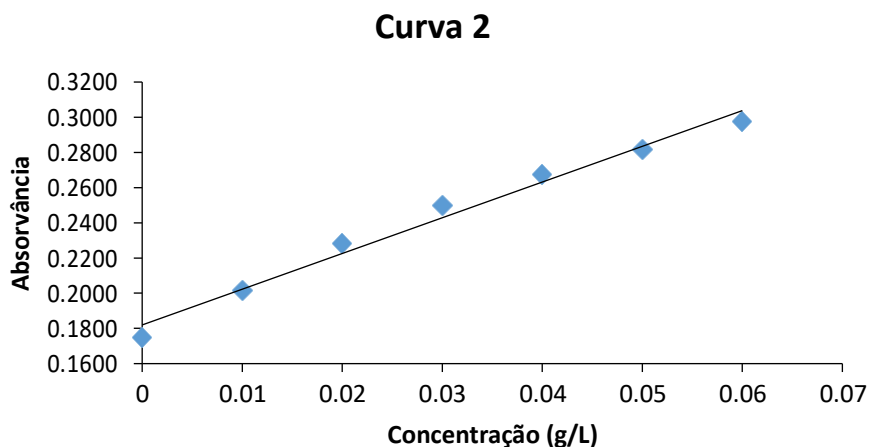


Figura A.0.2 - Curva padrão para o ensaio de Bradford. Solução de BSA (Albumina de soro bovino).

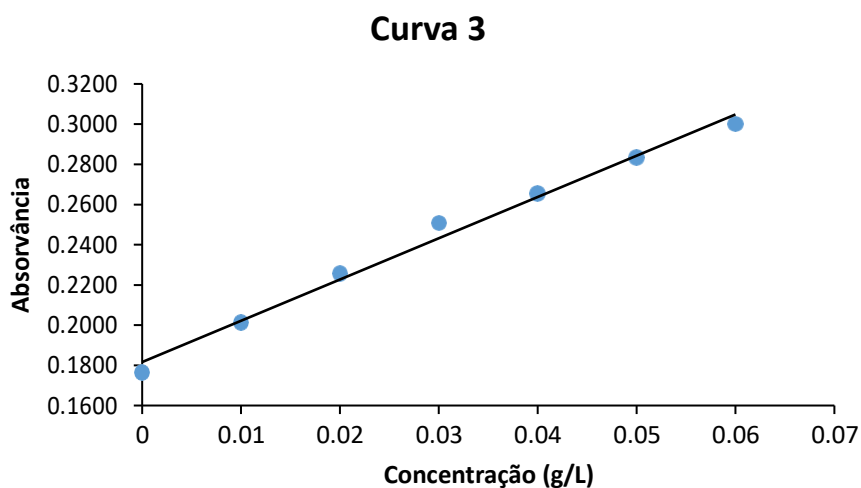


Figura A.0.3 - Curva padrão para o ensaio de Bradford. Solução de BSA (Albumina de soro bovino).

As Figuras A.4, A.5 e A.6 correspondem as curvas padrões para o ensaio de atividade utilizando apenas solução de sulfato de amônio.

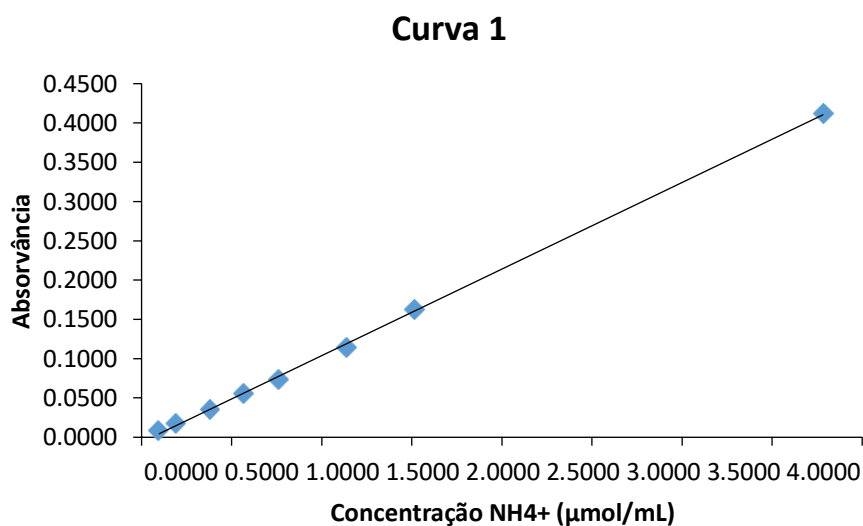


Figura A.0.4 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Solução de sulfato de amônio.

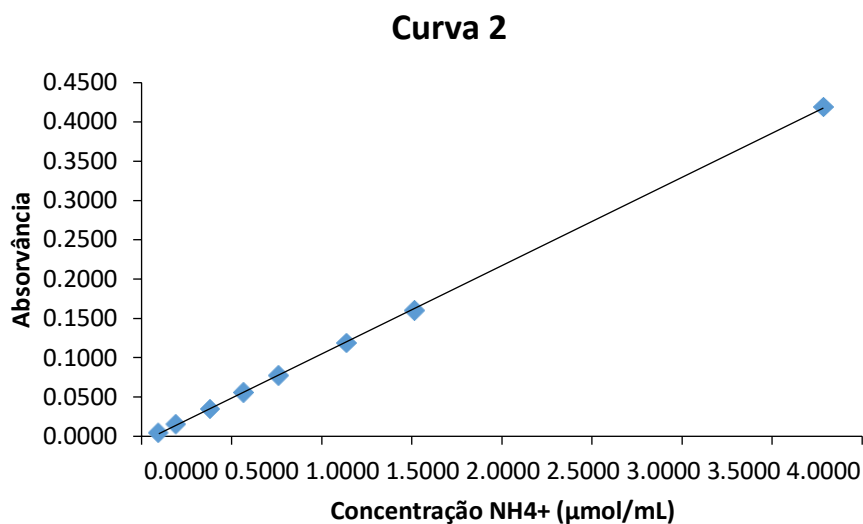


Figura A.0.5 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Solução de sulfato de amônio.

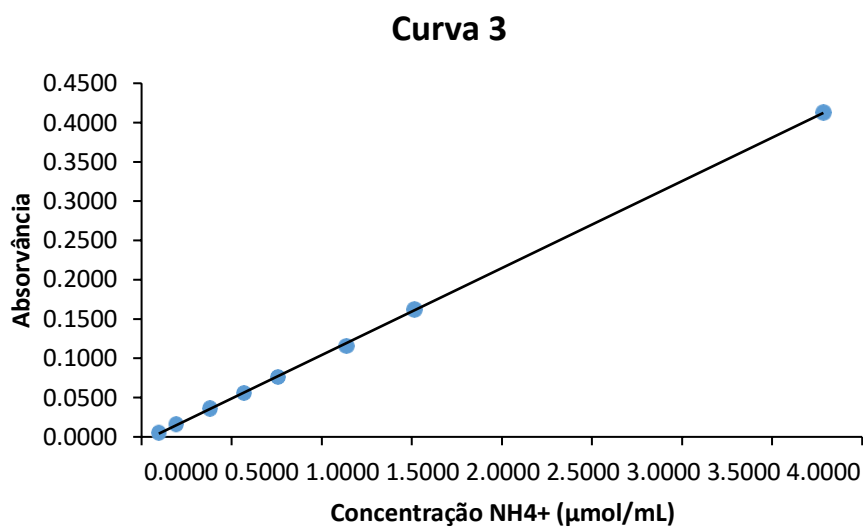


Figura A.0.6 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Solução de sulfato de amônio

As Figuras A.7, A.8 e A.9 correspondem as curvas padrões para o ensaio de atividade utilizando apenas solução de sulfato de amônio.

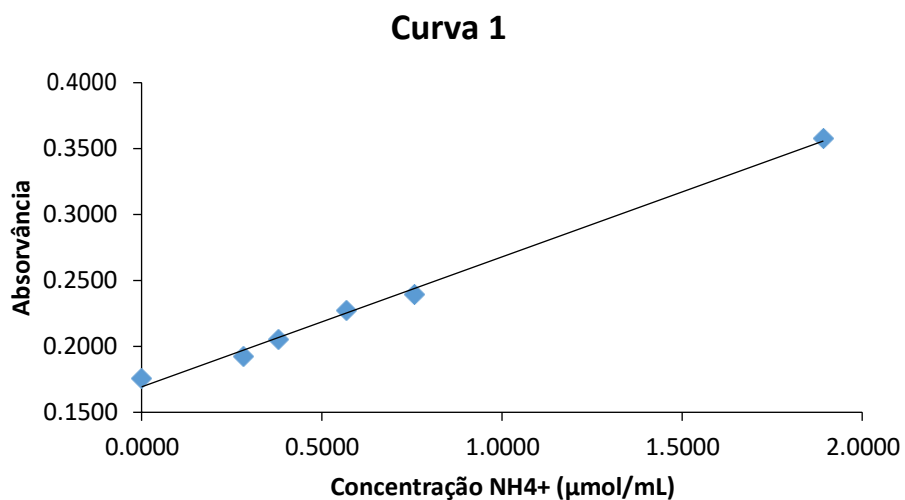


Figura A.0.7 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Mistura de solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.

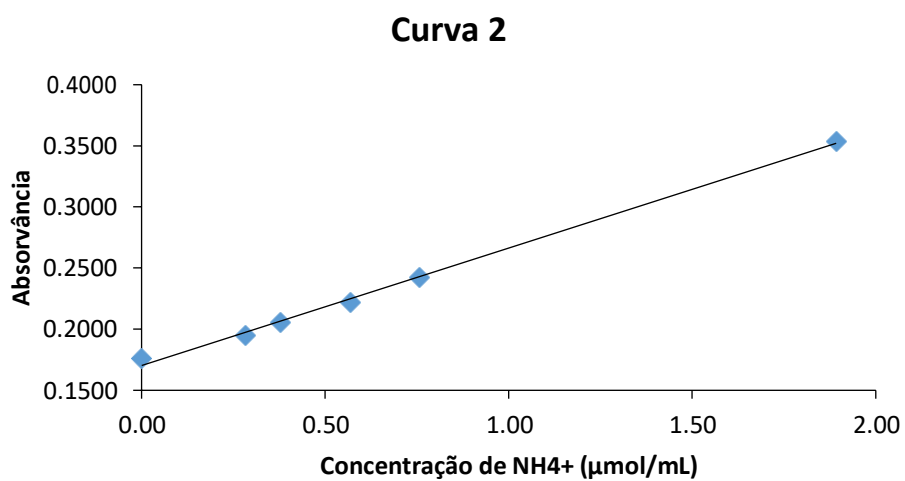


Figura A.0.8 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Mistura de solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.

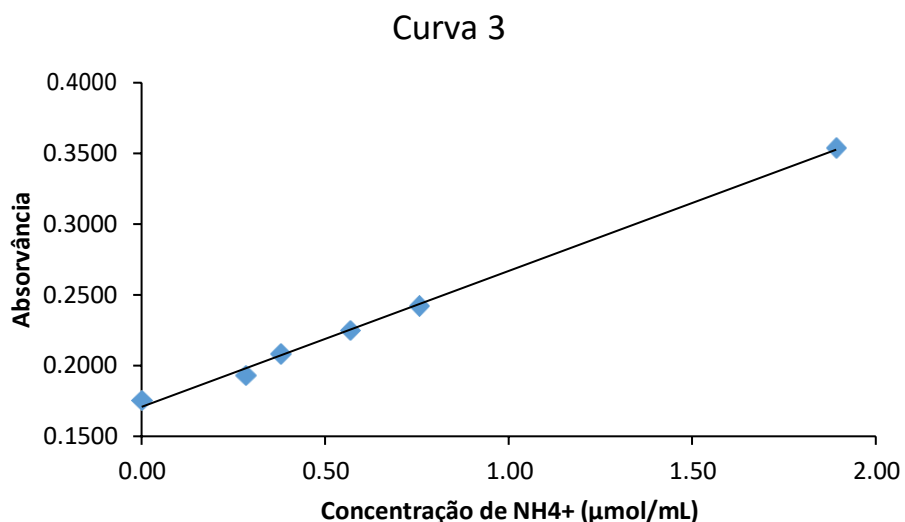


Figura A.0.9 - Curva padrão para o ensaio de atividade. Mistura de solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.

Figuras A.10 – A.13 correspondem as curvas padrões para os ensaios de atividade utilizando volumes de reagentes 1 e 2 como 0,7 mL e variando os volumes de amostra entre 20 e 14 µL.

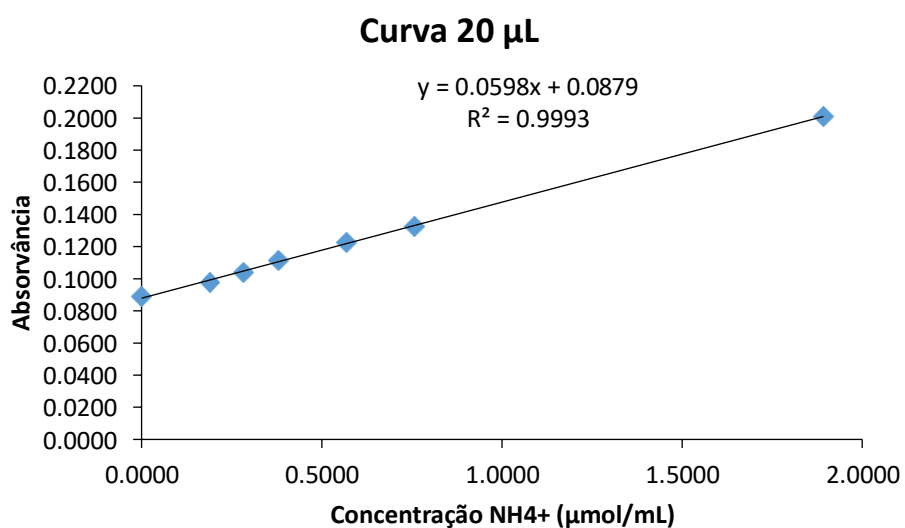


Figura A.0.10 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 20 µL para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L.

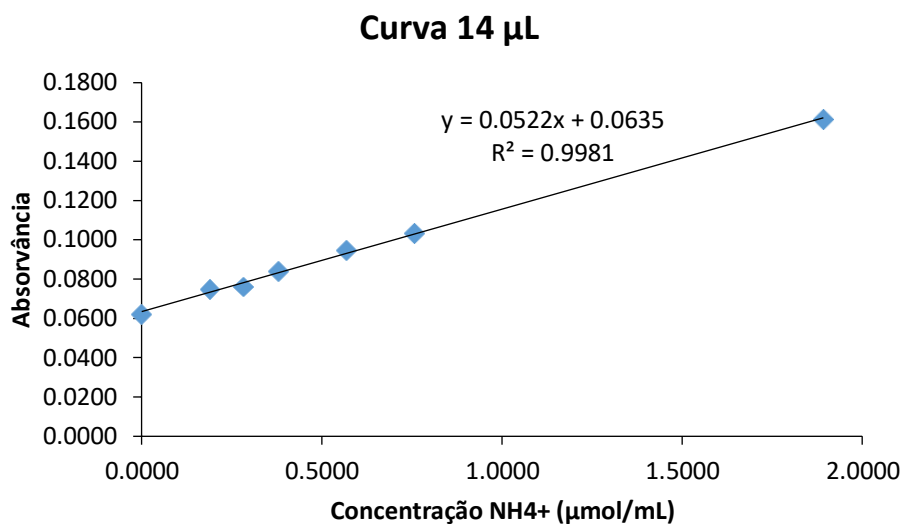


Figura A.0.11 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 14  $\mu$ L para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L

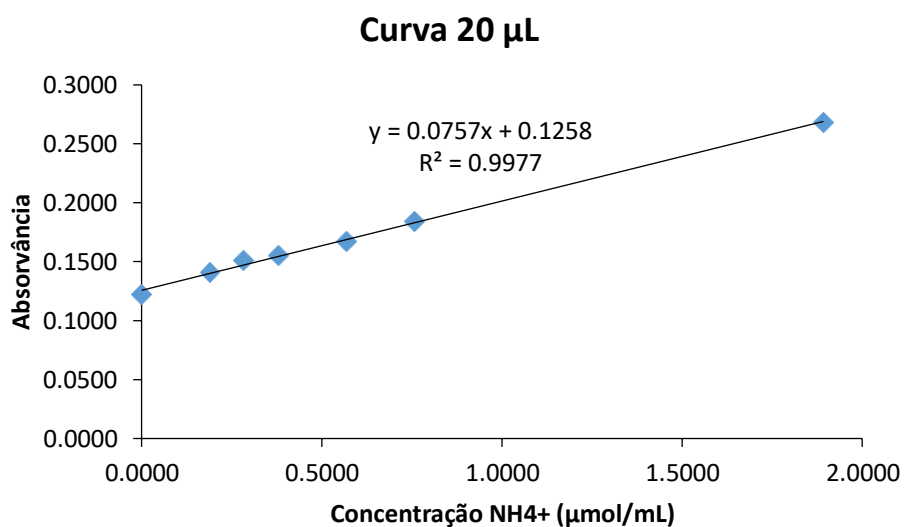


Figura A.0.12 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 20  $\mu$ L para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L



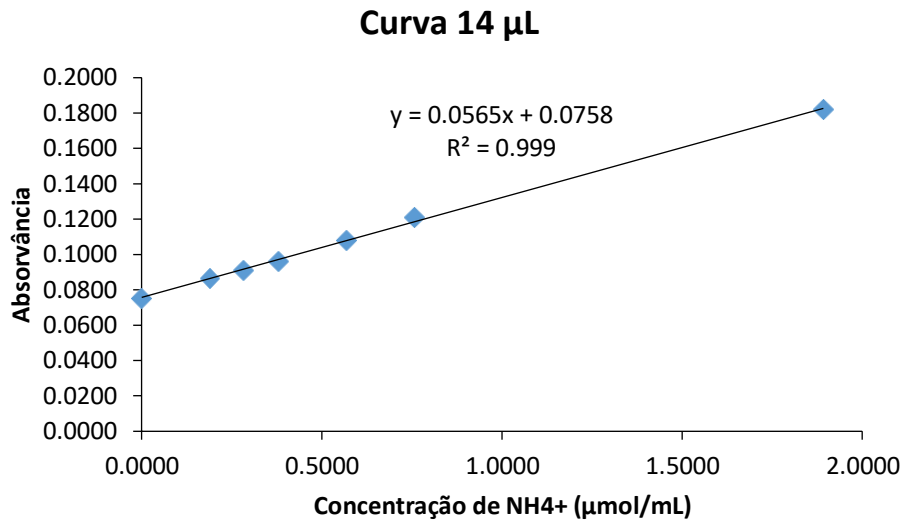


Figura A.0.13 - Curva padrão para ensaio de atividade com volume de reagentes 0,7 mL para reagente 1 e 2 e 14  $\mu$ L para amostra de análise. Mistura da solução de sulfato de amônio e L-asparagina 5 g/L