

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica**  
**Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica**

**Estudo da estabilidade e peguilação de L-asparaginase em soluções  
aquosas de líquidos iônicos de imidazólio**

**Eloísa Guedes Cavichon**

Dissertação para obtenção do título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica**  
**Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica**

**Estudo da estabilidade e peguilação de L-asparaginase em soluções  
aquosas de líquidos iônicos de imidazólio**

**Eloísa Guedes Cavichon**

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C79e	<p>Cavichon, Eloísa Guedes Estudo da estabilidade e peguilação de L-asparaginase em soluções aquosas de líquidos iônicos de imidazólio / Eloísa Guedes Cavichon. - São Paulo, 2019. 84 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira</p> <p>1. L-asparaginase. 2. Líquidos iônicos de imidazólio. 3. Estabilidade. 4. Peguilação. 5. Atividade enzimática. I. T. II. Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira, orientador.</p>
------	--

Eloísa Guedes Cavichon

**Estudo da estabilidade e peguilação de L-asparaginase em soluções  
aquosas de líquidos iônicos de imidazólio**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

---

Profª Drª Carlota Rangel Yagui (orientadora/presidente)

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_ .

*“Estamos irrevogavelmente em um caminho que nos levará às estrelas. A não ser que, por uma monstruosa capitulação ao egoísmo e à estupidez, acabemos nos destruindo.”*

Carl Sagan

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Leucemina Linfoblástica Aguda.....	14
2.2. L-asparaginase.....	15
2.3. Mecanismo de ação da L-asparaginase.....	16
2.4. PEGuilação.....	19
2.5 Líquidos iônicos.....	27
3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Material.....	30
4.2. Métodos.....	32
4.2.1. Estudo da atividade de ASNase em soluções aquosas de líquidos iônicos.....	32
4.2.2. Efeito do pH de soluções aquosas de ASNase em Lis.....	32
4.2.3. Influência das soluções aquosas de líquidos iônicos na estabilidade estrutural da ASNase por dicroísmo circular.....	33
4.2.4. Influência das soluções aquosas de líquidos iônicos na estabilidade estrutural da ASNase por fluorescência.....	33
4.2.5. Estudos de cinética de ASNase em soluções aquosas de Lis.....	33
4.2.7. Ensaio de atividade de ASNase após a remoção das soluções aquosas de Lis....	34
4.2.7. Determinação da concentração de proteína.....	35
4.2.8. Estudos da atividade de ASNase em soluções aquosas de líquidos iônicos ao longo do tempo.....	35
4.2.9. PEGuilação de ASNase em soluções aquosas de Lis.....	36
4.2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Estabilidade enzimática de ASNase em soluções aquosas de Lis.....	38
5.1.1. Interferência da cadeia alquílica do líquido iônico na atividade de ASNase.....	38
5.1.2. Interferência da alteração do ânion na atividade de ASNase.....	42
5.2. Influência do controle do pH de soluções aquosas de Lis na atividade enzimática de ASNase.....	45

5.3. Relação dos parâmetros solvatocrômicos e atividade relativa dos Lis de diferentes ânions.....	47
5.4. Influência de soluções aquosas de Lis na estabilidade estrutural da ASNase.....	50
5.4.1. Ensaio de Dicroísmo Circular (CD).....	50
5.4.2. Ensaio de fluorimetria .....	53
5.6. Estudo da influência de soluções aquosas de Lis na cinética enzimática de ASNase.....	56
5.7. Influência da remoção das soluções aquosas de Lis da atividade e estabilidade de ASNase.....	58
5.8. Estabilidade de ASNase em soluções aquosas de Lis ao longo do tempo.....	60
5.9 PEGuilação N-terminal de ASNase em Lis.....	61
6.CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	69
Referências.....	71
Anexo.....	76
Relação volume e molaridade dos Lis nas soluções estudadas:.....	76
Relação da massa e da molaridade de ASNase (145kDa).....	76
Tabela dos pHs dos Lis.....	76
Fluorescência dos Lis em diferentes concentrações.....	77
Mecanismo de PEGuilação.....	78
Hidrólise do PEG.....	78
Rendimento das reações de PEGuilação I.....	79
Rendimento das reações de PEGuilação II.....	80
Rendimento das reações de PEGuilação III .....	81
Rendimento das reações de PEGuilação IV.....	83
Ficha do Aluno.....	85
Créditos cumpridos.....	86

### Lista de abreviaturas

ASNase	Asparaginase
Å	Angstrom
AEP	Asparaginil endopeptidase
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
C	Grau cécius
CD	Dicroísmo circular
CTSB	Catepsina b
Cu <sup>2+</sup>	Cobre oxidado
Cu <sup>+</sup>	Cobre reduzido
DMF	N,n-dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
FDA	Administração de alimentos e medicamentos
GDH	Glutamato desidrogenase
h	Horas
k <sub>cat</sub>	Número de renovação
kDa	Quilo dalton
k <sub>M</sub>	Constante de michaelis-menten
L-Asn ou Asn	Asparagina
LIs	Líquidos iônicos
LLA	Leucemia linfoide aguda

M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mPEG-NHS	Metoxi-polietilenoglicol carboximetil n-hidroxisuccinimidil éster
NaCl	Cloreto de sódio
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietilenoglicol
PEG-ASNase	Asparaginase peguilada
pH	Potencial de hidrogênio
pKa	Constante de dissociação do ácido
p/v	Peso por volume
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
THF	Tetrahidrofurano
TRIS-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico

UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta-visível
V	Volts
V <sub>max</sub>	Velocidade máxima
xg	Veze gravidade
$\alpha$	Acidez da ligação de hidrogênio
$\beta$	Basicidade da ligação de hidrogênio
$\beta$ -NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ mol	Micromol
$\pi^*$	Dipolarabilidade e polarizabilidade

## RESUMO

Cavichon, E. G. **Estudo da estabilidade e peguilação de L-asparaginase em soluções aquosas de líquidos iônicos de imidazólio.**

2019, 84p, Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

A enzima L-asparaginase de *Escherichia coli* (ASNase) é um biofármaco indicado para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda, mas que pode causar reações de hipersensibilidade nos pacientes tratados. Na tentativa de amenizar esse efeito, foi desenvolvida a PEG-ASNase (enzima conjugada com polietilenoglicol) que apresenta a vantagem de ser menos imunogênica e ter maior meia-vida biológica. Mais recentemente, novas abordagens têm sido desenvolvidas visando aprimorar os processos de PEGuilação por meio de reações sítio dirigidas, por exemplo N-terminal, a fim de promover maior similaridade lote a lote e controle das características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do biofármaco. Porém, existe ainda uma limitação associada à hidrólise do PEG reativo, desta forma surge a necessidade de procurar solventes alternativos para a PEGuilação que permitam manter a estabilidade das proteínas, aumentar o rendimento de PEGuilação e a estabilidade do PEG reativo. Nesse trabalho, líquidos iônicos foram investigados como solventes alternativos para a peguilação N-terminal de PEG-ASNase. Para tal, a estabilidade de ASNase em Lis foi investigada em Lis da família metil-imidazol, analisando a influência do aumento da cadeia alquílica e de diferentes ânions. A estabilidade da ASNase é favorecida quando em contato com Lis relativamente hidrofóbicos ( $[C_2mim]Cl$ ,  $[C_4mim]Cl$  e  $[C_6mim]Cl$ ), mas sua atividade é prejudicada quando o LI é muito polar, como o  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$  ou anfifílico como o  $[C_{12}mim]Cl$ . Apesar de seu efeito desnaturante, o  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$  resultou no maior rendimento da reação de PEGuilação da ASNase (56%) quando empregado a 75% e a reação realizada em 10 min. O  $[C_4mim]Cl$  resultou em rendimento semelhante ao tampão fosfato (~ 49%), mas ambos os Lis reduziram a poliPEGuilação. Portanto, os Lis  $[C_4mim]Cl$  e  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$  fornecem uma alternativa viável à reação de PEGuilação pela redução na formação de espécies poliPEGuiladas, o que facilitaria os processos de purificação e permitiria maior controle lote a lote da reação, bem como pelo aumento do rendimento da reação no caso do  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$ .

**Palavras-chave:** L-asparaginase. 2. Líquidos iônicos de imidazólio. 3. Estabilidade. 4. Peguilação. 5. Atividade enzimática

## ABSTRACT

Cavichon, E. G. **Study of the stability and pegylation of L-asparaginase in aqueous imidazole ionic liquid solutions.**

2019, 84p, Dissertation (Master) - Postgraduate Program in Biochemical-Pharmaceutical Technology. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Sao Paulo.

Escherichia coli L-asparaginase enzyme (ASNase) is a biopharmaceutical indicated for the treatment of acute lymphoblastic leukemia, but may cause hypersensitivity in the patients used. In an attempt to alleviate this effect, PEG-ASNase (polyethylene glycol conjugated enzyme) was developed, which has the advantage of being less immunogenic and having a longer biological half-life. More recently, new approaches have been applied to improve PEGylation processes through targeted sites, for example N-terminal, in order to promote greater similarity to the batch and control of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of the biopharmaceutical. However, there is still a limitation associated with reactive PEG hydrolysis, thus increasing the need to look for alternative PEGylation solvents to maintain protein stability, increase PEGylation yield and use reactive PEG. In this work, ions were investigated as alternative solvents for the N-terminal PEG-ASNase. For example, a stability of ASNase in ILs was investigated in imidazole ILs by analyzing the influence of increased alkyl chain and different anions. ASNase stability is enhanced when in contact with relatively hydrophobic ILs ([C<sub>2</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim]Cl and [C<sub>6</sub>mim]Cl), but its activity is impaired when very polar ILs such as [C<sub>4</sub>mim][[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] or amphiphilic as [C<sub>12</sub>mim]Cl. Despite its denaturing effect, [C<sub>4</sub>mim][[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] resulted in higher yield of ASNase PEGylation reaction (56%) when employed at 75% and reaction performed in 10 min. [C<sub>4</sub>mim]Cl yielded similar phosphate buffer yield (~ 49%), but both ILs reduced polyPEGylation. Therefore, [C<sub>4</sub>mim]Cl and [C<sub>4</sub>mim][[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] ILs may use a viable alternative to the PEGylation reaction and reduce the formation of polyPEGylated species, or that facilitate purification processes and allow for greater batch use of the solution, as well as increased reaction yield in the case of [C<sub>4</sub>mim][[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>].

**Key-words:** 1.L-asparaginase. 2. Imidazole ionic liquids. 3. Stability. 4. Pegilation. 5. Enzymatic Activity

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leucemia linfoblástica aguda atinge crianças de diversas idades, desde zero a 14 anos (Elman & Silva, 2007) sendo mais recorrente em crianças de dois a cinco anos (INCA, 2018). O tratamento para esta doença consiste na eliminação das células cancerosas e reestabelecimento da hematopoese normal proporcionando um bom estado de saúde ao paciente (Atienza, 2016). Para isso, diversos medicamentos são utilizados na quimioterapia, destacando-se a L-asparaginase (LAKS, et al, 2003).

A L-asparaginase (ASNase) elimina as células cancerosas por apoptose, ao tornar escasso o aminoácido asparagina, essencial para a síntese proteica das células tumorais (Roth, 2011). No entanto, como esta enzima é produzida por bactérias, pode causar reações imunogênicas nos pacientes além de resistência ao tratamento (Keating, Holmes & Lerner , 1993)

A PEGuilação é uma forma de contornar este problema, pois forma uma camada protetora na molécula, impedindo estericamente que ocorra a exposição de epítomos imunogênicos (Harris & Chess, 2003). O medicamento ONCASPAR® refere-se a uma L-asparaginase PEGuilada e já possui esse benefício, porém sua PEGuilação ocorre de forma aleatória, o que é uma desvantagem, pois não garante a homogeneidade lote a lote da preparação (Meneguetti et al, 2019).

A fim de contornar este problema, protocolos de PEGuilação *N*-terminal de ASNase tem sido desenvolvidos com o intuito de melhorar a homogeneidade na produção deste fármaco (Meneguetti et al, 2019). Ainda assim, para tal feito, é utilizado grande quantidade de PEG reativo que, devido a hidrólise, gera produtos não reativos, que acarretam em maiores gastos pela utilização do excesso deste reagente, aumentando os custos da reação (Turecek, et al. 2016). Uma alternativa a este impasse é a utilização de líquidos iônicos (LIs) como solventes para PEGuilação, os quais presentes no meio reacional podem diminuir a hidrólise do PEG, aumentando o rendimento da reação e diminuindo custos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda**

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia maligna heterogênea originária de sucessivas falhas genéticas, sendo a maioria desconhecida, em células sanguíneas precursoras da linhagem linfóide, isto é, em células que ainda não possuem diferenciação (denominada blastos). Ao se proliferarem, essas células acumulam-se na medula e suprimem a hematopoese normal, com um aumento de linfoblastos que, gradativamente, substituem as células normais do sangue causando dores ósseas (principalmente ossos longos e articulação), danos à medula óssea, desordens hemorrágicas, fraqueza decorrente de anemia e infecções (CAZÉ BUENO & SANTOS, 2010; MELO, 2011; NEHMY, Et Al., 2011).

A LLA pode incidir em crianças de até 14 anos (Elman & Silva, 2007), porém a faixa etária mais comumente afetada é de crianças de dois a cinco anos, além de ser o tipo de câncer mais comum a atingi-las (INCA, 2018) correspondendo a 25% dos cânceres e 75-80% das leucemias em crianças (Atienza, 2016). Esta doença acomete mais crianças brancas que negras (1,8:1) e mais meninos que meninas (1,2:1), sendo sua frequência de 1/25.000 indivíduos/ano e as chances de adquiri-la nos dez primeiros anos de vida são de 1/2.8804. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, no ano de 2018 foram estimados 5.940 casos de doenças leucêmicas em homens e 4.860 casos em mulheres, totalizando 10.800 casos. No mundo, em 2012, foram identificados 352 mil casos de leucemias, com 265 mil casos de óbito para o mesmo ano, com o pior prognóstico para aqueles de menor nível socioeconômico.

Apesar de vários protocolos existentes para esta terapia, a maioria segue o mesmo esquema de cinco fases: indução de remissão, intensificação-consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central e continuação ou manutenção de remissão (ELMAN & SILVA, 2007). Esse tratamento da LLA pode durar de dois a três anos e é realizado

através de quimioterapia intramuscular envolvendo o uso de diversos fármacos ( LAKS, et al, 2003) . Dentre estes, para a etapa de indução, os principais são: antraciclina, vincristina, derivado de corticoide e L-asparaginase, enquanto que para a etapa de manutenção, é utilizado 6-mercaptopurina ou metotrexato oral entre outros (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). O tratamento tem como objetivo a eliminação das células leucêmicas e restauração da hematopoese normal, proporcionando, assim, um bom estado de saúde ao paciente (Atienza, 2016).

## 2.2. L-asparaginase

A L-asparaginase (ASNase, Figura 1), que também é utilizada no tratamento de outras doenças tais como doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, linfossarcoma e o mielossarcoma (Wietchorek, et al., 2013), é um dos principais medicamentos utilizados para a terapia de LLA em diversos protocolos mundiais (Cazé, Bueno & Santos).

Desde a primeira década do século XX a ASNase é conhecida pelos pesquisadores Lang (1904), Furth e Friedmann (1910) e posteriormente por Clementi (1922), mas estes apenas haviam constatado a capacidade da enzima em catalisar a hidrólise de L-asparagina (Asn) a L-ácido aspártico e amônia<sup>9</sup>. Já a atividade antitumoral foi observada por Kidd (Cachumba,et al., 2016), na década de 1950, em soro de porquinhos da Índia. Além da aplicação farmacêutica, a ASNase também possui importância na indústria alimentícia, evitando a formação de acrilamida, substância potencialmente cancerígena, resultante da exposição de alimentos a processos em altas temperaturas (Cachumba,et al., 2016).

A ASNase é encontrada em organismos desde mamíferos e plantas a leveduras e bactérias, porém, para uso como fármaco, esta enzima é produzida principalmente de *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi*, anteriormente denominada *Erwinia chrysanthemi* (Cachumba,et al., 2016). A ASNase é classificada em três famílias distintas: tipo planta, *Rhizobium etili* e bacteriano. Ainda, a ASNase do tipo bacteriano é classificada em outros dois subtipos: tipo I, que é uma enzima citosólica e de baixa afinidade pela L-asparagina, não sendo terapêuticamente aplicável; e a de tipo II, que é um

tipo de enzima restrita ao espaço periplasmático, com expressão induzida quando em anaerobiose, além de possuir alta afinidade por células antitumorais (Schwartz, Reeves & Broome, 1966). A do tipo II possui massa molecular de 141 kDa e constante de Michaelis (kM) cerca de 12,5  $\mu$ M, possuindo alta afinidade pelo substrato e seu pH ótimo e temperatura ótimos são de 7-8 e 37°C. Já a ASNase extraída de *Dickeya chrysanthemi*, denominada crisantaspase, possui massa molecular entre 140 a 150 kDa, kM de 18  $\mu$ M, meia-vida de 0,13 dia e temperatura e pH ótimos de 50°C e 8 respectivamente (Cachumba, et al., 2016). Portanto, devido às diferenças físico-químicas e farmacocinéticas entre as duas enzimas, elas não são podem ser substituídas nos tratamentos (Rizzarl, et al., 2013).

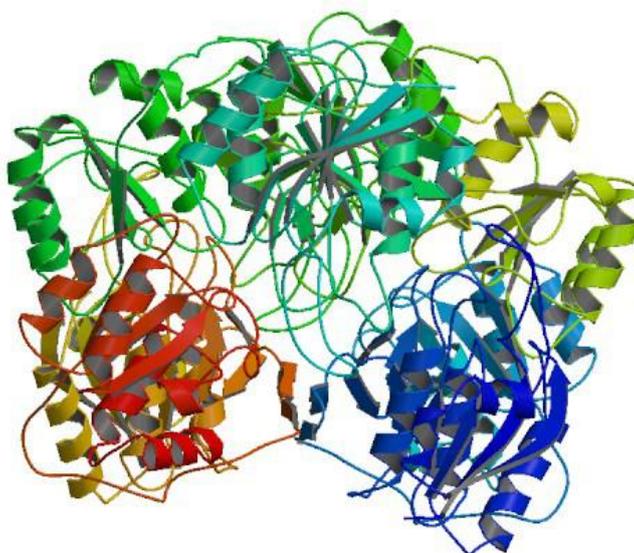


Figura 1. Representação esquemática do cristal de L-Asparaginase de *E. coli*, resolução de 1,82 Å (Extraído de Protein Data Bank, código PDB 3ECA).

### **2.3. Mecanismo de ação da L-asparaginase**

A grande maioria das células humanas expressa a enzima asparagina sintetase, conseguindo, portanto, produzir por si próprias a L-Asn, um aminoácido não essencial. No entanto, as células tumorais de LLA, linfoblastos leucêmicos, expressam uma pequena ou quase nenhuma

quantidade dessa enzima e, conseqüentemente, não conseguem sintetizar a L-Asn, fundamental para sua sobrevivência na velocidade requerida (Figura 2), já que possuem crescimento muito acelerado, exigindo esse aminoácido em grande quantidade. Portanto para estas células, a L-Asn pode ser considerada essencial. Sendo assim, o mecanismo de ação da ASNase consiste na hidrólise de asparagina do plasma sanguíneo acarretando em morte das células tumorais por ausência de um fator essencial para a síntese proteica. No entanto, as células saudáveis não são significativamente afetadas, pois ainda conseguem produzir o aminoácido através da asparagina sintetase presente no interior das células em quantidades suficientes (Cachumba, et al, Roth, 2011).

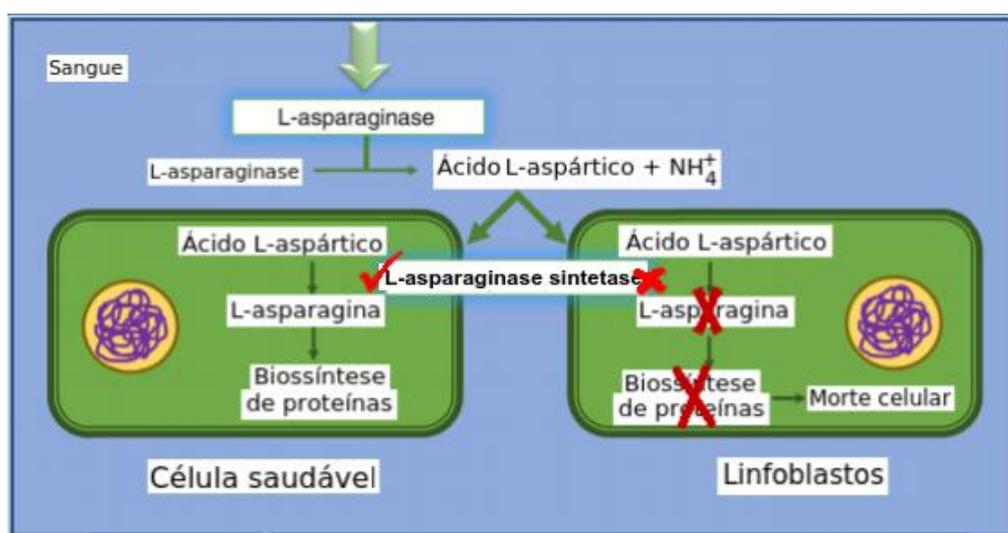


Figura 2. Mecanismo de ação da L-asparaginase. Baseado em Van den Berg (2011).

A hidrólise da L-Asn ocorre em duas etapas com o auxílio do intermediário acil-enzima (Figura 3). Na primeira etapa da reação, uma base forte ativa a região nucleofílica da enzima, atacando a L-Asn (substrato) no carbono do grupo amida, resultando no produto intermediário acil-enzima. Já no segundo passo, há um ataque realizado por um nucleófilo ativado por uma

molécula de água ao carbono éster do intermediário, resultando no ácido aspártico (Cachumba, et al, 2016).



Figura 3. Mecanismo geral da reação catalisada pela L-asparaginase. A seta mostra o ataque nucleofílico (nuc). Baseado em HILL (1967).

A ASNase apresenta significativa especificidade a L-Asn, tornando-se um agente eficaz contra LLA infantil. No entanto, uma das limitações do tratamento refere-se à hidrólise pelas proteases asparaginil endopeptidase (AEP) e catepsina B (CTSB), que inativam a enzima expondo epítomos, intensificando a resposta imunológica, incluindo reações de hipersensibilidade (Patel, et al, 2015). Essas reações se devem à formação de anticorpos e têm sido observadas em 60% dos pacientes que fazem uso da enzima derivada de *E. coli*. Uma alternativa a este tratamento é o uso da enzima de *D. chrysanthemi*, a crisantaspase, que é imunogenicamente distinta da ASNase de *E. coli*, além de também ser mesmo imunogênica, causando menos efeitos adversos (Rizzari, et al, 2013, Fu & Sakamoto, 2007).

As reações de hipersensibilidade resultantes do tratamento de LLA podem ser locais, na região da injeção, causando urticárias e erupções cutâneas, como também podem ocorrer complicações mais severas como broncoespasmos, hipotensão e anafilaxia (Roth, 2011, Keating, Holmes & Lerner, 1993). Essas reações de sensibilidade podem ser causadas pelos anticorpos IgG e IgE, fazendo com que alguns pacientes adquiram resistência ao tratamento sem apresentar sintomas, processo denominado inativação silenciosa. Os anticorpos adquiridos contra a ASNase podem resultar numa

depuração plasmática mais rápida da enzima. Adicionalmente, a inibição da síntese proteica tem principal manifestação no fígado, no sistema de coagulação e no pâncreas, causando hiperglicemia, hipoalbuminemia e diminuição em alguns fatores de coagulação (Keating, Holmes & Lerner, 1993).

Portanto, a fim de reduzir a reação adversa causada pela quimioterapia, desenvolveu-se a PEG-ASNase (enzima conjugada com polietilenoglicol) que apresenta a vantagem de ser menos imunogênica, além de ter um período de meia-vida biológica maior que ASNase nativa (Fu & Sakamoto, 2007).

#### **2.4. PEGuilação**

A PEGuilação surgiu na década de 1970 com Abuchowski, primeiro a relatar esta reação (Armstrong, et al. 2007) e com Frank Davis, que descreveu as vantagens desta modificação no campo farmacêutico (Harris, & Chess, 2003)<sup>18</sup>. A reação de PEGuilação consiste na conjugação de cadeias de polietilenoglicol (PEG) à superfície de uma molécula (Fig. 4), podendo esta ser um peptídeo, proteínas (incluindo anticorpos), fragmentos de anticorpos e fármacos químicos, assim como nanoestruturas, como lipossomos (Kang, Deluca & Lee, 2009, Harris, Martin & Mod, 2001). É um método de crescente interesse empregado para melhorar as características farmacológicas de um fármaco, como aumento da meia-vida, diminuição da imunogenicidade e melhora da solubilidade da molécula (Armstrong, et al, 2017). A tabela 5 apresenta os medicamentos PEGuilados aprovados nos Estados Unidos e Europa.

Com o aumento do tamanho da molécula, pode ocorrer também aumento de sua meia-vida por diminuição na filtração renal. Como a ligação ao PEG mascara a superfície da proteína, há diminuição dos processos de reconhecimento antigênico pelos anticorpos e da degradação por enzimas proteolíticas, corroborando ainda mais com o aumento da meia-vida (Veronese, 2001). Além disso, o PEG é uma molécula altamente solúvel. Duas ou três moléculas de água ligam-se a cada unidade de óxido etileno,

influenciando fortemente a solubilidade do complexo estrutural (Turecek, et al, 2016).

Os primeiros medicamentos PEGuilados disponíveis no mercado (Adagen®, Oncaspar® e PEG-Intron®) foram desenvolvidos utilizando a PEGuilação de primeira geração, técnica caracterizada por utilizar PEGs de baixa massa molecular (inferior a 12kDa), que se ligam aleatoriamente a sítios de ligação nas proteínas por ligações fracas do tipo éster, que são suscetíveis a hidrólise, podendo causar perda da fixação do PEG a proteína (Roberts, Bentley, & Harris, 2012, Kozlowski & Harris, 2001). Este procedimento pode resultar em vários problemas, como a formação de muitos isômeros (polidispersão), causando alterações e até perda da atividade específica. Além disso, isômeros podem ter atividades fármaco, tóxico e imunológicas distintas (Turecek, et al, 2016).

A PEGuilação de segunda geração foi desenvolvida com o objetivo de contornar os problemas da geração anterior, como as ligações fracas, que foram solucionadas adicionando-se grupamentos metileno entre o éster ativo e a cadeia de PEG, e a baixa seletividade, através das reação sítio dirigidas pela diferença de pKa dos resíduos de aminoácidos (Roberts, Bentley, & Harris, 2012).

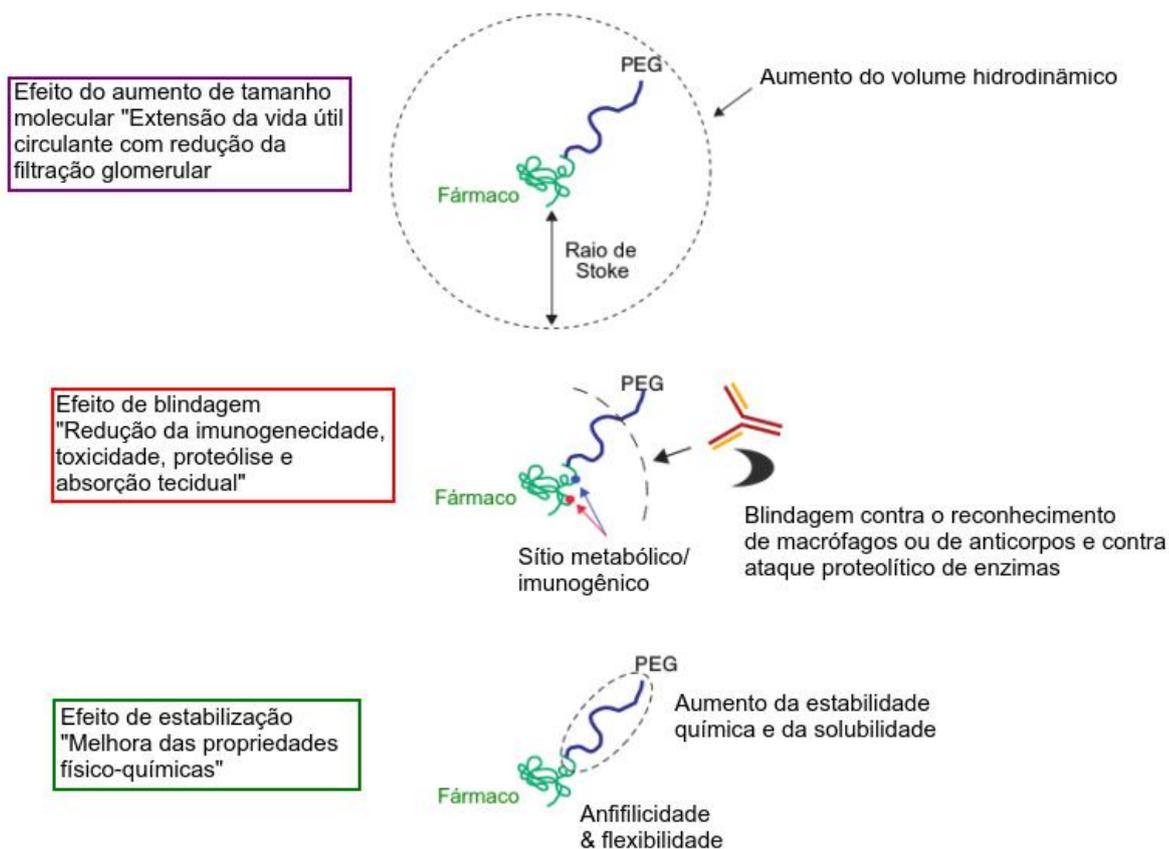


Figura 4. Representação de uma proteína PEGuilada e suas vantagens (Kang, Deluca & Lee, 2001).

Para que a PEGuilação ocorra, é necessário, previamente, a ativação do PEG para que este possa se ligar covalentemente a estrutura desejada. Esta alteração ocorre com a substituição de um grupo hidroxila por um grupo funcional eletrofílico (por exemplo carbonato ativo, éster ativo ou tresilato) (Fig. 5). Os principais sítios ativos das proteínas que podem se ligar ao PEG reativo são grupos tiol, amino  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -amino da lisina, grupos carboxilato e nos grupos nucleófilos dos hidroxilatos (Harris, Martin & Modi, 2001). No entanto, o grupo tiol normalmente está ausente em proteínas, e, quando presente, em geral está associado ao seu sítio ativo. Já os grupos carboxílicos apresentam dificuldades na PEGuilação, pois pode ocorrer reação cruzada com o grupo amina. Sendo assim, os grupos amino  $\alpha$  e  $\epsilon$ -amino da lisina são os mais empregados para esta reação (Harris, Martin & Modi, 2001).

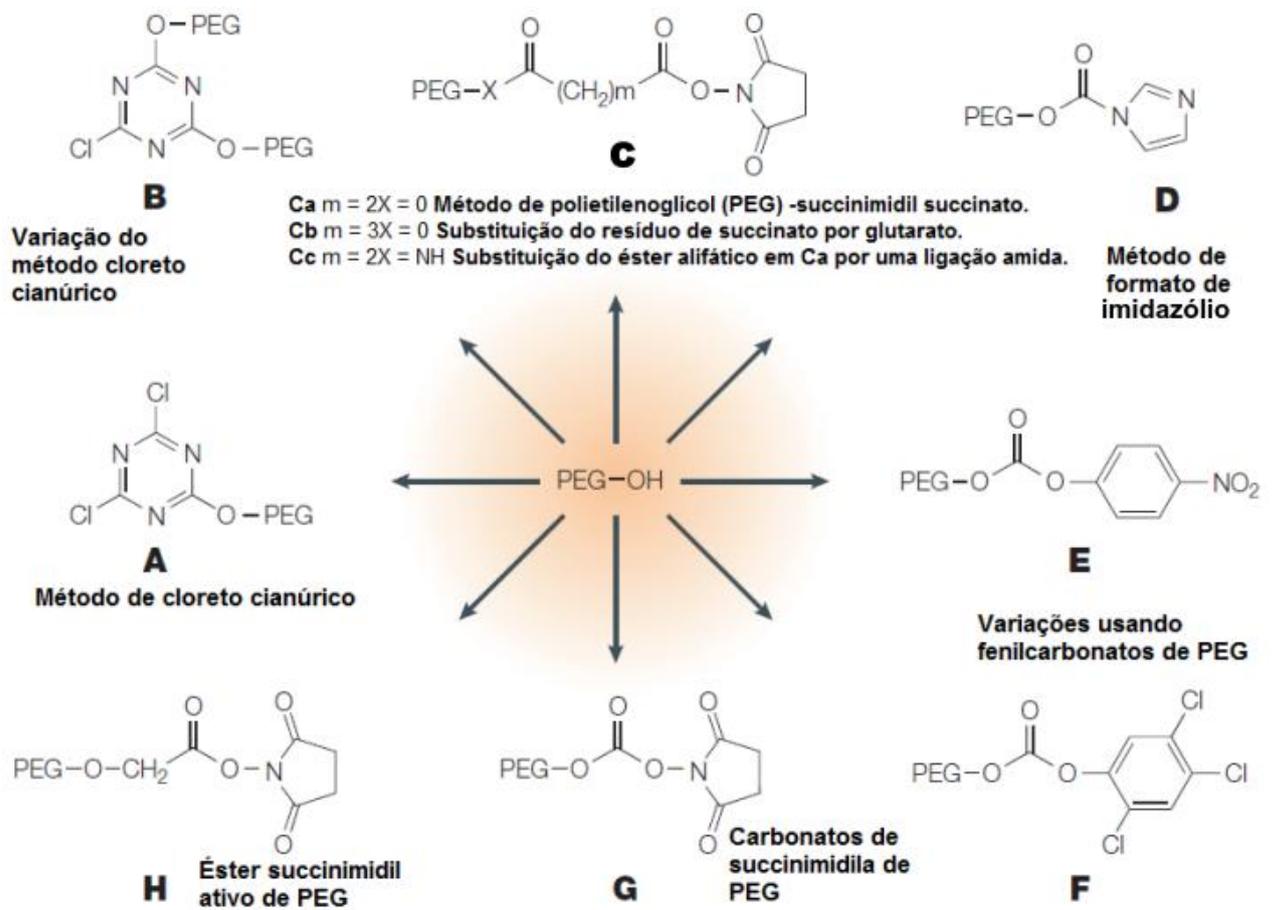


Figura 5. Método para a ativação de moléculas de PEG (Harris & Chess, 2013)

Tabela 1. Lista de medicamentos PEGuilados aprovados nos Estados Unidos e Europa até 2015, pelas agências reguladoras FDA e EMA (Santos, et al., 2018).

Marca	Empresa farmacêutica	Sítio PEGuilado	Tamanho do PEG (Da)	Aplicações	Ano de aprovação
Adagen®	Enzon	Lisina	5000	Doenças de imunodeficiência combinada severa	1990
Oncaspar®	Enzon	Lisina	5000	Leucemia linfóide aguda	1994
Peg-intron®	Schering-Plough	Histidina, cisteína, lisina, serina, tirosina, histidina	12000	Hepatite C	2000
Pegasys®	Hoffman-La Roche	Lisina	40000	Hepatite C	2001
Neulasta®	Amgen	<i>N</i> -terminal	20000	Neutropenia	2002
Somavert®	Pfizer	Lisina, <i>N</i> -terminal	5000	Acromegalia	2003
Macugen®	Pfizer	Lisina	40000	Degeneração macular relacionada à idade	2004
Mircera®	Hoffman-La Roche	Lisina	30000	Anemia associada à insuficiência renal crônica	2007
Cimzia®	UCB	<i>C</i> -terminal	40000	Doença de Crohn, espondiloartrite axial e artrite psoriática	2008
Krystexxa®	Savient	Lisina	10000	Gota crônica	2010
Sylatron™	Merck	Histidina, cisteína, lisina, serina, tirosina, histidina	12000	Melanoma	2011
Omontys®	Affymax/Takeda	Lisina	40000	Anemia associada à doença renal crônica	2012
Plegridy®	Biogen	<i>N</i> -terminal	20000	Esclerose múltipla	2014
Adynovate®	Baxalta	Lisina	20000	Hemofilia A	2015

Na terapia anticâncer, a PEGuilação vem amplamente sendo usada como estratégias em estruturas distintas. Algumas estratégias mais utilizadas são:

- PEGuilação de fragmento de anticorpo monoclonal: objetiva aumentar a meia-vida dessa estrutura a fim de poder interagir com as células cancerígenas por mais tempo e, na maioria dos casos, estimular sua apoptose, não afetando as células normais.
- PEGuilação de citosinas: citosinas são proteínas imunoterápicas e participam da mobilização do sistema imunológico contra o câncer.
- PEGuilação de fármacos anticâncer de baixo peso molecular: para contornar a hidrofobicidade dessas moléculas.
- PEGuilação de nanopartículas com potencial emprego na terapia anticâncer (lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros, nanopartículas de ouro ou de magnésio): são favorecidas pela diminuição da filtração renal devido ao aumento do volume da estrutura pelas cadeias de PEG e menor reconhecimento pelo sistema imune.
- PEGuilação de enzimas: as enzimas são importantes estruturas que podem ser PEGuiladas. Utilizadas na terapia anticâncer, são beneficiadas pelo aumento da meia-vida e pela diminuição do ataque sofrido pelo sistema imunológico (Mishra, Nayak, & Dey 2016).

Na Tabela 2 pode-se observar alguns exemplos de nanoestruturas farmacêuticas anticâncer PEGuiladas e suas aplicações.

Tabela 2. Estruturas PEGuiladas utilizadas na terapia anti-câncer (Hussain, et al, 2019).

Tipos de nanocarreador	Fármaco carregado	Aplicações	Status
Lipomossa PEGuilado	Paclitaxel	Aumento da semi-vida plasmática do fármaco no rato e efeito antitumoral melhorado	Ensaio pré-clínico
Micela polimérica PEGuilada	Paclitaxel	Aumento da captação do fármaco em camundongos portadores de tumor	Ensaio pré-clínico
Nanopartículas lipídicas PEGuiladas	Docetaxel	Meia vida plasmática prolongada de medicamentos com acumulação substancial no local do tumor	Ensaio pré-clínico
Nanopartícula polimérica PEGuilada	Cisplatina	Inibição do crescimento tumoral	Ensaio pré-clínico
Micela polimérica PEGuilada (NK911)	Doxorubicina	Acúmulo de fármaco em tumor sólido	Ensaio pré-clínico Fase I
Lipossoma PEGuilado (SPI-77)	Cisplatina	Redução da toxicidade sistêmica	Ensaio pré-clínico Fase II
Micela PEGuilada (NC-6004 NanoplatinTM)	Derivado de cisplatina	Acúmulo do fármaco em células cancerígenas	Ensaio pré-clínico Fase III
Lipossoma PEGuilado	Cisplatina	Tratamento de tumores com eventos adversos diminuídos	Ensaio pré-clínico Fase III
Lipossoma PEGuilado (Doxil®)	Doxorubicina	toxicidade sistêmica aliviada com aumento da meia-vida de circulação plasmática	Aprovado
Micela polimérica PEGuilada (Genexol-PM)	Paclitaxel	Alivia a toxicidade sistêmica, prolonga a meia-vida de circulação plasmática e melhora a eficácia anticancerígena	Aprovado na Coreia do Sul

A ASNase poliPEGuilada comercializada, Oncaspar®, apresenta meia-vida de cinco dias, superior à sua forma nativa, que possui meia-vida de até um dia (Kurre, et al., 2002). Foi aprovada pelo FDA em 1994, inicialmente para o tratamento de pacientes com reação imunogênica à ASNase nativa. Refere-se a um processo de PEGuilação aleatória em resíduos de lisina com PEGs de 5 kDa, resultando em preparação polidispersa, apresentando 69 a 82 moléculas de PEG em sua estrutura (Mishra, Nayak, & Dey 2016). São

poucos os casos de alergia aguda relatados, contrastando com a enzima não PEGuilada que pode causar alergias severas em mais de 20% dos pacientes tratados. Isso ocorre porque a PEGuilação é uma forma já conhecida de reduzir a reação imunogênica (Loureiro, et al, 2012).

Apesar das vantagens da PEG-ASNase, os custos deste fármaco são superiores aos da versão não PEGuilada (Kurre, et al, 2002). Uma possível maneira de diminuir o gasto empregado na produção da PEG-ASNase é por meio da PEGuilação *N*-terminal, que reduz a quantidade de PEG empregada e a polidispersão (Pfister, & Morbidelli, 2014). Essa reação parte da diferença de pKa entre o grupo amínico do aminoácido *N*-terminal (~7,0) e dos resíduos amínicos das lisinas (10,0-10,2), que favorece a ligação da amina do aminoácido *N*-terminal ao PEG reativo, enquanto a amina das lisinas encontra-se prevalentemente protonada (Pfister, & Morbidelli, 2014, Kinstler, et al, 2002).

O PEG reativo mais comumente empregado para PEGuilação *N*-terminal é o metoxi-poli(etilenoglicol) carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS), Fig. 5G, resultando na formação de ligações amídicas estáveis. No entanto, todos os mPEG-NHS são suscetíveis à hidrólise, como pode ser visto na Figura 6, resultando em um derivado ácido do PEG e em *N*-hidroxisuccinimida. A taxa de hidrólise varia conforme o espaçante (L) entre o PEG e o grupo reativo, porém sempre está presente. Por essa razão, as reações de PEGuilação requerem excesso de mPEG-NHS para compensar a degradação do reagente e isso se torna um fator significativo no custo do processo (Turecek, et al, 2016). Uma alternativa já estudada anteriormente por Torres-Obreque, 2017, foi a utilização aquosas de solventes orgânicos apróticos, tetrahidrofurano (THF) e dimetilformamida (DMF) como substituinte no meio reacional da PEGuilação, uma vez que a água, portadora de prótons, incita a reação de hidrólise. No entanto, devido à natureza não-iônica dos solventes, não houve formação de espécies reativas capazes de interagir com os prótons da água evitando a hidrólise do PEG, diminuindo consideravelmente o rendimento reacional (40% em DMF, 20% em THF, quando é obtido 50% em PBS). Assim, uma alternativa interessante a ser investigada na busca por solventes para a reação de PEGuilação que evitem

a hidrólise do reagente é a utilização de solventes iônicos, como os líquidos iônicos, capazes de formar espécies carregadas no meio.

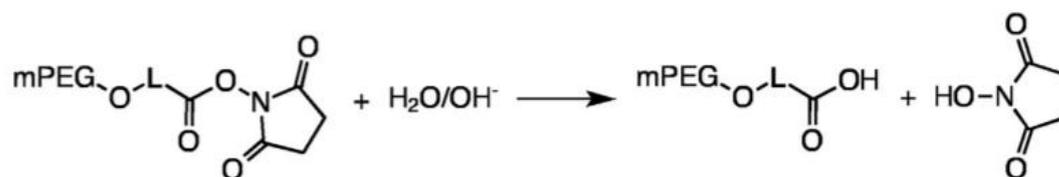


Figura 6. Reação de hidrólise do metoxi-poli(etilenoglicol) carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil (mPEG-NHS). (L – grupo espaçante) (Turcek, et al. 2016).

## 2.5 Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são estruturas iônicas assimétricas de grandes cátions orgânicos e de ânions de natureza orgânica ou inorgânica de menor volume (Fig. 7). Devido à assimetria entre os íons, os LIs apresentam baixa pressão de vapor, resultando em temperaturas mais baixas de fusão comparado com seus análogos estruturais sais, por isso os LIs também podem ser chamados por alguns autores de “sais líquidos” (Tavares, et al. 2013). Ainda, devido a sua baixa volatilidade, os LIs também são conhecidos como “solventes verdes”, pois a alta pressão de vapor dos solventes orgânicos é uma das grandes causas de poluição ambiental desses compostos (Rogers & Seddon, 2003).

No entanto, as propriedades dos LIs não se restringe à baixa volatilidade. Esses compostos possuem características físico-químicas ímpares, como estabilidades térmica e química, são capazes de solvatar espécies orgânicas e inorgânicas, possuem ampla janela de potencial eletroquímico, além de poder promover uma melhora na estabilidade de biomoléculas como enzimas e ácidos nucleicos (Zhao, 2010, Tavares, 2013). Devido a essas características, os LIs têm sido propostos para separação e purificação de biomoléculas através de diversos processos (ex.: extração líquido-líquido, extração sólido-líquido, métodos cromatográficos, entre outros)<sup>33</sup>, além de serem co-catalisadores em muito procedimentos, como em

catálises orgânicas (Zhao & Malhotra, 2002) e o potencial como agente estabilizante de proteínas tem sido cada vez mais investigado (Bisht, et al., 2017).

Além dessas vantagens, os LIs também podem ter suas características projetadas e ajustadas, isto é, seus ânions e cátions podem apresentar, por exemplo, hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade selecionada de acordo com a aplicabilidade desses solventes. Assim, é possível refinar as propriedades dessas estruturas para melhorar seus potenciais (Rodríguez, 2016).

Sendo assim, é sabido que algumas características relacionadas aos LIs influenciam mais a estabilidade enzimática nesses solventes que outras. Um desses fatores é a capacidade de realizar ligações de hidrogênio entre solvente-enzima (Zhao, 2010 e Bisht, et al., 2017).

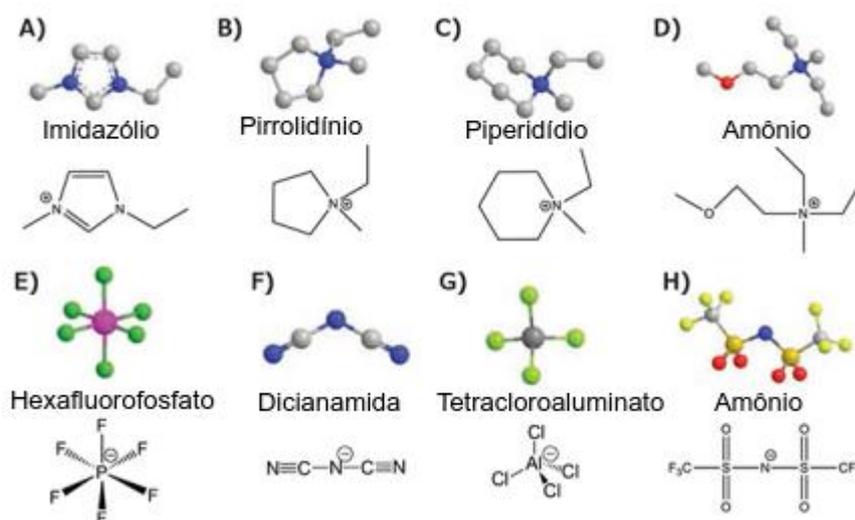


Figura 7. Exemplo de alguns cátions e ânions comumente utilizados para a composição de LIs. (Fonte: Lin, Chen & Dai, 2018).

Em muitos estudos encontrados na literatura é possível observar a importância que os LIs têm exercido para melhora da estabilidade de enzimas. Persson e Bornscheuer observaram que *Bacillus stearothermophilus* tinha sua estabilidade aumentada quando numa solução aquosa de hexafluorofosfato de buti-imidazol a 200mM por dez dias. Já foi observado que citocromo-c em solução de di-hidrogenofosfato de colina hidratada com 20%

de água manteve-se estável por 18 meses à temperatura ambiente (Armand et al., 2009). E em outro estudo, também foi verificado que o citocromo-c preservou sua atividade por 21 semanas na solução de carboxilato de colina, hidratada 50% com água (BISHT, et al., 2017).

Além da melhora da estabilidade ao longo do tempo, estudos também indicam que os LIs podem aumentar a atividade enzimática. Foi observado por Magri que solução de ASNase em 0,05M de cloreto de colina, tinha sua atividade aumentada em 1,5 vezes, e Bisht constatou que solução aquosa com 50% de glutarato de colina aumentava em 25 vezes a atividade de citocromo-c.

A estabilidade e a atividade da enzima estão intimamente relacionadas, sendo que ambas dependem da conformação enzimática da proteína para sua manutenção. Qualquer perturbação na estrutura pode causar alterações nas estruturas secundárias e terciárias, e conseqüente desnaturação da proteína. Assim, para a manutenção da integridade enzimática, é necessário que haja um equilíbrio entre as forças que compõe as estruturas, que são as ligações do tipo ponte dissulfeto, interações hidrofóbicas, iônicas e ligações de hidrogênio (Valstar, 2000). Ainda, qualquer estresse ambiental sofrido pelas enzimas, como mudança de temperatura, variação de pH, ou presença de eletrólitos também pode acarretar na desnaturação enzimática, além de agregação proteica, que é outro fator que contribui para perda de atividade. Sendo assim, as enzimas são muito dependentes do meio que se encontram, necessitando de ambientes favoráveis para sua estabilidade (Klefschaber & Buchner, 2005).

Os cátions dos LIs da família imidazol possuem uma carga positiva no anel imidazol, no entanto, devido à ressonância dessa estrutura, essa carga é dissipada, diluindo seu potencial positivo, não sendo intenso o suficiente para perturbar as forças que mantêm a estrutura enzimática. Na verdade, esse grande cátion é atraído pelas regiões negativas da enzima, auxiliando na sua hidratação, além de repelir íons que podem perturbar as ligações de hidrogênio e as interações salinas da proteína (Jaeger, Burney & Pfaendtner, 2015). Ainda, para a melhora da estabilidade enzimática, tem sido verificado

que ligações de hidrogênio entre ânions dos LIs são desejáveis. Em vários casos, é possível concluir que as ligações de hidrogênio alteram a conformação enzimática de forma a expor seus sítios ativos e maximizar a eficiência catalítica (Zhao, 2010).

Sendo assim, os LIs imidazol possuem potencial de fornecer a ASNase uma melhora da sua estabilidade, além de poder proporcionar melhores rendimentos para a reação de PEGuilação, possibilitando a utilização de menores concentrações de PEG reativo por evitar a hidrólise desse reagente.

### **3. OBJETIVOS**

Estudo da estabilidade de ASNase em LIs da família imidazol e desenvolvimento de um processo alternativo de PEGuilação utilizando esses LIs para a obtenção de ASNase monoPEGuilada com maior rendimento reacional que em tampão fosfato. Para alcançar esse objetivo, os seguintes passos foram propostos:

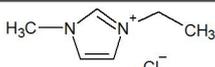
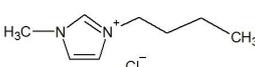
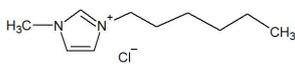
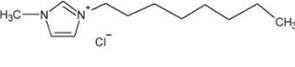
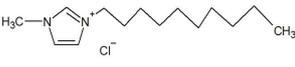
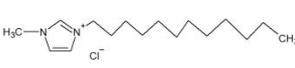
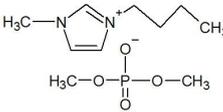
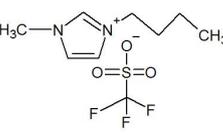
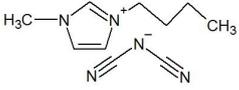
- Avaliação de LIs pertencentes à família imidazol variando o ânion e o cátion, para o estudo da estabilidade de ASNase.
- Estudo da estrutura de ASNase em soluções aquosas de LIs através de dicroísmo circular e fluorescência.
- Avaliação da estabilidade de ASNase após a retirada da solução aquosa de LIs e ao longo do tempo a 4° e 25°C.
- Análise de condições experimentais de PEGuilação para as soluções aquosas de LIs mais promissoras em diferentes condições (tempo, pH e concentração de LI).

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Material**

A enzima L-asparaginase E.C.3.5.1.1. foi obtida comercialmente da ProSpec Tany (Ness-Ziona, ISR). O polímero metoxi-poli(etilenoglicol) carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil (mPEG-NHS), de massa molecular de 10 kDa foi adquirido da Nanocs (New York, NY). Os líquidos iônicos (IoliTec, pureza = 99%, Tabela 3) foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup> Sónia P. M. Ventura, da Universidade de Aveiro, Portugal. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA) e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Tabela 3. Denominação comum, nome químico e família dos líquidos iônicos empregados.

Líquidos Iônicos	Nome Químico	Estruturas
[C <sub>2</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio	
[C <sub>4</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	
[C <sub>6</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio	
[C <sub>8</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio	
[C <sub>10</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-decil-3-metilimidazólio	
[C <sub>12</sub> mim]Cl	Cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazólio	
[C <sub>4</sub> mim][(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	Dimetil fostato de 1-butil-3-metilimidazólio	
[C <sub>4</sub> mim][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	Triflato de 1-butil-3-metilimidazólio	
[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ]	Dicianamida de 1-butil-3-metilimidazólio	

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Estudo da atividade de ASNase em soluções aquosas de líquidos iônicos**

Para determinação da atividade, foi empregada a metodologia desenvolvida por Drainas. A atividade da ASNase ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em presença de soluções aquosas de LIs foi estudada a  $25^\circ\text{C}$  nas proporções de LI/água de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50% (p/v), nos tempos 2h, 4h, 6, 8h e 24h. A atividade enzimática em tampão fosfato salino (PBS) 10mM pH 7,4 foi determinada como controle. A atividade de ASNase em PBS no tempo inicial foi considerada igual a 100% de atividade, e a atividade relativa foi calculada dividindo-se a absorbância obtida pela absorbância do controle no tempo inicial. Em alíquotas de  $50 \mu\text{L}$  de soluções aquosas de ASNase em LIs foram adicionados  $150 \mu\text{L}$  de tampão tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico (TRIS-HCl) 50 mM,  $50 \mu\text{L}$  de hidroxilamina 0,5 M e  $50 \mu\text{L}$  de asparagina 100 mM (concentração final de ASNase de  $5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). A reação foi mantida a  $37^\circ\text{C}$  em banho termostato por 7,5 minutos e, após este tempo, esta foi interrompida adicionando-se  $50 \mu\text{L}$  da solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), 2,5% (p/v) de ácido tricloroacético e HCl 0,33 mM. A reação foi quantificada através da absorbância a 500 nm em espectrofotômetro UV-VIS (SpectraMax Plus 384). Todas as análises foram realizadas em triplicata, os respectivos brancos foram subtraídos dos devidos cálculos e os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido o teste de Bonferroni, com  $p$ -valor = 0,05.

### **4.2.2. Efeito do pH de soluções aquosas de ASNase em LIs**

A fim de verificar o efeito da variação de pH nos meios contendo LIs, a atividade de ASNase ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em soluções aquosas de LIs também foi investigada através da metodologia desenvolvida por Drainas, com correção de pH para 7,4, para os LIs  $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$  e  $[\text{C}_4\text{mim}][(\text{CH}_3)\text{PO}_4]$  e o sal NaCl, todos a 5% p/v. Todas as análises foram realizadas em triplicata, os

respectivos brancos foram subtraídos dos devidos cálculos e os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA.

#### **4.2.3. Influência das soluções aquosas de líquidos iônicos na estabilidade estrutural da ASNase por dicroísmo circular**

A estrutura da ASNase foi investigada para as soluções aquosas a 5% (p/v) dos LIs [C<sub>4</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] e [C<sub>12</sub>mim]Cl por meio da técnica espectrofotométrica de dicroísmo circular, após o tempo de 24 horas. Foi empregada a concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> (7,09 x 10<sup>-3</sup> μmol) de enzima e o controle em PBS 10mM pH 7,4 também foi observado. Os espectros foram adquiridos na região de UV distante (*far*) próxima (*near*), a 250-350 nm em espectropolarímetro de dicroísmo circular modelo J-720 (Jasco, Tóquio, Japão). Os espectros foram adquiridos em cubetas de 5 mm e analisados em sextuplicata.

#### **4.2.4. Influência das soluções aquosas de líquidos iônicos na estabilidade estrutural da ASNase por fluorescência**

Soluções aquosas de ASNase, 0,33mg.mL<sup>-1</sup>, em distintas concentrações (5; 2,5; 1,25 e 0,63% p/v) dos LIs, [C<sub>12</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim]Cl [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)PO<sub>4</sub>], [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], após o período de 24 horas foram excitados a 295 nm, e a leitura foi realizada em fluorímetro (Varian 50 Bio UV-VIS), entre 300 a 500 nm, em cubetas de quartzo, 10x4 mm, com tensão de 660V, a 25°C. A fim de verificar possíveis interferências nas fluorescências, as absorvâncias também foram estudadas, com as leituras realizadas em espectrofotômetro (Varian 50 Bio UV-VIS) de 200 a 800 nm, com as mesmas cubetas de quartzo, 10x4 mm e aquelas soluções que obtiveram absorvância superior a 0,1 foram devidamente tratadas seguindo o protocolo de Mendonça et al, 2013.

#### **4.2.5. Estudos de cinética de ASNase em soluções aquosas de LIs**

A avaliação da cinética de ASNase foi realizada utilizando-se o ensaio acoplado à glutamato desidrogenase. Esse método baseia-se na oxidação de dinucleótido de nicotinamida e adenina ( $\beta$ -NADH ou NADH) à dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada (NAD<sup>+</sup>) pela glutamato desidrogenase (GDH), que é cofator. A partir de uma molécula de  $\alpha$ -cetoglutarato e uma molécula de amônia, o GDH é capaz de oxidar uma molécula de NADH (Balcão et al., 2001). No ensaio conjugado, a molécula de amônia é proveniente da hidrólise da asparagina pela ASNase. Para a realização deste ensaio foi utilizada microplaca de 96 poços, UV/VIS, sendo que em cada poço foram adicionados os seguintes reagentes: 92,5  $\mu$ L de tampão fosfato 200 mM pH 7,5; 3,7  $\mu$ L de  $\alpha$ -cetoglutarato em tampão Tris-HCl, 50 mM pH 8; 9,3  $\mu$ L de  $\beta$ -NADH em Tris-HCl 50 mM pH 8,6; 46,5  $\mu$ L de glutamato desidrogenase em 50% de glicina, 25% de água e 25% de tampão fosfato 200 mM, pH 7,4. Foi utilizado 50  $\mu$ L de ASNase 50 nM em PBS 10 mM pH 7,4 como controle e 50  $\mu$ L de ASNase 50 nM em solução aquosa de LI a 5% p/v ([C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]). Também foi acrescentada asparagina em concentrações crescentes (de 0,00578 a 2,95 mM). O ensaio de atividade foi realizado a 37°C por 20 minutos em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384), os ensaios foram feito em triplicata e os respectivos brancos foram subtraídos dos devidos cálculos. Os dados obtidos foram analisados através de regressão não linear empregando-se o software Graph Pad Prism 7. Os parâmetros cinéticos calculados foram velocidade máxima ( $V_{max}$ ), número de renovação ( $k_{cat}$ ), constante de Michaelis-Menten ( $k_M$ ) e constante de especificidade ( $k_{cat}/k_M$ ).

#### **4.2.6. Ensaio de atividade de ASNase após a remoção das soluções aquosas de LIs**

Para verificar se o efeito das soluções aquosas de LIs era reversível, a atividade da ASNase foi determinada após um processo de lavagem para remoção das soluções aquosas contendo os LIs. Soluções de ASNase 1mg.mL<sup>-1</sup> e 5% de cada LI ([C<sub>2</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], [C<sub>8</sub>mim]Cl e [C<sub>12</sub>mim]Cl) foram diluídas com 5 mL de água Mili-Q, submetidas

à filtração em centrífuga utilizando ultrafiltros Milipore de 10kDa, em 4000xg, 20 minutos, a 4°C. A condutividade de todo o ensaio foi medida e o processo foi realizado três vezes, até que o filtrado final apresentasse valores de condutividade próximas ao PBS, correspondendo portanto à total remoção da solução de LI. A atividade de ASNase nos sobrenadantes finais foi determinada pelo método de Drinas e a concentração de proteína pelo método de BCA. A estabilidade estrutural da ASNase após a remoção da solução aquosa de LIs também foi analisada por dicroísmo circular modelo J-720 (Jasco, Tóquio, Japão).

#### **4.2.7. Determinação da concentração de proteína**

A determinação da concentração de ASNase foi realizada através do método do ácido bicinconínico (BCA), que consiste na detecção de ligações peptídicas entre alguns aminoácidos específicos. Essas ligações peptídicas das proteínas são capazes de reduzir o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) presente em um dos reagentes, assim o BCA liga-se ao  $\text{Cu}^+$ , e a reação colorimétrica de cor púrpura, pode ser observada em espectrofotômetro (SIGMA-ALDRICH, 2013). As amostras obtidas no item anterior foram incubadas por 30 minutos, a 37 °C e as absorbâncias medidas a 562 nm em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384). A concentração de proteína total foi obtida através da interpolação dos valores de absorbância em uma curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA), construída nas concentrações de 200 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (SIGMA-ALDRICH, 2013).

#### **4.2.8. Estudos da atividade de ASNase em soluções aquosas de líquidos iônicos ao longo do tempo**

A atividade da ASNase ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em presença dos LIs foi estudada em 4° e em 25°C na proporção de LI/água de 5 % (p/v), ao longo de 28 semanas. Para verificação da atividade enzimática, foi empregada a metodologia de Drinas. Todas as análises foram realizadas em triplicata, os respectivos brancos foram subtraídos dos devidos cálculos.

#### **4.2.9. PEGuilação de ASNase em soluções aquosas de LIs**

A PEGuilação de ASNase seguiu a metodologia descrita por Meneguetti et al., 2019, utilizando-se a proporção molar PEG:proteína 25:1, mPEG-NHS de 10 kDa e partindo-se de uma solução de  $1\text{mg.mL}^{-1}$  de ASNase. Para finalizar a reação, foi adicionado 0,2 M de hidroxilamida, a fim de clivar os sítios instáveis de peguilação que tenham se formado na proteína. Foram empregadas as soluções aquosas dos LIs  $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ ,  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{N}(\text{CN})_2]$ ,  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{CF}_3\text{SO}_3]$  e  $[\text{C}_4\text{mim}][(\text{CH}_3)_2\text{PO}_4]$ . Foi investigada a influência da concentração das soluções de LIs nas proporções 25, 50 e 75%, nos pHs 7,5; 8,0 e 8,5, além dos tempos de reação de 10, 20 e 30 minutos, sob agitação constante.

As amostras foram analisadas em gel de eletroforese de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e as bandas contidas em cada gel foram analisadas e comparadas pela sua intensidade no software ImageJ (Rashband, 1997-2016).

#### **4.2.10. Eletroforese em gel de poliácridamida com SDS (SDS-PAGE)**

A análise de SDS-PAGE foram realizadas seguindo-se a metodologia de Laemmli (1970) e as proteínas foram coradas com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, CBB) de acordo com a metodologia descrita por Blum et al. (1987).

O gel para a separação eletroforética foi preparado com 522 mM de Tris-HCl pH 8,8, 12% de acrilamida/bis-acrilamida, adicionando-se 1,6 mL de água MiliQ, 2,0 mL de bis-acrilamida 30%, 1,3mL de Tris 1,5 M (pH 8,8), 50  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 50  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônio 10%, e 2  $\mu\text{L}$  de tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel empacotador (aplicado sobre o gel de separação) foi preparado utilizando-se 1,4 mL de água MiliQ, 0,33 mL de bis-acrilamida 30%, 0,25 mL de Tris 1,5 M (pH 6,8), 20  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 20  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônio 10% e 2  $\mu\text{L}$  de TEMED. As amostras foram preparadas com tampão de proteína (Laemmli, et al., 1970), e ditioneitol (DTT) 25 mM e aquecidas por 5 min a  $90^\circ\text{C}$ , enquanto o tampão de corrida utilizado

foi Tris-Glicina com SDS 1%, pH 8,3 e o gel permaneceu sob corrente de 65-75 mA, em 25°C.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Estabilidade enzimática de ASNase em soluções aquosas de LIs**

#### **5.1.1. Interferência da cadeia alquílica do líquido iônico na atividade de ASNase**

Soluções aquosas de LIs podem ser capazes de alterar a atividade enzimática de uma proteína. A atividade de ASNase em PBS encontra-se coerente com resultados anteriores (Magri, 2019). Assim, é visto na Figura 8 que a ASNase em PBS 10mM perdeu 50% de sua atividade após 6 horas, provavelmente devido à agregação proteica, que é o principal desafio referente a estabilidade enzimática (Valstar, 2010). Em contrapartida, ASNase em soluções com LI apresentou comportamento mais complexo. Nos LIs mais hidrofílicos, que apresentam menores cadeias alquílicas (2 a 4 átomos de carbono), e a baixas concentrações (até 10%), a ASNase apresentou uma atividade superior ao controle PBS, ainda mais quando exposta a menores tempos, tendo seu máximo de atividade em duas horas no meio contendo solução aquosa de LI [C4mim]Cl a 10% (atividade de 132%, equivalente a 1,45 vezes a atividade em PBS neste mesmo tempo).

Quanto às soluções aquosas de LIs mais hidrofóbicos, com cadeia alquílica maior (6 a 12 átomos de carbono), a ASNase apresentou uma queda em sua atividade, agravando-se com o aumento da concentração de LI, da cadeia alquílica e do tempo de exposição. Portanto, é possível afirmar que a atividade, e a estabilidade de ASNase nessas soluções de LIs é dependente do tamanho da cadeia alquílica, da concentração de LIs, e do tempo de exposição da enzima ao LI.

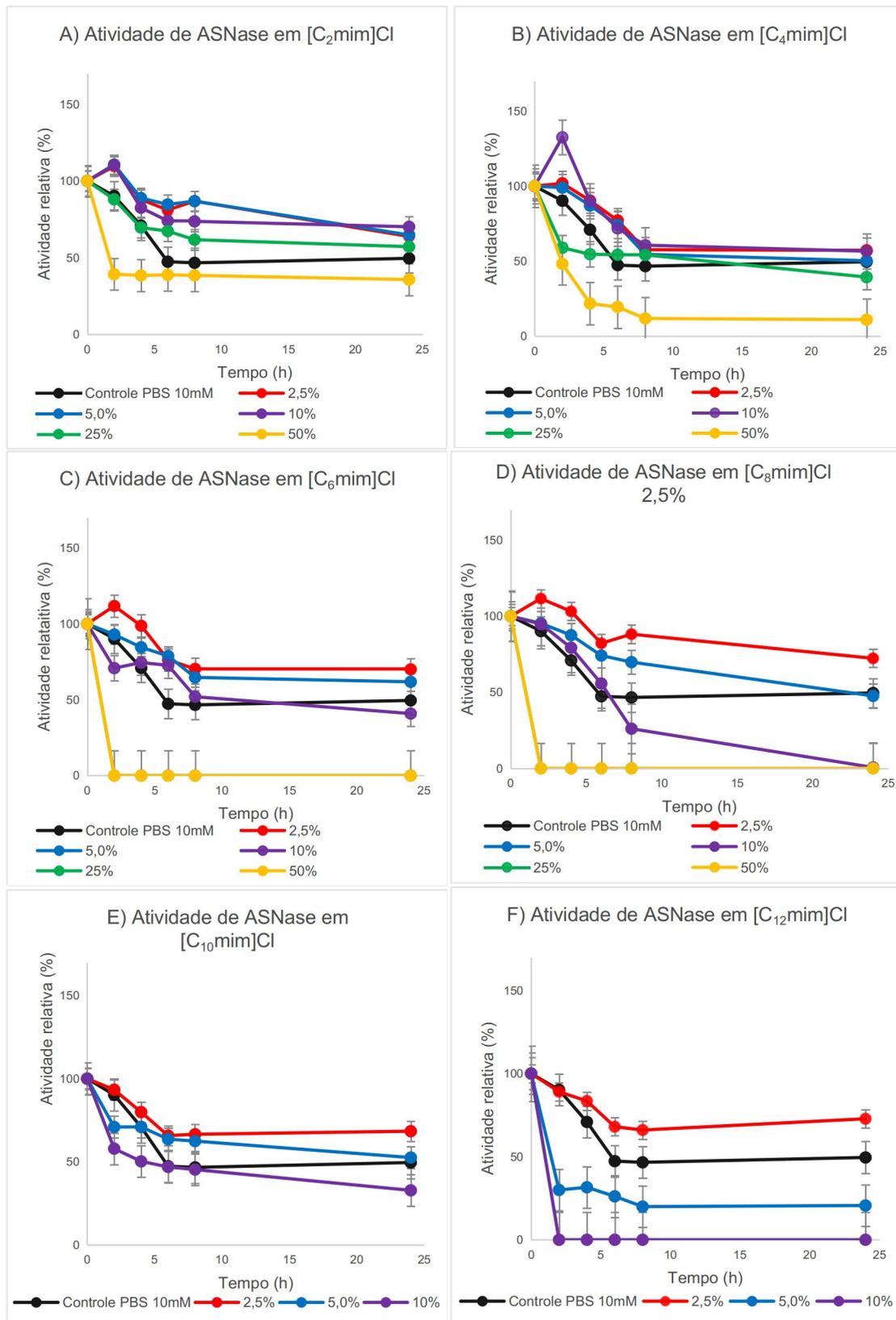


Figura 8. Atividade relativa da L-asparaginase em função do tempo, a 25 °C, na presença de diferentes líquidos iônicos, variando-se suas concentrações. Barras de erro calculadas a partir do desvio padrão.

Analisando estatisticamente os resultados obtidos, observou-se que o  $p$ -valor para a diferença de atividade de ASNase nos diferentes tempos de exposição, foram, em todos os casos, inferiores a 0,05, isto é, observou-se que em uma solução de ASNase em LI, nas cinco diferentes concentrações, em um determinado tempo, a atividade enzimática é significativamente diferentes. Portanto, quando se altera a concentração de um LI, a atividade enzimática também se altera.

Já quando se verifica o  $p$ -valor referente às diferenças de atividade segundo as concentrações, isto é, mantendo-se a concentração constante e alterando-se o tempo, há alguns valores que se destacam. Quando em solução de 50% de  $[C_2mim]Cl$ , a atividade enzimática foi de 39% ( $t = 2h$ ) a 35% ( $t = 24h$ ), com desvio padrão de 5% não resultou em diferenças significativas, assim o  $p$ -valor foi superior a 0,05. Isso significa que a enzima diminui parcialmente sua atividade em alta concentração desse LI, continuando estável, porém com baixa estabilidade ao decorrer do tempo. Quanto as concentrações de 25 e 50% de  $[C_6mim]Cl$  e  $[C_8mim]Cl$  e a de 10% de  $[C_{12}mim]Cl$ , a ASNase não apresenta atividade, sendo assim também não apresentam  $p$ -valor, concluindo-se que houve total perda da atividade da ASNase nessas soluções.

Com essas informações, pode-se afirmar que as alterações na atividade da ASNase se devem à mudança de polaridade do meio e interação dos LIs com a enzima. Os LIs interagem com as moléculas de ASNase por meio de interações eletrostáticas entre os resíduos polares da superfície da proteína e a porção catiônica dos LIs, e interações de van der Waals (efeito hidrofóbico) entre a cadeia alquílica dos LIs e regiões hidrofóbicas da proteína. Em baixas concentrações de LIs, essas interações podem justificar pequenas alterações conformacionais da enzima e o aumento de atividade observado. No entanto, com o aumento da concentração de LI na solução, a hidrofobicidade torna-se mais acentuada e pode resultar em desestabilização da estrutura da enzima ou formação de agregados, com consequente diminuição da atividade. Nos LIs mais hidrofílicos,  $[C_2mim]Cl$  a  $[C_6mim]Cl$ , as cadeias hidrocarbônicas são

pequenas o suficiente para ainda sofrerem influência da esfera de hidratação localizada na cabeça hidrofílica, assim a contribuição para o efeito hidrofóbico é menor. Em outras palavras, os LIs [C<sub>2</sub>mim]Cl a [C<sub>6</sub>mim]Cl, apresentam efeito iônico semelhantes aos sais e interagem com as proteínas de forma eletrostática e não específica. Em pequenas concentrações, são capazes de neutralizar as cargas da proteína, estabilizando-as e, em alguns casos como observado neste trabalho, podem aumentar sua atividade enzimática por uma ligeira alteração conformacional de modo a favorecer ligações com o substrato aumentando a atividade enzimática (Gao, et al, 2015, Tanford, 1974).

Os LIs, [C<sub>8</sub>mim]Cl a [C<sub>12</sub>mim]Cl, por outro lado, apresentam-se como moléculas anfifílicas e são capazes de formar arranjos estruturais com as partes hidrofóbicas voltadas umas para as outras e com as cabeças polares em direção à água, em forma de micelas, no sentido de diminuição da energia livre de Gibbs. Assim, os LIs de cadeia alquílica longa interagem com regiões hidrofóbicas da enzima e em altas concentrações podem resultar em efeito detergente e desnaturação da ASNase (Gao, et al, 2015, Tanford, 1974).

Tabela 4 Relação da meia-vida da ASNase (50% de atividade) com o tempo de exposição da enzima às soluções aquosas de LIs.

% (p/v)	[C <sub>2</sub> mim]Cl	[C <sub>4</sub> mim]Cl	[C <sub>4</sub> mim]Cl	[C <sub>8</sub> mim]Cl	[C <sub>10</sub> mim]Cl	[C <sub>12</sub> mim]Cl
2,5	> 24 h	24 h	> 24 h	> 24 h	> 24 h	> 24 h
5	> 24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	< 2 h
10	24 h	24 h	8 h	6 h	2 h	< 2 h
25	24 h	2 h	< 2 h	< 2 h	-	-
50	2 h	2 h	< 2 h	< 2 h	-	-

Outro fator observado nesse estudo encontra-se na Tabela 4, que indica o tempo necessário para que a ASNase em solução aquosa de LI atinja 50% de sua atividade. Enquanto o controle em PBS atinge a meia-vida em seis horas, é visto que para todas as soluções contendo 2,5% de LI a atividade da enzima permanece até 24 h. Para os LIs mais hidrofílicos

([C<sub>2</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim]Cl e [C<sub>4</sub>mim]Cl), a atividade enzimática permanece mesmo com 5% de LI em 24h. Assim pode-se concluir que as soluções aquosas desses LIs favorecem a atividade enzimática por períodos de tempo de até um dia em temperatura ambiente.

### **5.1.2. Interferência da alteração do ânion na atividade de ASNase**

O efeito de diferentes ânions na atividade da ASNase foi investigado, mantendo-se o cátion do LI fixo. Para esse estudo foi escolhido o cátion C<sub>4</sub>mim, de tal maneira que o efeito desnaturante não fosse pronunciado (Figura 9).

A partir da Figura 9, pode-se observar novamente o comportamento variado da ASNase nas diferentes soluções aquosas de LIs e em suas distintas concentrações. Assim como observado no item 5.1.1., a ASNase tem o ápice de sua atividade em duas horas, nas concentrações de até 10%, tendo seu ótimo em [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], na concentração de 10%, (atividade = 159,9%, 1,8 vezes superior ao controle neste mesmo tempo). Outro padrão verificado anteriormente se repete neste ensaio: o aumento da concentração de LI nas soluções propicia a perda da estabilidade e, conseqüente, diminuição da atividade da enzima, como pode ser visto em A, em que a atividade relativa da enzima, na concentração de 50% em 24h, foi de 10%, cinco vezes menor que a ASNase em PBS, cuja atividade foi de 49%. Nas demais soluções aquosas de LI (B a D) nas mesmas condições (e inclusive a 25% de LI), a enzima perdeu atividade logo nas primeiras dez horas.

Ainda, ao analisar o *p*-valor relacionados à diferença de atividade segundo os tempos, todos foram inferiores a 0,05, portanto todas as concentrações, ao serem comparadas num mesmo tempo, possuíram valores significativamente diferentes, concluindo-se que o aumento da concentração de LIs no meio interfere na estabilidade enzimática de ASNase.

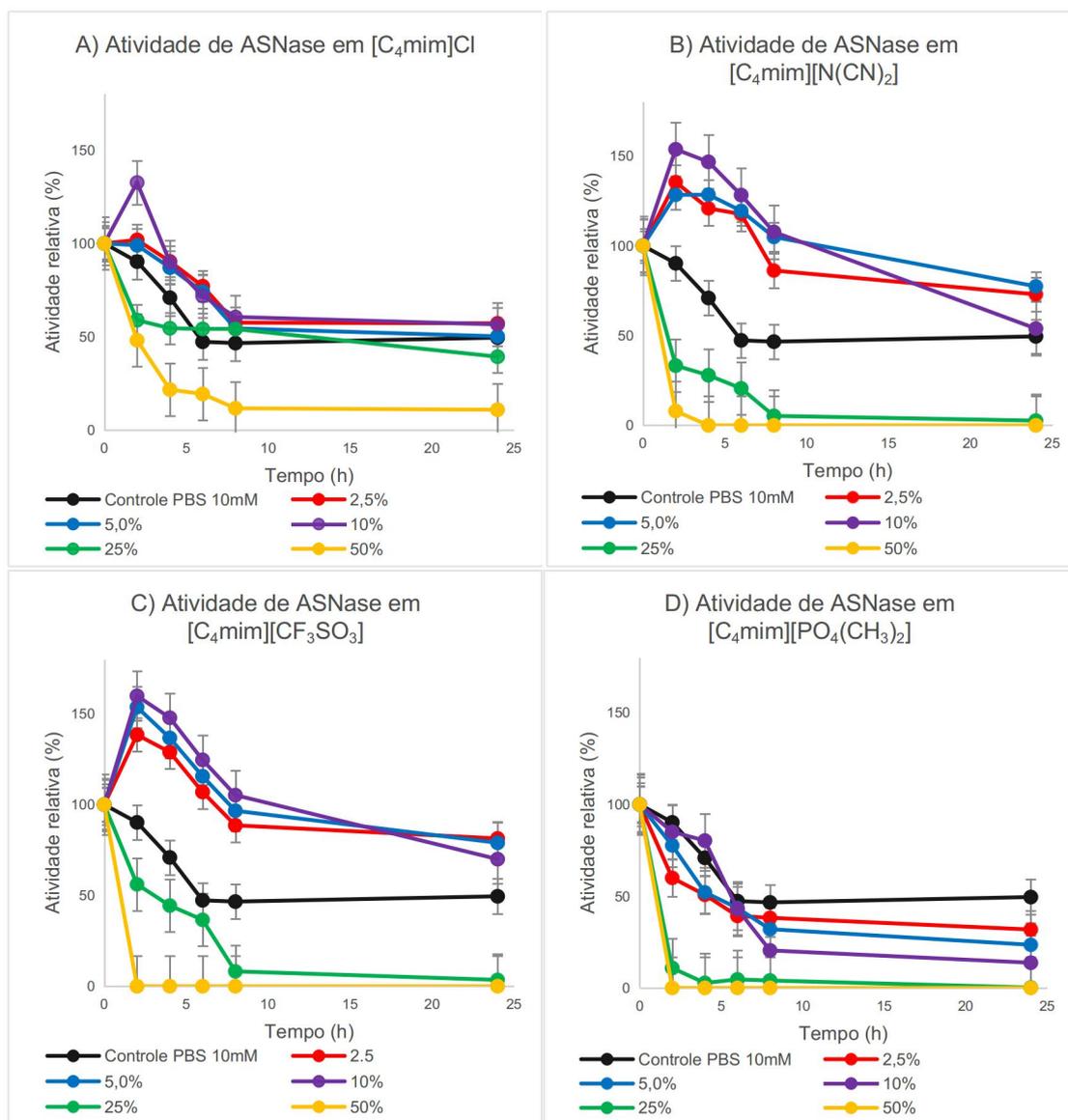


Figura 9. Atividade relativa da L-asparaginase em função do tempo, a 25 °C, na presença de diferentes líquidos iônicos, variando-se a concentração desses: A)  $[C_4mim]Cl$ , B)  $[C_4mim][N(CN)_2]$ , C)  $[C_4mim][CF_3SO_3]$  e D)  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$ . Foram empregados LI de cátion idêntico, variando-se a porção aniônica. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

A atividade de uma enzima é dependente da manutenção de sua estrutura. As principais forças responsáveis por essa manutenção, além das interações hidrofóbicas e das pontes dissulfeto, são as ligações de hidrogênio e as interações iônicas (Valstar, 2000). Com o aumento da nufleofilicidade do ânion ocorre uma diminuição da atividade catalítica, assim como com o

aumento da eletrofilicidade do ânion há consequente aumento da atividade enzimática (Gao, et al. 2015). Portanto, a ordem esperada da atividade de ASNase nos LIs seria  $[C_4mim]Cl < [C_4mim][N(CN)_2] < [C_4mim][CF_3SO_3] < [C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$ . No entanto, a ordem é ligeiramente diferente, tendo em vista que ligações de hidrogênio afetam a estrutura enzimática e diminuem sua estabilidade (Qin, et al., 2016). A ordem realmente encontrada foi  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2] < [C_4mim]Cl < [C_4mim][N(CN)_2] < [C_4mim][CF_3SO_3]$ . O  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$  deveria ser o LI que mais promoveria a estabilidade da enzima, por conta de sua eletronegatividade, porém ocorre exatamente o inverso, por conta das interações de hidrogênio com a enzima. Já o  $[C_4mim][N(CN)_2]$  possui uma menor densidade eletrônica por conter dois grupos cianeto (Cláudio, et al., 2014), favorecendo a estabilidade enzimática e o aumento de sua atividade, sendo que para o  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ , a capacidade de ligações de hidrogênio é menor (Cláudio, et al., 2014). O  $[C_4mim]Cl$  possui eletronegatividade superior aos dois LIs anteriores, não favorecendo tanto quanto esses a estabilidade enzimática, porém ainda causa menos impacto na atividade enzimática que o  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$ .

Tabela 5 Relação da meia-vida da ASNase (50% de atividade) com o tempo de exposição da enzima às soluções aquosas de LIs.

	$[C_4mim]Cl$	$[C_4mim][N(CN)_2]$	$[C_4mim][CF_3SO_3]$	$[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$
2,5	24 h	> 24 h	> 24 h	4 h
5	24 h	> 24 h	> 24 h	4 h
10	24 h	24 h	>24 h	6 h
25	2 h	< 2 h	2 h	< 2 h
50	2 h	0	0	0

Na Tabela 5, pode-se observar que a ASNase manteve sua atividade acima de 50% nas soluções aquosas dos LIs  $[C_4mim]Cl$ ,  $[C_4mim][N(CN)_2]$  e  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$  por pelo menos 24 h, nas concentrações de 2,5, 5 e 10%, com destaque para os LIs  $[C_4mim][N(CN)_2]$  e  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$  que mantiveram a atividade de ASNase acima de 50% por mais de 24 horas. Já as

soluções aquosas de  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$  não favoreceram a manutenção da atividade enzimática acima do controle em nenhuma condição. Assim, soluções aquosas de  $[C_4mim][N(CN)_2]$  e  $[C_4mim][PO_4(CH_3)_2]$  podem promover a estabilidade da ASNase melhor que PBS por 24 horas a temperatura ambiente.

## **5.2. Influência do controle do pH de soluções aquosas de LIs na atividade enzimática de ASNase**

Como nos ensaios anteriores não ocorreu controle de pH, foi considerado importante verificar se o efeito da diminuição de atividade observada poderia ser resultado da variação de pH. Portanto, para os dois LIs que proporcionaram as piores condições de estabilidade enzimática, ou seja quando houve o aumento da cadeia alquílica ( $[C_{12}mim]Cl$ ) e quando alterou-se o ânion ( $[C_4mim][(CH_3)PO_4]$ ), foi realizado um novo ensaio corrigindo o valor de pH para 7,4. Também foi estudada a influência da mudança do cátion (em relação aos LIs do tipo  $C_nminCl$ ) na estabilidade da ASNase, empregando-se NaCl.

De acordo com a Figura 10, em A pode-se observar que a atividade da ASNase foi superior ao controle em todos os meios, com exceção da solução aquosa de  $[C_{12}mim]Cl$ , LI mais hidrofóbico, para o qual se observa uma queda significativa da atividade após o período de 24 h. Em B, quando comparada a atividade enzimática de ASNase em solução aquosa de  $[C_{12}mim]Cl$  nos dois diferentes pHs, observa-se que a enzima apresenta valores inferiores de atividade no meio mais ácido (pH 3,0), o que indica que, além do efeito desnaturante proporcionado por esse LI, o pH também exerce efeito sobre a enzima. Como o efeito detergente é tempo-dependente (Mohammadi & Amirfazlie, 2004), a interação das cadeias alquílicas do LI com as porções apolares da enzima resultam em alteração da sua estrutura e desnaturação após longo períodos em contato com a solução aquosa do LI de cadeia alquílica longa (Tanford, 1974, Gao, et al., 2015). Para a solução aquosa de  $[C_4mim][(CH_3)PO_4]$  (Figura 10C), pode-se verificar novamente o efeito da alteração do pH sobre a enzima, sendo que a atividade é superior em

presença do LI em pH 7,4 comparando com a atividade enzimática em pH 3,0. Portanto, a diminuição da atividade inicialmente observada em presença desse LI deve-se, na verdade, à acidificação do meio, sendo que quando o pH é corrigido para 7,4 dentro da faixa do pH ótimo da enzima (entre 7 a 8), a curva de atividade enzimática ao longo do tempo assemelha-se a do controle (tampão pH 7,4).

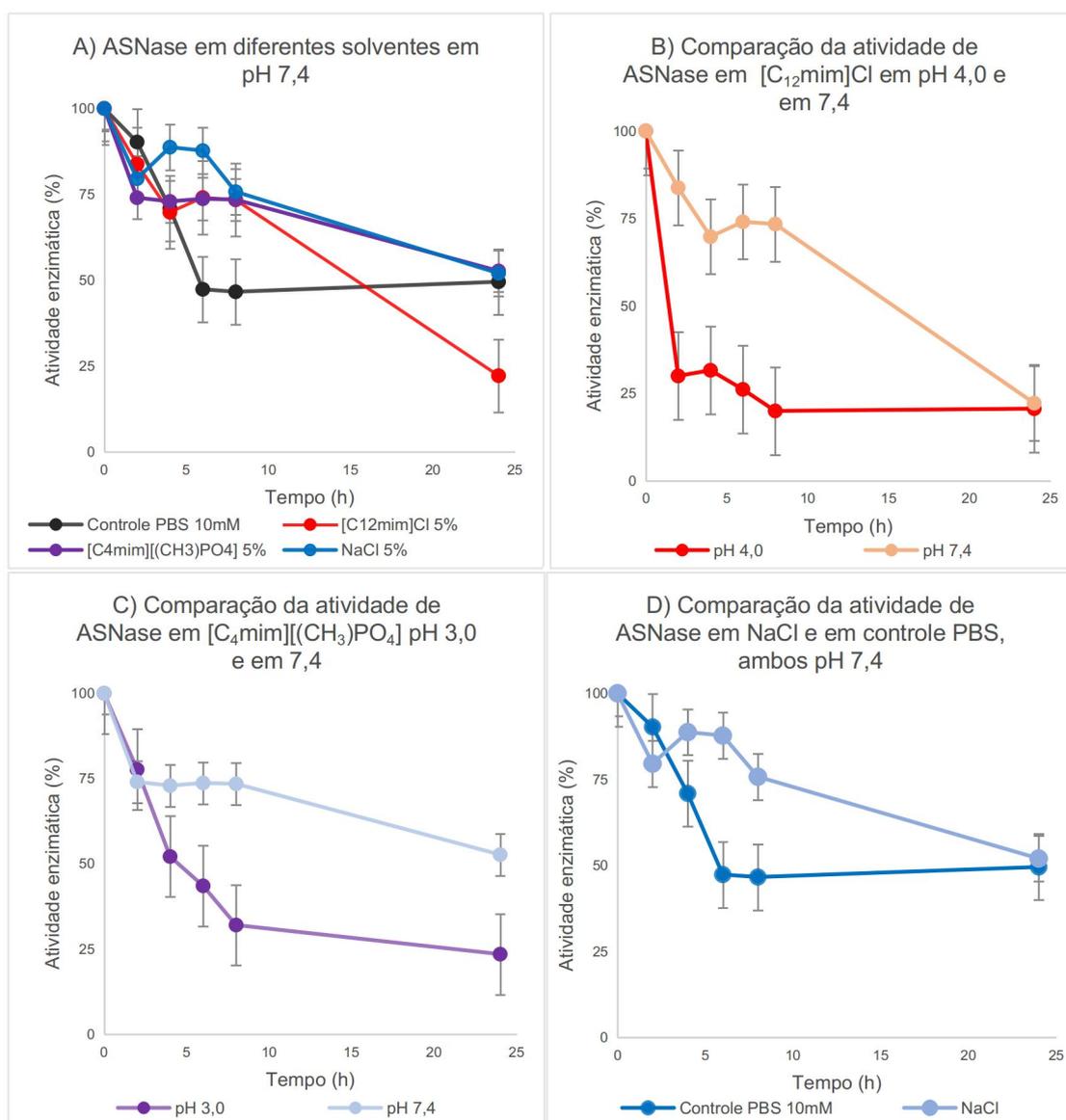


Figura 10. Influência do controle do pH na atividade enzimática de ASNase. A) Atividade enzimática de ASNase em diferentes soluções a pH 7.4. B) Atividade enzimática da ASNase em [C<sub>12</sub>mim]Cl a 5% nos pHs 4,0 e 7,4. C) Atividade enzimática da ASNase em [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)PO<sub>4</sub>] a 5% nos pHs 3,0 e 7,4. D) Atividade enzimática da ASNase em controle PBS pH 7,4 e em NaCl a 5%. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Ao comparar a atividade enzimática de ASNase em tampão e em presença de NaCl (D), observa-se o efeito positivo do sal na estabilidade da enzima, sendo que até oito horas o sal atua promovendo o aumento da interação proteína-água e a redução entre a interação hidrofóbica proteína-proteína, diminuindo significativamente a agregação proteica (Paulson, McMahon & Oberg, 1998), e portanto valores superiores de atividade enzimática são observados.

### **5.3. Relação dos parâmetros solvatocrômicos e atividade relativa dos LIs de diferentes ânions**

Os parâmetros solvatocrômicos, ou de Kamlet-Tafit, como também são conhecidos, são parâmetros físico-químicos determinados através do uso de corantes, tais como 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-N-piridino)fenolato (corante de Reichardt) N,N-dietil-4-nitroanilina e 4-nitroanilina, e subsequente a utilização da espectroscopia UV-VIS. Essa escala é baseada na relação linear de energia de solvatação, constituída por três elementos,  $\alpha$  (acidez da ligação de hidrogênio),  $\beta$  (basicidade da ligação de hidrogênio) e  $\pi^*$  (polarizabilidade) (Dolan et al. 2016), sendo bem estabelecida na literatura como uma escala de polaridade (Passos, et al, 2018), podendo influenciar na estabilidade enzimática (Lv, et al, 2016). Neste trabalho, todos os dados relacionados a esses parâmetros foram obtidos da literatura. Ainda, outro fator analisado foi a diferença entre os parâmetros  $\beta$  e  $\alpha$  pois, ao analisar um sistema, as interações entre os solventes é dada pela diferença entre o número de doador e de acceptor de elétrons, que equivalem aos parâmetros solvatocrômicos  $\alpha$  e  $\beta$  (Hauru, et al., 2012). Baseado na diferença entre os parâmetros  $\beta$  e  $\alpha$ , foi investigada essa relação com a atividade enzimática de ASNase nos LIs para verificar a influência desses parâmetros na estabilidade da enzima. Para esta análise, foi utilizada a atividade relativa no tempo de 24h, pois é o período que mais se assemelha a um platô de estabilidade, e foi utilizada a concentração de 5,0% de LI.

Para o cálculo dos parâmetros, corantes distintos podem ser empregados, gerando variações entre os resultados (Rani, et al, 2011). Assim,

nessa análise foi empregado a média dos valores dos parâmetros encontrados na literatura (Tabela 4).

Tabela 5. Relação dos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  e atividade relativa dos LIs de diferentes ânions

LI	$\alpha$	$\beta$	$\pi^*$	$\beta-\alpha$	Atividade relativa (%)
[C <sub>4</sub> mim]Cl	0,49 <sup>d,g</sup>	0,83 <sup>d,e,g</sup>	1,03 <sup>d,a</sup>	0,468	50,22
[C <sub>4</sub> mim][(CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> )]	0,62 <sup>h,g</sup>	0,48 <sup>b,c,e</sup>	0,98 <sup>h,a,g</sup>	-0,035	78,97
[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ]	0,56 <sup>h,f,g</sup>	0,6 <sup>b,c,a,e,f,g</sup>	1,03 <sup>h,a,f,g</sup>	0,114	77,40
[C <sub>4</sub> mim][PO <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,48 <sup>h,f</sup>	1,12 <sup>b,c,e,f</sup>	0,96 <sup>h,a,f</sup>	0,662	23,48

a. Brandt, et al., 2013, b. Lungwitz & Spange, 2008, c. Lungwitz, Et Al, 2008 d. Hauru, 2012 e. Qin, 2016 f. Rani, Et Al., 2011 g. Lungwiza, Strehmel & Spange, 2010 h. Dados Fornecidos Experimentalmente Pelo Laboratório Path, Aveiro, Pela Dr<sup>a</sup> Mara Freire

Na Tabela 5, verifica-se que os valores de  $\pi^*$  são muito próximos entre si, também, na Figura 11 (C) pode-se notar que o parâmetro  $\pi^*$ , responsável pela polarizabilidade, não possui relação significativa com a atividade enzimática, tendo  $R^2 = 0,0009$ . Esta falta de correlação também já havia sido observada anteriormente por Lv, et al, 2016, que estudou a enzima lipase em presença de LIs da família imidazol. Os valores de  $\alpha$ , relacionados à capacidade de doação de ligações de hidrogênio, podem ser atribuída ao cátion (Rani, et al, 2011) porém a influência exercida pelos ânions proporciona uma diferença entre esses valores. O [C<sub>4</sub>mim][PO<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] possui o menor valor de  $\alpha$ , sendo, portanto, o mais propício a ser um doador de hidrogênio. Porém, é observado na Tabela 4 que os valores de  $\alpha$  são suficientemente próximos uns dos outros a ponto de a relação entre este e a atividade enzimática de ASNase gerar um  $R^2$  inferior a 0,5, podendo-se afirmar que a relação de um com o outro não é suficientemente precisa para usa-lo como um parâmetro de seleção entre enzima e LI.

Já quanto ao parâmetro  $\beta$ , que mensura a aceitação da ligação de hidrogênio, obtém-se uma clara relação linear entre esse fator e a atividade enzimática.  $[C_4mim][CF_3SO_3]$  possui o menor valor de  $\beta$  e a maior atividade enzimática. Para enzimas mais hidrofílicas, já foi observado em outros estudos (Lv, et al. 2016, Zhao, et al., 2009) que LIs com valores elevados da basicidade da ligação de hidrogênio podem favorecer a atividade enzimática. Já o mesmo não é observado em enzimas mais hidrofóbicas. Este parâmetro, portanto, pode ser utilizado para selecionar os pares enzima e LI.

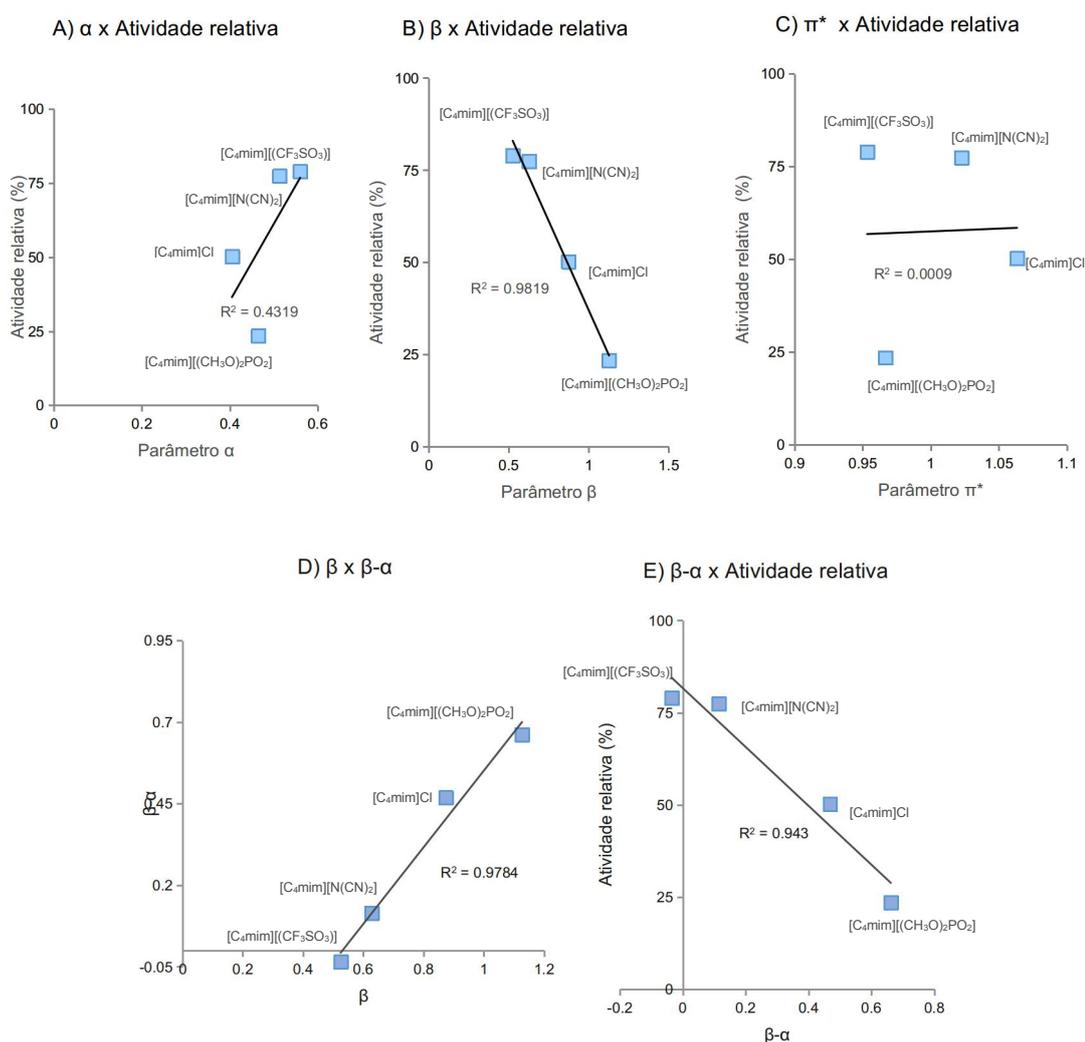


Figura 11. Relação dos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  e atividade relativa da ASNase em soluções aquosas de LIs do tipo  $[C_4mim]$  de diferentes ânions (respectivamente, os gráficos A, B, e C), D: relação entre  $\beta$  e  $(\beta - \alpha)$  e E: relação entre  $\beta - \alpha$  e a atividade relativa de ASNase em soluções aquosas de LIs com diferentes ânions.

Para quantificar a acidez e a basicidade da ligação de hidrogênio, além dos parâmetros  $\beta$  e  $\alpha$ , a diferença entre eles, definida como “basicidade líquida”, foi comparada com  $\beta$ . Os LIs de menor valor de basicidade líquida coincidem com os LIs de menor valor  $\beta$ . Há uma clara relação linear entre eles, com  $R^2$  superior a 0,95. Como constatado por Hauru, o gráfico de basicidade líquida por  $\beta$  pode prever com eficiência a resposta da enzima a um determinado LI. Foi analisada a atividade enzimática da ASNase em função da basicidade relativa, obtendo-se uma relação linear com  $R^2$  superior a 0,9, demonstrando que esta pode ser também um método consideravelmente preciso para a predição da atividade enzimática, quando a atividade for comparada entre LIs de mesmo cátion.

#### **5.4. Influência de soluções aquosas de LIs na estabilidade estrutural da ASNase**

##### **5.4.1. Ensaio de Dicroísmo Circular (CD)**

Os LIs possuem uma absorvância intrínseca, dificultando a obtenção do espectro na região *far*, entre 190 a 260 nm (Bisht, et al., 2017). Assim, para esse comprimento, apenas a ASNase pode ser observada (Fig. 12). Assim pode-se constatar que a enzima ASNase, alvo desse estudo, encontra-se íntegra, pois sua estrutura observada está de acordo com os dados encontrados na literatura (Fu, et al., 2015).

Os espectros de dicroísmo circular (CD) de ASNase em soluções aquosas de 5% dos LIs [C<sub>4</sub>mim]Cl, [C<sub>12</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>], [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] e controle PBS, são apresentados na Figura 12.

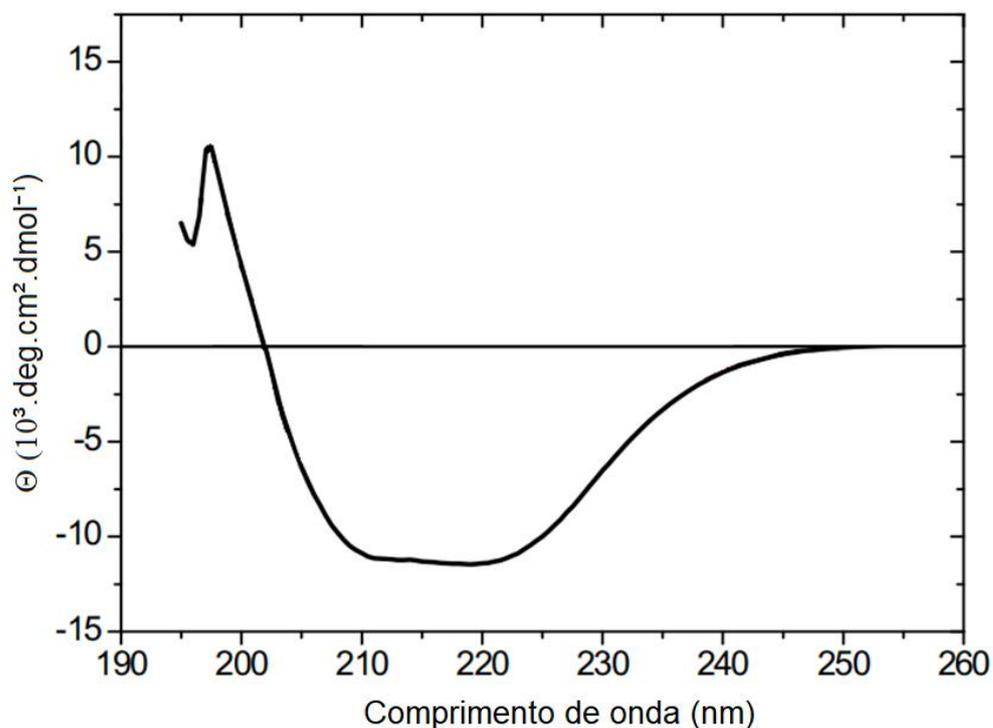


Figura 12. Espectro *far* de CDr da ASNase em PBS.

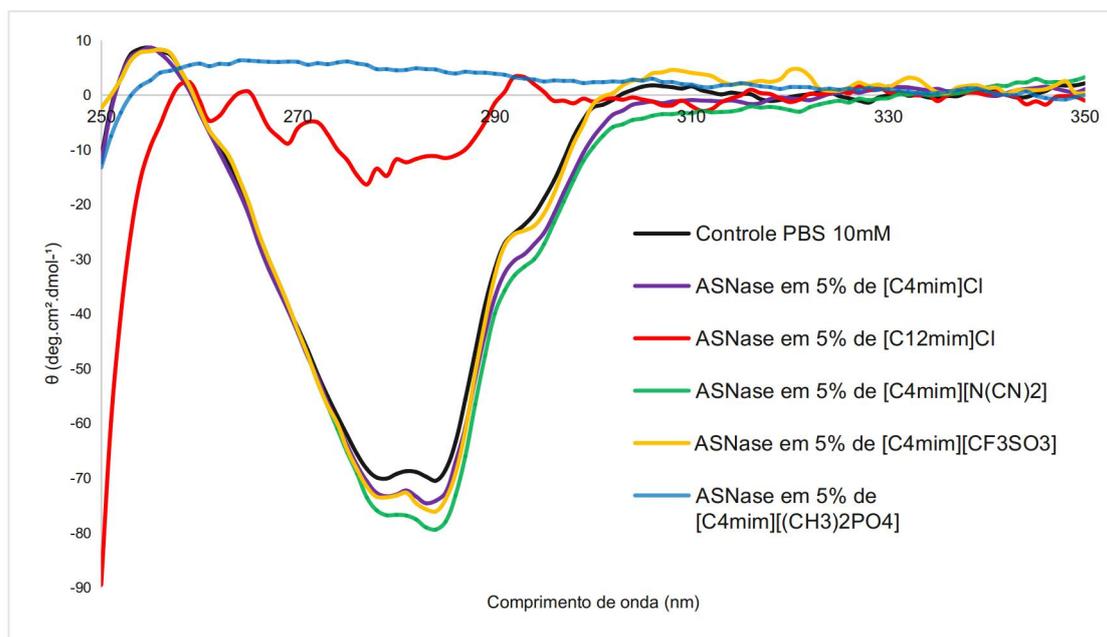


Figura 13. Espectro de CD de ASNase em tampão fosfato (PBS) como controle, em [C<sub>4</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] e [C<sub>12</sub>mim]Cl.

De acordo com o espectro de dicroísmo circular da ASNase em tampão, e em presença dos LIs [C<sub>4</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>],

obseva-se uma banda característica de estrutura de  $\alpha$ -hélice entre os pontos 275 e 285 nm, enquanto as faixas 265 a 275 e 285 a 300 nm representam a transição  $\pi$  para  $\pi^*$  da  $\alpha$ -hélice e  $\pi$  para  $\pi^*$  da  $\alpha$ -hélice ou enovelamento aleatório, respectivamente (Magri, 2019), como já havia sido observado anteriormente (Costa, et al., 2016, Faret et al., 2018, Feng, et al., 2018). No entanto, os espectros da ASNase em  $[C_{12}mim]Cl$  e em  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$  se distanciam muito dos anteriormente descritos, podendo-se afirmar que estes desestabilizam a estrutura enzimática. O  $[C_{12}mim]Cl$  interage com as porções hidrofóbicas da enzima, favorecendo o seu desenovelamento e consequente desnaturação. Já o LI  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$  atua nas porções hidrofílicas da enzima, causando o mesmo efeito desenovelador e desnaturante, obtendo-se, portanto, espectros sem as definições características da estrutura da ASNase.

É possível, ainda, constatar uma diferença nos espectros da ASNase em  $[C_4mim]Cl$ ,  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ ,  $[C_4mim][N(CN)_2]$  e PBS, que apresentaram diferentes intensidade na faixa de 275 a 285nm, sendo a mais intensa a ASNase em PBS, seguida da ASNase em  $[C_4mim]Cl$ ,  $[C_4mim][CF_3SO_3]$  e por fim  $[C_4mim][N(CN)_2]$ . O inverso dessa ordem é muito semelhante à obtida nos ensaios de atividade de ASNase, divergindo apenas na ordem dos LIs  $[C_4mim][CF_3SO_3]$  e  $[C_4mim][N(CN)_2]$ . Resultado semelhante já havia sido observado por Faret, que constatou que os espectros de menor intensidade correspondiam às concentrações de LIs nas soluções aquosas nos quais a enzima apresentava maior atividade. No entanto, apesar de haver este relato na literatura, a diferença observada nos espectros do presente trabalho (e do citado também) é desprezível e acredita-se não ser possível afirmar que houve alteração estrutural na enzima, uma vez que os picos característicos da estrutura da ASNase ainda se assemelham com o observado quando a enzima está em PBS. Kelly & Price, 2000, definem a técnica de CD como limitada e de baixa precisão, sendo melhor utilizada aliada à outras técnicas de análise estrutural. Assim, não é possível concluir precisamente que o aumento da intensidade do espectro de CD esteja de fato correlacionado com o aumento da atividade enzimática de ASNase.

#### 5.4.2. Ensaios de fluorimetria

A fluorescência é uma técnica suficientemente sensível a ponto de ser possível identificar alterações na estrutura proteica (Lakowics, et al. 2006). Portanto, na Figura 14, é possível observar a fluorescência de ASNase em diferentes soluções aquosas de LIs em diversas concentrações e seus distintos comportamentos.

Como pode ser observado na Figura 13, em PBS (linha preta nos gráficos A a E) a ASNase apresenta pico em 319 nm, como já é constado na literatura (Bushueva, Busel & Burstein, 1978) devido à presença de um triptofano em cada monômero de sua estrutura, que é tetramérica. Em A, o espectro fluorimétrico de ASNase em  $[C_4mim]Cl$  não apresentou alterações relevantes, comparadas com o controle em PBS, mesmo com o aumento da concentração de LI. Isso porque o próprio LI não possui fluorescência e as interações enzima-LI são muito semelhantes às encontrada entre enzima-tampão, como foi também observado anteriormente no espectro de dicroísmo circular. Já nos espectros fluorimétricos B, C e D de ASNase em diferentes concentrações das soluções aquosas de LIs observa-se dois pico, um na região de fluorescência da enzima (entre 310 a 340 nm), e outro que se intensifica com o aumento da concentração do LI, que representa, de fato, a fluorescência desses LIs (a partir de 340 nm). Em B (ASNase em  $[C_4mim][N(CN)_2]$ ), este último pico ocorreu em 424 nm, em C (ASNase em  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_2]$ ), em 409 nm e em D (ASNase em  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ ), ocorreu 375 nm.

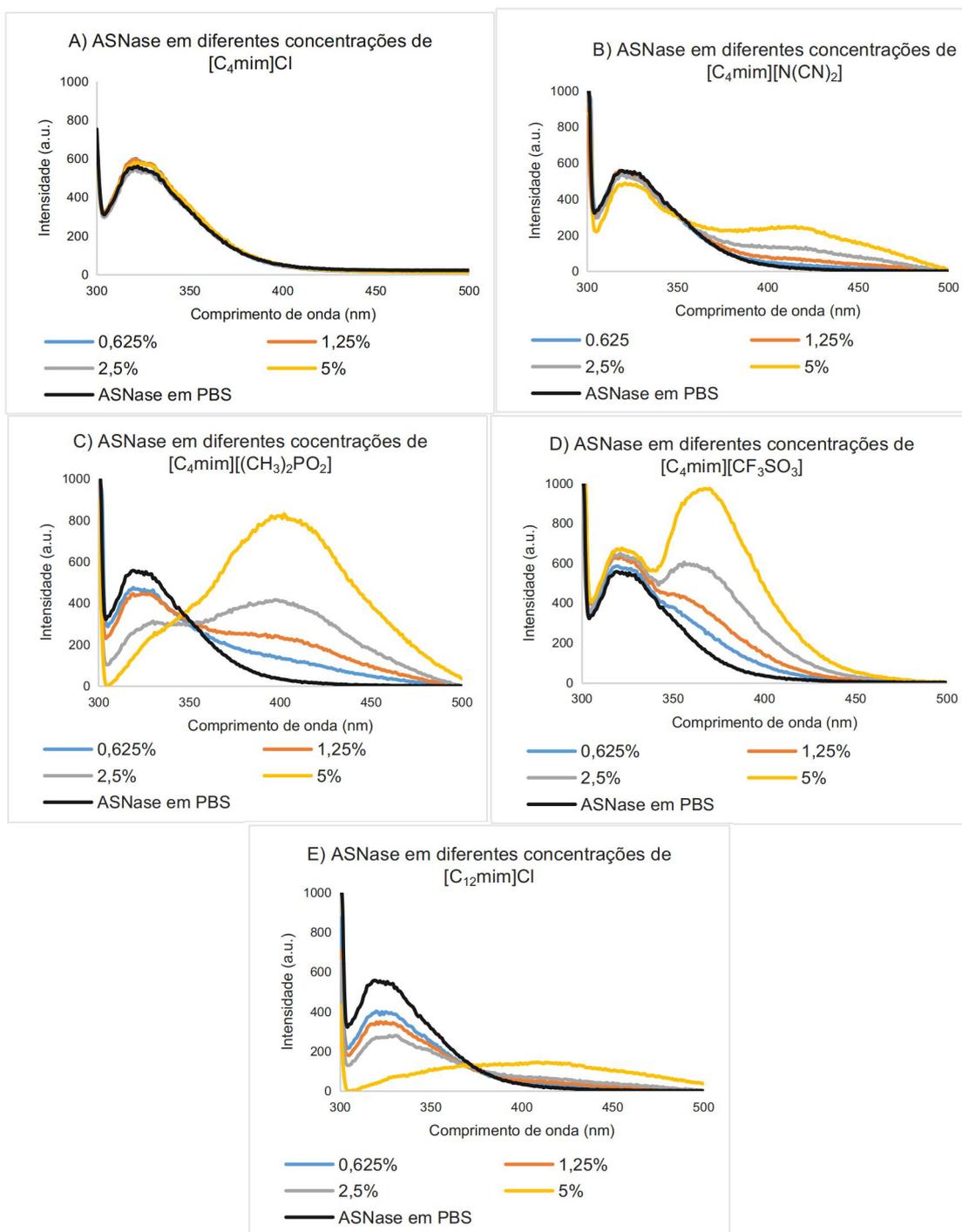


Figura 14. Fluorescência de ASNase em soluções aquosas de LIs a diferentes concentrações. A) solução de ASNase em  $[C_4mim]Cl$ ; B) solução de ASNase em  $[C_4mim][N(CN)_2]$ ; C) solução de ASNase em  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_2]$ ; D) solução de ASNase em  $[C_4mim][CF_3SO_3]$  e E) solução de ASNase em  $[C_{12}mim]Cl$ .

Quanto aos picos referentes à enzima, em B pode-se observar que estes se mantêm constantes, não sofrendo alterações de intensidade e nem

havendo deslocamento de seu pico em qualquer concentração de [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>]. Ainda, em 5% de LI, apesar de haver ligeira diminuição na intensidade da fluorescência de ASNase, esta não é suficientemente significativa a ponto de afirmar que houve interações entre o triptofano da enzima e os íons do LI. O mesmo ocorre em D. Apesar de o pico da fluorescência de ASNase aumentar de intensidade conforme aumenta a concentração de [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] no meio, isso ocorre porque, ao analisar as fluorescências desse LI isoladamente e nessas mesmas concentrações, observa-se uma fluorescência na mesma região do pico da ASNase. Assim, ao aumentar a concentração desse LI, aumenta-se também sua fluorescência que, somada com a da enzima, resulta na falsa impressão de aumento da sua intensidade. Portanto, com os LIs [C<sub>4</sub>mim]Cl, [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], através dos ensaios de CD e de fluorescência, pode-se afirmar que a integridade da enzima foi mantida em todas as condições estudadas, não havendo qualquer mudança estrutural na região dos triptofanos, região alvo na análise dessa fluorescência, e nem nas estruturas terciárias e quaternárias da enzima, que foram observadas nos comprimentos de onda correspondentes ao *near*. No entanto, ainda é possível que uma ligeira mudança conformacional da estrutura proteica tenha ocorrido<sup>63</sup>, devido às interações enzima-LI, justificando as alterações da atividade enzimática de ASNase.

Já quanto ao espectro C ([C<sub>4</sub>mim][CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>), e E ([C<sub>12</sub>mim]Cl) é clara a alteração do espectro de fluorescência de ASNase pois sua intensidade é diminuída conforme há aumento da concentração de LI no meio. Assim, associando-se os dados aqui obtidos com o de CD, pode-se afirmar que a estrutura enzimática é perturbada com o aumento da concentração desses LIs no meio, até sua completa desnaturação.

Ainda, há estudos na literatura sobre o uso de fluorescência para analisar a efetividade da micelização de um determinado composto utilizando um marcador fluorescente (Subuddhi & Mishra, 2007). Tendo isso em vista, é possível que no caso o LI [C<sub>12</sub>mim]Cl, de modesta fluorescência, sendo muito anfílico, recobriu os monômeros da enzima, resultantes da desnaturação causada pelo seu efeito detergente, mantendo toda sua superfície protegida,

impedindo sua fluorescência. Consequentemente, a fluorescência observada corresponde aos resíduos expostos à água, que são em sua maioria referentes aos do LI. Assim, a fluorescência obtida se refere ao [C<sub>12</sub>mim]Cl, e não mais à ASNase. Outra hipótese para a diminuição da fluorescência da enzima na solução desse LI, que também pode abranger o [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>], é que o anel indol do aminoácido triptofano da ASNase transfere seus elétrons excitados para o anel imidazol, que é elétron deficiente, fazendo com que a fluorescência da proteína diminua com o aumento da concentração de LI na solução (Lakowics, et al, 2006). Porém isso não explicaria a mudança brusca no comportamento da fluorescência de na concentração mais alta de [C<sub>12</sub>mim]Cl (5%).

#### **5.6. Estudo da influência de soluções aquosas de LIs na cinética enzimática de ASNase**

Este estudo foi realizado apenas com os dois LIs que potencializaram a atividade enzimática da ASNase, a fim de avaliar se houve diferença nos parâmetros cinéticos da enzima. Assim, a ASNase foi avaliada em PBS e em soluções de 5% de [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>] e de [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>]. Os parâmetros cinéticos foram obtidos através do método acoplado ao NADH, descrito anteriormente por Balcão, et al, 2001. Foram utilizadas diferentes concentrações de asparagina para a determinação da cinética enzimática (velocidade enzimática por concentração de substrato), e a velocidade inicial foi calculada através de regressão não-linear utilizando o software Graphic Pad Prism. Os gráficos obtidos na Figura 15 demonstram que, para as três situações, a enzima apresentou um perfil hiperbólico, característico de uma enzima Michaeliana, com R<sup>2</sup> superior a 0,98. Os parâmetros cinéticos encontram-se na Tabela 5, onde é possível observar os valores de k<sub>M</sub> (constante Michaelis-Menten) na faixa µM, como previamente descrito na literatura<sup>11,66</sup>. O valor de k<sub>cat</sub> representa a “constante de renovação”, isto é, o número de moléculas (mol) de produto originadas por uma molécula de enzima em um determinado tempo (minuto), enquanto que a razão entre essas duas constantes (K<sub>cat</sub>/k<sub>M</sub>) corresponde à constante de especificidade,

que mede quão eficiente é a catálise enzimática em baixas concentrações de substrato (Weibels, et al. 2012).

Observando os valores obtidos na Tabela 5, pode-se observar que há uma tendência na melhora da cinética de ASNase em LIs, porém, apesar de ser significativa, não é possível afirmar que seja relevante, pois as variações encontram-se muito próximas, dentro da mesma casa decimal. Portanto, pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre o perfil cinético da ASNase em PBS e em presença dos dois LIs investigados.

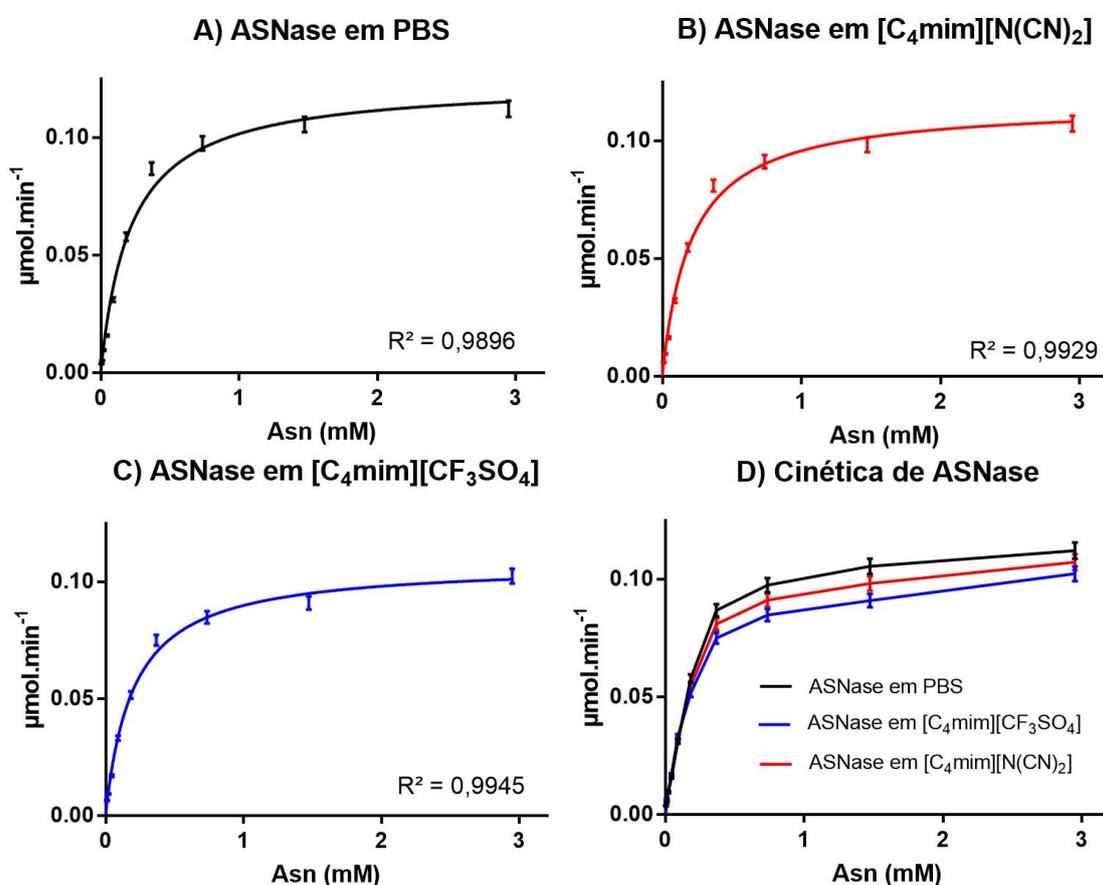


Figura 15. Gráficos de cinética de ASNase em diferentes meios. A) Perfil enzimático de ASNase em PBS (controle); B) Perfil enzimático de ASNase em  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{CF}_3\text{SO}_4]$  e C) Perfil enzimático de ASNase em  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{N}(\text{CN})_2]$ .

Tabela 6. Parâmetros cinéticos de ASNase em distintas condições.

	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$k_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/k_m$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )
<b>ASNase em PBS</b>	1,236 $\pm$ 0,019	21,77 $\pm$ 0,01	68,67 $\pm$ 0,13	3,154340836
<b>ASNase em [C4mim][CF3SO]</b>	1,079 $\pm$ 0,009	20,17 $\pm$ 0,01	59,95 $\pm$ 0,083	2,972235994
<b>ASNase em [C4mim][N(CN)2]</b>	1,158 $\pm$ 0,004	21,03 $\pm$ 0,01	64,32 $\pm$ 0,10	3,058487874

### 5.7. Influência da remoção das soluções aquosas de LIs da atividade e estabilidade de ASNase

A recuperação de enzimas após exposição às soluções aquosas de LIs é importante para que elas continuem proporcionando atividade catalítica mesmo após remoção do meio com LIs. Para a ASNase, é observado na Figura 15 que a atividade enzimática é recuperada em sua grande parte após remoção dos LI não desnaturantes, ou seja LIs mais hidrofílicos, nos quais a enzima apresenta melhor estabilidade, com destaque principal para o [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], cuja atividade de ASNase após remoção do LI é semelhante ao controle. Já quanto à atividade da enzima após a remoção dos LIs mais hidrofóbicos, como [C<sub>12</sub>mim]Cl, pode-se observar significativa perda de atividade, passando de 23% para apenas 3%, devendo-se à desnaturação irreversível causada pelo efeito detergente.

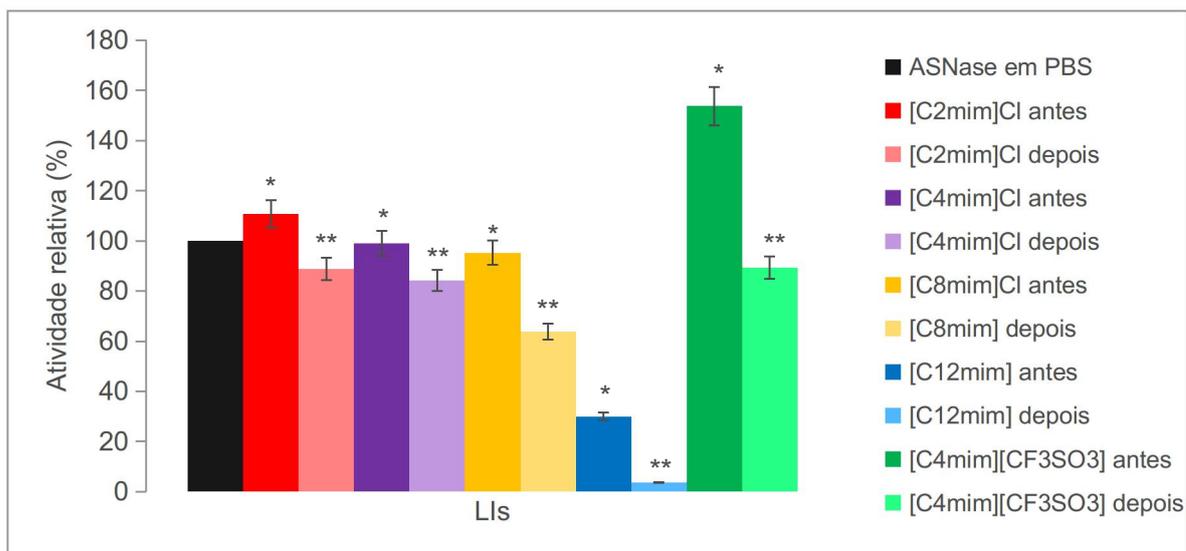


Figura 16. Comparação da atividade de ASNase antes e após a remoção das soluções aquosas de LIs. As barras de erro representam os desvios padrão e \* é significativamente diferente de \*\*.

Avaliando-se a Figura 16 em conjunto com os dados de CD da Figura 17, observa-se que a ASNase manteve sua integridade estrutural para todos os casos após a remoção da solução aquosa de LI. O rendimento da ASNase recuperada de [C<sub>8</sub>mim]Cl foi inferior aos LIs mais hidrofílicos, refletindo no espectro de CD, onde é possível verificar a integridade enzimática, porém com menos concentração. Assim, a atividade relativa de ASNase após a remoção desse LI também foi prejudicada. Essa perda de rendimento se deve a desnaturação enzimática, que foi menos agressiva que a observada em [C<sub>12</sub>mim]Cl, por ser menos hidrofóbico. Isso é confirmado pois não foi possível observar a ASNase recuperada da solução aquosa de [C<sub>12</sub>mim]Cl por CD devido à sua baixa concentração, resultado do forte perfil desnaturante do LI, que dividiu a estrutura tetramérica da enzima em monômeros, que foram filtrados durante o processo de remoção do LI.

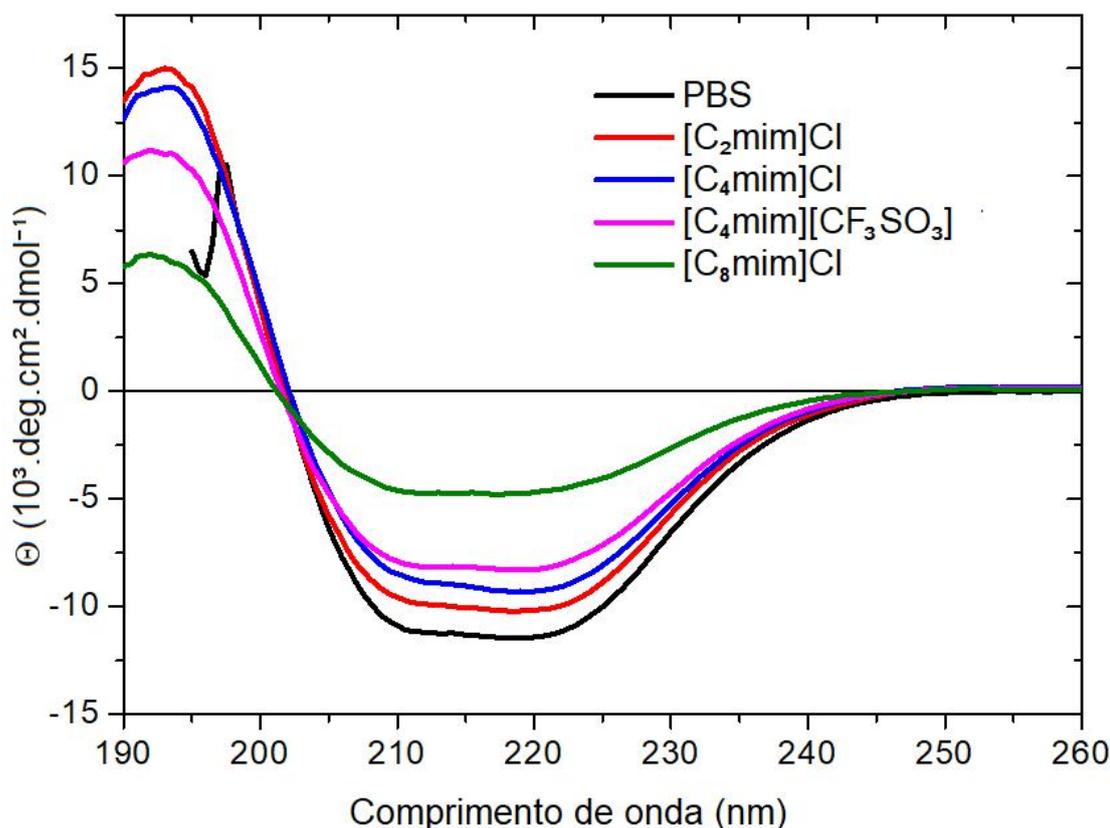


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular de ASNase após a remoção das soluções aquosas de LIs.

### 5.8. Estabilidade de ASNase em soluções aquosas de LIs ao longo do tempo

A análise da estabilidade enzimática ao longo do tempo em condições ambiente e refrigerada é um processo muito importante para avaliar as propriedades e aplicações industriais de enzimas (Ulbert, et al, 2004). Para a ASNase, pode-se observar na Figura 17 que a atividade em PBS a 25°C apresentou declínio muito acentuado, sendo que a enzima perdeu sua atividade completamente até o 21º dia, provavelmente em resultado da agregação proteica. As demais soluções em 25°C permaneceram com atividade por tempos significativamente superiores, sendo que em 28 dias, as duas soluções aquosas de LIs apresentavam ainda 50% da atividade. Essa manutenção da atividade enzimática em LIs já foi descrita na literatura anteriormente por Zou, et al., 2014 e Fujita, et al., 2006 referindo-se ao

citocromo-c, em tempos de até três meses. O melhor perfil de atividade foi observado em  $[C_4mim][CF_3SO_3]$  em temperatura refrigerada de 4°C sendo que 60% da atividade foi mantida em um período de 110 dias.

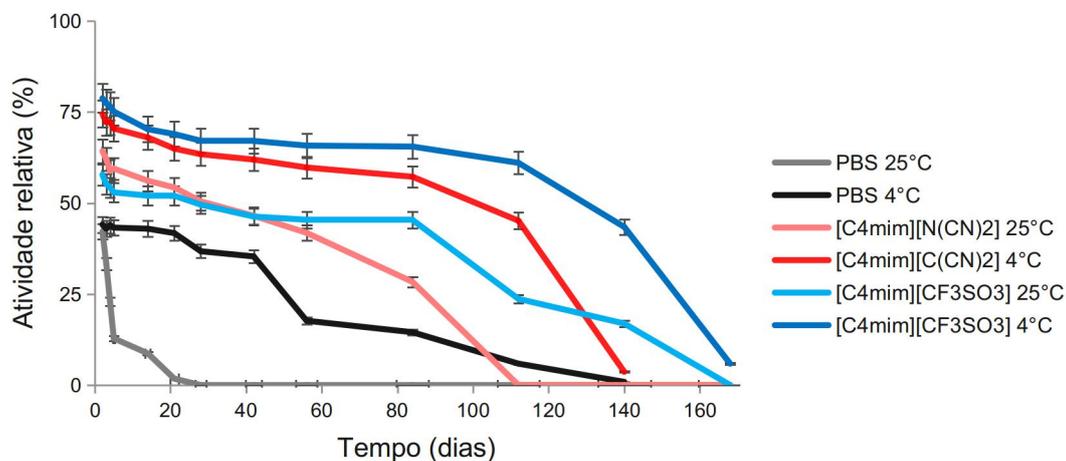


Figura 18. Atividade de ASNase ao longo do tempo em 4° e em 25°C, em diferentes solventes. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

A integridade enzimática em solução aquosa se altera quando a enzima é exposta a um longo período de tempo em temperatura ambiente. Esse efeito também é observado quando a enzima é mantida em refrigeração, porém em menor grau (Bisht, et al, 2013). No entanto, como já discutido anteriormente, soluções aquosas de LIs proporcionam à enzima maior estabilidade devido a interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Assim, os LIs  $[C_4mim][CF_3SO_3]$  e  $[C_4mim][N(CN)_2]$  promovem maior estabilidade e conseqüentemente a manutenção da atividade de ASNase. Portanto, o armazenamento de ASNase nas soluções aquosas desses LIs selecionados pode reduzir a agregação da enzima em soluções aquosas quando armazenada em temperaturas ambiente e refrigerada.

### 5.9 PEGuilação *N*-terminal de ASNase em LIs

A reação de PEGuilação ocorre através da ligação covalente de uma cadeia de PEG a uma estrutura, no caso, a enzima ASNase. Essa ligação

ocorre através de um ataque nucleofílico da amina da proteína ao PEG reativo. Assim, para que esta reação seja sítio específica ao *N*-terminal, é necessário selecionar a amina da proteína que protagonizará este ataque nucleofílico através da protonação dos demais resíduos amínicos da proteína, garantindo suas indisponibilidades para a reação. Essa seleção do grupamento ocorre numa faixa de pH próxima à qual o grupamento amínico *N*-terminal encontra-se desprotonado e acima do pKa dos demais resíduos (Pasut & Veronese, 2012). O resíduo *N*-terminal da ASNase apresenta pKa 7,7, enquanto que as demais lisinas apresentam valores de pKa de 10,3-12,0, garantindo a especificidade da reação *N*-terminal (Meneguetti, 2019). Assim, a faixa de pH escolhida para este estudo foi 7,5-8,5.

Os LIs escolhidos para este estudo foram [C<sub>4</sub>mim]Cl, que proporcionou à enzima atividade semelhantes ao controle, [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], que melhoraram a atividade enzimática ao alterarem ligeiramente sua conformação, e [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] que, embora apresente perfil desnaturante, em estudos anteriores ainda não publicados por este grupo de pesquisa resultou em ótimo rendimento (acima de 90%) para reação de PEGuilação de citocromo-C, quando na presença de 100% deste LI.

Como o objetivo deste estudo é a substituição de parte do meio reacional, que é aquoso, por LI, a fim de obter melhores rendimentos reacionais, foram estudadas três condições diferentes para as concentrações de LIs: 25, 50 e 75%. Ainda, as reações também foram analisadas em três tempos distintos, 10, 20 e 30 minutos, uma vez que o tempo de reação também interfere na hidrólise do m-PEG-NHS (Vaillard, et al., 2018). Em suma, as condições analisadas foram: concentrações de 25, 50 e 75% dos LIs [C<sub>4</sub>mim]Cl; [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>]; tempos de 10, 20 e 30 minutos e nos pH 7,5; 8,0 e 8,5, com a razão molar PEG:proteína 25:1. Os dados foram comparados com o controle obtido da literatura (Meneguetti, 2019).

Uma amostra de cada reação foi observada em gel de eletroforese SDS-PAGE e analisada pelo software ImageJ e foi utilizado o software Minitab para o cálculo e tratamentos estatísticos dos dados obtidos. Com isso foi

observado que todas as variáveis (tempo, concentração e pH) foram significativas, obtendo  $\alpha$  de 0,05. Assim, todas essas condições colaboram para o rendimento da reação de PEGuilação.

Como a ASNase é um tetrâmero de aproximadamente 140kDa, ao ser desnaturada, os monômeros formados possuem em torno de 40kDa. Assim, somando-se com o PEG de 10kDa, espera-se um tamanho aproximado de 50 kDa, mas as bandas de proteína peguilada corresponderam a aproximadamente 60 kDa. Tal fato ocorre por conta da formação de um complexo entre PEG-SDS que torna a migração da proteína peguilada mais lenta (Zheng, Ma & Su, 2007). Portanto, para questões de ajustes, recomenda-se considerar como a proteína tendo o dobro da massa de PEG a ela ligado (Brocchini et al., 2006), ou seja, aproximadamente 60kDa no presente caso.

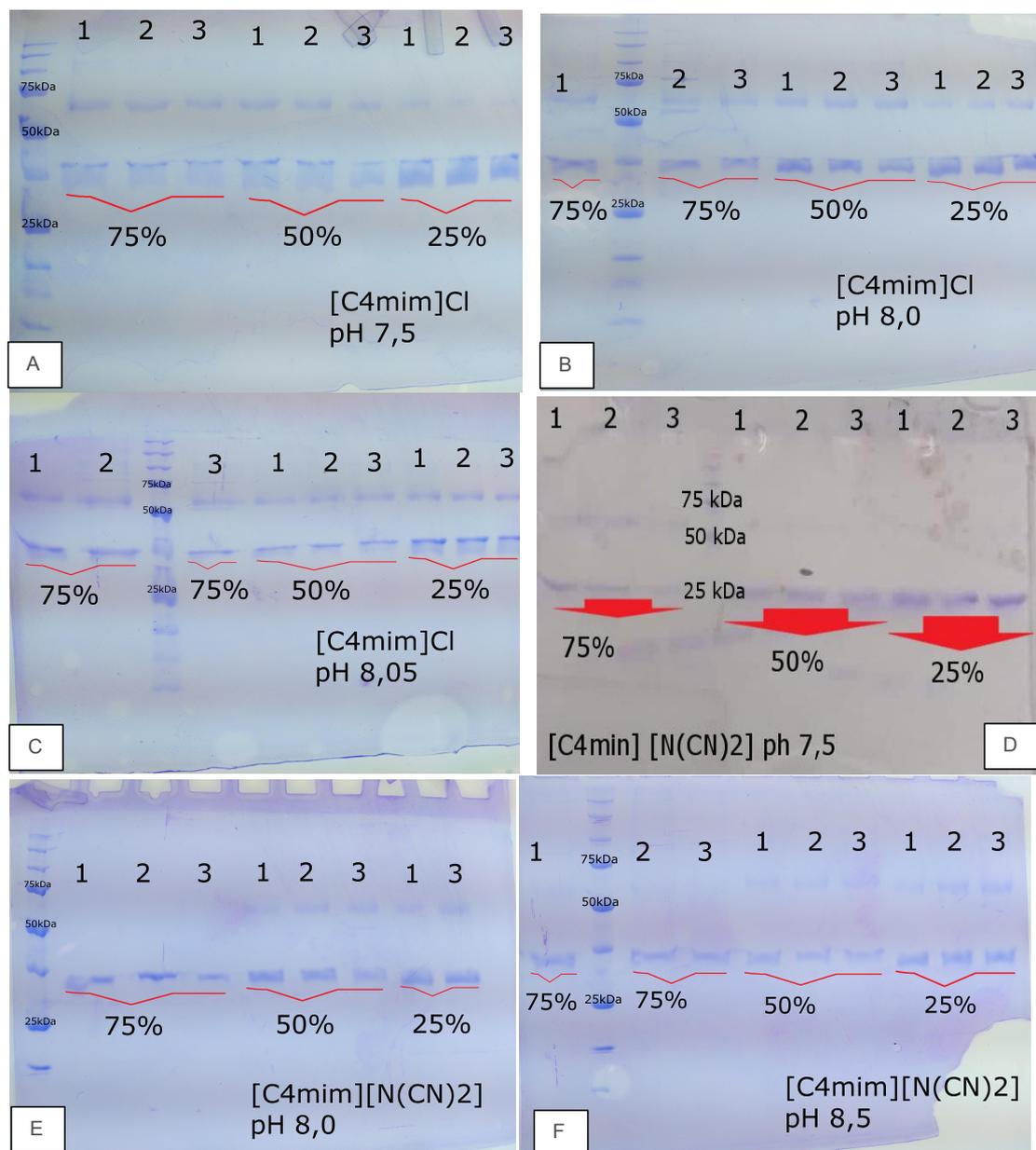


Figura 19. PEGuilação da ASNase no diferentes meio utilizados. Os números 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, aos tempos de 10, 20 e 30 minutos. A: peguilação de ASNase em [C4mim]Cl, pH7,5; B: peguilação de ASNase em [C4mim]Cl, pH8,0; C: peguilação de ASNase em [C4mim]Cl, pH8,5; D: peguilação de ASNase em [C4mim][N(CN)<sub>2</sub>], pH7,5; E: peguilação de ASNase em [C4mim][N(CN)<sub>2</sub>], pH8,0; F: peguilação de ASNase em [C4mim][N(CN)<sub>2</sub>], pH7,5;

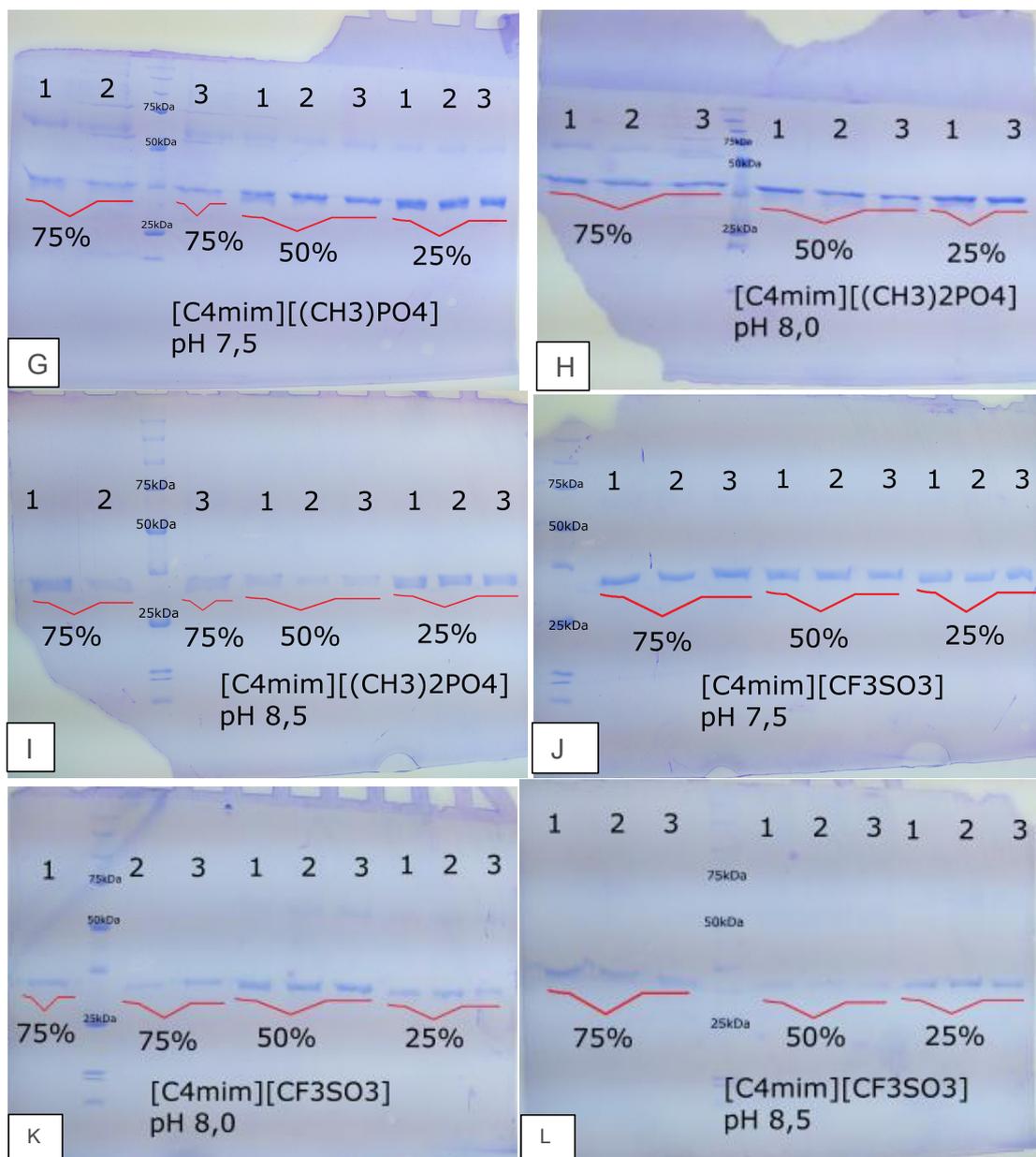


Figura 20. PEGuilação da ASNase no diferentes meio utilizados. Os números 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, aos tempos de 10, 20 e 30 minutos. G: peguilação de ASNase em  $[C_4mim][(CH_3)PO_4]$ , pH7,5; H: peguilação de ASNase em  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$ , pH8,0; I: peguilação de ASNase em  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$ , pH8,5; J: peguilação de ASNase em  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ , pH7,5; K: peguilação de ASNase em  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ , pH8,0; L: peguilação de ASNase em  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ , pH8,5.

É observado na Tabela 7 que as soluções aquosas de LIs que obtiveram melhores rendimentos de peguilação foram  $[C_4mim][(CH_3)PO_4]$  e  $[C_4mim]Cl$ , com rendimentos de 56 e 49% respectivamente. Esses resultados

sugerem que o ânion  $\text{Cl}^-$ , por ser ligeiramente básico, altera o equilíbrio de dissociação da água, deslocando para a formação de  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}^+$ , aumentando a formação de prótons capazes de serem ligados ao grupamento éster no PEG, colaborando com a formação de carbocátions que poderão se ligar nucleofilicamente à amina da proteína. Vale ressaltar ainda que o rendimento obtido por esse LI é comparável ao controle (50%, Meneguetti, et al., 2019). Isso não é surpresa ao observar o comportamento da enzima neste LI nos estudos realizados anteriormente, em que é possível constatar que a enzima sempre apresentou perfis, tanto de estabilidade quanto estrutural, semelhantes ao tampão PBS. Por meio dos estudos realizados, também é possível concluir que este LI promove um meio reacional próximo ao PBS, resultando em rendimentos comparáveis.

Quanto ao  $[\text{C}_4\text{mim}][(\text{CH}_3)\text{PO}_4]$ , efeito semelhante ao mecanismo de peguilação também ocorre, porém, sendo mais eletronegativo, o deslocamento para a formação da hidroxila e do próton é mais acentuado, aumentando a formação de carbocátions susceptíveis ao ataque nucleofílico a enzima. No entanto o seu segundo melhor rendimento para a solução é de 40%, indicando que a proteína é instável neste LI. Assim, uma hipótese levantada para o elevado rendimento inicial se deve ao fato de que, quanto mais a enzima for exposta a este LI, mais sofrerá desnaturação por conta das ligações polares provenientes deste solvente. Portanto, o aumento do rendimento nessas condições pode ser devido ao início do desdobramento da enzima decorrente do contato com o LI. Ao iniciar sua desenovelção, sítios amínicos da ASNase ficaram mais expostos ao meio, favorecendo a desprotonação e ao ataque nucleofílico ao m-PEG-NHS.

Tabela 7 – Condições definidas como mais favoráveis para a PEGuilação *N*-terminal da ASNase em diferentes meios.

[C4mim][(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]				[C <sub>4</sub> mim]Cl			
Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)	Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)
10	7,5	75	56	10	7,5	75	49
10	8	75	40	30	7,5	75	47
30	7,5	75	39	30	7,5	50	47
20	7,5	75	30	20	7,5	50	42
20	8	75	18	30	8,5	50	41

[C <sub>4</sub> mim][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]				[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ]			
Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)	Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)
30	8	25	34	10	7,5	50	41
20	8,5	50	18	30	7,5	75	40
20	8	25	18	20	8,5	50	39
30	8,5	50	15	20	7,5	75	35
30	8	50	14	30	8	50	35

Já os melhores rendimentos das soluções aquosas de [C<sub>4</sub>mim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] e [C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>] foram 40 e 34% respectivamente. Ambos LIs têm perfis semelhantes, e suas bases conjugadas, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N(CN)<sub>2</sub><sup>-</sup> são muito fracas, alterando o equilíbrio de dissociação da água para a formação de prótons. Porém, diferentemente do que ocorre com Cl<sup>-</sup> e com o (CH<sub>3</sub>)PO<sub>4</sub>, há uma formação acentuada de prótons no meio, desestabilizando o sistema por

conta do aumento da hidrólise do PEG resultante do ataque nucleofílico do éster ao  $H^+$  do meio.

Também pode-se verificar que para os maiores rendimentos nas reações de PEGuilação nas soluções de  $[C_4mim]Cl$ ,  $[C_4mim][N(CN)_2]$  e  $[C_4mim][(CH_3)PO_4]$ , foi necessário o menor tempo, 10 minutos, enquanto que para a solução de  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ , foi de 30 minutos. No entanto, para os demais rendimento o tempo não parece influenciar tanto, pois bons rendimento (acima de 40%) nas reações com  $[C_4mim]Cl$  também são obtidos nos tempo de 20 a 30 minutos também. Ao contrário, é interessante observar que para os cinco melhores rendimentos obtidos de cada reação, com exceção do  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ , os meio mais propícios para o aumento do rendimento foram em maiores concentrações de LIs (50-75%), o que significa que a concentração de LI interfere no rendimento reacional, como esperado por conta da hidrólise sofrida pelo m-PEG-NHS em ambiente aquoso. Isso se deve ao fato de que, apesar de possuírem uma natureza iônica, os LIs também apresentam uma porção hidrofóbica, com cátions de cadeia de quatro carbonos que proporciona ao m-PEG-NHS uma proteção contra a hidrólise através da formação de agregados transitório com essas estruturas, diminuindo a quantidade de ésteres hidrolisáveis (Vaillard, et al., 2018). Ainda como esperado, o pH foi outro fator que exerceu grande influência na reação. Novamente, com exceção do  $[C_4mim][CF_3SO_3]$ , os pHs predominantes para as melhores reações foram de 7,5 a 8,0, coincidindo com o perfil de uma reação pH dependente, onde é necessário um controle rigoroso desse fator para manter desprotonado o *N*-terminal e impedir o ataque nucleofílico do PEG, causando sua hidrólise.

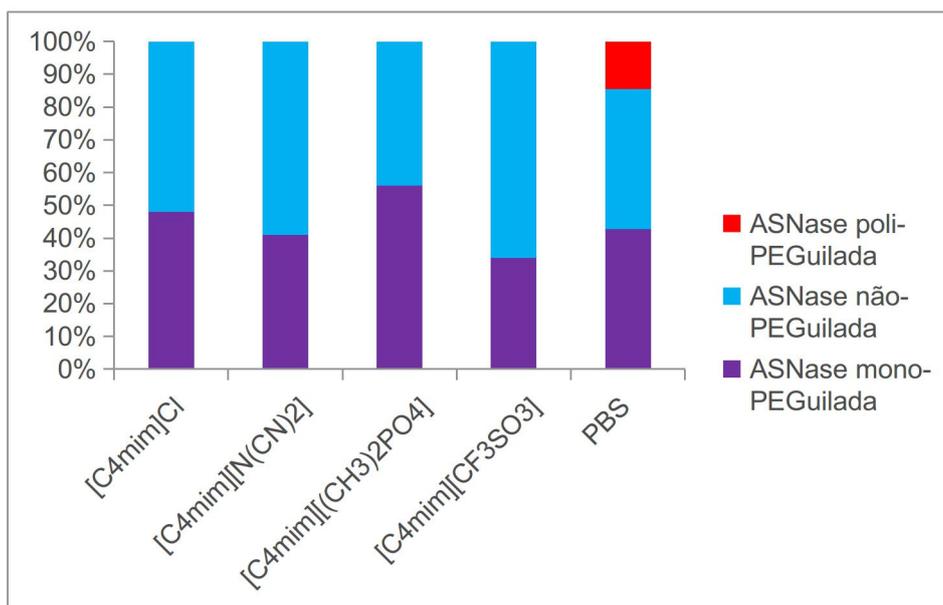


Figura 21- Rendimento em ASNase monoPEGuilada, porcentagem de ASNase que não reagiu e porcentagem de formas polipeguladas, com base na análise de intensidade das bandas no gel de SDS-PAGE, para as melhores condições de PEGuilação em cada líquido iônico.

Cabe ainda destacar que nas reações realizadas em soluções aquosas de LIs não foi observado o aparecimento das formas polipeguladas, como ASNase di ou tri-PEGuilada, o que apesar do controle do pH ainda ocorre nas reações em PBS. Portanto, o uso de LIs como co-solventes para as reações de PEGuilação minimiza a formação de sub-produtos o que poderá facilitar os processos de purificação da enzima PEGuilada e o controle lote-a-lote.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho investigou-se a estabilidade da enzima ASNase frente a LIs da família imidazol, bem como a possibilidade de se empregar esses LIs como solventes alternativos para a PEGuilação da enzima. Os resultados indicam que a enzima é pouco adaptada a meios hidrofóbicos, sendo desnaturada em duas horas em 10% de [C<sub>12</sub>mim]Cl. No entanto, em LIs mais hidrofílicos, como [C<sub>4</sub>mim][(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], comportamento semelhante também é observado, porém a partir de 25% do LI. O LI que se mostrou mais propensos

à estabilização enzimática foi o  $[C_4mim][N(CN)_2]$  que resultaram em aumento da atividade da ASNase em 1,5 vezes o controle, além de manter pelo menos 60% da atividade da enzima durante 110 dias em 4° C. Portanto, LIs podem vir a ser uma alternativa para preservar a atividade da ASNase em possíveis aplicações industriais, como a remoção de acrilamida.

Com relação ao emprego de LIs em reações de PEGuilação da ASNase, foi constatado que em  $[C_4mim]Cl$  obteve-se rendimentos semelhantes ao controle, 49%. Apesar de seu efeito desnaturante, o  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$  resultou no maior rendimento da reação (56%) quando empregado a 75% e a reação realizada em 10 min. Ainda é necessária uma análise mais criteriosa quanto o rendimento das reações de PEGuilação, por meio de técnicas cromatográficas, assim como também faz-se necessária a avaliação da atividade do produto obtido, comparando-se com o já encontrado na literatura.

Portanto, os LIs  $[C_4mim]Cl$  e  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$  fornecem uma alternativa viável à reação de PEGuilação pela redução na formação de espécies poliPEGuiladas, o que facilitaria os processos de purificação e permitiria maior controle lote a lote da reação, bem como pelo aumento do rendimento da reação no caso do  $[C_4mim][(CH_3)_2PO_4]$ .

Por fim, considerando que os LIs podem não apenas melhorar a qualidade da reação de PEGuilação, resultando em apenas um só produto, como aumentar o rendimento, outros LIs além dos derivados de imidazol poderiam ser investigados.

## Referências

- ARMAND, et al. Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nature Materials*, vol.8, p. 621-629, 2009.
- ARMSTRONG, et al. Antibody Against Poly(Ethylene Glycol) Adversely Affects PEG-Asparaginase Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *American Cancer Society*, vol. 110, n. 1, 2007.
- ATIENZA Leucemias. *Leucemia linfoblástica aguda*. *Pediatria Integral*, v.20 p. 380-89, ; n. 6, curso. 6, 2016.
- BALCÃO, et al, 2001 - Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports
- BALCÃO, et al, 2001 - Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports
- Bisht, et al (2017). Long-term protein packaging in cholinium-based ionic liquids: improved catalytic activity and enhanced stability of cytochrome c against multiple stresses. *Green Chemistry*, 19(20), 4900–4911. doi:10.1039/c7gc02011b
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-9, 1987.
- Brandt, et al (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 15(3), 550.
- BROCCHINI, S. et al. PEGylation of native disulfide bonds in proteins. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, p. 2241–2252, 2006.
- BUSHUEVA, BUSEL & BURSTEIN, Relationship of thermal quenching of protein fluorescence to intramolecular structural mobility. *Biochimica et Biophysica Acta*, 534 (1978) 141-152
- CACHUMBA, et al., Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Braz. J. Microbiol.* vol.47 supl.1, p.77-85. 2016.
- CAZÉ BUENO & SANTOS. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. *Revista HPCA*, v. 30, n. 1, p. 5-12, 2010
- CLAÚDIO, et al., Extended Scale for the Hydrogen-Bond Basicity of Ionic Liquids. *Chem. Chem. Phys.*, 2014, DOI: 10.1039/C3CP55285C.
- COSTA, I. M. SCHULTZ, L., PEDRA, B. A. B., LEITE, M. S. M., FARSKY, S. H. P., OLIVEIRA, M. A., PESSOA, A. & MONTEIRO, G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038, 2016
- DOLAN, et al., Kamlet-Taft Solvation Parameters of Solvate Ionic Liquids. *ChemPhysChem* 10.1002/cphc.201600361. 2016.
- DRAINAS, et al. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*. n. 98, p. 493-501, 1977
- ELMAN & SILVA Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda: Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 53(3). p. 297-303, 2007.
- FARET, et al., 2018 - L-Asparaginase from *Erwinia carotovora* insights about its stability and activity. *Molecular Biology Reports* <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4459-2>
- FENG, et al., 2018 - Improvement of L-asparaginase thermal stability by regulating enzyme kinetic and thermodynamic states. *Process Biochemistry* <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.002>

- FU & SAKAMOTO. PEG-asparaginase. *Exp. Opin. Pharmacotherapy*, v.8, n.12, p.1977-84, 2007.
- Fu, et al., 2015, Development of a thermally stable formulation for L-asparaginase storage in aqueous contions, *Jornal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 122 (2015) 8-14.
- FUJITA, et al., 2006 - Unexpected Improvement in Stability and Utility of Cytochrome c by Solution in Biocompatible Ionic Liquids. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 94, No. 6, 2006
- GAO, W. W., ZHANG, F. X., ZHANG, G. X., ZHOU, C. H. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. *Biochemical Engineering Journal*. n. 99, p. 67-84. 2015.
- HARRIS & CHESS Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature*, vol. 2, p. 214-221. 2003.
- HARRIS, & CHESS. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature*, vol. 2, p. 214-221. 2003.
- HARRIS, MARTIN & MODI. Pegylation A Novel Process for Modifying Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. n. 40, v. 7. p. 539-551. 2001.
- HAURU, et al., Role of Solvent Parameters in the Regeneration of Cellulose from Ionic Liquid Solutions. [dx.doi.org/10.1021/bm300912y](https://doi.org/10.1021/bm300912y) | *Biomacromolecules* 2012, 13, 2896–2905
- Hussain, et al (2019). PEGylation: a promising strategy to overcome challenges to cancer-targeted nanomedicines: a review of challenges to clinical transition and promising resolution. *Drug Delivery and Translational Research*.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.  
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao+>>.  
Acessado em 12 de março de 2018.
- JAEGER, BURNEY & PFAENDTNER, 2015 - Comparison of Three Ionic Liquid-Tolerant Cellulases by Molecular Dynamics, *Biophysical Journal* Volume 108 February 2015 880–892
- KANG, DELUCA & LEE. Emerging PEGylated drugs. DOI: 10.1517/14728210902907847.
- KEATING, HOLMES & LERNER L-Asparaginase and PEG Asparaginase - Past, Present, and Future. *Leukemia and Lymphoma*. v. 10, p. 153-157, 1993.
- KEATING, HOLMES & LERNER. L-Asparaginase and PEG Asparaginase - Past, Present, and Future. *Leukemia and Lymphoma*. v. 10, p. 153-157, 1993.
- KELLY & PRICE, 2000 - The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein and Peptide Science*, 2000, 1, 349-384
- KINSTLER, et al. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)–protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. n. 54. p. 477-485. 2002.
- KOZLOWSKI & HARRIS. Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. *Journal of Controlled Release*. n. 72. p. 217-224. 2001.
- KURRE, et al., Pharmacoeconomic Analysis of Pegaspargase Versus Native Escherichia Coli L-Asparaginase for the Treatment of Children With Standard-Risk, Acute Lymphoblastic Leukemia: The Children's Cancer Group Study (CCG-1962). *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. v. 24, n. 3. 2002.
- Lakowics, et al., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, University of Maryland School of Medicin, Singapura, 3ª ed , 2006
- LAKS, et al. Avaliação da sobrevida de crianças com leucemia linfoblástica aguda tratadas com o protocolo de Berlim-Frankfurt-Munique. *Jornal de Pediatria*, v. 79, n. 2, p. 149-58, 2003.

LIN, CHEN & DAI, 2018  
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/material-matters/ionic-liquids-based-electrolytes-for-rechargeable-batteries.html>

LOUREIRO, et al. Purification and Biochemical Characterization of Native and Pegylated Form of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* and Evaluation of Its Antiproliferative Activity. *Advances in Microbiology*, v. 2, p. 138-145, 2012.

LUNGWITZ & SPANGE, A hydrogen bond accepting (HBA) scale for anions, including roomtemperature ionic liquids. *New J. Chem.*, 2008, 32, 392–394

LUNGWITZ, et al., New aspects on the hydrogen bond donor (HBD) strength of 1-butyl-3-methylimidazolium room temperature ionic liquids. *New J. Chem.*, 2008, 32, 1493–1499

LUNGWITZA, STREHMEL & SPANGE, 2010 - The dipolarity-polarisability of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids as function of anion structure and the alkyl chain length, DOI: 10.1039/b9nj00751b

LV, et al., Impact of ionic liquid properties on selective enrichment of glycerides in direct 1 lipase-catalyzed esterification. DOI: 10.1039/C6RA24089E. 2016

LV, et al., Impact of ionic liquid properties on selective enrichment of glycerides in direct 1 lipase-catalyzed esterification. DOI: 10.1039/C6RA24089E. 2016

Magri, Extração e Purificação do Biofármaco Antileucêmico L-Asparaginase (ASNase) utilizando Sistemas Aquosos Bifásicos com Polímeros e Líquidos Iônicos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Araraquara, São Paulo. 2019

MELO, Leucemia linfóide aguda. Universidade Paulista - UNIP, Recife, 2011

Meneguetti GP, Santos JHPM, Obreque KMT, Barbosa CMV, Monteiro G, Farsky SHP, et al. (2019) Novel site-specific PEGylated L-asparaginase. *PLoS ONE* 14(2): e0211951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211951>

Mishra, Nayak, & Dey. 2016. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 337–348.

MOHAMMADI & AMIRFAZLIE, 2004 - Effect of Surfactants on Wetting of Super-Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* 2004, 20, 9657-9662

NEHMY, et al., A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma perspectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 11, n. 3, p. 293-299, Recife, 2011.

PASSOS, et al., Hydrogen bond basicity of ionic liquids and molar entropy of hydration of salts as major descriptors in the formation of aqueous biphasic systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, DOI: 10.1039/C8CP01401A.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. *Journal of Controlled Release*, v. 161, n. 2, p. 461–472, 20 jul. 2012.

Patel N, Krishnan S, Offman M N, et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *J Clin Invest*. 2009; 119 (7): 1964–1973.

Paulson, B. M., McMahon, D. J., & Oberg, C. J. (1998). Influence of Sodium Chloride on Appearance, Functionality, and Protein Arrangements in Nonfat Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 81(8), 2053–2064.

Pfister, & Morbidelli, 2014. Process for protein PEGylation. *Journal of Controlled Release*, 180, 134–149. doi:10.1016/j.jconrel.2014.02.002

- QIN, et al., Influence of Ionic Liquids on Lipase Activity and Stability in Alcoholysis 1 Reaction. DOI: 10.1039/C6RA19181A. 2016.
- Rani, et al (2011). Understanding the polarity of ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(37), 16831. doi:10.1039/c1cp21262a
- RASHBAND, W.S., ImageJ, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>, 1997-2016.
- RIZZARI, et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Current Opinion in Oncology*, v. 25, p. S1–S9, mar. 2013
- ROBERTS, BENTLEY, & HARRIS. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 64, p. 116-127. 2012.
- RODRÍGUEZ, H. Ionic Liquids in the Context of Separation Processes. *Ionic Liquids for Better Separation Processes*, Editora Springer, Berlim, 2016
- ROGERS, R. D., SEDDON, K. R. Ionic Liquids - Solvents of the Future? *Science*, v. 302, p. 792-3, 2003
- ROTH Produção de L-asparaginase II recombinante de *Erwinia carotovora* em cultivos de *Escherichia coli* em batelada alimentada. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ROTH. Produção de L-asparaginase II recombinante de *Erwinia carotovora* em cultivos de *Escherichia coli* em batelada alimentada. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- Santos, et al (2018). Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(spe).
- Schwartz, Reeves & Broome, Two L-Asparaginases from *E. coli* and their action against tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- SIGMA-ALDRICH. M6768 SIGMA/ Methoxypolyethylene glycol 350. CAS Number 9004-74-4. 2013. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6768?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 05 de maio, 2019.
- SUBUDDHI & MISHRA, Micellization of bile salts in aqueous medium: A fluorescence study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 57 (2007) 102–107
- TANFORD, C. Theory of Micelle Formation in Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 78, n. 24, p. 2469-79. 1974.
- TAVARES, et al., (2013). New Generations of Ionic Liquids Applied to Enzymatic Biocatalysis. *Ionic Liquids - New Aspects for the Future*. doi:10.5772/51897
- Terwilliger & Abdul-Hay (2017). *Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update*. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577. doi:10.1038/bcj.2017.53
- TORRES-OBREQUE, K. M., Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de *E. chrysanthemi* para o tratamento de leucemias, Universidade de São Paulo, 2017
- TURECEK, et al PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.105(2), p.460-475, 2016.
- TURECEK, et al. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.105(2), p.460-475, 2016

ULBERT, et al, Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 31 (2004) 39–45

USA 56, 1516–1519 (1966).

Vaillard, et al., 2018, mPEG-NHS carbonates: Effect of alkyl spacers on the reactivity: Kinetic and mechanistic insights, *Journal Applied Polymer Science*, DOI: 10.1002/APP.47028

VALSTAR, Protein-Surfactant Interactions, *Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala* 2000

VERONESE, Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*. v. 22. p. 405-417. 2001

Weibels, et al. (2012). Steering the enzymatic activity of proteins by ionic liquids. A case study of the enzyme kinetics of yeast alcohol dehydrogenase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(13), 4635.

WIETCHOREK, et al. Assessment of *Zymomonas mobilis* and *Erwinia herbicola* for the anti leukaemia asparaginase pr, BBR - *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.2, n.1, p. 31-34, 2013.

Zhao H and Malhotra SV, Applications of ionic liquids in organic synthesis. *Aldrichimica Acta* 35:75–83 (2002).

Zhao, (2010). Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids-a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(7), 891–907. doi:10.1002/jctb.2375

ZHAO, et al., Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57 (2009) 149–157

ZHENG, C. Y.; MA, G.; SU, Z. Native PAGE eliminates the problem of PEG–SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation. *Electrophoresis*, v. 28, p. 2801–2807, 2007.

ZOU, et al., 2014 - Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.210>. 2014

## Anexo

Relação volume e molaridade dos Lis nas soluções estudadas:

	g/mol	0,625%	1,25%	2,5%	5%	10%	25%	50%
[C <sub>2</sub> mim]Cl	146,1	0,04 M	0,09 M	0,2 M	0,3 M	0,7 M	1,7 M	3,4 M
[C <sub>4</sub> mim]Cl	174,1	0,04 M	0,07 M	0,1 M	0,3 M	0,6 M	1,4 M	2,9 M
[C <sub>6</sub> mim]Cl	202,1	0,03 M	0,06 M	0,1 M	0,3 M	0,5 M	1,2 M	2,5 M
[C <sub>8</sub> mim]Cl	230,2	0,03 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	0,4 M	1,1 M	2,2 M
[C <sub>10</sub> mim]Cl	258,2	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	0,4 M	1,0 M	1,9 M
[C <sub>12</sub> mim]Cl	286,2	0,02 M	0,04 M	0,9 M	0,2 M	0,4 M	0,9 M	1,8 M
[C <sub>4</sub> mim][(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	264,1	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	0,4 M	1,0 M	1,9 M
[C <sub>4</sub> mim][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	276,1	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	0,4 M	0,9 M	1,8 M
[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ]	205,1	0,03 M	0,06 M	0,1 M	0,2 M	0,5 M	1,2 M	2,4 M

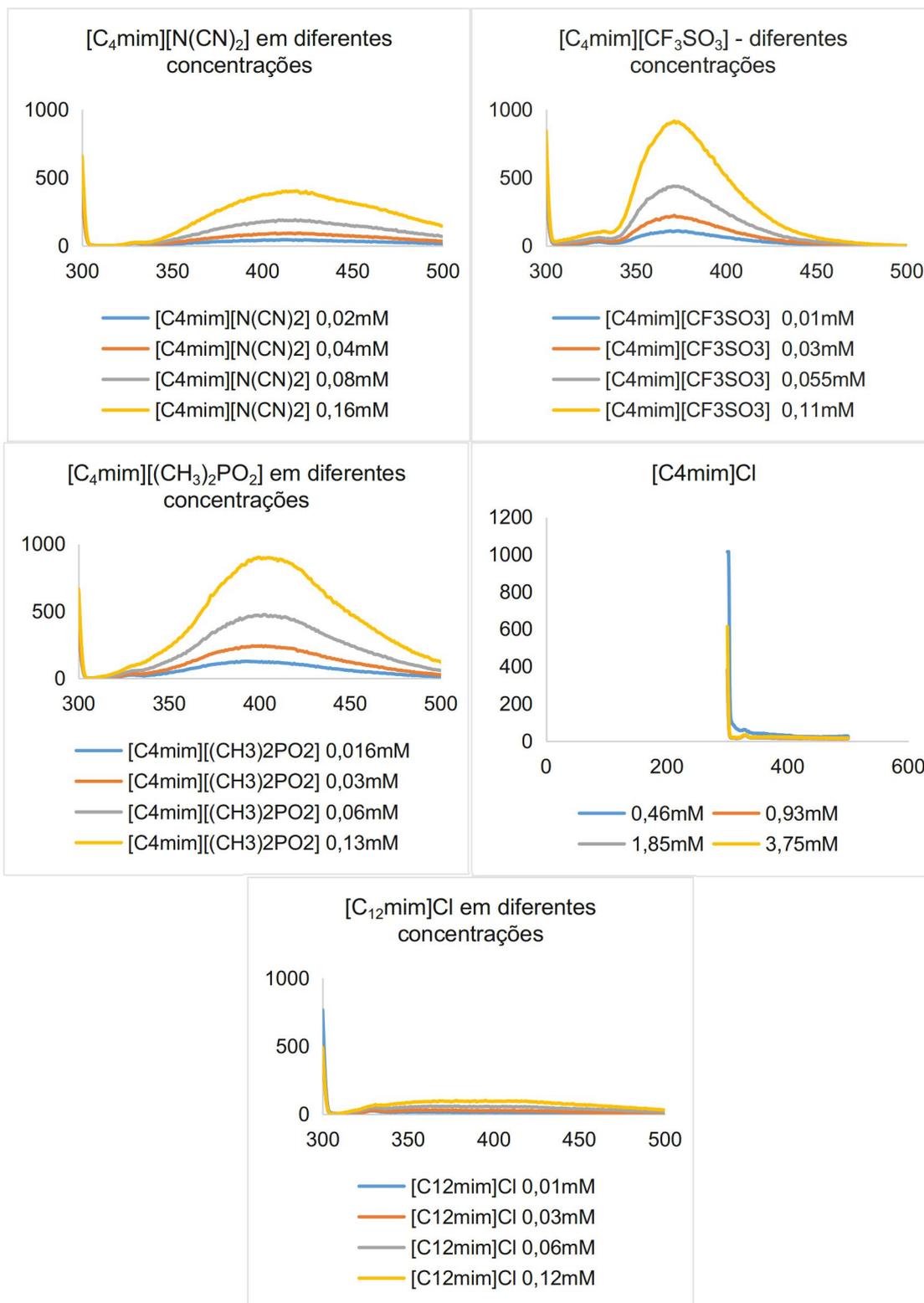
Relação da massa e da molaridade de ASNase (145kDa)

Massa (g)	Molaridade (µM)
0,1	0,7
0,33	2,2
1,0	6,9

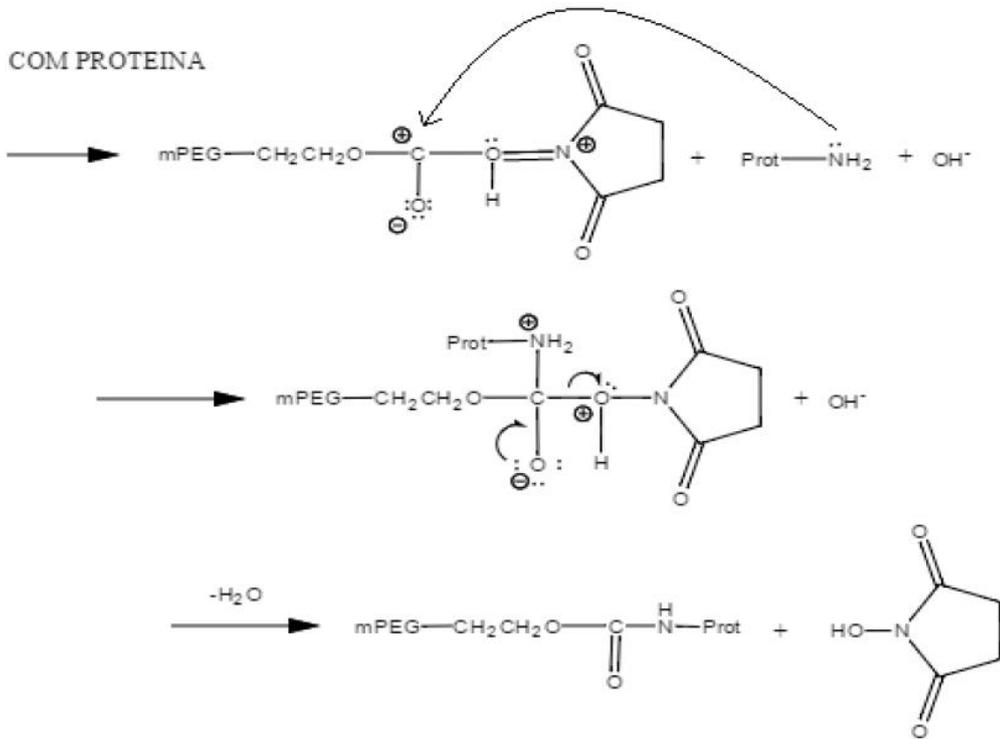
Tabela dos pHs dos Lis

[C <sub>2</sub> mim]Cl	5,0
[C <sub>4</sub> mim]Cl	7,0
[C <sub>8</sub> mim]Cl	6,0
[C <sub>12</sub> mim]Cl	4,0
[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ]	6,0
[C <sub>4</sub> mim][(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	3,0
[C <sub>4</sub> mim][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	5,0

## Fluorescência dos LIs em diferentes concentrações

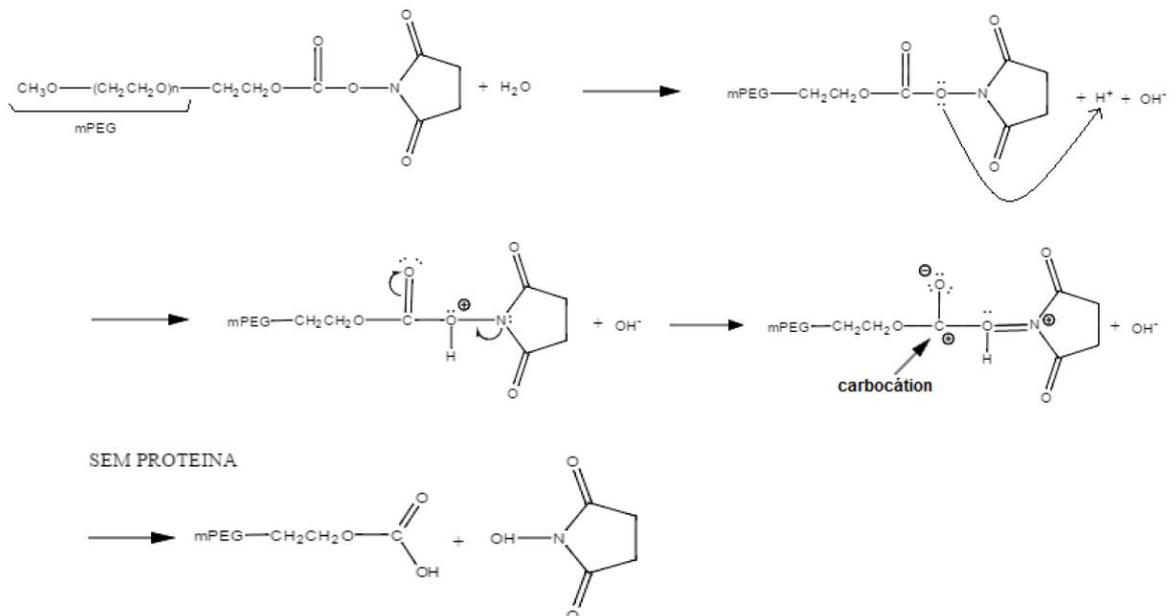


## Mecanismo de PEGuilação



## Hidrólise do PEG

### ANEXO A



Ambos mecanismos feitos por Torres-Obreque, 2017.

Rendimento das reações de PEGuilação I

[C<sub>4</sub>mim]Cl

Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)
10	8	25	8,8
20	8	25	9,1
30	8	25	12,2
10	8	50	12,5
30	7,5	25	17,6
20	7,5	25	18,9
20	8	75	20,4
10	8	75	21,4
20	8	50	21,9
30	8	75	24,9
10	8,5	25	25,4
30	8	50	26,3
10	7,5	25	27,8
10	8,5	50	27,9
20	8,5	75	28,2
20	8,5	25	28,3
10	8,5	75	31,0
30	8,5	25	33,7
30	8,5	75	35,9
20	8,5	50	36,3
10	7,5	50	38,7
20	7,5	75	40,5
30	8,5	50	40,5
20	7,5	50	42,2
30	7,5	50	46,6
30	7,5	75	46,7
10	7,5	75	48,6

Rendimento das reações de PEGuilação II

[C<sub>4</sub>mim][N(CN)<sub>2</sub>]

Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)
10	8	75	0
10	8,5	75	0
20	8	75	0
20	8,5	75	0
30	8	75	0
30	8,5	75	0
10	8,5	25	12,5
20	8,5	25	12,5
10	7,5	75	13,8
10	8	25	14,9
10	8,5	50	15,7
20	8	25	15,9
10	8	50	16,8
30	8	25	16,9
20	7,5	25	19,6
30	7,5	25	20,1
10	7,5	25	21,4
30	8,5	50	22,8
30	8,5	25	23,8
20	8	50	24,5
30	7,5	50	29,7
20	7,5	50	30,3
30	8	50	34,9
20	7,5	75	35,1
20	8,5	50	39,1
30	7,5	75	40,0
10	7,5	50	40,8

Rendimento das reações de PEGuilação III



Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)
10	8	25	0
10	8	50	0
10	8,5	25	0
10	8,5	50	0
10	8,5	75	0
20	8	25	0
20	8	50	0
20	8,5	25	0
20	8,5	50	0
20	8,5	75	0
30	8	25	0
30	8	50	0
30	8,5	25	0
30	8,5	50	0
30	8,5	75	0
20	7,5	25	3,2
30	7,5	25	3,9
10	7,5	25	6,3
20	7,5	50	8,9
30	7,5	50	10,5
10	7,5	50	11,7
30	8	75	15,9
20	8	75	18,3
20	7,5	75	30,5
30	7,5	75	38,6
10	8	75	39,6
10	7,5	75	56,2

Rendimento das reações de PEGuilação IV

[C4mim][CF3SO3]

Tempo (min)	pH	Concentração (%)	Rendimento (%)
10	7,5	25	0
10	7,5	50	0
10	7,5	75	0
10	8	75	0
10	8,5	25	0
10	8,5	75	0
20	7,5	25	0
20	7,5	50	0
20	7,5	75	0
20	8	75	0
20	8,5	25	0
20	8,5	75	0
30	7,5	25	0
30	7,5	50	0
30	7,5	75	0
30	8	75	0
30	8,5	25	0
30	8,5	75	0
10	8,5	50	3,3
10	8	50	4,2
10	8	25	11,2
20	8	50	13,4
30	8	50	13,5
30	8,5	50	14,7
20	8	25	17,8
20	8,5	50	18,0
30	8	25	33,5



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

---

9135 - 9181739/1 - Eloisa Guedes Cavichon

Email: elo\_g.o@usp.br  
Data de Nascimento: 08/06/1987  
Cédula de Identidade: RG - 34330664-5 - SP  
Local de Nascimento: Estado de São Paulo  
Nacionalidade: Brasileira  
Graduação: Farmacêutica - Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto - Minas Gerais - Brasil - 2015

---

Curso: Mestrado  
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica  
Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica  
Data de Matrícula: 03/07/2017  
Início da Contagem de Prazo: 03/07/2017  
Data Limite para o Depósito: 31/10/2019  
Orientador: Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 03/07/2017 até o presente. Email: corangel@usp.br  
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/07/2017  
Prorrogação(ões): 120 dias  
Período de 03/07/2019 até 31/10/2019  
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/08/2018  
Data do Depósito do Trabalho:  
Título do Trabalho:  
Data Máxima para Aprovação da Banca:  
Data de Aprovação da Banca:  
Data Máxima para Defesa:  
Data da Defesa:  
Resultado da Defesa:  
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 03/07/2017  
Prorrogação em 24/06/2019

---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 29/10/2019 00:09:31



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

9135 - 9181739/1 - Eloisa Guedes Cavichon

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5766-4/1	Biodisponibilidade de Medicamentos	03/10/2017	04/12/2017	90	6	81	B	N	Concluída
MPT6007-2/1	Físico-Química dos Sistemas Coloidais - Nanotecnologia de Processos Industriais (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	09/10/2017	17/12/2017	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/5	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	06/02/2018	16/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5773-8/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	05/03/2018	15/05/2018	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/4	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	25/06/2018	08/07/2018	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5821-1/4	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Avanços e Desafios no Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados para a Liberação Modificada de Fármacos)	03/09/2018	16/09/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5826-2/1	Relações entre Estrutura Química e Atividade Biológica de Compostos Bioativos e Fármacos	18/09/2018	13/12/2018	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-4/7	Aprimoramento Pedagógico	02/10/2018	29/10/2018	60	4	87	A	N	Concluída
FBT5776-5/9	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	15/10/2018	28/10/2018	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	30
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.  
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.