

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Gabriela de Assis Ferreira



OTIMIZAÇÃO UPSTREAM DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE
RECOMBINANTE EM *E. COLI* PARA O TRATAMENTO DE
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

RIO DE JANEIRO

2024

Gabriela de Assis Ferreira

Otimização *upstream* da produção de L-asparaginase recombinante em *E. coli* para o
tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de
Bioprocessos.

Orientador(es): Jose Angel Ramon Hernandez
Mariana Miguez Tardelli Garcia
Carolina Lessa Aquino

Rio de Janeiro

2024

CIP - Catalogação na Publicação

F1180 Ferreira, Gabriela de Assis
Otimização upstream da produção de L-asparaginase recombinante em E. coli para o tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda / Gabriela de Assis Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2024.
76 f.

Orientador: Jose Angel Ramon Hernandez.
Coorientadora: Mariana Miguez Tardelli Garcia.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos, 2024.

1. Planejamento experimental. 2. L-asparaginase Humana. 3. Leucemia Linfoblástica Aguda. I. Hernandez, Jose Angel Ramon, orient. II. Garcia, Mariana Miguez Tardelli, coorient. III. Titulo.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Gabriela de Assis Ferreira

OTIMIZAÇÃO UPSTREAM DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE
EM *E. COLI* PARA O TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Engenheiro de
Bioprocessos.

Aprovado em ____ de _____. de _____. .

Jose Angel Ramon Hernandez, DSc, UFRJ

Mariana Miguez Tardelli Garcia, DSc, FIOCRUZ

Carolina Lessa Aquino, DSc, FIOCRUZ

Paula Borba Cruz, MSc, FIOCRUZ

Ivaldo Itabaiana Jr, DSc, UFRJ

Rio de Janeiro
2024

Para aquela que me acompanha desde o começo e que estará aqui até o fim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcus e Simone, por todo sacrifício, todo o trabalho e toda dedicação. Se cheguei onde estou foi graças unicamente a vocês. A Ivone e Aldemira, por cuidarem de mim. Obrigada por todo o carinho e por me escolherem como família.

A Pepe, obrigada pela oportunidade.

Para Mariana e Carol, agradeço pelo direcionamento, pela paciência e por todo conhecimento. A toda equipe do LATER, por todo trabalho de vocês e por terem me acolhido. Essa foi uma das minhas melhores experiências, obrigada por tornarem ela inesquecível. Contribuir como voluntária a esse projeto foi gratificante.

A Mário e Limoeiro, os verdadeiros Tico e Teco. A Luana, pela amizade e incentivo. A Lunyx, Naim e Grael, pelas conversas e risadas. Aos amigos ao longo dessa trajetória, espalhados em diferentes laboratórios, encontrados em diferentes disciplinas, alunos e professores. Para todos vocês que compartilhei angústias e vitórias.

Obrigada a todos por fazerem parte do meu caminhar. As longas conversas até tarde, os almoços, os cafés compartilhados e toda boa e má notícia. Das dificuldades e das comemorações, da presença e da lembrança. Sou grata por todos esses momentos, menores que sejam, mas que significam muito para mim.

Posso dizer que sou a pessoa mais feliz do mundo por tê-los comigo.

Quanta sorte tenho eu, por ter algo que faz a despedida ser tão difícil.

- A. A. Milne.

RESUMO

FERREIRA 1, Gabriela de Assis. **OTIMIZAÇÃO UPSTREAM DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE EM *E. COLI* PARA O TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.** Rio de Janeiro, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Buscando eficiência, a indústria de bioprocessos tem investido na otimização ao longo da cadeia produtiva. A abordagem mais utilizada se baseia na análise de uma variável por vez, aumentando o custo e tempo investidos. Através da técnica Plackett-Burman é possível estudar um amplo número de variáveis em um número reduzido de experimentos, realizando uma seleção prévia das variáveis que influenciam o processo. Um medicamento frequentemente utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a L-asparaginase, cuja maior parte das formulações no mercado tem origem bacteriana. Essa enzima degrada o excesso de L-asparagina no meio, inibindo a proliferação das células tumorais da LLA. Rotas alternativas envolvem o uso da enzima L-asparaginase humana (hASRGL1) em *Escherichia coli* recombinante, no entanto, a baixa atividade catalítica dificulta a produção industrial devido ao alto custo de revenda do medicamento.. O objetivo deste estudo foi definir as variáveis que exercem maior impacto na etapa *upstream* da produção de L-asparaginase recombinante. Com a matriz ortogonal de Plackett-Burman fornecida pela empresa Protimiza, foi possível realizar 20 ensaios para avaliar 13 parâmetros. A análise da cinética de crescimento e atividade enzimática após a indução da cepa revelou que o tempo de 10 horas apresenta a maior atividade enzimática (14,75 UI/mL). Optou-se pelo tempo de 8 horas de indução, próximo ao final da fase exponencial da *E. coli* recombinante. O gráfico de Pareto obtido indica que 4 variáveis (temperatura, concentração de triptona, densidade óptica (D.O.) de indução e inóculo) impactam significativamente o crescimento celular. Esses dados podem ser usados para construir um modelo preditivo visando maximizar a expressão celular.

Palavras-chave: Planejamento experimental. L-asparaginase Humana. Leucemia Linfoblástica Aguda.

ABSTRACT

FERREIRA 1, Gabriela de Assis. **OTIMIZAÇÃO UPSTREAM DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE EM E. COLI PARA O TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.** Rio de Janeiro, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Seeking efficiency, the bioprocess industry has invested in optimization throughout the production chain. The most commonly used approach involves analyzing one variable at a time, which increases costs and time investment. Through the Plackett-Burman technique, it is possible to study a wide range of variables with a reduced number of experiments, preselecting the variables that influence the process. L-asparaginase is a frequently used medication in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), with most formulations on the market originating from bacteria. This enzyme degrades excess L-asparagine in the medium, inhibiting the proliferation of ALL tumor cells. Alternative routes involve using human L-asparaginase (hASRGL1) in recombinant *Escherichia coli*; however, low catalytic activity complicates industrial production due to the high resale cost of the medicine. The goal of this study was to define the variables that have the greatest impact on the upstream stage of recombinant L-asparaginase production. Using the Plackett-Burman orthogonal matrix provided by the company Protimiza, 20 assays were conducted to evaluate 13 parameters. Analysis of growth kinetics and enzymatic activity after strain induction revealed that the 10-hour time point exhibited the highest enzymatic activity (14.75 U/mL). The 8-hour induction time, close to the end of the recombinant *E. coli*'s exponential phase, was chosen. The Pareto chart obtained indicates that 4 variables (temperature, tryptone concentration, optical density (O.D.) at induction, and inoculum) significantly impact cell growth. These data can be used to build a predictive model aimed at maximizing cellular expression.

Keywords: 1. Experimental Design. Human L-asparaginase. Acute lymphocytic leukemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1.1 - Diferença morfológica entre as células.
- Figura 2.1.2 - Taxas ajustadas de incidência de câncer por sexo, Brasil e Regiões, 2023-2025.
- Figura 2.1.3 - Melhoria na sobrevivência de crianças com LLA. Taxas de sobrevida em cinco anos para crianças menores de 15 anos com LLA: 1960–2004.
- Figura 2.2.1 - Mecanismo de ação da L-asparaginase.
- Figura 2.1.2.1 - Estrutura da L-asparaginase humana (hASNase3).
- Figura 2.2.1 - Fluxograma generalizado para o escalonamento de um processo fermentativo.
- Figura 2.2.1.1 - Comparaçāo do alcance de um quase ótimo.
- Figura 2.2.1.3 - Fluxograma das etapas envolvidas para atingir o objetivo desejado.
- Figura 2.2.1.1 - Representação de um gráfico de Pareto.
- Figura 2.3.1 - Logo do programa Protimiza Experimental Design®
- Figura 3.2.2.1 - Preparo dos meios de Cultura.
- Figura 3.2.3.1 - Pré-inóculo e incubação.
- Figura 3.2.3.2 - Medição da D.O. em espectrofotômetro.
- Figura 3.2.3.3 - Representação do procedimento.
- Figura 3.2.4.1 - Fluxograma de cada ensaio individual.
- Figura 3.2.5.1 - Processo de separação da fração solúvel e insolúvel.
- Figura 3.2.6.1 - Preparo das amostras para corrida Eletroforese.
- Figura 3.2.6.2 - Procedimento de fixação dos geis.
- Figura 3.2.6.3 - Etapas de coloração e fixação dos geis.
- Figura 3.2.6.4 - Etapas de transferência e bloqueio para *western blot*.
- Figura 3.2.6.5 - Etapas de aplicação do anticorpo para *western blot*.
- Figura 3.2.6.6 - Etapas de aplicação da solução de revelação no *western blot*.
- Figura 3.2.7.1 - Avaliação da atividade enzimática por Nessler.
- Figura 3.2.8.1 - Interface do software Protimiza Experimental Design® .
- Figura 4.1.1 - Curva de crescimento da *E.coli* recombinante no meio controle.
- Figura 4.1.2 - Curva de crescimento da *E.coli* recombinante no meio ponto central.
- Figura 4.2.1 - Gel de SDS-PAGE para as amostras da cinética de crescimento.
- Figura 4.2.2 - Membrana do *western blot* para as amostras da cinética de crescimento.
- Figura 4.2.3 - Resultados do SDS-PAGE e *western blot*. A parte superior representa os geis de eletroforese, a parte inferior as membranas utilizadas no *western blot*.

Figura 4.3.1 - Curva padrão de sulfato de amônio.

Figura 4.3.2 - Curva padrão de sulfato de amônio corrigida.

Figura 4.3.3 - Gráfico para comparação da atividade enzimática.

Figura 4.4.1 - Gráfico de pareto para influência das variáveis no crescimento celular.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.2.1.1 - Etapas para otimização de um processo
- Tabela 2.2.1.1.1 - Exemplo da aplicação de Plackett-Burman para 12 variáveis.
- Tabela 3.2.1.1 - Matriz ortogonal para a triagem de variáveis.
- Tabela 3.2.2.1 - Composições dos meios de cultura.
- Tabela 3.2.4.1 - Condições de cultivo para cada ensaio.
- Tabela 4.3.1 - Valores da curva padrão de sulfato de amônio para as amostras a 450nm.
- Tabela 4.3.2 - Cálculo da concentração das amostras em $\mu\text{g/mL}$.
- Tabela 4.3.3 - Cálculo da atividade enzimática das amostras em IU/mL.
- Tabela 4.4.1 - Resultado do DOE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CEE Fiocruz	Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz
CTRL	Meio controle
CTRL NI	Meio controle não induzido
CTRL IND	Meio controle induzido
DCC	Design de Composto Central
DCCR	Design de Composto Central Rotacional
D.O. _{600nm}	Densidade Óptica a 600nm
DoE	Design Experimental
EtOH	Etanol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERW	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
hASNase1	60-kDa-lisofosfolipase
hASNase3	L-asparaginase humana <i>like 1</i>
hASRGL1	L-asparaginase humana <i>like 1</i>
HGG	Histidina 8 – Glicina 9 – Glicina 10
ICC	Instituto Carlos Chagas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
LLA	Leucemia linfoide aguda
L-ASNase	L-asparaginase
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
MetOH	Metanol
MS	Ministério da Saúde
PAGE	Poliacrilamida
PB	Plackett-Burman
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Meio ponto central
PC NI	Meio ponto central não induzido
PC IND	Meio ponto central induzido
PEG	Polietilenoglicol

PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Protimiza	<i>Software Protimiza Experimental Design®</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SBOC	Sociedade brasileira de oncologia clínica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SUS	Sistema único de saúde
TCA	Ácido tricloroacético
TRIS	<i>2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

K_M Constante de Michaelis-Menten

M Molaridade (mol L^{-1})

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A Leucemia Linfoblástica Aguda	20
2.1.1 A Enzima L-Asparaginase	24
2.1.2 L-Asparaginase Humana	27
2.2 Otimização na Bioengenharia	29
2.2.1 Planejamento Experimental	31
2.2.1.1 Plackett–Burman Design	35
2.3 Programa Protimiza Experimental Design	36
3 METODOLOGIA	38
3.1 Materiais	38
3.1.1 Soluções e Tampões	38
3.1.2 Meios de Cultura	38
3.2 Métodos	40
3.2.1 Matriz Ortogonal para Plackett-Burman	40
3.2.2 Preparo de Meios para Ensaio de Otimização	41
3.2.3 Cinética de Crescimento	42
3.2.4 Análise da Expressão em Diferentes Meios de Cultura	45
3.2.5 Verificação da Solubilidade	48
3.2.6 SDS-Page e Western Blotting para Confirmação de Expressão	48
3.2.7 Atividade Enzimática por teste de Nessler	52
3.2.8 Programa Protimiza	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Cinética de Crescimento	55
4.2 SDS-PAGE e western blot dos cultivos	57
4.3 Cálculos da Atividade Enzimática	61
4.4 Gráfico de pareto e análise estatística	64
5 CONCLUSÕES	66
6 REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A indústria de bioprocessos passa por uma profunda transformação no que se refere à busca pela eficiência, adotando uma abordagem que prioriza uma análise profunda do *design experimental* (MU'AZZAM *et al*, 2024). A otimização é parte fundamental para a produção em escala industrial, diminuindo os custos associados e tornando o produto mais acessível e com um custo associado atrativo a investidores. Para produtos biofarmacêuticos os principais custos estão atrelados às etapas de *downstream*, na recuperação e purificação. Porém as etapas de *upstream*, referentes à expressão celular, exercem grande importância na atividade das enzimas de interesse (STRAATHOF, 2011).

Ao se tratar de otimização, normalmente o objetivo é diminuir custos ou aumentar o lucro do processo, porém, as aplicações industriais podem ser das mais diversas, sendo possível melhorar o rendimento, ou reduzir a quantidade de etapas na produção. No caso de bioprocessos, processar esse conjunto de valores ótimos é desafiador, devido a predominância de modelos não lineares que descrevem os sistemas fermentativos (SENDÍN *et al*, 2006).

A abordagem mais utilizada para otimização na indústria se baseia em tentativa e erro, onde diferentes experimentos de fermentação são realizados analisando apenas um fator por vez, deixando os demais parâmetros que descrevem o sistema constantes. Esse método não leva em consideração as interações entre os parâmetros que descrevem o sistema, além de exigir uma grande quantidade de experimentos, aumentando o custo e o tempo investidos, sem a garantia de encontrar as melhores condições do sistema (KASEMIIRE *et al*, 2021).

Entre as ferramentas estatísticas disponíveis, o planejamento experimental, conhecido do inglês, *design of experiments* (DoE), tornou-se essencial. Seu princípio se baseia na análise das interações das variáveis de entrada e saída do sistema, reduzindo o número de experimentos até alcançar o ótimo global (GASSENMEIER *et al*, 2022). Pode-se defini-lo de acordo com seu objetivo: realizar uma triagem de variáveis, avaliar a influência das variáveis, construir um modelo empírico e por fim construir um modelo matemático que descreva o sistema (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

Essa técnica é uma das principais utilizadas na otimização da produção de antibióticos, enzimas e proteínas recombinantes podendo se estender para outras áreas biológicas, como a produção de etanol, hidrogênio e metabólitos primários (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008). Sua importância pode também ser sinalizada no escalonamento, o que para medicamentos de alto custo, por exemplo, é essencial visto a necessidade de torná-los mais acessíveis à comunidade (WAHLSTER *et al*, 2015).

Entre as doenças com maior custo para o paciente e o sistema de saúde podemos citar o câncer. No Brasil estima-se que cerca de 17% dos óbitos anuais sejam relacionados à doença, representando uma média de 200 mil mortes (AGÊNCIA BRASIL, 2023). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são mais de cem doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado celular, sendo classificadas em relação ao tecido de origem, a velocidade de multiplicação celular e a capacidade de proliferação (INCA, 2022). No estudo “Quanto custa o câncer?” produzido pelo Observatório de Oncologia em parceria com o Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz (CEE Fiocruz) e o Movimento Todos Juntos Contra o Câncer demonstrou-se que o gasto com o tratamento da doença representa cerca de 3% dos recursos destinados à saúde, representando um gasto aproximado de R\$ 3,9 bilhões por ano (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2023).

O câncer pediátrico, por exemplo, representa um percentual de aproximadamente 3% em relação ao câncer de adultos, sendo a primeira causa de morte entre crianças de 1 a 19 anos. Os tumores mais frequentes são as leucemias, seguido pelos que atingem o sistema nervoso central e por linfomas. (INCA, 2023). A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a doença neoplásica mais comum em crianças, representando 75% dos casos de leucemia em crianças menores de 15 anos e a segunda maior causa de morte nessa mesma faixa etária (MANUAIS MSD, 2023).

As células tumorais da LLA são incapazes de sintetizar L-asparagina, um substrato importante para a replicação celular, o que as torna dependentes do excesso presente em meio extracelular. A enzima L-asparaginase catalisa a L-asparagina em ácido aspártico e amônia, degradando o excesso desse aminoácido, sem prejudicar as células saudáveis. Seu uso é essencial no começo e ao longo do tratamento, devido a alta taxa de mutação das células tumorais, que podem passar a expressar sua própria L-asparagina inviabilizando o medicamento (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Existem três tipos de formulações desse medicamento disponíveis, que podem ser obtidos através de: *Escherichia coli* (*E.coli*), que se trata da própria enzima nativa bacteriana; de sua forma peguilada, onde a enzima é ligada a moléculas de polietilenoglicol (PEG), aumentando a meia-vida; e a produzida por *Erwinia chrysanthemi*, que atua como substituta da enzima obtida por *E.coli*. Alguns dos efeitos colaterais observados, por exemplo, são trombose, pancreatite e reações alérgicas (DOUER *et al*, 2022). Uma alternativa ao uso da enzima bacteriana é a utilização da enzima humana expressa em célula de *E.coli*, que possui protocolos de expressão bem estabelecidos para outros medicamentos biológicos (AHN; JUNG, 2023).

O presente trabalho é um resultado de uma colaboração entre Bio-Manguinhos/Fiocruz e do Instituto Carlos Chagas Fiocruz/Paraná. Com o intuito de escalar a produção da enzima L-asparaginase recombinante para a produção nacional em larga escala, é necessário adotar as melhores práticas da indústria farmacêutica, que se baseiam no emprego da otimização. Os resultados desse esforço diminuem o custo ao longo da cadeia produtiva desse medicamento, tornando-o um bom concorrente para as formulações no mercado.

O objetivo principal deste trabalho é definir quais variáveis na etapa de *upstream* influenciam no crescimento celular e na produção da L-asparaginase humana recombinante, aplicando o design Plackett-Burman, uma ferramenta que permite definir as variáveis de maior importância em um sistema.

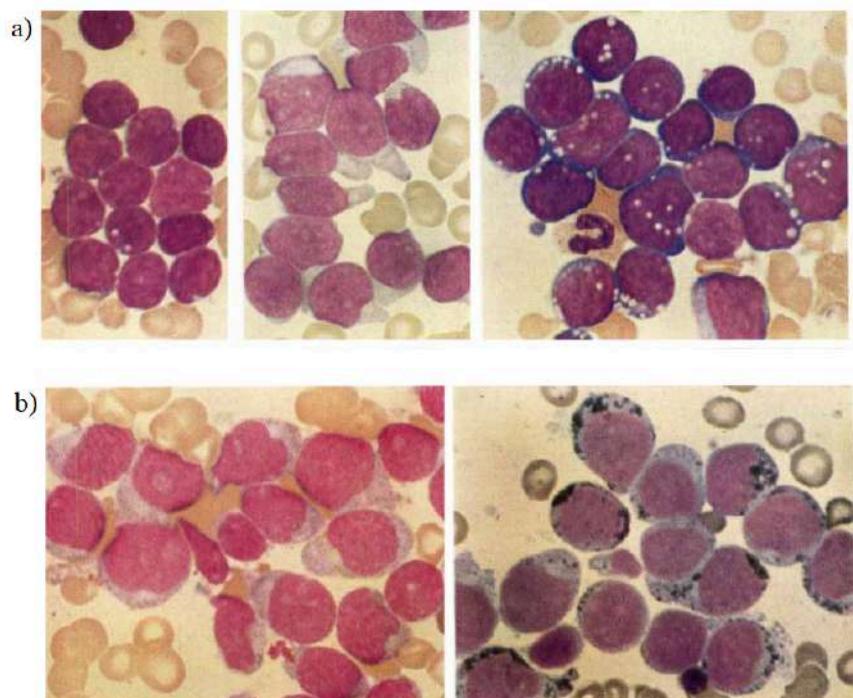
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A leucemia é uma doença que afeta os órgãos produtores de células sanguíneas, como a medula óssea, o baço, e os linfonodos. Ela pode ser descrita como a proliferação neoplásica de células hematopoiéticas ou linfoïdes. A ocorrência dessa neoplasia se deve a mutação em uma única célula, acompanhada por eventos genéticos como a perda de função de genes supressores de tumor (BAIN, 2017). É possível classificá-la a partir da origem celular (se são células linfoïdes ou células mieloides), e da velocidade de propagação. As leucemias agudas possuem rápida proliferação comparadas às crônicas, e afetam mais crianças e adultos se comparadas às leucemias crônicas, representando a maioria dos casos (CAZARIN; AUGUSTO; MELO, 2007).

Além dessa classificação, para as leucemias agudas há outras ramificações que partem de estudos mais aprofundados das características morfológicas e citoquímicas. Alguns desses fatores levam em consideração o tamanho celular, o formato nuclear e a quantidade de basofilia no citoplasma (BENNETT *et al.*, 1976). A partir de avanços na citogenética, os métodos de classificação se tornaram mais rigorosos, permitindo uma maior precisão em relação à origem celular do tumor, auxiliando no diagnóstico e tratamento das leucemias agudas (DEVINE; LARSON, 1994). Na Figura 2.1.1 é apresentado a diferença morfológica entre: a) as células da leucemia linfoblástica e b) as células da leucemia mieloblástica.

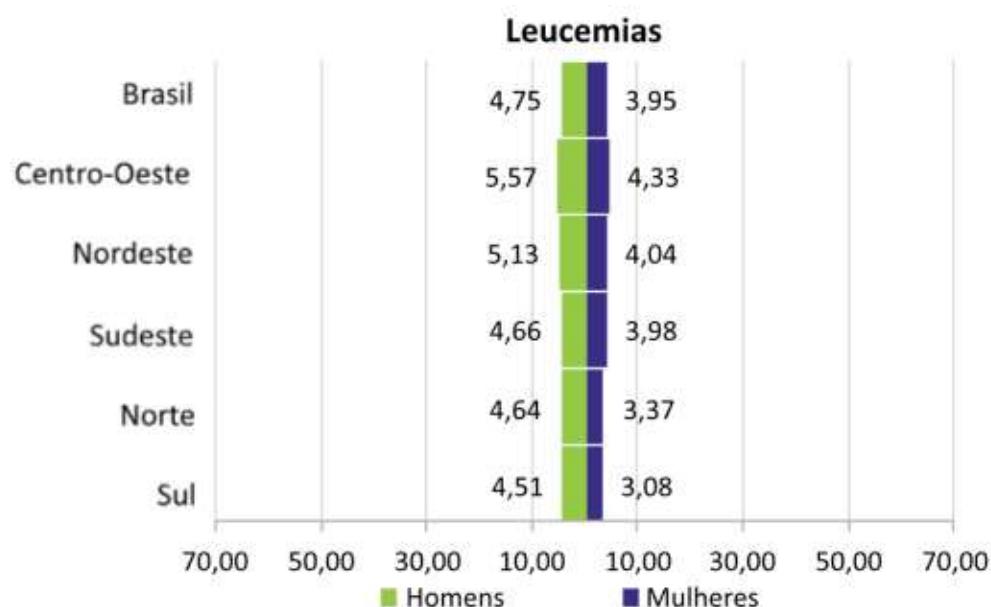
Figura 2.1.1 – Diferença morfológica entre as células.



Fonte: BENNETT *et al.*, 1976.

A leucemia linfoblástica aguda representa entre 75% a 80% das leucemias agudas em crianças, afetando também 20% dos adultos. Dentre os mais novos, os mais afetados são crianças entre 1 a 4 anos, representando 78,1% dos casos desse tipo de câncer (HOWLADER *et al.*, 2021). No mundo, os países de médio e baixo desenvolvimento representam cerca de 70% dos casos novos de leucemia infantil. No Brasil estima-se que entre 2023 e 2025 sejam notificados quase 8.000 novos casos de cânceres infantis (SANTOS *et al.*, 2023). Na Figura 2.1.2 encontram-se as taxas ajustadas de incidência de câncer, fornecendo um parâmetro que indica o impacto da neoplasia.

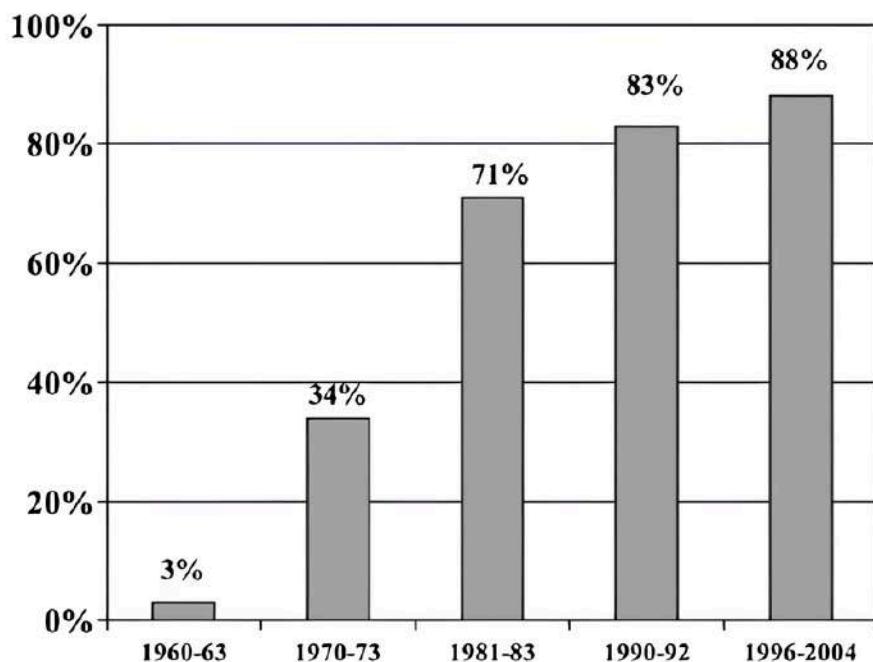
Figura 2.1.2 – Taxas ajustadas de incidência de câncer por sexo, Brasil e Regiões, 2023-2025.



Fonte: Adaptado de SANTOS *et al*, 2023.

A terapia para o tratamento da LLA está entre as mais complexas entre os programas de câncer. São utilizados múltiplos medicamentos a fim de favorecer a reconstituição da hematopoiese saudável, prevenir o surgimento de subclones resistentes das células cancerígenas (JABBOUR *et al.*, 2005). Esta abordagem resultou em um dos mais notáveis sucessos na medicina do câncer, porque confere uma taxa de cura maior que 80% para crianças com LLA, como demonstra a Figura 2.1.3 (SEIBEL, 2008).

Figura 2.1.3 – Melhoria na sobrevivência de crianças com LLA. Taxas de sobrevida em cinco anos para crianças menores de 15 anos com LLA: 1960–2004.



Fonte: SEIBEL, 2008.

Os resultados positivos da intensificação do tratamento ocasionaram na exposição de alguns pacientes a terapias mais agressivas que o necessário. Com base nisso várias iniciativas começaram a ser tomadas para classificar os grupos a partir de fenótipos, genótipos e riscos, definindo assim o tipo de terapia a ser seguida (PUI; EVANS, 2006). As abordagens específicas do tratamento para cada paciente diferem, mas enfatizam as seguintes etapas: indução da remissão, consolidação pós-remissão, intensificação temporária e manutenção (MANUAIS MSD, 2023).

Elas podem ser descritas como:

1) Indução de remissão

Possui como objetivo erradicar mais de 99% das células leucêmicas e induzir a uma remissão morfológica, restaurando a hematopoiese normal da medula óssea. Muitas das vezes essa parte do tratamento inclui a administração de glicocorticoides (prednisona, prednisolona ou dexametasona), vincristina e pelo menos outro agente (geralmente L-asparaginase, antraciclina ou ambos). As taxas de remissão completa em crianças são próximas de 98% e 85% em adultos (GAYNON *et al.*, 2000).

2) Consolidação pós-remissão

Após a restauração da hematopoiese o paciente passa para a segunda parte, onde o objetivo é prevenir um novo crescimento leucêmico. A terapia pode durar alguns meses e inclui altas doses de metotrexato com mercaptopurina e L-asparaginase. A utilização da asparaginase demonstrou excelentes resultados com baixa morbidade, especialmente em relação a trombose e hiperglicemias, em contrapartida ao que se observa na primeira parte do tratamento (SILVERMAN *et al.*, 2001).

3) Intensificação temporária

Essa é uma etapa anterior à manutenção, onde se usa medicamentos semelhantes à primeira etapa do tratamento, mas com doses diferentes. Alguns exemplos são fármacos com resistência cruzada, uso prolongado da L-asparaginase em altas doses, ou combinações de todos eles (PUI; EVANS, 2006).

4) Manutenção

A última etapa trata-se da mais longa, com duração entre 2 e 3 anos. Alguns protocolos fornecem aplicações de vincristina e corticoides (PIETERS *et al.*, 2010).

Apesar dos resultados positivos no tratamento da LLA, ainda há muitos desafios ao longo do processo, como o custo e efeitos colaterais dos medicamentos. A L-asparaginase é um desses desafios, principalmente porque faz parte de todos os protocolos de tratamento de pacientes com LLA. Por se tratar de um medicamento biológico, existem complicações em seu tempo de vida e em seus efeitos adversos, como alergias e pancreatite (MOGHRABI *et al.*, 2006). Dada a sua importância se faz necessário conduzir estudos que diminuam esses efeitos e a torne mais acessível.

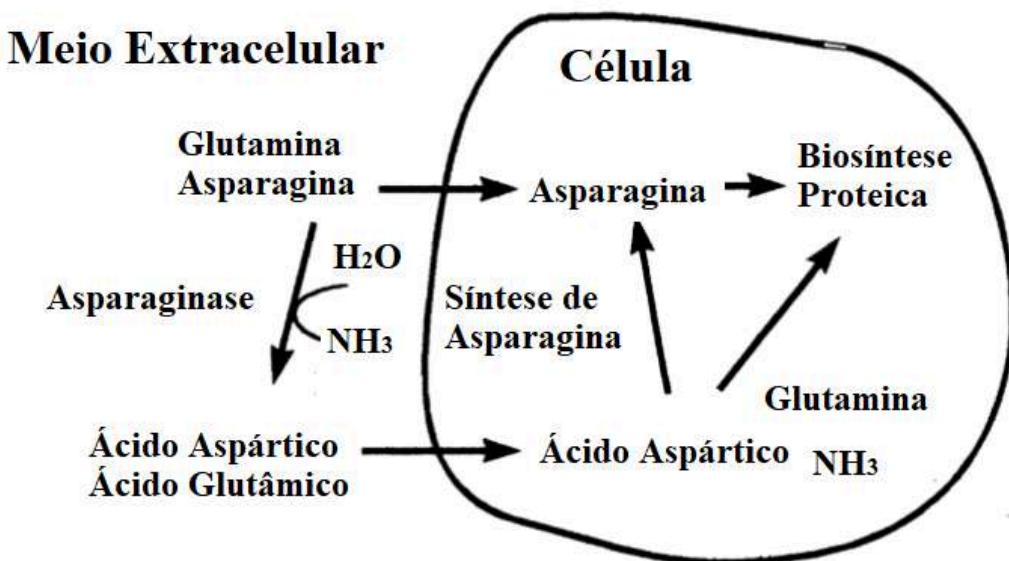
2.1.1 A ENZIMA L-ASPARAGINASE

A primeira atividade de asparaginase foi detectada em 1904, mas apenas em 1953 foi observada atividade antileucêmica em soro de porquinhos da índia. A descoberta trouxe uma grande inovação, mas devido a necessidade de uma produção enzimática maior, considerou-se outras fontes da enzima, levando em 1964 ao isolamento de asparaginases oriundas de *E. coli*.

Isso possibilitou a produção em maior escala para testes pré-clínicos, que seriam consolidados em 1967, com a constatação de ser uma droga anticancerígena (KEATING et al., 1993).

A L-asparaginase (L-ASNase) é uma enzima que catalisa a hidrólise da L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Ela pode ser tanto utilizada na indústria alimentícia, para inibir a formação de acrilamida, como na indústria farmacêutica, sendo aplicada no tratamento de diversos tipos de leucemia (WANG et al., 2021). A atuação como biofármaco se deve ao fato das células leucêmicas não sintetizarem asparagina, dependendo da produção de células saudáveis. A L-asparaginase age degradando o excesso desse aminoácido, matando as células cancerígenas por inanição. Seu mecanismo de ação encontra-se descrito na Figura 2.2.1, que demonstra seu funcionamento no meio extracelular. As moléculas de ácido aspártico formam uma nova molécula de asparagina no interior das células, o que não prejudica a síntese proteica das células saudáveis (UENO et al., 1997).

Figura 2.2.1 – Mecanismo de ação da L-asparaginase



Fonte: Adaptado de MÜLLER et al., 1998.

Atualmente existem três produtos de asparaginase disponíveis no mercado: o mais antigo, que é a enzima produzida por *Escherichia coli* (*E.coli*); sua forma conjugada com polietilenoglicol (PEG-asparaginase); e a produzida por *Erwinia chrysanthemi* (ERW-asparaginase) que tem sido utilizada em crianças que apresentam hipersensibilidade a enzima de *E. coli* (RIZZARI et al., 2019). A forma mais comum utilizada é a PEG-asparaginase, que possui um tempo de meia vida muito mais longo e de rápida ação se

comparada a forma *E. coli* nativa. Ensaios demonstraram que seu uso também acarreta uma menor incidência de anticorpos neutralizantes, o que a torna a opção de escolha nos protocolos de tratamento. Pacientes que apresentam alergia à forma peguilada são redirecionados para o uso da ERW-asparaginase, que precisa ser administrada com maior frequência e em maior dose devido ao seu tempo de meia vida (SEIBEL, 2008).

No entanto, seu uso pode ocasionar complicações como pancreatite e tromboembolismo (PIETERS *et al.*, 2008). Foram observados efeitos colaterais como leucopenia, convulsões neurológicas, anafilaxia, anomalias de coagulação, entre outros. Outra limitação é devido a origem bacteriana, que pode ocasionar um efeito alérgico e na produção de anticorpos que degradam o medicamento. Somado a isso é seu uso frequente, que pode chegar até 3 vezes por semana, aumentando o custo do tratamento (ALI *et al.*, 2016).

Em 2013, o Brasil enfrentou uma situação crítica em relação ao estoque do medicamento L-asparaginase, utilizado no tratamento da LLA. A empresa responsável pela comercialização do fármaco no país relatou que o fabricante estrangeiro encerrou a produção, deixando o Brasil com estoque para apenas seis meses. Entidades médicas estavam mobilizadas para buscar soluções urgentes, e o Ministério da Saúde (MS) planejava abrir um chamamento para que laboratórios apresentassem alternativas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR, 2013).

Em 2017, após um processo licitatório, o MS adquiriu o medicamento Leuginase® da empresa Beijing SL Pharmaceutical (China), por apresentar um valor mais competitivo que seus concorrentes. No entanto, devido a urgência desse processo, as condições de importação foram mais brandas, sem exigir estudos comparativos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2017). Uma posterior avaliação demonstrou que a composição da Leuginase® apresentava 130 vezes mais impurezas em comparação com o fármaco alemão (ZENATTI *et al.*, 2018).

Após toda a repercussão, o medicamento foi recolhido e o desabastecimento da L-asparaginase persiste. (SANTOS ROCHA *et al.*, 2023). Ainda no primeiro semestre de 2018 pesquisadores do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná) desenvolveram uma versão que pode ser uma forte candidata para o tratamento de LLA, conseguindo o depósito da patente. Essa nova molécula apresenta maior atividade bioquímica e menos efeitos colaterais em comparação com a asparaginase bacteriana atualmente utilizada. A descoberta promete aumentar a eficácia do tratamento de LLA e reduzir a dependência de importações (INSTITUTO CARLOS CHAGAS, 2018).

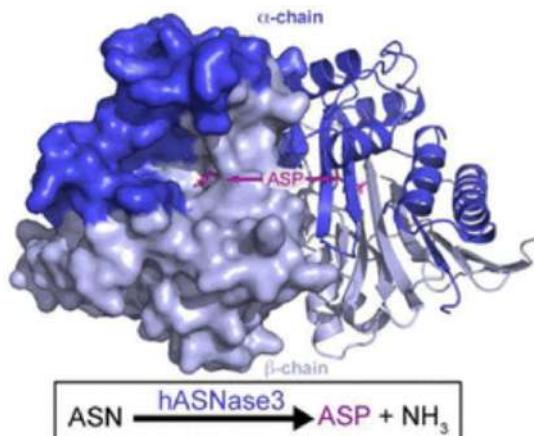
2.1.2 L-ASPARAGINASE HUMANA

O genoma humano pode produzir até três tipos de enzimas que degradam L-asparagina, dentre as quais apenas a hASRGL1 (também conhecida como hASNase3) e a 60-kDa-lisofosfolipase (hASNase1) têm a capacidade de degradar L-asparagina livre no substrato. A enzima hASNase1 pode também hidrolisar lisofosfolipídeos e possui um domínio N-terminal homólogo às asparaginases encontradas em *E. coli*, seguido por várias repetições de anquirina. Embora compartilhe diversas características com outras L-asparaginases, as propriedades cinéticas não se comparam a bacteriana, sendo necessário um maior aprofundamento em seu mecanismo de ação (GUIMARÃES *et al.*, 2021).

Em contrapartida, diversos estudos sobre o funcionamento da enzima hASNase3 demonstram o papel desempenhado na degradação de asparagina e na clivagem de peptídeos isoaspartil. A hASNase3 é homóloga a enzima tipo III de *E. coli*, mas se diferencia por precisar de uma autoclivagem para seu funcionamento, sendo uma reação limitante do processo (CANTOR *et al.*, 2009). Estas enzimas são produzidas como precursoras inativas de cadeia polipeptídica única, que pós-tradução sofrem uma clivagem intramolecular em uma ligação peptídica cindível (autoprotólise), resultando na geração de dois protômeros fortemente associados (subunidades α e β) (MICHALSKA *et al.*, 2006).

Enquanto a asparaginase do tipo III de *E. coli* é purificada totalmente clivada, a hASNase3 recombinante mostra apenas uma banda predominante em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS) em sua forma não clivada, e bandas fracas para as cadeias α e β , o que afeta a visualização por métodos tradicionais como eletroforese em gel de poliacrilamida. A enzima não clivada cristaliza em condições contendo sais, como sulfato de amônia, dificultando ainda mais a manipulação. Também foi constatado que o aminoácido glicina acelera de maneira seletiva a reação de clivagem. A Figura 2.1.2.1 representa os sítios da molécula (NOMME *et al.*, 2012).

Figura 2.1.2.1 – Estrutura da L-asparaginase humana (hASNase3)



Fonte: Adaptado de NOMME *et al.*, 2012.

A L-asparaginase humana pode ser uma boa substituta para as de origem bacteriana, especialmente no que se refere a imunogenicidade. No entanto, nenhuma das enzimas humanas possui a propriedade cinética necessária para essa substituição. Um pré-requisito para o uso clínico é um baixo valor micromolar da constante de Michaelis-Menten (K_M), porém a enzima hASNase3 possui um valor na faixa milimolar, o que a torna inviável na substituição das formulações presentes no mercado (PANETTA *et al.*, 2009). O segmento próximo do sítio ativo (Histidina 8 – Glicina 9 – Glicina 10), chamado de loop HGG, apresenta um papel crucial na cinética. Evidências indicam sua influência tanto na clivagem da enzima como em sua atividade, demonstrando sua importância (NOMME *et al.*, 2014).

Outros desafios estão no aumento da expressão enzimática, que corresponde a uma peça-chave no processo de viabilização para testes clínicos. Com esse objetivo definiu-se alguns protocolos de expressão utilizando *E. coli*, tornando possível a amplificação dos genes responsáveis pela produção de L-asparaginase a partir de técnicas de clonagem (YOUSSEF *et al.*, 2008). A expressão recombinante da hASNase3 resulta em uma mistura de enzimas na forma não processada e processada, sendo um desafio importante para purificação. Su *et al.* (2013) sugere a utilização de glicinas livres, que funcionam como indutoras na ativação da hASNase3, mas envolve passos adicionais na incubação da proteína purificada. Outro protocolo procura coexpressar as duas subunidades da hASNase3 de forma solúvel, removendo também a metionina N-terminal da subunidade β para permitir a atividade enzimática (KARAMITROS *et al.*, 2014).

Essas técnicas podem ser exploradas junto a outros protocolos de expressão de proteínas recombinantes, visando a otimização da expressão da enzima na forma solúvel e tornando viável a utilização da hASNase3 no tratamento de LLA.

2.2 OTIMIZAÇÃO NA BIOENGENHARIA

A otimização é uma das principais ferramentas na tomada de decisão na indústria. Muitos dos problemas no *design*, na operação e nos processos químicos podem ser resolvidos através da modelagem matemática, que se estende nos campos da ciência e da engenharia. A formulação de um problema segue por sua representação por equações ou apenas por dados experimentais. O objetivo da otimização é encontrar os melhores valores para as variáveis de entrada, alcançando a maior eficiência de acordo com o que se busca, como por exemplo menor custo e maior produção. (EDGAR *et al.*, 2001)

Modelos matemáticos podem ser fenomenológicos, baseados nas leis da conservação como em princípios básicos da física, química ou biologia, ou podem ser empíricos, com informações obtidas de maneira experimental (TRICA *et al.*, 2024). Se os dados disponíveis forem para uma faixa limitada de condições no processo, provavelmente os parâmetros do modelo serão diferentes para cada condição da operação. Além disso, os dados existentes podem não abranger todos os fenômenos que ditam o sistema, uma característica presente na maioria dos processos biológicos (MONTEIRO *et al.*, 2023).

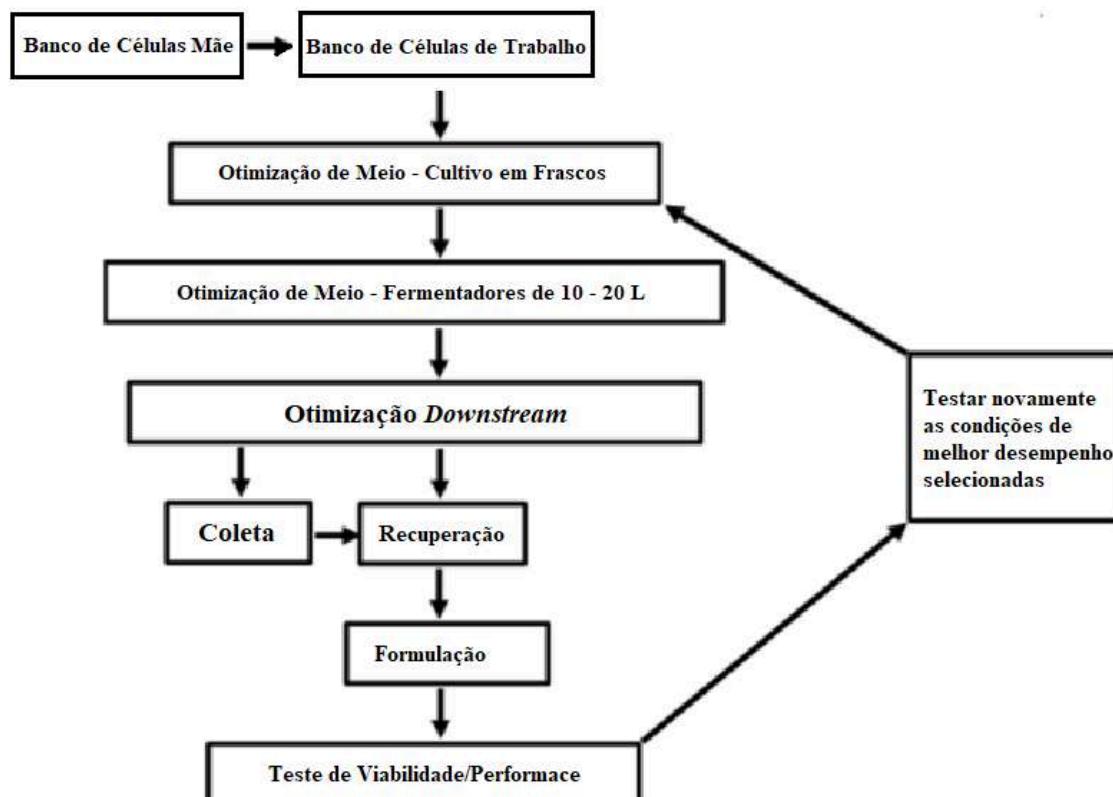
Para uma efetiva otimização é necessário saber quantificar as variáveis que descrevem a cinética do sistema. Enquanto processos químicos, a cinética está relacionada às taxas a níveis molecular, para processos biológicos a dinâmica está relacionada à própria relação do microrganismo com as variáveis do ambiente, como temperatura, composição química do meio de cultivo e pH. Devido aos custos atrelados ao escalonamento, uma boa abordagem para otimizar esses sistemas é trabalhar em escala laboratorial para depois realizar o *scale-up* (VOLESKY; VOTRUBA, 1992).

Para bioprocessos há diferentes abordagens referentes ao aumento da produtividade. Parte-se desde a genômica, com a indução de genes relevantes para a expressão metabólica, à proteômica com o estudo tridimensional das proteínas na busca da conformação com maior atividade, até o processo fermentativo, na formulação de meios para o aumento da taxa de crescimento além do *design* de biorreatores (WANG *et al.*, 2009). Os sistemas biológicos apresentam alta complexidade e alta robustez, sendo necessário uma compreensão

aprofundada das interações das variáveis no sistema. Quando se trata de um ativo farmacêutico deve-se alcançar mais requisitos que se comparado a uma biorrefinaria de biodiesel, por exemplo. (BECKER *et al.*, 2023).

As fases de fermentação alteram constantemente o fluxo metabólico e a concentração de proteínas presentes, sendo necessário implementar um controle dinâmico das variáveis. Somado a isso, o escalonamento para a produção de proteínas recombinantes segue com vários parâmetros que influenciam diretamente na expressão de proteínas solúveis, como temperatura, oxigenação e pH (MIN *et al.*, 2017). A extração no aumento da escala (*scale up*) laboratorial para a piloto e posterior escala industrial pode ser dividida em várias etapas que apresentam desafios próprios, como demonstra a Figura 2.2.1. Muitas vezes a otimização no desenvolvimento de processo é acelerada para economizar tempo na produção, resultando em baixo rendimento e perdas econômicas significativas (GANESHAN *et al.*, 2021).

Figura 2.2.1 – Fluxograma generalizado para o escalonamento de um processo fermentativo



Fonte: Adaptado de GANESHAN *et al.*, 2021

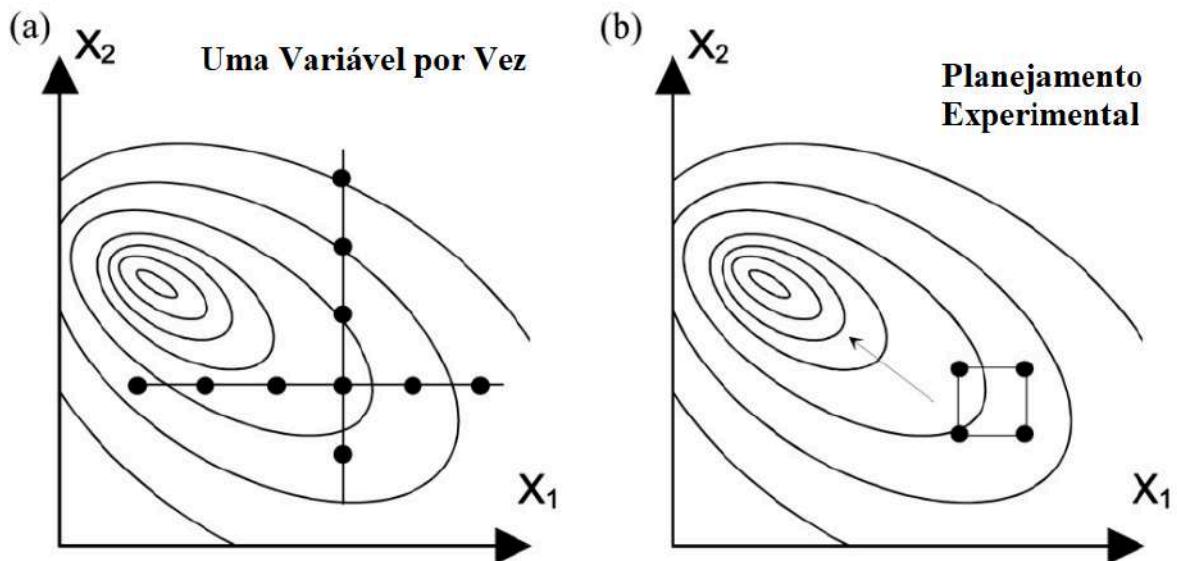
A primeira etapa a ser analisada para otimização é referente ao meio de cultivo para a expressão da proteína de interesse. O meio de cultura é essencial no cultivo de microrganismos, contendo diversas particularidades que afetam diretamente na atividade enzimática (BONNET *et al.*, 2020). Sua formulação pode envolver componentes de alto valor, tóxicos ou de difícil acesso, o que pode encarecer o processo ou até mesmo torná-lo inviável na aplicação industrial (O'NEILL *et al.*, 2020).

O crescimento em *shaker* pode considerar diversos parâmetros além da composição do meio. Essas variáveis de entrada, como temperatura, tempo após a indução, concentração celular e concentração do indutor também podem ser estudadas em conjunto, fornecendo parâmetros importantes que serão utilizados no aumento da expressão celular. A necessidade de entender a influência de diversas variáveis ao mesmo tempo alinhado à dinamicidade dos modelos biológicos tornam o Planejamento Experimental a melhor ferramenta para essa abordagem (ÖZCAN *et al.*, 2023).

2.2.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental ou *design of experiments* (DoE) é uma ferramenta de otimização estatística a partir do qual diferentes variáveis independentes são analisadas, determinando sua influência no parâmetro de interesse a partir de um número limitado de experimentos (AMBRUS *et al.*, 2024). O conceito foi criado no início do século XXI, no livro *The Design of Experiments* do estatístico Sir Ronald Fisher, e ainda possui relevância nas pesquisas conduzidas nos dias atuais, especialmente na área farmacêutica (POLITIS *et al.*, 2017). Comparado a métodos de otimização de uma variável por vez, o DoE torna possível alcançar o ótimo do sistema ao realizar variações simultâneas das variáveis, como aponta a Figura 2.2.1.1 (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008).

Figura 2.2.1.1 – Comparação do alcance de um quase ótimo.



Fonte: Adaptado de MANDENIUS; BRUNDIN, 2008.

Essa metodologia estatística estuda diferentes níveis das variáveis, podendo ser dividida em níveis mínimo (-) e máximo (+). Definir esses valores requer um conhecimento prévio do analista em relação ao seu projeto. A quantidade de experimentos para um planejamento fracionário completo é definida por 2^n sendo n o número de variáveis a serem estudadas. Para duas variáveis tem-se $2^2 = 4$ experimentos, para 7 variáveis esse valor vai para $2^7 = 128$, o que aumenta o tempo e o custo associados. Nesses casos é preferível um planejamento fatorial fracionário (BOX *et al.*, 2005).

Para isso é necessário utilizar uma meia fração, onde se considera que os contrastes das interações entre duas ou mais variáveis possuem pouca significância. Assim, mistura-se os efeitos entre as variáveis, permitindo realizar apenas uma fração dos experimentos sem perdas significativas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). A abordagem para a resolução do problema é definida através da situação que se encontra o experimento, geralmente pela quantidade de variáveis a serem analisadas, como descrito na Tabela 2.2.1.1.

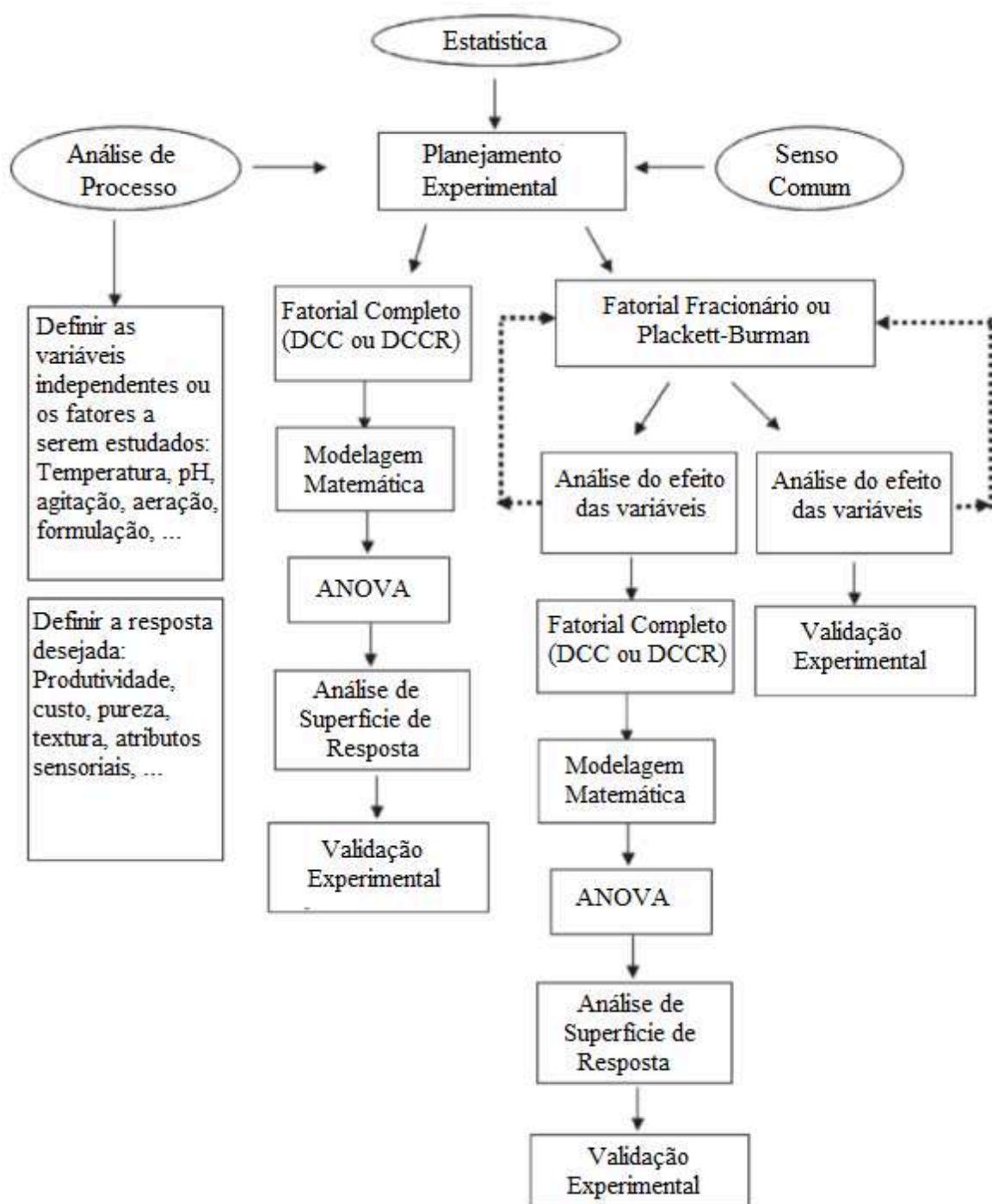
Tabela 2.2.1.1 – Etapas para otimização de um processo

Situação	Objetivo	Passos
Muitos fatores, pouco conhecimento do processo	Identificar as variáveis mais importantes.	Selecionar as variáveis (Planejamento experimental ou Plackett-Burman)
Poucos fatores.	Construção de modelos preditivos.	Otimização (Fatorial completo)
Condições ótimas definidas.	Confirmação experimental por análise de superfície de resposta.	Validação das condições de otimização.

Fonte: Adaptado de RODRIGUES; LEMMA, 2015.

Para uma eficiente aplicação do planejamento experimental deve-se levar em conta o número de variáveis independentes. Para duas ou três variáveis, recomenda-se o uso do Delineamento de Composto Central (DCC) ou Delineamentos de Compostos Central Rotacional (DCCR). Para quatro fatores, a melhor abordagem é através do uso do DCCR ou de um planejamento fracionário, com o intuito de avaliar as variáveis de maior impacto no sistema. No caso de bioprocessos, a maior parte dos experimentos envolve sete ou mais variáveis, recomendando-se o Plackett-Burman design. Na Figura 2.2.1.3 encontra-se um fluxograma com as etapas para a otimização com o planejamento experimental (RODRIGUES; LEMMA, 2015).

Figura 2.2.1.3 – Fluxograma das etapas envolvidas para atingir o objetivo desejado



Fonte: Adaptado de RODRIGUES; LEMMA, 2015.

2.2.1.1 PLACKETT–BURMAN DESIGN

Desenvolvido em 1946 por R.L. Plackett e J.P. Burman, esse método estatístico utiliza matrizes ortogonais, produzindo estimativas imparciais de todos os efeitos principais no menor número possível de experimentos. Sua aplicação serve para $n-1$ variáveis em n experimentos, alcançando otimizações que envolvem mais de oito variáveis (WANG *et al.*, 2005). O número de experimentos é um múltiplo de 4, ao invés de uma potência de 2 como visto no planejamento fatorial completo e em menos execuções que um fatorial parcial. O Plackett-Burman (PB) permite uma separação eficiente dos principais efeitos, no entanto uma desvantagem está na dificuldade em estimar as interações entre os fatores, sendo necessário um fatorial completo para complementar essa informação (TROCINE *et al.*, 2002).

Em uma triagem do PB, as variações entre os níveis de cada fator geralmente é pequeno em comparação com os intervalos usados durante a fase de otimização (AGUANZA; LAUZON; EMNACE, 2018). Após essa seleção, é gerada uma matriz para indicar os níveis fracionários. Uma vez definida, o pesquisador pode executar seu experimento, utilizando posteriormente os resultados em uma análise estatística. Na Tabela 2.2.1.1.1 é apresentado um exemplo da matriz ortogonal. As colunas representam fatores com graus de liberdade iguais a o número de níveis na coluna. Os elementos nas colunas especificam os níveis alto (+1) e baixo nível (-1) a serem definidos para fatores para o dado experimento.

Tabela 2.2.1.1.1 – Exemplo da aplicação de Plackett-Burman para 12 variáveis.

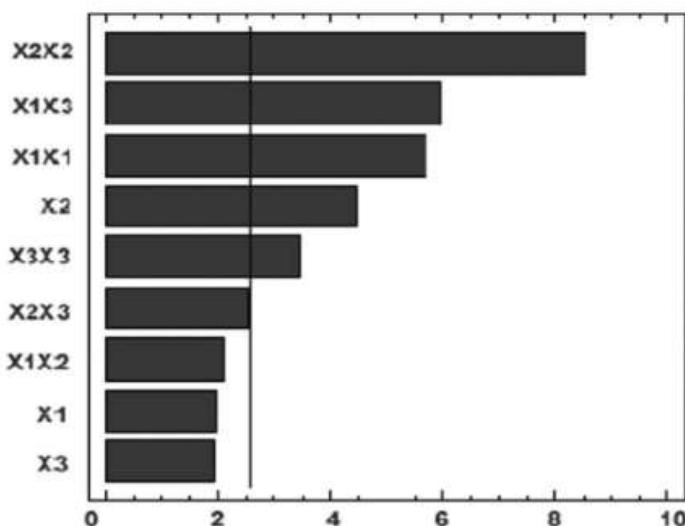
Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Fonte: Adaptado de VANAJA; RANI, 2007.

A partir dos dados é possível calcular os coeficientes de regressão, que são baseados em matrizes de Hadamard. Os resultados são interpretados por polinômios de primeira ordem. Aqui, todos os graus de liberdade são usados para estimar os efeitos das variáveis analisadas, para depois realizar uma análise de variância (ANOVA) para determinar quais fatores possuem maior influência na resposta de interesse (PLACKETT; BURMAN, 1946).

Antes de definir um modelo, é necessário examinar a distribuição dos valores residuais, que tratam da diferença entre os valores previstos no modelo para os dados experimentais. Se todos esses resíduos se encaixarem em uma linha reta, pode-se afirmar que seguem uma distribuição normal. Em seguida implementa-se um gráfico de pareto, onde classifica-se as estimativas do efeito ANOVA do maior ao menor valor absoluto. A magnitude de cada efeito é representada por uma coluna, e uma linha cruzando as colunas representa o tamanho de uma coluna para ter significância estatística, como representado na Figura 2.2.1.1 (VANAJA; RANI, 2007).

Figura 2.2.1.1 – Representação de um gráfico de Pareto

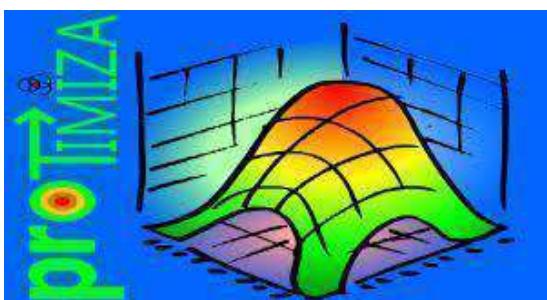


Fonte: VANAJA; RANI, 2007.

2.3 PROGRAMA PROTIMIZA EXPERIMENTAL DESIGN

O programa Protimiza Experimental Design® foi criado pela Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues com o objetivo de ajudar na análise de dados experimentais aplicando a metodologia do DoE. Ele atua como complemento do livro da mesma autora, Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, que é um dos livros mais completos ao se tratar de matrizes de Plackett-Burman (PROTIMIZA, 2024).

Figura 2.3.1 – Logo do programa Protimiza Experimental Design®



Fonte: PROTIMIZA, 2024.

No software online é possível utilizar DCC, DCCR e de Plackett-Burman, gerando modelos polinomiais com os dados experimentais das análises. O tratamento estatístico feito pelo programa permite a melhor interpretação dos dados, sendo utilizado em diversas pesquisas de otimização por design experimental (GONZALES *et al.*, 2020; BARBOSA *et al.*, 2020).

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES

- Tampão de amostra de proteínas: Tris-HCl (40 mM), SDS (1%), β -mercaptoetanol (2,5%), glicerol (6%) e azul de bromofenol (0,005%).
- NuPAGE™ MES SDS *Running Buffer*: MES (50 mM), Tris Base (50 mM), EDTA (1 mM) e SDS (0,1%).
- Solução fixadora: PBS, EtOH (50%) e ácido acético (10%).
- Solução de coloração dos geis: Azul de Coomassie R250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45% : 10%) e água ultrapura (45%).
- Tampão de transferência para *Western blot*: Tris-base (25 mM), glicina (192 mM) e MetOH (20%).
- Solução de bloqueio para *Western blot*: Tampão PBS, Tween-20 (0,05%) e leite em pó desnatado (4%).
- Tampão de lise: Tris-HCl (50mM), NaCl (500mM), glicerol (10% w/v), Triton100 (1% w/v) e PMSF (Fluoreto de fenilmetanosulfonil) (1 mM).
- Tampão PBS (*Phosphate-buffer saline*): KCl (2,7 mM), KH_2PO_4 (1,5 mM), NaCl (137mM) e $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,3 mM).
- Tampão PBS + Tween-20: PBS e Tween-20 (0,05% w/v).
- Solução aquosa de TCA: Ácido tricloroacético (5% w/v).

3.1.2 MEIOS DE CULTURA

- Meio 01: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), glicina (150 mM), KH_2PO_4 (17 mM) e glicerol (4%).
- Meio 02: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), glicina (150 mM) e K_2HPO_4 (72 mM).
- Meio 03: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), KH_2PO_4 (17 mM) e K_2HPO_4 (72 mM).
- Meio 04: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), K_2HPO_4 (72 mM) e glicerol (4%).
- Meio 05: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), glicina (150 mM) e glicerol (4%).

- Meio 06: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), glicina (150 mM) e KH₂PO₄ (17 mM).
- Meio 07: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), KH₂PO₄ (17 mM) e K₂HPO₄ (72 mM).
- Meio 08: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), glicina (150 mM), K₂HPO₄ (72 mM) e glicerol (4%).
- Meio 09: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), KH₂PO₄ (17 mM) e glicerol (4%).
- Meio 10: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L) e NaCl (2,0 g/L).
- Meio 11: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (8,0 g/L) e glicina (150 mM).
- Meio 12: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), KH₂PO₄ (17 mM) e K₂HPO₄ (72 mM).
- Meio 13: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), glicina (150 mM) e KH₂PO₄ (17 mM).
- Meio 14: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), glicina (150 mM), KH₂PO₄ (17 mM), K₂HPO₄ (72 mM) e glicerol (4%).
- Meio 15: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), glicina (150 mM), KH₂PO₄ (17 mM), K₂HPO₄ (72 mM) e glicerol (4%).
- Meio 16: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), glicina (150 mM) e K₂HPO₄ (72 mM).
- Meio 17: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (8,0 g/L), KH₂PO₄ (17 mM) e glicerol (4%).
- Meio 18: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (2,0 g/L), K₂HPO₄ (72 mM) e glicerol (4%).
- Meio 19: Triptona (15,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L) e NaCl (2,0 g/L).
- Meio 20: Triptona (5,0 g/L), extrato de levedura (8,0 g/L), NaCl (8,0 g/L) e glicerol (4%).
- Meio Ponto Central (PC): Triptona (10,0 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L) e NaCl (5,0 g/L).
- Meio Controle (CTRL): Triptona (10,0 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), glicina (75 mM), KH₂PO₄ (8.5 mM), K₂HPO₄ (36 mM) e glicerol (2%).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 MATRIZ ORTOGONAL PARA PLACKETT-BURMAN

De acordo com a consultoria realizada com a Protimiza, a triagem das variáveis que influenciam a atividade enzimática considerou todos os parâmetros relacionados à expressão. Isso inclui as variáveis da composição do meio, pH, tempo de pré-inóculo, volume do inóculo, densidade óptica (D.O.) de indução, concentração do indutor isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e temperatura. A matriz ortogonal foi criada com dois níveis e um meio com um terceiro nível, que representa os valores médios das variáveis, como presente na Tabela 3.2.1.1.

Tabela 3.2.1.1 – Matriz ortogonal para a triagem de variáveis

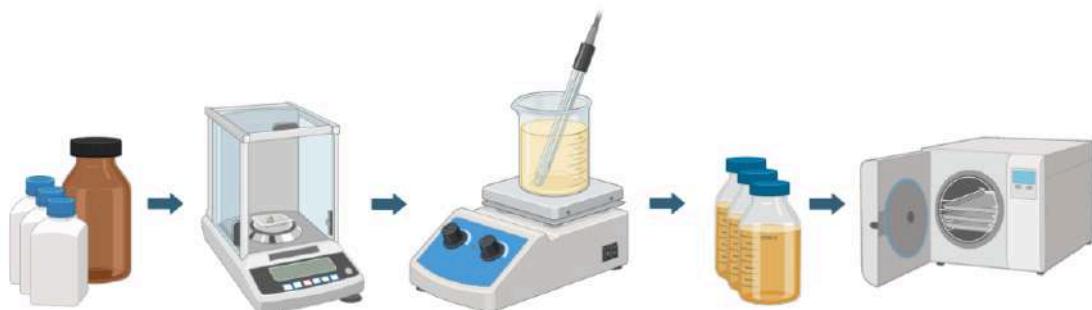
Ensai o	Triptona	Extrato de levedura	NaCl	Glicina	KH2PO4	K2HPO4	pH	Glicerol	Tempo Pré-Inóculo	Inóculo	D.O. 600 de indução	IPTG	Temperatura
1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
3	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1
4	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1
6	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1
7	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1
8	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
11	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
12	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
13	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
14	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1
15	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1
16	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	1
17	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
18	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
19	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	1
20	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Protimiza, 2024.

3.2.2 PREPARO DE MEIOS PARA ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO

Para a análise da expressão celular, foram preparados 22 meios de cultura. O procedimento envolveu pesagem do material em uma balança de precisão. Em seguida, o material foi diluído em água purificada com o auxílio de um agitador magnético. O pH foi ajustado utilizando solução de NaOH 5M e/ou HCl 5M, conforme necessário. O volume total foi ajustado para 1 litro utilizando uma proveta graduada, e o meio de cultura foi transferido para frascos devidamente etiquetados para garantir a identificação correta. Todo o material foi submetido à descontaminação em autoclave, por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

Figura 3.2.2.1 – Preparo dos meios de Cultura.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

Tabela 3.2.2.1 – Composições dos meios de cultura.

Ensaio/ Meio	Triptona (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	NaCl (g/L)	Glicina (mM)	KH ₂ PO ₄ (mM)	K ₂ HPO ₄ (mM)	pH	Glicerol (%)
1	15	8	2	150	17	0	5.5	4
2	5	2	8	150	0	72	7.5	0
3	15	8	2	0	17	72	5.5	0
4	15	8	8	0	0	72	7.5	4
5	15	8	8	150	0	0	7.5	4
6	5	8	8	150	17	0	5.5	0
7	15	2	8	0	17	72	7.5	0
8	5	2	2	150	0	72	5.5	4
9	5	2	2	0	17	0	7.5	4
10	5	2	2	0	0	0	5.5	0
11	15	2	8	150	0	0	5.5	0
12	5	8	8	0	17	72	5.5	0
13	15	2	2	150	17	0	7.5	0
14	15	2	8	150	17	72	5.5	4
15	5	8	2	150	17	72	7.5	4
16	5	8	2	150	0	72	7.5	0
17	5	2	8	0	17	0	7.5	4
18	15	2	2	0	0	72	5.5	4
19	15	8	2	0	0	0	7.5	0
20	5	8	8	0	0	0	5.5	4
Controle (CTRL)	10	5	5	0	0	0	7	0
Ponto Central (PC)	10	5	5	75	8.5	36	6.5	2

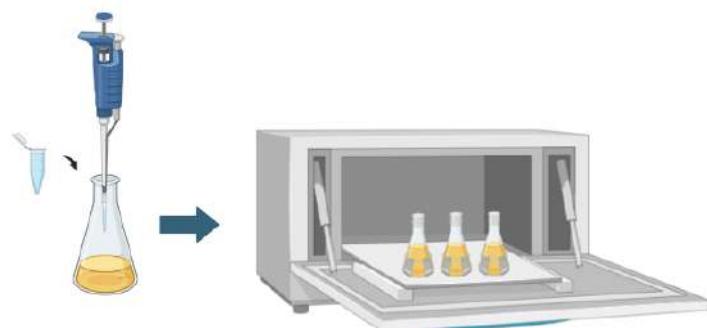
Fonte: Protimiza.

3.2.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

O primeiro ensaio de expressão teve como objetivo determinar o momento ideal após a indução para que a enzima L-asparaginase extracelular e solúvel apresentasse a maior taxa de produção. Essa informação serviria como parâmetro para as análises subsequentes.

Em Cabine de Segurança Biológica, realizou-se um pré-inóculo com uma alíquota de 125 μ L da *E. coli* recombinante em 62,5 mL de meio Controle contendo 25 μ g/mL do antibiótico canamicina. A incubação ocorreu por 16 horas, a 200 rpm e 37°C.

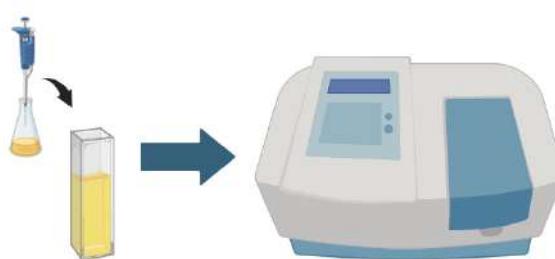
Figura 3.2.3.1 – Pré-inóculo e incubação.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

Realizou-se o envase de 125 mL do meio Controle (CTRL) e 1 litro do meio Ponto Central (PC), ambos contendo 25 μ g/ml de antibiótico canamicina. Para o CTRL, removeu-se 1,75 mL de meio e adicionou-se o mesmo volume do pré-inóculo crescido *overnight*. Já para o PC, retirou-se 14 mL de meio e adicionou-se o mesmo da pré-cultura, representando uma diluição de 1:70. Após o inóculo, coletou-se 1 mL da cultura e analisou-se a densidade óptica (D.O.) a 600 nm utilizando um espectrofotômetro. Esse foi o primeiro registro de uma série que prosseguiu até a cultura atingir D.O. 0,7, com intervalos de 1 hora entre as coletas. As culturas foram mantidas em shaker a 37°C e 200 rpm.

Figura 3.2.3.2 – Medição da D.O. em espectrofotômetro.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

Após as culturas atingirem D.O. 0,7, foram retiradas três alíquotas de 1 mL de cada um dos dois cultivos e armazenadas em tubos de 1,5 mL. Separou-se os 6 tubos em “CTRL

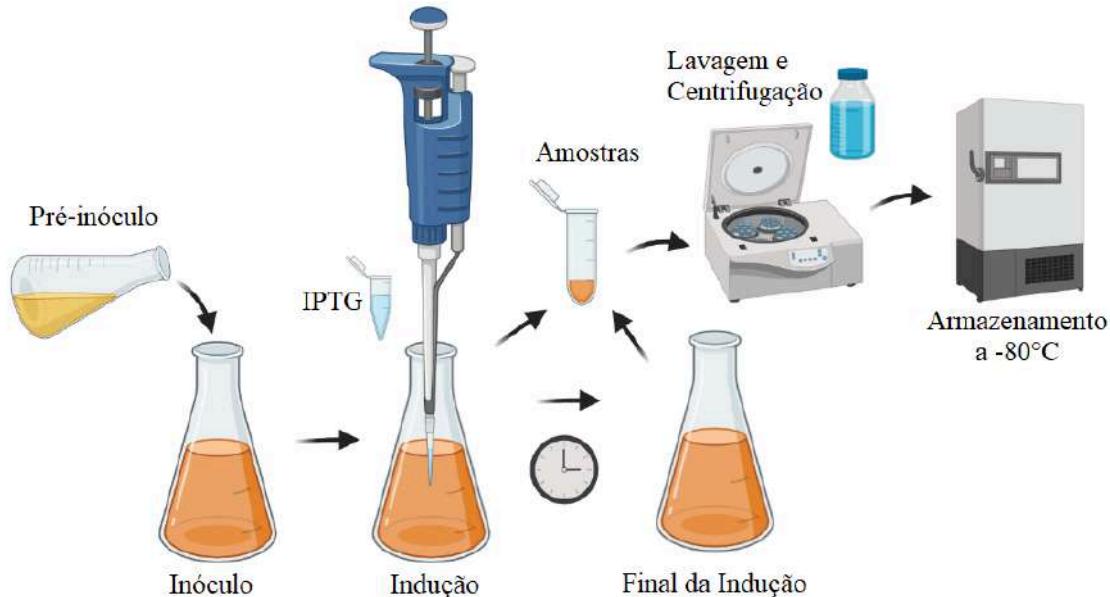
NI” (Controle não induzido) e “PC NI” (Ponto Central não induzido). No erlenmeyer do meio CTRL, adicionou-se 62,5 µL de IPTG 1M (concentração final de 0,5 mM), e o cultivo foi incubado em shaker a 18°C por 16 horas a 200 rpm. Para o PC, adicionou-se 550 µL de IPTG 1M (concentração final de 0,55 mM) e o inóculo foi dividido em quatro erlenmeyers: PC 5h, PC 10h, PC 15h e PC 30h, correspondendo ao tempo total de indução da cultura. Os quatro frascos foram transferidos para *shaker* a 200 rpm e 27°C, por representar a temperatura média entre os dois pontos analisados pela matriz ortogonal da análise Plackett-Burman. Para acompanhar o crescimento celular, foram retiradas alíquotas de 1 mL das amostras a cada 1 hora.

As alíquotas das amostras não induzidas foram submetidas à centrifugação a 6000 x g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, e os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 400 µL de PBS estéril. Após nova centrifugação a 6000 x g por 5 minutos, as amostras foram armazenadas a -30°C.

Após 16 horas, coletaram-se três alíquotas de 1 mL do CTRL, armazenadas em tubos de 1,5 mL e identificadas como “CTRL IND”. Repetiu-se o mesmo procedimento de lavagem com PBS utilizado para as amostras não induzidas. Em seguida, separou-se 1 mL do cultivo para análise em espectrofotômetro. Do restante do cultivo, 125 mL foram transferidos para um tubo de centrífuga de 250 mL, devidamente identificado, e centrifugados a 6000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensos com 50 mL de PBS estéril e centrifugado novamente sob as mesmas condições. Após descartar o sobrenadante, os frascos foram pesados e armazenados a -80°C.

Os mesmos procedimentos foram aplicados ao PC, respeitando o tempo estabelecido para cada cultura. Foram coletadas três alíquotas de 1 mL, identificadas como “PC IND 5/10/15/30” de acordo com o tempo de indução. Essas amostras passaram pelas etapas de centrifugação e lavagem com PBS estéril. Em seguida, coletou-se 125 mL do cultivo em um tubo de centrífuga de 250 mL e o centrifugou a 6000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 50 mL de PBS 1x filtrado e novamente centrifugado. Após descartar o sobrenadante, o tubo foi armazenado a -80°C.

Figura 3.2.3.3 – Representação do procedimento.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

3.2.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

A análise de desempenho segue o mesmo protocolo descrito anteriormente para a avaliação da cinética de crescimento. A diferença está no tempo de indução, no pré-inóculo, nas diluições do inóculo, na concentração do indutor (IPTG) e nos meios de cultura utilizados. Todos os valores estão listados na Tabela 3.2.4.1, correspondendo às variações dos níveis no design de Plackett-Burman.

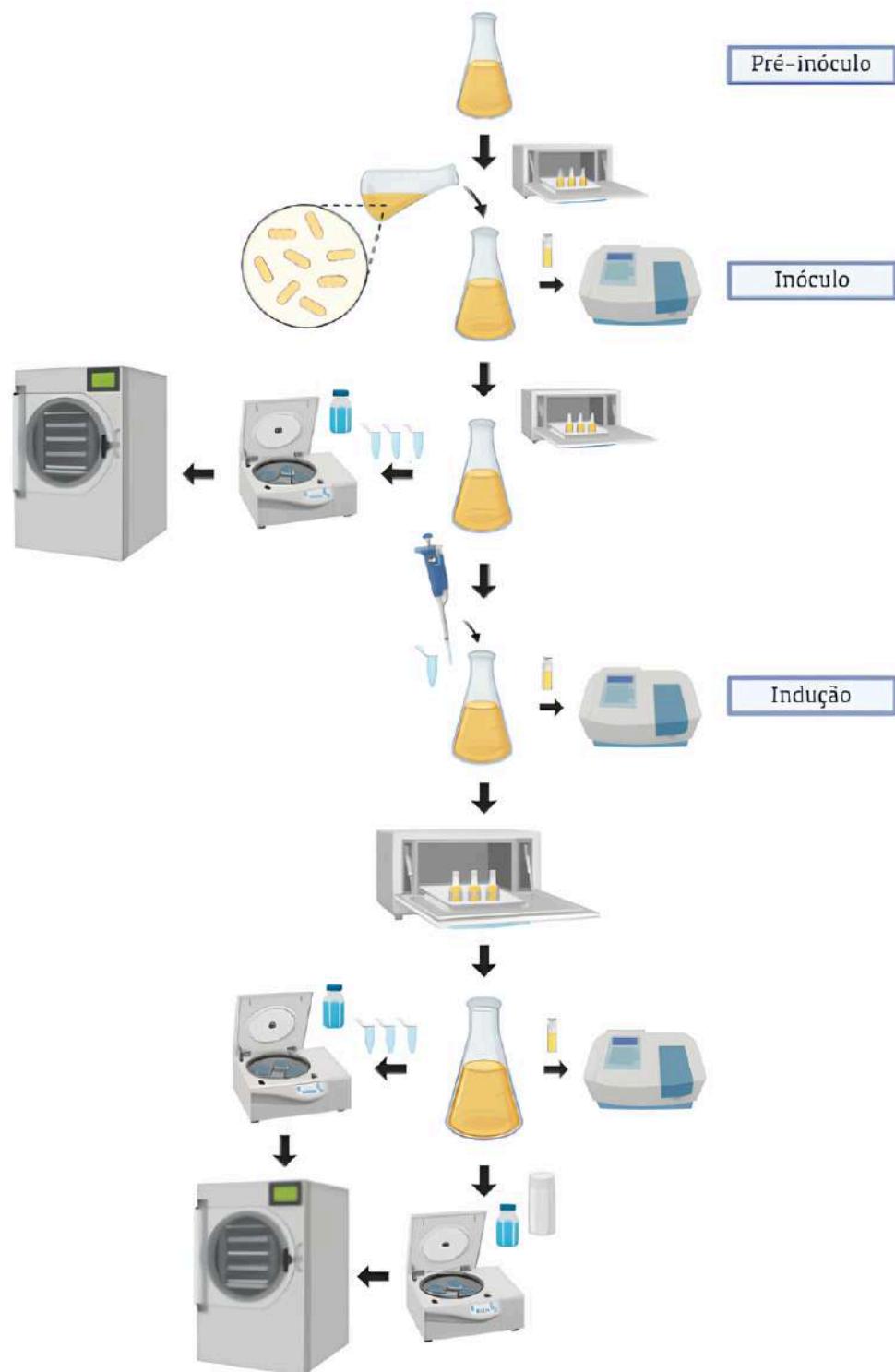
Tabela 3.2.4.1 – Condições de cultivo para cada ensaio.

Ensaio / Meio	Tempo de Pré cultura (h)	Inóculo	D.O. de indução	IPTG (mM)	Temperatura (°C)
1	8	1:130	0,2	1	18
2	8	1:130	0,2	1	18
3	24	1:20	0,2	0,1	18
4	8	1:20	0,2	0,1	18
5	24	1:130	1,2	0,1	18
6	24	1:20	1,2	1	18
7	24	1:130	1,2	1	18
8	24	1:20	1,2	0,1	18
9	8	1:20	1,2	1	18
10	8	1:130	0,2	0,1	18
11	8	1:20	1,2	0,1	36
12	8	1:130	1,2	0,1	36
13	24	1:130	0,2	0,1	36
14	8	1:20	0,2	1	36
15	8	1:130	1,2	0,1	36
16	24	1:20	0,2	1	36
17	24	1:20	0,2	0,1	36
18	24	1:130	1,2	1	36
19	8	1:20	1,2	1	36
20	24	1:130	0,2	1	36
PC	16	1:70	0,7	0,55	27
Controle	16	1:70	0,7	0,5	18

Fonte: Adaptado do Protimiza.

Devido à complexidade do experimento, que envolve muitas variáveis e detalhes importantes, ele foi dividido em quatro partes, correspondentes aos diferentes tempos de pré-cultura. Para cada experimento, também foi necessário conduzir um novo ensaio com o PC e o CTRL. O procedimento para cada ensaio individual está detalhado na figura 3.2.4.1.

Figura 3.2.4.1 – Fluxograma de cada ensaio individual.



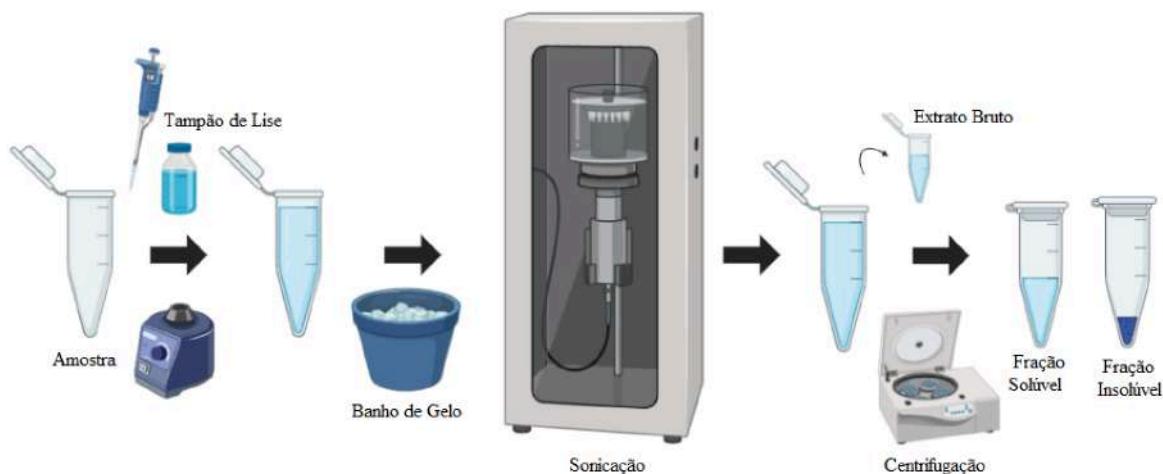
Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

3.2.5 VERIFICAÇÃO DA SOLUBILIDADE

Após a coleta dos *pellets* nos experimentos de cinética e desempenho dos meios, uma amostra de cada *pellet* passou pelo procedimento de separação da fração solúvel. Os *pellets* foram ressuspensos em um tampão de lise na proporção de 25 µL de tampão para cada 0,1 de D.O. e 1 mL de amostra.

Em seguida, os *pellets* foram submetidos a três ciclos de sonicação de 10 segundos e amplitude de 40 Hz, com intervalos de 30 segundos entre os ciclos, em banho de gelo. Foram separados 30 µL de extrato bruto, enquanto o restante foi centrifugado a 16000 x g por 10 minutos a 4°C. Com o auxílio de uma micropipeta automática, o novo sobrenadante foi transferido para um tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, correspondendo à fração solúvel, enquanto o *pellet* representou a fração insolúvel (Figura 3.2.5.1).

Figura 3.2.5.1 – Processo de separação da fração solúvel e insolúvel.

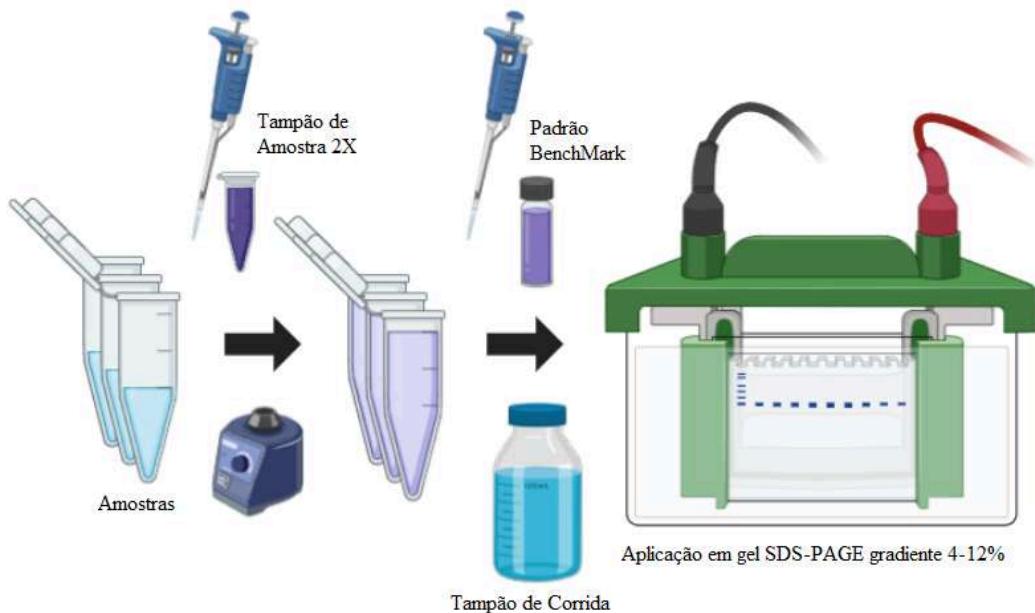


Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

3.2.6 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING PARA CONFIRMAÇÃO DE EXPRESSÃO

Para as análises, utilizou-se as frações solúveis preparadas anteriormente. Para 20 µL de fração solúvel adicionou-se 20 µL de tampão de amostra de proteína 2x e homogeneizou com vortex. Em seguida, em um gel SDS-PAGE gradiente 4-12% adicionou-se 15 µL em cada poço, com 7 µL do padrão BenchMark. A corrida foi conduzida a voltagem constante de 125V por 2 horas em tampão de corrida NuPAGE™ MES SDS *Running Buffer*.

Figura 3.2.6.1 – Preparo das amostras para corrida Eletroforese.

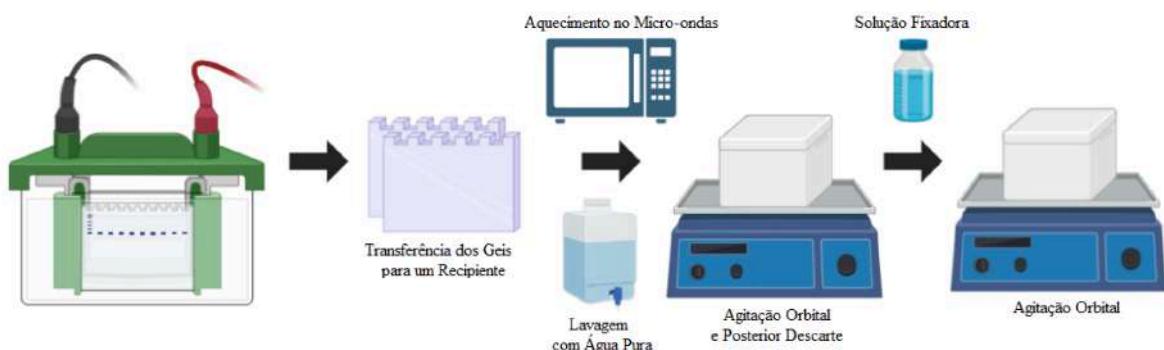


Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

Após a corrida, os géis foram lavados com água purificada e armazenados em uma caixa, onde adicionou-se 100 mL de água purificada. Em seguida, os geis para coloração foram aquecidos por 60 segundos no micro-ondas e a água foi removida. Repetiu-se esse processo por mais duas vezes. Na terceira vez, os geis foram submetidos a agitação orbital por 5 minutos imersos em água quente.

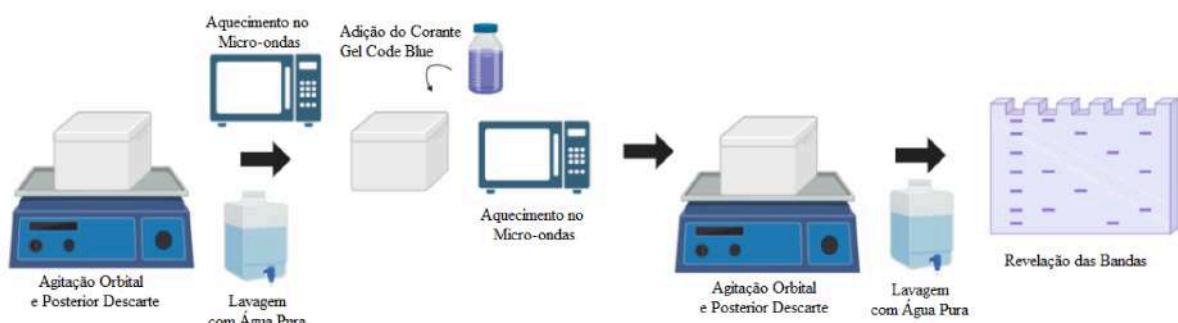
Para a etapa de fixação, a água foi descartada e utilizou-se uma solução fixadora. O gel foi deixado em agitação orbital por 30 minutos. Na etapa de coloração, a solução fixadora foi removida, o gel foi lavado com água purificada e, em seguida, preencheu-se o recipiente com 100 mL de água, submetendo-o a mais 60 segundos no micro-ondas.

Figura 3.2.6.2 – Procedimento de fixação dos géis.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

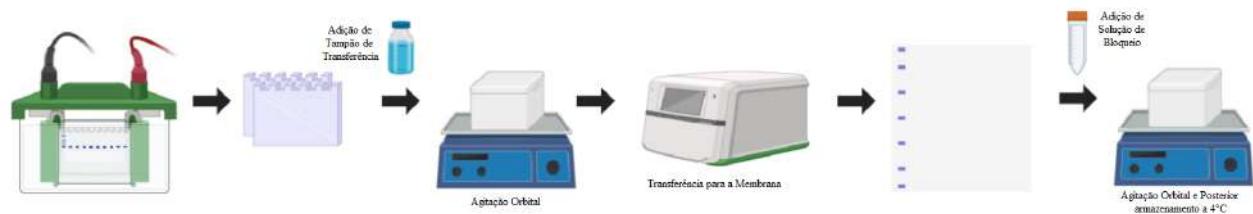
Figura 3.2.6.3 – Etapas de coloração e descoloração dos geis.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

Para o *western blot*, realizou-se a mesma corrida. Após a eletroforese, transferiu-se o gel para uma caixa contendo tampão de transferência, ficando por 15 minutos em agitação orbital. Em seguida, utilizou-se o sistema Power Blotting (Thermo Fisher) com uma amperagem fixa de 1,3 A por 4 minutos. A membrana utilizada foi de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com tamanho de poro de 0,22 µm. Após a transferência, as membranas foram colocadas em um recipiente contendo 25 mL de solução de bloqueio composta por tampão PBS, Tween-20 (0,05%) e leite em pó desnatado (4%), sendo deixadas armazenadas a -4°C durante a noite (Figura 3.2.6.4).

Figura 3.2.6.4 – Etapas de transferência e bloqueio para western blot.

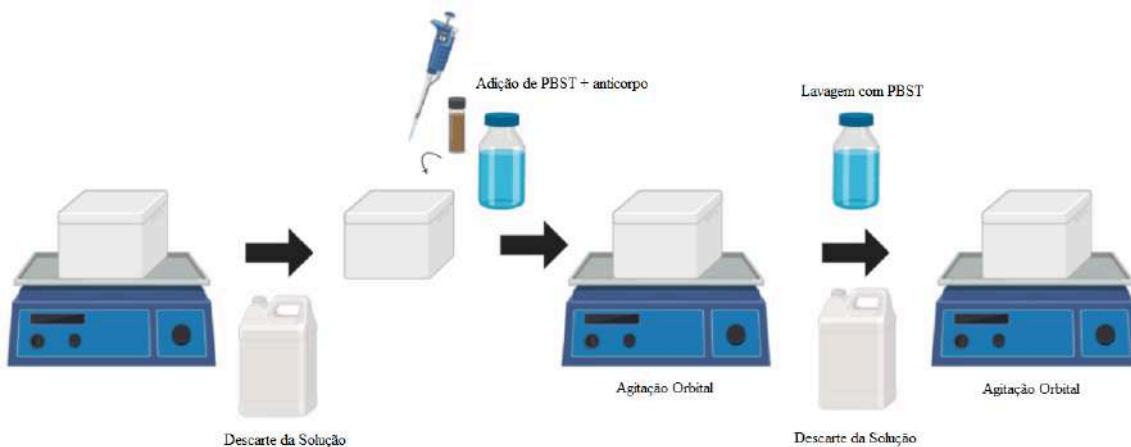


Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

Após o período de incubação, descartou-se a solução de bloqueio e lavou-se o gel com uma solução de PBST. Descartou-se novamente a solução e adicionou-se para cada membrana 10mL da solução de PBST + 1 μ L de anticorpo primário anti-ASRGL1 (MyBioSource) em uma diluição de 1:1000. As membranas foram então submetidas à agitação orbital por 1 hora e 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida removeu-se a solução e adicionou-se 15 mL de PBST, realizando agitação orbital por 5 minutos antes de descartar. Esse processo foi repetido mais duas vezes.

Em seguida adicionou-se 30 mL de solução PBST + 1 μ L do anticorpo secundário Anti-IgG de coelho (Sigma) em uma diluição: 1:30000. O sistema foi submetido novamente à agitação orbital por uma hora à temperatura ambiente e, em seguida, lavado duas vezes com PBST e uma vez com PBS por 5 minutos cada, utilizando agitação orbital.

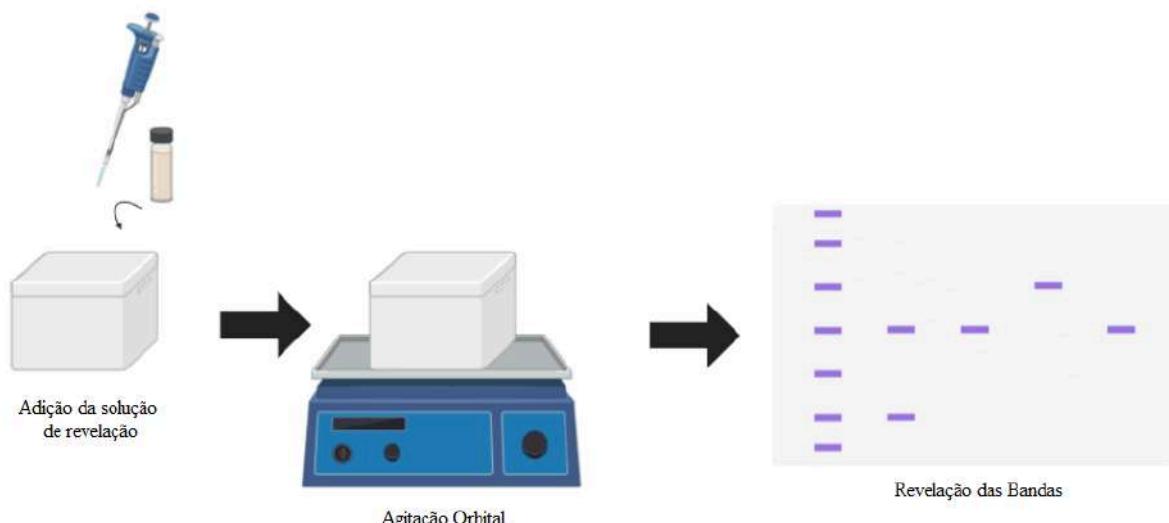
Figura 3.2.6.5 – Etapas de aplicação do anticorpo para western blot.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

Ao final, adicionou-se 10mL da solução de revelação do kit AP Conjugate Substrate (Bio-Rad), protegido da luz, deixando sob agitação por 10 minutos, até a revelação da banda. A reação de revelação foi parada com adição de água purificada.

Figura 3.2.6.6 – Etapas de aplicação da solução de revelação no *western blot*.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

3.2.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR TESTE DE NESSLER

A atividade enzimática da enzima L-asparaginase foi avaliada com base em protocolos que utilizam o reagente de Nessler (DERST; HENSELING; RÖHM, 1992). Essa atividade é determinada pela conversão da asparaginase, em que uma unidade internacional de L-asparaginase (UI) corresponde à quantidade de enzima necessária para converter 1 µmol de asparagina em 1 µmol de L-aspartato e 1 µmol de amônia por minuto a 37 °C.

Para o ensaio da atividade diluiu-se 1 µL das amostras solúveis, obtidas na cinética de crescimento, em 499 µL de tampão PBS filtrado. Em seguida, adicionou-se 150 µL dessa diluição a um tubo Eppendorf de 1,5 mL, juntamente com 150 µL de asparagina a 5 g/L. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 30 minutos. Ao final, adicionou-se 75 µL da solução aquosa de TCA 1,5 M e agitou-se rapidamente em um vórtex para interromper a reação. Adicionalmente, foram acrescentados 750 µL de água destilada.

Para a construção da curva padrão, preparou-se uma solução padrão em proporção de 1:7,5 de solução aquosa de asparagina a 5 g/L, 1:15 de solução aquosa de TCA 1,5 M e PBS para completar o volume. Além disso, preparou-se também uma solução de sulfato de amônio

a 1 mg/mL, realizando uma diluição seriada para definir os pontos da curva: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL.

Em uma placa de 96 poços, reservou-se os primeiros 7 poços para a curva padrão analítica. Adicionou-se 150 µL das amostras e da solução de sulfato de amônio em triplicata e, em seguida, completou-se com 50 µL do reagente de Nessler. A placa ficou em repouso por 30 minutos até a leitura em uma leitora de placas com comprimento de onda de 440 nm.

Figura 3.2.7.1 – Avaliação da atividade enzimática por Nessler.



Fonte: Elaboração própria, produzido com biorender.

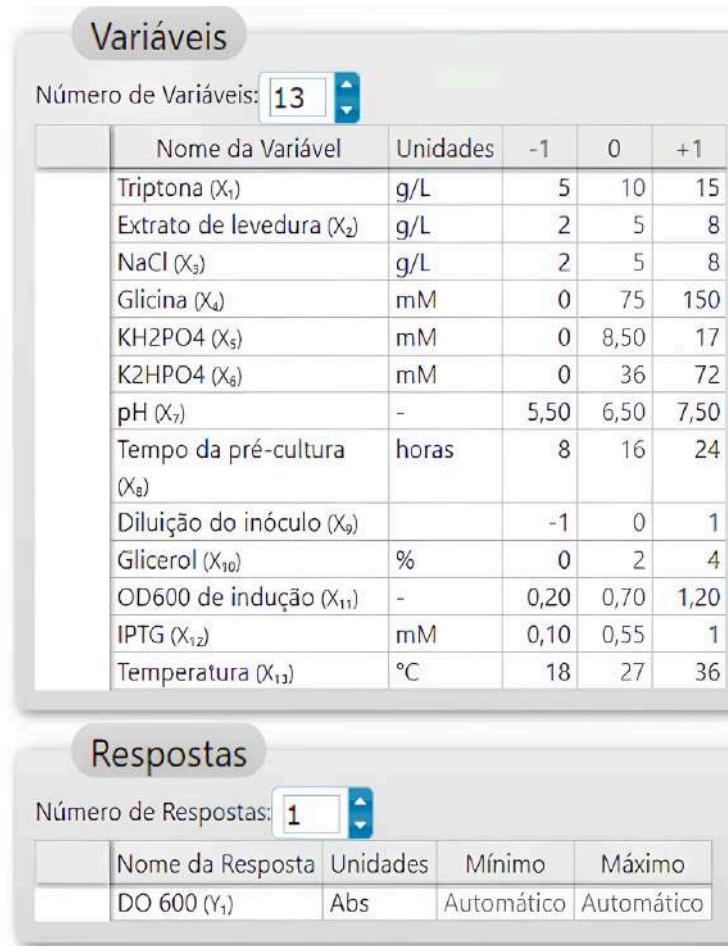
Os valores de absorvância (abs) obtidos para a curva padrão foram plotados em um gráfico, resultando em uma equação linear relacionada à concentração de NH₄⁺. Para o cálculo da atividade enzimática, utilizou-se a relação da quantidade de amônia liberada dividida pelo tempo de incubação multiplicada a quantidade de enzima como descrita na equação (3.2.7).

$$\text{Atividade Enzimática (UI/mL)} = \frac{\text{Quantidade de Amônia Liberada}}{\text{Tempo de Incubação x mL de enzima}} \quad (3.2.7)$$

3.2.8 PROGRAMA PROTIMIZA

Para a análise pelo programa Protimiza, estabeleceu-se uma relação entre as variáveis com a D.O._{600nm} obtida ao final da análise de performance dos diferentes meios de cultura. O programa estabeleceu as relações entre as variáveis e forneceu um gráfico de pareto, demonstrando quais parâmetros possuem relevância no crescimento celular após a indução de expressão.

Figura 3.2.8.1 – Interface do software Protimiza Experimental Design® .



Fonte: Protimiza.

4 RESULTADOS

4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Os dados coletados com a leitura no espectrofotômetro foram plotados em um gráfico de D.O. a 600 nm em função do tempo (horas), com o objetivo de analisar a cinética de crescimento da *E. coli* recombinante e verificar se todos os experimentos apresentaram o mesmo perfil de crescimento bacteriano. Os resultados demonstram valores muito próximos de D.O. É possível observar que, após aproximadamente 12 horas de indução, o microrganismo atinge uma fase estacionária e, posteriormente, volta a crescer. Isso provavelmente está relacionado ao consumo de sua fonte principal de energia. Após esse período, o microrganismo provavelmente utiliza outra fonte de energia e retoma o crescimento.

O principal objetivo dessa análise é estimar o tempo de indução a partir dos dados do cálculo de atividade enzimática para a L-asparaginase solúvel e da comparação com seu perfil de crescimento. Através da curva de crescimento, é possível observar se algum experimento teve um resultado diferente do esperado, além de estimar a curva de crescimento da bactéria recombinante. Com base nesses dados, escolheu-se o período de 8 horas de indução, pois representa o final da fase exponencial, caracterizando uma maior atividade bacteriana e uma menor presença de contaminantes expressos pelo metabolismo do microrganismo.

Figura 4.1.1 – Curva de crescimento da *E.coli* recombinante no meio controle

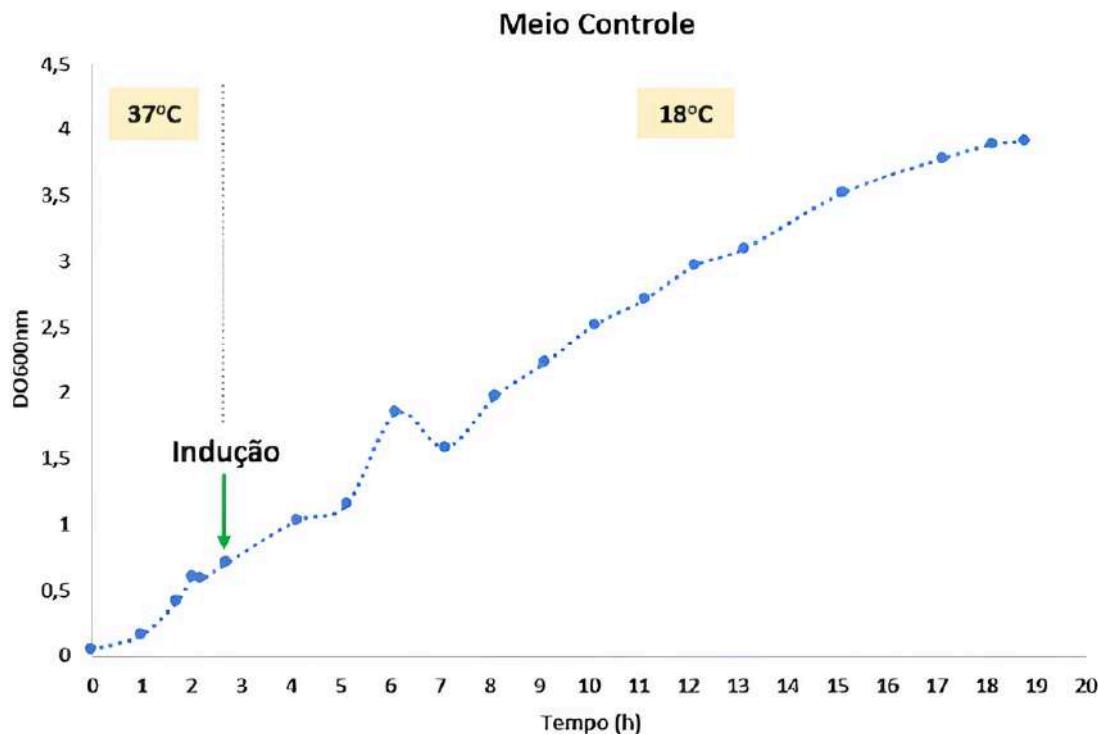
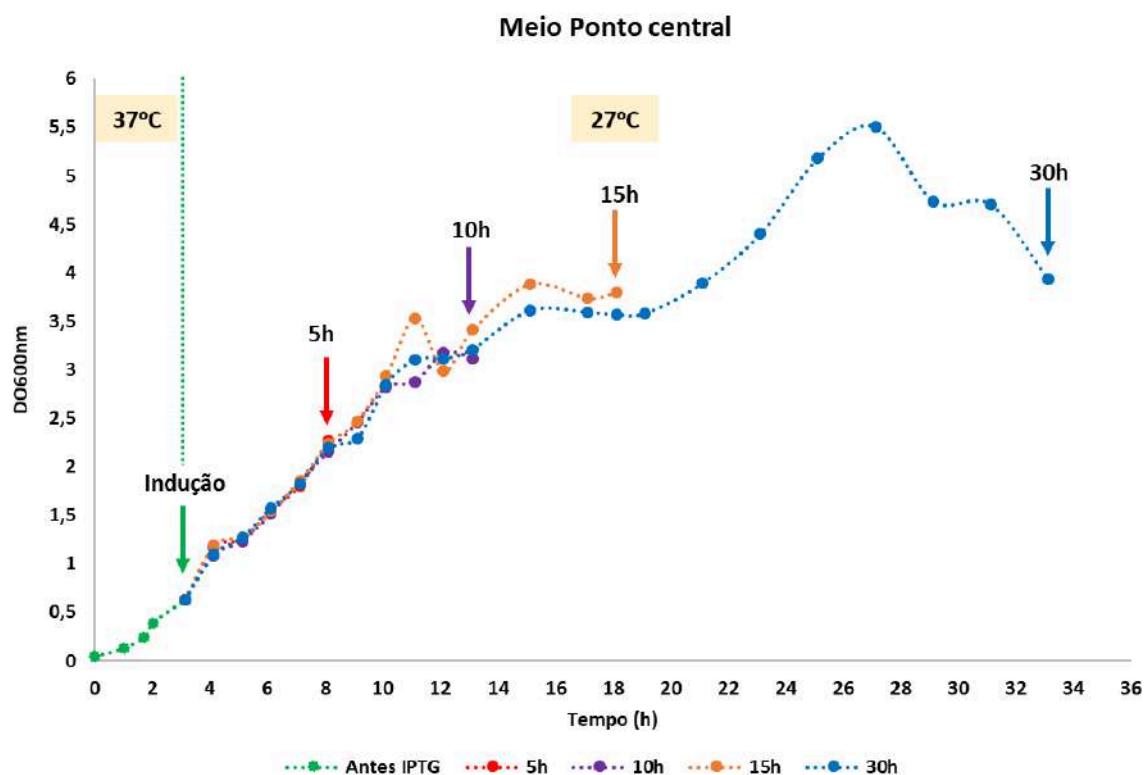


Figura 4.1.2 – Curva de crescimento da *E.coli* recombinante no meio ponto central.



4.2 SDS-PAGE E WESTERN BLOD DOS ENSAIOS

Através dos geis obtidos por SDS-PAGE pode-se confirmar a presença da enzima nas culturas induzidas, o que não é possível observar na cultura não induzida, na altura entre 40 e 50 kDa, como visto na Figura 4.2.1 indicado pela seta vermelha. Na cultura controle induzida por 16 horas é possível notar uma banda que se destaca do cultivo não induzido, como demonstrado pela seta vermelha. No entanto, devido à sobreposição com outras proteínas, a visualização é prejudicada. Para auxiliar na confirmação da expressão da L-asparaginase na forma clivada realizou-se o *western blot* representado pela Figura 4.2.2. Esse método é mais específico e mostra que, após a indução da expressão, a enzima está presente no cultivo. Também é possível visualizar outros dímeros da enzima expressos, mas esses não têm relevância para o resultado final, porque representam a enzima não clivada, que não possui atividade. Além disso, os geis referentes ao ponto central apresentam semelhanças, demonstrando a reproduutividade do sistema.

Figura 4.2.1 – Gel de SDS-PAGE para as amostras da cinética de crescimento.

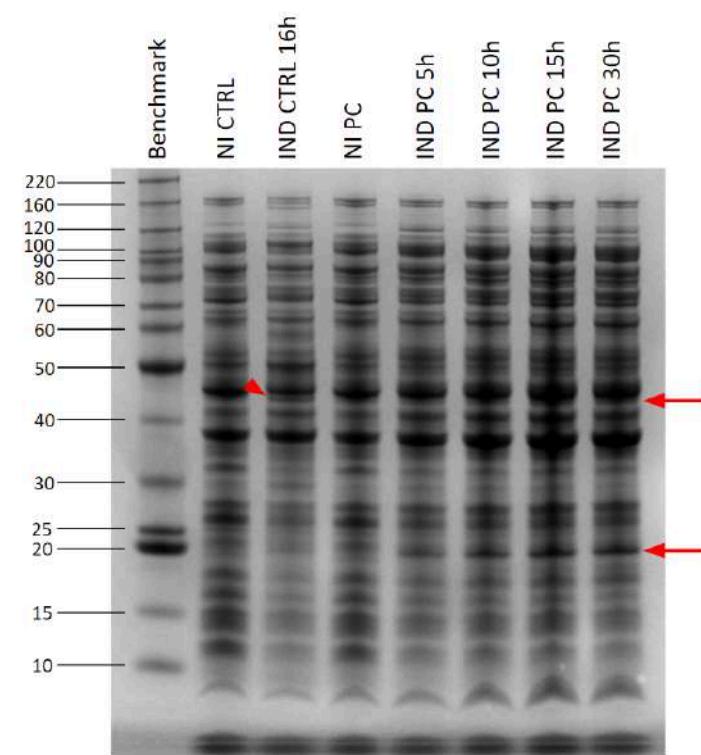
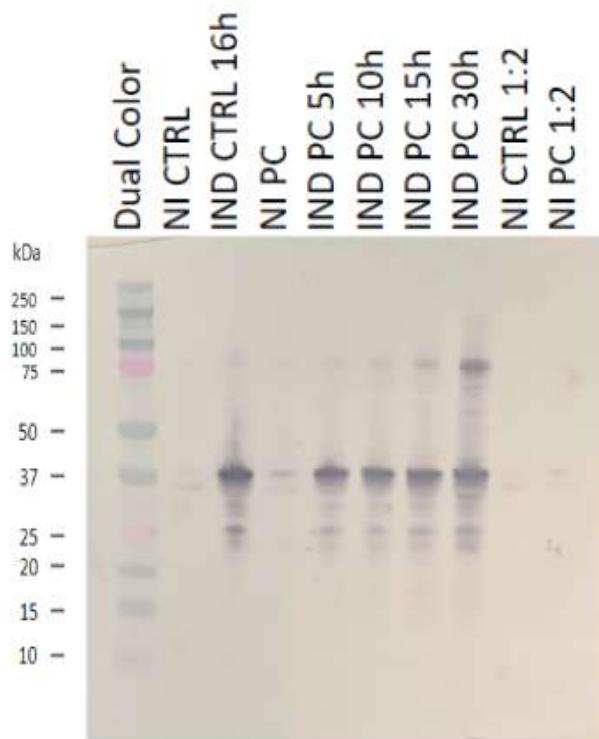
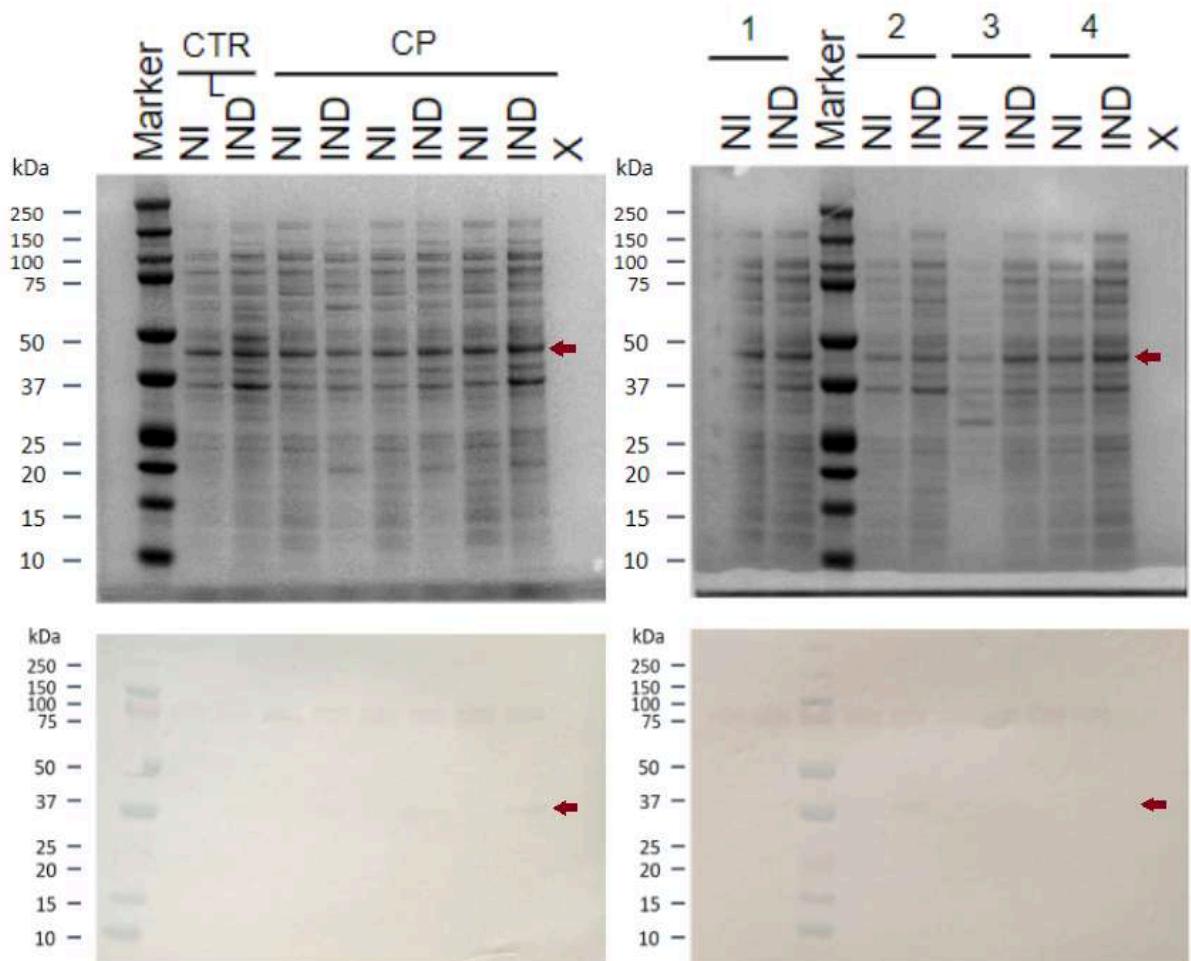


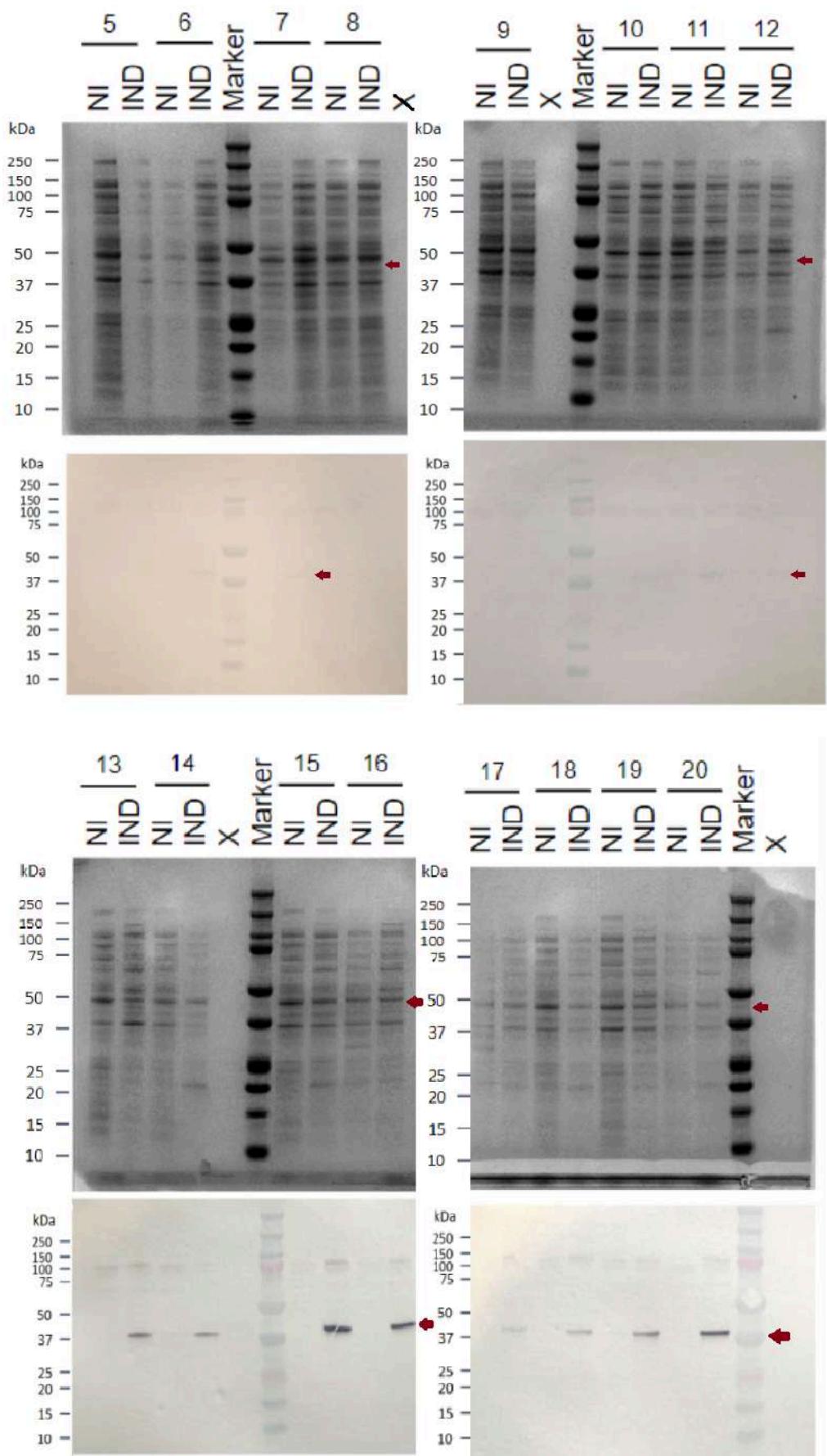
Figura 4.2.2 – Membrana do *western blot* para as amostras da cinética de crescimento.



Os resultados obtidos no *western blot* das diferentes condições de cultivo revelam uma banda clara após a indução na altura entre 37 e 50kDa, demonstrando a presença da enzima. Os resultados obtidos são qualitativos, indicando a presença da enzima, mas não a quantidade. Portanto, são necessários outros experimentos para quantificar a concentração de enzima no extrato solúvel.

Figura 4.2.3 – Resultados do SDS-PAGE e *western blot*. A parte superior representa os geis de eletroforese, a parte inferior as membranas utilizadas no *western blot*.





4.3 CÁLCULOS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

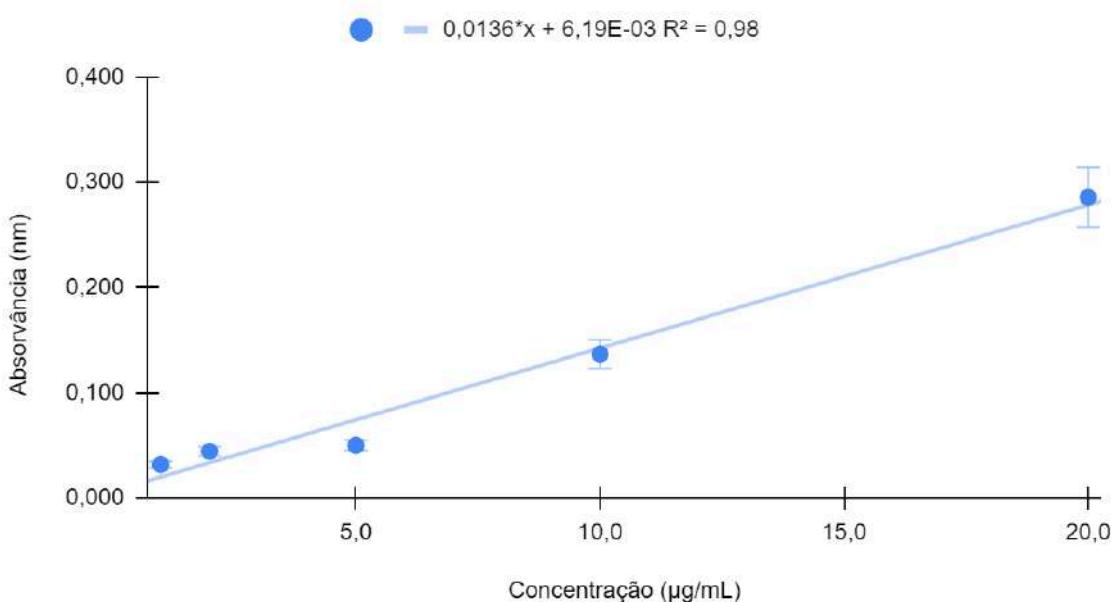
Com os valores obtidos para a absorvância a 450 nm no ensaio de Nessler, plotou-se uma curva padrão da solução de sulfato de amônio (concentração x absorvância), seguindo o princípio da Lei de Lambert-Beer. Essa lei relaciona a absorção da luz por um meio absorvente com a concentração do soluto presente.

Tabela 4.3.1 – Valores da curva padrão de sulfato de amônio para as amostras a 450nm.

Amostras	Média				Branco Descontado
	Branco	0,483	0,482	0,453	0,473
0,5	0,375	0,372	0,490	0,409	-0,064
1,0	0,516	0,515	0,482	0,504	0,032
2,0	0,537	0,511	0,503	0,517	0,044
5,0	0,522	0,530	0,517	0,523	0,050
10,0	0,615	0,607	0,606	0,609	0,137
20,0	0,777	0,752	0,746	0,758	0,286

Figura 4.3.1 – Curva padrão de sulfato de amônio.

Curva Padrão - Sulfato de Amônio



É importante observar que, no ponto correspondente à concentração de 5,0 µL, há um desvio da linearidade. Para obter uma equação que descreva melhor a relação entre absorbância e concentração, optou-se por não considerar esse ponto. O resultado foi uma aproximação mais precisa da reta.

Figura 4.3.2 – Curva padrão de sulfato de amônio corrigida.

Curva Padrão - Sulfato de Amônio

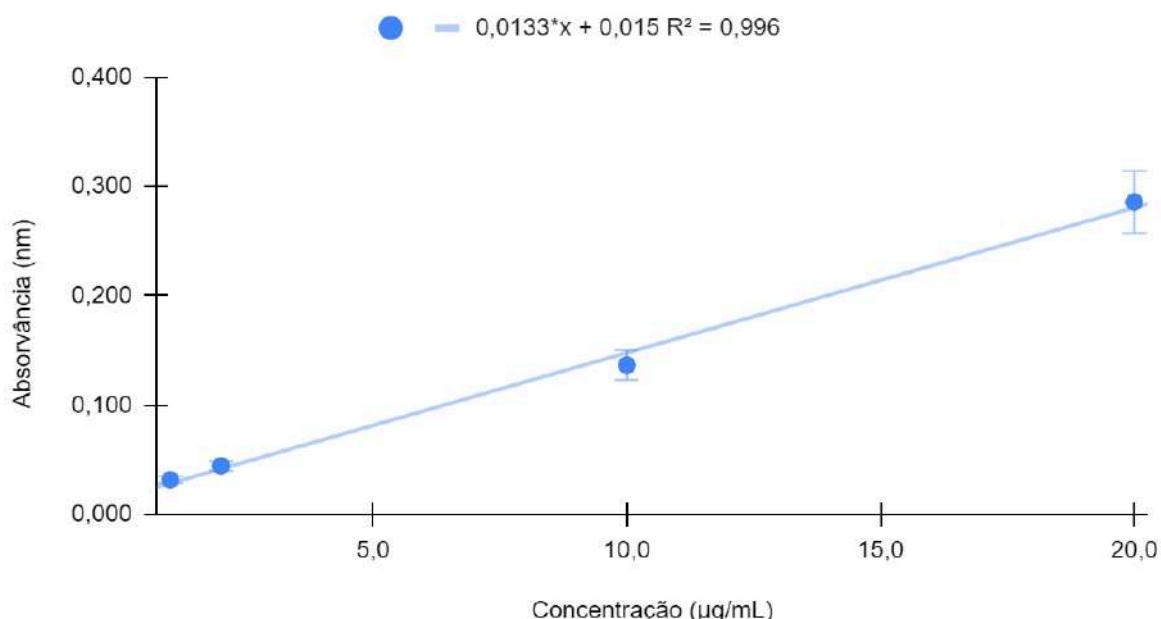


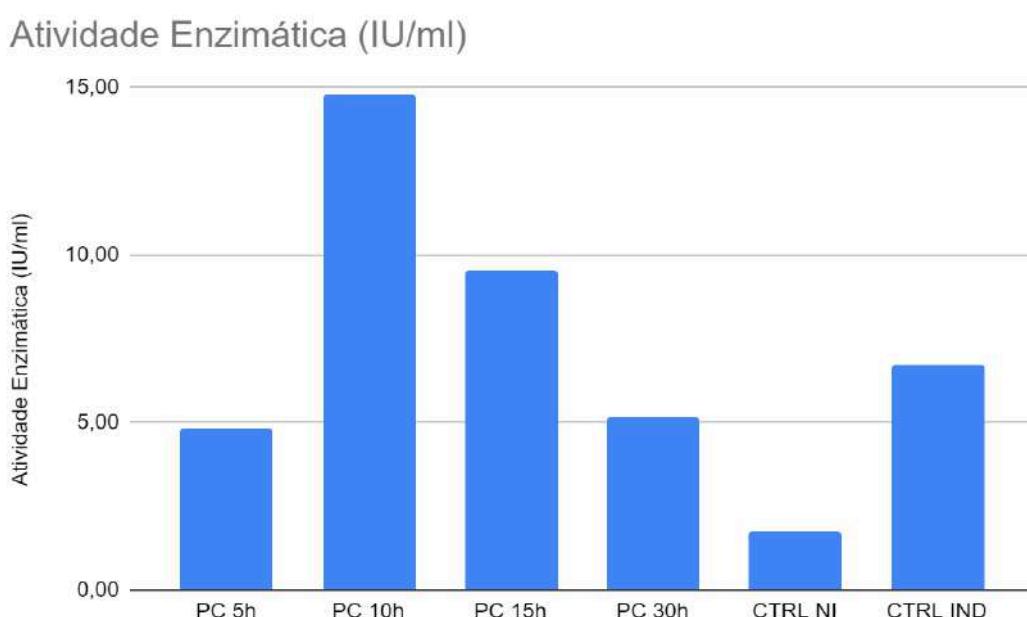
Tabela 4.3.2 – Cálculo da concentração das amostras em µg/mL.

Amostras				Média	Branco Descontado	ug/mL diluído	ug/mL final
Branco	0,465	0,475	0,447	0,462	-		
PC 5h	0,504	0,513	0,518	0,511	0,049	2,57	1284,73
PC 10h	0,587	0,563	0,593	0,581	0,119	7,80	3899,27
PC 15h	0,542	0,537	0,555	0,544	0,082	5,05	2524,61
PC 30h	0,527	0,497	0,518	0,514	0,051	2,73	1362,84
CTRL NI	0,515	0,492	0,463	0,489	0,027	0,91	456,57
CTRL IND	0,520	0,501	0,554	0,525	0,062	3,56	1780,47

Tabela 4.3.3 – Cálculo da atividade enzimática das amostras em IU/mL.

	Concentração de amônio ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração de amônio ($\mu\text{mol/ml}$)	$\mu\text{moles de amônio para 1 ml de enzima diluída}$	Fator de diluição	$\mu\text{moles de amônio por 1 ml de enzima original}$	Tempo de reação	Atividade Enzimática (IU/ml)
PC 5h	2,57	0,04	0,29	500	145,84	30	4,86
PC 10h	7,80	0,12	0,89	500	442,63	30	14,75
PC 15h	5,05	0,08	0,57	500	286,58	30	9,55
PC 30h	2,73	0,04	0,31	500	154,70	30	5,16
CTRL NI	0,91	0,01	0,10	500	51,83	30	1,73
CTRL IND	3,56	0,05	0,40	500	202,11	30	6,74

Figura 4.3.3 – Gráfico para comparação da atividade enzimática.



Os dados obtidos demonstram uma maior atividade enzimática após 10 horas de indução, especialmente no meio PC em comparação com o meio CTRL. Através do perfil de cinética e com esses dados é possível inferir que a maior atividade é referente ao final da primeira etapa exponencial de crescimento. Embora a *E.coli* recombinante continue crescendo, a atividade enzimática diminui, o que pode indicar sua degradação pelo próprio microrganismo.

O PC, que possui uma composição mais rica em nutrientes, apresenta valores intermediários entre os níveis definidos na matriz ortogonal, quando comparado ao meio CTRL, o que pode ser uma sugestão para sua maior atividade. Além disso, a escolha do período de 8 horas de indução também se baseia na curva de crescimento e na observação do

comportamento da *E.coli* recombinante. Um parâmetro adicional que pode ser analisado é a concentração total da enzima L-asparaginase, a qual pode orientar a decisão sobre o tempo de indução que resulta em maior crescimento.

Para uma compreensão mais completa, é necessário realizar outros experimentos para quantificar a atividade enzimática, considerando agora os 20 meios preparados. Esses dados permitirão a análise das variáveis que exercem maior influência na atividade enzimática. No entanto, com os dados obtidos descritos aqui, pode-se estabelecer uma relação entre as variáveis e o crescimento celular.

4.4 GRÁFICO DE PARETO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados obtidos para a D.O. 600 nm dos cultivos após a indução, realizou-se uma análise estatística utilizando o Protimiza Experimental Design®. O resultado foi um gráfico que combina barras com uma curva acumulativa, seguindo o princípio de Pareto. Esse princípio afirma que aproximadamente 80% dos efeitos são causados por 20% das causas. Os resultados indicam influência da temperatura, da D.O. de indução, da concentração de triptona e do inóculo de indução.

A D.O. de indução está relacionada diretamente à atividade replicativa da *E.coli*. Para um maior valor espera-se que a cultura alcance mais rápido a fase exponencial de crescimento. A análise da temperatura ideal envolve as preferências do próprio microrganismo, que para a replicação da *E.coli* é 37°C, direcionando a maquinaria celular para a expressão proteica. Baixas temperaturas influenciam em uma menor atividade do microrganismo, retardando seu crescimento.

A triptona é a principal fonte de carbono, sua menor disponibilidade dificulta o processo replicativo. Além disso, maiores concentrações de IPTG podem afetar negativamente o crescimento celular, porque direcionam o metabolismo celular para a expressão de um determinado gene, ao invés do crescimento celular.

Figura 4.4.1 – Gráfico de pareto para influência das variáveis no crescimento celular.

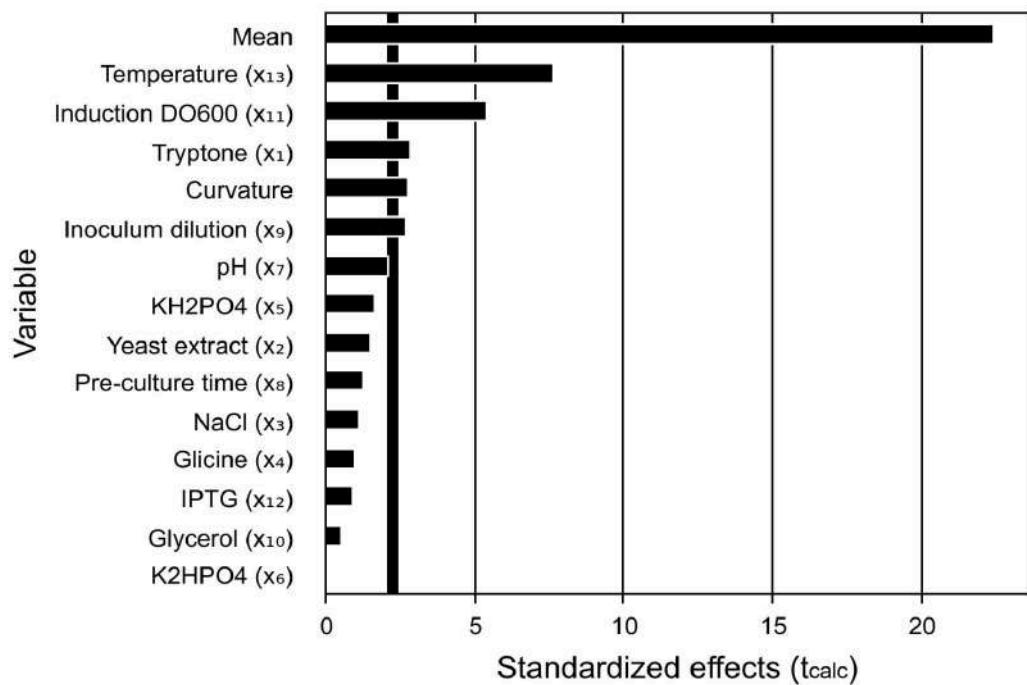


Tabela 4.4.1 – Resultado do DOE.

Condition	Tryptone	Yeast extract	NaCl	Glicine	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	pH	Pre-culture time	Inoculum dilution	Glycerol	Induction OD _{600nm}	IPTG	Temperature	Final OD _{600nm}
	g/L	g/L	g/L	mM	mM	mM	-	horas	%	-	mM	°C	Abs	
1	15	8	2	150	17	0	5,5	8	1:130	4	0,2	1	18	1,247
2	5	2	8	150	0	72	7,5	8	1:130	0	0,2	1	18	0,142
3	15	8	2	0	17	72	5,5	24	1:20	0	0,2	0,1	18	0,793
4	15	8	8	0	0	72	7,5	8	1:20	4	0,2	0,1	18	1,954
5	15	8	8	150	0	0	7,5	24	1:130	4	1,2	0,1	18	1,146
6	5	8	8	150	17	0	5,5	24	1:20	0	1,2	1	18	4,099
7	15	2	8	0	17	72	7,5	24	1:130	0	1,2	1	18	1,919
8	5	2	2	150	0	72	5,5	24	1:20	4	1,2	0,1	18	2,684
9	5	2	2	0	17	0	7,5	8	1:20	4	1,2	1	18	3,577
10	5	2	2	0	0	0	5,5	8	1:130	0	0,2	0,1	18	1,221
11	15	2	8	150	0	0	5,5	8	1:20	0	1,2	0,1	36	4,328
12	5	8	8	0	17	72	5,5	8	1:130	0	1,2	0,1	36	5,721
13	15	2	2	150	17	0	7,5	24	1:130	0	0,2	0,1	36	2,088
14	15	2	8	150	17	72	5,5	8	1:20	4	0,2	1	36	3,764
15	5	8	2	150	17	72	7,5	8	1:130	4	1,2	0,1	36	4,257
16	5	8	2	150	0	72	7,5	24	1:20	0	0,2	1	36	3,555
17	5	2	8	0	17	0	7,5	24	1:20	4	0,2	0,1	36	3,221
18	15	2	2	0	0	72	5,5	24	1:130	4	1,2	1	36	3,721
19	15	8	2	0	0	0	7,5	8	1:20	0	1,2	1	36	3,982
20	5	8	8	0	0	0	5,5	24	1:130	4	0,2	1	36	3,666
CP	10	5	5	75	8,5	36	6,5	16	0	2	0,7	0,55	27	4,15
CP	10	5	5	75	8,5	36	6,5	16	0	2	0,7	0,55	27	3,875
CP	10	5	5	75	8,5	36	6,5	16	0	2	0,7	0,55	27	3,537
CP	10	5	5	75	8,5	36	6,5	16	0	2	0,7	0,55	27	3,277

5 CONCLUSÕES

Ao analisar a cinética de crescimento e a atividade enzimática nos tempos pós-indução de 5, 10, 15 e 30 horas, observa-se que o tempo de 10 horas apresenta a maior atividade enzimática, correspondendo a 14,75 UI/mL. Com base nesse dado e na curva de crescimento, optou-se pelo tempo de 8 horas de indução, próximo ao final da primeira fase exponencial da *E. coli* recombinante. A escolha está relacionada à proximidade de maior atividade enzimática e por representar o final da fase com maior produção celular.

Para uma avaliação mais precisa das condições ideais de expressão da L-asparaginase recombinante, são necessários outros experimentos, incluindo a análise da atividade enzimática nos 20 ensaios realizados no Plackett-Burman. Essas informações serão relacionadas às variáveis analisadas pelo Protimiza, fornecendo os parâmetros que efetivamente influenciam a atividade enzimática.

Em resumo, o gráfico de Pareto gerado pela análise com o Protimiza Experimental Design® revela que, dentre as 13 variáveis estudadas, apenas 4 têm impacto significativo no crescimento celular: temperatura, concentração de triptona, D.O. de indução e inóculo da indução. Com esses dados é possível aplicar um fatorial completo, com o intuito de construir um modelo preditivo para maximizar o crescimento celular e consequentemente a expressão enzimática da L-asparaginase.

6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA BRASIL. **Custo de tratamento de câncer sobe 400% em quatro anos.** Rio de Janeiro, 6 de junho de 2023. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023-06/custo-de-tratamento-de-cancer-sobe-400-em-quatro-anos>>. Acesso em: 13 de jun. de 2024.

AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. **Fiocruz sela parceria com Inca e divulga estudo sobre custos do câncer no SUS.** 13 de junho de 2023. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-sela-parceria-com-inca-e-divulga-estudo-sobre-custos-do-cancer-no-sus>>. Acesso em: 13 de jun. de 2024.

AGUANZA, Ma. Aezel; LAUZON, Roberta; EMNACE, Ivy. **Improving the Extraction Process of Sodium Alginate from Samu (*Sargassum piluliferum*) using the PlackettBurman Design.** Science And Humanities Journal, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 54-65, 1 dez. 2018. Science and Humanities Journal, Visayas State U. <http://dx.doi.org/10.47773/shj.1998.111.4>.

ahn, Yeh-Jin; JUNG, Minjae. **Improved recombinant protein production using heat shock proteins in Escherichia coli.** Biocatalysis And Agricultural Biotechnology, [S.L.], v. 50, p. 102736, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102736>.

ALI, Usman et al. **L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): a novel approach to target all.** European Journal Of Pharmacology, [S.L.], v. 771, p. 199-210, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.023>.

AMBRUS, Rita et al. **Holistic Study Design Following Quality by Design Approach for Fabrication of Hybrid Polymeric Nanoparticulate Based Dry Powders as Carriers for Ciprofloxacin.** Journal Of Pharmaceutical Sciences, [S.L.], v. 113, n. 7, p. 1946-1959, jul. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2024.04.017>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR. **L-Asparaginase tem fabricação suspensa.** ABHH, 18 de janeiro de 2013,

<<https://abhh.org.br/noticia/l-asparaginase-tem-fabricacao-suspensa-2/>>. Acesso em 05 de jun. de 2024.

BAIN, Barbara J. **Leukaemia diagnosis**. Fifth edition, John Wiley & Sons, Inc, 2017.

BARBOSA, Fernando Cesar et al. **Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes**. Biomass And Bioenergy, [S.L.], v. 141, p. 105697, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105697>.

BARROS NETO, Benício De; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Planejamento E Otimização De Experimentos**. Editora da Unicamp, 1996.

BECKER, Lucas et al. **Analyzing and understanding the robustness of bioprocesses**. Trends In Biotechnology, [S.L.], v. 41, n. 8, p. 1013-1026, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.03.002>.

BENNETT, J. M. et al. **Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group**. British Journal Of Haematology, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 451-458, ago. 1976. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>.

BONNET, M. et al. **Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology**. New Microbes And New Infections, [S.L.], v. 34, p. 100622, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>.

BOX, George E. P., et al. **Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery**. 2nd ed, Wiley-Interscience, 2005.

CANTOR, Jason R. et al. **The Human Asparaginase-like Protein 1 hASRGL1 Is an Ntn Hydrolase with β -Aspartyl Peptidase Activity**. Biochemistry, [S.L.], v. 48, n. 46, p. 11026-11031, 30 out. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi901397h>.

CAZARIN, Gisele; AUGUSTO, Lia Giraldo da Silva; MELO, Raul Antônio Morais. **Doenças hematológicas e situações de risco ambiental: a importância do registro para a vigilância epidemiológica.** Revista Brasileira de Epidemiologia, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 380-390, set. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-790x2007000300009>.

DERST, C.; HENSELING, J.; RÖHM, K.H.. **Probing the role of threonine and serine residues of E.coli asparaginase II by site-specific mutagenesis.** Protein Engineering, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 785-789, 1992. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/protein/5.8.785>.

DEVINE, S. M.; LARSON, R. A.. **Acute leukemia in adults: recent developments in diagnosis and treatment.** Ca: A Cancer Journal for Clinicians, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 326-352, 1 nov. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/canjclin.44.6.326>.

DOUER, Dan; GÖKBUGET, Nicola; STOCK, Wendy; BOISSEL, Nicolas. **Optimizing use of L-asparaginase-based treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia.** Blood Reviews, [S.L.], v. 53, p. 100908, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2021.100908>.

EDGAR, Thomas F., et al. **Optimization of chemical processes.** 2nd ed, McGraw-Hill, 2001.

EGLER, Rachel A.; AHUJA, Sanjay P.; MATLOUB, Yousif. **L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia.** Journal Of Pharmacology And Pharmacotherapeutics, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 62-71, jun. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.4103/0976-500x.184769>.

GANESHAN, Seedhabadee et al. **Scaling-up production of plant endophytes in bioreactors: concepts, challenges and perspectives.** Bioresources And Bioprocessing, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 117-133, 15 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-021-00417-y>.

GASSENMEIER, Veronika. et al. **Model-assisted DoE applied to microalgae processes**. Current Research In Biotechnology, [S.L.], v. 4, p. 102-118, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.005>.

GAYNON, Ps et al. **Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983÷1995**. Leukemia, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 2223-2233, 1 dez. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2401939>.

GONZALES, Tatiane Araujo et al. **Optimization of anaerobic fermentation of Actinobacillus succinogenes for increase the succinic acid production**. Biocatalysis And Agricultural Biotechnology, [S.L.], v. 27, p. 101718, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101718>.

GUIMARÃES, Ana Virginia Frota et al. **Molecular dynamics simulations of human L-asparaginase1: insights into structural determinants of enzymatic activity**. Journal Of Molecular Graphics And Modelling, [S.L.], v. 109, p. 108007, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.108007>.

HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018**, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/, based on November 2020 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2021.

INSTITUTO CARLOS CHAGAS. **Estudo da Fiocruz Paraná obtém depósito de patente de nova versão de L-asparaginase humana**. ICC – Instituto Carlos Chagas. 05 de março de 2018 Disponível em: <<http://www.icc.fiocruz.br/estudo-da-fiocruz-parana-obtem-deposito-de-patente-de-nova-versao-de-l-asparaginase-humana>>. Acesso em 05 de jun de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer infantojuvenil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/infantojuvenil>>. Acesso em 06 de jun. de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Leucemia. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>>. Acesso em: 02 de jun. de 2024.

JABBOUR, Elias J. et al. **Adult Acute Lymphoblastic Leukemia**. Mayo Clinic Proceedings, [S.L.], v. 80, n. 11, p. 1517-1527, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.4065/80.11.1517>.

KARAMITROS, Christos S. et al. **Bacterial co-expression of the α and β protomers of human L-asparaginase-3: achieving essential n-terminal exposure of a catalytically critical threonine located in the β -subunit**. Protein Expression And Purification, [S.L.], v. 93, p. 1-10, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.007>.

KASEMIIRE, Alice. et al. **Design of experiments and design space approaches in the pharmaceutical bioprocess optimization**. European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics, [S.L.], v. 166, p. 144-154, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.06.004>.

KEATING, Michael J. et al. **L-Asparaginase and PEG Asparaginase—Past, Present, and Future**. Leukemia & Lymphoma, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 153-157, jan. 1993. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10428199309149129>.

MANDENIUS, Carl-Fredrik; BRUNDIN, Anders. **Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology**. Biotechnology Progress, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 1191-1203, nov. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.67>.

MANUAIS MSD. **Leucemia linfoblástica aguda (LLA) - Hematologia e oncologia**. Maryland, outubro de 2023. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/leucemia-linfoblastica-aguda-lla>>. Acesso em 06 de jun. de 2024.

MICHALSKA, Karolina et al. **Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations**. Acta Biochimica Polonica, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 627-640, 1 dez. 2006. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.18388/abp.2006_3291.

MIN, Byung Eun et al. **Optimization of industrial microorganisms: recent advances in synthetic dynamic regulators.** Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 89-98, 1 jan. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-016-1867-y>.

MOGHRABI, Albert et al. **Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia.** Blood, [S.L.], v. 109, n. 3, p. 896-904, 26 set. 2006. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-06-027714>.

MONTEIRO, Mariana et al. **Towards advanced bioprocess optimization: a multiscale modelling approach.** Computational And Structural Biotechnology Journal, [S.L.], v. 21, p. 3639-3655, 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2023.07.003>.

MU'AZZAM, Khadija. et al. **A roadmap for model-based bioprocess development.** Biotechnology Advances, [S.L.], v. 73, p. 108378, jul. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108378>.

MÜLLER, H et al. **Use of L-asparaginase in childhood ALL.** Critical Reviews In Oncology/Hematology, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 97-113, ago. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1040-8428\(98\)00015-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1040-8428(98)00015-8).

NOMME, Julian et al. **Elucidation of the Specific Function of the Conserved Threonine Triad Responsible for Human L-Asparaginase Autocleavage and Substrate Hydrolysis.** Journal Of Molecular Biology, [S.L.], v. 426, n. 13, p. 2471-2485, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.016>.

NOMME, Julian et al. **Structures of Apo and Product-Bound Human L-Asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis.** Biochemistry, [S.L.], v. 51, n. 34, p. 6816-6826, 14 ago. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi300870g>.

O'NEILL, Edward N. et al. **Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production.** Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 686-709, 5 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12678>.

ÖZCAN, Saniye et al. **Quality by design approach with design of experiment for sample preparation techniques.** Advances In Sample Preparation, [S.L.], v. 7, p. 100079, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sampre.2023.100079>.

PANETTA, J C et al. **Comparison of Native E. coli and PEG Asparaginase Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia.** Clinical Pharmacology & Therapeutics, [S.L.], v. 86, n. 6, p. 651-658, 9 set. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2009.162>.

PIETERS, Rob et al. **Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia.** Pediatric Clinics Of North America, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 1-20, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2007.11.002>.

PIETERS, Rob et al. **L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia.** Cancer, [S.L.], v. 117, n. 2, p. 238-249, 7 set. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25489>.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P.. **The design of optimum multifactorial experiments.** Biometrika, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>.

POLITIS, Stavros N. et al. **Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development.** Drug Development And Industrial Pharmacy, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 889-901, 23 fev. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>.

PROTIMIZA. **Experimental Design.** Disponível em:
<http://experimental-design.protimiza.com.br/>. Acesso em 07 de jun. de 2024.

PUI, Ching-Hon; EVANS, William E.. **Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia**. New England Journal Of Medicine, [S.L.], v. 354, n. 2, p. 166-178, 12 jan. 2006. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra052603>.

RIZZARI, Carmelo et al. **Asparagine levels in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia treated with pegylated-asparaginase in the induction phase of the AIEOP-BFM ALL 2009 study**. Haematologica, [S.L.], v. 104, n. 9, p. 1812-1821, 31 jan. 2019. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2018.206433>.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antônio Francisco. **Experimental design and process optimization**. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015.

SANTOS ROCHA, J. et al. **Repercussões e posicionamentos frente ao desabastecimento da L-Asparaginase no período de 2017 e 2018**. JORNAL DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA E FARMACOECONOMIA, [S. l.], v. 4, n. s.1, 2023. DOI: 10.22563/2525-7323.2019.v4.s1.p.109. Disponível em: <https://ojs.jaff.org.br/ojs/index.php/jaff/article/view/546>. Acesso em: 5 jun. 2024.

SANTOS, M. de O. et al.. **Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025**. Revista Brasileira de Cancerologia, [S. l.], v. 69, n. 1, p. e-213700, 2023. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700. Disponível em: <<https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>>. Acesso em: 3 jun. 2024.

SEIBEL, Nita L.. **Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents: peaks and pitfalls**. Hematology, [S.L.], v. 2008, n. 1, p. 374-380, 1 jan. 2008. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.374>.

SENDÍN, José-Oscar H. et al. **Improved Optimization Methods for the Multiobjective Design of Bioprocesses**. Industrial & Engineering Chemistry Research, [S.L.], v. 45, n. 25, p. 8594-8603, 2 set. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ie0605433>.

SILVERMAN, L. B. et al. **Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of dana-farber consortium protocol 91-01.** Blood, [S.L.], v. 97, n. 5, p. 1211-1218, 1 mar. 2001. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v97.5.1211>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. **Medicamento chinês sem eficácia comprovada pode comprometer tratamento de câncer infantil.** SBOC, 17 de junho de 2017 Disponível em: <<https://sboc.org.br/noticias/item/980-medicamento-chines-sem-eficacia-comprovada-pode-comprometer-tratamento-de-cancer-infantil>>. Acesso em 05 de jun. de 2024.

STRAATHOF, A. J. J. **The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes.** Comprehensive Biotechnology, [S.L.], p. 811-814, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00492-x>.

SU, Ying et al. **Free Glycine Accelerates the Autoproteolytic Activation of Human Asparaginase.** Chemistry & Biology, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 533-540, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.03.006>.

TRICA, Diego José. **Introdução à Modelagem e Dinâmica para Controle de Processos.** 2o ed, Trica, 2024.

TROCINE, L. et al. **Finding important independent variables through screening designs: a comparison of methods.** 2000 Winter Simulation Conference Proceedings (Cat. No.00Ch37165), [S.L.], p. 749-754, ago. 2002. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/wsc.2000.899789>.

UENO, T et al. **Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase.** Leukemia, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1858-1861, 1 nov. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2400834>.

VANAJA, K.; RANI, R.H. Shobha. **Design of Experiments: concept and applications of plackett burman design.** Clinical Research And Regulatory Affairs, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 1-23, jan. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10601330701220520>.

VOLESKY, Bohumil; VOTRUBA, Jaroslav. **Modeling and optimization of fermentation processes**. Elsevier, 1992.

WAHLSTER, Philip. et al. **Barriers to access and use of high cost medicines: a review**. Health Policy And Technology, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 191-214, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hlpt.2015.04.009>.

WANG, Yiming et al. **Microbial production, molecular modification, and practical application of L-Asparaginase: a review**. International Journal Of Biological Macromolecules, [S.L.], v. 186, p. 975-983, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.107>.

WANG, Yong et al. **Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology**. Biotechnology Advances, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 989-995, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.022>.

WANG, Yong-Hua et al. **Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by Streptomyces claviger**. Process Biochemistry, [S.L.], v. 40, n. 3-4, p. 1161-1166, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.010>.

YOUSSEF, Magdy M. et al. **Cloning, Purification, Characterization and Immobilization of L-asparaginase II from E. coli W3110**. Asian Journal Of Biochemistry, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 337-350, 15 out. 2008. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/ajb.2008.337.350>.

ZENATTI, Priscila Pini et al. **Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of E. coli L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins**. Ebomedicine, [S.L.], v. 30, p. 158-166, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.005>.